

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06048

研究課題名(和文) ウイルスに付随する寄生性分子の病理学的動態解析

研究課題名(英文) Analysis of pathological dynamics of virus-associated parasitic DNA molecules

研究代表者

佐野 義孝 (Sano, Yoshitaka)

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：00226044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)： GFP導入植物に、TRVベクターを用いてプロモーター領域にメチル化を誘導し、GFP転写が抑制されたTGS植物を作出した。またクローンDNAの感染性を向上させるため、DNA-M、-U1、-U2の3種について変異解析により再選抜した。Rep領域を喪失した相同組み換え体サテライトDNAと、インタクトなRepを発現するDNAコンストラクトをアグロバクテリウムを介して同時接種し、組み換え体サテライトDNAを植物体中でトランス複製させるシステムを構築した。BBTV沖縄分離株の全ゲノムを初めて解析するとともにゲノムに付随する新規アルファサテライトを同定し、J1と名付けた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本試験開始当初、東南アジアおよび韓国からMDVのマメ科以外の広範な作物における感染被害が相次いで報告された。すなわちトマト、トウガラシ、パパイア、ユリ、ニンニクなどである。ただしこれらの報告ではMDV感染におけるサテライトの関与はほとんど調査されていない。申請者も国内で流通するユリやニンニクの球根を調査した結果、MDVが高率に無病徴感染しており、さらにマメ科以外の宿主に付随するアルファサテライトは特定の分子種に限定されることが判明した。本試験で得られた知見を基にMDVの病原性と宿主範囲拡大におけるサテライトの意義が感銘されることが期待される。

研究成果の概要(英文)： (1) Using a TRV vector, methylation was induced in the promoter region of GFP-introduced *N. benthamiana* plants to create TGS plants in which GFP transcription was suppressed. In order to improve the infectivity of the cloned DNA, three genomic segments, f DNA-M, -U1 and -U2, were further cloned and sequenced to obtain consensus DNA clones. (2) A homologous recombinant satellite DNA lacking the Rep region and a DNA construct expressing intact Rep were simultaneously inoculated via *Agrobacterium* to construct a system for trans-replicating the recombinant satellite DNA in *N. benthamiana* plants. (3) We analyzed the whole genome of BBTV Okinawa isolate for the first time and identified a novel alpha-satellite associated with the BBTV genome, and named J1.

研究分野：植物病理学

キーワード：植物ウイルス サテライト核酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ある種のウイルスに寄生して増殖する“サテライト”という付随性の因子が知られている。サテライトの多くは感染細胞中でウイルス複製機構を利用して増殖し、ウイルスがコードするタンパク外殻に包まれてウイルスとともに植物から植物へと伝搬する。ウイルスに対するサテライト共存の影響は多様であり、サテライトの中にはウイルス病原性を変化させるものが知られている。

2. 研究の目的

本研究は、ユニークな環状一本鎖 DNA ゲノムを持つ植物ウイルスとこれに付随するサテライト DNA を用いて、サテライトの寄生がウイルス複製や病徴発現に与える病理学的意義を解明することを目的とする。レンゲ萎縮ウイルス(MDV) はナノウイルス科に属する植物ウイルスで、アブラムシによって永続的に伝搬され、マメ科植物の師部細胞内で増殖し、黄化萎縮症を引き起こす。MDV のゲノムは、サイズ約 1,000 塩基で配列の異なる 8 種の環状 1 本鎖 DNA (-R, -S, -M, -C, -N, -U1, -U2, -U4) から成る分節ゲノムで、各 DNA が個別にウイルス外殻に包まれる“多粒子性ゲノム”構造を持つ。DNA 上には単一の翻訳読み枠 (ORF) の他ステムループ配列が一か所存在し、ここにある共通配列を起点としてローリング・サークル型の DNA 複製を行う。この複製過程は、DNA-R がコードするマスター複製開始タンパク質 (Ms-Rep) が他のすべてのゲノム DNA に作用して起こることが実証されている。さらに、MDV ゲノムに付随して複製する、 α -サテライト DNA がこれまでに 4 種 (MDC1A, MDC2A, MDC3A, MDC10A) 同定されている。 α -サテライトは自身の DNA 複製に関与するタンパク質 (Rep) をコードしており、MDV 感染細胞中で自律的に複製する能力を持ち、粒子形成とアブラムシ伝搬過程を MDV に依存するユニークなサテライト DNA である。これまでの調査で、自然感染した MDV の大半は、8 種のゲノム DNA に加えて 2-4 種類の α -サテライトを含んでおり、サテライトを全く含まないウイルスはわずか (5%未満) であることが分かっている。一方類似の配列を持つ α -サテライト DNA は他のナノウイルス種においても同定されているが、それらの病理学的意義すなわちウイルス複製に及ぼす影響は現在まで不明である。

3. 研究の方法

サテライトとの共存はウイルス複製に負荷を与えて、感染症状を軽減することにより宿主植物を延命させ、結果的に子孫ウイルスの感染機会拡大をもたらしているのか、あるいは α -サテライトがコードするタンパク質が自己複製以外に宿主因子と相互作用してウイルス DNA の転写阻害 (DNA メチル化) や転写後抑制 (RNA サイレncing) を抑制しているのか。本研究では病理学的視点から、ウイルスとサテライトおよび宿主植物間の詳細な動態解析を行う。さらに遺伝学的改変導入した α -サテライトを用いたノックアウトベクター構築の可能性や、 α -サテライト DNA が異なるナノウイルス間で水平伝搬可能か、について検証を試みる。

4. 研究成果

α -サテライトがウイルスゲノムの転写・複製に及ぼす影響の病理学的解析では、緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子が導入された *Nicotiana benthamiana* 16c 系統植物に対して TRV ベクターを用いて 35S プロモーター領域にメチル化を誘導し GFP 転写が抑制された TGS 系統植物を作出した。さらに MDV のすべてのゲノムセグメントおよび 4 種 α -サテライト DNA がコードするタンパクコード領域のすべてを PCR 増幅し、タンパク発現用の PVX ベクターに組み込みを完了した。期間中に試験を完了することができなかったが、今後、得られた組み換え PVX を *N. benthamiana* 16c TGS 系統植物に全身感染させて、各々の MDV タンパク質を TGS 植物体中で発現させた際、プロモーター領域に導入されたメチル化が軽減し、GFP 蛍光の回復を起こす MDV および α -サテライトの因子があるか、検証するのみである。また、この試験項目におけるポジティブ・コントロールとして、すでに TGS 抑制能が報告されているジェミニウイルス科ベ後モウイルス属のトマト黄化葉巻ウイルス (TYLCV) -滋賀分離株の感染葉を入手し、全ゲノム DNA をクローニング・シーケンス解析し、感染性 DNA を構築した。ウイルス DNA 複製に及ぼす影響については、そのベースとなるクローン DNA の感染性を向上させるため、8 種のウイルス DNA のうち、DNA-M、-U1、-U2 の 3 種についてさらなる変異解析を行い、最も普遍的なコンセンサス配列をもつ DNA クローンを再選抜した。これらを用いたササゲ植物体での MDV 全身感染性とアブラムシ伝搬性を確認した。 α -サテライト DNA への改変導入とベクター化については、既知のサテライト DNA のタンパクコード領域を欠失させる代わりに、自然感染した MDV 分離株で同定された DNA 複製に関与する遺伝子領域を喪失した相同組み換え体 α -サテライトを用いて感染性 DNA を構築し、ここに MDC3A 由来の複製開始タンパク質を 35S プロモーター制御化で発現するコンストラクトとともに *N. benthamiana* にアグロバクテリウム菌を介して導入し、Rep タンパクがトランスに作用して組み換え体 α -サテライト DNA を複製させるシステムの構築に成功した。 α -サテライトの異種ウイルス間の水平伝搬の検証試験では、ナノウイルス

科で属が異なるバナナバンチ トップウイルス BBTV 沖縄分離株の全ゲノムを初めて解析するとともに既知のナノウイルス関連 γ -サテライトに特異的なプライマーを用いて新規アルファサテライトを同定し、J1 と名付けた。バナナの代替宿主としてショウガ科の月桃への MDV 感染を確認したので、混合感染植物体からアルファサテライトのウイルス間水平伝搬については現在調査中である。本試験開始当初、東南アジアおよび韓国から MDV のマメ科以外の広範な作物における感染被害が相次いで報告された。すなわちトマト、トウガラシ、パパイア、ユリ、ニンニクなどである。ただしこれらの報告では MDV 感染における γ -サテライトの関与はほとんど調査されていない。申請者も国内で流通するユリやニンニクの球根を調査した結果、MDV が高率に無病徴感染しており、さらにマメ科以外の宿主に付随するアルファサテライトは特定の分子種に限定されることが判明した。本試験で得られた知見を基に MDV の病原性と宿主範囲拡大におけるサテライトの意義が感銘されることが期待される。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 John E. Thomas, Bruno Gronenborn, Robert M. Harding, Bikash Mandal, Ioana Grigoras, John W. Randles, Yoshitaka Sano, Tania Timchenko, H. Josef Vetter, Hsin-Hung Yeh, Heiko Ziebell and ICTV Report Consortium	4. 巻 1.2(3)
2. 論文標題 ICTV Virus Taxonomy Profile: Nanoviridae	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of General Virology	6. 最初と最後の頁 1-2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/jgv.0.001544	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 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐野義孝・風間佑美・田巻千郷・高濱有沙・夏秋啓子
2. 発表標題 パナパンチ - トップウイルス沖縄分離株のゲノムセグメントDNA-U3の転写産物解析
3. 学会等名 令和3年度日本植物病理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 トマト黄化葉巻ウイルスの感染系クロンの構築
2. 発表標題 棚橋正貴・猪俣陽輔・高濱有沙・小林聖隆・佐野義孝
3. 学会等名 第74回北陸病害虫研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 皆川裕香・佐野義孝
2. 発表標題 レンゲ萎縮ウイルスの宿主範囲の再検討
3. 学会等名 第74回北陸病害虫研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高濱有沙・猪俣陽輔・湊菜未・佐野義孝・夏秋啓子
2. 発表標題 パナパンチ - トップウイルス沖縄分離株のゲノムおよびアルファサテライトDNAの配列
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会関東部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 猪俣陽輔・高濱有沙・佐野義孝
2. 発表標題 ニコチアナベンサミアナ16c 転写抑制系統の作出
3. 学会等名 第73回北陸病害虫研究会
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