

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450065

研究課題名(和文) TYLCVのゲノム複製における宿主RPA-ウイルス間相互作用の機能解明

研究課題名(英文) Analysis of the interaction between host replication protein A and a viral protein C3 in the replication process of TYLCV

研究代表者

山口 博隆 (Yamaguchi, Hirotaka)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜花き研究部門野菜育種・ゲノム研究領域・上級研究員

研究者番号：30355664

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)：トマトのタンパク質SIRPA1(replication protein A, 70kDサブユニット)とトマト黄化葉巻病の原因ウイルスTYLCVとの相互作用に必要なSIRPA1のアミノ酸残基を明らかにした。相互作用能を喪失した変異型SIRPA1をトマトで発現させると、TYLCVの増殖抑制が観察された。通常SIRPA1は細胞内の小器官に局在するが、TYLCVのタンパク質の一つであるrepが共存すると、C3が局在する核へと局在性が変化することが分かった。これらの結果から、SIRPA1はTYLCVの感染時に核に移行してC3と相互作用し、共同してTYLCVの複製プロセスに関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：A tomato protein SIRPA1(replication protein A, 70kD subunit) interacts with C3 protein of TYLCV. I identified amino acid residues responsible for the interaction between SIRPA1 and C3 protein. Over-expression of a mutated SIRPA1 protein, which no longer interacted with C3 protein, resulted in inhibition of TYLCV replication in the transgenic plants. SIRPA1 was usually localized to small organelle in tobacco leaf cells. When rep protein of TYLCV was co-expressed together, SIRPA1 moved to nucleus in which C3 protein was localized. These results indicate that upon infection of TYLCV SIRPA1 moves to nucleus and interacts with C3 protein, and these proteins cooperate to facilitate the replication process of TYLCV.

研究分野：園芸学

キーワード：トマト黄化葉巻病 TYLCV 宿主因子 replication protein A 生物間相互作用 geminivirus

1. 研究開始当初の背景

(1) トマト黄化葉巻病は原因ウイルス TYLCV の感染によって引き起こされるトマトの重要病害である。38 都府県で発生が報告されており、各地で深刻な被害を引き起こしている。本病害は微小昆虫タバココナジラミにより媒介されるため防除が困難である。そのため抵抗性品種の利用が効果的な防除手段と考えられるが、十分な抵抗性を有する育種素材がなく、強度抵抗性品種の育成は困難であり、新規の抵抗性素材の開発が求められている。

(2) TYLCV は 2.7kb の環状 1 本鎖 DNA のゲノムを持つが、自身のゲノムには 6 つの遺伝子しかコードされていないため、ウイルスゲノムの複製や全身移行のためには宿主の装置を利用する必要がある。これらのプロセスには宿主-ウイルス間のタンパク質相互作用が存在すると考えられ、宿主側の因子はウイルス感染に必要な罹病性因子と考えることができる。これらの生物間相互作用を阻害するように宿主タンパク質を改変することにより、新規の抵抗性遺伝子の開発が可能になると考えられる。

2. 研究の目的

(1) TYLCV の C3 タンパク質と相互作用する宿主のタンパク質として、酵母 Two-hybrid 系を用いたスクリーニングにより単離された、SIRPA1 (replication protein A, 70kD サブユニット) について、C3 タンパク質との相互作用に必要なアミノ酸配列を明らかにする。

(2) 遺伝子組換え培養細胞や、遺伝子組換え植物を利用して、SIRPA1 の野生型や変異型タンパク質の過剰発現や発現抑制が、TYLCV の増殖・感染応答反応に与える影響を明らかにする。

(3) TYLCV の C3 タンパク質と SIRPA1 タンパク質の細胞内局在性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) TYLCV の C3 タンパク質との相互作用に必要なアミノ酸配列の解明

相互作用に必要なアミノ酸領域の同定

SIRPA1 タンパク質について N 末端、C 末端および両端を欠失した各種デリベーション変異配列を設計し、酵母 Two-hybrid 相互作用検出系で使用する prey ベクター pGADT7-rec (Matchmaker Library Construction & Screening Kits, Clontech) にクローニングする。同様に TYLCV の C3 タンパク質を bait ベクター pGBKT7 に組み込み、定法により相互作用の有無を検出した。検出はヒスチジンおよびアデニン要求性の両方のレポーター発現を同時に要求する条件で行った (ヒスチジン、アデニン欠失培地での選抜)。

相互作用に必要なアミノ酸残基の同定

SIRPA の N 末端 110 アミノ酸の領域に

error-prone PCR によりアミノ酸置換変異をランダムに導入した。error-prone PCR には Taq DNA polymerase (Roche) を使用し、反応は添付バッファーに 0.4mM MnSO₄ を追加した条件で行った。作出した各種変異型 SIRPA1 を供試して、C3 タンパク質との相互作用の有無を評価し、相互作用に必要なアミノ酸残基を同定した。

(2) SIRPA1 の野生型および変異型タンパク質の過剰発現、発現抑制が TYLCV 増殖・感染応答反応に与える影響の評価

各種発現コンストラクト、RNAi コンストラクトの構築

野生型および変異型の SIRPA1 配列を CaMV 35S プロモーター、NOS ターミネーターを利用した発現カセットに組み込み過剰発現コンストラクトを構築した。また、SIRPA1 の部分配列を利用した RNAi 抑制コンストラクト (イントロンを挟んだ逆向き反復配列を上記発現カセットに組み込んだもの) を構築した。

組換え培養細胞を利用した評価

で構築した各種コンストラクトをアグロバクテリウムを介して、タバコ培養細胞 BY-2 に導入し、組換え培養細胞系統を作出した。各種培養細胞系統に対して TYLCV 焼津株を感染性クローンをを用いて接種し、TYLCV の増殖をリアルタイム PCR によるウイルスゲノム DNA の定量により評価した。

組換えトマトを利用した評価

で構築した各種コンストラクトをアグロバクテリウムを用いたリーフディスク法により罹病性トマト「秋玉」に導入し、組換えトマトを作出した。作出した組換えトマトに対して、TYLCV 大阪株を感染性クローンをを用いて接種し、病徴の発現を観察するとともに、TYLCV の増殖をリアルタイム PCR によるウイルスゲノム DNA の定量により評価した。

(3) 蛍光タンパク質との融合タンパク質を利用した SIRPA1 タンパク質と C3 タンパク質の細胞内局在性解析

RFP と C3 タンパク質、SIRPA1 タンパク質と EYFP との融合タンパク質を過剰発現させるバイナリープラスミドを構築し、アグロバクテリウムを介した一過的発現系を利用してタバコ (*Nicotiana benthamiana*) の葉で発現させた。接種 3 日後の葉を供試して、落射蛍光顕微鏡を用いて各融合タンパク質の細胞内での局在性を観察した。

4. 研究成果

(1) TYLCV の C3 タンパク質との相互作用に必要なアミノ酸配列の解明

相互作用に必要なアミノ酸領域の同定

酵母 Two-Hybrid 相互作用検出系を利用した相互作用解析の結果、全長 899 アミノ酸からなる SIRPA1 タンパク質を C 末端から削って

いっても N 末端から 110 アミノ酸分の配列があれば C3 タンパク質と相互作用することができるが、80 アミノ酸まで削ってしまうと相互作用能が失われることがわかった。一方 N 末端からは 31 アミノ酸を削っただけで相互作用能は喪失した。これらの結果から、C3 タンパク質との相互作用には SIRPA1 の N 末端 110 アミノ酸が必要であることが明らかとなった (図 1)。

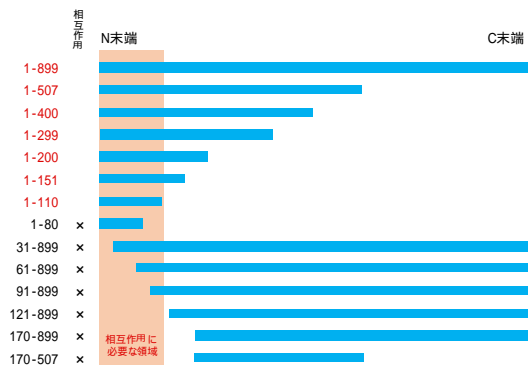


図 1 SIRPA1 の各種欠失変異タンパク質と C3 タンパク質との相互作用評価

相互作用に必要なアミノ酸残基の同定

SIRPA1 の N 末端 110 アミノ酸分に対応する塩基配列への error-prone PCR を利用した変異導入の結果、この領域にランダムなアミノ酸置換変異を持つ変異型 SIRPA1 タンパク質が 222 種類得られた。これらについて酵母 Two-Hybrid 相互作用検出系により C3 タンパク質との相互作用の有無を検討したところ、1ヶ所のアミノ酸置換により相互作用能が喪失した変異型 SIRPA1 タンパク質を 3 種類 (R47L、G61E、M62K) 同定した。野生型タンパク質におけるこれらのアミノ酸残基は C3 タンパク質との相互作用に重要なアミノ酸残基と考えられた。また、2ヶ所のアミノ酸変異を有する変異タンパク質で相互作用能が欠失したもののうち、欠失した変異タンパク質に固有の変異を持つものは 9 種類同定された。(図 2)。

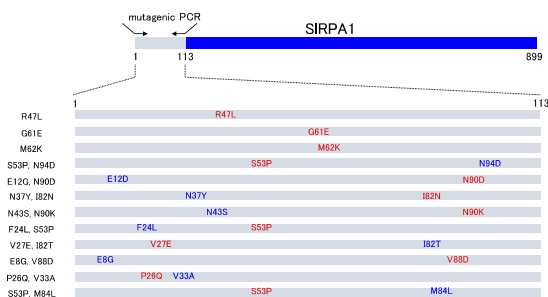


図 2 C3 タンパク質との相互作用を喪失させるアミノ酸置換変異の同定
赤字は相互作用を喪失した変異タンパク質に固有の変異。青字の変異は相互作用を維持していた他の変異型タンパク質でも観察された変異。

(2) SIRPA1 の野生型および変異型タンパク質の過剰発現、発現抑制が TYLCV の増殖に与える影響評価

各種発現コンストラクト、RNAi コンストラクトの構築

野生型の SIRPA1、相互作用が確認された最小の欠失変異タンパク質 (SIRPA1_N110)、1ヶ所のアミノ酸置換変異で相互作用が欠失した 3 種の変異型 SIRPA1 (SIRPA1_R47L、SIRPA1_G61E、SIRPA1_M62K) を CaMV 35S プロモーター、NOS ターミネーターを利用した発現カセットに組み込み過剰発現コンストラクトを構築した。また、SIRPA1 の部分配列を利用した RNAi 抑制コンストラクトを構築した。

組換え培養細胞を利用した評価

SIRPA1 の野生型タンパク質、N 末 110 アミノ酸からなる欠失タンパク質 (SIRPA1_N110)、相互作用を欠失した 3 つのタンパク質 (SIRPA1_R47L、SIRPA1_G61E、SIRPA1_M62K) を過剰発現する組換え BY-2 培養細胞系統を作出した。作出した系統にアグロバクテリウムを介して TYLCV を接種し、導入遺伝子が TYLCV 増殖に与える影響を調査したが、再現性のある影響を確認することはできなかった。培養細胞を利用した評価系では TYLCV の増殖量のばらつきが大きく、一定以下の影響を検出することは困難と考えられたため、組換えトマトを作出して影響を評価することとした。

組換えトマトを利用した評価

で検討した過剰発現コンストラクトおよび SIRPA1 を標的とした RNAi 抑制コンストラクトを罹病性トマト「秋玉」に導入し組換えトマトを作出した。作出した組換えトマトに TYLCV を接種し感染応答反応を調査した。接種 28 日後には、野生型の過剰発現コンストラクト、RNAi コンストラクトを導入した組換えトマトでは、罹病性トマト「秋玉」と同様にウイルスが増殖するとともに病徴が発現し、感染応答反応に「秋玉」と大きな違いは観察されなかった。一方、変異型 SIRPA1 タンパク質を導入した組換えトマトでは、R47L 変異 SIRPA1 を導入した組換えトマトにおいて、ウイルス増殖の抑制が観察された。他の 2 種の変異タンパク質については増殖抑制は観察されなかった (図 3A)。しかし接種 56 日後には、抵抗性品種の「大安吉日」では、ウイルスの増殖が抑制されていたのに対し、R47L 変異 SIRPA1 を導入した組換えトマトでは「秋玉」と同程度のウイルス増殖が確認されたため、導入遺伝子による増殖抑制効果は限定的と考えられた (図 3B)。R47L 変異は C3 タンパク質との相互作用を消失させる変異であり、C3 タンパク質と相互作用できない変異型 SIRPA1 が共存することにより、SIRPA1 と C3 タンパク質との相互作用が阻害され TYLCV の増殖が抑制される可能性が示唆された。

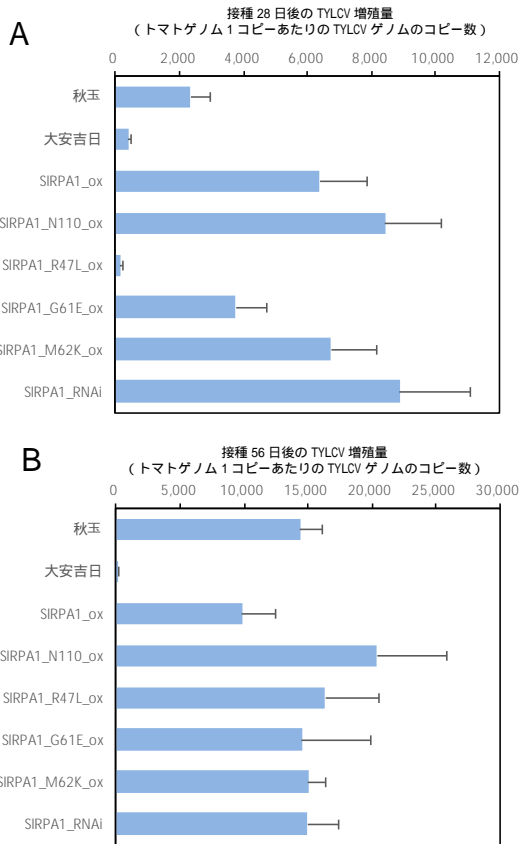


図 3 各種コンストラクトを導入した組換えトマトでの TYLCV 増殖量
 接種 28 日後 (A) および 56 日後 (B) の TYLCV の増殖量をリアルタイム PCR によるウイルス DNA 量の定量により評価。秋玉：罹病性トマト、大安吉日：*Ty-3a* 抵抗性トマト、*_ox*：野生型または各種変異型 SIRPA1 の過剰発現コンストラクトを導入した組換えトマト、SIRPA1_RNAi：SIRPA1 を標的とした RNAi コンストラクトを導入した組換えトマト。

(3) 蛍光タンパク質との融合タンパク質を利用した SIRPA1 タンパク質と C3 タンパク質の細胞内局在性解析

融合タンパク質 YFP::SIRPA1 をタバコ葉で一過的に発現させると、融合タンパク質は顆粒状の細胞内小器官に局在した (図 3A)。一方 C3::RFP は核への局在が観察された (図 3B)。このように単独発現させた場合、両融合タンパク質は異なる細胞内小器官に局在した。しかし、YFP::SIRPA1 ともう 1 つの TYLCV タンパク質である rep と RFP の融合タンパク質を共発現させると、YFP::SIRPA1 は核に局在するようになった (図 3C)。この結果により、SIRPA1 は通常時には細胞内小器官に局在するが、TYLCV の感染時には核に局在するようになり、さらに核内で C3 タンパク質と共同してウイルス複製等、ウイルス感染プロセスに関与する可能性が示唆された。

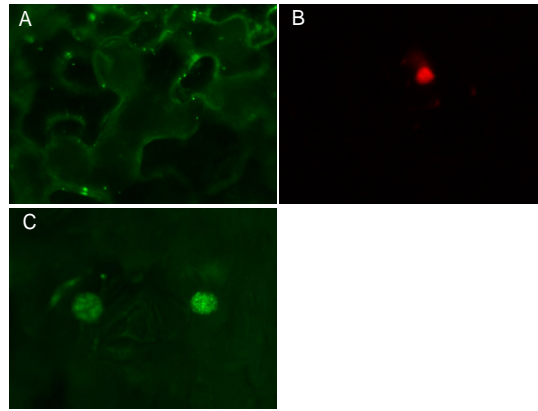


図 4 蛍光タンパク質との融合タンパク質を利用した SIRPA1 タンパク質と C3 タンパク質の細胞内局在性解析
 (A) YFP::SIRPA1、(B) C3::RFP を単独発現させた時の各融合タンパク質の細胞内局在性。(C) YFP::SIRPA1 と rep::RFP を共発現させた時の YFP::SIRPA1 の細胞内局在性。

(4) 総合考察

本研究課題では TYLCV の C3 タンパク質と相互作用する宿主のタンパク質 SIRPA1 について、相互作用に必要なアミノ酸残基を同定し、相互作用能を欠失したアミノ酸置換変異タンパク質の過剰発現が TYLCV の増殖を阻害する効果があること明らかにした。SIRPA1 と C3 タンパク質の共同的なウイルス増殖プロセスへの関与は、細胞内での動態においても示唆的な知見が得られた。TYLCV をはじめとするジェミニウイルス全般において、ウイルスの感染プロセスにおける宿主植物の因子 (タンパク質等) の役割はほとんど解明されておらず、本研究課題の成果はジェミニウイルスの感染プロセス解明に貢献するものと考えられる。今後はウイルス増殖において SIRPA1 と C3 タンパク質が関与する具体的なプロセスを明らかにしていくとともに、SIRPA1 の改変による新たな抵抗性遺伝子の開発の可能性について検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 博隆 (YAMAGUCHI, Hirotaka)
 農業・食品産業技術総合研究機構・野菜花き
 研究部門・上級研究員

研究者番号：30355664