

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2013

課題番号：21580054

研究課題名(和文)多粒子性DNAウイルスのベクター化に向けた植物・昆虫におけるゲノム動態の解析

研究課題名(英文)Analyses of the dynamics of multipartite DNA virus genome toward the construction of a novel virus vector.

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) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：実験に用いていたウイルス分離株(MDV-N)の病原性低下が見られたため、試験期間の半ばでウイルス分離株の変更を余儀なくされた。このため当初予定していた転写制御や昆虫媒介に関する調査に変更が生じた。しかしながら、新たな採集した野生株の完全ゲノム配列の詳細な解析とサイレンシング抑制因子の同定を通じてMDV DNAの感染系の基礎が確立された。

研究成果の概要(英文)：By using newly identified MDV isolate, we have identified silencing suppressor and established the molecular basis of the viral infection system.

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：植物ウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

レンゲ萎縮ウイルス (Milk vetch dwarfvirus, MDV) は Nanoviridae 科に属する DNA ウイルスで、そのゲノムは、複数の環状 1 本鎖 DNA から構成される多粒子性の構造をとっており、ウイルスが持つ種々の遺伝情報は、極小球形 (直径 20nm) の粒子にパッケージングされた約 1kb の DNA コンポーネント上に個別にコードされている。各 DNA は上には単一の翻訳読み枠 (ORF) の他、ステムループ配列が存在し、このループ内にある保存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。このプロセスは、DNA-R がコードする複製開始タンパク質が他のゲノム DNA に in trans で作用することによって触媒されることが実証されている。日本国内で採集された MDV 感染葉から、これまでに計 12 種の環状 ssDNA が同定されているが、このうち 8 種 (DNA-R, -S, -M, -C, -N, -U1, -U2, -U4) は全てのウイルス分離株に普遍的に見られ、ウイルス増殖に必須のゲノムコンポーネントと考えられるが、各 DNA の機能については不明の点が多い。残り 4 種の DNA (C1, C2, C3, C10) は自律的に複製するゲノム付随性のサテライト様 DNA と考えられているが、それら付随性因子の病理学的意義はいまだわかっていない。これまでに、個々の MDV-DNA のプロモーター活性が、GUS レポーターと形質転換タバコで調査され、師部組織特異性を持つ強力なプロモーターが DNA-U1 および DNA-M で同定されている。

## 2. 研究の目的

本研究は、MDV ゲノムの植物細胞における転写制御や宿主の抵抗性 (ジーンサイレンシング) 抑制および昆虫媒介に関するゲノム領域を同定し、それらの分子機構を詳細に解析することにより、これら病原性に関与するゲノム領域を改変・制御して、目的遺伝子を特定の植物組織で高率に発現するベクターの構築を目指すものである。この目的を達成するため、および上述のウイルスゲノムにおける詳細な機能解析を行うためには、クローン化したウイルス DNA をアグロバクテリウムを介して植物体へ導入する '全身感染系' を確立することが重要な前提条件となる。これまで試験ではウイルス全身感染効率が低く、この原因として、実験に用いていたウイルス分離株 (MDV-N) が長期間 (25 年以上) に亘って一定条件下 (20 人口気象器内、ソラマメ宿主およびマメアブラムシ・ベクター) で継代維持を続けたため、遺伝的変異が蓄積して病原性が低下したこと、およびクローン化された DNA 配列中にマイナーな塩基置換が含まれていた可能性が示唆された。そこで、新たに MDV 野生株 (MDV-N11) を分離し、ゲノム DNA の変異を詳細に解析し、感染系の再構築を行った。併せて、これまで日本各地で採集した MDV 分地株およ

びバングラデシュから初めて分離された MDV 分離株の遺伝的変異の詳細な解析を行った。

## 3. 研究の方法

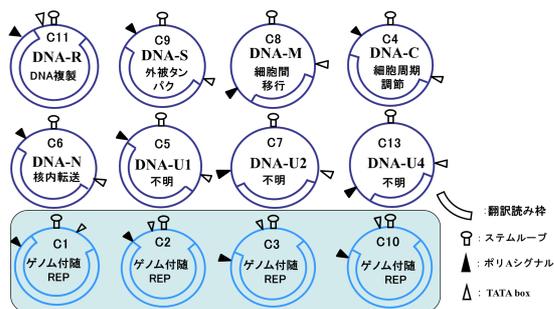
(1) ゲノム変異の解析と感染系の再構築  
野外から採集した MDV 感染ソラマメ葉組織からトータル DNA を抽出し、各 MDV-DNA に特異的なプライマーと校正活性を持ち正確性の高い耐熱性 DNA ポリメラーゼを用いて PCR 法により増幅したウイルス DNA をプラスミドにクローニングし、塩基配列を決定するとともに各 DNA の異なるクローン間における塩基配列の変異を解析した。

(2) サイレncing抑制の分子機構  
宿主の塩基配列特異的な転写後 RNA 抑制 (ジーンサイレンシング) を可視化するために、緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を導入した *Nicotiana benthamiana* タバコ 16c 系統を用い、16c 植物体の葉組織へ GFP 遺伝子をアグロバクテリウムを用いてさらに一過性発現させることによってサイレンシングを誘導し、この実験系に MDV の各タンパク質遺伝子を共発現させることで、サイレンシング抑制能を持つウイルスタンパク質を同定し、さらにノーザンハイブリダイゼーションにより検証した。

## 4. 研究成果

(1) ゲノム変異の解析と感染系の再構築  
新たに分離した MDV 野生株 (N11) について、ゲノム配列の詳細な変異を解析し、オリジナルの MDV-N 分離株の配列と比較した結果、2012 年現在の N 株の配列は 1989 年に解析した配列と比べ、欠失や置換を持つ DNA を多数含むことが判明した。これに対し、新たに採取された MDV-N11 分離株の配列はオリジナルの MDV-N 株に近い配列を含む DNA 集団を含んでいた。この理由として N 株は延べ 25 年以上に亘って人口気象器内でソラマメとマメアブラムシを用いて維持されてきたが、自然界における MDV の生活環は解明されておらず、夏期の宿主が不明であることがあげられる。自然宿主とは異なる単一宿主 (ソラマメ) を用いて一定環境条件下で増殖を繰り返した結果、特定の塩基配列変異が蓄積されたと考えられる。そこで試験に用いるウイルス DNA を N 株から N11 株へ転換し、N11 株ゲノム全体における塩基配列の変異を詳細に解析した。また、MDA 野生株採集の際に、自然界における MDV の自然宿主検索調査を行った結果、これまで未報告であったマメ科以外のアブラナ科、ナデシコ科、カタバミ科、オオバコ科等の雑草から MDV が検出された。MDV はソラマメやレンゲ、ダイズ等の作物で発生が報告されているものの自然界における宿主、特に夏期におけ

る宿主は不明であったが、今回の調査結果は MDV の生活環の解明と耕種的防除対策を図る上で重要な意義を持つ。さらに、バングラデシュで採集されたササゲ、ジュウロクササゲ及びフジマメから MDV が検出され、完全長の 8 種ゲノム DNA ( DNA-R, -S, -M, -C, -N, -U1, -U2, -U4 ) およびサテライト様 DNA が PCR によりクローニングされ塩基配列が解析され、MDV-N 株と比較して、ゲノム DNA 配列で 94-97%、サテライト様 DNA では 97-99% の塩基配列が保存されていた。これらの結果は、国外で同定された MDV の完全なゲノムの初の報告であり、MDV が日本だけでなく、東アジア全域のマメ科作物に発生するウイルスであることを示している。



## (2) サイレンシング抑制の分子機構

GFP 遺伝子導入タバコとアグロバクテリウムによる遺伝子一過性発現を用いて、MDV ゲノムコンポーネント中でサイレンシング抑制活性を持つ DNA を同定した。



さらにノーザン・ハイブリ大ゼーション法により、GFP の mRNA と siRNA の発現を詳細に調査、検証した。

以上、MDV バングラデシュ分離株のゲノム解析とサイレンシング抑制因子の就いては現在論文準備中である。

## 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 0 件)

[学会発表](計 4 件)

M. K. Uddin, M. B. Meah, K. Okazaki and Y. Sano, Identification and molecular characterization of Milk vetch dwarf virus from legume crops in Bangladesh, 10<sup>th</sup> International Congress of Plant Pathology, August 27, 2013, Beijing, China

M. K. Uddin, M. B. Meah, K. Okazaki and Y. Sano, Identification and molecular characterization of Milk vetch dwarf virus from legume crops in Bangladesh, 平成 25 年度日本植物病理学会、2013 年 3 月 28 日、岐阜市。

M. K. Uddin, M. B. Meah, K. Okazaki and Y. Sano, Identification and molecular characterization of Milk vetch dwarf virus from legume crops in Bangladesh, 4th International Conference for the Development of Integrated Pest Management (IPM) in Asia and Africa, December 18, 2012, Malaysia.

K. Nomizu and Y. Sano, Genetic variability of Milk vetch dwarf virus, 4th International Conference for the Development of Integrated Pest Management (IPM) in Asia and Africa, January 21, 2011, Bangladesh.

[図書](計 1 件)

H. J. Vetter, J. L. Dale, I. Grigoras, B. Gronenborn, R. Harding, J. W. Randles, Y. Sano, J. E. Thomas, T. Timchenko and H. H. Yeh, Elsevier /Academic Press, Family Nanoviridae, In Virus taxonomy, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of viruses, 2011, pp. 395-404.

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 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

(2)研究分担者 ( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：