

平成21年6月1日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18380028
 研究課題名（和文） ノンコーディング RNA 病原体“ウイロイド”の自律複製能と病原性発現の分子機構
 研究課題名（英文） Molecular mechanisms of replication and pathogenicity of viroid – non-coding RNA pathogen
 研究代表者：佐野 輝男 （SANO TERUO）
 弘前大学・農学生命科学部・教授
 研究者番号：30142699

研究成果の概要：

ノンコーディング RNA 病原体“ウイロイド”の自己複製能と病原性を RNA サイレンシングの観点から解析した。ウイロイド感染植物に誘導されるウイロイドを標的とする RNA サイレンシングにより、ウイロイド分子は少なくとも5箇所のホットスポットが標的となり分解され、多様なウイロイド特異的 small RNA が宿主細胞内に蓄積することを明らかにした。ウイロイドは想像以上に複雑な機構で RNA サイレンシングの標的になっていると考えられる

RNA 配列の類似性を基に2次構造を予測する新しいプログラムを開発し、RNA の自己複製と分子構造の関連性を解析するための基盤を構築した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2007年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2008年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：ウイロイド、ノンコーディング RNA、RNA サイレンシング、siRNA シークエンス

1. 研究開始当初の背景

ウイロイドは現在知られている最小の病原体で、ジャガイモ、キュウリ、キク、ホップ、カンキツ、リンゴ、ココヤシなど、様々な農作物に感染し重大な病気を引き起こす。その本体はわずか246-401ヌクレオチドのRNAで、環状1本鎖という自然界では極めて特異な分子構造を持つ。ウイロイドは感染植物に矮化、葉巻、壞疽、果実の奇形や着色

障害など様々な重篤な病状を引き起こすにもかかわらず、奇妙なことに、その分子中には一切のタンパク質情報を有しない。即ち、タンパク質に翻訳されないRNA、“Non-coding RNA”の一種であり、その特異な分子構造中に自律複製と病原性に関わる全ての要素を含み、病原性発現にはRNAサイレンシングとの関連が指摘されている（佐野輝男：ウイロイドー自律複製するノンコー

ディング RNA. 化学と生物 42 巻 : 508-513. 2004、他)。

独自のタンパク質情報を持たないウイロイドが、宿主植物細胞内で自律的に複製できるのは何故か？自律複製しない Non-coding RNA との違いをもたらす分子構造上の特徴は何か？さらに、矮化や果実の奇形など、宿主に形態異常を引き起こすのは何故か？本研究は、ウイロイドを Non-coding RNA あるいは機能性 RNA のひとつとする新しい視点で捉え直し、近年急速に進展している RNA サイレncing機構に関連する新規な発想に基づいたウイロイド研究を展開した。

2. 研究の目的

ウイロイドは 1970 年代初めに発見されて以来、主にウイルス学的な観点から、分子構造、複製機構、病原性、宿主相互作用などに関する様々な研究が展開されてきた。しかし、近年、ポストゲノム研究の進展の中で、RNA サイレncingという新しい防御機構の概念が発見され、ゲノムの非翻訳領域に多数の機能性 RNA (或は Non-coding RNA) が存在し、タンパク質に翻訳されずに siRNA や microRNA などの形で重要な役割を演じることが明らかにされた結果、ウイルス学的な観点に加え、機能性 RNA の観点からの研究も必要不可欠になってきた。本研究は、このような新しい研究の展開を視野に入れ、植物病理学 (代表者: 佐野)、植物分子遺伝学 (千田峰生)、バイオインフォマティクス (種田晃人) の専門家に、ウイロイド研究のリーダーの一人である R.A.Owens 博士を海外研究協力者として組織し、RNA サイレncing機構という新しい概念に基づいてウイロイドの病原性発現機構を捉えなおし、申請者らが蓄積してきたウイロイドの病原性発現機構の分子基盤を解明しようとするものである。

本研究の結果、RNA サイレncingという新しい遺伝子発現制御機構に関する概念の中で、ウイロイドの標的遺伝子が同定され、病原性発現の分子基盤が解明されることが期待される。また、病原性発現機構の解析を通してカルコン合成酵素遺伝子など、植物の生育 (形態形成) に重要な役割を果たす遺伝子の新しい機能と制御機構が明らかになることも期待される。

3. 研究の方法

(1) ウイロイド感染により宿主植物に誘導される RNA サイレncing と病原性の関係

ポストゲノム研究の中心課題として、この数年急速な進歩を遂げている Non-coding RNA の機能に関する新知見を基に、感染宿主植物細胞内で自律的に増殖したウイロイドが病原性発現に至る分子機構を分析する。

まず Potato spindle tuber viroid (以下 PSTVd) 感染トマトをモデル実験系として、ウイロイド感染試験・病徴観察、宿主遺伝子発現解析 (ノザン解析等) を系統的に実施し、矮化や果実の奇形・着色異常など栽培現場で問題となる病徴発現に至る宿主側標的遺伝子を同定する。

また、標的遺伝子に関連する siRNA や microRNA など small RNA の発現変化と標的遺伝子のメチル化状態などを解析し、RNA サイレncing機構との関連性をベースにその発現制御の分子基盤を考察する。さらに以上のモデル実験系で得られた情報を基に、より実用価値の高いキク (矮化)、ホップ (矮化)、リンゴ (奇形、さび、斑入り果実) などのウイロイド病の病原性発現機構解明につなげたい。

(2) 自律複製能を生み出す分子構造のバイオインフォマティクス解析と実験的検証

Non-coding RNA としてみた場合、ウイロイドの病原性はその分子構造・自律複製能と切り離して考えることはできない。バイオインフォマティクスの解析手法を用いて、精度の高いマルチプルアライメントから RNA 2 次構造を予測する新規なプログラムを開発し、既に申請者が保有している様々なウイロイド変異体とキメラ分子の感染性試験から得られた結果を基に、自律複製能の有無と関連する 2 次構造を予測する。予測に基づく新たな変異体の感染実験と自律複製能を持たない正常細胞内の Non-coding RNA との同プログラムによる比較をベースに、ウイロイドの自律複製能と病原性をもたらす分子構造上の特徴を分析する。

4. 研究成果

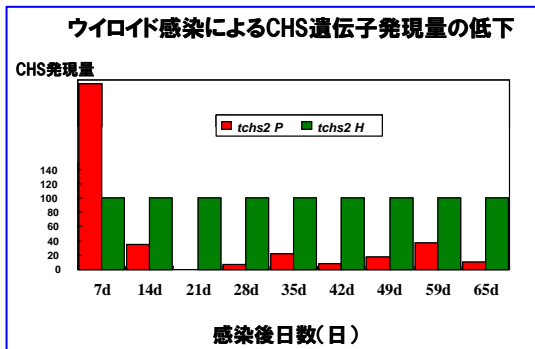
(1) ウイロイド感染により宿主植物に誘導される RNA サイレncing と病原性の関係

① ウイロイドの病徴発現に関わる宿主遺伝子: ウイロイド感染植物では発病に伴いフラボノイド生合成系のキーエンザイムである CHS 発現量が特異的に低下することが明らかになっている (申請者等未発表データ)。

まず、CHS 転写量が低下した PSTVd 感染トマトの PSTVd 特異的 siRNA と CHS 特異的 siRNA の生成量を分析した。その結果、多量の PSTVd 特異的 siRNA が蓄積するにもかかわらず CHS 特異的 siRNA 蓄積量の増加は全く確認されなかった。即ち、PSTVd を標的とする RNA サイレncing が CHS 転写物を直接転写後分解することでその転写量を低下させている可能性は否定された。

そこで次に、ウイロイド感染植物のカルコン合成酵素 (CHS) 遺伝子の発現量の解析を行った。本研究費で購入した分析機器を活用して、トマト CHS 遺伝子 1 (*tchs1*)、トマ

ト CHS 遺伝子 2 (*tchs2*) 及び既に感染により発現量が低下すると報告されているエクспанシン遺伝子 (*Le-exp1*) (Qi & Ding, 2003) について発現量の定量的分析を行った。その結果、*tchs1* は 30–50%、*tchs2* は 53–80%、*Le-exp1* は 0–84% の発現量の低下を示した。特に、*tchs2* の発現量が最も顕著で、発病との関連性が高いことが明らかになった (下図)。



以上の結果を基に、さらに、ウィロイド感染がフラボノイド生合成経路に及ぼす影響を解析するための、フラボノイド生合成系で *chs* 遺伝子の下流にある *chi*, *f3h* 及び *fls* 遺伝子を分離・クローニングし、その発現解析用のプローブを作成した。PSTVd をトマトに感染させ、*tchs2* 及び *chi*, *f3h*, *fls* 遺伝子発現量をノザンプロット法で経時的に解析した。その結果、いずれの遺伝子も、発病前の接種 7 日目では健全葉と感染葉で発現量に差はなかったが、病徴 (葉巻) 発現 (14 日目) に伴い、発病葉での発現量が減少し、*tchs2* では健全に比べ約 65–90% も減少した。ウィロイド感染により CHS を含めたフラボノイド生合成経路が影響を受けることが、病徴発現と関連する可能性が示唆された。

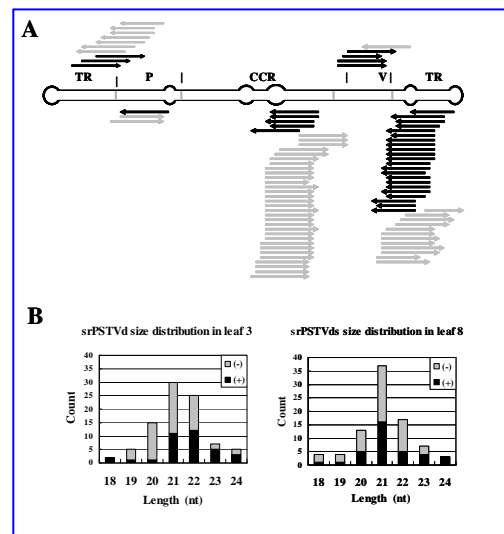
しかし、一方で、*tchs2* 以外の遺伝子群の発現レベルは低く、今後さらにリアルタイム PCR 法等、より感度の高い手法で分析する必要がある。また、フラボノイド生合成系がトマトの生育にどのような役割を果たしているかに関する情報が乏しく、*chs* 遺伝子の発現低下がどのような過程で矮化や葉巻などの病徴発現に結びつくか、今後、更なる研究が必要である。

② ウィロイド特異的 small RNA の蓄積パターンとシーケンス解析: まず、PSTVd 特異的 siRNA (以下、srPSTVd) の経時的蓄積パターンの詳細な分析を行ない、感染時期に依存した特徴的な蓄積パターンを明らかにした。即ちウィロイドが宿主細胞に侵入後、細胞質を経由して核で増殖し、再び細胞質を経由して隣接細胞に侵入するまでの間に、核あるいは細胞質に存在する複数の DICER により切断されている可能性が示唆された。

すなわち、ウィロイド感染植物に生じる

srPSTVd の経時的解析の結果、srPSTVd は接種後 12 日目頃から検出レベルに達し、25 日目頃にかけて、茎頂部に近い葉原基からは約 21 塩基の短い srPSTVd のみが検出され、一方、明瞭な病徴が現れた下部展開葉では約 21 塩基の srPSTVd に加えて約 23–24 塩基の srPSTVd が検出された。接種後 20 日目の試料を選び、第 1、3、4、6、8、9、10 葉に生成している srPSTVd のシーケンスを行った結果、srPSTVd はウィロイド分子の特定の領域から集中して生成してくることが明らかになった。下部展開葉では 5 領域に、頂部葉原基ではそのうちの主に 3 領域に集中していた (下図 A)。また、領域によってプラス鎖とマイナス鎖の頻度に偏りがあった (下図 B)。

さらに、ウィロイド感染植物に生じる srPSTVd の茎と葉の分布及びサイズと極性 (プラス/マイナス) を解析した。茎では葉より高濃度の srPSTVd が蓄積していた。また、茎・葉共に、プラス鎖由来の srPSTVd には約 21 塩基と 24 塩基の 2 種類が、マイナス鎖には約 21 塩基の 1 種類が存在していた。24 塩基の srPSTVd は従来の手法ではクローニング効率が極めて悪く、末端に何らかの修飾がある可能性が考えられた。



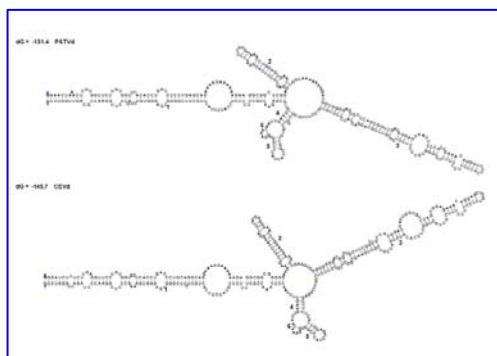
(2) 自律複製能を生み出す分子構造のバイオインフォマティクス解析と実験的検証

① RNA 配列用高精度マルチプルアライメント Web システムの開発:

2 本の RNA に共通な 2 次構造とペアワイズアライメントを同時に得ることができる Cofolga で、複製能を持つウィロイド変異体と持たない変異体の 2 次構造予測を行い、両分子間で構造上の変化を伴う可能性のある領域を特定した。

また、新規な変異を有する ADFVd を分離・同定し、Cofolga で 2 次構造予測を試み

た。その結果、mfold では、従来報告された ADFVd と新規変異体では異なる 2 次構造が予測されたのに対して、Cofolga では両変異体ともほぼ類似の 2 次構造を予測することができた (下図)。



図説明：塩基配列の異なる (相同性約 70%) 2 種類のウイロイドの配列類似性を基に予測した 2 次構造モデル。Pospiviroid 科に属する Potato spindle tuber viroid と Citrus exocortis viroid の予測された 2 次構造モデルを示した。

RNA 配列用高精度マルチプルアライメントウェブシステムのテスト版を完成し、ウェブ上で公開した。現在、計算時間の観点から配列長が 150 塩基以内の直鎖 RNA、配列本数 5 本以下という制限を行っており、ウイロイド対応版 (環状 RNA、配列長 400 塩基程度以内) の公開に向けてアルゴリズムの改善を行っている。また、遺伝的アルゴリズムによる二次構造を考慮した RNA 配列アライメントアルゴリズムについて、論文を発表した。

遺伝的アルゴリズムを応用して新しい RNA 共通二次構造予測プログラムを開発し、ベンチマークテストにより従来手法と比べて高効率に低配列類似度における RNA 共通二次構造予測を行えることを示した。RNA の部分的配列類似性を基に、様々な変異を有するウイロイド RNA の 2 次構造予測が可能になった。

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 15 件)

- ① Ikeda, T., Ohnishi, S., Senda, M., Miyoshi, T., Ishimoto, M., Kitamura, K. and Funatsuki, H.: A novel major quantitative trait locus controlling seed development at low temperature in soybean (*Glycine max*). *Theor. Appl. Genet.*, 2009, in Press
- ② Hou, W., Sano, T., Li, F., Wu, A., Li, L.

and Li, S.: Identification and characterization of a new Coleviroid (CbVd-5). *Arch. Virol.* 154:315-320, 2009. (DOI 10.1007/s00705-008-0276-6)

- ③ Taneda, A.: An efficient genetic algorithm for structural RNA pairwise alignment and its application to non-coding RNA discovery in yeast. *BMC Bioinformatics* 9: 521 doi:10.1186/1471-2105-9-521 (20 頁), 2008.
- ④ Sano, T.: Study on viroids in Japan, *J Gen Plant Pathol*, 74:450-453, 2008.
- ⑤ 佐野輝男: 本邦に発生するウイロイドの研究 日植病報 74 巻 131-133, 2008.
- ⑥ Sano, T., Isono, S., Matsuki, K., Kawaguchi-Ito, Y., Tanaka, K. Kond, K., Iijima, A., Bar-Joseph, M: Vegetative propagation and its possible role as a genetic bottleneck in the shaping of the Apple fruit crinkle viroid populations in apple and hop plants. *Virus Genes* 37(3): 298-303. 2008.
- ⑦ Machida, S., Shibuya, S. and Sano, T.: Enrichment of viroid small RNAs by hybridization selection using biotinylated RNA transcripts for the analysis of viroid inducing RNA silencing. *J. Gen. Pl. Pathol.* 74: 203-207. 2008.
- ⑧ 佐野輝男: ウイロイド, 植物防疫 61 巻 11 号: 660-664, 2007.
- ⑨ Machida, S., Yamahata, N., Watanuki, H., Owens, R. and Sano, T.: Successive accumulation of two size classes of viroid-specific small RNA in potato spindle tuber viroid-infected tomato plants. *J. Gen. Virol.* 88: 3452-3457. 2007.
- ⑩ Yaegashi, H., Isogai, M., Tajima, H., Sano, T. and Yoshikawa, N.: The combinations of the two amino acids (Ala40 and Phe75 or Ser40 and Tyr75) in the Coat Protein of apple chlorotic leaf spot virus are crucial for infectivity. *J. Gen. Virol.* 88: 2611-2618. 2007.
- ⑪ Yang, Y., Wang, H., Cheng, Z., Sano, T. and Li, S.: First report of Hop stunt viroid from plum in China. *Plant Pathology* 56: 339, 2007.
- ⑫ Guo, R., Sano, T., Cheng, Z. and Li, S.: Detection of Australian grapevine viroid in a grapevine more than 100 years old in Xinjiang, China *Plant Pathology* 56: 339, 2007.
- ⑬ Yang, Y.A., Wang, H.Q., Guo, R., Cheng, Z., M. Li, S., and Sano, T.: First Report of Hop stunt viroid in Apricot in China.

Plant Dis. 90; 828, 2006.

- ⑭ Yamamoto H. and Sano, T.: An epidemiological survey of *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* in Akita Prefecture, as a model region in Japan. *J. Gen. Pl. Pathol.* 72(6):387-390. 2006.
- ⑮ Cohen, O., Batuman, O., Stanbekova, G., Sano, T., Mawassi, M. and Bar-Joseph, M.: Construction of a multiprobe for the simultaneous detection of viroids infecting citrus trees. *Virus Genes* 33:287-292. 2006.

[学会発表] (計 14 件)

- ① 葛巻英祐・佐野輝男: ウイロイドの病徴発現に伴って発現量が低下するフラボノイド生合成系遺伝子群の発現量解析, 平成 21 年度日本植物病理学会, 2009 年 3 月 27 日, 山形市 (山形大学)
- ② Sano, T., Isono, S., Tsubame, T., Tsushima, Y., Urasaki, N., Kawano, S., Uemori, R., Ooura, T., Takeda, O., Mukai, H.: Cycleave Isothermal chimeric amplification of nucleic acids (Cycleave-ICAN) for the sensitive, rapid and simple diagnosis of viroids, 9th International Congress of Plant Pathology, August 24-29, 2008, Trino, Italy
- ③ Sano, T., Matsuki, K., Isono, S., Tsuji, M., Tanaka, K.: The diversity and identity of Apple fruit crinkle viroid isolates in apple and hop. 9th International Congress of Plant Pathology, August 24-29, 2008, Trino, Italy
- ④ 伊藤 (川口) 陽子・佐野輝男: ホップ矮化ウイロイド-ブドウ株の *in vitro* 転写物がホップに持続感染している間に生じる塩基変異プロセスの解析, 平成 20 年度日本植物病理学会東北部会, 2008 年 9 月 25 日, 盛岡市 (岩手大学)
- ⑤ 伊藤 (川口) 陽子・佐野輝男: ホップ矮化ウイロイド-ブドウ変異体がホップに持続感染している間に生じる塩基変異プロセスの解析: 平成 20 年度日本植物病理学会, 2008 年 4 月 26-28 日, 松江市 (くにびきメッセ)
- ⑥ 渋谷允・町田悟・佐野輝男: ウイロイド特異的 small RNAs の感染植物体中の経時的蓄積パターンとその塩基配列解析, 平成 20 年度日本植物病理学会, 2008 年 4 月 26-28 日, 松江市 (くにびきメッセ)
- ⑦ 渋谷 允、佐野輝男: ウイロイド特異的 small RNA の生成パターンと塩基配列解析—生成ホットスポットの存在, 第 55 回日本ウイルス学会学術集会, 2007 年 10 月 22 日,

札幌市 (コンベンションセンター)

- ⑧ 崔海東・山本英樹・佐野輝男: 日本のキク品種におけるキククロロティックモットルウイロイドの病徴, 平成 19 年度日本植物病理学会東北部会 2007 年 9 月 20 日 秋田市 (秋田県立大学)
- ⑨ 伊藤 (川口) 陽子・飯野雅崇・田川雅也・佐野輝男: ホップ矮化ウイロイド (HSVd) 分離株の多様性と宿主適応について, 平成 19 年度日本植物病理学会東北部会, 2007 年 9 月 20 日, 秋田市 (秋田県立大学)
- ⑩ 佐野輝男・松木慧悟・磯野清香・辻雅晴・田中和明・近藤賢一・飯島章彦: リンゴゆず果ウイロイド-ホップ分離株と-リンゴ分離株の同一性, 平成 19 年度日本植物病理学会大会 (2007 年 3 月 28 日) 宇都宮市 (宇都宮大学)
- ⑪ 磯野清香・種田晃人・佐野輝男・近藤賢一・飯島章彦: 日本の栽培リンゴから検出された Apple dimple fruit viroid (ADFVd), 平成 19 年度日本植物病理学会大会 (2007 年 3 月 28 日) 宇都宮市 (宇都宮大学)
- ⑫ 磯野清香・佐野輝男・忠英一・上森隆司・向井博之: 温遺伝子増幅法 (ICAN法) を用いたキク矮化ウイロイドの発生圃場調査. 日本植物病理学会東北部会 2006 年 9 月 29 日, 鶴岡市 (山形大学)
- ⑬ 對馬由記子・佐野輝男・向井博之・上森隆司: リンゴさび果病ウイロイド (Apple scar skin viroid) の ICAN (Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids) 法による検出. 日本植物病理学会大会 2006 年 6 月 5 日, 札幌市 (コンベンションセンター)
- ⑭ 磯野清香・佐野輝男・上森隆司・向井博之: 等温遺伝子増幅法 (ICAN法) を用いたキク矮化ウイロイドの診断. 日本植物病理学会大会 2006 年 6 月 5 日, 札幌市 (コンベンションセンター)

[図書] (計 2 件)

- ① K. Eastwell and T. Sano, *Compendium of Hop Diseases, Arthropod Pests and Other Disorders*, APS Press, 2009, 112 pages, ISBN 978-0-89054-376-4
- ② 千田峰生: 種子の科学とバイオテクノロジー (第 4 章 4-4 を担当), 学会出版センター, 2009, 396 頁, ISBN 978-4-7622-3059-2

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐野 輝男 (SANO TERUO)
弘前大学・農学生命科学部・教授
研究者番号: 30142699

(2) 研究分担者

千田 峰生 (SENDAMINEO)
弘前大学・農学生命科学部・准教授
研究者番号：30261457

種田 晃人 (TANEDAAKITO)
弘前大学・理工学研究科・助教
研究者番号：70332492

(3)連携研究者
海外研究協力者
R.A.Owens
USDA・Agriculture Research Service
Molecular Plant Pathology Laboratory