

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19589001
 研究課題名（和文） 植物 RNA ウイルスの複製精度制御機構の解明-弱毒ウイルス安定化技術の構築に向けて
 研究課題名（英文） Analysis of the mechanisms that control replication fidelity of plant RNA viruses - toward development of stable attenuated viruses
 研究代表者
 氏名（アルファベット） 小松 健（KOMATSU KEN）
 所属機関・所属部局名・職名 東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任研究員
 研究者番号：60451837

研究成果の概要：

植物 RNA ウイルスの複製精度の制御機構を解明するための基盤的知見を得るため、植物 RNA ウイルスの感染植物内でのゲノムの多様性を比較解析した。オオバコモザイクウイルス（PIAMV）、ダイコンひだ葉モザイクウイルス（RaMV）など数多くの植物 RNA ウイルスの全塩基配列を決定した結果、PIAMV の分離株間の多様性が大きいこと、RaMV の分節ゲノム間で多様性が異なることなどを見出した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,400,000	0	1,400,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	390,000	3,090,000

研究分野：植物病理学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：ウイルス、複製精度、リバビリン、塩基配列

1. 研究開始当初の背景

植物ウイルスの 80%以上を占める RNA ウイルスは、その複製酵素にエラー修正能を持っておらず（複製精度が低く）、ゲノムの変異出現率が非常に高い。これまで、申請者はこれを裏付けるように、植物 RNA ウイルスはそのゲノム上のわずかな変異により病原性を大きく変化させることを明らかにしてきた。

化学農薬による防除が不可能な植物ウイルスの防除に最も有効で実用化されているのが弱毒ウイルスである。しかし、弱毒ウイ

ルスは、その複製精度の低さから、ゲノムの変異により強毒株が出現する可能性があるという問題点を抱えており、これには決定的な解決策が未だ見いだされていない。

最近、動物 RNA ウイルスの複製酵素の 1 アミノ酸が、複製酵素の立体構造の変化を介して複製精度の制御に関わっているという報告がなされた。この報告では、RNA ウイルスゲノムの複製過程における塩基の取り込みの際に高頻度でエラーを起こさせ、その結果ゲノムの変異率を高め感染力を低下させ

る抗ウイルス薬として知られているリバビリン (ribavirin) の存在下でウイルスを継代し、複製精度が高いウイルスを選抜している。申請者はこの研究に着想を得て、植物 RNA ウイルスにおいても複製酵素の特定のアミノ酸が複製精度の制御に関わっていると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、植物 RNA ウイルスの複製精度の制御機構を明らかにするための基盤的知見を得ようとするものである。具体的には、植物 RNA ウイルスのゲノムの多様性を解析することにより、その複製精度の低さについての知見を得るとともに、どのウイルスを材料として複製精度を解析していくかを決定する。

将来的にはリバビリンによる選抜によって、強毒株が出現しない弱毒ウイルスを作出することが可能であり、またその手法を応用することにより多くの弱毒ウイルス作出技術の実用化に寄与するものと考えている。

3. 研究の方法

植物 RNA ウイルスの複製精度の制御メカニズムを解明するため、本研究では植物 RNA ウイルスと、宿主植物として *Nicotiana benthamiana* を用い、当宿主において野生型よりも複製精度が高い変異株を得る計画である。この変異株を得るための選抜には、動物ウイルスにおいて、RNA ウイルスゲノムの複製過程におけるゲノムの変異率を高め感染力を低下させることが知られているリバビリンを用いる。研究は以下の手順で行う。

(1) さまざまな植物 RNA ウイルスの感染植物内でのゲノムの多様性を、全塩基配列決定により解析する。

(2) (1) においてゲノムの多様性が大きかった植物ウイルスを見出し、*N. benthamiana* において、複製精度を測定する系を確立する。

(3) リバビリンの存在下でウイルスを *N. benthamiana* に接種し、2、3週間後に全身に感染した植物を見いだす。このウイルスを異なる植物にリバビリンの存在下で再接種する。

(4) (3) を繰り返し選抜したウイルスの複製精度を測定し、複製精度の高い変異株を

見いだす。

(5) 得られた変異株のゲノム塩基配列を決定し、複製の精度と quasispecies 形成の制御に関わるアミノ酸変異を特定する。また、得られた複製精度が高い変異株を安定した弱毒ウイルスとして用いることができるかどうかを検証する。

4. 研究成果

オオバコモザイクウイルス (PIAMV) の感染植物内での複製精度を測定する系を確立するに先立ち、植物 RNA ウイルスの感染植物内でのゲノムの多様性を比較するため、PIAMV と同じポテックスウイルス属のアスパラガスウイルス 3 (*Asparagus virus 3*; AV3) と、系統学的に離れたコモウイルス属のダイコンひだ葉モザイクウイルス (*Radish mosaic virus*; RaMV) について、そのゲノム塩基配列を世界で初めて決定した。AV3 のゲノムは全長が 6937 塩基からなり、ポテックスウイルス属に特徴的な 5 つのタンパク質をコードしていると考えられた。AV3 と、塩基配列が既知の他のポテックスウイルスとの塩基配列の相同性を比較した結果、本ウイルスはポテックスウイルス属の新規な種であることが明らかとなった。

また、並行して、2 分節ゲノムを持つコモウイルス属のダイコンひだ葉モザイクウイルス (*Radish mosaic virus*; RaMV) について、RNA1 と RNA2 の全塩基配列をそれぞれ決定した。RNA1 は全長 6064 塩基からなり、ウイルスの複製に重要なタンパク質がコードされていると考えられた。一方 RNA2 は全長 4020 塩基からなり、ウイルスの細胞間移行に重要なタンパク質がコードされていると考えられた。さらに、他の既に塩基配列が決定されているコモウイルスとの相同性から、RaMV は同属の新規な種であることが確認された。また、系統学的解析を行った結果、アブラナ科植物に感染する RaMV は、コモウイルス属の多数を占めるマメ科植物に感染するウイルス群と系統学上離れた関係にあった。植物 RNA ウイルスの複製精度と本年度に報告した新規なウイルスのゲノム塩基配列の多様性との関係は非常に興味深い。

さらに、RaMV の種内のゲノムの多様性と複製精度についての知見を得るため、RaMV のカリフォルニア分離株の RNA1 と RNA2 のゲノム塩基配列を決定した。日本分離株の塩基配列と比較したところ、その相同性は 95% 以上であり、両分離株が同種であることが確認された。また、両分離株の塩基配列の相同性は、RNA1 に比べて RNA2、その中でも特に 3' 側のゲノム領域において顕著に低かった。この知見は、2

分節ゲノムを持つウイルスの複製精度が分節間で異なる可能性を示唆しており、RNAウイルスの複製精度を解析するうえで非常に興味深い。

さらに、世界中で被害を及ぼしている重要病害であるイネいもち病菌に感染している二本鎖RNAウイルスのゲノム塩基配列を決定し報告した。これらの塩基配列の解析結果は、RNAウイルスのゲノムの多様性に関する知見を深めることとなり、今後の解析に寄与するところは大きい。

並行して、RNAウイルスに対する抵抗性機構として知られるRNAサイレンシングに関する研究も行った。その結果、PIAMVを含むポテックスウイルスは、TGBp1という同一のタンパク質によりRNAサイレンシングを抑制しているものの、抑制のレベルはウイルス種により異なることが明らかになった。以上の結果は全て論文として発表した。

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 6件)

全て査読あり

Komatsu K., Hashimoto M., Maejima K., Ozeki J., Kagiwada S., Takahashi S., Yamaji Y., Namba S. Genome sequence of a Japanese isolate of Radish mosaic virus: the first complete nucleotide sequence of a crucifer-infecting comovirus.

Archives of Virology 152.2007:1501-1506

Hashimoto M, Ozeki J, Komatsu K, Senshu H, Kagiwada S, Mori T, Yamaji Y, Namba S. Complete nucleotide sequence of asparagus virus 3.

Archives of Virology 153. 2008:219-221.

Komatsu K, Yamaji Y, Ozeki J, Hashimoto M, Kagiwada S, Takahashi S, Namba S.

Nucleotide sequence analysis of seven Japanese isolates of *Plantago asiatica* mosaic virus (PIAMV): a unique potexvirus with significantly high genomic and biological variability within the species.

Archives of Virology 153. 2008:193-198.

Maejima K., Himeno M., Komatsu, K., Kakizawa S., Yamaji, Y., Hamamoto, H., Namba, S. Complete nucleotide sequence

of a new double-stranded RNA virus from the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*.

Archives of Virology 153. 2008:381-391

Komatsu, K., Hatada K., Hashimoto, M., Ozeki, J., Maejima, K., Kagiwada, S., Yamaji, Y., Namba, S. Complete nucleotide sequence of a California isolate of Radish mosaic virus.

Archives of Virology 153. 2008:2167-2168.

Senshu, H., Ozeki, J., Komatsu, K., Hashimoto, M., Hatada, K., Aoyama, M., Kagiwada, S., Yamaji, Y., Namba, S.

Variability in the level of RNA silencing suppression caused by triple gene block protein 1 (TGBp1) from various potexviruses during infection.

Journal of General Virology 90. 2009:1014-1024.

[学会発表](計 6件)

小松健・尾関丈二・千秋博子・姫野未紗子・山次康幸・難波成任. オオバコモザイクウイルス(PIAMV)の遺伝学的多様性. 平成20年度日本植物病理学会大会、松江、2008年4月27日(査読あり、既発表)

千秋博子・尾関丈二・橋本将典・小松健・青山倫子・山次康幸・難波成任. *Potexvirus* 属ウイルスによるRNAサイレンシング抑制能の比較解析. 平成20年度日本植物病理学会大会、松江、2008年4月27日(査読あり、既発表)

姫野未紗子・前島健作・小松健・山次康幸・濱本宏・難波成任. 糸状菌に感染する *Totivirus* 科ウイルスの分類について. 平成20年度日本植物病理学会大会、松江、2008年4月27日(査読あり、既発表)

K. Komatsu, M. Hashimoto, J. Ozeki, M. Aoyama, Y. Yamaji, S. Namba. Analysis of the systemic necrosis on *Nicotiana benthamiana* induced by *Plantago asiatica* mosaic virus infection.

第14回国際ウイルス学会 2008.8.13. トルコ・イスタンブール(査読あり、既発表)

畑田康司・川西剛史・尾関丈二・小松健・橋本将典・山次康幸・難波成任. Radish mosaic virus (RaMV)カリフォルニア分離株のゲノムRNA全塩基配列の解析. 平成21年度日本植物病理学会大会、山形、2009年3月27日(査読あり、既発表)

千秋博子・尾関丈二・川西剛史・姫野未紗
子・小松健・山次康幸・難波成任・オオバコ
モザイクウイルス (PIAMV) がコードする
triple gene block protein 1 (TGBp1) によ
る RNA サイレンシング抑制機構の解析. 平成
21 年度日本植物病理学会大会、山形、2009
年 3 月 27 日 (査読あり、既発表)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小松 健 (KOMATSU KEN)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任
研究員

研究者番号 : 60451837

(2)研究分担者

(3)連携研究者