

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380029

研究課題名(和文) トマトモザイクウイルスRNA複製複合体形成におけるジスルフィド結合の役割の解明

研究課題名(英文) Analyses of the roles of disulfide bond formation between the replication proteins of tomato mosaic virus in viral 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・微生物間相互作用研究ユニット・ユニット長

研究者番号：70192482

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：トバモウイルスの130K複製タンパク質が、ゲノムRNAの5'末端近傍の約70ヌクレオチドの領域に結合して複合体PMTCを形成し、翻訳を阻害するとともに当該RNAを複製に導くことを見出した。PMTCには複数の複製タンパク質が含まれた。遊離130Kタンパク質はゲノムRNAへの結合能を示さなかったが、そのN末端側2/3に相当するMet-IR断片は結合能を有していた。このことから、130Kタンパク質は合成の途上でゲノムRNAを認識すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The 130K replication protein of a tobamovirus bound to a 5'-terminal ca. 70-nucleotide region of its genomic RNA to form a ribonucleoprotein complex named PMTC. The binding inhibited translation of the RNA and lead it to a replication pathway. The PMTC contained multiple molecules of the replication protein. Interestingly, free (non-membrane-bound) 130K protein did not bind tobamovirus RNA, but the Met-IR fragment that corresponded to the N-terminal two-thirds of the 130K protein did. Thus, 130K protein molecules likely recognize tobamovirus RNA before the completion of their synthesis.

研究分野：分子生物学

キーワード：ウイルス RNA 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 として機能するゲノム RNA をもつ。このクラスのウイルスが宿主細胞に感染すると、ゲノム RNA が宿主のタンパク質合成系により翻訳され、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）を生じる。複製タンパク質はゲノム RNA を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。複製複合体の中ではマイナス鎖 RNA が合成され、さらにこのマイナス鎖 RNA を鋳型として多量の子孫（プラス鎖ゲノム）RNA が複製されて細胞質に放出される。複製複合体の電子顕微鏡レベルでの形態は多くのウイルスで明らかにされているが、複製複合体の分子レベルでの構造あるいは複製複合体が形成される分子機構には不明な点が多い。また、発現を攪乱するとウイルスの増殖に影響を与える宿主遺伝子が多数同定されているが、ウイルス複製における役割が明らかにされたのはそのうちのごく一部である。

トマトモザイクウイルス (ToMV) は代表的な植物プラス鎖 RNA ウイルスで、5'末端にキャップ構造を有する約 6,400ヌクレオチドの1本鎖 RNA をゲノムとしてもつ。ゲノム上には 130K およびそのリードスルー産物である 180K タンパク質がコードされる。130K タンパク質は RNA の 5'キャッピングを司るメチルトランスフェラーゼ・グアニリルトランスフェラーゼ (GTase) 様ドメインとヘリカーゼ様ドメインをもち、180K タンパク質はそれらに加えてポリメラーゼ様ドメインをもつ。

我々は、本研究開始時点において、以下の知見を得ていた。

(1) 試験管内ウイルス RNA 翻訳・複製系において、ToMV RNA 複製複合体は、複製タンパク質とゲノム RNA を含む可溶性複合体 (pre-membrane-targeting complex: PMTC) を経て形成される。また、PMTC は ToMV RNA の翻訳と共役して形成される (Komoda et al. 2007. *J. Virol.* 81: 2584-2591)。

(2) ToMV の 130K 複製タンパク質は、グアノシン 3リン酸 (GTP) のグアノシン 1リン酸 (GMP) 部分を RNA の 5' (2リン酸) 末端に転移することによりキャップ構造を付加する。この反応の中間段階で、130K タンパク質は GMP と共有結合する。ToMV 感染植物細胞破碎液あるいは試験管内翻訳・複製反応液において、GMP 化される (GTase 活性をもつ) 複製タンパク質は膜画分に含まれ、分子間ジスルフィド結合により高分子量化しており、SDS-PAGE で泳動起点付近に分画される。この高分子量複合体に含まれる複製タンパク質は、膜画分に含まれる複製タンパク質のごく一部である。

(3) ToMV RNA の複製には、宿主の複数回貫通型膜タンパク質 TOM1 および低分子

量 GTP 結合タンパク質 ARL8 が必要である。TOM1 と ARL8 は ToMV の RNA 複製複合体の構成因子となっていると考えられた (Yamanaka et al. 2000. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 10107-10112; Nishikiori et al. 2011. *PLoS Pathogens* 7: e1002409)。酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) において 130K 複製タンパク質を発現させると、TOM1 および ARL8 と共発現させたときに限って GTase 活性が現れた。酵母においても、GTase 活性をもつ複製タンパク質はジスルフィド結合を介した高分子量複合体の中のみに見いだされた。

2. 研究の目的

プラス鎖 RNA ウイルスは植物ウイルスの大多数を占め、農学的に重要な多くの病原ウイルスを含む。本研究は、ToMV あるいはその近縁ウイルスであるタバコモザイクウイルス (TMV) をモデルとして、プラス鎖 RNA ウイルスのゲノム RNA 複製機構を理解し、より有効な植物ウイルス病防除法確立に向けた基盤を構築することを最終目的とした。そのために、本研究では先ず、130K タンパク質の高分子量化をもたらずジスルフィド結合が複製複合体形成のどの段階で形成されるのか、また、RNA 複製における複製タンパク質のジスルフィド結合形成の意義を明らかにすることを目的として、130K 複製タンパク質中に存在する 19 個のシステイン残基のいずれかがセリン残基に置換した ToMV 変異株の解析を行った。その結果、ジスルフィド結合を形成できなくなった変異 130K タンパク質は PMTC も形成できないことが明らかとなり、ジスルフィド結合あるいは当該結合に関与するシステイン残基が PMTC 形成に重要な役割を果たす可能性が示唆された。これを受け、PMTC 形成機構の解明に研究の重点を移した。

3. 研究の方法

ウイルス RNA の複製は、タバコ BY-2 培養細胞由来の脱液胞化プロトプラスト抽出液 (BYL) を用いた試験管内翻訳・複製系 (Komoda et al. 2004. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 1863-1867) により解析した。翻訳・複製反応に用いるウイルス RNA は、線状化完全長ウイルス cDNA プラスミドを鋳型とする T7 あるいは SP6 RNA ポリメラーゼによる試験管内転写反応により合成した。PMTC は、超遠心で膜を除去した BYL でウイルス RNA を翻訳することにより形成させた。複製タンパク質の GTase 活性は、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ と S-アデノシルメチオニン (キャッピング反応に必要な) を含む緩衝液中でインキュベートし、当該タンパク質への ^{32}P の転移を観察することにより調べた。

4. 研究成果

ToMV の 130K 複製タンパク質中に存在す

る 19 個のシステイン残基 (-CH₂SH 側鎖 : ジスルフィド結合に關与する可能性がある) のそれぞれをセリン残基 (-CH₂OH 側鎖) に置換する変異を完全長 ToMV cDNA に導入し、19 種類の変異ウイルス RNA を作製した。これらの変異株の性質を試験管内ウイルス RNA 翻訳・複製系を用いて解析した。その結果、3 つの変異 (C179S, C186S, C581S) がジスルフィド結合を介した複製タンパク質の高分子量化のみならず、PMTC 形成能、複製タンパク質の膜結合能、グアニリルトランスフェラーゼ活性および RNA 合成活性を喪失させることが明らかになった。一方、130K タンパク質がもつ二本鎖 small interfering RNA 結合能はこれらの変異により影響を受けなかった。このことから、これらのシステイン残基がジスルフィド結合にかかわるとともに、複製複合体形成のごく初期に位置する PMTC 形成において重要な役割を果たす可能性が示唆された。PMTC 形成は還元剤存在下でも起きるので、当該システイン残基の PMTC 形成段階における役割は、ジスルフィド結合形成ではなく、当該残基を介した相互作用を成立させることにあると考えられた。

以上の結果を受けて、PMTC の形成機構の解析に重点を移した。PMTC において 130K 複製タンパク質が TMV RNA のどこに結合しているのかを知るために、PMTC をマイクロコッカルヌクレアーゼで処理したところ、TMV RNA 5'末端近傍の約 70 ヌクレオチドの領域が分解を免れた。130K タンパク質を免疫沈降するとこの RNA 断片も共沈してくることから、この領域に 130K タンパク質が結合して、マイクロコッカルヌクレアーゼによる分解から保護していると考えられた。TMV RNA のこの領域に変異を導入すると、PMTC 形成能と複製能が失われた。翻訳後一旦 TMV RNA から離れた 130K タンパク質は、TMV RNA と混合しても PMTC を形成できないことが知られていたが、遊離 130K タンパク質を TMV RNA と混合しても、当該領域への結合は起きなかった。これに対し、130K タンパク質のヘリカーゼドメインを欠失させた Met-IR 断片 (130K タンパク質の N 末端側約 2/3 の領域に相当する) は、翻訳が完了してからも TMV RNA の当該領域に結合することができた。このことから、TMV RNA への結合は、130K タンパク質の合成途上、Met-IR 領域が完成し、かつ、ヘリカーゼドメインが未完成の時に起き、完成した遊離 130K タンパク質分子内ではヘリカーゼドメインが Met-IR 領域の TMV RNA への結合に阻害的に働いていると考えられた。これらの知見は、従来知られていた TMV 130K タンパク質の複製機能のシス嗜好性をうまく説明するものであった。

130K タンパク質あるいは Met-IR 断片の標的配列への結合により、TMV RNA の翻訳が阻害されることを見出した。TMV RNA は、

複製タンパク質合成の際に翻訳鋳型として働くとともに、RNA 複製においてはマイナス鎖 RNA 合成の鋳型としても働く。翻訳においては、TMV RNA 上をリボソームが 5'末端から 3'末端方向に移動し、マイナス鎖 RNA 合成においては複製タンパク質 (RNA ポリメラーゼ) が 3'末端から 5'末端方向に移動する。従って、両反応が同時に起きるとリボソームと複製タンパク質が衝突し、破綻が起きる。PMTC 形成により翻訳が抑制されることにより、マイナス鎖 RNA 合成が開始する前に TMV RNA 上からリボソームが除去され、この衝突が回避されているのではないかと考えられた。

さらに、Met-IR が結合するために必要な標的 RNA の要件の解明を目指した。TMV RNA 5'末端 100 ヌクレオチド (nt) に相当する RNA (RNA1-100) と Met-IR を混合し、マイクロコッカルヌクレアーゼで処理すると、約 70 nt の RNA 断片が保護された。RNA1-100 に 5'末端側から 22 nt あるいは 3'末端側から 25 nt の欠失を導入しても約 70 nt の断片が保護されたが、それ以上欠失を大きくすると保護は見られなくなった。興味深いことに、保護が観察された 5'あるいは 3'欠失体の共通部分を含む RNA16-80 では保護は全く観察されなかった。複製タンパク質の結合領域には ACA 配列が繰り返し現れ、そのいくつかを他の配列に置換すると結合は観察されなくなった。また、ブルーネイティブポリアクリルアミドゲルを用いた解析により、RNA1-100 と Met-IR の複合体の大きさはおよそ 100 万 Da と見積もられた。以上を総合して、ある決まった数の Met-IR 分子が 70 nt にわたる ACA 配列に富む RNA 領域に結合したときに限って安定な複合体が形成される可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

Chujo T, Ishibashi K, Miyashita S, Ishikawa M. (2015) Functions of the 5'- and 3'-untranslated regions of tobamovirus RNA. **Virus Research in press.** (査読あり ; doi: 10.1016/j.virusres.2015.01.028)

Ishibashi K, Ishikawa M. (2014) Mechanisms of tomato mosaic virus RNA replication and its inhibition by the host resistance factor Tm-1. **Current Opinion in Virology** 9: 8-13. (査読あり ; doi: 10.1016/j.coviro.2014.08.005)

石橋和夫, 石川雅之. (2014) タバコモザイクウイルスの複製タンパク質による複製鋳型認識機構 **ウイルス** 64(1): 3-10. (査読なし ; doi: 10.2222/jsv.64.3)

Kawamura-Nagaya K, Ishibashi K, Huang Y-P, Miyashita S, Ishikawa M. (2014) Replication protein of tobacco mosaic virus cotranslationally binds the 5' untranslated region of genomic RNA to enable viral replication. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 111(16): E1620-E1628. (査読あり ; doi: 10.1073/pnas.1321660111)

Ishibashi K, Ishikawa M. (2013) The resistance protein Tm-1 inhibits formation of a Tomato mosaic virus replication protein-host membrane protein complex. **Journal of Virology** 87(14): 7933-7939. (査読あり ; doi: 10.1128/JVI.00743-13)

Ishibashi K, Miyashita S, Katoh E, Ishikawa M. (2012) Host membrane proteins involved in the replication of tobamovirus RNA. **Current Opinion in Virology** 2(6): 693-698. (査読あり ; doi: 10.1016/j.coviro.2012.09.011)

Nishikiori M, Meshi T, Ishikawa M. (2012) Guanylation-competent replication proteins of Tomato mosaic virus are disulfide-linked. **Virology** 434(1): 118-128. (査読あり ; doi: 10.1016/j.virol.2012.09.011)

[学会発表](計 8 件)

中条哲也, 宮下脩平, 石川雅之. タバコモザイクウイルス RNA-複製タンパク質複合体の解析. **平成 27 年度日本植物病理学会創立 100 周年記念大会** (平成 27 年 3 月 29-31 日、東京)

Miyashita S, Ishikawa M. Dissecting cis- and trans-acting functions of tomato mosaic virus replication proteins and their domains. **American Society for Virology 33rd Annual Meeting** (平成 26 年 7 月 21-25 日、アメリカ合衆国、コロラド州、Fort Collins)

河村(長屋)和恵, 石橋和太, 宮下脩平, 石川雅之. タバコモザイクウイルス複製タンパク質は翻訳と共役してゲノム RNA の 5'非翻訳領域に結合し、さらなる翻訳を阻害する. **平成 26 年度日本植物病理学会大会** (平成 26 年 6 月 2-4 日、札幌)

宮下脩平, 石川雅之. トマトモザイクウイルス複製タンパク質と各ドメインの機能の cis 性・trans 性. **平成 26 年度日本植物病理学会大会** (平成 26 年 6 月 2-4 日、札幌)

石橋和太, 加藤悦子, 石川雅之. トマトモザイクウイルス抵抗性遺伝子 Tm-1 に関する研究. **平成 25 年度植物感染生理談話会** (平成 25 年 8 月 19-21 日、石川県小松市)

Ishikawa M. Toward controlling tobamovirus multiplication. **2012 FFTC-TUA International Seminar on Emerging Infectious Diseases of Food Crops in Asia** (平成 24 年 10 月 21 日、東京)

Kawamura K, Ishibashi K, Ishikawa M. Characterization of a ribonucleoprotein complex that serves as a precursor of tobacco mosaic virus replication complex. **XV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions** (平成 24 年 7 月 31 日-8 月 2 日、京都)

Katoh E, Nishikiori M, Sugiyama S, Xiang H, Niiyama M, Ishibashi K, Inoue T, Matsumura H, Ishikawa M. Crystal structure and interaction with host factors of the superfamily 1 helicase from Tomato mosaic virus. **XV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions** (平成 24 年 7 月 31 日-8 月 2 日、京都)

6. 研究組織

(1)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・微生物間相互作用研究ユニット・ユニット長
研究者番号：70192482

(2)連携研究者

石橋 和太 (ISHIBASHI, Kazuhiro)
独立行政法人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・任期付研究員
研究者番号：20611742

(3)研究協力者

中条 哲也 (CHUJO, Tetsuya)