

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04460

研究課題名(和文) タバコモザイクウイルスRNA複製複合体前駆複合体の解析

研究課題名(英文) Analysis of a precursor complex of tobacco mosaic virus RNA replication machinery

研究代表者

石川 雅之 (Ishikawa, Masayuki)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・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) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：タバコモザイクウイルス(TMV)は一本鎖RNAゲノムをもつ。ゲノムRNAは宿主細胞内の膜上に形成される複製複合体の中で相補鎖RNAを介して複製する。我々は、複製複合体の形成に先だって、ウイルスにコードされた複製タンパク質とゲノムRNAを含むリボ核タンパク質複合体(PMTC)が形成されることを見いだした。本研究では、PMTCの分子の実体とその形成機構の解明を目指して解析を行った。その結果、PMTCは複数の複製タンパク質を含む巨大な複合体で、その形成には約70塩基にわたるACAに富む配列が必要であること、また、PMTC形成には宿主由来の因子が必要である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The genome of tobacco mosaic virus (TMV) is a single-stranded RNA that replicates via the complementary RNA in a membrane-bound replication complex. Previously, we found that a ribonucleoprotein complex named PMTC that contains the genomic RNA and the replication proteins is formed prior to the establishment of the replication complex on membranes. In this study, we explored the molecular basis for the formation of PMTC and found that PMTC is a large complex containing multiple replication protein molecules, and that ACA-rich RNA of at least 70 nucleotides is required for PMTC formation. It was also suggested host factors may play essential roles in PMTC formation.

研究分野：植物病理学

キーワード：ウイルス RNA 複製 タンパク質

## 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。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。真核生物を宿主とするプラス鎖 RNA ウイルスの複製タンパク質はゲノム RNA を認識して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。

タバコモザイクウイルス (TMV) 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 6400 ヌクレオチドの 1 本鎖 RNA をゲノムとしてもつ。ゲノム上にコードされる 130K およびそのリードスルー産物である 180K タンパク質はウイルス RNA の複製に必須である。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、脱液胞化タバコプロトプラスト抽出液 (BYL) を用いて TMV RNA を試験管内で翻訳し、複製させる系を確立した (引用文献 1)。これを用いて本研究開始時点までに以下の知見を得ていた。

(i) BYL から遠心により生体膜を除去して得た mdBYL で TMV RNA を翻訳すると、複製タンパク質が合成される。このとき 130K 複製タンパク質は、翻訳と共役してゲノム RNA の 5' 末端近傍の領域に結合し、非膜結合性複合体 (pre-membrane-targeting complex: PMTC) を形成する。このとき、約 70 ヌクレオチド領域がマイクロコッカルヌクレアーゼによる分解から保護される。

(ii) 130K タンパク質の MetIR 断片 (130K タンパク質からヘリカーゼドメインを欠失させた約 70 kDa の断片) は、翻訳とは独立して TMV RNA の 5' 末端近傍領域に結合する。このことから、完成した 130K タンパク質においてはヘリカーゼドメインが標的 RNA への結合を妨害していると考えられる。

(iii) PMTC を BYL 由来の生体膜と混ぜると RNA 複製が起きる。また、TMV RNA の 5' 非翻訳領域の配列をジャガイモ X ウイルス RNA の相当配列に置換すると、130K タンパク質の合成は正常に起きるが、130K タンパク質のゲノム RNA への結合とマイナス鎖 RNA 合成は大幅に低下する。これらのことから PMTC は複製複合体の前駆複合体と考

えられる。

(iv) PMTC に含まれる TMV RNA は、翻訳されにくい。TMV RNA は、翻訳 (リボソームが 5' 末端から移動) とマイナス鎖 RNA 合成 (RNA ポリメラーゼが 3' 末端から移動) という二つの相容れない反応の鋳型となる。このため、両反応が同一鋳型 RNA 分子上で同時に起きるとリボソームと RNA ポリメラーゼの衝突が起き、いずれの反応も破綻する。TMV はマイナス鎖 RNA 合成が始まる前に鋳型 RNA の翻訳を阻害してリボソームをゲノム RNA から除去し、このジレンマを解消していると考えられる (以上、引用文献 2 および 3 に発表)。

このように、PMTC 形成はウイルス複製の鍵となる重要な過程と考えられた。しかし、PMTC の分子的实际体や形成機構は明らかになっていなかった。

### <引用文献>

1. Komoda *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 1863-1867 (2004).
2. Komoda *et al.* J. Virol. 81: 2584-2591 (2007).
3. Kawamura-Nagaya *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 111: E1620-E1628 (2014).

## 2. 研究の目的

本研究では、TMV の複製タンパク質が、ゲノム RNA の 5' 末端近傍のどのような構造をどのように認識して PMTC を形成するのか、PMTC 形成はどのようにマイナス鎖 RNA 合成につながるのか、また、PMTC とはどのような分子的实际体をもつ複合体なのかを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

BYL あるいは mdBYL を用いた試験管内 TMV RNA 翻訳・複製系を利用した生化学的手法を用いた。

## 4. 研究成果

(1) PMTC の形成に必要な TMV RNA 上の配列の推定を試みた。MetIR 断片による PMTC 様複合体の形成に十分であることがわかっている「TMV RNA の 5' 末端から 100 ヌクレオチドの配列」の特徴を把握するため、当該配列をランダムに並べ替えた配列を *in silico* で 10000 個作成し、それぞれについて特定の 3 塩基の並びが何回現れるかを調べた。そして、その 3 塩基の並びが、元の TMV RNA の配列中で現れる回数以上に現れる確率  $p$  を算出した。この試行を、タバコモザイクウイルスと同属の異種ウイルスの 5' 末端配列についても行ったところ、実際の配列中の出現頻度がどのウイルスの配列においても配列

をランダムに並べ替えた場合に比して有意に高かった ( $p < 0.05$ ) のは「ACA」のみであった (TMV の場合 17 回出現)。4 塩基の配列について同様の試行を行ったところ、そのような配列は存在しなかった。このことから、PMTC の形成には「ACA」の 3 塩基のブロックが繰り返しあらわれることが重要であることが示唆された。この結果は、種々の欠失を導入した結合標的 RNA を用いた実験により限定された領域には特に密に ACA 配列が見いだされることと合致するものであった。

(2) mdBYL を用いて試験管内合成した MetIR 断片を TMV RNA の 5' 末端から 100 ヌクレオチドの配列をもつ RNA (TMV-5'-100 RNA) と混合し、ブルーネイティブポリアクリルアミドゲル電気泳動法により解析すると、TMV-5'-100 RNA を添加しなかったときにはみられなかった位置にバンドが検出された。その質量は約 1 MDa と見積もられ、異なる 2 種のタグを付した MetIR を用いた実験から、複合体は複数の MetIR 分子を含み、かつ安定である (一旦形成されると MetIR 分子の交換がほとんど起こらない) ことが示唆された。

(3) 5' 非翻訳領域の配列をジャガイモ X ウィルス RNA の相当配列に置換した TMV RNA は、BYL を用いた翻訳・複製系で非常に低い効率ながら検出可能なマイナス鎖 RNA を合成した (前述; 引用文献 2)。このことから、5' 非翻訳領域のマイナス鎖 RNA 合成への関与は示唆されたが、それがマイナス鎖 RNA 合成に必要なかは不明であった。そこで、5' 末端から 100 ヌクレオチドの領域 (非翻訳領域 68 ヌクレオチドを含む) を、ACA 配列を全く含まない人工配列に置換した TMV RNA 誘導体 (TMV-OMi4) を作製し (コードされる 130K タンパク質のアミノ酸配列は変わらない) 翻訳・複製反応を行ったところ、130K タンパク質は合成されたもののマイナス鎖 RNA の蓄積は全くみられなかった。このことから、マイナス鎖 RNA の合成が PMTC 形成に強く依存することが示された。

130K タンパク質の TMV RNA への結合部位が 5' 非翻訳領域に存在する生物学的意義のひとつは、マイナス鎖 RNA 合成 (RNA ポリメラーゼが 3' 末端側から移動する) に先立って翻訳を止め、TMV RNA 上のリボソーム (RNA 上を 5' 末端側から移動し、タンパク質を合成する) を排除することにあると我々は考えた。この可能性を検討するために、TMV-OMi4 の移行タンパク質コード領域 (複製タンパク質コード領域の 3' 末端側にあり、改変しても複製が損なわれない) に TMV RNA のヌクレオチド番号 1-150 の配列を挿入し、翻訳複製反応を行ったが、マイナス鎖 RNA の合成は (ゲノム RNA の 3' 末端近傍に対する短い RNA の合成さえも) みられなかった。また、PMTC 形成時にヌクレアーゼ

から保護される領域を重複させた TMV RNA 誘導体 (TMV-OMi2) を作製し、翻訳・複製反応を行ったが、マイナス鎖 RNA 合成はみられなかった。興味深いことに、TMV-OMi2 RNA を mdBYL を用いて翻訳した後ヌクレアーゼ処理したときに分解されずに残ったのは、主として野生型の TMV RNA を用いた実験で観察されたものと同じ約 70 ヌクレオチドの断片であった。各 TMV RNA 誘導体の複製がマイナス鎖 RNA 合成開始に至るどのような過程で破綻しているのかを解明するには至っていないが、これらの結果は複製タンパク質の結合配列はただ存在すれば複製における機能を発揮できるわけではないことを示している。

(4) PMTC に宿主因子が含まれる可能性を検討するため、FLAG タグを付した MetIR と結合標的配列を含む RNA を混合して複合体を形成させた後に抗 FLAG 抗体による精製を行った。精製画分には MetIR に加え、分子量約 10 万の宿主タンパク質が含まれ、これを LC-MS/MS 法により同定した。標的 RNA を添加しなかったとき、この宿主タンパク質は MetIR と共精製されなかった。この宿主タンパク質が TMV RNA の複製あるいは PMTC 形成に関与するかは不明のままであり、それを明らかにすることは今後の課題である。

アフィニティー精製した MetIR-PMTC が得られたので、その形状の解明を目指して、ネガティブ染色による透過型電子顕微鏡観察を行った。いくつかの特徴的な像が得られたが、その形態に関して確定的な情報を得るには至っていない。

(5) アフィニティー精製した MetIR と結合標的配列を含む RNA を混合しても複合体は形成されないが、そこに mdBYL を添加すると複合体が形成されることを見いだした。この結果は、PMTC 形成に宿主因子が必要であることを示唆するものである。

## 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 3 件)

1. Masayuki Ishikawa. (2017) Studies on the mechanism of tobacco mosaic virus RNA replication. *J. Gen. Plant Pathol.* 83 (6): 410-413. (DOI 10.1007/s10327-017-0741-8) (査読なし)
2. 石川雅之. (2017) タバコモザイクウイルスの複製機構に関する研究. *日本植物病理学会会報* 83(3): 120-123. (学会賞受賞者講演要旨) (査読なし)
3. Kazuhiro Ishibashi and Masayuki

Ishikawa. (2016) Replication of  
Tobamovirus RNA. Annu. Rev.  
Phytopathol. 54: 55-78 (DOI:  
10.1146/annurev-phyto-080615-100217)  
( 査読あり )

[ 学会発表 ] ( 計 1 件 )

石川雅之 .(2017) タバコモザイクウイルスの  
複製機構に関する研究 ( 学会賞受賞者講演 )  
平成 29 年度日本植物病理学会大会 . 平成 29  
年 5 月 26 日、盛岡

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

石川 雅之 ( ISHIKAWA, Masayuki )  
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合  
研究機構・生物機能利用研究部門 植物微  
生物機能ユニット・ユニット長  
研究者番号：70192482

### (2) 研究協力者

中条 哲也 ( CHUJO Tetsuya )  
宮下 脩平 ( MIYASHITA Shuhei )  
石橋 和大 ( ISHIBASHI Kazuhiro )  
行弘 文子 ( YUKUHIRO Fumiko )