

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：34316

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04456

研究課題名(和文) 植物RNAウイルスの複製を正あるいは負に制御する宿主因子の探索と機能解明

研究課題名(英文) Search and functional analysis of host proteins that positively or negatively regulate the replication of a plant RNA virus

研究代表者

奥野 哲郎 (Okuno, Tetsuro)

龍谷大学・農学部・教授

研究者番号：00221151

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マメ科植物に病気を起こすレッドクローバーネクロティックモザイクウイルス(RCNMV)をモデルウイルスとして用いRNAウイルスの複製機構を調べた。その結果、RCNMVは、様々な宿主のタンパク質を利用して細胞内膜を改変しウイルス複製工場を作り、さらに宿主の活性酸素発生装置をも巧みに利用してウイルス複製に適した細胞内環境を作ることによりウイルスRNA複製を行うことが分かった。その過程においてウイルス複製を促進する正の因子とウイルス複製を抑制する負の因子を明らかにした。これらの因子の同定と機能解明はウイルス病防除法の開発に繋がることが期待出来る。

研究成果の概要(英文)：We investigated molecular mechanisms underlying the replication of RNA viruses using a legume plant-infecting Red clover necrotic mosaic virus (RCNMV) as a model virus. We found that RCNMV modifies cellular membranes to create a viral RNA replication factory, and changes cellular environment by harnessing host oxygen-generating machinery to facilitate virus RNA replication. We identified many host proteins which positively or negatively regulate virus RNA replication. Molecular identification of host factors and elucidation of their functions in the viral infection process could assist in the development of novel anti-viral strategies.

研究分野：植物病理学 植物ウイルス学

キーワード：RNA virus RNA replication dianthovirus Rboh phospholipase D phosphatidic acid cellular membrane reactive oxygen species

## 1. 研究開始当初の背景

植物ウイルスは、宿主細胞に侵入後、ゲノム RNA の複製、隣接細胞への移行、さらに維管束系を経た植物体全体への移行過程を経て、全身感染を成立させる。これら一連の過程は、ウイルスが植物の抵抗性機構を抑制、回避し、様々な細胞装置を効率よく改変、利用できる能力に依存している。その際、ウイルスが積極的に宿主植物を殺してしまうことはなく、ウイルスと宿主の攻防はあるバランスの上に成り立っている。ただし、ウイルスの増殖能が植物の抵抗性機能を極度に上回ったときに植物は病気になると考えられる。

植物ウイルスの大多数を占めるプラスセンス RNA [(+)RNA]ウイルスは、小胞体、ゴルジ装置、ミトコンドリア、葉緑体、ペルオキシソーム、液胞などの細胞小器官膜上にウイルス複製複合体 (VRC) を形成し、RNA 複製を行う。(+)RNA ウイルスの複製に関わる宿主因子は酵母を用いたゲノムワイドスクリーニングにより *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) で約 130、*Brome mosaic virus* (BMV) で約 30 の遺伝子が同定されている。また、ウイルスタンパク質や RNA と相互作用する宿主タンパク質が *Tomato mosaic virus* (ToMV) で同定されている。それらのタンパク質の一部については機能解析が進められ、VRC 形成、膜の改変、脂質代謝における役割が明らかにされている。しかし、その数は極めて限られており、大多数のタンパク質のウイルス感染における役割は不明であった。申請者らは、免疫生化学的手法と質量分析法を用いて *Red clover necrotic mosaic virus* (RCNMV) の複製タンパク質 p27 と p88 と相互作用する多くの宿主タンパク質を同定してきた。それらにはシャペロンタンパク質、ユビキチン関連タンパク質、膜輸送、脂質合成、抵抗性・ストレス応答に関わる様々なタンパク質が含まれていた。

## 2. 研究の目的

ウイルスは、我々にとって重要な植物や家畜などに大きな被害をもたらす農業上重要な病原体である。しかし、防除法開発に欠かせないウイルスと宿主の相互作用、特にその分子基盤となる宿主因子の情報は極めて限られている。申請者らはこれまで、ウイルス複製複合体に含まれる植物因子を免疫生化学的手法を用いて同定し、それらのウイルス複製における役割を研究してきた。その中にはウイルス複製に必要な因子と複製を抑制する因子が含まれることが分かってきた。この結果は必要因子を阻害し、抑制因子を活性化すればウイルス感染を抑制できることを示唆している。本研究では、申請者がウイルス複製複合体成分としてこれまでに同定してきた因子のウイルス増殖における役割解明を行う。本研究の目的は、ウイルスと宿主間で繰り広げられる攻防の分子ネットワー

クにおける新たな分子基盤を提供し、ウイルス抵抗性植物作成への大きな道を拓くことである。

## 3. 研究の方法

本研究の流れと手法を以下に示す。

**1) ウイルス RNA 複製複合体画分に含まれる宿主タンパク質のウイルス感染と複製に及ぼす影響。** タンパク質情報をもとに植物から候補タンパク質の遺伝子 (cDNA クローン) を得、タンパク質の発現抑制、変異体発現等でウイルス増殖に及ぼす影響を植物体、プロトプラスト、及び *in vitro* 系で調べる。

**2) 候補タンパク質の細胞内局在性。** 蛍光タンパク質 (GFP 等) との融合タンパク質を発現させ共焦点顕微鏡で観察する。タンパク質間相互作用は二分子蛍光補足 (BiFC) アッセイなどで確認する。

**3) 候補タンパク質のウイルス複製における機能解析。** 候補タンパク質に関わる代謝産物、例えば PLD による PA、Rboh による  $H_2O_2$  などの活性酸素種のウイルス複製とタンパク質の細胞内局在性に及ぼす影響を調べる。

## 4. 研究成果

3 年間の研究で得られた成果は以下の通りである。

1) フォスファチジルコリンやフォスファチジルエタノールアミンなどのリン脂質を加水分解しフォスファチジン酸 (PA) を生産する酵素であるフォスホリパーゼ D (PLD) が複製の必須因子であることを明らかにした。PA は、細胞膜の構成成分であると同時に、細胞の様々な機能制御に関わるシグナル分子として働く重要なリン脂質である。RCNMV 感染細胞では PA の蓄積量が増大した。RCNMV は PLD をリクルートし PA を量産し、膜の改変などを介してウイルス RNA 複製工場を作り RNA 複製に利用することを示した (Plos. Pathogen, 2015)。

2) RCNMV RNA 複製複合体膜画分に含まれる植物の NADPH オキシダーゼ RBOH とカルシウム依存性タンパク質キナーゼ (CDPK) が RNA 複製の必須因子であることを明らかにした。RBOH は活性酸素 (ROS) 産生において重要な働きをする酵素である。RBOH を介して細胞外に生産されるスーパーオキシド ( $O_2^-$ ) は自然に、あるいは、酵素によって  $H_2O_2$  (過酸化水素) に変換される。RBOH の機能制御には CDPK が関わる。RCNMV の複製補助タンパク質 p27 は RBOH と相互作用して RNA 複製工場である膜にリクルートすること、そして、RBOH 依存的に活性酸素バーストを起こすことを示し、この活性酸素バーストは RCNMV RNA 複製の必須因子であることを明らかにした (PNAS, 2017)。

ペンタミアーナタバコの CDPK は直接 Rboh をリン酸化して活性化して RBOH と複合体を作ることを *in vitro* 系で明らかにした。また、別の植物 RNA ウイルスであるブロムモザ

イクウイルスの複製も ROS 産生に依存していることを明らかにした。すなわち、植物 RNA ウイルスは宿主の ROS 発生装置を巧みに利用して RNA 複製を行うことが分かった。この研究成果を踏まえ、RCNMV 複製の新規宿主因子、RACK1 (receptor for activated C kinase) の機能解析を行ったところ、RACK1 は p27 と CDPKiso2 の双方と相互作用し、RCNMV 複製および p27 誘導性 ROS 産生に必要な因子であることが分かった。さらに、RACK1 のノックダウンにより p27-CDPKiso2 間相互作用が顕著に阻害された。以上のことから、RACK1 は p27 と CDPKiso2 のアダプターとして機能し、ウイルス誘導性 ROS 産生に貢献すると考えられる。さらに興味深いことに、RACK1 は、RNA1 の RNA 因子 3' CITE に依存したキャップ非依存的翻訳にも重要な役割を持つことが明らかとなった。この発見は RACK1 が翻訳と RNA 複製いずれにおいてもキー因子として働くことを示しており、RACK1 が翻訳と RNA 複製間の制御に関わる可能性を示唆した。

#### 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 6 件)

1) Hyodo, K., Nagai, H., and Okuno, T. 2017. Dual function of a *cis*-acting RNA element that acts as a replication enhancer and a translation repressor in a plant positive-stranded RNA virus. **Virology** 512, 74-82. doi:10.1016/j.virol.2017.09.008 (査読あり)

2) Tajima, Y., Iwakawa, H.O., Hyodo, K., Kaido, M., Mise, K., and Okuno, T. 2017. Requirement for eukaryotic translation initiation factors in cap-independent translation differs between bipartite genomic RNAs of red clover necrotic mosaic virus. **Virology** 509:152-158. doi: 10.1016/j.virol.2017.06.015 (査読あり)

3) Hyodo, K., Suzuki, N., and Okuno, T. 2017. Roles of superoxide anion and hydrogen peroxide during replication of 2 unrelated plant RNA viruses in *Nicotiana benthamiana*. **Plant Signaling & Behavior** 12(6):e1338223. doi: 10.1080/15592324.2017.1338223 (査読あり)

4) Hyodo, K., Hashimoto, K., Kuchitsu, K., Suzuki, N., and Okuno, T. 2017. Harnessing host ROS-generating machinery for the

robust genome replication of a plant RNA virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 114, E1282-E1290. doi:10.1073/pnas.1610212114 (査読あり)

5) Hyodo, K. and Okuno, T. 2016. Pathogenesis mediated by proviral host factors involved in translation and replication of plant positive-strand RNA viruses. **Curr. Opin. Virol.** 17, 11-18. doi:10.1016/j.coviro.2015.11.004 (査読あり)

6) Hyodo, K., Taniguchi, T., Manabe, Y., Kaido, M., Mise, K., Sugawara, T., Taniguchi, H., and Okuno, T. 2015. Phosphatidic acid produced by phospholipase D promotes RNA replication of a plant RNA virus. **PLoS Pathog.** 11:e1004909. doi:10.1371/journal.ppat.1004909 (査読あり)

[学会発表](計 10 件)

1) 兵頭 究, 鈴木 信弘, 奥野 哲郎  
宿主足場タンパク質 RACK1 は植物 RNA ウイルスの増殖を正に制御する。  
日本植物病理学会 2018 年

2) 末森 彩洋子, 峯 彰, 奥野 哲郎, 竹田 篤史  
AGO2 発現誘導に必要な RCNMV 因子に関する研究。  
日本植物病理学会 2018 年

3) Kiwamu Hyodo, Nobuhiro Suzuki, Tetsuro Okuno  
A role of reactive oxygen species during the replication of a plant RNA virus.  
17<sup>th</sup> International Congress of Virology, 2017

4) Saya Nakagawa<sup>1</sup>, Keiichi Yazaki, Tetsuro Okuno, Masanori Kaido, Yoshitaka Takano, Kazuyuki Mise. Infection strategy of brome mosaic virus in host and non-host plants.  
17<sup>th</sup> International Congress of Virology, 2017

5) Takaaki Oya, Koji Nitta<sup>1</sup>, Quan Xu, Kanako Yasuda, Masayoshi Teraishi, Masanori Kaido, Tetsuro Okuno, Yoshitaka Takano, Yutaka Okumoto, Kazuyuki Mise. Isolation of an NB-LRR gene involved in rice resistance against brome mosaic virus.  
17<sup>th</sup> International Congress of Virology, 2017

6) 兵頭究、鈴木信弘、奥野哲郎  
活性酸素種は植物 RNA ウイルス増殖を正に制御する。  
日本植物病理学会 2016 年

7) 永井比加里、兵頭究、田島由理、海道真典、三瀬和之、奥野哲郎  
ダイアンソウウイルスの RNA 複製から移行タンパク質翻訳へのスイッチング機構。  
日本植物病理学会 2016 年

8) 北坂公紀、三瀬和之、奥野哲郎、海道真典  
Red clover necrotic mosaic virus (RCNMV) の各ゲノム RNA は単独で細胞間移行できる。  
日本植物病理学会 2016 年

9) 河野早帆・三瀬和之、奥野哲郎、海道真典  
Red clover necrotic mosaic virus 移行タンパク質の機能ドメイン解析。  
日本植物病理学会 2016 年

10) 末森彩洋子、中村光希、奥野哲郎、竹田篤史  
Red clover necrotic mosaic virus 感染時に認められる AG02 遺伝子の発現誘導に関する研究。  
日本植物病理学会関西部会 2015 年

〔図書〕(計 1 件)

1) 奥野哲郎ら (著者多数) 植物ウイルス大事典 「ダイアンソウウイルス属」 pp.202-203、トウガラシ微斑ウイルス pp.489-490、タバコ微斑モザイクウイルス pp.574-575。  
朝倉書店 総ページ 944、2015 年

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

奥野 哲郎 (OKUNO, Tetsuro )  
龍谷大学・農学部・教授  
研究者番号：00221151

### (2) 研究分担者

兵頭 究 (HYODO, Kiwamu)  
岡山大学・資源植物科学研究所・助教  
研究者番号：80757881

三瀬 和之 (MISE, Kazuyuki )  
京都大学・農学研究科・准教授  
研究者番号：90209776

海道 真典 (MISE, Kazuyuki )  
京都大学・農学研究科・助教  
研究者番号：20314247