

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：11101  
研究種目：若手研究  
研究期間：2019～2020  
課題番号：19K15842  
研究課題名（和文）環状一本鎖RNAウイルスの病原性発現メカニズムの解明 標的宿主因子の探索一

研究課題名（英文）Elucidation of pathogenetic expression mechanism of cyclic single-stranded RNA viroids &#331;Search for target host factors&#331;

## 研究代表者

対馬 大希 (TSUSHIMA, DAIKI)

弘前大学・医学研究科・研究機関研究員

研究者番号：20803943

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）： PSTVd弱毒株の左側分子に特徴的な塩基変異について、PSTVd強毒株に変異を導入した変異体10種を構築し、感染性クローンをRutgersトマトへ接種したところ、全ての変異体が感染性を示した。感染後の変異体の塩基配列は、高確率で共変異を誘導するが、病原性にはほとんど影響しないことが明らかになった。しかしながら、42番塩基のC Uに単一の変異誘導によって、一部の強毒株が弱毒化に至った。次世代シーケンス解析で得られたデータをもとにin silico解析を実施し、標的宿主因子として見出されたマイクロRNA種について、標的候補2種の検出用プローブを選定し検定したが、差異は見られなかった。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

日本国内では、行政機関等の研究所でウイルス病の診断や作物への影響の調査は行っているが、ウイルスの病原性メカニズムに関する研究までは至っておらず、本研究はこれまでに得られた基礎データをもとに進展させた研究であると言える。近年、ヒトの脳内にもウイルスと同じ環状一本鎖RNAが多数存在していることが発見され、その機能が注目されている。すなわち、本研究によって得られる知見は、将来的には植物だけでなく動物の研究にも有益な情報を提供できる可能性を秘めている。

研究成果の概要（英文）： Regarding the nucleotide mutations characteristic of the left hand half molecular of the PSTVd attenuated isolates, we constructed 10 mutants that mutated nucleotide mutations into PSTVd virulent isolates. Then, each infectious clones were inoculated to Rutgers tomatoes, and all the mutants were infected. It was revealed that the nucleotide sequence of the mutant after infection induces co-mutation with high probability, but has little effect on the pathogenicity. However, a single mutagenesis of base 42C to U resulted in attenuation of some virulent strains.

We performed In silico analysis based on the data obtained in the next-generation sequence analysis. For the microRNA species found as the target host factor, detection probes of two target candidates were selected and tested, but no difference was found.

研究分野：植物病理学

キーワード：ウイルス PSTVd スモールRNA マイクロRNA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、農産物の国際化に伴い種苗類が流通・拡大する中で、検疫病害指定ウイルスが世界中に蔓延しつつあり、植物保護の観点から大きな懸念材料となっている。ウイルスは、ジャガイモやせいもウイルス (PSTVd) に代表される、全長 250 - 400 塩基程度の環状一本鎖 RNA であり、これまでに宿主域の特定や様々な分離株の同定が行われてきたが、詳細な病原性の発現メカニズムの解明には至っていない。ウイルスの病原性決定因子の特定は、これまでも PSTVd 分離株のいくつかの組合せで分析されており、PSTVd 分子中の Pathogenicity 領域が病原性の程度を決定する上で重要であることが示唆されている。

一方で、ウイルスは強力な RNA サイレncing 誘導体であり、多量のウイルスゲノム由来の Small RNA (Viroid-sRNA) がウイルス感染植物に蓄積することから、Viroid-sRNA は、ウイルスの病原性発現を紐解く重要なキー因子であると考えられている。Viroid-sRNA だけではなく、ウイルス感染によって発現量が変動するタンパク質をはじめとする宿主側因子の研究も精力的に行われてきたが、やはり病原性発現の分子機構について未解明の部分が多い。

### 2. 研究の目的

本研究計画を進めていくうえで、申請者は次のような研究成果及び報告を得ている。

PSTVd 右側分子中の塩基置換は、病原性の決定にはさほど影響せず、左側分子の補助的な役割を果たす (Tsushima et al., 2016)

PSTVd 強毒株への単一な塩基変異導入により弱毒化を誘発する。すなわち、単一な塩基変異導入により PSTVd の病原性が制御できる可能性を実証した (未発表)

ウイルス感染で生じる Viroid-sRNA の蓄積レベルは均一ではなく、特定のホットスポット領域から生成する Viroid-sRNA は病原性に相関を示す (Tsushima et al., 2015)

PSTVd 感染により宿主側因子であるマイクロ RNA 蓄積レベルは変動し、特に、miR159 と miR319 は PSTVd の病原性の強弱に一致する (Tsushima et al., 2015)

ウイルス結合タンパク質 (VirP1) をノックダウンしたタバコでは、PSTVd の複製或いは全身移行能力が著しく低下した (Kalantidis et al., 2007)

これらの研究成果をもとに、本研究では、未解明の PSTVd の病原性発現機構に関して多方面 (ウイルスゲノム側及び宿主ゲノム側) からアプローチすることによって、世界中で報告された多様なウイルス種の病原性リスクを評価し、ウイルス病を防除するための基礎研究を展開することを目的とする。

### 3. 研究の方法

I. 強毒型の病原性を有する PSTVd 系統に対して、左側分子中の単一な塩基変異導入により弱毒化を誘発することが可能か調査する

1) PSTVd 弱毒株に特徴的な左側分子中 (Pathogenicity 領域周辺) の塩基置換を、PSTVd 強毒株に変異導入した変異体 10 種を構築・合成する

2) PSTVd の指標植物であるトマト品種 (Rutgers) に接種し、複製能、蓄積量、病徴の強弱を RNA ゲルブロット分析、定量 RT-PCR と目視で評価する

3) PSTVd の複製能 (蓄積量)・病徴の強さを制御するウイルス側因子を塩基レベルで明らかにし、新たな病原性発現モデルを提案する

II. Viroid-sRNA のホットスポット領域に一致する塩基配列をトマトゲノム上で相同配列検索 (in silico 解析) し、PSTVd の病原性との関連性を見出す

1) 相同配列検索で見出された仮想標的遺伝子配列をもとに、標的宿主因子を探索する

2) 仮想標的遺伝子と予想された塩基配列との類似性が異なる変異体を複数構築する

3) 感受性トマト品種に接種し、複製能、蓄積量、病徴の強弱を評価する

III. PSTVd 変異体および検疫病害指定ウイルス種感染トマトから得た RNA 抽出物中での miR159 と miR319 の発現量の変動を分析する

1) 検疫病害指定ウイルス種 (TCDVd、TASVd、TPMVd 他) をトマトに接種する

2) 標的候補 miRNA (miR159 と miR319) の検定用プローブを miRBase で選定し、PSTVd 及び各ウイルス感染トマト中での miR159 と miR319 の発現量を定量分析する

3) ポスピウイルス科に属するウイルスの病原性の発現機構を miRNA と関連付けて、ポスピウイルス全般に共通する標的宿主因子となりえるか評価する

IV. 小型トマト品種であるマイクロトムを用い、VirP1 タンパク質 をノックダウンしたトマトを作成し、PSTVd 感染に与える影響を評価する

1) RNAi を介した VirP1 ノックダウントマトを作成する

2) 作成したトマト中での VirP1-mRNA 発現レベルを野生型と比較する

3) 実際に PSTVd を接種し、感染の検定、種子伝染率の調査を行う

4) トマトでの PSTVd 感染における VirP1 タンパク質の役割を決定する

#### 4. 研究成果

I. 強毒型の病原性を有する PSTVd 系統に対して、左側分子中の単一な塩基変異導入により弱毒化を誘発することが可能か調査する

本研究では、先行研究として PSTVd 基準株と弱毒 PSTVd ダリア株間の左側分子中の塩基変異 (42, 43, 64, 310, 312 番) に着目し、トマトに対する病原性を比較分析した結果、ダリア株に特徴的な 42, 64 番塩基が基準株の弱毒化を誘発することが明らかになった (Kitabayashi et al., 2020)。基準株よりもさらに激しい病気を引き起こす致死型株である PSTVd-RG1 及び-AS1 株にも弱毒化を誘発することが可能か調べるために、さらに 10 種の変異体を作成し、分析した結果、42 番塩基を単一でダリア株型に変えた RG1 及び AS1 変異体はやや弱毒化した。これらの変異体について、接種後 1 か月目の感染トマトから RNA を抽出し、塩基変異の有無を調査したところ、PSTVd 左側分子への塩基変異導入は高確率で共変異を誘導するが、共変異した場合も病原性にはほとんど影響しないことが明らかになった。一方で、追加で変異体を作成し、ダリア株に強毒或は致死型の塩基変異を導入しても弱毒性を保持したことから、ダリア株は安定な弱毒株と考えられた。これらの結果から、PSTVd ダリア株の弱毒性は周辺の塩基配列及び分子構造の強固な相互作用によって保持されていることが推測された。

II. Viroid-sRNA のホットスポット領域に一致する塩基配列をトマトゲノム上で相同配列検索 (in silico 解析) し、PSTVd の病原性との関連性を見出す

in silico 解析によって PSTVd ゲノム上の 49 - 68 番塩基領域 (上側 P 領域) および 294 - 312 番塩基領域 (下側 P 領域) が仮想標的遺伝子として見出されたため、この領域について類似性が異なる変異体を 4 種作成し、トマトへ接種した。その結果、いずれの変異体もトマトへ感染性を示さなかったため、強固に保持された安定的な領域であると推測された。すなわち、この領域への変異導入によって PSTVd のトマトへの感染性が失われたと考えられた。

III. PSTVd 変異体および検疫病害指定ウイロイド種感染トマトから得た RNA 抽出物中での miR159 と miR319 の発現量の変動を分析する

まず、検疫病害指定ウイロイド種 (TCDVd, TASVd, TPMVd) の感染性クローンを作成し、トマトへ接種し、RNA 検定用サンプルを得た。次に、標的候補 miRNA (miR159 と miR319) の検定用プローブを miRBase で選定し、PSTVd 及び上記 3 種ウイロイドについて、miR159 と miR319 の発現量を定量分析した。その結果、健全トマトの場合と比較して、各ウイロイド間で差異は認められなかった。すなわち、今回の試験結果だけでは、標的候補 miRNA 2 種について標的宿主因子として判断できかねる結果となった。

IV. 小型トマト品種であるマイクロトムを用い、VirP1 タンパク質 をノックダウンしたトマトを作成し、PSTVd 感染に与える影響を評価する

まず、RNAi を介して作成済みであった Virp1 ノックダウントマト (品種: マイクロトム) について、VirP1-mRNA 発現レベルを野生型トマトと比較したところ、葉及び茎でそれぞれ 0.4 - 0.5 倍、0.2 倍程度に抑制されていたため、接種試験の供試材料として用いた。PSTVd 基準株とダリア株をそれぞれ 6 株ずつ接種したところ、全てのトマトへ感染した。健全株への感染性 (感染速度) と比較した場合、顕著な差は見られず、接種 2 か月目ではトマト体内で PSTVd は同程度の蓄積量であった。今回の試験に用いた Virp1 ノックダウントマトは、PSTVd の感染を抑えるに至らなかったため、種子伝染についても調査を実施しようとして試みたが、PSTVd 感染トマトでは不稔性となり、種子が得られなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shoya Kitabayashi, Daiki Tsushima, Charith Raj Adkar-Purushothama, Teruo Sano	4. 巻 21
2. 論文標題 Identification and Molecular Mechanisms of Key Nucleotides Causing Attenuation in Pathogenicity of Dahlia Isolate of Potato Spindle Tuber Viroid	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21197352	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 対馬大希・戸田 武・古屋廣光・藤 晋一
2. 発表標題 ダリアにおけるジャガイモやせいもウイルスの病原性および種子伝染に対するリスク評価
3. 学会等名 令和 2 年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------