

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02190

研究課題名(和文) ニンニクウイルスOYDVがLYSVにアブラムシ伝搬を依存する分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism by which garlic virus OYDV depends on LYSV for aphid transmission.

研究代表者

増田 税 (Masuta, Chikara)

北海道大学・農学研究院・教授

研究者番号：60281854

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：ニンニクにはポティウイルス、タマネギ萎縮ウイルス(OYDV)とリーキ黄色条斑ウイルス(LYSV)が混合感染している。本研究では、欠損HC-Proを生産するOYDVのアブラムシ伝搬が、LYSVのHC-Proに依存していることを証明した。また、欠損HC-Proは、アブラムシの口針タンパク質StylinやPRIと結合できないことをin vitro結合試験で明らかにした。HC-Proは、また、RNA silencing suppressor (RSS)でもある。LYSVのバイオインフォマティクス解析によって、OYDVにとって欠損HC-Proを作り出したことは、進化にむしろ有利に働いたと結論した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ニンニクに感染するポティウイルス(OYDVとLYSV)はアブラムシで周囲に伝搬される。北海道産ニンニクに検出されるOYDVは、アブラムシ伝搬能を喪失しており、この原因はHC-Proタンパク質のN末端にあるアミノ酸配列の欠失と考えられた。本研究では、「OYDVがアブラムシ伝搬をLYSVに依存していること、そしてそのメカニズム」を分子生物学的手法によって証明した。この知見によりニンニクのウイルスフリー化には、LYSVの除去が一義的に重要であると言える。すなわち、本研究成果は、北海道における今後のウイルスフリー化とニンニク収量増に大きく貢献するものと言える。

研究成果の概要(英文)：Garlic is mixed-infected with two potyviruses, onion dwarf virus (OYDV) and leek yellow streak virus (LYSV). This study demonstrated that aphid transmission of OYDV, which produces defective HC-Pro, is dependent on LYSV HC-Pro. Our in vitro binding assay showed that the defective HC-Pro is unable to bind to the aphid stylet proteins Stylin and PRI; HC-Pro functions also an RNA silencing suppressor (RSS). Our bioinformatics analysis on LYSV concluded that the generation of the defective HC-Pro was evolutionarily rather advantageous for OYDV.

研究分野：植物ウイルス学

キーワード：OYDV LYSV HC-Pro アブラムシ Stylin 進化

1. 研究開始当初の背景

北海道では、この数年間にニンニク増産の勢いが増し、各地で産地形成の動きが活発化している。ウイルスフリーのニンニク球は感染球に比較して見違えるよう大きくなることから、ウイルスフリー球の供給によるニンニクの増殖体制の確立が急務である。申請者による10年間にわたるニンニクウイルス研究の積み重ねによって、ようやく北海道産ニンニクのウイルス汚染状況の実態や感染ウイルスの性状について明らかになってきていた。これまでの我々の研究によって、「2つのポティウイルス、OYDVがLYSVは常に同時検出される」という観察が得られていた。この理由を解明するために、OYDVをクローニングし、ウイルス遺伝子の解析を行ったところ、HC-Proタンパク質のN末端に大きな欠失があることを見出した。HC-ProはOYDVのアブラムシ伝搬に必須であることから、申請者は、「OYDVはLYSVにアブラムシ伝搬を依存しているのではないか」という仮説を構築した。したがって、まず「OYDVのコートタンパク質(CP)がLYSVのHC-Proに結合し、その複合体がアブラムシの口針のタンパク質(Stylinなど)に結合して、アブラムシ伝搬のプラットフォームになるのではないか」という疑問に答える研究を実施することにした。もし、北海道産ニンニクに感染しているOYDVが本当にアブラムシ伝搬をLYSVに依存しているならば、ウイルスフリー化のターゲットをLYSV1つに絞ればよいことになり、この点が明らかになることはウイルス病防除に極めて重要である。

2. 研究の目的

本研究の一義的な目的は、「OYDVのHC-Proはアブラムシ伝搬能を喪失しているため、LYSVにアブラムシ伝搬を依存している」という仮説を証明することにある。具体的には、まず、OYDVのCPとLYSVのHC-Proの間に分子間相互作用があることを証明する。さらには、両タンパク質の結合が実在するという仮定のもとに、次なる目的として、アブラムシの口針タンパク質(Stylinなど)とHC-Pro-CP複合体を形成できるのか明らかにする。これによって「北海道産ニンニクからOYDVが高頻度で検出される謎」をうまく説明しようとするれば、この仮説が唯一の答えになる。以上の結果から、「なぜN末端に欠失のあるOYDVがLYSVに依存して生き残ることができたのか」バイオインフォマティクス手法を使用して考察する。

3. 研究の方法

(1) ドットプロットハイブリダイゼーションによるOYDV HC-Pro (America および Hakko) とアブラムシ CuP (Stylin および RR1) との間の相互作用の検出

MBP融合タンパク質をpMAL-c2xベクターで形質転換した大腸菌BL21株で発現させ、アミロース樹脂を用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製した。精製したOYDV HC-Proをニトロセルロース膜に点着し、その上に同様にMBP融合タンパクとして発現させた後、精製したCuPをHC-Proと反応させた。発現タンパクには、Strept タグの配列を組み込んであった。メンブラン上で結合したタンパク質複合体を、ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼコンジュゲートとインキュベートすることにより検出した。

(2) バイオインフォマティクスによるLYSVの進化解析：系統樹を基にした解析

まずGenBankからLYSVのゲノム配列を取得し、本研究で独自にシーケンスした配列を加えて、データセットを作成した。次にmuscle v3.8.31を用いてコドンベースマルチプルシーケンスアライメントを作成した。組換え解析には、RDP5を用いた。P1, HC-Pro, CPの3データセットについて、adegeneを用いて分離宿主と分離地域を形質情報としたdiscriminant analysis of principal component (DAPC)を行った。分子系統解析には、ベイズ法の枠組みを実装したBEASTv2.6.7を使用した。分子時計モデルには対数正規分布を用いたuncorrelated relaxed clockを適用した。系統動態モデルには、Baysian skyline 合祖モデルを適用した。分子時計の較正には、各LYSV分離株の採集年代によるtip-dating calibrationを行った。また、各データセットに十分な時間信号が含まれていることをクラスターランダムマイゼーション検定によって確認した。対数正規分布のパラメータは既報のポティウイルスにおける塩基置換速度をもとに設定した。事後確率分布は、マルコフ連鎖モンテカルロ(MCMC)法によって計算した。Maximum clade credibility (MCC)系統樹の作成にはTreeAnnotatorを用いた。系統樹の可視化はggtreeを使用した。ウイルス分離株の分岐年代を推定するために、Birth-death modelを用いた適応度推定を行った。

4. 研究成果

我々は、ニンニクに感染するポティウイルスOYDVのHC-ProのN末端に欠失があることを見出し(ΔHCとする)、これがOYDVの生き残り・進化に重要な役割を果たしているものと考えた(図1)。HC-Proはウイルスのアブラムシ伝搬に必須であることから、「アブラムシ伝搬能を喪失したOYDVがどのように生き残れるのか」疑問であった。この答えの仮説として「ニンニクに混合感染しているもう一つのポティウイルスLYSVのHC-ProがOYDVのアブラムシ伝搬

を補充している」と予想した。アブラムシ伝搬のメカニズムは、アブラムシの口針にあるタンパク質 (Stylin と RRI) に HC-Pro が結合し、それにウイルスのコートタンパク質 (CP) が結合するブリッジ仮説が提唱されている。我々の以前の研究において、OYDV の Δ HC は LYSV の CP と確かに結合できることを証明していた。したがって、本研究でのハイライトは、 Δ HC がアブラムシの Stylin や RRI と結合できるか明らかにすることであった。そこで、大腸菌で発現させた HC-Pro と Stylin (RRI) を使用して、*in vitro* の結合試験を実施した結果、欠失のない HC-Pro は Stylin や RRI と結合できるが、 Δ HC は両者に結合できないことを明らかにすることに成功した (図 2)。このことから、 Δ HC をもつ OYDV は LYSV にアブラムシ伝搬を高い確率で依存していると結論できる。ここで、「なぜ OYDV は Δ HC を作りだし、LYSV にアブラムシ伝搬を依存するようになったのか」という進化上の大きな疑問が生じる。我々は、「偶然出現した Δ HC は、淘汰されて消滅せず、LYSV の HC-Pro によって生き残れた」と推定した。この予想には、LYSV の HC-Pro が Allium 植物において、常に優先種

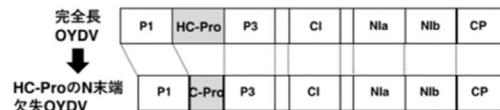


図1 OYDVゲノム上のHC-ProのN末端欠失

を補完している」と予想した。アブラムシ伝搬のメカニズムは、アブラムシの口針にあるタンパク質 (Stylin と RRI) に HC-Pro が結合し、それにウイルスのコートタンパク質 (CP) が結合するブリッジ仮説が提唱されている。我々の以前の研究において、OYDV の Δ HC は LYSV の CP と確かに結合できることを証明していた。したがって、本研究でのハイライトは、 Δ HC がアブラムシの Stylin や RRI と結合できるか明らかにすることであった。そこで、大腸菌で発現させた HC-Pro と Stylin (RRI) を使用して、*in vitro* の結合試験を実施した結果、欠失のない HC-Pro は Stylin や RRI と結合できるが、 Δ HC は両者に結合できないことを明らかにすることに成功した (図 2)。このことから、 Δ HC をもつ OYDV は LYSV にアブラムシ伝搬を高い確率で依存していると結論できる。ここで、「なぜ OYDV は Δ HC を作りだし、LYSV にアブラムシ伝搬を依存するようになったのか」という進化上の大きな疑問が生じる。我々は、「偶然出現した Δ HC は、淘汰されて消滅せず、LYSV の HC-Pro によって生き残れた」と推定した。この予想には、LYSV の HC-Pro が Allium 植物において、常に優先種

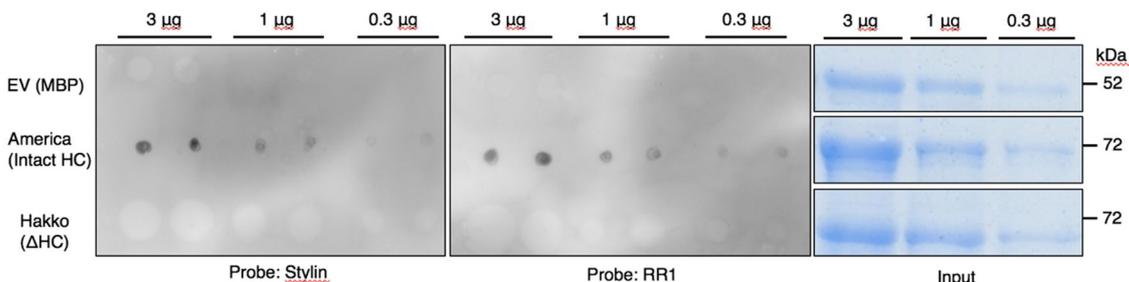


図2 ドットプロットハイブリダイゼーションによるOYDV HC-Pro (AmericaおよびHakko) とアブラムシCuP (StylinおよびRR1) との間の相互作用の検出

で存在している前提が必要である。そこで上の質問に答えを見つけるために、LYSV の HC-Pro の解析に、研究をシフトさせた。LYSV の HC-Pro には N 末端の欠失は存在しない。その代わりに P1 タンパク質の N 末端に欠失が存在する。ポテトウイルスの HC-Pro は、アブラムシ伝搬に関与する他にも、宿主のウイルス抵抗性である RNA silencing (RS) suppressor (RSS) という重要な機能を備えている。P1 は HC-Pro の RSS 能を促進するアクセサリー因子として知られている。そこで LYSV の P1 について RSS 活性を調査したところ、N 末端に欠失のある P1 (Δ P1) それ自体に、RSS 活性があることを見出した (Sasaki et al., 2022)。この時、欠失のない P1 には RSS 活性を検出できなかった。すなわち、P1 は N 末端を欠失させることによって RSS 活性を獲得したのである。また、RSS 活性のアッセイ系に LYSV の宿主であるタマネギやリーキを使用すると Δ P1 は HC-Pro の RSS 活性を強く促進することも明らかになった。 Δ P1 を持つ LYSV は、HC-Pro と共同で強力に宿主の RS を抑制できるになり、LYSV が宿主範囲を拡大して感染拡大することに非常に有利な状況を作り出していることになる。実際、 Δ P1 をもつ LYSV は、冬に雑草が死滅しない本州以南で、様々な野生 Allium 植物において頻繁に検出される。これらがウイルスのリザーバーになって、ニンニクやラッキョウなどの栽培植物において高頻度に LYSV が検出されることになる。一方、OYDV は宿主範囲が狭く、日本では主に、ニンニクで問題となるのみである。以上のことより、OYDV は LYSV と混合感染することによって、アブラムシ伝搬を LYSV に依存するのみならず、宿主の RS を回避することにおいても多大なメリットを受けているものと考えられる。LYSV にとっても OYDV から供給される Δ HC-Pro の RSS 活性を加えることによって、さらに宿主の抵抗性を抑制できるメリットもあるだろう。最後に、我々は、LYSV と OYDV の共進化について、あるいは LYSV と Allium 植物の共進化について、最新のバイオインフォマティクス手法を用いて系統樹解析することにした。その結果、図 3 に示すとおり、LYSV は Allium 植物と巧みに共進化してきたことを示唆する結果を得ることができた (Kawakubo et al., 2023)。以上の結果を総合して、我々は、 Δ HC をもつ OYDV が十分に感染を拡大することができたことは、LYSV の圧倒的な宿主適応能力に因るところが大きいものと結論した。

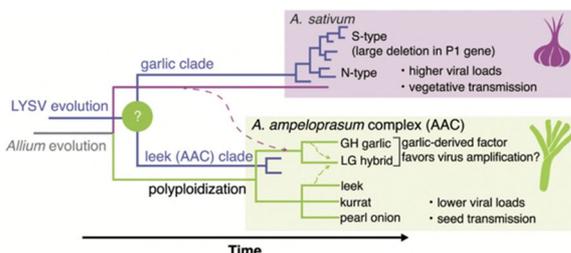


図3 LYSVとアリウム属植物の共進化のシナリオ。破線はアリウム属植物間での染色体水平移動の可能性を示す

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sasaki, J., Kawakubo, S., Kim, H., Kim, O.-K., Yamashita, K., Shimura, H. and Masuta, C.	4. 巻 38
2. 論文標題 Leek yellow stripe virus can adjust for host adaptation by trimming the N-terminal domain to allow the P1 protein to function as an RNA silencing suppressor.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Pathology Journal	6. 最初と最後の頁 383-394
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5423/PPJ.FT.06.2022.0077	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 -

1. 著者名 Kawakubo Shusuke, Kim Hangil, Takeshita Minoru, Masuta Chikara	4. 巻 11
2. 論文標題 Host-specific adaptation drove the coevolution of leek yellow stripe virus and Allium plants	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 e0234023
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/spectrum.02340-23	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 -

1. 著者名 Furuta Kazuyoshi, Kawakubo Shusuke, Sasaki Jun, Masuta Chikara	4. 巻 40
2. 論文標題 An Inexpensive System for Rapid and Accurate On-site Detection of Garlic-Infected Viruses by Agarose Gel Electrophoresis Followed by Array Assay	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 The Plant Pathology Journal	6. 最初と最後の頁 40～47
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5423/PPJ.FT.11.2023.0146	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7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川久保修佑、Hangil Kim、竹下稔、増田税
2. 発表標題 リーキ黄色条斑ウイルスとネギ属植物の共進化：リーキからニンニクへの宿主適応
3. 学会等名 令和5年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川久保修佑、佐々木純、Hangil Kim、Ok-kyong Kim、山下和夫、志村華子、増田税
2. 発表標題 リーキ黄色条斑ウイルスのP1タンパク質における欠失は宿主域を拡大させる適応進化である
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川久保修佑、Hangil Kim、竹下稔、増田税
2. 発表標題 リーキ黄色条斑ウイルスとネギ属植物の共進化：リーキからニンニクへの宿主適応
3. 学会等名 令和5年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川久保修佑、Hangil Kim、竹下稔、増田税
2. 発表標題 リーキ黄色条斑ウイルスの宿主適応的系統進化
3. 学会等名 令和4年度日本植物病理学会北海道部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kim, Hangil. and Masuta, Chikara.
2. 発表標題 ニンニクウイルスの宿主適応戦略を逆手にとったウイルス駆逐作戦
3. 学会等名 日本植物病理学会 令和3年度植物感染生理談話会（オンライン）（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shusuke Kawakubo, Hangil Kim, Minoru Takeshita, and Chikara Masuta
2. 発表標題 Host-adaptive evolution of leek yellow stripe virus determined by viral RNA silencing suppressor activity in a host-dependent manner
3. 学会等名 The 70th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Sendai
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shusuke Kawakubo, Hangil Kim, Minoru Takeshita, and Chikara Masuta
2. 発表標題 Coevolution of leek yellow stripe virus and Allium plants driven by host adaptive diversification and protein involvement of RNA silencing suppressor
3. 学会等名 The 8th European Congress of Virology, Gdansk
4. 発表年 2023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
---------	---------