

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15841

研究課題名(和文) 宿主プロトンダイナミクスの改変による植物ウイルス増殖戦略

研究課題名(英文) Co-opting of a host proton pump for replication of plant RNA viruses

研究代表者

兵頭 究 (HYODO, Kiwamu)

岡山大学・資源植物科学研究所・准教授

研究者番号：80757881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、植物RNAウイルス感染場における、細胞内プロトン恒常性維持に関わる宿主膜タンパク質複合体液胞型ATPアーゼの機能解析を目的とする。red clover necrotic mosaic virus (RCNMV) をモデルウイルスとした種々の解析から、RCNMVは複製酵素タンパク質を介して液胞型ATPアーゼに結合することでその細胞内局在を変化させ、ウイルス複製コンパートメントのpHを低下させることが示唆された。本成果は、植物RNAウイルスが液胞型ATPアーゼを標的とし細胞内プロトン恒常性を調節することで増殖に適した局所環境を整備するという、新規のウイルス増殖戦略を示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物ウイルスが感染に利用する宿主因子の同定・機能解析はウイルス感染の分子メカニズム解明に必須であり、ひいては、ウイルス感染に対する新規防除法開発に向けた分子基盤整備に貢献する。本研究では、red clover necrotic mosaic virusを含む複数の植物RNAウイルスに共通の宿主因子として液胞型ATPアーゼを同定した。本因子は広範な植物RNAウイルスに対する抵抗性付与に向けて有用な分子標的の一つとなると考えられる。但し、今後、液胞型ATPアーゼがどのようにしてウイルス感染を促進するのか、その分子メカニズムの詳細を明らかにする必要がある。

研究成果の概要(英文)：Plant viruses are important pathogens that cause serious crop losses worldwide. Because of the limited number of virally encoded proteins, plant viruses need to subvert the host cell machinery for their own functions, ultimately creating a cellular environment favorable to the infection. For this purpose, plant viruses co-opt an array of host-derived factors (referred to as proviral host factors) to establish viral infection, in which viruses remodel their functions to facilitate every step of the viral life cycle. The identification of the global landscape of plant-virus interactions at the molecular level advances the understanding of the viral infection process and may assist in the development of novel antiviral strategies. This study identified the host vacuolar-type H⁺ ATPase as a new proviral host factor for several plant positive-sense single-stranded RNA viruses.

研究分野：植物ウイルス学

キーワード：植物RNAウイルス ゲノムRNA複製 液胞型ATPアーゼ

1. 研究開始当初の背景

植物ウイルスは絶対寄生性の病原体であり、そのゲノムサイズの制約からわずかな数の遺伝子しかコードできず、宿主由来の様々なタンパク質、脂質などの宿主因子をハイジャックしウイルス感染に転用することではじめて効率的な増殖が可能となる(Hyodo and Okuno, 2016, *Curr Opin Virol*)。植物ウイルスが利用する宿主因子を同定し、ウイルス感染サイクルにおけるこれらの機能を明らかにすることは、植物ウイルス感染の分子メカニズムの解明のみならず、ウイルス感染によってもたらされる宿主細胞の生理学的変化の理解にも貢献することが期待される。研究代表者はプロテオミクス解析を用いて、モデル植物の1つであるベンサミアナタバコから red clover necrotic mosaic virus (RCNMV; プラス鎖 RNA ウイルス) 複製酵素複合体を構成する p27・p88 に結合する宿主因子候補を多数同定した (Hyodo et al., 2015, *PLoS Pathogens*)。

本研究ではこれらの宿主因子候補のうち、細胞内プロトン恒常性維持に必要な液胞型 ATPアーゼ (V-ATPase) に着目した。V-ATPase は複数のサブユニットからなる膜タンパク質複合体であり、小胞体で形成された後に輸送され、トランスゴルジネットワークや液胞膜に局在し、細胞質からオルガネラ内へのプロトン輸送を担う(Schumacher & Krebs, 2010, *Curr Opin Plant Biol*)。本タンパク質複合体の働きによって細胞内プロトン恒常性が保たれる。V-ATPase 活性は正常な小胞輸送系やオートファジーに必須であることに加えて、塩ストレスなどの非生物的ストレス応答にも関わる(Schumacher & Krebs, 2010, *Curr Opin Plant Biol*)。しかしながら、植物ウイルス感染時における V-ATPase の関与は不明であった。興味深いことに、研究代表者は植物ウイルス感染時に V-ATPase の挙動が変化することを示唆する予備的データを得た。これらのことから、本因子の解析から得られる知見は、植物ウイルス感染戦略のみならず、ウイルス感染に付随する宿主生理の変化を理解する上でも有用であると考え、研究を進めた。

2. 研究の目的

本研究では、植物プロトン恒常性の維持に関わる V-ATPase に着目して、(i) 植物ウイルス感染戦略の分子機序、ならびに (ii) ウイルスによる宿主 V-ATPase ハイジャックに伴う宿主生理の変化、について知見を得ることを目的とする。本目的の達成を目指し、red clover necrotic mosaic virus (以下、RCNMV) をモデルウイルスとして計画を進めた。

3. 研究の方法

V-ATPaseは複数のサブユニットから成る膜タンパク質複合体である。まず、ウイルス複製酵素タンパク質が標的とするV-ATPaseサブユニットを同定するために、共免疫沈降法やbimolecular fluorescence complementation (BiFC) 法などを用いて分子間相互作用解析を行った。また、ウイルスが宿主V-ATPaseの細胞内局在に及ぼす影響を調べるため、共焦点レーザー顕微鏡を用いたイメージング解析によって検証した。次に、V-ATPaseがウイルス感染に必要であるかどうかを検証するために、virus-induced gene silencing (VIGS) 法によりV-ATPase各サブユニット遺伝子のノックダウンを行なった。ウイルス感染が宿主プロトン恒常性に及ぼす影響をLysoTracker Redを用いたイメージング解析によって解析した。また、塩ストレス耐性を指標に、RCNMVがV-ATPaseの関与する宿主生理学的応答に影響するかを検討した。

4. 研究成果

(1) RCNMV-宿主 V-ATPase 間の分子間相互作用

V-ATPase は先に述べたように、複数のサブユニットから構成される膜タンパク質複合体である。まず、ウイルスタンパク質-V-ATPase 間の相互作用を解析するため、共免疫沈降法あるいは bimolecular fluorescence complementation (BiFC) 法を含む分子間相互作用解析を行った。その結果、RCNMV の持つ 4 つのウイルスタンパク質のうち、複製酵素タンパク質 p27 が宿主 V-ATPase との相互作用を担う因子であることが明らかとなった。また、同様の相互作用解析実

験から、V-ATPase のサブユニットのうち、サブユニット E がウイルス複製酵素タンパク質 p27 との相互作用に特に重要であることを見出した。一方で、コントロールとして用いた membrane-bound proton-pumping pyrophosphatase (V-PPase) (Graus et al., 2018, *New Phytol*) と p27 との相互作用は共免疫沈降法や BiFC 法では確認されず、p27 と V-ATPase との相互作用は特異的なものであることが示唆された。

RCNMV は小胞体膜でウイルス複製複合体を形成する (Kusumanegara et al., 2012, *Virology*)。一方、V-ATPase は上述したように、小胞体で組み立てられた後にトランスゴルジネットワークや液胞膜に輸送され、細胞質からオルガネラ内へのプロトン輸送を担う。これらの先行研究と先の相互作用解析の結果から、RCNMV は p27 を介して宿主 V-ATPase に結合し、その細胞内局在を変化させる可能性が考えられた。そこで緑色蛍光タンパク質 GFP 融合型の V-ATPase サブユニット E を作出し、共焦点レーザー顕微鏡を用いたイメージング解析によって本可能性を検証した。その結果、コントロール葉 (RCNMV 非接種あるいはベクターコントロール) では、GFP 融合型 V-ATPase サブユニット E は液胞膜およびトランスゴルジネットワークにその局在が見られたのに対し、RCNMV 感染葉あるいは p27 タンパク質発現葉ではコントロールに比べてその細胞内局在の変化が認められ、RCNMV 複製複合体のマーカである赤色蛍光タンパク質 mCherry 融合型 p27 によってラベルされる細胞内アグリゲート構造を形成した。同様の結果は RCNMV と近縁の carnation ringspot virus (CRSV) でも見られた。以上の結果から、RCNMV は複製酵素タンパク質 p27 を介して V-ATPase のサブユニット E に結合し、小胞体に形成されるウイルス複製コンパートメントへとリクルートすることが強く示唆された。

(2) 植物ウイルス感染における宿主 V-ATPase の機能解析

V-ATPase がウイルス感染に必要であるかどうかを検証するために、virus-induced gene silencing (VIGS) 法により V-ATPase 遺伝子のノックダウンを行い、RCNMV の蓄積量をノーザン解析および定量 RT-PCR 法で解析した。当初は、p27 と相互作用するサブユニット E に加えて、サブユニット A およびサブユニット B をノックダウンの標的とした。しかしながら残念なことに、サブユニット A あるいはサブユニット B をノックダウンした植物は壊死症状を示し、その後のウイルス接種試験には適さないと判断されたため、サブユニット E に焦点を絞って解析を進めた。その結果、V-ATPase サブユニット E ノックダウン植物では接種葉、上位葉の双方において RCNMV 蓄積量の顕著な低下が認められた一方で、V-PPase をノックダウンした植物ではベクターコントロールと同程度のウイルス蓄積が見られた。また、サブユニット E ノックダウン植物からプロトプラストを調整し、一細胞レベルでのウイルス増殖を調べたところ、本実験においてもウイルス蓄積量の顕著な低下が認められた。さらに、V-ATPase 活性阻害剤である concanamycin A および bafilomycin A1 は一細胞レベルでの RCNMV 増殖を顕著に阻害した。以上の結果から、V-ATPase 活性は RCNMV の一細胞レベルでの複製に必要なことが明らかとなった。また、これら阻害剤を用いた実験から、V-ATPase 活性は RCNMV と近縁の CRSV や科レベルで異なるプロムモザイクウイルスのウイルス複製においても必要であることが明らかとなった。

V-ATPase は細胞質からオルガネラ内へのプロトン輸送を担う。RCNMV は p27 を介して V-ATPase を複製コンパートメントにリクルートすること、そのウイルス複製が V-ATPase 活性に依存することから、複製コンパートメント近傍におけるプロトン濃度の上昇 (酸性化) がウイルス複製に正に関わる可能性が考えられた。そこで、酸性オルガネラ染色試薬である LysoTracker Red あるいは LysoTracker Green を用いて、p27 でラベルされるウイルス複製コンパートメントが酸性化されているかをイメージング解析で調べた。その結果、GFP あるいは mCherry 融合型 p27 発現葉においては、ベクターコントロールでは見られない LysoTracker Red あるいは LysoTracker Green でラベルされる細胞内アグリゲート構造が観察され、かつ、その構造はウイルス複製コンパートメントと一致した。本構造体の形成は V-ATPase 活性阻害剤 concanamycin A 処理によってキャンセルされたことから、V-ATPase 活性依存的に形成されると

推察された。以上の結果は、RCNMV を含む複数の植物ウイルスが、効率の良いウイルス増殖のために宿主 V-ATPase をハイジャックし、ウイルス複製コンパートメント内部を酸性化（プロトンに富む）することでウイルス増殖に適した細胞内局所環境を整備する可能性を示唆する。ウイルス複製コンパートメントのプロトン濃度上昇がどのようにしてウイルス複製に貢献するのか、その分子メカニズムの詳細を明らかにすることが今後の課題として挙げられる。

(3) RCNMV 感染が V-ATPase を介して宿主生理に影響を及ぼす可能性の検討

V-ATPase はトランスゴルジネットワークや液胞膜に局在し、細胞質からオルガネラルーメン内へのプロトン輸送を担う。ナトリウムを含む各種イオンの輸送体の多くは細胞内プロトン勾配を駆動力とするため、植物 V-ATPase は塩や乾燥といった非生物学的ストレス応答に重要である (Silva & Gerós, 2009, *Plant Signal Behav*)。RCNMV は複製酵素タンパク質 p27 を介して宿主 V-ATPase サブユニット E と相互作用し、その細胞内局在を変化させることから、RCNMV 感染植物では V-ATPase が然るべき機能を発揮できず、V-ATPase を必要とする生理学的応答に変化が見られる可能性が考えられた。そこで本可能性を検証するために、RCNMV 感染植物の塩ストレス耐性の評価試験を行った。しかしながら、ウイルス感染の有無による顕著な差は認められなかった。

<参考文献>

- Graus D, Konrad KR, Bemm F, Patir Nebioglu MG, Lorey C, Duscha K, Güthoff T, Herrmann J, Ferjani A, Cuin TA, Roelfsema MRG, Schumacher K, Neuhaus HE, Marten I, Hedrich R. (2018) High V-ATPase activity is beneficial under high salt loads, but detrimental without salinity. *New Phytol.* 219(4):1421-1432. doi: 10.1111/nph.15280.
- Hyodo K, Okuno T. (2016) Pathogenesis mediated by proviral host factors involved in translation and replication of plant positive-strand RNA viruses. *Curr Opin Virol.* 17:11-18. doi: 10.1016/j.coviro.2015.11.004.
- Hyodo K, Taniguchi T, Manabe Y, Kaido M, Mise K, Sugawara T, Taniguchi H, Okuno T. (2015) Phosphatidic acid produced by phospholipase D promotes RNA replication of a plant RNA virus. *PLoS Pathog.* 11(5):e1004909. doi: 10.1371/journal.ppat.1004909.
- Kusumanegara K, Mine A, Hyodo K, Kaido M, Mise K, Okuno T. (2012) Identification of domains in p27 auxiliary replicase protein essential for its association with the endoplasmic reticulum membranes in Red clover necrotic mosaic virus. *Virology.* 433(1):131-141. doi: 10.1016/j.virol.2012.07.017.
- Schumacher K, Krebs M. (2010) The V-ATPase: small cargo, large effects. *Curr Opin Plant Biol.* 13(6):724-730. doi: 10.1016/j.pbi.2010.07.003.
- Silva P, Gerós H. (2009) Regulation by salt of vacuolar H⁺-ATPase and H⁺-pyrophosphatase activities and Na⁺/H⁺ exchange. *Plant Signal Behav.* 4(8):718-726. doi: 10.4161/psb.4.8.9236.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hyodo, K., Kaido, M.	4. 巻 vol 4
2. 論文標題 Dianthovirus (Tombusviridae).	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Encyclopedia of Virology 4th Edition (Ed. D. Bamford & M. Zuckerman).	6. 最初と最後の頁 383-387
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/B978-0-12-809633-8.21263-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Aulia, A., Hyodo, K., Hisano, S., Kondo, H., I. B., Hillman, B. I., and Suzuki, N.	4. 巻 10
2. 論文標題 Identification of an RNA silencing suppressor encoded by a symptomless fungal hypovirus, <i>Cryphonectria hypovirus 4</i> .	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biology (Basel)	6. 最初と最後の頁 100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biology10020100	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 該当する
1. 著者名 Hyodo, K., Okuno, T.	4. 巻 107
2. 論文標題 Hijacking of host cellular components as proviral factors by plant-infecting viruses.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Advances in Virus Research	6. 最初と最後の頁 37-86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/bs.aivir.2020.04.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Telengech, P., Hisano, S., Micheni, C. M., Hyodo, K., Arjona-Lopez, J.M., Lopez-Herrera, C., Kanematsu, S., Kondo, H., and Suzuki, N.	4. 巻 11
2. 論文標題 Diverse partitiviruses from the phytopathogenic fungus, <i>Rosellinia necatrix</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 1064
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2020.01064	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 該当する

1. 著者名 Kondo H, Fujita M, Hisano H, Hyodo K, Andika IB, Suzuki N	4. 巻 11
2. 論文標題 Virome Analysis of Aphid Populations That Infest the Barley Field: The Discovery of Two Novel Groups of Nege/Kita-Like Viruses and Other Novel RNA Viruses.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Microbiol.	6. 最初と最後の頁 509
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2020.00509	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 該当する

1. 著者名 Lin YH, Fujita M, Chiba S, Hyodo K, Andika IB, Suzuki N, Kondo H	4. 巻 533
2. 論文標題 Two novel fungal negative-strand RNA viruses related to myonnaviruses and phenuiviruses in the shiitake mushroom (<i>Lentinula edodes</i>).	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 125-136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virol.2019.05.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 兵頭 究
2. 発表標題 植物ウイルス感染の抗細菌/糸状菌免疫への影響
3. 学会等名 第12回植物ストレス科学シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 兵頭 究
2. 発表標題 植物RNAウイルスの複製に関わる宿主因子の研究
3. 学会等名 令和3年度日本植物病理学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 近藤 秀樹・藤田 美貴・久野 裕・兵頭 究・鈴木 信弘
2. 発表標題 オオムギ圃場に生息するアブラムシのウイルス叢解析
3. 学会等名 令和3年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Paul Telengech, Kiwamu Hyodo, WQ Wang, T Nastuaki, Nobuhiro Suzuki
2. 発表標題 Subcellular localization of carrot temperate virus 1 capsid protein in the nucleus and cytoplasm.
3. 学会等名 The Annual Meeting of the Japanese Phytopathological Society.
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hyodo K
2. 発表標題 A virus infection modulates plant immunity against bacterial and fungal pathogens
3. 学会等名 The 18th Awaji International Forum on Infection and Immunity (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>岡山大学 (大学院環境生命科学研究科) 資源植物科学研究所ホームページ https://www.rib.okayama-u.ac.jp/</p> <p>岡山大学 (大学院環境生命科学研究科) 資源植物科学研究所 植物・微生物相互作用グループ ホームページ https://www.rib.okayama-u.ac.jp/pmi/index-j.html</p>

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
---------	---------