

令和元年5月26日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15229

研究課題名(和文) ROSを介した植物ウイルスタンパク質の機能制御機構

研究課題名(英文) Analysis of the molecular mechanism by which ROS regulate the function of a plant virus protein

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ある種の植物ウイルスは、宿主植物の活性酸素種(ROS)産生機構を乗っ取り、感染に利用する。しかしながら、植物-ウイルス間相互作用におけるROSの分子メカニズムやその発生機構に関しては不明な点が多い。本研究では、red clover necrotic mosaic virusをモデルウイルスとして、ROSのうちスーパーオキシドアニオンが効率の良いウイルス複製に必要であることを明らかとした。ROS依存的なウイルスタンパク質の酸化修飾を期待したが、そのような翻訳後修飾の同定には至らなかった。一方で、新奇宿主因子RACK1の同定に成功し、ウイルス誘導性ROS産生に関する分子知見を深めることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物ウイルスは農作物等に感染し、世界規模で農業経済上甚大な被害を与える病原体である。しかしながら、現在のところ有効な植物ウイルス防除法は樹立されていない。植物ウイルス感染の成否は、宿主因子と呼ばれる様々な宿主細胞由来の分子をウイルスが利用できるかどうかにかかっている。従って、植物-ウイルス間相互作用を分子レベルで解き明かすことは、その感染戦略を逆手に取ったウイルス防除法の基盤確立に貢献する。本研究では、活性酸素種(ROS)に特に着目して、植物-ウイルス間相互作用におけるROSの分子メカニズムやその発生機構に関して研究を行なった。

研究成果の概要(英文)：Red clover necrotic mosaic virus (RCNMV), a plant positive-strand RNA [(+) RNA] virus, hijacks the host's reactive oxygen species (ROS)-generating machinery during infection. However, it remains largely unknown how ROS promote viral replication. Here, we found that RCNMV replication was sensitive to an O₂⁻ scavenger but insensitive to an H₂O₂ scavenger. To understand the molecular mechanism by which ROS regulate viral replication, we tried to identify post-translational modification, including protein oxidation, of viral replication protein induced by ROS. However, unfortunately, we could not identify such post-translational protein modification. We also provide evidence suggesting that RCNMV hijacks RACK1, a host scaffold protein, to facilitate ROS accumulation induced by a viral replication protein and viral RNA replication.

研究分野：植物ウイルス学

キーワード：植物ウイルス ROS RACK1 翻訳後修飾

1. 研究開始当初の背景

ウイルスはわずかな数の遺伝子しかコードしておらず、宿主因子と呼ばれる宿主細胞由来の様々なタンパク質、脂質、代謝物などをハイジャックし、感染に転用することで、効率のよいウイルス増殖を可能にする。従って、植物ウイルスの手の内を探りその感染戦略を分子レベルで理解するためには、ウイルスが利用する宿主因子の同定とその機能解析が必須となる。

研究代表者らはプロテオミクス解析を用いて、モデル植物の1つであるベンサミアナタバコから red clover necrotic mosaic virus 複製酵素複合体の構成因子 p27・p88 に結合する宿主因子候補を探索し、植物免疫反応時の活性酸素種 (ROS) 産生における鍵因子 NbRBOHB (Yoshioka et al., *Plant Cell*, 2003,15:706-718) やイネ免疫複合体の足場タンパク質 OsRACK1 (Nakashima et al., *Plant Cell*, 2008, 20:2265-2279) のオルソログ (NbRACK1) を同定した。ROS は植物が病原体の侵入に対して効果的な免疫応答を示す上で重要なシグナル分子である。しかしながら、興味深いことに、研究代表者らの研究から、NbRBOHB 本来の機能から予測される結果 (抵抗性因子として、ウイルス感染を阻害する) とは逆に、RCNMV が NbRBOHB を活性化することで積極的に ROS を発生させウイルス増殖に利用する (ROS がないと感染できない) ことが明らかとなり、「植物免疫機構の転用によるウイルス感染戦略」の存在が浮かび上がってきた (Hyodo et al., *PNAS*, 2017, 114:E1282-E1290)。

しかしながら、ウイルス感染植物において見られる ROS の発生メカニズムや特にその下流 (ROS の分子標的・作用機作など) に関しては不明な点が多く残されており、その解明が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者らの研究から浮かび上がってきた、植物-ウイルス間相互作用における ROS の分子メカニズムの解明を目的とする。本目的を達成するために、植物プラス鎖 RNA ウイルスの一種である red clover necrotic mosaic virus (以下、RCNMV) をモデルウイルスとして計画を進める。

3. 研究の方法

まず、ウイルス複製に関わる ROS の種類を特定するために、分子種特異的 ROS scavenger が一細胞レベルでの RCNMV 増殖に及ぼす影響を解析した。次に、質量分析解析によって、RBOH 由来 ROS によって制御されるウイルスタンパク質の翻訳後修飾の決定を試みた。1 アミノ酸置換ウイルスタンパク質変異体を作成し、同定された翻訳後修飾のウイルス複製における機能を解析した。さらに、RCNMV 感染植物における ROS 産生メカニズムに迫るため、RCNMV 複製酵素複合体の構成因子 p27・p88 に結合する宿主タンパク質 NbRACK1 の機能解析を行なった。

4. 研究成果

(1) 植物ウイルス増殖に関わる ROS 分子種の同定

ROS は細胞内レドックス状態の変化や、タンパク質・脂質といった様々な生体分子の酸化修飾に関わることが知られている (Møller et al., *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2007, 58:459-481)。RCNMV は小胞体膜を複製の場とすることから、RBOH 由来 ROS が宿主オルガネラ膜に作用し、ウイルス複製に影響を与える可能性が考えられた。しかしながら、過酸化脂質の scavenger である α -トコフェロールは RCNMV 増殖に影響を与えない一方で、水溶性 ROS の scavenger であるアスコルビン酸は RCNMV 増殖を量依存的に抑制した。このことから、ROS がウイルス増殖の場であるオルガネラ膜への作用を介してウイルス増殖に貢献する可能性は低いと考えられた。RBOH によって産生されたスーパーオキシドアニオンは SOD (スーパーオキシドディスムターゼ) によって過酸化水素に変換されることが知られている。これら ROS のうち、どちらが RCNMV 増殖に必要なかを調べるため、特異的 scavenger を用いて解析を行なったところ、スーパーオキシドアニオンが RCNMV 増殖に必要なことが明らかとなった (図 1)。一方で興味深いことに、RCNMV と同様

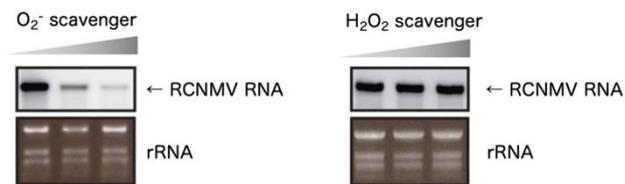


図 1. ROS scavenger の一細胞レベルでの RCNMV 増殖への影響。ベンサミアナプロトプラストに RCNMV RNA を接種後、ROS scavenger を処理し、16 時間後のウイルス増殖をノーザンブロットによって解析した。
 O_2^- : スーパーオキシドアニオン
 H_2O_2 : 過酸化水素

RBOH 由来 ROS を増殖に必要とするプロモモザイクウイルス (BMV) の増殖はスーパーオキシドアニオン, 過酸化水素の双方に依存した。これらの結果は, 植物ウイルスの種類によって, 増殖に必要とする ROS の分子種が異なることを示唆している。

(2) RCNMV 複製酵素タンパク質の翻訳後修飾解析

翻訳後修飾は細胞内局在, タンパク質間相互作用, 酵素活性など, タンパク質の様々な機能を正あるいは負に制御することが知られている (Jensen, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2006, 7:391-403)。上述したように, ROS はタンパク質の酸化修飾を行い, タンパク質の機能に影響することが知られている。興味深いことに, RBOH 活性阻害剤 DPI 処理により, RCNMV の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ p88 のバンドシフトが見られ (図 2, 100 kDa 近傍のバンド), RBOH 活性依存的な p88 の翻訳後修飾制御機構の存在が示唆される。RBOH 由来 ROS 依存的な RCNMV 複製酵素タンパク質の翻訳後修飾を調べるために, RBOH 阻害剤あるいはスーパーオキシドアニオン除去剤存在下において, ベンサミアナプロトプラストからウイルス複製酵素タンパク質をアフィニティー精製し, 質量分析解析によって翻訳後修飾の同定を試みたが, ROS 特異的な翻訳後修飾の同定には至らなかった。しかしながら, RCNMV 複製酵素タンパク質は宿主細胞中で種々の翻訳後修飾 (メチル化, ユビキチン化, アセチル化など) を受けていることを明らかにすることができた。さらに, 1 アミノ酸置換ウイルス複製酵素タンパク質変異体の機能解析から, これら翻訳後修飾のウイルス増殖における意義を明らかにすることができた。今後, さらに詳細な解析を行い, 原著論文として報告を目指す。

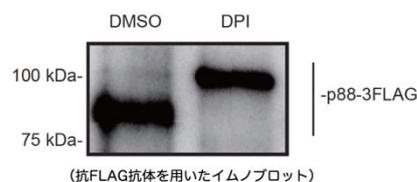


図2. RBOH活性阻害剤 (DPI) によるp88のバンドシフト。
DMSO: コントロール。

(3) 宿主足場タンパク質 RACK1 の機能解析

RCNMV はウイルス複製酵素タンパク質 p27 を介して ROS 産生を誘導する。また, この p27 誘導性 ROS 産生には宿主の ROS 産生酵素 RBOHB とカルシウム依存性タンパク質キナーゼ CDPKiso2 が必要である (Hyodo et al., *PNAS*, 2017, 114:E1282-E1290)。CDPKiso2 は RBOHB をリン酸化し活性化する性質を持つ。RCNMV 感染植物における ROS 産生機構に関する知見をさらに深めるため, RCNMV 複製酵素複合体の構成因子 p27・p88 に結合する宿主タンパク質 RACK1 (receptor for activated C kinase 1) の機能解析を行なった。共免疫沈降法および共焦点顕微鏡を用いた局在解析から, RACK1 は p27 と相互作用し小胞体凝集体 (ウイルス複製の場) へとリクルートされることが明らかとなった。さらに, RACK1 は CDPKiso2 とも相互作用し, p27-CDPKiso2 間の相互作用に必要であることが明らかとなった。加えて, virus-induced gene silencing (VIGS) 法によって RACK1 をノックダウンした植物においては p27 誘導性 ROS 産生の著しい低下と RCNMV 複製の顕著な減少が認められた。以上のことから, RACK1 はウイルスタンパク質 p27 と宿主因子 CDPKiso2 を橋渡すアダプター分子として機能し, ROS を介したウイルス複製において重要な役割を果たすことが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

- (1) **Hyodo K**, Suzuki N, Okuno T. (2019) Hijacking a host scaffold protein, RACK1, for replication of a plant RNA virus. *New Phytol.* 221:935-945. (査読有り)
DOI:10.1111/nph.15412
- (2) Kato Y, **Hyodo K**, Sakamoto W. (2018) The Photosystem II Repair Cycle Requires FtsH Turnover through the EngA GTPase. *Plant Physiol.* 178:596-611. (査読有り)
DOI:10.1104/pp.18.00652
- (3) Shinya T, Yasuda S, **Hyodo K**, Tani R, Hojo Y, Fujiwara Y, Hiruma K, Ishizaki T, Fujita Y, Saijo Y, Galis I. (2018) Integration of danger peptide signals with herbivore-associated molecular pattern signaling amplifies anti-herbivore defense responses in rice. *Plant J.* 94:626-637. (査読有り)
DOI: 10.1111/tpj.13883
- (4) **兵頭究** (2018) 植物ウイルス感染がパターン誘導性免疫に及ぼす影響 植物感染生理談話会論文集第 53 号 (ISSN:1345-8086) pp132-138. (査読無し)
- (5) **兵頭究** (2018) 植物 RNA ウイルスの複製機構 植物ウイルス病研究会レポート第 13 号

(ISSN:0919-2956) pp77-82. (査読無し)

- (6) **Hyodo K.**, Nagai H., 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. (査読有り)
DOI: 10.1016/j.virol.2017.09.008
- (7) Tajima Y, Iwakawa HO, **Hyodo K.**, Kaido M, Mise K, 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. (査読有り)
DOI: 10.1016/j.virol.2017.06.015
- (8) **Hyodo K.**, Suzuki N., Mise K., Okuno T. (2017) Roles of superoxide anion and hydrogen peroxide during replication of two unrelated plant RNA viruses in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Signaling & Behavior* 6:e1338223. (査読有り)
DOI: 10.1080/15592324.2017.1338223

〔学会発表〕(計 10 件)

- (1) 兵頭 究・鈴木信弘 「植物ウイルス感染の抗糸状菌免疫への影響」平成 31 年度日本植物病理学会大会、つくば国際会議場 (2019 年 3 月 18 日～2019 年 3 月 20 日)
- (2) **Hyodo K.** 「A role of reactive oxygen species during the replication of a plant virus」International Neovirology Mini-Symposium series IV, IPSR, Okayama University (2019 年 2 月 1 日)
- (3) 新屋友規・藤原由佳・兵頭 究・吉見圭永・原克弥・円谷陽一・小竹敬久・Galits Ivan 「イネの植食性昆虫認識に関わる細胞壁由来エリシターの解析」第 60 回日本植物生理学会年会、名古屋大学東山キャンパス、(2019 年 3 月 13 日～2019 年 3 月 15 日)
- (4) **Hyodo K.** 「Hijacking a host ROS-generating machinery by a plant RNA virus for its replication」International Neovirology Mini-Symposium series III, IPSR, Okayama University (2018 年 10 月 26 日～2018 年 10 月 27 日)
- (5) 兵頭 究・鈴木 信弘・奥野 哲郎 「宿主足場タンパク質 RACK1 のハイジャックによる植物ウイルス増殖戦略」平成 30 年度日本植物病理学会関西西部会、山口大学吉田キャンパス(2018 年 9 月 27 日～2018 年 9 月 28 日)
- (6) 兵頭 究 「植物ウイルス感染がパターン誘導性免疫に及ぼす影響」第 53 回植物感染生理談話会、高知大学 (2018 年 8 月 21 日～2018 年 8 月 23 日)
- (7) 兵頭 究 「植物 RNA ウイルスの複製機構」第 13 回植物ウイルス病研究会、神戸大学滝川記念学術交流会館 (2018 年 3 月 28 日)
- (8) 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」平成 30 年度日本植物病理学会大会、神戸国際会議場 (2018 年 3 月 25 日～2018 年 3 月 27 日)
- (9) 加藤裕介、兵頭 究、坂本 亘 「光化学系 II 修復サイクルでの FtsH プロテアーゼ自身の品質管理の重要性」第 59 回日本植物生理学会年会、札幌コンベンションセンター (2018 年 3 月 28 日～30 日)
- (10) **Hyodo K.**, Suzuki N., Okuno T. 「A role of reactive oxygen species during the replication of a plant RNA virus」17th International Congress of Virology, Sands Expo & Convention Centre, Marina Bay Sands, Singapore (2017 年 7 月 17 日～2017 年 7 月 21 日)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

岡山大学資源植物科学研究所 植物・微生物相互作用グループ ホームページ
<http://www.rib.okayama-u.ac.jp/pmi/index-j.html>

6．研究組織

該当無し

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。