

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：30109

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26450050

研究課題名(和文) マメ科および核果類植物を用いたポティウイルス試験管内実験系の開発と利用

研究課題名(英文) Development of in vitro assay systems using legumes and stone fruits for analyses of potyvirus replication

研究代表者

薦田 優香 (Komoda, Yuka)

酪農学園大学・農食環境学群・講師

研究者番号：90716482

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：様々な農作物に被害を出すポティウイルスの増殖機構の分子レベルでの理解を深めるため、核果類やマメ科等自然宿主を用いた試験管内実験系の確立を目指した。試験管内実験系の確立はまだ成功していないものの、既存の試験管内系を利用し、ポティウイルスにおいて近年発見されたpipo遺伝子の発現様式の解明を行った。pipoはウイルスがコードするP3シストロンに異なる読み枠で存在し、P3のN末端側と融合したP3N-PIPOとして発現するが、その発現が、ウイルス複製酵素が起こすスリッページに起因することを明らかにした。さらに、pipoとも異なる読み枠にずれた翻訳産物、P3N-ALTの存在を新たに発見した。

研究成果の概要(英文)：Potyviruses cause diseases in many important crops. To reveal the replication mechanism of potyviruses, we attempted to generate an in vitro potyviral translation-replication system using their natural host plants. The establishment of the natural host-derived in vitro system remains incomplete. We investigated the expression mechanism of pipo ORF discovered recently in potyviral genomes, by using conventional in vitro and in vivo assay systems. The pipo ORF exists in the -1 (or +2) reading frame relative to the viral polyprotein ORF, and is expressed as a fusion protein with the N-terminal half of P3 (P3N-PIPO). We revealed that the pipo ORF is expressed via transcriptional slippage during viral replication. We also found that, in addition to P3N-PIPO, another frameshift product, P3N-ALT, is also produced via transcriptional slippage.

研究分野：植物ウイルス学

キーワード：ポティウイルス 遺伝子発現 フレームシフト

1. 研究開始当初の背景

植物と病原体との相互作用の解明において、試験管内実験系は有効な解析手段の一つである。植物細胞由来の試験管内翻訳液としては、小麦胚芽抽出液が市販されており、高い翻訳活性が容易に得られる。また近年では、タバコ培養細胞やシロイヌナズナ植物体から試験管内翻訳液を作製する方法も確立されている (Komoda et al., PNAS 101: 1863-7, 2004; Murota et al., Plant Cell Physiol. 52: 1443-1453, 2011)。タバコ培養細胞由来翻訳液 (BYL) においては、これまでにいくつかの代表的な植物ウイルスを試験管内で翻訳・複製させることに成功している。一方、試験管内での翻訳・複製に成功していないウイルスも多数存在する。

ポティウイルス属は、ナス科やマメ科などの作物から柑橘類や核果類などの果樹まで幅広い植物を宿主とし、世界中で農業的被害が報告されているウイルスグループであり、古くから研究が行われている。しかし、約 10 kb の RNA ゲノムにコードされる長大なポリプロテインを介してウイルスタンパク質を発現するという特徴があり、これまで試験管内での複製には成功していない。

近年、ポティウイルスがコードする新たな遺伝子 *pipo* が発見された (Chung et al., PNAS 105, 5897-5902, 2008)。我々は、ポティウイルスの一つであるクローバ葉脈黄化ウイルス (CIYVV) とその宿主であるエンドウを用いて、PIPO 発現量とウイルスの病原性に相関があることを示した (Choi et al., J. Virol. 87: 7326-7337, 2013)。 *pipo* 遺伝子については、ポティウイルスゲノムがコードする長大なポリプロテインの P3 シストロンに重なる形でポリプロテインの読み枠とは異なる読み枠に存在すること、P3 の N 末端側と融合した P3N-PIPO として発現すること、 *pipo* 遺伝子上流に存在する保存配列 (G1A6 配列) が *pipo* の発現に関与することなどが、複数の研究グループにより示された。多くのウイルスが遺伝子発現の際にリボソームのフレームシフトを利用していることから、ポティウイルスもリボソームのフレームシフトによって *pipo* 遺伝子を発現させると予想されたが、その詳細は不明であった。このような、ポティウイルスの複製や遺伝子発現様式の詳細を解明するには、試験管内実験系を利用した研究が重要となる。

2. 研究の目的

本研究では、ポティウイルスによる被害が報告されている自然宿主を由来とした試験管内翻訳・複製系の開発を目指した。ウメ輪紋ウイルス (PPV) の宿主としてモモおよびサクラ、CIYVV の宿主としてはエンドウを用いて、実験系の構築を試みることにした。一方、新たな実験系の開発には時間がかかるこ

とが予想されたため、既存の試験管内実験系、植物体を用いた実験系も利用し、ポティウイルス増殖過程、特に、*pipo* の発現様式の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 自然宿主由来の培養細胞ラインの作出とウイルス感染試験

核果類であるサクラやモモ、および複数のマメ科植物について、これまでにカルス化の報告がある (例: Asano and Otake, Plant Biotechnol, 28: 51-62, 2011) ことから、それらを参考に、サクラ、モモ、エンドウについてカルス化の条件検討を行った。MS 培地に 3% ショ糖を添加したものをを用い、固形培地としてはゲランガムを用いた。カルス誘導の条件検討には、オーキシンとして 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) およびナフタレン酢酸 (NAA)、サイトカイニン類として 6-ベンジルアミノプリン (BA) を使用した。得られたカルスを液体培地で継代培養することで、培養細胞ラインの構築を行った。

モモの培養細胞に、細胞壁分解酵素液を処理し、プロトプラストを単離した。単離したプロトプラストに、PPV cDNA ゲノムを含有するプラスミドを導入し、ウイルス感染試験を行った。

(2) ポティウイルス遺伝子 *pipo* の発現は試験管内翻訳実験系で検出可能か

試験管内翻訳試験に用いる翻訳鋳型として、*pipo* 遺伝子領域を含む P3 領域の mRNA を試験管内で合成した。合成には、SP6 あるいは T7 RNA ポリメラーゼを用いた。試験管内翻訳には、市販のコムギ胚芽抽出液およびシロイヌナズナ由来試験管内翻訳液 (MM2dL) を用いた。翻訳液に [35S] 標識メチオニンを添加することで、翻訳産物の検出を行った。

(3) *pipo* 遺伝子上流の G1A6 配列はリボソームによるフレームシフトを誘発するか

翻訳の際に G1A6 配列周辺でリボソームがフレームシフトを起こす可能性を検証するため、G1A6 を含む周辺 16 塩基を、GFP 遺伝子内部に挿入した。SP6 あるいは T7 RNA ポリメラーゼにより G1A6 含有 GFP 遺伝子の mRNA を合成し、試験管内翻訳を行った。[35S] 標識メチオニンにより翻訳産物の検出を行った。

4. 研究成果

(1) 自然宿主由来の培養細胞ラインの作出とウイルス感染試験

サクラ未展開葉およびモモ胚乳組織からのカルス化条件検討を行った結果、どちらにおいても、2,4-D 0.1 mg/L、BA 1 mg/L を含む固形培地で良好なカルスが得られた。カル

スを液体培地に移植して継代培養を行うことにより、安定的に増殖する液体培養細胞ラインを得ることが出来た。一方、エンドウ種子および未展開葉を用いてカルス誘導を試みたが、褐色で硬いカルスしか得られず、液体での継代培養には至らなかった。

モモの培養細胞からプロトプラストを単離し、PPVのcDNAを導入することでウイルス感染を試みた。感染評価のため、GFP遺伝子を挿入したcDNA(PPV-GFP)を用いた。PPV-GFP導入後3日目の細胞において、GFP蛍光が確認された(図1)。一方、複製タンパク質を欠損する変異PPV-GFPを導入した細胞では、微弱なGFP蛍光しか得られなかった。以上より、本研究で得られたモモ培養細胞はPPVの増殖を許容することが示唆された。

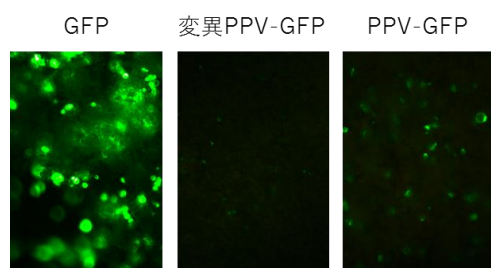


図1. モモ培養細胞由来プロトプラストへのPPV感染実験。PPV-GFPを導入した細胞(右)では、変異PPV-GFP導入細胞(中央)よりも強いGFP蛍光が確認できる。左はGFPのみを発現させた対照区。

(2) ポティウイルス遺伝子 *pipo* の発現は試験管内翻訳実験系で検出可能か

P3 シストロン内部に異なる読み枠で存在する *pipo* 遺伝子がどのように発現するのかは不明であった。そこで試験管内において、P3 シストロンから *pipo* 遺伝子産物(P3N-PIPO)を翻訳可能かについて検証した。P3 mRNA (*pipo* 遺伝子をずれた読み枠で含有する)を試験管内翻訳したところ、わずかにP3N-PIPOが検出された(図2)。一方、*pipo* 遺伝子上流のG1A6保存領域に変異を導入したものでは、P3N-PIPOが検出されなかったことから、*pipo* の発現にはG1A6が関与することが示唆された。

(3) *pipo* 遺伝子上流のG1A6配列はリボソームのフレームシフトを誘発するか

G1A6配列がリボソームのフレームシフトを誘発する可能性があったことから、G1A6を含んだ前後16塩基を用いて検証を行った。GFP遺伝子にG1A6含有16塩基を挿入し、mRNAを作製した。また、リボソームのフレームシフトは読み枠の影響を大きく受けることから、3つの異なる読み枠(f1, f2, f3)にG1A6配列を配置することで、検出された産物がリボソームのフレームシフトによるものかどうかを評価した。

試験管内翻訳を行った結果、フレームシフ

トを起こさずに翻訳された“zero-frame”産物に加え、2種類のフレームシフト産物(-1 frame, +1 frame)が検出された(図3)。すなわち、G1A6配列の存在により、読み枠が-1方向および+1方向にずれた産物がともに合成されたと考えられる。一方、3つの異なる読み枠でG1A6を挿入したf1~f3の間で、フレームシフト産物の蓄積量に大きな差は見られなかった(図3)。したがって、G1A6保存配列がリボソームのフレームシフトを誘発する可能性は低いと考えられた。

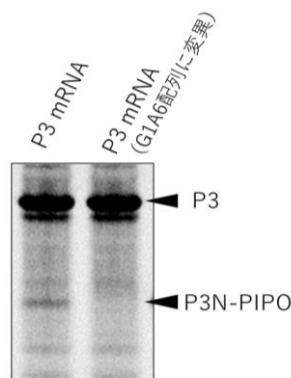


図2. 試験管内翻訳産物の電気泳動像。P3 mRNAを翻訳したところ、P3に加えて、P3N-PIPOの翻訳が確認された。一方、G1A6配列に変異を導入したP3 mRNAではP3N-PIPOは検出されなかった。

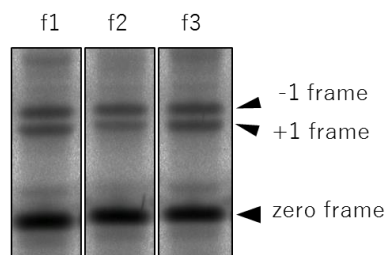


図3. 異なる読み枠(f1~f3)にG1A6配列が存在することによるフレームシフト産物合成量への影響。フレームシフトを起こさなかった産物(zero-frame)に加え、-1 frameおよび+1 frameの2種類のフレームシフト産物が検出された。ただし、合成量はf1~f3の間でほとんど変わらなかった。

上記より、*pipo* 遺伝子の発現には、リボソームのフレームシフトではなく、RNAポリメラーゼのスリッページが関与しており、さらにポリメラーゼが1塩基の挿入(-1フレームシフト)と1塩基の欠失(+1フレームシフト)を起こすことが考えられた。そこで、CIYVV感染植物からRNAを抽出し、G1A6配列付近のRNA-seq解析を依頼した。その結果、CIYVV複製過程では、G1A6内でA塩基の挿入が起こりP3N-PIPOが翻訳されること、さらにA塩基の欠失も低頻度で起こっていることを見出した。我々は、A塩基欠失により産生される+1フレームシフト産物を、「P3N-ALT」と名づけた。

RNA ポリメラーゼのスリッページ誘発部位である G1A6 配列は、他のウイルス種のゲノムにも見出されている。それらウイルスにおいても、RNA ポリメラーゼのスリッページが両方向に起こっている可能性、そして新規遺伝子が発現している可能性を示すことが出来た。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Hagiwara-Komoda Y. (責任著者), Choi S.H., Sato M., Atsumi G., Abe J., Fukuda J., Honjo N.M., Nagano A.J., Komoda K., Nakahara K.S., Uyeda I., Naito S. Truncated yet functional viral protein produced via RNA polymerase slippage implies underestimated coding capacity of RNA viruses. *Scientific Reports* 6, 21411, doi: 10.1038/srep21411. (2016). 査読有り

[学会発表] (計 3 件)

- ① 薦田 (萩原) 優香, 谷中陽佑, 中原健二. 劣性抵抗性遺伝子 *cyv1* をもつエンドウにおける一細胞レベルでのクロウバ葉脈黄化ウイルス増殖能解析. **第 59 回日本植物生理学会**, 札幌コンベンションセンター (北海道, 札幌市), 2018 年 3 月 28 日-3 月 30 日.
- ② 薦田 (萩原) 優香. 植物ウイルスの RNA ポリメラーゼと転写スリップ. **第 6 回植物 RNA 研究ネットワークシンポジウム**, 北海道大学 (北海道, 札幌市), 2016 年 11 月 17-18 日
- ③ 薦田 (萩原) 優香, 崔 善熹, 佐藤昌直, 厚見剛, 阿部純也, 中原健二, 上田一郎, 内藤哲. クロウバ葉脈黄化ウイルスがコードする P3N-PIPO および新規タンパク質の発現機構. **平成 27 年度日本植物病理学会大会**, 明治大学 (東京都, 千代田区), 2015 年 3 月 29-31 日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

薦田 優香 (KOMODA, Yuka)
酪農学園大学・農食環境学群・講師
研究者番号：90716482

(2) 研究分担者

中原 健二 (NAKAHARA, Kenji)
北海道大学・大学院農学研究院・講師
研究者番号：90315606