様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成２１年６月２９日現在

研究種目： 特定領域研究（公募研究）
研究期間： ２００７～２００８
課題番号： １９０４１０６８
研究課題名（和文） プラス鎖ＲＮＡウイルスの複製複合体形成過程の生化学的解析

研究課題名（英文） Biochemical analysis on the mechanisms of replication complex formation of positive-strand RNA viruses

研究代表者 石川 雅之（ISHIKAWA MASAYUKI）
独立行政法人農業生物資源研究所、植物-微生物間相互作用研究ユニット
上級研究員
研究者番号：７０１９２４８２

研究成果の概要：
プラス鎖 RNA ウイルスの一種であるトマトモザイクウイルス（ToMV）の RNA 複製複合体前駆体を、脱液胞化植物プロトプラスト抽出液を用いた試験管内反応により形成させた。当該複合体の構成要素であるウイルス複製タンパク質に付したタグを利用して精製し、共精製された宿主タンパク質を 6 種類同定した。対応する宿主遺伝子がノックアウトされたシロイヌナズナを構築し、ToMV の増殖を調べたが、いずれにおいても野生株と同様に増殖した。現在までのところ、これらの宿主タンパク質が ToMV RNA の複製に関与することを積極的に示唆する結果は得られていない。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
２００７年度	4,200,000	0	4,200,000
２００８年度	4,300,000	0	4,300,000
年度			
年度			
年度			
総 計	8,500,000	0	8,500,000

研究分野：ウイルス学
科研費の分科・細目：基礎医学
キーワード：ウイルス、複製、宿主因子

１．研究開始当初の背景

ポリオウイルス、C 型肝炎ウイルス、SARS コロナウイルス等多くのヒト病原ウイルスはプラス鎖 RNA ウイルスである。一方、植物ウイルスの大多数もプラス鎖 RNA ウイルスである。これら動植物を宿主とするプラス鎖 RNA ウイルスのゲノムは、知られる限り例外なくオルガネラ膜の細胞質側表面に形成される複製複合体の中で、マイナス鎖 RNA を介して複製する。プラス鎖 RNA ウイルスのゲノム複製は、ウイルスにコードされた複製に関与するタンパク質（複製タンパク質）

と宿主因子との機能協奏により進行するため、宿主因子に関する情報は複製機構を考察する前提となる。しかしながら、RNA 複製をサポートする宿主因子に関する情報は解析の進んだウイルスにおいてさえ十分とはいえない状況にある。また、複製複合体の構造およびその形成過程についてはまだ何もわかっていない状態である。我々は、これまでに、植物プラス鎖アルファ様 RNA ウイルスであるトマトモザイクウイルス（ToMV）をモデルとして、RNA ゲノムの複製機構の解析を行ってきた。これにより、RNA 複製に必須な宿主膜タンパク質 TOM1, TOM2A を同定し、これらが複製複合体に含まれることを明らかにした。また、タバコ細胞抽出液(BYL）を用いた試験管内 ToMV RNA 翻訳・複製系を構築した(Komoda *et al.* [2004] PNAS 101: 1863)。さらに、生体膜を除去した BYL (mdBYL）で ToMV RNA を翻訳すると、ウイルスがコードする 130K, 180K 複製タンパク質とゲノム RNA を含む、沈降係数約 70S の複合体（pre-membrane-targeting complex: PMTC）が形成され、これが膜結合複製複合体の前駆体となることを明らかにした（Komoda *et al.* [2007] J. Virol. 81: 2584)。

２．研究の目的

本特定領域研究の最終目的は、ヒトの感染症への対抗策を打ち出すことである。ToMV は、プラス鎖 RNA ウイルスに属し、複製機構に関しては、同ウイルス群に属すヒト病原ウイルスと多くの特徴を共有する。そこで、本公募研究では、植物ウイルスである ToMV をモデルとして複製機構の解析を進め、動物ウイルスをも含む真核生物プラス鎖 RNA ウイルス全般に通じる原理を明らかにすることを目的とした。具体的には、ToMV RNA から複製タンパク質が合成されたあと、どのような過程を経て膜上に複製複合体が形成されるかを明らかにする。そのために、PMTC を精製し、含まれる宿主因子を網羅的に同定する。さらに、これら宿主因子とウイルス複製タンパク質およびウイルス RNA がどのような役割を果たしながら、どのような順番で分子集合してゆくかを、試験管内系を用いて生化学的に解明することを目指した。

３．研究の方法

mdBYL を用いて ToMV RNA を翻訳すると、ウイルスがコードする 130K, 180K 複製タンパク質とゲノム RNA を含む、沈降係数約 70S の複合体（pre-membrane-targeting complex: PMTC）が形成される。PMTC は膜結合複製複合体の前駆体であることが既に示されていた。本研究では、PMTC を分画遠心および複製タンパク質に付加したタグを利用した免疫沈降により精製し、含まれる宿主因子を LC-MS/MS 法により同定する。さらに、それらの因子が PMTC あるいは複製複合体形成過程において果たす役割を、試験管内系を用いて生化学的に解明する。

４．研究成果

180K タンパク質の C 末端にタグをもつ ToMV 誘導体 RNA を、mdBYL で翻訳し、PMTC の精製を試みたが、共精製されたタンパク質の同定を行うのに十分な量を確保することが困難であった。収量が低い原因のひとつとして、180K タンパク質が 130K タンパク質のリードスルー産物であり、少量しか合成されないことが考えられた。

PMTC の形成過程では、先ず 130K タンパク質が翻訳に共役してゲノム RNA に結合し (core PMTC)、これに引き続き 180K タンパク質が翻訳とは独立してエントリーすることがわかっている（図 1）。そこで、130K タンパク質の C 末端にタグをもつ ToMV 誘導体 RNA を、mdBYL で翻訳し、core PMTC を精製した。これにより宿主由来の複数の

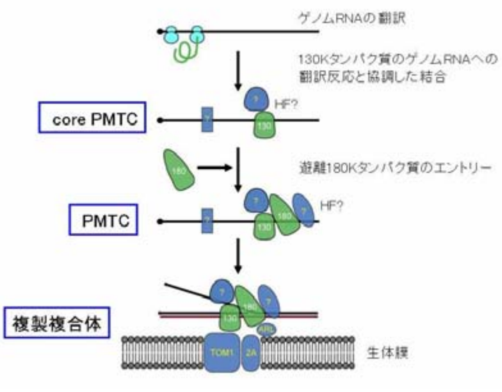

図１　ToMV の RNA 複製複合体形成モデル

タンパク質が共精製され、そのうち６種をLC-MS/MS 法により同定した。

モデル植物シロイヌナズナでは、アグロバクテリウムの Transfer DNA の挿入による遺伝子ノックアウト株のライブラリーが整備されている。そこで、core PMTC に含まれることが示唆された宿主タンパク質に対応する遺伝子のノックアウト株を入手した。候補遺伝子はいずれもファミリーを形成しており、それぞれの単独欠損は ToMV の増殖に顕著な変化をもたらさなかった。そこで、５種のタンパク質に対応する遺伝子（それぞれ２個あるいは３個の相同な遺伝子から構成される）についてシロイヌナズナのノックアウト変異株を交配し、３個のタンパク質についてはメンバー全てがノックアウトされた多重変異株を作製した。他の２個のタンパク質については全ての遺伝子メンバーをノックアウトすると致死になったので、最も発現レベルの低いメンバーのみ野生型アリルをホモあるいはヘテロでもつ多重ノックアウト株を作製した。これらに ToMV を接種したところ、いずれの株においても ToMV は野生株と同様の増殖を示した。このうちのひとつ DNA/RNA-binding Alba-related protein を試験管内翻訳反応により合成し、BYL を用いた試験管内植物ウイルス RNA 翻訳・複製系に添加したところ、ウイルス RNA の翻訳阻害が観察された。しかし、この効果は ToMV RNA 特異的ではなかった。以上の結果から、解析したタンパク質はいずれも ToMV RNA の複製に関与しないと考えられた。

５．主な発表論文等（研究代表者には下線）

〔雑誌論文〕（計２件）

① Koki Fujisaki and <u>Masayuki Ishikawa</u>. (2008) Identification of an *Arabidopsis thaliana* protein that binds to tomato mosaic virus genomic RNA and inhibits its multiplication. **Virology** 380 (2): 402-411.

② Kazuhiro Ishibashi, Kiyoshi Masuda, Satoshi Naito, Tetsuo Meshi and <u>Masayuki Ishikawa</u>. (2007) An inhibitor of viral RNA replication is encoded by a plant resistance gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 104 (34): 13833–13838.

〔学会発表〕（計３件）

① <u>Masayuki Ishikawa</u>, Kazuhiro Ishibashi. A direct inhibitor of viral RNA replication encoded by a plant resistance gene. **The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity**. 2008 年 9 月 7-11 日 Awaji Yumebutai International Conference Center.

② 石橋和大, <u>石川雅之</u>. トマトモザイクウイルス抵抗性遺伝子 *Tm-1* の解析. **平成21年度日本植物病理学会大会**. 2009 年 3 月 26-28 日、山形大学.

③ 石橋和大, 飯　哲夫, <u>石川雅之</u>. タバコマイルドグリーンモザイクウイルス (TMGMV) の非宿主であるトマトには複数の増殖阻害機構が存在する. **平成21年度日本植物病理学会大会**. 2009 年 3 月 26-28 日、山形大学.

〔図書〕（計２件）

① 石橋和大, <u>石川雅之</u>（2008）「ウイルス RNA の複製を阻害する抵抗性遺伝子」**化学と生物** 46(11) 781-785

② 藤崎恒喜、薦田圭介、<u>石川雅之</u> (2007). 「トバモウイルスのゲノム複製機構」 **蛋白質核酸酵素** 52 (10): 1149-1154.

〔産業財産権〕

○出願状況（計０件）

該当なし

○取得状況（計０件）

該当なし

〔その他〕

該当なし

６．研究組織

(1)研究代表者

石川　雅之（ISHIKAWA MASAYUKI）

（独）農業生物資源研究所　植物・微生物間相互作用研究ユニット・上級研究員

研究者番号：７０１９２４８２

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし