

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 5月17日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580056

研究課題名（和文） 植物マイナス鎖RNAウイルスが誘導するバイロプラズムの形成機構と感染戦略上の役割

研究課題名（英文） Studies on the mechanism of viroplasm formation during plant negative-strand RNA virus infection

研究代表者

近藤 秀樹 (KONDO HIDEKI)

岡山大学・資源植物科学研究所・助教

研究者番号：40263628

研究成果の概要（和文）：

ランエソ斑紋ウイルス(OFV)はマイナス鎖RNAをゲノムに持ち、感染植物細胞に核内封入体バイロプラズムを誘導する。本研究では、このバイロプラズムの形成機構、特にその誘導に関わるウイルス側因子の同定を中心に検討した。アグロインフィルトレーション法を用いた一過的遺伝子発現実験を行ったところ、ヌクレオキャプシド蛋白質Nと推定リン酸化蛋白質Pを同時発現することで、ウイルス非感染下でもバイロプラズム様構造が誘導されることが示された。

研究成果の概要（英文）：

Orchid fleck virus (OFV), a unique two-segmented negative-sense RNA virus, induces an intranuclear electron-lucent viroplasm (inclusion) in infected plant cells. We studied the molecular mechanism by which OFV viroplasms are produced *in vivo*. Transiently expression examinations by *Agrobacterium*-infiltration revealed that coexpression of nucleocapsid protein N and the putative phosphoprotein P, in the absence of virus infection, was sufficient for the formation of an intranuclear electron-lucent viroplasm-like structure in *Nicotiana benthamiana* cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：植物病理学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：ランエソ斑紋ウイルス、ラウドウイルス、*Nicotiana benthamiana*、ウイルス工場、バイロプラズム、粒子形成、植物、マイナス鎖RNAウイルス

1. 研究開始当初の背景

マイナス鎖 RNA ウイルスはインフルエンザやエボラウイルスなど人や家畜の重要な病原体として知られている。植物でもトスポウイルスや植物ラブドウイルスなど多くのマイナス鎖 RNA ウイルスが発生し、農業上問題となっている。これらの植物マイナス鎖 RNA ウイルスは、対応する動物ウイルス（ブニヤウイルス、ラブドウイルスなど）と共通の複製戦略を持つと考えられており、感染細胞内に特徴的な封入体あるいはパイロプラズム (Viroplasm:Vp) を形成する場合がある。この特徴的な領域は、ウイルスの複製や形態形成を司ると推定されるが、植物マイナス鎖 RNA ウイルスでは逆遺伝学を用いた遺伝子操作系など有効な実験系がないため解析は進んでいない。

そこで本研究では、我々が発見した分節型マイナス鎖 RNA ウイルス(ランエソ斑紋ウイルス, OFV) をモデルに (Kondo et al., JGV 2006), ウイルスが誘導する核内 Vp の形成機構を解明し、Vp が担う役割 (粒子形成・ゲノム複製等) について検証する。一連の研究から、植物マイナス鎖 RNA ウイルスが誘導する Vp のウイルス感染戦略上の役割の一端が理解できると期待される。

2. 研究の目的

本研究では「OFV が誘導する Vp の細胞内イメージングと関与するウイルス因子の動態」、 「Vp 領域の役割と宿主との相互作用」を中心に解析することを目指した。

- (1) Vp 様構造の形成に関与する OFV 蛋白質の同定とその動態解析。
- (2) OFV の媒介者 (オンシツヒメハダニ) 体内における Vp 誘導の可能性。
- (3) キャプシド構築に必要な構造蛋白質の同

定と形態形成が行われる領域の特定。

- (4) Vp 様構造形成による植物側の応答反応、宿主の生育、ウイルス感染への影響を調べるための実験系を構築。

3. 研究の方法

- (1) Vp 形成に関与するウイルス因子の解析

Vp 形成に関与するウイルス因子を明らかにするため、アグロインフィルトレーション法により *Nicotiana benthamiana* 葉肉細胞に OFV 遺伝子を発現させ、組織の蛍光顕微鏡、電子顕微鏡観察を行う。

- (2) 保毒ヒメハダニの細胞内所見

OFV を安定して保毒するヒメハダニ系統の作出を進め、細胞レベルでの病理所見、特に核内における Vp の形成を確認する。

- (3) Vp における粒子形成機構

ヌクレオキャプシド構築に必要な構造蛋白質を同定するため、主要構造蛋白質を細胞内で一過発現させ、粒子形成の有無を検討するとともに、Vp 領域との関連性を確認する。

- (4) Vp 様構造を誘導する組換え植物作製

Vp 形成に関与するウイルス因子を過剰発現する *N. benthamiana* 組換え体を作製する。さらに、粒子形成に関わるウイルス因子を発現する組換え体と交配を行う。得られた個体の表現型や細胞内所見を明らかにする。

- (5) Vp 形成への蛋白質輸送機構の関与

N. benthamiana の蛋白質輸送因子 (Importin α) が Vp や粒子形成に関与するウイルス因子の核輸送に関与するか理解するため、細胞内で相互作用実験を行う。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

- ① Vp 形成に関わるウイルス因子とその動態
OFV の感染細胞の核の蛋白質フラクション

を解析したところ、ヌクレオキャプシド蛋白質Nと推定リン酸化蛋白質Pが主に検出されたことから、両者がVpの主要構成因子であることが示唆された。このNとPを*N. benthamiana*葉で一過的に発現させたところ、細胞核内にVp様構造が形成されることが確認された。そこで、NとPに蛍光蛋白質タグ(GFP, dsRed)を結合し、*N. benthamiana*葉で発現させ、細胞内存在様式を調べた。ウイルス非存在下では、Nは細胞内に広く分布し、Pは核領域全体に分布した。一方、OFV感染細胞では両蛋白質とも推定Vp領域に局在化した。ウイルス非存在下でNとPを共に発現させると、両者の局在性が変化しVp様の局在パターンを示した。

Pには単一の核移行シグナル(NLS)の存在が示唆されているが、このNLS配列のアラニン変異体は核へ局在しなかった。さらに、このP変異体をNと共に発現させた場合、Nの核への局在化は起こらなかった。

Nが単独でVp様構造を誘導できるか調べるため、NのC末端側に核移行シグナル(NLS)をタグした変異体を*N. benthamiana*葉で一過的に発現させた。電顕観察の結果、N変異体が集積した細胞核にはVp様構造の誘導が認められなかったことから、NとPの両者がVp様構造の形成に必須であることが証明された。以上の結果より、「PはNと相互作用し、Nの核への集積に関与するだけではなく、Nと共にVp様構造の形成にも必要である」と考えられた(図1)。

② NとPの相互作用解析

酵母Two-hybrid法によりNとPの相互作用が確認された。そこで、Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC)法を用いた解析により、NとPの相互作用だけでなく、NやPのself-interactionが確認された。細胞核への蛋白質輸送因子である*N. benthamiana*のImportin α のホモログ(NbImp α 1-1, NbImp

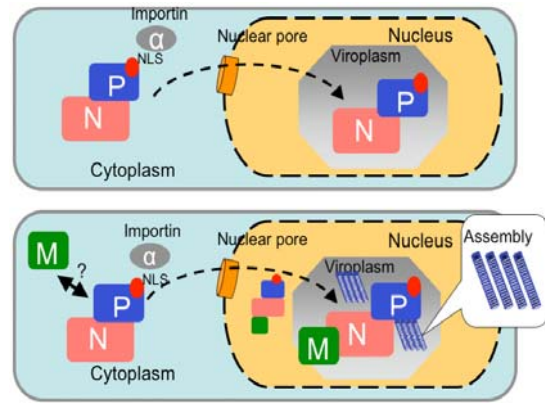


図1. OFVのVp様構造(上図)とウイルス様粒子(下図)の形成モデル。N-P複合体はPの核移行シグナルNLS依存的に核へ輸送された後、VpLSを誘導する。NとMは核局在性を示さない。Mの核輸送の様式についての詳細は現在解析中である。

α 1-2, Martin et al., 2009)を用いたBiFCでは、両者とPの間では相互作用が確認されたが、Nとは相互作用しなかった。さらに、ウイルスベクターを用いたNbImp α 1のノックダウン実験では、いずれのホモログをノックダウンしても、Pの核への移行をブロックすることはできなかった。

③ Vp領域の粒子形成との関わり

ウイルス粒子の主要構成因子はVp様構造の形成に関わるNとP以外に、マトリックス蛋白質Mが含まれる(Kondo et al., Arch Virol 2009)。そこで、N, P, Mを植物細胞内で一過発現したところ、この三者を同時に発現した条件でのみ、DN法で植物汁液内にウイルス様粒子が検出された。通常、OFV粒子は100-110nm \times 45-50nmの桿菌状であるが、このウイルス様粒子は長さが5-10倍程度と非常に長かった。しかし、その幅や微細構造はウイルス粒子に酷似していた。超薄切片のTEM観察では、ウイルス様粒子はNとPが誘導するVp様領域内部に集積していることが確認された。この三者蛋白質間のBiFC解析で、相互作用はM-N間に認められたが、MとPには認められなかった。

また、Mの核への移行はNとPが共存した場合に確認された。これらから、MはN-P複合体にNを介して結合し、核へ移行後、形態形成に関与するモデルを提案した(図1)。

④ Vp様構造を形成する組換え体植物の作製

*N. benthamiana*でN, P, M遺伝子をそれぞれ導入した形質転換体を複数選抜した。T₀個体から種子を採取し、T₁~T₃世代を得た。発現が確認され固体について、さらに交配した。まず、N(T₃世代)およびP(T₃/T₁世代)を単独で発現する*N. benthamiana*形質転換体の交雑を試み、両者を発現するF₁世代が得られた。このF₁個体の表現型には目立った影響は認められなかった。現在、F₂世代の個体を取得しており、N+P発現個体の核内でVp様構造を形成されているか調べる準備を進めている。

これに並行して、N (T₂世代) とM (T₂世代)を同時発現する*N. benthamiana* F₂個体を作出し、さらに、P発現個体(T₁/T₃世代)を掛け合わせることでN+P+Mの三者を発現するF₁個体を得ることに成功した。DN法観察でウイルス様粒子が検出されたことから、これらの個体の細胞レベルで形態形成(粒子形成)が起きることが確認された。今後、N+P+M発現F₁個体の後代でも、細胞内所見の観察準備を進めている。さらに、N+P発現F₂個体とこれらの植物について、個体防御応答関連遺伝子の発現解析、ウイルス接種実験などを実施したい。

⑤ 植物以外の細胞におけるVp形成機構

OFV媒介者であるヒメハダニ(Kondo et al., Exp Appl Acarol 2003)の細胞内所見を調べるために、ウイルスを安定的に保持するヒメハダニコロニーの選抜を行った。しかし、OFVを保毒する媒介者ヒメハダニの維持管理が非常に難しく、限られた観察では虫体内におけるVp形成を確認するに至らなかった。今後も

ヒメハダニにおけるVp形成の有無を検討する予定である。なお、酵母や昆虫培養細胞では発現蛋白質の安定性などの問題から、Vp形成の検討には至らなかった。

(2)得られた成果の位置づけとインパクト

ウイルスは宿主細胞をハイジャックし、自信の複製に好適な環境を作り出すため、いわゆる「ウイルス工場」を形成すると考えられる。プラス鎖RNAウイルスでは、宿主オルガネラ膜系で小胞として形成され、二本鎖RNAウイルスの例では細胞内封入対バイロプラズムが誘導されることが知られている。しかし、マイナス鎖RNAウイルスではほとんど研究の蓄積がなかった。本研究では、分節型ラブド様ウイルスOFVをモデルとして、ウイルス工場と考えられているVpのウイルス側の誘導因子を初めて同定した。さらに、このVp領域がウイルス粒子(ラブドウイルスのRNP-Mコア粒子に相当, Kondo et al., Arch Virol 2009)の形態形成の場である可能性が強く示唆された。この一連の成果は、研究が立ち後れているマイナス鎖RNAウイルスのウイルス工場、特に複製の場としての役割を理解する上で、非常に有益な情報になると期待される(動物のマイナス鎖RNAウイルスでもほとんどわかっていない)。また、植物マイナス鎖RNAウイルスで未だ成功していない遺伝子操作系(逆遺伝学)の確立に向けた基盤的な知見となると期待される。

なお、4-(1)では記載していないが、本研究でOFVのVp誘導に関わるウイルス因子(N蛋白質)の相同性を検索中、偶然にも植物ラブドウイルス、バリコサウイルス(分節型ラブド様ウイルス, Sasaya et al., 2001, 2004)のN(CP)類似配列が複数の植物核ゲノム上に存在することを発見した。これは「ラブドウイルス・バリコサウイルスの祖先ウイルスがかつてその植物種に感染していたことを示唆す

る有力な化石配列情報」であると考えられる。この成果の一部は先行の植物ウイルスの化石配列情報（2本鎖RNAをゲノムにもつパルティティウイルスのCPなど）とともにPLoS Pathogens 誌（Chiba et al., 2011）に掲載され、Featured Researchとして大いに注目を浴びた。

(3) 今後の展望

現在進めているN+Pおよび、N+P+M発現植物の解析では、核内にVp様構造が誘導されると期待されるが、植物個体の表現型に見かけ上の変化は認められない。このことから、ウイルス工場の骨格自体が細胞核に形成されても、宿主へは大きな影響を与えない可能性が考えられる。今後、核内でVp様構造を形成している組換え植物体の解析が可能になれば、OFVのユニークな感染戦略、例えば「宿主防御応答の抑制機構」や、「防御機構を回避するストレス感染戦略」の発見が期待できるかもしれない。

さらに、OFV粒子の形態形成を解析するための実験系が確立できたことは、「3種ものウイルス因子が関わる複雑なOFV粒子の詳細な構造解析やその形成機構の理解する」ための研究が加速するとともに、狂犬病ウイルスなどのエマージングウイルスを含む動物ラブドウイルスへのフィードバックも期待できる。

ウイルス保毒ヒメハダニの細胞内所見に関しては、ウイルスを安定的に保持するヒメハダニコロニーの選抜に苦慮したため再検討中であるが、早急にダニ体内でのVp形成を再度検証する予定である。この媒介者側の解析は、我々が想定する「OFVの植物-媒介者シャトル感染機構」の理解に向けた取り組みの一つであり、ウイルス媒介機構を理解する上でも重要である。

植物核ゲノム上に存在するラブドウイル

ス・バリコサウイルスN様配列の挿入メカニズムやその存在意義については全く不明であり、現在新たな課題を立ち上げて研究に取り組む準備を進めている。今後のウイルス化石配列研究により、「ウイルス-宿主植物の古くて新しい相互作用（せめぎ合い）の一端を理解する」新しい指標が構築できると考えている。

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 8 件）

- ① Chiba, S., Kondo, H. (co-first author), Tani, A., Saisho, D., Sakamoto, W., Kanematsu, S., and Suzuki, N. 2011. Widespread endogenization of genome sequences of non-retroviral RNA viruses into plant genomes. *PLoS Pathogens* 7(7): e1002146. (Featured Research) doi:10.1371/journal.ppat.1002146 (査読有り)
- ② Chiba, S., Kondo, H. (co-first author), Miyanishi, M., Andika, I. B. Han, C. G. and Tamada, T. 2011. The evolutionary history of Beet necrotic yellow vein virus deduced from genetic variation, geographical origin and spread, and the breaking of host resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24: 207-218. doi:10.1094/MPMI -10-10-0241. (査読有り)
- ③ Gibbs, A. J., Torronen, M., Mackenzie A. M., Wood, J. T., Armstrong, J. S., Kondo, H., Tamada, T., Keese, P. L. 2011. The enigmatic genome of Chara australis virus. *Journal of General Virology* 92:2679-2690. doi: 10.1099/vir.0.033852-0 (査読有り)
- ④ 近藤秀樹・I Wayan Gara・前田孚憲・丸山和之・松本純一・井上成信・鈴木信弘. 2010. ラン科植物に発生するポチウイルスの外被蛋

白質遺伝子の同定と分子系統学的解析. 名古屋国際ラン会議NIOC2010記録10-15. (NIOC賞受賞)

⑤ Kondo, H., Maeda, T. and Tamada, T. Identification and characterization of structural proteins of orchid fleck virus. *Archives of Virology* 154. 37-45 (2009) doi: 10.1007/s00705-008-0268-6. (査読有り)

[学会発表] (計 14 件)

- ① 近藤秀樹・千葉壮太郎・梅林絵里・鈴木信弘 (2011) 植物の核ゲノム上に見いだされるマイナス鎖 RNA ウイルス様配列. 日本植物病理学会 平成 23 年度大会, 福岡, 2012 年 3 月 28-30 日
- ② Kondo, H., Hirokado, C., Noda, M., Andika, I.B., Tamada, T. and Suzuki, N. Orchid fleck virus N and P proteins form intranuclear viroplasm-like structures in the absence of viral infection. XVth International Congress of Virology, Sapporo, Japan, September 11-16 2011
- ③ 近藤秀樹・千葉壮太郎・谷 明生・最相大輔・坂本 亘・兼松聡子・鈴木信弘. 非レトロ RNA ウイルス由来の植物染色体配列. 日本植物病理学会 平成 23 年度大会, 2011 年 3 月 27~29 日 (但し、震災のため開催中止, 要旨の印刷をもって発表)
- ④ 近藤秀樹・野田瑞紀・廣門知紗・鈴木信弘. 植物マイナス鎖 RNA ウイルスが誘導する核内 viroplasm 形成に関わるウイルス因子, 第 25 回中国四国ウイルス研究会, 岡山. 2010 年 6 月 26-27 日
- ⑤ 近藤秀樹・廣門知紗・野田瑞紀・鈴木信弘. ランえそ斑紋ウイルスの Viroplasm 様構造の形成に関わる N および P 蛋白質の相互作用と核移行に関する研究. 日本植物病理学会平成 22 年度大会(京都) 2010 年 4 月 18-20 日

⑥ 近藤秀樹. ラン植え戻しに際してのウイルス感染の危険性. 第 4 回 みんなで守ろう日本の野生ランシンポジウム「誰もが実践できるサギソウの自生地保護, 復元活動」新宿御苑. 2011 年 7 月 23 日 (招待講演)

⑦ 近藤秀樹. ランのウイルス病. 第 62 回ラン懇話会. 東京農業大学「食と農」の博物館. 2010 年 12 月 5 日 (招待講演)

[図書] (計 0 件)

該当なし

[産業財産権(特許権, 実用新案権, 意匠権)] (計 0 件)

該当なし

[その他]

ホームページ:

<http://www.rib.okayama-u.ac.jp/pmi/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 秀樹 (KONDO HIDEKI)
岡山大学・資源植物科学研究所・助教
研究者番号: 40263628

(2) 研究分担者

鈴木 信弘 (SUZUKI NOBUHIRO)
岡山大学・資源植物科学研究所・教授
研究者番号: 70206514

(3) 連携研究者

()
研究者番号:

(4) 研究協力者

丸山 和之 (MARUYAMA KAZUYUKI)
岡山大学・資源植物科学研究所
・技術職員
研究者番号: 20379811

研究協力者

イダ バグス アンデカ (IDA BAGUS ANDIKA)
中国浙江省農業科学院