

令和元年6月21日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05615

研究課題名(和文) 出芽酵母を用いたトマト黄化えそウイルス逆遺伝学実験系の開発と増殖機構の解析

研究課題名(英文) Development of a tomato spotted wilt virus reverse genetics system and analyses of replication mechanisms using yeast

研究代表者

石橋 和夫 (ISHIBASHI, Kazuhiro)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・主任研究員

研究者番号：20611742

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,300,000円

研究成果の概要(和文)：トマト黄化えそウイルス(TSWV)はアザミウマによって媒介されるトマトの重要病害であるが、TSWVをはじめとする植物のマイナス鎖RNAウイルスの増殖機構はほとんどわかっていなかった。本研究では出芽酵母を用いてTSWV RNAの複製系を確立し、この系を用いてTSWVの複製に必要なシス配列を同定するとともに、遺伝子破壊株ライブラリーを用いた順遺伝学的スクリーニングによりTSWVの複製が低下する出芽酵母変異株を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルスは宿主の因子を利用して増殖する。当該因子が機能不全になった宿主ではウイルスは増殖することができないため、ウイルスの増殖機構を理解することは抗ウイルス戦略を考える上でも重要である。本研究では、独自に開発した実験系を用いることにより、トマトの重要病害であるトマト黄化えそウイルス(TSWV)が増殖に利用する因子の候補を多数同定した。本成果は、TSWVをはじめとするマイナス鎖RNAウイルスの増殖機構の理解を大きく進めると同時に、新たなウイルス抵抗性作物の作出に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Tomato spotted wilt virus (TSWV) is a negative-strand RNA virus causing a serious disease to tomato. This study aimed to investigate the replication mechanism of TSWV. Using a TSWV S RNA replication system in yeast, genome RNA sequences required for replication were determined. In addition, yeast mutants that did not support efficient TSWV RNA replication were identified.

研究分野：植物ウイルス学

キーワード：トマト黄化えそウイルス 出芽酵母 宿主因子 逆遺伝学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

TSWV はアザミウマによって媒介され、トマトをはじめ多くの植物に感染する重要病害ウイルスである。TSWV は3分節のゲノム(L, M, S)をもつマイナス鎖 RNA ウィルスで、5つのタンパク質をコードしている。他のマイナス鎖 RNA ウィルスと同様、ゲノム RNA はヌクレオキャプシドタンパク質および RNA ポリメラーゼとリボヌクレオタンパク質複合体(RNP)を形成した状態でウイルス粒子内に存在する。TSWV に対する抵抗性遺伝子が知られてはいるが、これを打破するウイルス変異株が出現しており、現在媒介昆虫の駆除以外に有効な防除策はない。

ウィルスの増殖機構の解析には、遺伝子操作(逆遺伝学)実験系が強力なツールとなるが、RNA ウィルスの場合、cDNA からの感染ができて初めて遺伝子操作が可能となる。プラス鎖 RNA ウィルスのゲノムは RNA のみで感染性を示すため、多くのプラス鎖 RNA ウィルスのクローン化 cDNA を用いた遺伝子操作実験系が 1980 年代以降に確立され、ウイルス増殖機構の解明に著しく貢献してきた。一方、TSWV など多くの重要病原ウイルスが含まれるにもかかわらず、当時植物のマイナス鎖 RNA ウィルスの逆遺伝学実験系は確立されておらず、増殖過程の分子レベルでの理解はほとんど進んでいなかった。逆遺伝学実験が可能になればマイナス鎖 RNA ウィルスの増殖・媒介サイクルについての理解が格段に深まり、新規防除策の構築に向けた基盤となることが期待できる。

動物に感染するマイナス鎖 RNA ウィルスについては、多くのウイルスで逆遺伝学実験系が確立されている。これらの例では、ウイルスのタンパク質を発現するプラスミドと cDNA からゲノム RNA を転写するプラスミドを同時に宿主細胞に導入し、ウイルスの RNP が再構築されたことにより増殖してきたウイルス粒子を回収する。しかし、原因は不明だが、植物細胞を用いた同様の実験系の報告はなかった(注:2015年に1例報告された)。私自身も試みたものの、成功していなかった。一方、植物プラス鎖 RNA ウィルスの研究ではモデル宿主として出芽酵母がしばしば用いられている。そこで私は出芽酵母をマイナス鎖 RNA ウィルスの研究にも利用できないかと考え、TSWV のヌクレオキャプシドタンパク質および RNA ポリメラーゼを出芽酵母で発現させる実験系を構築した(科研費若手 B による成果, H25-26)。この細胞にさらに S RNA (TSWV がもつ3分節のゲノムのうち一番短い分節)を発現するプラスミドを導入したところ、S RNA の複製が観察された。

そこで本研究では、(i) この出芽酵母を用いた TSWV レプリコン系をさらに発展させ、残りの2分節(L, M)についても出芽酵母細胞内で複製させる系を構築し、感染性を有する TSWV RNP を得ることを目指すと同時に、(ii) TSWV レプリコン系を用いて、S RNA の複製に関するウイルス側因子および出芽酵母遺伝子を探索した。

2. 研究の目的

RNA ウィルスの遺伝子操作は cDNA からの感染ができて初めて可能となるが、植物マイナス鎖 RNA ウィルスについてはこのような遺伝子操作実験系が未だ確立されておらず、増殖過程には未解明の点が多い。本研究では、トマト黄化えそウイルス(TSWV)の遺伝子操作実験系の確立を目指すとともに、増殖に関する宿主因子の探索とウイルス因子の解析を行う。これにより、現在知見が乏しいマイナス鎖 RNA ウィルスの増殖サイクルについての理解を深めるとともに、新規ウイルス防除策の構築に向けた基礎的知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

出芽酵母細胞内で TSWV の S, M, L 全ての分節を複製させる実験系を構築する。酵母細胞より TSWV RNP を抽出し、宿主植物に接種することによって感染性ウイルス粒子を回収する。この系が確立できたら、TSWV の各遺伝子に変異を導入し、それぞれの遺伝子が増殖過程のどの段階に寄与しているかを明らかにする。

TSWV S RNA のレプリコン系を用いて、S RNA に変異を導入することにより複製に関わる RNA シスエレメントを解析する。また、TSWV の複製が低下する出芽酵母変異株をスクリーニングする。同定された遺伝子について、独立に遺伝子破壊した変異株を用いて、当該遺伝子産物が TSWV の複製に必要であることを確認する。

4. 研究成果

出芽酵母における TSWV の L および M RNA の発現を試みたが、ウイルスゲノム中に RNA ポリメラーゼが転写を終結させやすい配列が複数箇所あるために、完全長の RNA を得ることはできなかった。イントロン配列の挿入や、T7 RNA ポリメラーゼによる発現など状況の打破を試みたが、残念ながら成功には至らなかった。

一方、酵母細胞内 TSWV S RNA 複製系を用いることにより、S RNA の遺伝子操作と導入変異の複製への影響を調べることが可能になった。そこで、S RNA の様々な領域に欠失をもつ変異体を作製し、複製の可否を調べた。その結果、いずれかの末端の非コード領域を欠失させたときに複製が起こらなくなり、これらの領域に複製に必要なシス配列が存在することが示唆された(図1)。当該領域をレポーター配列に付加したレプリコン RNA も高効率で複製したことから、TSWV RNA ポリメラーゼによる複製鑄型認識には両末端配列があれば十分であることがわかった。

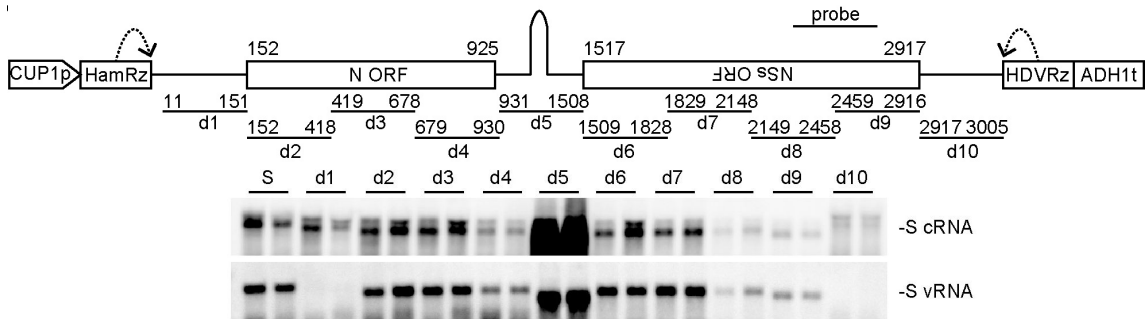


図1. TSWV S RNA 欠失変異体の出芽酵母における複製能

下線部の領域を欠失した各 S RNA 変異体の複製能を調べた。S cRNA は出芽酵母 RNA ポリメラーゼによる転写産物を含む極性，S vRNA はその逆鎖で TSWV RNA ポリメラーゼによる複製産物と考えられる。

ウイルスは宿主の因子を利用して増殖するが，TSWV をはじめとするマイナス鎖 RNA ウイルスの増殖に関する宿主因子に関する知見は少ない。出芽酵母は約 6000 個の遺伝子を持つが，このうち約 5000 の遺伝子が破壊されたライブラリーが市販されており，これを用いて TSWV の複製が低下する変異株のスクリーニングを行うことにより，TSWV の複製に関する宿主因子の同定を目指した。まず，なるべく操作が簡便になるよう，レポーター遺伝子の発現を利用したスクリーニング法を計画したが，レポーター遺伝子の発現量が低いためうまくいかなかった。これは，出芽酵母細胞内で TSWV S RNA の複製は起こるものの，mRNA の転写効率が著しく低いことが一因と考えられる。そこで複製産物の RNA そのものを検出することとした。TSWV の S RNA 全長と比較して，複製に必須な両末端のみをもつレプリコン RNA の方が高い複製効率を示したため，スクリーニングにはこのレプリコン RNA を用いた。また，多検体を同時に処理できるよう，96 穴プレートを用いて酵母の形質転換，培養，RNA 抽出，ドットプロットハイブリダイゼーションによる複製産物の検出を行う一連の実験系を構築した。さらに，ハイスループットの一次スクリーニングでは結果が不安定だったため，一次候補株について個別に培養して解析し直す二次スクリーニングを行った。以上により，入手した 5000 系統全てについてスクリーニングを終え，100 系統近くの二次候補株を得た。

ライブラリー由来の遺伝子破壊株では使用できる選択マーカーの数が限られるため，さらに詳細な解析を行うために一部の候補遺伝子については，実験室系統の出芽酵母において相同組換えにより当該遺伝子を欠失させた変異株を作出した。得られた変異株における TSWV の複製効率を調べたところ，複製効率の低下が再現できた株とできなかった株があった。その中で，生体内膜輸送に関与する ESCRT 複合体関連因子である *VPS23* 遺伝子および *BRO1* 遺伝子の欠失変異体における TSWV レプリコン RNA の複製レベルを図 2 に示す。

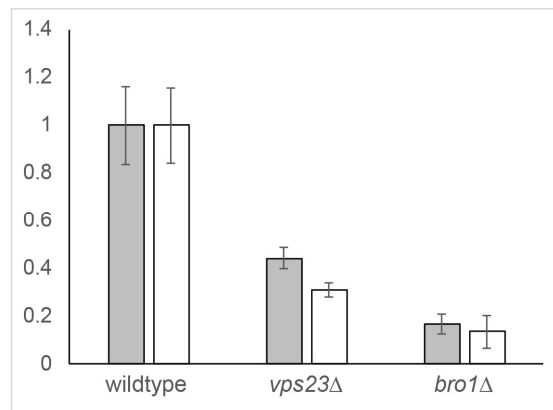


図2. ESCRT 関連因子である *vps23* および *bro1* 欠損株における TSWV の複製低下
灰色はウイルスの相補鎖 RNA (cRNA) の，白色はゲノム鎖 RNA (vRNA) の定量値。

以上により同定した TSWV の複製に関与すると考えられる宿主因子の多くは，これまでにマイナス鎖 RNA ウイルスの複製への関与が報告されていないものであり，今後機能解析を進めることにより，マイナス鎖 RNA ウイルスの複製機構の解明に大きく資するものと期待できる。また，いくつかの候補遺伝子は，プラス鎖 RNA ウイルスの複製への関与が報告されているものであったため，両者の複製機構に何らかの共通性が存在する可能性が示唆された。今後の研究により RNA ウイルスの進化に関する新たな知見が得られるかもしれない。

〔雑誌論文〕(計2件)

1. 石橋和太、石川雅之 植物のウイルス抵抗性遺伝子 ウイルス 68(1):13-20 2018年 査読無
2. Kazuhiro Ishibashi, Eiko Matsumoto-Yokoyama, Masayuki Ishikawa. A tomato spotted wilt virus S RNA-based replicon system in yeast. Scientific Reports 7:12647 2017年 査読有 doi:10.1038/s41598-017-12687-8

〔学会発表〕(計3件)

1. 石橋和太、石川雅之: トマト黄化えそウイルス S RNA の複製に必要なシス配列の解析 平成28年度日本植物病理学会大会 2016年
2. 石橋和太、石川雅之: 出芽酵母細胞内におけるトマト黄化えそウイルスの複製 植物微生物研究会第25回研究交流会 2015年
3. 石橋和太、石川雅之: 出芽酵母におけるトマト黄化えそウイルス RNA 複製機構の解析 日本植物病理学会関東部会 2015年

〔その他〕

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。