

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19380030  
 研究課題名（和文） 低分子量GTP結合タンパク質のトバモウイルスRNA複製における機能の解明  
 研究課題名（英文） Analysis of the role of a small GTP-binding protein in tobamovirus RNA replication  
 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 植物科学研究領域  
 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：

トバモウイルスのRNA複製に関与する低分子量GTP結合タンパク質ARL8の機能を解析した。試験管内トバモウイルスRNA複製系を用いた実験および植物体を用いた実験により、ARL8のGTP結合型とGDP結合型のうち、GTP結合型が生体膜上でトバモウイルスの複製に関与することが示唆された。また、ARL8は生体内で、トバモウイルスのRNA複製に関与するTOM1、TOM2Aに加え、液胞型H<sup>+</sup>-ATPase（V-ATPase）およびGolginとも結合していることが示唆された。しかし、V-ATPaseあるいはGolginがトバモウイルスの増殖に関与することを示唆する結果は現在のところ得られていない。

## 交付額

(金額単位：円)

|      | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|------|------------|-----------|------------|
| 19年度 | 7,100,000  | 2,130,000 | 9,230,000  |
| 20年度 | 7,800,000  | 2,340,000 | 10,140,000 |
| 年度   |            |           |            |
| 年度   |            |           |            |
| 年度   |            |           |            |
| 総計   | 14,900,000 | 4,470,000 | 19,370,000 |

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・宿主認識・遺伝子・複製

## 1. 研究開始当初の背景

プラス鎖RNAウイルスは、ウイルス粒子内にmRNAとして機能しうる極性の1本鎖RNAを含み、マイナス鎖RNAを介して複製する。大多数の植物ウイルスがこのグループに属することから、プラス鎖RNAウイルスの

増殖機構の理解と防除手段の確立は安定した農業生産を維持するために重要である。

プラス鎖RNAウイルスが宿主細胞に感染すると、ゲノムRNAから複製に関与するタンパク質（複製タンパク質と総称される）が翻訳される。複製タンパク質は、ゲノムRNAを認識してウイルスごとに決まった特

定のオルガネラ膜の細胞質側表面にリクルートし、複製複合体を形成する。そして、複製複合体の中でマイナス鎖 RNA の合成を経て多量のプラス鎖 RNA が複製される。この過程には特異的な宿主因子が関与すると考えられるが、いずれのウイルスにおいても、複製に関与する宿主因子を網羅するには至っていない。またこれが足枷となつて、RNA 複製がどのような素過程を経て起きているのかは謎のままである。

タバコウイルスは、代表的なプラス鎖 RNAウイルスで、タバコモザイクウイルス、トマトモザイクウイルス (ToMV) 等農業生産に重大な影響を与えるウイルスを含む。約6400ヌクレオチドのウイルスゲノム上には約130-kDa, 180-kDaの複製タンパク質を含む4個のタンパク質がコードされている。

我々は、タバコウイルスの増殖を許容しないシロイヌナズナ変異株の解析から、宿主膜タンパク質TOM1およびTOM2AがRNA複製に重要な役割を果たしていることを明らかにした。さらに我々は、ToMV感染細胞由来の脱液胞化プロトプラスト抽出液から得た膜結合ToMV RNA依存RNAポリメラーゼ (RdRP) を界面活性剤リソフォスファチジルコリン (LPC) で処理して可溶化し、180-kDa複製タンパク質に対するアフィニティー精製を行った。すると、RdRP活性、130-kDaタンパク質、TOM1、TOM2Aとともに、低分子量GTP結合タンパク質の一種、ADP-リボシル化因子様タンパク質 (ARL8) が共精製された。シロイヌナズナにおいて、ARL8 は4個のメンバーをもつ遺伝子ファミリーを形成している。我々は、研究開始時点で、そのうちの2個をノックアウトするとToMVの増殖が低下するという結果を得ていた。

## 2. 研究の目的

本研究では、新たに同定した ARL8 が ToMV RNA の複製過程において果たす機能を明らかにすることを目的とした。ARL8 が属す ARF ファミリータンパク質は GDP あるいは GTP に結合した状態で存在する。ARF ファミリーのメンバーの多くは N 末端にミリスチル化を受ける。GTP に結合した状態では、ミリスチル基

と N 末端近傍の疎水的アミノ酸残基に富むアルファヘリックスを介して膜に結合する。一方、GDP に結合したときは、大きく異なるコンフォメーションをとり、N 末端近傍のアルファヘリックスは膜と結合しにくい状態に折りたたまれる。ARF1 における知見の類推から、ARL8 の T33N 変異型は恒常的に GDP 結合型コンフォメーションをとり、Q74L 変異型は恒常的に GTP 結合型コンフォメーションをとると予想される。そこで、本研究では ToMV RNA の複製にはどちらのコンフォメーションが重要かを明らかにする。また、ARL8 と相互作用する因子を同定し、その因子が ToMV RNA の複製に必要なかを明らかにする。なお、申請段階で計画した、ARL8 タンパク質を中心とした ToMV RNA 複製関連タンパク質間相互作用の解析は、本課題開始後間もなく採択された別課題で遂行した。

## 3. 研究の方法

(1) 植物細胞は、RNase あるいはプロテアーゼを多量に含む液胞をもつため、細胞をそのまま破碎して得た抽出液は液胞から漏出したこれらの酵素に汚染され、mRNA を翻訳することはできない。我々は、タバコ BY-2 培養細胞から調製したプロトプラストをパーコール密度勾配遠心にかけて、液胞の内部密度が小さいことを利用して脱液胞化した。この脱液胞化プロトプラストを破碎して得た細胞質抽出液 (BYL) は高い翻訳活性をもち、ToMV RNA を翻訳して複製タンパク質を合成することができた。さらに、ここに RNA 合成基質を加えると、生体内と同様のパターンで ToMV RNA の複製が起きた。本研究では、この試験管内 ToMV RNA 翻訳・複製系を用いて解析を進めた。

(2) タグを付加した ARL8 を発現する形質転換 BY-2 細胞を作製し、その細胞抽出液 (非感染) の可溶性画分あるいは LPC 可溶化膜画分からタグ精製を行った。TOM1, TOM2A が共精製されたかはウエスタン法により調べた。共精製された未知タンパク質は LC-MS/MS 法により同定した。同定したタンパク質のウイルス増殖への関与は、対応する遺伝子が T-DNA 挿入によりノックアウトされたシロイヌナズナにウイルスを接種し、外被タンパク

質の蓄積を調べることにより評価した。

#### 4. 研究成果

(1) GTP 結合型、GDP 結合型 ARL8 のどちらがトバモウイルスの増殖に関与するかを明らかにするために、試験管内翻訳により合成した野生型、T33N [恒常的 GDP 結合型] あるいは Q74L [恒常的 GTP 結合型] 変異 ARL8 を、試験管内トバモウイルス RNA 複製系に添加したところ、野生型および Q74L 型でのみ複製の昂進が観察された。このことから、GTP 結合型 ARL8 がトバモウイルス RNA の複製に必要であることが示唆された。複製複合体前駆体 pre-membrane targeting complex (PMTC) 画分には、ARL8 が極少量検出されたが、130K 複製タンパク質との量比は膜結合性の複合体から精製した場合に比して低かった。また、ARL8 を発現する野生型 BY-2 細胞から調製した BYL を用いて調製した PMTC を ARL8 欠損シロイヌナズナ由来の膜と混合しても複製活性は現れなかった。これらの結果から、GTP 結合 (膜局在) ARL8 がトバモウイルス RNA の複製に重要であることが示唆された。

(2) *arl8* 変異株 (4 個あるファミリーメンバー中 3 遺伝子が T-DNA 挿入により破壊され、トバモウイルスの増殖は完全に抑制される) で野生型 ARL8 タンパク質を発現させようと試みたが、恐らく RNA サイレンシングにより、導入遺伝子は発現できなかった。RNA サイレンシングを回避するために、*ARL8* 遺伝子に同義置換を導入したところ、ARL8 タンパク質が発現し、ToMV の増殖抑制が解除された。ARL8 の GTP 結合型、GDP 結合型のどちらが ToMV の増殖に関与するかを明らかにするために、*arl8* 変異株で T33N (恒常的 GDP 結合型) あるいは Q74L (恒常的 GTP 結合型) 変異 ARL8 を発現させるところ、いずれにおいても ToMV の増殖が起きたが、T33N 発現株での ToMV 増殖のレベルは低かった。このことと試験管内複製系を用いた実験の結果と合わせて、ToMV RNA の複製には、主として GTP 結合型 ARL8 が機能していると推測された。

(3) ARL8 が細胞内で他のタンパク質分子と結合し、それらもまた ToMV RNA の複製に寄与する可能性を考え、ARL8 と相互作用する宿

主タンパク質を探索した。アフィニティー精製のタグを付した ARL8 を発現させた BY-2 細胞から ARL8 を精製し、共精製されたタンパク質を LC-MS/MS 法により解析したところ、TOM1, TOM2A に加え、液胞型 H<sup>+</sup>-ATPase (V-ATPase) のいくつかのサブユニットおよび Golgin が同定された。これらの遺伝子の ToMV 複製への関与を検討するため、シロイヌナズナのノックアウト株を入手した。V-ATPase サブユニットのいくつかについては遺伝子を破壊すると致死となり、ウイルス増殖への関与は調べられなかった。Golgin 変異株では ToMV は野生株と同様に増殖し、このタンパク質は ToMV 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、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

石川雅之 (2009). 「内在性遺伝子の発現抑制によるウイルス抵抗性植物の作出」 農業技術 64 (4):145-148

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

Koki Fujisaki, Soko Kobayashi, Yayoi Tsujimoto, Satoshi Naito and Masayuki Ishikawa. (2008) Analysis of tobamovirus multiplication in *Arabidopsis thaliana* mutants defective in *TOM2A* homologs. *J. Gen. Virol.* 89 (6): 1519-1524.

石橋和夫、錦織雅樹、馬渡なつき、石川雅之 (2007). 「ウイルスに対する静的な抵抗性」 蛋白質核酸酵素 52 (6): 686-691.

藤崎恒喜、薦田圭介、石川雅之 (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.

[学会発表] (計 3 件)

石川雅之、薦田 (萩原) 優香、平井克之、津田新哉、飯哲夫 (2007) トマトモザイクウ

イルスの病原性と弱毒化の分子機構 第55回  
日本ウイルス学会学術集会 #117

岡村英保, 錦織雅樹, 石川雅之, 加藤悦子 (2008) タバコ ADP-ribosylation factor-like protein ARLA1d の NMR 解析 The 47th Annual Meeting of The NMR Society of Japan Abstracts pp. 210-211.

錦織雅樹, 泰中智史, 土肥浩二, 森正之, 岡村英保, 加藤悦子, 飯哲夫, 石川雅之 (2009) トバモウイルス RNA 複製に関与する因子間の相互作用解析 平成 21 年度日本植物病理学会大会 #427.

## 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