

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2014

課題番号：22248002

研究課題名(和文) ウイルスによる植物の抵抗性システムの回避と利用の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanisms underlying viral strategies for circumvention and utilization of host defense systems

研究代表者

奥野 哲郎 (Okuno, Tetsuro)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：00221151

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,300,000円

研究成果の概要(和文)：Red clover necrotic mosaic virus の複製酵素成分タンパク質と相互作用する宿主タンパク質を免疫沈降/質量分析解析により多数同定し、それらのウイルス複製における機能解析を行った。その結果、RCNMV は、シャペロンであるHsp70、Hsp90、膜輸送系に関わるARF1、ホスファチジン酸(PA)の産生に関わるホスホリパーゼD(PLD)などを利用し宿主膜を改変してウイルスRNA複製工場を形成すること、また、複製複合体にはウイルス抵抗性に必要な宿主タンパク質も含まれていたことからウイルスは抵抗性因子も複製の制御に利用してウイルスRNA複製を行うことが分かった。

研究成果の概要(英文)：We identified several host proteins associated with viral RNA replication complexes of Red clover necrotic mosaic virus (RCNMV) and determined their roles in viral RNA replication. RCNMV encodes the replication proteins, p27 and p88. We found that p27 interacts with Hsp70 and Hsp90 and regulate the assembly of the RCNMV replicase complex on the ER membrane. p27 recruits small GTPases, such as ADP ribosylation factor 1 (Arf1) and Sar1, which regulate the biogenesis of COPI and COPII vesicles, respectively, to the ER. These results suggest that the replication of RCNMV depends on the host membrane trafficking machinery and that RCNMV rewires the cellular trafficking pathways to build a viral replication factory. We also found that p88 interacts with phosphatidic acid (PA)-producing enzyme phospholipase D (PLD) and that PLD is essential for viral RNA replication. Together, our findings suggest that RCNMV hijacks many host proteins to achieve successful RNA replication in host cells.

研究分野：植物病理学

キーワード：植物RNAウイルス RNA複製 RNA複製酵素 小胞体膜 ホスファチジン酸 ホスホリパーゼD Arf1 シャペロンタンパク質

### 1. 研究開始当初の背景

植物 RNA ウイルスの複製に関わる宿主因子としては、翻訳、ストレス、膜結合タンパク質などでいくつかの因子が同定されていたが、その情報は極めて限られていた。ダイアンソウイルス属の *Red clover necrotic mosaic virus* (RCNMV) をモデルウイルスとして用いて RNA ウイルスの複製機構研究を行っていた申請者らは、RCNMV は特定の VSR を持たず、RNA 複製、特にマイナス鎖 RNA 合成が起こる RNA 複製複合体形成条件でのみ RNA サイレンシングを抑制することを見いだしていた。また、RCNMV はマイクロ RNA (miRNA) の生成過程を阻害することも同時に報告していた。これらの結果は、ウイルス RNA 複製と RNA サイレンシング機構が密接に関係していることを示唆していた。当時、既に多くの植物ウイルスで RNA サイレンシングを抑制する RNA サイレンシングサプレッサータンパク質が同定されていたが、タンパク質でなく RNA 複製プロセス自身で RNA サイレンシングを抑制するウイルスは報告されていなかった。また、植物 RNA ウイルスが複製に利用する宿主タンパク質についてもその数は極限られていた。これらの結果は RCNMV は宿主の RNA サイレンシング関連因子を自らの RNA 複製に利用することで RNA サイレンシングを抑制しているモデルが考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究では、RNA 複製を介して RNA サイレンシングを抑制する植物 RNA ウイルス、RCNMV をモデルウイルスとして利用して、ウイルス RNA 複製タンパク質と相互作用するタンパク質を同定し、ウイルス RNA 複製と RNA サイレンシングを含む様々な植物のウイルス抵抗性機構の分子ネットワークを解明することを目的とする。本研究成果は、ウイルスと植物の攻防における新たな分子基盤を提供し、ウイルス抵抗性植物開発の道を拓くための重要な情報を提供すると考える。

### 3. 研究の方法

エピトープタグ融合 RCNMV 複製酵素タンパク質 (p27 と p88) を発現する RNA1 と RNA2、あるいはタグ融合 p27 と p88 を RNA2 とともにアグロインフィルトレーション法を用いてベンサミアータタバコで一過的に、あるいはタバコ培養細胞から調整した *in vitro* 翻訳・複製系で発現させ、アフィニティー精製、分画し、共精製されてきたタンパク質をポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE と Blue Native PAGE) で分画し、質量分析 (LC/MS/MS) により解析した。また RCNMV 移行タンパク質 (MP) と相互作用するタンパク質も同様にして解析した。宿主因子候補タンパク質として同定されたタンパク質については、植物体で

は VIGS を利用した発現抑制、プロトプラスト系での阻害剤の影響、細胞内局在とタンパク質相互作用については共焦点顕微鏡による観察で調べ、タンパク質のウイルス感染における機能と役割を明らかにした。また、RNA aptamer (ストレプトタグ) 法を用いウイルス RNA に結合する宿主因子を精製し、質量分析法を用いて同定後、上記と同様の解析を行った。

ウイルス側のシス因子については RCNMV の cDNA クローンに様々な変異を導入し、転写ウイルス RNA を植物体とそれらのプロトプラスト、あるいは培養細胞のプロトプラストに接種し感染性を調べた。また、タバコ BY-2 培養細胞から調整した *in vitro* 複製翻訳系を用い、翻訳とウイルス RNA 合成、および RNA-タンパク質、タンパク質-タンパク質間の相互作用を免疫生化学的に調べるとともに、相互作用に関わるタンパク質と RNA の領域を解析した。

### 4. 研究成果

RCNMV 複製複合体に含まれる約 30 種のタンパク質を RCNMV 複製関連候補タンパク質として同定することができた。p27 と結合する宿主タンパク質としてはシャペロンタンパク質である HSP70、HSP90 及び膜輸送系に関わる small GTPase である Arf1 と Sar1 を同定した。HSP70 と HSP90 はいずれも RCNMV RNA 複製複合体 (480 kDa 複合体) の形成に必要な過程の異なるステップで働くことが明らかとなった。特に、HSP90 が RNA との会合ステップで重要な役割を担うことが分かったのは重要な成果の一つである。

RNA 複製補助タンパク質である p27 は、ゴルジ装置と共同在する Arf1 と結合し、Arf1 を RCNMV RNA 複製の場である小胞体膜ヘリクルートして、複製酵素複合体の形成とその維持において重要な役割を担っていることが分かった。p27 による Arf1 を介した小胞体膜改変、すなわち RNA 複製場の構築が示唆された。

一方、p88 と相互作用する宿主タンパク質としてホスホリパーゼ D (PLD) を同定した。PLD と PLD がその生産に関わるフォスファチジン酸 (PA) が RCNMV の RNA 複製において重要な役割を担うことが分かった。PLD は Arf1 により活性化されると報告されている。*in vitro* 翻訳複製系及びプロトプラスト系において PA を添加すると RCNMV RNA 複製が促進

されること、さらに RCNMV が感染した植物細胞では PA 含量が増大することが分かった。本発見は、細胞内膜リモデリングなどウイルス RNA 複製での PA の役割解明に繋がることが期待できる。

RCNMV は、さらに NADPH オキシダーゼ (Rboh)、カルシウム依存性タンパク質キナーゼ (CDPK) など活性酸素種 (ROS) 生成とカルシウムイオンの関わる植物免疫シグナル系を複製に利用している可能性がこれまでの研究から浮上してきた。RCNMV 複製におけるこれらタンパク質の機能と役割については今後の研究に待たねばならない。

RNA サイレンシング関連タンパク質の研究では、RCNMV 感染によって AGO2 と DCL3 の mRNA の蓄積量が特異的に増大することが分かった。また、新たな複製酵素複合体の質量分析解析により、RCNMV 複製酵素タンパク質が DCL2、AGO1、AGO2 と相互作用する可能性が示唆された。

RCNMV の RNA 複製タンパク質と相互作用する宿主因子として、トバモウイルスに対する抵抗性遺伝子として用いられている *Tm1* 遺伝子がコードするタンパク質が同定された。*Tm1* ノックダウン植物は RCNMV に対する感受性が増大したことから、*Tm1* はトバモウイルス以外のウイルスにも抵抗性遺伝子として利用できることが示唆された。このことは予期せぬ大きな成果と考える。

RCNMV MP と結合する宿主タンパク質としてはグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵 (GAPDH-A) と germin-like protein を同定した。GAPDH-A は、MP を RNA 複製場ヘリクルートし RNA 複製から細胞間移行へのステップにおいて重要な役割を果たしていることが分かった。

一方、RNA アプタマーを利用した解析により、ウイルス RNA に結合するタンパク質として poly(A) 結合タンパク質 (PABP) を同定した。PABP は RNA1 の 5' 非翻訳領域のアデニンリッチ領域に結合し、RNA1 のキャップ非依存性翻訳において重要な役割を担うことを明らかにした。

本研究の成果は、ウイルスと宿主間で繰り広げられる分子ネットワークの新たな分子基盤を提供し、本研究成果によりウイルス RNA 複製機構の解明とウイルス抵抗性植物作成への大きな道が拓かれたと考える。

##### 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 15 件)

Kaido M, Abe K, Mine A, Hyodo K, Taniguchi T, Taniguchi H, Mise K, Okuno T. GAPDH-A Recruits a Plant Virus Movement Protein to Cortical Virus Replication Complexes to Facilitate Viral Cell-to-Cell Movement. (2014) PLoS Pathog. 査読有り 2014 doi: 10.1371/journal.ppat.1004505. eCollection 2014 Nov. PMID: 25411849

Hyodo K, Kaido M, and Okuno T (2014). Host and viral RNA-binding proteins involved in membrane targeting, replication and intercellular movement of plant RNA virus genomes. *Frontiers in plant science* 査読有り 5 (321): 1-7.

Narabayashi T, Kaido M, Okuno T, Mise K. (2014). Base-paired structure in the 5' untranslated region is required for the efficient amplification of negative-strand RNA3 in the bromovirus melandrium yellow fleck virus. *Virus Res.* 査読有り 25:162-169. doi: 10.1016/j.virusres.2014.04.002.

Hyodo K, Kaido M, and Okuno T (2014) Traffic jam on the cellular secretory pathway generated by a replication protein from a plant RNA virus. *Plant Signaling & Behavior* 査読有り 9, e28644

Mizumoto H, Morikawa Y, Ishibashi K, Kimura K, Matsumoto K, Tokunaga M, Kiba A, Ishikawa M, Okuno T, Hikichi Y. (2014). Functional characterization of the mutations in Pepper mild mottle virus overcoming tomato tm-1-mediated resistance. *Mol Plant Pathol.* 査読有り 15 (5): 479-487. doi: 10.1111/mpp.12107. (PMID: 24299004)

Hyodo, K., Mine, Taniguchi, T., Kaido, M., Mise, K., Taniguchi, H., and Okuno, T. (2013). The ADP-ribosylation factor 1 plays an essential role in the replication of a plant RNA virus. *J. Virol.* 査読有り 87:163-176  
Iwakawa H-O, Tajima Y, Taniguchi T, Kaido M, Mise K, Tomari Y, Taniguchi H and Okuno T (2012). Poly(A)-binding

protein facilitates translation of an uncapped/nonpolyadenylated viral RNA by binding to the 3' untranslated region. *J. Virol.* 査読有り 86 (15): 7836-7849. 10.1128/JVI.01659-12JVI.00538-12

Kusumanegara K, Mine A, Hyodo K, Kaido M, Mise K, and 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* 査読有り 433: 131-141. 10.1016/j.virol.2012.07.017

Mine A, Hyodo K, Tajima Y, Kusumanegara K, Taniguchi T, Kaido M, Mise K, Taniguchi H, and Okuno T. (2012) Differential Roles of Hsp70 and Hsp90 in the Assembly of the Replicase Complex of a Positive-Strand RNA Plant Virus. *J. Virol.* 査読有り 86 (22):12091-12104. 10.1128/JVI.01659-12

Iwakawa H, Mine A, Hyodo K, An M, Kaido M, Mise K and Okuno T. (2011). Template Recognition Mechanisms by Replicase Proteins Differ between Bipartite Positive-Strand Genomic RNAs of a Plant Virus. *J. Virol.* 査読有り 85 (1): 497-509

Hyodo K, Mine A, Iwakawa H, Kaido M, Mise K and Okuno T. (2011). Identification of amino acids in auxiliary replicase protein p27 critical for its RNA-binding activity and the assembly of the replicase complex in Red clover necrotic mosaic virus. *Virology* 査読有り 413:300-309.

Kaido M, Funatsu N, Tsuno Y, Mise K, Okuno T. (2011). Viral cell-to-cell movement requires formation of cortical punctate structures containing Red clover necrotic mosaic virus movement protein. *Virology* 査読有り 413: 205-215.

Tajima, Y., Iwakawa1, H., Kaido, M., Mise, K., and Okuno, T. (2011). A long-distance RNA-RNA interaction plays an important role in programmed -1 ribosomal frameshifting in the translation of p88 replicase protein of Red clover necrotic mosaic virus. *Virology* 査読有り 413:

169-178.

Mine, A., Takeda, A., Taniguchi, T., Taniguchi, H., Kaido, M., Mise, K., Okuno, T. (2010). Identification and Characterization of the 480 kDa Template-Specific RNA-Dependent RNA Polymerase Complex of Red Clover Necrotic Mosaic Virus. *J. Virol.* 査読有り 84: 6070-6081

Mine, A., Hyodo, K., Takeda, A., Kaido, M., Mise, K., Okuno, T. (2010). Interactions between p27 and p88 replicase proteins of Red clover necrotic mosaic virus play an essential role in viral RNA replication and suppression of RNA silencing via the 480-kDa viral replicase complex assembly. *Virology* 査読有り 407: 213-224

〔学会発表〕(計 26 件)

永井比加里・田島由理・兵頭究・海道真典・三瀬和之・奥野哲郎 *Red clover necrotic mosaic virus* RNA2 の 5' UTR はプラス鎖とマイナス鎖合成いずれにも関与する. 日本植物病理学会大会 平成 27 年 3 月 29 日 - 3 月 31 日 明治大学駿河台キャンパス 東京

兵頭究、海道真典・三瀬和之・奥野哲郎 活性酸素種産生機構の転用による植物 RNA ウイルスの増殖戦. 日本植物病理学会大会 平成 27 年 3 月 29 日 - 3 月 31 日 明治大学駿河台キャンパス 東京

河野早帆・三瀬和之・奥野哲郎・海道真典 *Red clover necrotic mosaic virus* 移行タンパク質の細胞内輸送経路の探索. 日本植物病理学会大会 平成 27 年 3 月 29 日 - 3 月 31 日 明治大学駿河台キャンパス 東京

高橋佳奈 兵頭究、海道真典・三瀬和之・奥野哲郎 HMG-CoA Synthase は *Red clover necrotic mosaic virus* の複製に必要である. 日本植物病理学会大会 平成 27 年 3 月 29 日 - 3 月 31 日 明治大学駿河台キャンパス 東京

田島 由理、Siriruk Sarawaneeyaruk、海道真典・三瀬和之・奥野哲郎 *Red clover necrotic mosaic virus* RNA1 のプラス鎖合成に必要な 5' 末端領域の塩基配列と構造 日本植物病理学会大会

平成 27 年 3 月 29 日- 3 月 31 日 明治  
大学駿河台キャンパス 東京  
永井比加里、田島由理、海道真典・三瀬  
和之・奥野哲郎 ダイアンソウイルス  
ゲノム RNA2 の合成制御に関わる新規  
RNA 因子 . 日本植物病理学会 札幌コン  
ソーシアム 札幌市 平成 26 年 6 月 2  
日- 4 日 .  
田島 由理, 海道真典・三瀬和之・奥野  
哲郎 Red clover necrotic mosaic  
virus RNA1 の翻訳には eIF4F が必要で  
ある . 日本植物病理学会 札幌コンソー  
シアム 札幌市 平成 26 年 6 月 2 日- 4  
日 .  
兵頭 究、海道真典・三瀬和之・奥野哲  
郎 ダイアンソウイルスのゲノム  
RNA 複製における宿主 Phospholipase D  
の機能解析 . 日本植物病理学会 札幌  
コンソーシアム 札幌市 平成 26 年 6  
月 2 日- 4 日 .  
Hyodo K, Kaido M, Mise K and Okuno T.  
Functional analysis of phospholipase  
D and phosphatidic acid in a plant RNA  
virus replication. XVIth  
International Congress of Virology,  
Montreal, Canada, July 27 - August 1,  
2014.  
Tajima Y, Iwakawa H-O, Kaido M, Mise  
K and Okuno T. Bipartite genomic RNAs  
of Red clover necrotic mosaic virus  
use different eukaryotic translation  
initiation factors for their  
cap-independent translation. XVIth  
International Congress of Virology,  
Montreal, Canada, July 27 - August 1,  
2014.  
田島由理・岩川弘宙・海道真典・三瀬和  
之・奥野哲郎 Red clover necrotic  
mosaic virus はの二分節ゲノム RNA は  
翻訳にごとに異なる翻訳開始因子を用  
いる . 日本植物病理学会 平成 25 年  
3 月 27 日-29 日 岐阜大学  
恵口奏・三瀬和之・奥野哲郎・海道真典  
Germin-Like Protein (GLP) 遺伝子は  
Nicotiana benthamiana における Red  
clover necrotic mosaic virus (RCNMV)  
感染に關与する . 日本植物病理学会  
平成 25 年 3 月 27 日-29 日 岐阜大学

Hyodo K, Mine A, Kaido M, Mise K, Okuno  
T. A cellular secretory pathway  
plays a critical role in replication  
of a positive-strand RNA plant virus.  
American Society for Virology 31<sup>th</sup>  
Annual Meeting, Wisconsin, USA July  
21-25, 2012  
兵頭 究、海道真典・三瀬和之・奥野哲  
郎 植物プラスセンス RNA ウイルスの  
ゲノム複製における宿主 small GTPase  
ADP-ribosylation factor 1 の機能解析  
日本植物病理学会大会 平成 24 年 3 月  
28 日-30 日 博多市、国際会議場  
Kusumanegara K, Mine A, Hyodo K, Kaido  
M, Mise K, Okuno T. Identification of  
domains in *Red clover necrotic mosaic*  
*virus* p27 auxiliary replicase protein  
essential for its association with  
the endoplasmic reticulum membranes.  
日本植物病理学会大会 平成 24 年 3 月  
28 日-30 日 博多市、国際会議場  
Tajima Y, Iwakawa H-O, Kaido M, Mise  
K and Okuno T. A long-distance RNA-RNA  
interaction plays an important role  
in programmed -1 ribosomal  
frameshifting for the translation of  
p88 replicase protein of Red clover  
necrotic mosaic virus. 国際 RNA 学会  
2011 年 6 月 17 日 京都市、国際会館  
Hyodo K, Mine A, Taniguchi T, Kaido M,  
Mise K, Taniguchi H, and Okuno  
T. ADP-ribosylation factor 1 plays an  
important role in RNA replication of  
Red clover necrotic mosaic virus. 国  
際ウイルス学会 2011 年 9 月 12 日-16 日  
札幌市、札幌コンベンションセンター  
Mine A, Taniguchi T, Kaido M, Mise K,  
Taniguchi H, and Okuno T. Host heat  
shock protein 70 regulates proper  
assembly of the replicase complex of  
a positive-strand RNA plant virus.  
国際ウイルス学会 2011 年 9 月 12 日-16  
日 札幌コンベンションセンター  
Iwakawa H, Tajima Y, Hyodo K, Mine A,  
Taniguchi T, Kaido M, Mise K,  
Taniguchi H, and Okuno T.  
Poly(A)-binding protein stimulates  
cap-independent translation of

- uncapped/nonpolyadenylated viral RNA via binding to the 3' untranslated region. 国際ウイルス学会 2011年9月12日-16日 札幌市、札幌コンベンションセンター
- 兵頭究、峯彰、岩川弘宙、海道真典、三瀬和之、奥野哲郎 Auxiliary replicase protein p27 of Red clover necrotic mosaic virus plays multiple roles in an early replication process. 第33回日本分子生物学会年会 2010年12月7日-10日 神戸市 神戸国際会議場
- 21 田島由理、岩川弘宙、海道真典、三瀬和之、奥野哲郎 Kissing interaction across 2500 bases is required for efficient -1 ribosomal frameshifting in Red clover necrotic mosaic virus RNA1. 第33回日本分子生物学会年会 2010年12月7日-10日 神戸国際会議場 神戸
- 22 兵頭究、峯彰、岩川弘宙、海道真典、三瀬和之、奥野哲郎 Red clover necrotic mosaic virus RNA 複製酵素成分タンパク質p27はウイルスRNAの初期複製段階において様々な役割を担っている. 日本ウイルス学会学術集会 2010年11月7-9日 徳島市
- 23 Hyodo, K., Mine, A., Iwakawa, H., An, M., Kaido, M., Mise, K., and Okuno, T. RNA Binding activity of red clover necrotic mosaic virus replicase protein p27 plays important roles in the early replication steps of viral genomic RNA2. American Society for Virology 29th Annual Meeting 2010年7月 Bozeman, Montana, USA
- 24 Tajima, Y., Iwakawa, H., Kaido, M., Mise, K., and Okuno, T. Analysis of long-distance RNA-RNA interaction required for an efficient -1 ribosomal frameshifting in red clover necrotic mosaic virus RNA1. American Society for Virology 29th Annual Meeting 2010年7月 Bozeman, Montana, USA
- 25 田島由理・岩川弘宙・海道真典・三瀬和之・奥野哲郎 Red clover necrotic mosaic virus RNA1 の効率良

い-1 フレームシフト翻訳に必要な RNA-RNA 長距離相互作用の解析. 日本植物病理学会大会 2010年4月18日-20日 京都国際会館 京都

- 26 兵頭究、峯彰、岩川弘宙、海道真典、三瀬和之、奥野哲郎 Red clover necrotic mosaic virus RNA 複製酵素成分タンパク質p27のRNA結合活性はウイルスゲノム RNA2 の初期複製段階に重要である. 日本植物病理学会大会 2010年4月18日-20日 京都国際会館 京都

〔図書〕(計 1件)

Okuno, T. and Hiruki, C. (2013). Molecular Biology and Epidemiology of Dianthoviruses. **Advances in Virus Research** 87: 37-74 (doi: 10.1016/B978-0-12-407698-3.00002-8.)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

取得状況 (計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.plant-pathology.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

奥野哲郎 (OKUNO, Tetsuro)

研究者番号: 00221151

京都大学大学院・農学研究科・教授

(2)研究分担者

海道真典 (KAIDO Masanori)

研究者番号: 20314247

京都大学大学院・農学研究科・助教

三瀬和之 (MISE Kazuyuki)

研究者番号: 90209776

京都大学大学院・農学研究科・准教授

(3)連携研究者

谷口寿章 (TANIGUCHI Hisaaki)

研究者番号: 10257636

徳島大学・疾患酵素学研究中心・教授