

平成 21 年 4 月 8 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19580048

研究課題名（和文）植物マイナス鎖RNAウイルスのゲノム輸送機構に関する研究

研究課題名（英文）Genome transport mechanisms of plant negative-stranded RNA virus

研究代表者

近藤 秀樹（KONDO HIDEKI）

岡山大学・資源生物科学研究所・助教

研究者番号：40263628

研究成果の概要：植物のマイナス鎖RNAウイルスであるOFVをモデルとし、ゲノム輸送に関わると考えられるウイルス因子を解析した。特にウイルスの移行形態とされるvRNP複合体を精製し、構成ウイルス蛋白質を明らかにした。そのうち、ゲノム結合タンパク質であるNの細胞核（複製の場と推定）への輸送にはアクセサリ蛋白質であるPが必要であることを発見した。また、モデル植物における細胞間移行や長距離移行に関する一連の研究も行った。これらの成果は、OFVのゲノム移行輸送機構を理解する上で基礎的な知見となると期待される。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：植物病理学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：ランエそ斑紋ウイルス、ラブドウイルス、ゲノム輸送、RNP、ヌクレオキャプシド蛋白質、核移行、RNA結合、マイナス鎖RNAウイルス

1. 研究開始当初の背景

マイナス（-）鎖RNAウイルスはインフルエンザウイルスやエボラウイルスなど人や家畜の重要な病原体として知られている。植物でも植物ラブドウイルス、トスポウイルスやテヌイウイルスに代表され多くのウイルスが発生し農業上問題となっている。これらの植物

一鎖RNAウイルスは、動物のラブドウイルスやブンヤウイルスとゲノムの基本構造や遺伝子発現様式が類似し、複製機構や粒子形成についても類似性を示す。一方で、宿主植物では細胞間移行や全身移行という動物ウイルスとは全く異なるプロセスが必要とされるが、ウイルスの感染から発病にいたる過程はほとん

ど解明されていない。

申請者は、ラン科植物に発生する重要病害であるランえそ斑紋ウイルス(OFV)の病原学的研究を進めており、2分節ゲノムのユニークなラブドウイルスであることを発見した(Kondo et al., 2003, 2006)。このウイルスは汁液接種が可能で、精製が容易で、ゲノム構造の解析も進んでいる。そこで、このOFVをモデルとして、一鎖RNAウイルスが植物体内でどのように移行するかを、ゲノムの輸送機構という側面から解析する研究を立案した。

2. 研究の目的

一鎖RNAウイルスはプラス鎖RNAウイルスと異なり、そのゲノムはmRNA活性を持たない。このため、ゲノムRNAはヌクレオキャプシド蛋白質Nや複製酵素蛋白質L(RdRp)などとウイルスRNA-蛋白質複合体(vRNP)という複製ユニットを形成するとされている。一鎖RNAウイルスのゲノムが植物内を移行する場合、このvRNP複合体やそれを含む粒子が移動すると考えられるが、その実態はよくわかっていない。そこで、本研究では以下の研究課題を推進した。

- (1) vRNPの精製法の確立とvRNPの分子解剖を進める。vRNPの形成に必要なゲノムRNAとウイルス蛋白質、あるいはウイルス蛋白質間の相互作用を解析する。
- (2) ゲノムの核内移行へvRNPを構成する複数のウイルス蛋白質がどのように関与するか理解するために、細胞内での存在様式を観察する。
- (3) 細胞間移行蛋白質(MP)の同定と、MPとウイルス蛋白質間の相互作用を理解する。
- (4) ウイルスあるいはvRNPの全身移行の様式を明らかにし、OFVの長距離移行様式を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究ではウイルスゲノムの移行に関わる

と期待されるvRNPの解析と、構成ウイルス蛋白質の細胞核への局在様式や細胞間移行への関与、ウイルスの長距離移行に関する、以下のような研究を行った。

(1) vRNP複合体の同定と分子解剖

感染植物やウイルス粒子よりvRNP複合体を精製し、電気泳動とウエスタンブロット解析によりその構成蛋白質を明らかにする。また、大腸菌による蛋白質発現系を用いて、ウイルス蛋白質のRNA結合能を調べる。さらに、酵母Two-Hybrid法によりウイルス蛋白質間の相互作用を調べる。

(2) vRNP構成蛋白質の核輸送様式

vRNP構成蛋白質と蛍光蛋白質タグ(GFP, dsRED)を連結させバイナリーベクターから発現することでその核局在性を調べた。核局在性を示す場合は、その核局在シグナルNLSを同定するため変異体を作製して解析した。

(3) 細胞間移行蛋白質の同定と機能解析

OFVの精製ウイルスに含まれない非構造蛋白質を同定するとともに、その細胞内局在性を明らかにする。さらに、細胞間移行できない変異型*Potato virus X*(PVX-ΔP25)を用い、このPVX-ΔP25の細胞間移行の機能をOFV蛋白質が補完できるかを検討した。

(4) ウイルスの全身移行と異種ウイルスによるシナジー効果

*N. benthamiana*でOFVが全身感染に至る過程を観察する。さらに*Potato virus Y*(PVY)との混合感染実験によるOFVの移行や蓄積への影響を調べる。

(5) 人工ミニゲノムの構築

OFV RNA1をベースにGFP転写ユニットをもつ人工ミニゲノムコンストラクトを構築した。RNA1のゲノム末端に位置するleader領域とtrailer領域の間に、GFP転写ユニット(5'-UTRはN遺伝子、3'-UTRはG遺伝子由来)連結し、pBinバイナリーベクターの35Sプロモータ

一とNosターミネーターの間に挿入した。転写領域の両末端にはリボザイム配列を付加し、転写後に不要な配列を切断できるようにデザインした。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

①OFV粒子とvRNPの構成蛋白質の解析

OFV粒子の構造蛋白質を同定したところ、少なくともN, P(推定複製酵素コファクター), M(マトリックス蛋白質), Lの4種の構造蛋白質からなり、RNP-Mコアと呼ばれるラブドウイルスの粒子内構造と類似していた(Kondo et al., 2009)。しかし、粒子は小型で被膜(エンベロープ)やG(スパイク)蛋白質ももたず、また塩や界面活性剤に対して比較的安定な性質を示す点でラブドウイルスとは大きく異なっていた(Kondo et al., 2009)。精製vRNPはひも状で、N, P, L蛋白質が検出されたが、M蛋白質はほとんど認められなかった。このことから、MはvRNPの巻き上げに(形態形成)に関与すると推測された。

②N蛋白質-RNA複合体の解析

N蛋白質はゲノム結合蛋白質として、ヌクレオキャプシドの主要骨格を構成すると考えられている。ウイルス粒子を塩化セシウム平衡密度勾配遠心することにより、ひも状のN-vRNA複合体が精製されたことから、OFVのN蛋白質はゲノムRNAに強固に結合していると推定された(Kondo et al., 2009)。さらに、N蛋白質を大腸菌で発現すると、その精製試料には大腸菌由来と推定される低分子のRNAが結合していた。この発現N蛋白質試料を透過型電子顕微鏡で観察したところ、非常に小さなリング構造が多数観察された。一方、他の構造蛋白質(P, M)にはNのようなRNAとの結合は認められなかった。今後、このRNA結合能の特異性について調べるとともに、NのRNA結合ド

メインを明らかにする予定である。また後述の推定細胞間移行蛋白質(ORF3)とN蛋白質間の相互作用の有無についても検討中である。

③vRNP構成蛋白質の細胞核への移行様式

OFVは細胞核が複製・形態形成の場であると推定されている(Kitajima et al., 2001)。OFVゲノムがその核内へ輸送されるためには、vRNPが宿主の蛋白質輸送機構を利用して核へと移行する必要がある。そこで、vRNPの主要構成要素であるN蛋白質の細胞内分布様式を調べたところ、蛍光蛋白質(GFP, DsRed)をタグしたN融合蛋白質は細胞全体に分布し、核への局在性を示さなかった。一方、vRNPのマイナー成分であるP蛋白質はSV40-T抗原と類似した核移行シグナルを持ち、その蛍光蛋白質融合蛋白質は核局在性を示した。このP蛋白質はN蛋白質とともに発現させると、Nは核に局在化した。また、P蛋白質はN蛋白質と酵母Two-hybrid法で相互作用することが確認された。さらに、大腸菌で発現・形成させたN-RNA複合体にP蛋白質が結合できることも示された。以上から、N-vRNA複合体に核移行能を持つP蛋白質が結合することで、細胞核へのゲノム輸送が行われると推測された。

④推定細胞間移行蛋白質ORF3の解析

ORF3は植物ラブドウイルスゲノムの細胞間移行蛋白質と同じ位置にコードされていることから、細胞間移行に関わる蛋白質であると推測される。そこで、大腸菌で発現したORF3(38K)の翻訳産物に対する抗体を作製し、ウイルス感染組織からの検出を可能とした。この蛋白質はウイルス粒子に含まれず、非構造蛋白質であることが判明した。次に、pGR106ベクターを改変して細胞間移行ができない変異型PVX-GFP(Δ P25)を作製した。この変異ウイルスとORF3蛋白質を用いて*N. benthamiana*葉肉細胞で同時に発現させた。その結果、変異型PVXのGFP蛍光は単一細胞に

止まり、コントロールで発現させた野生型P25の場合と大きく異なった。さらに、他の構造蛋白質も検討したがORF3と同様の結果であった。OFVはツルナなどの接種葉での病斑形成が通常のウイルスと比べ遅い(2-3週間必要)。これは、細胞間移行に関わるORF3のOFV移行を促進する能力が低い為ではないかと推測している。今後、ORF3の形質発現植物を作製し、細胞間移行に対するORF3の影響をより詳細に解析する予定である。

⑤ウイルスの全身移行と異種ウイルスによるシナジー効果

OFVは精製ウイルス粒子を用いた場合に *N. benthamiana* に感染し、全身へと移行した。地上部では、ウイルスは茎頂部の新たな展開葉には検出されず、2-3葉下位の展開葉に検出された。OFVの病徴は主に葉脈部の黄化が認められた。プレスプロット法で調べるとウイルスのシグナルは発病部に多く検出された。一方、地下部では根全体にウイルスが蓄積していた。次に、OFV感染個体にPVYを接種し、混合感染によるOFVの影響を調べた。その結果、PVYとの混合感染によりOFVは茎頂部の展開葉にまでウイルスが移行し、葉全体にウイルスの蓄積が確認された。一方、地下部では混合感染でもウイルスの蓄積量に大きな変化は認められなかった。この結果から *N. benthamiana* におけるOFVの全身移行をPVYが補ったと推測される。根へのウイルスの移行は影響が無いことから、茎頂部では宿主のRNAサイレンシングが葉肉細胞へのウイルスの移行を抑制していると考えられる。そこで、移行蛋白質やサイレンシングサプレッサーを発現する植物個体を用いた接種実験も検討する必要がある。

⑥ミニゲノム実験系の構築

本研究では、GFP転写ユニットをもつ人工ミニゲノム発現バイナリーベクターコンストラクトを構築した。さらに、ゲノムの複製、転

写に関わると推定されるvRNP構成要素N, P, L蛋白質のORFをバイナリーベクターにそれぞれ組み込んだコンストラクトを作製した。これを用いたミニゲノム転写物が発現するかを検討したが、今のところ成功していない。その原因は不明であるが、複製に関わるL(RdRp)の発現が確認されていないことから、新たにL遺伝子の組換え植物を調整し、再度検討する予定である。

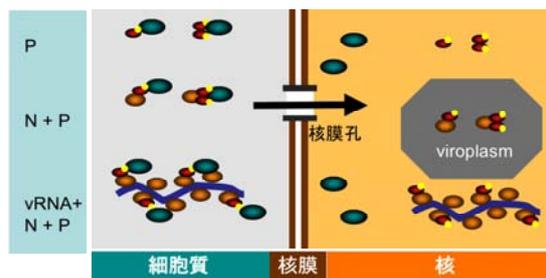


図 1.ウイルス蛋白質ならびにウイルスゲノムの核輸送モデル。

上段：P (赤色)はNLSを持ち Importin α (水色)と相互作用し核へ局在。中段：Nは単独では核局在性を示さず、Pと相互作用し核へ移行。下段：Nはゲノムに結合することから、N-vRNAがPと複合体を形成し核へ輸送されると推測される。NとPの同時発現で細胞核内にバイロプラズム様の構造を形成する。

(2)得られた成果の位置づけとインパクト

本研究は、OFVのゲノム輸送機構という広範な現象を解明しようとする課題であり、複製装置と考えられるvRNPが、ゲノム輸送という非常に動的な役割を担っていることを理解するきっかけになると期待される。

① OFVは分節型のマイナス鎖RNAウイルスであるが、モノネガウイルス(非分節)のラブドウイルスに類似性を持つこれまでにないタイプのウイルスである。今回、OFV粒子の構成がラブドウイルスの粒子内部成分であるRNP-M複合体と類似した構造であり、その構成もよく似ていることを示した。さらに、精製されたvRNPもラブドウイルスものと類

似することが明らかになった。このことから、OFVはゲノム構造だけでなく、粒子の基本構造や構成もよく類似していることが判明した。

- ② 最近、動物ラブドウイルスやインフルエンザウイルスにおけるN(NC)蛋白質とRNAの非特異的な結合の様式が解明され、SCIENCE誌等に相次いで報告された。本研究でも、NとRNAの非特異的な結合が推測されたことから、今後植物ウイルスのN-RNA結合様式を解析する新しいモデルになると考えられる。
- ③ 細胞内でのゲノム輸送については、植物ラブドウイルス(SYNV)や動物のインフルエンザ、ボルナウイルスの場合は、核への局在能を持つN(NC)が重要であると推測されている。一方、OFVの場合は、N単独では核に局在できず、P蛋白質が必要である。このことから、OFVのゲノムの核内輸送にはNのみならずアクセサリ蛋白質(P)が必要であると考えられた。これは、OFVと前述のウイルスの核へのゲノム輸送戦略に違いがあると推測される。
- ④ 植物ウイルスの維管束系を介した全身移行には、RNAサイレンシングが抑制的に働いている例が示されている。OFVの場合、*N. benthamiana*の茎頂部でウイルスの蓄積はほとんど無く、ウイルスの茎頂部の葉肉細胞への移行には宿主のサイレンシングが抑制的に影響していると推察される。そこで、このOFVの実験系を用いることにより、ウイルスゲノムの長距離輸送にサイレンシングがどの様に影響するかを解析できる可能性が示された。

(3) 今後の展望

本研究では、OFVのvRNPの分子解剖やその構成要素の核への移行を解明できた。しかし、ゲノムの輸送がvRNPの形で行われている直接

的な証明はない。そこで、今後はvRNPがゲノムの輸送形態であることを証明する必要がある。残念ながら、現状では植物のマイナス鎖RNAウイルスでは逆遺伝学は未だ確立されていないことから、ゲノム輸送を研究できる有効な実験系の確立が急務である。将来、OFVの感染性cDNAクローン化が確立すればウイルスゲノム輸送機構に関わるウイルス因子の解析やゲノム複合体vRNPの動態などの解析が飛躍的に展開できると期待される。

ところで、我々はOFV蛋白質の細胞内局在性を調べる過程で、複数のウイルス蛋白質が関与する現象を解析するために、「バイナリーベクターによる一過的な遺伝子発現系」が非常に有効であることを見出した。これにより、「ヌクレオキャプシド蛋白質Nと核局在性蛋白質Pがウイルス工場であるパイロプラズムVpに類似した構造を形成する」ことを発見するに至った(未発表)。さらに、「N、P、マトリックス蛋白質Mがウイルス様粒子の形態形成に必要である」ことをはじめて証明した(未発表)。

そこで、本研究から展開した新知見をもとに、今後はOFVが誘導する核内Vpの形成機構を解明し、Vpが担う役割(粒子形成・ゲノム複製等)について検証する予定である。さらに、Vpの構築に関与する宿主因子や、宿主側にVp誘導がどのような影響しているかを解析することで、植物-鎖RNAウイルスが誘導するVpのウイルス感染戦略上の役割と宿主側の関わりを理解できると期待される。

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5件)

- ① Kondo, H., Maeda, T. and Tamada, T. Identification and characterization of structural proteins of orchid fleck virus.

Archives of Virology, 154: 37-45, 2009 (査読有り)

②近藤秀樹・前田孚憲・野田瑞紀・鈴木信弘・玉田哲男. ランエそ斑紋ウイルスのダニ伝搬様式, 分子系統および診断技術に関する研究. 名古屋国際ラン会議2009記録: 8-13, 2009 NIOC 奨励賞 (査読無し)

③ 近藤秀樹・前田孚憲・玉田哲男. 分節型ラブド様ウイルス、ランエそ斑紋ウイルスの分子生物学的および分子系統学的解析. 植物ウイルス研究会レポート9:27-35, 2008 (査読無し)

④ Chiba S, Miyanishi M, Andika IB, Kondo H, Tamada T. Identification of amino acids of the beet necrotic yellow vein virus p25 protein required for induction of the resistance response in leaves of *Beta vulgaris* plants. Journal of General Virology 89:1314-1323, 2008 (査読有り)

⑤ Rahim, M. D. Andika, I. B. Han, C. Kondo H. and Tamada T. RNA4-encoded p31 of beet necrotic yellow vein virus is involved in efficient vector transmission, symptom severity and silencing suppression in roots. Journal of General Virology 88: 2413-2419, 2007 (査読有り)

〔学会発表〕(計5件)

①近藤秀樹・野田瑞紀・広田恵介・前田孚憲・玉田哲男・鈴木信弘 徳島県のシンビジウムから分離されたランエそ斑紋ウイルス(OFV)の塩基配列の解析. 日本植物病理学会 平成21年度大会(山形) 2009年3月26日

②近藤秀樹・野田瑞紀・前田孚憲・玉田哲男・鈴木信弘. ランエそ斑紋ウイルス(OFV)のヌクレオキャプシドタンパク質遺伝子(N)を用いた分子系統解析. 日本植物病理学会 平成20年度関西西部会(和歌山) 2008年9月18日

③近藤秀樹・廣門沙知・玉田哲男・鈴木信弘.

ランエそ斑紋ウイルスの構造タンパク質が誘導する核内 viroplasm 様領域と粒子形成との関連性. 第56回ウイルス学会(岡山) 2008年10月27日

④ 近藤秀樹・野田瑞紀・玉田哲男・鈴木信弘. ランエそ斑紋ウイルス(OFV)様粒子の核内での形態形成と Viroplasm 様構造の関連性. 日本植物病理学会 平成20年度大会(島根) 2008年4月26日

⑤近藤秀樹・玉田哲男・鈴木信弘. 2007. ランエそ斑紋ウイルス構造タンパク質Mの病原性はヌクレオキャプシドタンパク質Nにより抑制される. 日本植物病理学会 平成19年度関西西部会(岐阜) 2007年10月6日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 秀樹 (KONDO HIDEKI)

岡山大学・資源生物科学研究所・助教

研究者番号: 40263628

(2) 研究分担者

鈴木 信弘 (SUZUKI NOBUHIRO)

岡山大学・資源生物科学研究所・教授

研究者番号: 70206514

(3) 連携研究者