

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658027

研究課題名(和文) 生体内移動性mRNAの開発に向けたウイルス結合タンパク質の同定と機能解析

研究課題名(英文) Basic study for determination of proteins relating on trafficking of mRNA

研究代表者

細川 宗孝 (HOSOKAWA, Munetaka)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40301246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、キクわい化ウイルス(CSVd)の細胞内局在性を明らかにし、モデルRNAとして本実験に適切であることを明らかにした。そこで、CSVdをいくつかの大きさの分子に切断し、それぞれの分子を発現するベンサミアタバコを育成した。F2まで育成し、現在、継続して組み換え体の作成を行っている。RNAseq法を用いてCSVdで発現誘導される遺伝子が8つ、発現抑制される遺伝子が6つ見つかった。これらのCSVd結合性候補遺伝子についてはウェットな解析を行っている。また、キクにおけるウイルス結合性タンパク質のスクリーニング方法を確立し、遺伝子組み換え体を作成した。

研究成果の概要(英文)：In this experiment, we determined the distribution of chrysanthemum stunt viroid in chrysanthemum cells and from this result it was revealed that CSVd is suitable as model RNA molecules for screening of proteins which helps trafficking of RNA. And transgenic plants with over-expression of partial CSVd sequences were generated. These plants can be used for the determination of important sequences for traffic CSVd RNA to nucleus and this information is valuable for screening of trafficking proteins with CSVd. And we compared RNA expression in CSVd-infected and -non infected tobacco plants and could screened 8 genes of candidates for trafficking proteins. Now these genes are under being analyzed in detail. In addition, we developed the protein-screening method using chrysanthemum plants, which are strong resistant to CSVd. The transgenic plants over expressed of CSVd in these resistant cultivars were prepared here.

研究分野：蔬菜花卉園芸学

キーワード：mRNA キクわい化ウイルス 移動性

1. 研究開始当初の背景

キクわい化ウイルス(CSVd)は約 350nt からなる小さな環状 RNA であり、タンパク質をコードせず、感染と増殖に関わるすべてのステップを植物体のタンパク質に依存している。申請者は 400 以上のキク品種から、CSVd に対して興味深い反応を持つ 2 つの品種を得た。これらの品種を穂木として CSVd 感染株に接ぎ木すると、穂木の葉においては CSVd は維管束に局在し、維管束以外の葉肉細胞ではほとんど検出されなかった。これらの葉から CSVd の分解産物は検出されなかったことから、維管束以外に CSVd が見られないのは CSVd が分解されているからではない。また、これらの品種では CSVd の篩管での長距離移行は正常であり、細胞間移行の阻害が局在性の原因である可能性が高い。なお、これらの品種は CSVd が感染しにくい、あるいは感染しても時間と共に消失する CSVd 抵抗性品種であった。

ウイルスの配列を付加することで mRNA に細胞間移行能を付与できる可能性は、申請者のグループで確認している。しかし、その移動量はわずかであった。この点を解決するためには、最近報告されているウイルス結合タンパク質を同定し利用することが必要であると考えた。2 つのキク品種の発見によって、細胞間移行タンパク質を同定できると考え、移動性 mRNA の技術開発の基盤整備を行った。

2. 研究の目的

- ・ CSVd の細胞内局在性の調査
- ・ キクの CSVd 結合性タンパク質のスクリーニング
- ・ モデル植物を用いた CSVd 付加 mRNA の細胞間移行
- ・ 細胞間移行に関わる結合性タンパク質の決定

3. 研究の方法

・ CSVd の細胞内局在性の調査

CSVd はポスピウイルス科に属するウイルスであり、この科に属するウイルスは核に局在するといわれている。しかし、CSVd に関する情報はない。本実験で同定を試みるタンパク質は RNA の核への移行や長距離移行を促すものであることから、まずは核局在性を確認することとした。*in vitro* で培養した CSVd 感受性のキク 'ピート' CSVd 感染株およびフリー株を実験に供試した。展開葉から約 1 mm 四方に切り出した葉片を固定液 {1% グルタルアルデヒド (v/v), 2% パラホルムアルデヒド (v/v), 67 mM リン酸緩衝液 (pH7.4)} で 2 時間固定し、エタノールで脱水後、LR-White に包埋した。ダイヤモンドナイフを取り付けた回転式マイクロトームで厚さ 0.1 μm の切片を作成し、フォルムバル膜を張ったグリッドあるいは支持膜を張っていないグリッド上にのせた。DIG 標識した

CSVd アンチセンス鎖の全長 RNA プローブを 55 で一晩ハイブリダイズさせ、抗 DIG 抗体は室温で、金コロイド標識二次抗体は 37 で共に 2 時間反応させた。金コロイドは粒子径 10 nm のものを用いた。切片は酢酸ウラニル水溶液およびクエン酸鉛染色液で染色後、透過型電子顕微鏡で観察した。

・ キクの CSVd 結合性タンパク質のスクリーニング

CSVd センス鎖全長 RNA をビオチン標識したものをプローブとした。感受性品種 'ピート' からタンパク質を抽出し、プローブとタンパク質抽出液を混合してインキュベートした。さらにストレプトアビジンが結合した磁気ビーズを混合し、ビオチン-ストレプトアビジンの抗体抗原反応により、CSVd プローブ-タンパク質複合体をマグネットで回収した。回収サンプルを 6% SDS-PAGE により分離し、銀染色した。プローブを加えずにストレプトアビジンに非特異的に結合するタンパク質を回収したものをコントロールとした。候補タンパク質のペプチド解析を MALDI-TOF 解析によって行った。

・ モデル植物を用いた CSVd 付加 mRNA の細胞間移行

- ・ 細胞間移行に関わる結合性タンパク質の決定

・ モデル植物を用いた CSVd 付加 mRNA の細胞間移行

CSVd の配列を 6 つの部分配列に分け、それぞれの配列を持つベクターを作成し、ベンサミアナタバコを形質転換した。それぞれの組み換え体の F2 系統を作成し、その発現および接木による生体内移動を調査した。

- ・ 細胞間移行に関わる結合性タンパク質の決定

細胞間移行性物質の同定は最初の実験課題で行ったが十分な成果は得られなかった。そこで、いったん RNA の発現解析によってタンパクの推定が出来ないかと考え CSVd に感染したベンサミアナタバコと感染していないベンサミアナタバコとの間で RNAseq 解析を行うこととした。実験には葉を用いた。ベンサミアナタバコは CSVd に感染しても全く病徴を示さず、RNAseq によってストレス応答遺伝子などの直接的に CSVd の移行などに関わらない遺伝子によるデータの複雑性が回避できると考えた。

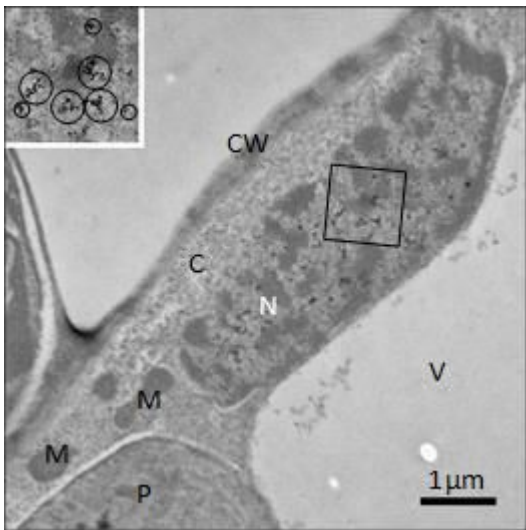
また、これまでに抵抗性品種としてキクから同定した '精の一精' および '鞠風車' の CSVd の組み換え体を作成した。組み換えた CSVd 配列は 2 つの CSVd 配列をタンデムに持つセンスとアンチセンス配列とした。配列の両末端にはベクター由来の配列を持つことから、生体内で発現した遺伝子は、(センス鎖の合成) 切断、ライゲーション、増幅、移行の全てのステップが感染・移行には必要

である。

4. 研究成果

・CSVd の細胞内局在性の調査

フォルムバル膜を支持膜として用いた実験において、CSVd 感染株の核に多くの金コロイド粒子がみられた（データ略）。しかし、切片上に多数の皺とこれに伴う染色液汚染が生じ、観察に適した細胞がほとんど存在しなかった。一方で、グリッドに支持膜を張らずにハイブリダイゼーションを行った際には切片に破れが生じたものの、部分的に良好な染色像が得られた。支持膜のないグリッドにおいても、CSVd 感染株の切片では核に多量の金コロイド粒子が観察され（第1図）、CSVd フリー株の切片では核にほとんど金コロイド粒子がみられなかった（データ略）。Pospiviroidae 属のウイロイドは核内で複製を行うとされる（Ding, 2009）が、本実験によりキクの CSVd 感受性品種においても、CSVd が核内に多量に存在することが電子顕微鏡レベルで示された。また、感染株では細胞質にも金コロイド粒子がみられたが（データ略）、液胞にはほとんど存在しなかった。ただし、今後サンプルごとの傾向を定量的に評価するためには、より多くの細胞を観察する必要がある。支持膜のないグリッド上では各細胞器官を含み、かつ損傷が少ない細胞が少なかった。本実験で試みた高ストリンジェンシー条件下でのハイブリダイゼーション操作では支持膜の損傷も著しかったが、本操作と親和性の高い切片の支持方法を検討すれば、細胞小器官ごとの分布率などについてサンプル間での定量的な比較をすることも可能になると考えられた。



第1図 ‘ピアト’ CSVd 感染株の葉肉細胞における CSVd の検出

N: 核, P: 葉緑体, V: 液胞, C: 細胞質, CW: 細胞壁, M: ミトコンドリアを示す。左上は四角で囲った部分の拡大図であり、丸で囲った部分に金コロイド粒子がみられた。

・キクの CSVd 結合性タンパク質のスクリーニング

CSVd をプローブにしたサンプルにおいて、コントロールには見られないバンドが複数確認された。このうち、濃度の高かったバンドのひとつを切り出し、MALDI-TOF 解析によりタンパク質の同定を試みた。gi|167999847, gi|147838786 などの機能未知のタンパク質が複数候補として挙げられたが、統計的な信頼性は低く、タンパク質の同定には至らなかった。そこで、エドマン分解およびプロテインシーケンスによって N 末端の 10 アミノ酸残基を解析した。この結果、このバンドには 2 種類の N 末端が含まれることがわかった。今後は、2 次元電気泳動などによってこの 2 種類のタンパク質を分離する必要がある。

・モデル植物を用いた CSVd 付加 mRNA の細胞間移行

組み換え体の作成には成功したが、十分な発現個体および生体内移動はほとんど認められなかった。一部の組み換え個体においては若干量の接木移行性が認められたことから、CSVd は部分配列であっても生体内を移行しうることが示唆された。この点を検証するためには、高発現個体の作成が必須であると考えられたが、本研究期間の間には実現できなかった。実験は現在も継続中である。

・細胞間移行に関わる結合性タンパク質の決定

CSVd の感染によって発現が上昇した遺伝子は 8 つであり、下降した遺伝子は 6 つあった。上昇した遺伝子の中には peroxidase 64-like、myb family transcription factor family protein、o-methyltransferase omt3 などが含まれていた。しかし、real-time RT-PCR では個体間差も見られ、RNAseq に再現性を見る必要があるように思われた。本実験は違うサンプルで現在解析中である。

Table 1. Statistics of assembly quality

Total sequence length	64,435,933
Total trinity transcripts	73,512(>100bp)
Contig N50	1,411

また、‘精の一世’および‘鞠風車’では一部の配列を除き、組み換え体を得ることが出来た。対照区として用いた‘ピアト’のアンチセンス配列を組み込んだ組み換え体では RNA の発現が確認されている。これらの組み換え体は全て *in vitro* で管理しているものである。抵抗性品種ではウイロイド RNA の発現が特定のステップで停止しているものと考えられるが、これまでのところは明らかにはなっていない。また、前述の RNAseq と同様の方法やピオチン-アビジン法によるタン

パク質のスクリーニング法を用いて、組み換え体における発現 RNA とタンパク質を特定することが今後の課題である。

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 1 件)

鍋島朋之、細川宗孝、矢野志野布、大石一史、土井元章

Jornal of Horticultural Science and Biotechnology, 2014, 89: 29-34.

Evaluation of chrysanthemum stunt viroid (CSVd) infection in newly-expanded leaves from CSVd-inoculated shoot apical meristems as a method of screening for CSVd-resistant chrysanthemum cultivars

〔学会発表〕(計 3 件)

梁 修静、安井康夫、鍋島朋之、鈴木貴裕、神田紘子、土井元章、細川宗孝

9th International Horticultural Congress & Exhibition (IHC 2014)@Brisbane Convention & Exhibition Centre (8/17-22)

Screening genes relating to chrysanthemum stunt viroid infection to Nicotiana benthamiana

鍋島朋之、細川宗孝、土井元章

9th International Horticultural Congress & Exhibition (IHC 2014)@Brisbane Convention & Exhibition Centre (8/17-22)

In vitro method for screening of CSVd-resistant Chrysanthemum cultivars.

鍋島朋之・栗野達也・土井元章・細川宗孝
平成 26 年度園芸学会秋季大会@佐賀大学 (9/27-29)

キクにおけるキクわい化ウイルス(CSVd)の細胞内分布 2014 園学研. 13 別 2: 516.

〔図書〕(計 1 件)

Viroid (仮名)、2016 発刊予定

〔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:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.hort.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細川 宗孝 (HOSOKAWA, Munetaka)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号: 4 0 3 0 1 2 4 6

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: