

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 1日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20380026

研究課題名（和文） 植物 DNA ウイルスの細胞質移行機構の解明

研究課題名（英文） Analysis of intracellular movement of plant DNA viruses

研究代表者

宇垣 正志（UGAKI MASASHI）

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：20323438

研究成果の概要（和文）：

植物 DNA ウイルスは、植物細胞に侵入したのち、細胞質を移行して複製の場である核へ到達し、複製後は細胞質を再び移行して隣接細胞とのチャネルである原形質連絡へと到達する。そこで、この細胞質移行に細胞骨格が関与する可能性を検証し、アクチン繊維がカリモウイルス感染に重要なはたらきをしていることを明らかにした。また、ウイルス粒子を可視化するため、6アミノ酸から成るテトラシステインタグの有効性を検証した。

研究成果の概要（英文）：

After entry into the host plant cell, plant DNA viruses must move toward a nucleus where they express their genes and replicate. After replication, they must move toward plasmodesmata. We studied to see whether plant cytoskeletons are involved in the viral intracellular movement and found that the actin filament plays an important role in *Cauliflower mosaic virus* infection.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2009年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2010年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2011年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：植物病理学

キーワード：DNA ウイルス、細胞内移行、細胞骨格

1. 研究開始当初の背景

植物DNAウイルスは、見虫に媒介されて植物細胞内に侵入したのち、複製の場である核等へと細胞質を移行し、複製後、細胞質を移行して隣接細胞への通路である原形質連絡に至

る。この細胞質移行の機構は不明であるが、ブラウン運動による自然拡散ではないと考えられている。なぜなら、細胞質にはオルガネラ、細胞骨格、代謝物等が高密度に存在しており、概ね20 nm以上の構造物はほとんど動けないからである。動物DNAウイルスにおいて

は、細胞骨格とその上を移動するモータータンパク質を利用して細胞質を移行する例が多く報告されている。たとえば、ヘルペスウイルスは、ウイルス粒子を形成する外被タンパク質が微小管上を移動するダイニンと相互作用することにより、微小管を利用して細胞辺縁部から核へと移行する。一方、植物ウイルスでは、細胞質移行の機構は、ほとんどわかっていない。

2. 研究の目的

核を複製の場とする植物DNAウイルスには、細胞質を移行するための何らかの機構が備わっていると予想される。そこで、植物DNAウイルスが、微小管やアクチン繊維といった細胞骨格を利用して細胞質を移行する可能性の検証を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

植物 DNA ウイルスの感染性クローンを構築し、植物への感染系を確立する。

植物 DNA ウイルスの植物感染における細胞骨格の重要性を調べる。

植物 DNA ウイルスの粒子を形成するタンパク質と植物モータータンパク質との相互作用を調べる。

植物ウイルスを可視化する系を確立し、細胞骨格との共局在を調べる。

4. 研究成果

(1) 植物DNAウイルスの感染性クローンの構築と植物への感染系の確立

ジェミニウイルス科クルトウイルス属の Beet severe curly top virus (BSCTV)およびカリモウウイルス科カリモウウイルス属のカリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の感染性クローンを

構築し、モデル植物であるシロイヌナズナへの感染系を確立した。すなわち、BSCTVにおいては、複製開始点とその周辺の領域を2つ含む全長の1.3コピー分のゲノムDNAをクローン化し、アグロバクテリウムのパイナリーベクターに導入し、アグロバクテリウムをシロイヌナズナの葉に注射することでBSCTVを効率的に感染させることができた。また、同様の方法でタバコ野生種 *Nicotiana benthamiana* に感染させ、ウイルス粒子を精製した。CaMVにおいては、複製中間体である35S RNAのプロモーター部分の下流に35S RNAの全長領域に相当するゲノム1.1コピー分のゲノムDNAをクローン化し、シロイヌナズナの葉に接種することでCaMVを効率的に感染させることができた。また、同様の方法でカブに感染させ、ウイルス粒子を精製した。タバコ培養細胞およびシロイヌナズナ培養細胞を入手した。

(2) カリフラワーモザイクウイルスの感染にはアクチン繊維が必要である

植物に微小管形成阻害剤 propyzamide あるいはアクチン繊維形成阻害剤 latrunculin B を濃度を変えて処理し、抗チューブリン抗体および抗アクチン抗体を用いてそれぞれの細胞骨格を観察し、細胞骨格の形成が阻害される条件を調べた。それらの条件におけるウイルス感染の影響を調べたところ、微小管、アクチン繊維の両者ともウイルス感染率を有意に低下させたが、アクチン繊維形成阻害剤の影響がはるかに顕著であった。これより、CaMVの感染にはアクチン繊維が必要であることが強く示唆された。

(3) カリフラワーモザイクウイルスの外被タンパク質はシロイヌナズナダイニン軽鎖のホモログタンパク質と相互作用する

CaMVの外被タンパク質と、シロイヌナズナのダイニン軽鎖ホモログ、キネシン2種類およびミオシン2種類との *in vivo* 相互作用を酵

母ツーハイブリッド法で検証した。その結果、ダイニン軽鎖ホモログとの相互作用が検出された。しかしながら、シロイヌナズナのゲノム中にダイニン重鎖のホモログは見つかっておらず、CaMV のシロイヌナズナ感染におけるダイニンの役割の解明にはさらなる検証が必要である。

(4) 短いタグであるテトラシステインタグによる植物ウイルス粒子の標識

植物ウイルス粒子を蛍光タンパク質で可視化することはできていない。これは、従来用いられてきた緑色蛍光タンパク質(GFP)のようななかさだかいタグを外被タンパク質に融合すると、粒子が形成されなくなるからである。そこで、6 アミノ酸からなる短いテトラシステインタグと、そのタグに結合すると蛍光を発する FIASH 試薬を用いて植物ウイルスを可視化することを試みた。CaMV 粒子を可視化するため、ウイルス粒子を構成する外被タンパク質および、virion-associated protein のさまざまな箇所にテトラシステインタグを挿入したさまざまな感染性クローンを作出したが、植物への感染性が失われた。そこで、外被タンパク質のカルボキシル末端が粒子の外側に露出していることが報告されているトマトモザイクウイルス(ToMV)の外被タンパク質のカルボキシル末端に TC タグを挿入したところ、ToMV の感染性が CaMV と同様に失われた。そこでさらに、ToMV の外被タンパク質に付加した TC タグの前にリードスルー配列を挿入し、すべての外被タンパク質ではなく一部の外被タンパク質のみが TC タグとの融合タンパク質となるよう工夫したところ、感染性のある組換えウイルスとなり、FIASH 試薬によりウイルス粒子に由来する蛍光が観察された。同様の方法により、DNA ウイルス粒子を可視化し、さらには、標識した細胞骨格との共局在を検証できる可能性が示された。

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)

①Shinjo, A., Araki, Y., Hirano, K., Arie, T., Ugaki, M. and Teraoka, T. Transgenic rice plants that over-express the mannose-binding rice lectin have enhanced resistance to rice blast. *Journal of General Plant Pathology*, 査読あり, 77: 85-92, 2011.

②Hirata, H., Yamaji, Y., Komatsu, K., Kagiwada, S., Oshima, K., Okano, Y., Takahashi, T., Ugaki, M. and Namba, S. Pseudo-polyprotein translated from the full-length ORF1 of capillovirus is important for pathogenicity, but a truncated ORF1 protein without variable and CP regions is sufficient for replication. *Virus Research*, 査読あり, 152: 1-9, 2010.

③Chen, H., Tamai, A., Mori, M., Ugaki, M., Tanaka, Y., Samadder, P. P., Miyao, A., Hirochika, H., Yamaoka, N., Nishiguchi, M. Analysis of rice RNA-dependent RNA polymerase 1 (OsRDR1) in virus-mediated RNA silencing after particle bombardment. *Journal of General Plant Pathology*, 査読あり, 76: 152-160, 2010.

④Bao, J. H., Chin, D. P., Fukami, M., Ugaki, M., Nomura, M. and Mii, M. Agrobacterium-mediated transformation of spinach (*Spinacia oleracea*) with *Bacillus thuringiensis* cry1Ac gene for resistance against two common vegetable pests. *Plant Biotechnology*, 査読あり, 26: 249-254, 2009.

⑤Netsu, O., Hirastuka, K., Kuwata, S., Hibi, T., Ugaki, M. and Suzuki, M. Peanut stunt virus 2b cistron plays a role in viral local and systemic accumulation and virulence in *Nicotiana benthamiana*. *Archives of Virology*, 査読あり, 153: 1731-1735, 2008.

〔学会発表〕（計 7 件）

① 内堀美和、鈴木匡、宇垣正志、トマト黄化葉巻ウイルスを吸汁させたタバココナジラミ中腸円筒細胞の細胞内微細構造. 平成 24 年度日本植物病理学会大会. 2012 年 3 月. 福岡国際センター, 福岡.

② 早川豪人、平塚和之、鈴木匡、宇垣正志. Beet severe curly top virus の C1 はウイルス鎖遺伝子の転写活性化タンパク質である. 平成 24 年度日本植物病理学会大会. 2012 年 3 月. 福岡国際センター, 福岡.

③ Hayakawa, H., Hiratsuka, K., Suzuki, M. and Ugaki, M. Identification of the protein which activates the expression of the virus-sense genes of Beet severe curly top virus. XV International Congress of Virology, September 2011, Sapporo, Japan.

④ 早川豪人、鈴木匡、宇垣正志. Beet severe curly top virus のウイルス鎖遺伝子の発現活性化に関するタンパク質の同定. 平成 23 年度日本植物病理学会大会講演要旨集. p. 165. 2011 年 3 月. 東京農工大学, 東京.

⑤ 寺田良介、川島祐介、小野里歩、鈴木匡、宇垣正志. Beet severe curly top virus の感染性クローンの構築と感染葉からの欠損 DNA の検出. 平成 22 年度日本植物病理学会大会講演要旨集. p. 152. 2010 年 4 月. 京都国際会館, 京都.

⑥ Netsu, O., Kuwata, S., Hibi, T., Ugaki, M. and Suzuki, M. 2b protein of Peanut stunt virus is important for local and systemic accumulation. XIV International Congress of Virology. August 2008, Istanbul, Turkey.

⑦ Ueno, T., Suzuki, M. and Ugaki, M. Phylogenetic analysis of Tomato yellow leaf curl virus isolates occurring in central Japan. XIV International Congress of Virology. August 2008, Istanbul, Turkey.

〔図書〕（計 1 件）

宇垣正志他（眞山、難波編）植物病理学. 文永堂出版. 328 pp. 2009.

〔その他〕

日本植物病理学会学生優秀発表賞
早川豪人、平塚和之、鈴木匡、宇垣正志.
Beet severe curly top virus の C1 はウイルス鎖
遺伝子の転写活性化タンパク質である.
平成 24 年度日本植物病理学会大会. 2012 年 3
月. 福岡国際センター, 福岡.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇垣 正志 (UGAKI MASASHI)
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・
教授
研究者番号 : 20323438

(2) 研究分担者

なし。

(3) 連携研究者

なし。