

令和 4 年 4 月 26 日現在

機関番号：30109

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2021

課題番号：17K07670

研究課題名（和文）試験管内実験系を利用したポティウイルス増殖機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of potyvirus propagation mechanisms using in vitro experimental systems

研究代表者

薦田 優香（Komoda, Yuka）

酪農学園大学・農食環境学群・准教授

研究者番号：90716482

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、様々な農作物に被害を出すポティウイルスの増殖過程を解析できる実験系の確立を目指した。ポティウイルス科に属するクローバ葉脈黄化ウイルス（CIYVV）の感染性cDNAクローンと、CIYVVの自然宿主であるエンドウを用いて、葉肉プロトプラスト感染実験系を新たに構築した。この実験系を用いることで、エンドウがもつ劣性抵抗性遺伝子の一細胞レベルでのウイルス増殖への関与の有無等、ウイルスと植物との相互作用の一部を解析可能となった。さらに本実験系が、ポティウイルスだけでなく、ルテオウイルス属ウイルスの感染実験にも適用可能であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
ウイルス抵抗性品種の育種においては、劣性（潜性）抵抗性遺伝子の利用、すなわち遺伝子の欠損や変異によってウイルス抵抗性を付与する方法が用いられる場合がある。ポティウイルスについては、翻訳開始因子の劣性アレルを含む複数の劣性抵抗性遺伝子が見つかっているが、それらの育種への利用は一部にとどまっている。本研究では、エンドウがもつ様々な劣性抵抗性遺伝子の一細胞レベルでのウイルス増殖への関与について解析可能な実験系を開発できた。本実験系は、近年見いだされている新たな劣性抵抗性遺伝子の研究や他のウイルス種を用いた解析にも利用可能と考えている。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to develop an experimental system to analyze the multiplication process of potyviruses that cause damage to various agricultural crops. Using an infectious cDNA clone of clover yellow vein virus (CIYVV) and pea, a natural host of CIYVV, a mesophyll protoplast transfection method was newly developed. This experimental system made it possible to analyze some of the virus-plant interactions, such as the involvement of the recessive resistance genes of pea in virus multiplication at the single-cell level. Furthermore, we showed that this experimental system can be applied to virus propagation assays using not only potyviruses but also luteoviruses.

研究分野：植物病理学

キーワード：ポティウイルス エンドウ 劣性抵抗性遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物と病原体との相互作用を分子レベルで理解するためには、試験管内実験系やプロトプラストを用いた一細胞実験系は有効な手段の一つである。タバコモザイクウイルス等、いくつかの代表的な植物ウイルスについては、モデル植物を用いた実験系や試験管内翻訳複製系など、様々な実験系が確立されており研究が進んでいる (PNAS 101: 1863-7, 2004)。しかし、ウイルスはそれぞれ宿主範囲が限定されているため、モデル植物を用いた既存の実験系が適用できなかったり、自然宿主内での感染・増殖機構を再現できていない可能性のあるウイルスも多数存在する。

ポティウイルス属ウイルスは、長大なウイルスゲノムにコードされる遺伝子のほとんどがまず、約 350kDa の長大なポリプロテインとして翻訳されるなどの特徴があり、既存の試験管内翻訳・複製系を用いた解析は難しい。我々はこれまでに、ポティウイルスの一種であるクローバ葉脈黄化ウイルス (CIYVV) に抵抗性および感受性を示す 2 系統のエンドウ植物体および試験管内翻訳系を用いて、ポリプロテインとは異なる読み枠に存在する *pipo* 遺伝子の発現量とウイルスの病原性に相関があることを示した (J. Virol. 87: 7326-37, 2013)。さらに、既存の試験管内実験系を用いた CIYVV の遺伝子発現解析を試みる中で、我々は新たな機能タンパク質 ALT の存在を見いだした (Sci.Rep. 6: 21411, 2016)。

ポティウイルス抵抗性を示す植物品種の中には、劣性(潜性)抵抗性遺伝子をもつものがある。劣性抵抗性とは、植物遺伝子に欠損や変異が生じることで付与される抵抗性のことである。CIYVV に対する劣性抵抗性遺伝子としては、エンドウの遺伝子 *cyv1* や *cyv2* が発見されている (Phytopathology 97: 544-50, 2007; J Gen Plant Pathol 75: 241-9, 2009)。劣性抵抗性遺伝子 *cyv2* は翻訳開始因子 eIF4E をコードする遺伝子のアレルであることが明らかとなった (Plant J., 40: 376-85, 2004; Mol. Plant Microbe Interact. 20:1075-82, 2007; J Gen Plant Pathol 75: 241-9, 2009)。一方、*cyv1* 遺伝子については未だ同定されていない。

劣性抵抗性遺伝子とウイルスとの相互作用を明らかにする上では、宿主植物を用いた詳細な解析が重要なポイントとなる。CIYVV はマメ科植物を自然宿主とするが、マメ科植物由来の試験管内実験系やプロトプラストへの CIYVV 感染実験系の報告は無く、劣性抵抗性遺伝子がウイルス増殖をどのように阻害するのかについて解析可能な新たな手法の開発が必要であった。

2. 研究の目的

本研究では、自然宿主内での CIYVV 増殖プロセスの詳細を解析可能な試験管内実験系、またはプロトプラストを用いた一細胞レベルでの実験系を開発することを目的とした。さらに、構築した実験系を用いて、CIYVV の自然宿主であるエンドウがもつ劣性抵抗性遺伝子と CIYVV との関係の一端を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

播種後 2~4 週間のエンドウ小葉から、葉肉プロトプラストを単離し、トランスフェクション実験の条件検討を行った。*cyv1* 劣性抵抗性遺伝子をもつエンドウと CIYVV 感受性エンドウからプロトプラストを単離し、*cyv1* 遺伝子存在・非存在下での CIYVV の増殖効率の違いを比較した。CIYVV としては、感染性 cDNA クローンにウミシイタケ由来ルシフェラーゼ遺伝子を付加したものを、ルシフェラーゼ活性を指標にウイルス増殖の定量を行った。また、エンドウプロトプラストトランスフェクション実験系が他のウイルス種へ適用可能かを調べるため、ルテオウイルス属ウイルスを用いたウイルス感染実験を行った。

4. 研究成果

(1) CIYVV の自然宿主エンドウを用いた実験系の開発

エンドウ由来の試験管内翻訳・複製系の構築のためには、エンドウ組織のカルス誘導、液体培養化、プロトプラスト化、そして脱液胞化のステップを経る必要がある。そこで、エンドウの葉や茎、胚軸等を用いたカルス誘導や液体培養化の条件検討を進めていた。しかし、胆振東部地震に伴う停電による細胞状態の悪化などにより、最終的に良好な培養細胞を得ることはできなかった。

そこで次に、プロトプラストを用いた実験系の開発を行った。エンドウの小葉より葉肉プロトプラストを効率よく単離する条件を見だし、トランスフェクション実験に用いた。GFP 発現カセットをもつプラスミドをエンドウプロトプラストに導入し、30%以上のプロトプラストに GFP 蛍光が確認できるトランスフェクションの条件を決定した。この実験系を、ポティウイルス増殖と劣性抵抗性遺伝子との関係解明に用いることとした。

(2) 劣性抵抗性遺伝子 *cyv1* をもつエンドウを用いた CIYVV 増殖解析

CIYVV の感染性 cDNA クローンにルシフェラーゼ遺伝子を挿入し、ルシフェラーゼ活性を指標に CIYVV の増殖を定量できるようにした。同様に、*cyv1* 抵抗性を打破する CIYVV (RB) にもルシフェラーゼ遺伝子を挿入した。これら感染性 cDNA クローンをエンドウプロトプラスト

に導入すると、細胞由来 RNA ポリメラーゼ によって CIYVV RNA が合成され、それがウイルスとして機能すれば複製を開始する。ただし、ウイルス複製活性と細胞由来の転写活性を見分けるためには、一定時間後に転写活性を止める必要があった。そこで、トランスフェクション後に転写阻害剤 (Act D) を加えるタイミングや濃度の条件検討などを行い、CIYVV 増殖を解析可能な条件を見いだした。次に、感受性エンドウおよび *cyv1* エンドウ由来のプロトプラストを用いたトランスフェクション実験を行い、一細胞レベルでの CIYVV 増殖への *cyv1* 劣性抵抗性遺伝子の影響を解析した。その結果、*cyv1* エンドウ由来のプロトプラストにおいて、CIYVV は RB と同程度の増殖効率を示した。すなわち、*cyv1* 劣性抵抗性は、一細胞レベルでの CIYVV の増殖には関与しないことを明らかにした。

(3) エンドウプロトプラストを用いた実験系その他ウイルス種の研究への応用

エンドウプロトプラストトランスフェクションを用いたポティウイルス増殖試験が、マメ科植物を宿主とする他のウイルス種にも適用可能かについて検討した。ダイズに被害を出すウイルスである、ルテオウイルス科ルテオウイルス属のダイズ矮化ウイルス (SbDV) を対象に検討を行った。SbDV の感染性 cDNA クローンを構築し、ルシフェラーゼ遺伝子を挿入した。また比較として、複製酵素遺伝子に変異を導入した SbDV mutant cDNA クローンを作製した。エンドウプロトプラストトランスフェクションを行った結果、SbDV cDNA クローンを導入したプロトプラストは SbDV mutant cDNA クローン導入プロトプラストと比較して、有意に高いルシフェラーゼ活性を示した。すなわち、本実験系が SbDV 増殖試験や遺伝子発現解析にも利用可能であることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Taninaka Yosuke, Nakahara Kenji S., Hagiwara Komoda Yuka	4. 巻 64
2. 論文標題 Intracellular proliferation of clover yellow vein virus is unaffected by the recessive resistance gene cyv1 of Pisum sativum	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 76 ~ 82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12755	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hagiwara-Komoda Yuka	4. 巻 88
2. 論文標題 An efficient mechanical inoculation technique for soybean dwarf virus reveals that the viral readthrough domain is inessential for the systemic infection of host plants	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of General Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 197 ~ 202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10327-022-01057-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中山侑香, 西川郁香, 村山拓真, 薦田(萩原)優香
2. 発表標題 ダイズ矮化ウイルス感染性cDNAクローンを用いたエンドウプロトプラスト感染実験系の確立
3. 学会等名 令和元年度日本植物病理学会北海道部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷中陽祐, 中原健二, 薦田(萩原)優香
2. 発表標題 エンドウのcyv1遺伝子による劣性抵抗性を打破するクローバ葉脈黄化ウイルス株の性状解析
3. 学会等名 平成31年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 薦田（秋原）優香，谷中陽祐，中原健二
2. 発表標題 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ーバ葉脈黄化ウイルス増殖能解析
3. 学会等名 第59回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中原 健二 (Nakahara Kenji) (90315606)	北海道大学・農学研究院・講師 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関