

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：82112

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850032

研究課題名(和文) イネ縞葉枯ウイルス増殖機構の逆遺伝学的解析

研究課題名(英文) Reverse genetics analysis of the multiplication mechanism of Rice strip virus

## 研究代表者

石橋 和夫 (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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：植物のマイナス鎖RNAウイルスは遺伝子操作実験系が確立されておらず、増殖過程には未解明の点が多い。本研究は、イネ縞葉枯ウイルス(RSV)のウイルス粒子(RNP)を再構築することにより遺伝子操作実験系の確立を目指した。試験管内でのRSV RNPの再構築は成功には至らなかった。一方、細胞内でのRNPの再構築も試み、RSVではポジティブな結果を得るには至らなかったが、近縁のトマト黄化えそウイルス(TSWV)を用いた場合に、TSWVゲノムのうち一番短い分節であるS RNAを出芽酵母細胞内で複製させることができた。この結果はTSWV RNPが出芽酵母細胞内で形成されたことを強く示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：Because of the lack of reverse genetics systems, infection processes of negative-strand RNA viruses of plants are largely unknown. This project was aimed to establish the reverse genetics system of rice stripe virus (RSV) and tomato spotted wilt virus (TSWV) in the family Bunyaviridae. First, I tried to reconstitute the RSV ribonucleoprotein complex in vitro using purified RNA polymerase and nucleocapsid, but the trial was unsuccessful. Then, I expressed RNA polymerase, nucleocapsid, and S RNA of TSWV in *Saccharomyces cerevisiae*, and found that replication of TSWV S RNA occurred. This suggests that TSWV RNP was formed in yeast.

研究分野：植物ウイルス学

キーワード：マイナス鎖RNAウイルス 逆遺伝学 イネ縞葉枯ウイルス トマト黄化えそウイルス 出芽酵母

## 1. 研究開始当初の背景

イネ縞葉枯ウイルス (RSV) は、イネ縞葉枯病の原因となるマイナス鎖 RNA ウィルスで、ヒメトビウムカによって媒介される。昆虫媒介性の植物ウイルスは、発生域が迅速に拡大するため、農作物に多大な被害をおよぼすが、特に永続伝搬 (増殖型) するウイルスは昆虫体内でも増殖するため、その拡大を防止することは困難であり、RSV やトマト黄化えそウイルス (TSWV) など、国内で頻繁に発生しているウイルスも多い。これらのウイルスを防除するためには、宿主植物における増殖・媒介昆虫によるウイルスの獲得・媒介昆虫体内における増殖・新たな宿主植物への感染というサイクルを断ち切る必要があり、抵抗性品種の利用や媒介昆虫の駆除が行われているが、抵抗性を打破するウイルスや薬剤抵抗性昆虫の出現が問題となっている。

ウイルスの増殖機構の解析には、遺伝子操作 (逆遺伝学) 実験系が強力なツールとなるが、RNA ウィルスの場合、cDNA からの感染ができて初めて遺伝子操作が可能となる。プラス鎖 RNA ウィルスのゲノムは mRNA として機能し、RNA のみで感染性を示すため、多くのプラス鎖 RNA ウィルスのクローン化 cDNA を用いた遺伝子操作実験系が 1980 年代以降に確立され、ウイルス増殖機構の解明に著しく貢献してきた。一方、RSV を含め、永続伝搬 (増殖型) するウイルスのほとんどはマイナス鎖 RNA ウィルスであるが、マイナス鎖 RNA ウィルスのゲノムはヌクレオキャプシドタンパク質および RNA ポリメラーゼとリボヌクレオタンパク質複合体 (RNP) を形成しており、裸の RNA は感染性をもたない。このことが主な原因となり、植物のマイナス鎖 RNA ウィルスの逆遺伝学実験系は未だ確立されておらず、増殖過程の分子レベルでの理解はほとんど進んでいない。

現在までに多くの動物マイナス鎖 RNA ウィルスについて逆遺伝学実験系が報告されているが、これらは宿主細胞内でウィルスタンパク質と RNA を発現させ、増殖してきたウイルスを回収するという方法によるものである。しかし、原因は不明だがこれまで植物ウイルスについて同様の方法によるウィルスゲノムの遺伝子操作は成功していない。インフルエンザウイルスでは、8 分節あるゲノムのうち 1 つの分節について RNA と精製タンパク質を用いて RNP を再構築し、これをヘルパーウイルスと共感染させることにより、遺伝子再集合を起こして組換え RNA をもったウイルスを回収する方法が確立されている (Enami et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3802-3805 [1990])。しかし、感染性をもつマイナス鎖 RNA ウィルスそのものを再構築した例はこれまで報告されていない。これは、ほとんどのマイナス鎖 RNA ウィルスの粒子が RNP を覆う脂質被膜をも

っており、この被膜が感染性に重要である一方、適切な被膜構造を再構築することが技術的に困難であることが一因として考えられる。

一方、RSV をタイプ種とするテヌイウィルス属のウイルスは被膜をもたず、RNP がウィルス粒子そのものであると考えられている (Falk and Tsai, Annu. Rev. Phytopathol. 36:139-163 [1998])。このことから私は、RSV の RNP を再構築することができれば、感染性を有するウイルスとなる、すなわち逆遺伝学実験系を構築することができるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究は、RSV の逆遺伝学実験系を確立し、マイナス鎖 RNA ウィルスの増殖・媒介サイクルについての理解を深めることにより、新規防除策の構築に向けた基盤を作ろうとするものである。モデルとして RSV を用いるが、これに固執するものではなく、RSV を用いた研究が困難であった場合には近縁のウイルスである TSWV 等も研究対象とする。

逆遺伝学実験系の確立に成功すれば、ウィルス遺伝子の機能解析が容易になる。RSV のゲノムには少なくとも 7 個のタンパク質がコードされている。この中には、ヌクレオキャプシドタンパク質、RNA ポリメラーゼ、細胞間移行タンパク質、2 つの RNA サイレンシング抑制タンパク質が含まれる (Toriyama et al., J. Gen. Virol. 75:3569-3579 [1994]; Xiong et al., J. Virol. 82:12304-12311 [2008]; Xiong et al., Virology 387:29-40 [2009]; Du et al., Mol. Plant Pathol. 12:808-814 [2011]) が、残る 2 つのタンパク質の機能は全くわかっていない。また、多くのウィルスタンパク質は多機能であるため、機能が既に推定されている遺伝子についても、未知の機能をもっている可能性がある。そこで、RSV ゲノム中の各遺伝子の機能喪失変異株を作製し、これらの変異株の表現型を調べることにより、増殖の各段階において機能するウィルス遺伝子を明らかにする。これは、本研究の延長線上の長期的な到達目標である「マイナス鎖 RNA ウィルス増殖・媒介サイクルの全容を解明し、ウィルスの弱点を突くことによって効果的な防除策を構築する」ことに向けた第一歩となる。また、逆遺伝学実験系は、ウィルスのベクター化や弱毒ウィルスの開発等にも応用が期待できる。宿主植物の遺伝子機能解析に役立つ Virus-induced gene silencing ベクターとしても利用可能かもしれない。

## 3. 研究の方法

### (1) 試験管内 RNP 再構成

精製 RSV 粒子 (RNP) は RNA、ヌクレ

オキャプシドタンパク質，および RNA ポリメラーゼから成り，ゲノム RNA を鋳型に相補鎖 RNA を合成する（以下，複製とする）活性を有する．そこで本研究では，この 3 者を用いて感染性に必須な最小単位である RNP の再構築を目指す．

本研究開始時点において RSV ゲノムの cDNA をクローン化し，各分節（RSV は 4 分節のゲノムをもつ）について試験管内転写でゲノム RNA が合成できることを確認した．約 35 kDa のヌクレオキャプシドタンパク質については大腸菌等を用いて発現に成功し，精製タンパク質に RNA 結合活性があることを確認した．約 330 kDa と巨大な RNA ポリメラーゼについては発現が困難であったが，出芽酵母を用いることにより発現に成功した．本研究ではこれらをどのような条件で混合すれば感染性を有する RNP が構築されるか検討する．

#### (2)細胞内 RNP 再構成

試験管内 RNP 再構成が上手くいかなかった場合，翻訳や複製などの過程と RNP の形成が共役している可能性が考えられるため，細胞内での RNP 再構成も試みる．前項では RSV RNA ポリメラーゼの発現に出芽酵母を用いたが，出芽酵母はいくつかの植物プラス鎖 RNA ウイルスや動物マイナス鎖 RNA ウイルスであるインフルエンザウイルスの複製を許容するモデル宿主として広くウイルス研究に用いられている．そこで，RSV の各タンパク質およびゲノム RNA を発現するプラスミドを出芽酵母に導入し，ゲノム RNA が複製されるか調べる．ゲノム RNA の発現にあたっては，両末端がウイルス本来の配列と同じになるようリボザイム配列を利用する．

### 4．研究成果

#### (1)試験管内 RNP 再構成

精製した RNA ポリメラーゼタンパク質は鋳型特異的(RSV ゲノムの 3'末端配列特異的)な RNA 合成活性を示した．しかし，RSV RNA ポリメラーゼによる RNA 合成反応は短い鋳型（数十塩基程度）を用いた場合に限られ，ゲノム RNA 全長を鋳型としたときに全長の複製産物は検出できなかった．これは精製ヌクレオキャプシドタンパク質を添加したときにも同様だった．したがって，適切な RNP が構築できていないと考えられた．そこで，本研究では感染性 RNP の再構築を目指し，ゲノム RNA 全長が複製される条件の検討を行った．

RSV の RNA ポリメラーゼ活性は金属イオン（2 価陽イオン）の種類や濃度によって大きく影響を受けた．そこで最適な条件を検討したところ，マグネシウムイオンおよびマンガンイオンをそれぞれ 2 mM 加えたときに，

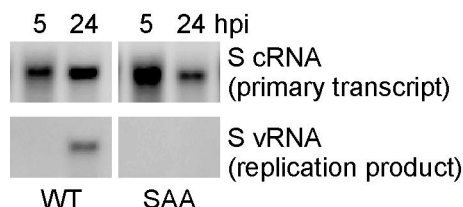
数百塩基の長い RNA が合成されるようになった．しかし，このときにもゲノム全長は複製されず，この条件で形成させた RSV RNP を植物に接種しても感染性を示さなかった．

当初の計画では，さらにウイルスがコードする他のタンパク質や宿主細胞抽出液などを加えることにより，適切な RNP が形成される条件を検討するとしていたが，(2)項が進展したためこちらに注力することとした．

#### (2)細胞内 RNP 再構成

RSV ゲノムの一番短い分節である RNA4 を出芽酵母細胞内で発現するためのプラスミドを作製した．プロモーターとしては誘導性の GAL1 あるいは CUP1 を用いた．両末端を正確に切断するために，ウイルス RNA の 5'側にハンマーヘッド型リボザイムを，3'側に D 型肝炎ウイルスリボザイムを配した．さらに，複製に伴う遺伝子発現を簡便に検出するため，p4 タンパク質 ORF を蛍光タンパク質(YFP)に置換した．このプラスミドを，RNA ポリメラーゼおよびヌクレオキャプシドを発現するプラスミドとともに出芽酵母細胞に導入し，転写誘導条件において YFP 蛍光を観察した．ネガティブコントロールとして活性中心に変異をもつ RNA ポリメラーゼを用いたが，この変異体発現細胞と比較して，野生型の RNA ポリメラーゼ発現細胞の蛍光は同程度であった．

一方，TSWV を用いて同様の実験系を構築した場合に，数千細胞に 1 個程度と非常に低頻度であるが，強い蛍光が観察された．そこで，ウイルス RNA 発現ベクターの改良を行うとともに，レポーターではなく TSWV S RNA そのものを発現させたところ，野生型の RNA ポリメラーゼを発現する細胞では，複製産物と考えられる相補鎖 RNA が検出された（図 1）．ネガティブコントロール細胞では相補鎖 RNA は検出されなかった．したがって，出芽酵母細胞内で TSWV S RNA の複製が起きたと考えられた．すなわち，ゲノムの一節のみではあるが，cDNA に由来するマイナス鎖 RNA ウイルスゲノムの複製に成功した．



**図 1．出芽酵母細胞における TSWV S RNA の複製．**野生型 (WT) あるいは活性中心に変異をもつ (SAA) RNA ポリメラーゼ，ヌクレオキャプシドタンパク質，および S cRNA を発現するプラスミドを出芽酵母に導入し，発現誘導後 5 時間および 24 時間にお

ける RNA の蓄積をノーザンハイブリダイゼーションにより検出した。野生型の TSWV RNA ポリメラーゼ依存的に複製産物である相補鎖 S vRNA の蓄積が検出された。

#### 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 2 件)

Kazuhiro Ishibashi, Masayuki Ishikawa (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, 査読有, doi:10.1016/j.coviro.2014.08.005

石橋和太, 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* 64:3-10, 査読無

[学会発表](計 2 件)

石橋和太, 石川雅之 出芽酵母を用いたトマト黄化えそウイルス S RNA レプリコン系の開発 日本植物病理学会創立 100 周年記念大会 2015 年 3 月 29 日~2015 年 3 月 31 日 明治大学(東京都千代田区)

石橋和太 植物ウイルス研究の未開の地を目指して 日本植物病理学会創立 100 周年シンポジウム 2015 年 3 月 28 日 明治大学(東京都千代田区)

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

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