

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 27 日現在

機関番号：12201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658038

研究課題名(和文) 植物はウイルスに寄生するRNAを新たに編み出してウイルスに抵抗している

研究課題名(英文) The origin of Cucumber mosaic virus satellite RNA

研究代表者

夏秋 知英 (NATSUAKI, Tomohide)

宇都宮大学・農学部・教授

研究者番号：10134264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：キュウリモザイクウイルス(CMV)はしばしばゲノムRNA 以外にサテライトRNA(satRNA)を含むが、satRNAの由来は不明である。CMVを繰り返し継代接種すると、自然にsatRNAが出現したが、その出現は安定せず、出現条件を明確には出来なかった。しかし、植物細胞内ではCMVの感染に対応して、siRNAやmiRNAの再編集が行われてsatRNAが出来上がった可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Cucumber mosaic virus (CMV) contains satellite RNA (satRNA), however, The origin of satRNA is remains unexplained. The infectious clone of CMV-Pepo was inoculated on *Nicotiana benthamiana* and then the progeny virus was repeatedly passaged to new plants under insect-free greenhouse conditions. A satRNA emerged after repeated sap-inoculation of CMV-Pepo, but the emerging condition of satRNA has been unclear. The sequences of the emerged satRNA and its progeny molecules were determined and compared, indicating that the sequence of satRNA is unstable. Since the sequence of CMV satRNAs contain siRNA As of CMV-RNA and miRNAs of plant mRNA, the re-editing of siRNA /miRNA might be related to CMV satRNAs. Further research is necessarily to clear the nature of the origin of CMV satRNAs.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理

キーワード：キュウリモザイクウイルス サテライトRNA 出現 変異

### 1. 研究開始当初の背景

植物ウイルスの増殖に乗じて自らを増幅する寄生性(パラサイト)RNAが知られている。寄生性RNAにはサテライトRNA(以下 satRNA)と欠損性干渉RNA(Defective interfering RNA、以下 DI-RNA)があり、その一部は寄生するウイルスの病原性を低下させ、増殖を妨げて病徴を軽減する。satRNA および DI-RNA は短いRNAで、植物細胞中で単独では増殖できず、ウイルスの増殖機構を借りて複製・増殖し、ウイルス粒子に入り込み、ウイルスとともに他の植物個体に伝染する。このうち DI-RNA はウイルスゲノム RNA が短くなったものである。

キュウリモザイクウイルス(CMV)は3本の(+)-一本鎖RNAをゲノムとし、多種のアップラムシ伝搬され、数百種の植物に感染する最重要植物病原ウイルスである。CMVの satRNA は1970年代に発見されて盛んに研究され、その性状が詳細に解明された。また、CMVの病原性を低下させる satRNA は弱毒(ワクチン)ウイルスの作出に応用された。CMVの satRNA の塩基配列は、CMVのゲノムRNAとも植物のゲノムDNAとも相同性がないことから、その起源は不明である。

本研究では、サテライトRNAを全く含まない感染性クローン由来のCMVを *Nicotiana benthamiana* で継代接種すると、継代4~5回目から satRNA が検出され始め、病徴も軽くなる現象を見出した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的の第一は、「CMVの satRNA は感染植物が新たに編み出すRNA分子で、satRNAを編み出す現象はこれまでに知られていない新規のウイルス抵抗性機構である」という仮説を証明することである。すなわちまず、CMVの satRNA が出現する条件を明らかにし、新規に出現した satRNA がCMVの病原性を低下させることを証明する。次に、出現する satRNA の起源はどのRNA分子で、どのようなRNA編集を受けて satRNA となるのかを解明する。合わせて「DI-RNAは、植物のRNA編集機構がウイルスRNAから直接編み出す産物である」という仮説に立ち、同様に解析する。

### 3. 研究の方法

既存の強毒を示すPEPO株の感染性クローン、およびそれ *Nicotiana benthamiana* に接種し、さらに汁液にて継代接種し、サテライトRNAが出現、変異、蓄積し、弱毒化したと思われるCMV株を用いた。

*Nicotiana benthamiana* は明期・暗期ともに12時間・25℃で育成したものをを用いた。それ以外に接種試験には、メロン(アリストキイ種苗)を用いた。

植物からのRNA抽出には、イノムキャプチャー法を用いた。抽出したRNAはcDNA合成に使用した。cDNA合成にはサテライトRNAに

共通の3'末端側塩基配列に特異的な合成プライマーおよび、Primescript® 1<sup>st</sup> strand cDNA Synthesis kit (Takara)を用いて行った。合成したcDNAを鋳型としてPCR反応を行い、全長cDNAクローン構築のためにウイルスゲノムを増幅した。サテライトRNAのcDNAクローン合成に使用したプライマーは、配列に高く保存されていた5'末端側と3'末端側においてそれぞれのサテライトRNAに共通の配列を用いた。PCR反応には、BIOTAQ DNA Polymerase (BIOLINE)を用いた。増幅されたDNA断片回収のための電気泳動には、5%ポリアクリルアミドゲルを用いた。泳動後のゲルは、エチジウムブロマイドで染色した後、トランスイルミネーター上でバンドを確認し、カミソリでバンドを切りだして溶出した。

溶出されたPCR産物はpGEM®-T Easy Vectorに挿入し、大腸菌のコンピテントセルを形質転換した。大腸菌にはDH-5を用いた。

得られた形質転換体よりプラスミド抽出し、シークエンス反応にBig Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI)を使用して塩基配列を決定し、比較した。

汁液接種はカーボランダム法によった。また、CMVの感染の有無はELISA法により検定した。

RNAの *in vitro* 転写はRibomax™ Large Scale RNA Production System-T7 (Promega)を用いて行った。得られたRNA転写反応溶液を直接接種に用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) CMV-Pepoの継代接種

感染性クローン由来の強毒CMV(pepo強毒株)を *Nicotiana benthamiana* に汁液接種し、4代継代した。4代継代して弱毒化した *N. benthamiana*(図1)に感染していたCMVをメロン(アリス)に汁液接種したところ、メロン(アリス)の葉に激しい萎縮とモザイク症状(図1)が見られた。



図1. *N. benthamiana* (左)とメロン(右)の病徴

#### (2) メロンにおける継代接種

メロンでの継代1代目は葉全体にモザイク症状を呈し、激しい葉の萎縮もみられた(図1)。メロンでの継代2代目では、1代目よりは弱いモザイク症状になったものの、

依然として葉の萎縮は激しいままであった。メロンでの継代3代目になると、モザイク症状は更に弱くなり、葉の萎縮も少し弱くなった。メロンでの継代4代目ではモザイク症状を呈する部位が小さくなりつつあり、濃い緑色の弱毒領域が広がっており、葉の萎縮も弱くなった。メロンでの継代5代目では弱毒領域が目立つようになり、葉の萎縮はほとんどなくなっている(図2-a)。メロンでの継代6代目になると葉の病徴はほとんど見られなくなり、わずかなモザイク症状を呈するのみとなった(図2-b)。



図2-a メロンでの継代接種5代目



図2-b メロンでの継代接種6代目

### (3) 継代接種における各世代のサテライト RNA の塩基配列の比較

*N. benthamiana* で得られたサテライト RNA の塩基配列(図3)にはすでに23、24、116、177番目の4ヶ所に変異があるヘテロな分子集団であった。

N.B1.gnu	1	ATAGAGAATTGCGTAGAGGGGTTAATTACGTGAGGATCTGTCACTCGGCGGTGTGGGT	60
N.B2.gnu	1	ATAGAGAATTGCGTAGAGGGGTTAATTACGTGAGGATCTGTCACTCGGCGGTGTGGGT	60
N.B3.gnu	1	ATAGAGAATTGCGTAGAGGGGTTAATTACGTGAGGATCTGTCACTCGGCGGTGTGGGT	60
N.B4.gnu	1	ATAGAGAATTGCGTAGAGGGGTTAATTACGTGAGGATCTGTCACTCGGCGGTGTGGGT	60
N.B1.gnu	61	FACCTCCCTGCTACGGCGGGTTGAGTTGACGCGCCTCGAATGGGGACCGCTGGG	120
N.B2.gnu	61	FACCTCCCTGCTACGGCGGGTTGAGTTGACGCGCCTCGAATGGGGACCGCTGGG	120
N.B3.gnu	61	FACCTCCCTGCTACGGCGGGTTGAGTTGACGCGCCTCGAATGGGGACCGCTGGG	120
N.B4.gnu	61	FACCTCCCTGCTACGGCGGGTTGAGTTGACGCGCCTCGAATGGGGACCGCTGGG	120
N.B1.gnu	121	AGCTATGTCGGTACTCTCAGCACCGCACTATTGAGCCCCCGCTCAGTTTGA	180
N.B2.gnu	121	AGCTATGTCGGTACTCTCAGCACCGCACTATTGAGCCCCCGCTCAGTTTGA	180
N.B3.gnu	121	AGCTATGTCGGTACTCTCAGCACCGCACTATTGAGCCCCCGCTCAGTTTGA	180
N.B4.gnu	121	AGCTATGTCGGTACTCTCAGCACCGCACTATTGAGCCCCCGCTCAGTTTGA	180
N.B1.gnu	181	AAAAACCGCCCGTGGTTTGGCGTTACCGGAAATTCGAAAGAAACACTCTGTAAGGT	240
N.B2.gnu	181	AAAAACCGCCCGTGGTTTGGCGTTACCGGAAATTCGAAAGAAACACTCTGTAAGGT	240
N.B3.gnu	181	AAAAACCGCCCGTGGTTTGGCGTTACCGGAAATTCGAAAGAAACACTCTGTAAGGT	240
N.B4.gnu	181	AAAAACCGCCCGTGGTTTGGCGTTACCGGAAATTCGAAAGAAACACTCTGTAAGGT	240
N.B1.gnu	241	GGTATAGTGTGACGACCGAGGGGAGAGCTAAACCTATAAGGTATCCCGATCTCCG	300
N.B2.gnu	241	GGTATAGTGTGACGACCGAGGGGAGAGCTAAACCTATAAGGTATCCCGATCTCCG	300
N.B3.gnu	241	GGTATAGTGTGACGACCGAGGGGAGAGCTAAACCTATAAGGTATCCCGATCTCCG	300
N.B4.gnu	241	GGTATAGTGTGACGACCGAGGGGAGAGCTAAACCTATAAGGTATCCCGATCTCCG	300
N.B1.gnu	301	TGAATGCTAAACATTCCATTA	321
N.B2.gnu	301	TGAATGCTAAACATTCCATTA	321
N.B3.gnu	301	TGAATGCTAAACATTCCATTA	321
N.B4.gnu	301	TGAATGCTAAACATTCCATTA	321

図3 *Nicotiana benthamiana* から得られたサテライト RNA の塩基配列の比較

メロン1代目のサテライト RNA の塩基配列(図4)はそれらの変異を全て引き継ぐと共に、17、19、138、211、251、289番目の変異が新たに加わり、変異数は10ヶ所となっている。メロン2代目では、1代目の変異を全く引き継がず、7、67、124、155、175、245、273、299、309番目の9ヶ所に変異が確認できた(以下図は省略)。メロン3代目では、2代目から7、67、155、175、245、299、309番目の変異を引き継いでおり、新たな変異の259番目のものを加え8ヶ所となった。メロン4代目では、また新たに、22、159、186番目の3ヶ所のみの変異となった。メロン5代目は72、105、107、136、138、206、268番目に7ヶ所の新たな変異が入った。メロン6代目でも、4代目、5代目と同様7、11、38、85、86、97、129、247、315番目に散在的に新たな変異が入った。

melon1-1.gnu	1	ATAGAGAATTGCGTAGAGGGGTTAATTACGTGAGGATCTGTCACTCGGCGGTGTGGGT	60
melon1-2.gnu	1	ATAGAGAATTGCGTAGAGGGGTTAATTACGTGAGGATCTGTCACTCGGCGGTGTGGGT	60
melon1-3.gnu	1	ATAGAGAATTGCGTAGAGGGGTTAATTACGTGAGGATCTGTCACTCGGCGGTGTGGGT	60
melon1-4.gnu	1	ATAGAGAATTGCGTAGAGGGGTTAATTACGTGAGGATCTGTCACTCGGCGGTGTGGGT	60
melon1-1.gnu	61	FACCTCCCTGCTACGGCGGGTTGAGTTGACGCGCCTCGAATGGGGACCGCTGGG	120
melon1-2.gnu	61	FACCTCCCTGCTACGGCGGGTTGAGTTGACGCGCCTCGAATGGGGACCGCTGGG	120
melon1-3.gnu	61	FACCTCCCTGCTACGGCGGGTTGAGTTGACGCGCCTCGAATGGGGACCGCTGGG	120
melon1-4.gnu	61	FACCTCCCTGCTACGGCGGGTTGAGTTGACGCGCCTCGAATGGGGACCGCTGGG	120
melon1-1.gnu	121	AGCTATGTCGGTACTCTCAGCACCGCACTATTGAGCCCCCGCTCAGTTTGA	180
melon1-2.gnu	121	AGCTATGTCGGTACTCTCAGCACCGCACTATTGAGCCCCCGCTCAGTTTGA	180
melon1-3.gnu	121	AGCTATGTCGGTACTCTCAGCACCGCACTATTGAGCCCCCGCTCAGTTTGA	180
melon1-4.gnu	121	AGCTATGTCGGTACTCTCAGCACCGCACTATTGAGCCCCCGCTCAGTTTGA	180
melon1-1.gnu	181	AAAAACCGCCCGTGGTTTGGCGTTACCGGAAATTCGAAAGAAACACTCTGTAAGGT	240
melon1-2.gnu	181	AAAAACCGCCCGTGGTTTGGCGTTACCGGAAATTCGAAAGAAACACTCTGTAAGGT	240
melon1-3.gnu	181	AAAAACCGCCCGTGGTTTGGCGTTACCGGAAATTCGAAAGAAACACTCTGTAAGGT	240
melon1-4.gnu	181	AAAAACCGCCCGTGGTTTGGCGTTACCGGAAATTCGAAAGAAACACTCTGTAAGGT	240
melon1-1.gnu	241	GGTATAGTGTGACGACCGAGGGGAGAGCTAAACCTATAAGGTATCCCGATCTCCG	300
melon1-2.gnu	241	GGTATAGTGTGACGACCGAGGGGAGAGCTAAACCTATAAGGTATCCCGATCTCCG	300
melon1-3.gnu	241	GGTATAGTGTGACGACCGAGGGGAGAGCTAAACCTATAAGGTATCCCGATCTCCG	300
melon1-4.gnu	241	GGTATAGTGTGACGACCGAGGGGAGAGCTAAACCTATAAGGTATCCCGATCTCCG	300
melon1-1.gnu	301	TGAATGCTAAACATTCCATTA	321
melon1-2.gnu	301	TGAATGCTAAACATTCCATTA	321
melon1-3.gnu	301	TGAATGCTAAACATTCCATTA	321
melon1-4.gnu	301	TGAATGCTAAACATTCCATTA	321

図4 メロン継代1代目に得られたサテライト RNA の塩基配列の比較

### (4) メロン継代7代目の弱毒株8個体における ELISA

継代7代目に於いてみられた弱毒症状を示す8個体を選抜し、ELISA法にてCMV濃度を測定したところ、8株全てからCMVが検出され、さらに8株中2株は著しく低いCMV濃度を示した。8株中6株の数値は、標準液の数値の10倍程度あるのに対し、CMV濃度が著しく低い2株に関しては標準液の2倍~4倍の数値しか示さなかった。ポジティブコントロールとした強毒株は標準液の22倍ほどあり、CMVの濃度が著しく高いことを示した

### (5) CMVの2bタンパク質の塩基配列解析

CMVの弱毒化がCMV自体の弱毒性の変化ではなく、サテライトRNAによるものであることを証明するために、強毒株、継代7代目弱毒株双方のCMVの2b領域の塩基配列を決定し比較した。すると、弱毒株、強毒株でCMVの2b領域の塩基配列に全く違いが見られなかったことにより、2bタンパク質の変異によ

る弱毒化ではないことが判明した。

#### (6) サテライトRNA出現再確認実験

サテライトRNAがCMV感染植物に出現する条件を明らかにするために、CMVのPepo株の*in vitro*転写産物を接種に用いた。接種20日後(day per inoculate, dpi)以降、10日ごとにサンプルを回収し、satRNAの検出を行った。また、汁液接種には20dpiのサンプルを用い、弱毒化などの選抜をほとんど加えずに継代を行った。*N. benthamiana*では7代目まで継代を行ったが、satRNAの検出には至らなかった。

メロンでも*N. benthamiana*と同様の条件で継代接種を行った。継代初代ではほとんどが激しいモザイク症状を示す強毒葉だったが、代を経るごとに病徴の弱い弱毒葉が現れることが多くなっていき、そのような葉ではウイルス蓄積量の減少がELISAで確認できた。しかし、7代目30日まで検出を行ったが、*N. benthamiana*と同様、satRNAやDI-RNAの出現は確認できなかった。このことからメロンでのCMV-Pepoの病原性低下はサテライトRNAや2bの変異ではなく、別の原因が関与している可能性が考えられた。

*N. benthamiana*のCMV-Pepo感染葉を*Arabidopsis thaliana*に汁液接種してCMVを感染させ、2代目まで継代したが、satRNAの検出には至っていない。

そこで、現在各植物における7代目以降の継代接種を引き続き行うと同時に、トマトでも継代接種試験を開始した。

#### (7) 考察

各種継代ではsatRNAの検出はできなかった。継代の中で散在的に生じた弱い病徴の葉ではウイルスの蓄積量の減少は見られても、satRNAは存在しなかった。また、*N. benthamiana*の5代目に行った、100dpi以上経過した感染葉からもsatRNAが検出できなかったことから、CMVが長期間1つの植物体に感染しただけではsatRNAは出現せず、継代のようななんらかの刺激が必要であることが示唆された。弱毒化の選抜を行わなかった継代とほぼ同じ条件でCMVのFny系統とLS系統の感染性クローンを*Nicotiana tabacum*で継代したところ、Fny系統では8代目や11代目にsatRNAの出現が見られ、LS系統では11代継代してもsatRNAが検出されなかった。

*Nicotiana benthamiana*における継代5代目でsatRNAを検出しており、弱毒病の選抜を行わなかった実験では7代目まで継代してもsatRNAは確認できてなかった。これらのことからsatRNAの効率的な出現には弱毒化の選抜が関与していると考えられる。

一方、病徴の弱い葉では植物側のRNAサイレンシングがCMVに打ち勝ったとも考えられる。このため、サテライトRNA出現と弱

毒化を合わせて解析する場合には、植物側のサイレンシング機構も考慮に入れなければならない。

一方、宿主が変化すると病徴の変化が見られ、*N. benthamiana*で弱毒性を示したサテライトRNAを含むCMVは、メロン(アリス)においては弱毒性を示さないことが明らかになった。*N. benthamiana*では、継代によって*N. benthamiana*に適応したサテライトRNAが選抜され、宿主である*N. benthamiana*の病徴を抑制したものと考えられる。そのようなサテライトRNAをメロンに接種したところ、弱毒性を示さなかった。これは得られたサテライトRNAがメロンに適応したのではないため、目メロンではCMVの病徴を抑えられなかったものと考えられる。このことは、宿主とサテライトRNAとの間に、相互作用があることを示唆している。

また、*N. benthamiana*におけるサテライトRNAの塩基配列(図3)とメロン継代1代目の塩基配列(図4)を比較してみても、変異が4ヶ所から10ヶ所へと変異が急激に増加しており、このことから宿主の変化がサテライトRNAの複製・増殖に影響を与えていると考えられる。

CMVのサテライトRNAはどこで作られているのだろうか。最近のトランスクリプトームの概念では、mRNAだけでなく様々な一次転写産物のRNAがスプライシングやプロセッシングといったRNA編集を受けてmicroRNAやsiRNAなどの非翻訳性RNA(non-coding, ncRNA)として機能していることが明らかになりつつある。satRNAはCMV感染に呼応して、RNA編集によってsiRNAやmiRNAを再結合した新しいRNAとして編み出されているのではないかと考えられる。実は、完成性クローン由来のCMVを継代接種した*N. benthamiana*では、新たに検出されたsatRNAの塩基配列はかなり相同性が高く、satRNAを編み出す機構はかなり正確であると考えられる。このようなCMVのsatRNAを編み出す機構を解明する研究はこれまで例がなく、大きなチャレンジであり、今後も研究を継続し、学会発表を目指す。

#### 5. 主な発表論文等

現在のところなし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

夏秋 知英 (NATSUAKI TOMOHI DE)

宇都宮大学・農学部・教授

研究者番号：10134264