

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450058

研究課題名(和文)植物ウイルス複製酵素複合体の輸送ハブ機能の解明

研究課題名(英文)Studies on a plant virus replication complexes as the transportation hub

研究代表者

海道 真典(Kaido, Masanori)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：20314247

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：Affinity精製と質量分析によって、Red clover necrotic mosaic virus (RCNMV) 移行タンパク質(MP)と相互作用する宿主タンパク質として、ベンサムアナ植物のGAPDH-Aタンパク質を同定した。GAPDH-AはRCNMVの複製複合体(VRC)と小胞体膜上で共局在し、MPをVRCへとリクルートする作用を通じてRCNMVの細胞間移行に貢献する宿主因子であることがわかった。また、MPの欠失変異体の解析から、細胞の表層に形成されるMPとVRCを含む小斑点状構造はウイルスゲノムの複製には影響しないが、細胞間移行にとって必須の構造体であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Using affinity purification and mass spectrometry, we have identified a host protein GAPDH-A from *Nicotiana benthamiana* plants as the interacting partner of the movement protein (MP) of Red clover necrotic mosaic virus (RCNMV). GAPDH-A colocalized with virus replication complex (VRC) of RCNMV on the endoplasmic reticulum. We revealed that GAPDH-A is the host factor protein that contributes to the viral cell-to-cell movement, through its function to recruit the MP to VRCs. Furthermore, we showed the cortical punctate structures that contain the MP and VRC are required for the viral cell-to-cell movement and are not required for the replication of viral genomic RNA.

研究分野：植物病理学

キーワード：RNAウイルス 細胞間移行 複製複合体 小胞体膜 宿主因子 移行タンパク質

1. 研究開始当初の背景

植物ウイルスの増殖戦略について、遺伝子発現機構の解析や、一細胞レベルでの複製機構の解明や関連宿主因子遺伝子の働きについて近年研究が進んでいる。また植物ウイルスの移行戦略については、移行タンパク質 (MP) の局在性や、関連宿主因子の探索とその機能解析が幾つかのウイルスで行われている。しかし一方で、複製過程と移行過程との関連性、すなわち複製されたウイルスゲノムがどのような過程を経て MP へと橋渡しされるのかについての知見は得られていなかった。

本研究の申請段階で、申請者はプラス鎖 RNA ウイルスである *Red clover necrotic mosaic virus* (RCNMV) の MP が、C 末端 70 アミノ酸領域を介して RCNMV 複製複合体と共同在して細胞表面小胞体膜上に小斑点状構造を形成し、この小斑点状構造形成がウイルスの細胞間移行にとって必須であるという結果を得ていた。また、RCNMV MP と相互作用する宿主植物タンパク質として *Nicotiana benthamiana* 植物の *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH-A) を同定し、これが RCNMV の細胞間移行にとって重要な役割をもつ宿主因子である可能性を報告していた。

2. 研究の目的

RCNMV は二分節型ゲノム構造をとる (+) 鎖 RNA ウイルスである。申請者らはこれまで、RCNMV の翻訳・複製機構を詳細に解析し、これに関与する宿主因子遺伝子の同定とその機能解析を行ってきた。この過程で、他に類例のないサイレンシング抑制機構も明らかになった。

本研究の目的は、RCNMV MP と相互作用する因子として同定された GAPDH-A が RCNMV の細胞間移行において果たす役割を解明すること、および RCNMV の MP と複製複合体を含む小斑点状構造の形成過程についての知見を得ることを通じて RCNMV の細胞間移行機構を解明することである。

3. 研究の方法

Nicotiana benthamiana 植物からプロトプラストを単離し、PEG 接種法によってウイルス RNA を接種し、約 1 日培養した後、脱水、固定操作を行い、免疫染色法によって蛍光ラベルした二次抗体を用いてウイルスタンパク質やウイルスの複製中間産物である二本鎖 RNA を検出し、共焦点顕微鏡観察によって細胞内局在について調べた。

RCNMV MP と相互作用する因子として、アフィニティー精製と質量分析によって同定された *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH-A) 遺伝子の部分配列を *Nicotiana tabacum* の同遺伝子の配

列に基づいて増幅し、全長 cDNA 配列は RACE 法によって決定した。

サイレンシング誘導のためのリンゴ潜在球形ウイルス (ALSV) ベクターは pBI 系バイナリーベクターに挿入し、アグロバクテリウムを介した爪楊枝接種法で接種した。サイレンシングの誘導は Real Time RT PCR によって確認した。

GST を N 末端に付加した MP と、C 末端に myc タグを付加した全長 GAPDH-A を大腸菌に発現させ、GST pulldown アッセイによって *in vitro* での結合を確認した。また Bimolecular Fluorescence Complementation アッセイ法を利用して、GAPDH-A と YFP の C 末端部分との融合タンパク質を、アグロ注入法を用いてベンサムアナ葉に発現させ、MP と YFP の N 末端との融合タンパク質を発現する組み換え RCNMV ウイルスの RNA を機械接種し、48 時間後に蛍光を共焦点顕微鏡観察した。

二次構造予測ソフト PSIPRED サーバーを利用して RCNMV MP の二次構造を予測し、ヘリックス領域として予測された 5 つのドメインを欠失させたウイルスを作製し、接種実験に供した。

細胞内輸送経路の探索のため、細胞骨格アクチンや微小管に対する阻害剤として Lat B および oryzalin を、また膜輸送システムの阻害剤として Brefeldin あるいはドミナントネガティブ型 Sar1 [H74L] 変異タンパク質を、一過的にアグロバクテリウムを用いて発現させて、これに同じくアグロバクテリウムを用いて MP-GFP を発現させ、局在を共焦点顕微鏡観察して調べた。

4. 研究成果

RCNMV MP と蛍光タンパク質との融合タンパク質を植物細胞に発現させるか、または免疫染色法を用いるなどして詳細に調べた結果、感染の初期に細胞表面の微細な斑点状構造に局在し、時間の経過とともにこの斑点状構造が互いに融合してそのサイズが大きくなり、感染後期には核に隣接して巨大な塊状構造を 1 つ形成することがわかった。これらの MP を含む構造体は RCNMV 複製酵素成分タンパク質 p27 や、ウイルス RNA の複製中間体である二本鎖 RNA の局在と一致することが明らかとなった。また MP の欠失変異体の解析から、MP の C 末端のアミノ酸残基が小斑点状構造の形成にとって重要な領域であり、これを欠失させた変異 MP は MP としての生物学的諸能力を保持しているにも拘わらず RCNMV を細胞間移行させることが出来ず、この小斑点状構造が RCNMV の細胞間移行にとって必要な構造であることが以前の研究から明らかになっている。

RCNMV の細胞間移行に関与する宿主因子の探索を目的として、Tandem Affinity Purification 法と質量分析によって、

RCNMV MP と相互作用する *Nicotiana benthamiana* 植物タンパク質を網羅的に解析した。これらのうち、GAPDH-A タンパク質について、ウイルス増殖への影響について詳細に調べた結果、GAPDH-A は RCNMV の一細胞レベルでの増殖には関与せず、細胞間移行過程に関与する宿主タンパク質であることが明らかとなった。続いて GAPDH-A の細胞内局在を調べたところ、GAPDH-A と GFP の融合タンパク質は葉緑体局在性を示したが、RCNMV RNA1 が複製している細胞では細胞表層の小斑点状構造にも局在することがわかった。このような局在性の変化は RCNMV MP と GFP の融合タンパク質を一過的に発現させた場合にも見られることから、GAPDH-A は RCNMV の複製過程と密接な関連をもつものと推察された。さらに、BiFC アッセイによって RCNMV MP と GAPDH-A が細胞表層の小斑点状構造において相互作用することがわかった。両者の結合は *in vitro* での免疫沈降実験によっても確認された。GAPDH-A と RCNMV 複製酵素タンパク質 p27 との結合も *in vitro* 免疫沈降実験で確認された。さらには、GAPDH-A 発現を ALSV ベクターによって抑制した葉において、MP-GFP を発現する組み換え RCNMV を接種したところ、細胞表層の小斑点状構造が見られない細胞が多数観察された。以上の結果から、GAPDH-A は RCNMV の VRC と MP との間に介在し、MP がウイルスゲノム RNA1 を捕捉して隣接細胞へと輸送するために必要な宿主タンパク質であることが明らかとなった。

RCNMV と同じ *Dianthovirus* 属に属する *Carnation ringspot virus* に GFP 遺伝子を挿入した組み換えウイルスを用いて、同様に GAPDH-A サイレンシング誘導植物への接種実験を行ったところ、RCNMV の場合と同様にウイルス増殖の抑制が認められた。RCNMV とは異なる科に属する *Tomato mosaic virus* (ToMV) の接種実験ではこのような抑制効果は見られなかったことから、GAPDH-A は RCNMV の近縁のウイルスが利用する宿主因子タンパク質であると考えられる。現在、RCNMV と属は異なるが同科の *Tombusviridae* に属するウイルスを用いて、GAPDH-A サイレンシングのウイルス増殖抑制効果を調べる研究を計画している。将来的には、GAPDH-A タンパク質が VRC に局在することとウイルス移行との相関を示すことが出来るかもしれない。

GAPDH-A の他にも RCNMV MP と相互作用する宿主因子候補として、質量分析の結果 Germin-like protein (GLP) が同定された。GLP は gene family を形成しているが、そのうちの幾つかは細胞壁に局在し病原体感染への応答反応に関連すると言われていることから、研究を進めた。GAPDH-A の場合と同様に ALSV ベクターによって遺伝子発現を抑制し、続いて RCNMV を感染させる

実験を行ったところ、GLP 発現抑制植物では RCNMV の細胞間移行が抑制されることが明らかとなった。しかし GLP と GFP との融合タンパク質の細胞内局在性を調べたところ、細胞膜または小胞体膜に分布することがわかったが、RCNMV 感染による局在性の変化は認められず、さらに免疫沈降実験によって RCNMV MP と GLP との相互作用についても調べたが、相互作用する可能性は低いという結果になった。これらの結果から、GLP は膜系に局在しており、間接的に RCNMV 感染に関与することがわかったが、RCNMV 感染時における具体的な働きについては不明である。

RCNMV ゲノム RNA が表層小胞体膜に形成される VRC からどのような経路を辿ってプラズモデスマータ (PD) に到達するのかは報告されていない。この問題について調べるために、各種阻害剤を用いて細胞骨格系や膜輸送系を阻害した状態で MP-GFP もしくは MP-mCherry を一過的に発現させるか、もしくは組み換え RCNMV から発現させて、共焦点顕微鏡観察によって MP の PD 局在性について詳細に調べた。その結果、小胞体膜からゴルジ体を經由する膜輸送経路も、細胞骨格を用いる経路も RCNMV MP の PD 輸送には用いられていないことが明らかとなった。このような性質は幾つかの植物ウイルスで報告されており、おそらく RCNMV MP は小胞体膜上を拡散する過程で PD の細胞質側に存在する受容体と結合することで PD 局在する性質を持つものと推測される。

続いて RCNMV MP の機能ドメインの解析を目的として各種変異体 MP を作製し、細胞間移行への影響と細胞内局在の変化について解析した。構造予測ソフトによって MP 内に予測された 5 つの α ヘリックス構造を 1 個ずつ欠失させた変異 MP と GFP との融合タンパク質を発現する組み換え RCNMV をベンサムアナ植物に接種したところ、N 末から 1 番目~3 番目の α ヘリックス欠失変異 MP は効率的なウイルス細胞間移行を行うことが出来ず、1 番目と 3 番目の欠失変異 MP は PD には局在できたが野生型 MP のような細胞表層で小斑点状構造を形成出来ず、細胞内に広く拡散して局在した。またこれらの欠失変異 MP は一細胞レベルでのウイルス増殖には全く影響を与えなかったが、免疫染色法によってウイルス RNA の複製中間体である二本鎖 RNA を検出したところ、野生型 MP-GFP 発現細胞のような表層の小斑点状構造を形成せず、細胞全体にシグナルが拡散して存在することがわかった。この結果は、ウイルス複製複合体 (VRC) と MP の両方を含む細胞表層の小斑点状構造は RCNMV RNA の複製に寄与するものではなく、RCNMV の細胞間移行にとって重要な構造

であることを示している。

以上の RCNMV の細胞間移行に関する宿主因子 GAPDH-A の研究および RCNMV MP の解析を通して、細胞表層の MP と VRC を含む小斑点状構造のウイルス細胞間移行における重要性が改めて認識されるようになった。これらの構造体はウイルス移行複合体 (Virus movement complex; VMC) と称されるべきものと考えられる。

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 6件)

Kiwamu Hyodo, Takako Taniguchi, Yuki Manabe, Masanori Kaido, Kazuyuki Mise, Tatsuya Sugawara, Hisaaki Taniguchi, Tetsuro Okuno. Phosphatidic acid produced by phospholipase D promotes RNA replication of a plant RNA virus. PLoS Pathogens (2015) 査読有、11(5): e1004909.

doi:10.1371/journal.ppat.1004909

Masanori Kaido, Kazutomo Abe, Akira Mine, Kiwamu Hyodo, Takako Taniguchi, Hisaaki Taniguchi, Kazuyuki Mise, Tetsuro Okuno. GAPDH-A recruits a plant virus movement protein to cortical virus replication complexes to facilitate viral cell-to-cell movement. PLoS Pathogens (2014) 査読有、10(11): e1004505.

doi:10.1371/journal.ppat.1004505

Kiwamu Hyodo, Masanori Kaido, Tetsuro Okuno. Traffic jam on the cellular secretory pathway generated by a replication protein from a plant virus. Plant Signaling & Behavior (2014) 査読有、9: e28644. doi: 24714629

Taiki Narabayashi, Masanori Kaido, Tetsuro Okuno, Kazuyuki Mise. 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 Research (2014) 査読有、188: 162-169. doi: 10.1016/j.virusres.2014.04.002

Takashi Kawai, Ayako Gono, Michiya Nitta, Masanori Kaido, Noriko Yamagishi, Nobuyuki Yoshikawa, Ryutaro Tao. Virus-induced gene silencing in apricot (*Prunus armeniaca* L.) and Japanese apricot (*P. mume* Siebold & Zucc.) with Apple latent spherical virus vector system. Journal of

the Japanese Society for Horticultural Science (2014) 査読有、83: 23-31. doi: 10.2503/jjshs1.CH-091

Kiwamu Hyodo, Akira Mine, Takako Taniguchi, Masanori Kaido, Kazuyuki Mise, Hisaaki Taniguchi, Tetsuro Okuno. The ADP-ribosylation factor 1 plays an essential role in the replication of a plant RNA virus. Journal of Virology (2013) 査読有、87: 163-176. doi: 10.1128/JVI.02383-12

[学会発表](計 16件)

[図書](計 0件)

[産業財産権]
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等
京都大学植物病理学研究室ホームページ
www.plant-pathology.kais.kyoto-u.ac.jp

6. 研究組織

(1)研究代表者

海道真典 (KAIDO, Masanori)
京都大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号：20314247

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

谷口寿章 (TANIGUCHI, Hisaaki)
徳島大学・疾患酵素学研究センター・教授
研究者番号：10257636