

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010年度～2012年度

課題番号：22580047

研究課題名（和文）ダイアンソウウイルスの細胞間移行とゲノム複製機構との関連性の解明

研究課題名（英文）Studies on the relevance of cell-to-cell movement and replication mechanisms of Dianthovirus

研究代表者

海道 真典 (KAIDOU MASANORI)

京都大学大学院・農学研究科・助教

研究者番号：20314247

研究成果の概要（和文）：申請者は RNA ウイルスである *Red clover necrotic mosaic virus* (RCNMV) の移行タンパク質 (MP) と結合する宿主因子タンパク質を、免疫沈降法と質量分析によってタバコ (*Nicotiana benthamiana*) 植物から多数同定した。これらのうち *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH-A)* 遺伝子の全長 cDNA をクローニングし、*GAPDH-A* 遺伝子が RCNMV の細胞間移行過程に関与する宿主因子であることを明らかにした。さらに、*GAPDH-A* タンパク質の細胞内局在性の詳細な調査結果等から、*GAPDH-A* は MP と複製酵素との共局在性を正に制御する因子であり、この働きによってウイルスの効率的な細胞間移行が行われることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Using tandem affinity purification and mass spectrometry, a lot of host factor candidates that interact with the movement protein (MP) of *Red clover necrotic mosaic virus* (RCNMV) were identified from *Nicotiana benthamiana* plants. Among these, full-length cDNA of *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH-A)* was cloned. *GAPDH-A* was shown to be the host factor that is involved in the cell-to-cell movement of RCNMV. From the detailed study of *GAPDH-A* intracellular localization, I have revealed that *GAPDH-A* positively regulates the colocalization of the MP and the replication complex to support efficient cell-to-cell movement of the virus.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
平成 23 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
平成 24 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：植物病理学

キーワード：植物ウイルス・細胞間移行・複製酵素複合体・小胞体膜・宿主因子

1. 研究開始当初の背景

植物ウイルスの増殖戦略について、遺伝子発現機構の解析や、一細胞レベルでの複製機構の解明や関連宿主因子遺伝子の働きについて近年研究が進んでいる。また植物ウイルスの移行戦略については、MP の局在

性や、関連宿主因子の探索とその機能解析が幾つかのウイルスで行われている。しかし一方で、複製過程と移行過程がどのような関係にあるのか、複製されたウイルスゲノムがどのような過程を経て MP へと橋渡しされるのかについての知見は得られていなかった。

本研究の申請段階で、申請者は一過的に発現させた *Red clover necrotic mosaic virus* (RCNMV) の MP が、RCNMV RNA1 が複製される条件下でのみ小胞体膜にリクルートされて複製酵素と共局在する性質があることを報告していた。これは MP をコードしない RNA1 を MP が捕捉するために必要な過程ではないかと考えられた。さらに、MP の欠失変異体の解析から、MP の C 末端 70 アミノ酸領域が RCNMV 複製酵素との共局在性と細胞間移行の両方にとって重要であるという結果を得ていた。MP が複製酵素と共局在するという結果はこれまで3種類のウイルスで報告されていたが、複製、しかも2分節ゲノムのうち RNA1 の複製に特異的な形で MP が複製酵素にリクルートされるというような報告はこれが初めてであり、その後も報告されていない。

2. 研究の目的

RCNMV は二分節型ゲノム構造をとる(+)鎖 RNA ウイルスである。申請者らはこれまで、RCNMV の翻訳・複製機構を詳細に解析し、これに関与する宿主因子遺伝子の同定とその機能解析を行ってきた。この過程で、他に類例のないサイレンシング抑制機構も明らかになった。RCNMV の移行メカニズムについては、MP-GFP 融合タンパク質の細胞内局在の詳細な解析を行い、上述のような複製酵素複合体と共局在性を明らかにし、これに必要な配列が MP の C 末端 70 アミノ酸領域に存在することと、細胞間移行機能にとって必須であることを明らかにしてきた。

本研究の目的は、この複製酵素と MP との複合体のウイルス感染における意義について明らかにすることであり、これが複製過程と移行過程の橋渡しをするための複合体であることを明らかにすることである。そのためにも、C 末端 70 アミノ酸欠失型変異 MP (MPdC70) の機能解析を行った。さらに複製酵素複合体と MP との間を橋渡しする宿主植物タンパク質を同定し、このタンパク質のウイルス移行における働きについて解析した。

3. 研究の方法

(1) RCNMV MP と MPdC70 のプラズモデスマータ開閉能力の検定には、particle bombardment 法を用いた。ベンサミアナの若葉に particle gun を用いて GFP と MP 遺伝子を発現するプラスミドを混合して打ち込み、GFP 蛍光を蛍光顕微鏡観察した。

MP と MPdC70 の RNA 結合能は、大腸菌で発現させニッケルカラムで精製したタンパク質を、RI ラベルした RNA と培養し、ゲルシフトアッセイによって調べた

MP および MPdC70 同士の相互作用の検

出のために、HA および myc でタグリングしたタンパク質を、アグロバクテリウムを介した一過的発現システムによってベンサミアナ植物に注入・発現させ(以下アグロ注入法とする)、免疫沈降とウェスタン解析によって共免疫沈降タンパク質検出した。

(2) MP と相互作用する宿主植物因子の探索には、MP の C 末端に FLAG-3C protease 認識配列-HA というタグ配列をタンデムに配した組み換えウイルスを作製し、アグロ注入法でベンサミアナ植物に大量に発現させた。この葉から可溶性タンパク質画分を精製し、抗 HA 抗体による免疫沈降を行い、次にプロテアーゼ処理を行い、さらに抗 FLAG 抗体による免疫沈降操作を行い、MP を含む画分を高度に精製し、SDS-PAGE、銀染色の後、バンドを切り出し、ゲル内トリブシン消化を行い、質量分析機にかけてタンパク質を同定した。対照区はタグ配列を持たない野生型 RCNMV を注入した葉を同様に処理した。

同定された遺伝子のうち、*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH-A)* 遺伝子の部分配列を *Nicotiana tabacum* の同遺伝子の配列に基づいて増幅し、全長 cDNA 配列は RACE 法によって決定した。

MP と GAPDH-A の *in vivo* および *in vitro* での結合は免疫沈降法で確認した。

サイレンシング誘導のためのリンゴ潜在球形ウイルス (ALSV) ベクターは pBI 系バイナリーベクターに挿入し、アグロバクテリウムを介した爪楊枝接種法で接種した。サイレンシングの誘導は Semi-quantitative RT-PCR によって確認した。

GAPDH-A サイレンシング誘導葉に、GFP 発現組み換え RCNMV の *in vitro* 転写産物を機械接種して GFP 蛍光の広がりを蛍光顕微鏡で観察した。さらに組み換え RCNMV を低濃度でアグロ注入した葉をウェスタンブロットリングに供し、ウイルス増殖レベルを定量化した。一細胞レベルでの RCNMV 増殖レベルの定量は、サイレンシング誘導葉からプロトプラストを調製して PEG 接種法によってウイルス接種を行い、抽出 RNA をノーザンブロットリングによって調べた。同時にタンパク抽出も行い、MP 蓄積レベルもウェスタンブロットリングによって調べた。またサイレンシング誘導葉における MP 局在は、MP-GFP 発現組み換え RCNMV を接種し、共焦点顕微鏡観察によって調べた。

GAPDH-A の細胞内局在は、同遺伝子と GFP 遺伝子を連結した発現ベクターをアグロ注入し、共焦点顕微鏡で観察した。同時に様々な RCNMV 因子を共接種して局在変化を調べた。

4. 研究成果

(1) 申請者は RCNMV MP が RNA1 複製す

る条件下でのみ ER 膜上の小斑点状構造（ウイルス複製酵素複合体が局在している）に局在することと、MP の C 末端 70 アミノ酸領域を欠失させた MPdC70 では ER 局在性が失われ、同時に細胞間移行機能が極端に低下するがタンパク質としての安定性は影響を受けないことを発見していた。これに続いて、MPdC70 のプラズモデスマータ開閉機能と RNA 結合能、および MP 間相互作用について詳細に調べた結果、MP と MPdC70 間にこれらの機能に差が無いことが明らかとなった。この結果から、MPdC70 を発現する組み換え RCNMV の細胞間移行能の低下は、専ら ER 小斑点構造への局在性の喪失に因るものであることが明らかとなった。

以上の結果を総合して、RCNMV MP はウイルスゲノム RNA1 を増幅する複製酵素複合体にリクルートされてこれと共局在し、その意義は MP をコードしないゲノム RNA1 を捕捉して効率良い細胞間移行を果たすことにあるのではないかと、この仮説を提唱し、*Virology* 誌に投稿し、掲載された（発表論文 5）。

(2) RCNMV の細胞間移行に関する宿主因子を同定する目的で、Tandem Affinity Purification 用のタグ配列を付加した MP を発現する組み換え RCNMV を感染させた *N. benthamiana* 葉から 2 段階免疫沈降法によって MP を高度に精製し、これと共免疫沈降した宿主タンパク質を、液体高速クロマトグラフタンデム型質量分析計によって多数同定した。これらの中から、*Nicotiana tabacum* の葉緑体局在性 Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-A (GAPDH-A) に着目して解析を行った。GAPDH-A 遺伝子断片を挿入した ALSV ベクターを用いてベンサミアナ植物の GAPDH-A 遺伝子のサイレンシングを誘導した植物（以下 gsGAP 植物）には、野生型 ALSV 接種ベンサミアナ植物（以下 wt 植物）と同様に、生長の異常や病徴は全く観察されなかった。gsGAP 植物における GAPDH-A の mRNA 蓄積レベルは、半定量 RT-PCR の結果、wt 植物と比較しておよそ 3% に低下していた。これらに GFP 遺伝子を組み込んだ組み換え RCNMV (RCNMV-GFP) をチャレンジ接種したところ、gsGAP 植物では GFP 蛍光の細胞間の広がりが顕著に抑制され、wt 植物と比較して GFP 蓄積レベルはおよそ 25% 程度に低下した。続いてこれらの植物のプロトプラストに RCNMV-GFP を接種したところ、GFP 蓄積レベルに差は認められず、さらに MP 蓄積レベルもほぼ同じであった。以上の結果から GAPDH-A は RCNMV の細胞間移行に関与する宿主因子遺伝子であり、MP の発現や安定性に影響を与える因子ではないことが明らかとなった。

続いて GAPDH-A が RCNMV の細胞間移行においてどのような役割を果たすのかについて調べた。GAPDH-A と MP の *in vivo* での結合はアグロ注入した葉のタンパク質サンプルを免疫沈降することで確認された。GAPDH-A と GFP との融合タンパク質をベンサミアナに発現させ、共焦点顕微鏡観察したところ、予想通り葉緑体のみ蛍光シグナルが観察された。しかし、同時に様々な RCNMV 因子を共発現させたところ、RNA1 の複製が起きる条件下では細胞表層の ER に小斑点状に局在した。このことから、GAPDH-A は RCNMV RNA1 の複製時には複製酵素複合体と近接して存在することが明らかになった（複製には影響しない）。さらに MP-GFP 融合タンパク質を発現する組み換え RCNMV を wt 植物と gsGAP 植物に接種し、共焦点顕微鏡観察に供したところ、前者では典型的な MP 局在パターンである細胞表層 ER 上の小斑点状構造への局在が観察されたのに対して、後者では細胞質全体に蛍光が広がるパターンを示す細胞が多数観察されたことから、GAPDH-A は MP と複製酵素複合体間の結合を助ける働きがあることが強く示唆された。MP-GFP のみを発現させた場合にはプラズモデスマータ局在性に変化は見られなかった。

現在、細胞内で GAPDH-A と RCNMV MP もしくは p27 とが共局在するかどうか、蛍光タンパク質タグをつけたタンパク質発現コンストラクトを作製してベンサミアナ植物にアグロ注入して発現させ、共焦点顕微鏡観察によって確認するべく準備中である。また、GAPDH-A と p27 が *in vitro* および *in vivo* で結合するかどうか、免疫沈降実験を行うべく準備中である。

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 11 件）

1. A. Mine, A. Takeda, T. Taniguchi, H. Taniguchi, M. Kaido, K. Mise and T. Okuno Identification and characterization of the 480 kDa template-specific RNA-dependent RNA polymerase complex of *Red clover necrotic mosaic virus*. *Journal of Virology* 84: 6070-6081. (2010)（査読有）
2. M. An, H-O. Iwakawa, A. Mine, M. Kaido, K. Mise and T. Okuno A Y-shaped RNA structure in the 3' untranslated region together with the trans-activator and core promoter of *Red clover necrotic mosaic virus* RNA2 is required for its negative-strand RNA synthesis. *Virology* 405: 100-109. (2010)（査読有）

3. A. Mine, K. Hyodo, A. Takeda, M. Kaido, K. Mise and T. Okuno Interactions between p27 and p88 replicase proteins of *Red clover necrotic mosaic virus* play an essential role in viral RNA replication and suppression of RNA silencing via the 480-kDa viral replicase complex assembly. *Virology* 407: 213-224. (2010) (査読有)
 4. H-O. Iwakawa, A. Mine, K. Hyodo, M. An, M. Kaido, K. Mise and T. Okuno Template recognition mechanism by replicase proteins differ between bipartite positive-strand genomic RNAs of a plant virus. *Journal of Virology* 85: 497-509. (2011) (査読有)
 5. M. Kaido, N. Funatsu, Y. Tsuno, K. Mise and T. Okuno Viral cell-to-cell movement requires formation of cortical punctate structures containing *Red clover mosaic virus* movement protein. *Virology* 413: 205-215. (2011) (査読有)
 6. K. Hyodo, A. Mine, H-O. Iwakawa, M. Kaido, K. Mise and T. Okuno Identification of amino acids in auxiliary replicase protein p27 critical for its RNA-binding activity and the assembly of the replicase complex in *Red clover necrotic mosaic virus*. *Virology* 413: 300-309. (2011) (査読有)
 7. Y. Tajima, H-O. Iwakawa, M. Kaido, K. Mise and T. Okuno A long-distance RNA-RNA interaction plays an important role in programmed -1 ribosomal frameshifting in the translation of p88 replicase protein of *Red clover necrotic mosaic virus*. *Virology* 417: 169-178. (2011) (査読有)
 8. H-O. Iwakawa, Y. Tajima, T. Taniguchi, M. Kaido, K. Mise, Y. Tomari, H. Taniguchi and T. Okuno Poly(A)-binding protein facilitates translation of an uncapped/non-polyadenylated viral RNA by binding to the 3' untranslated region. *Journal of Virology* 86: 7836-7849. (2012)
 9. K. Kusumanegara, A. Mine, K. Hyodo, M. Kaido, K. Mise and T. Okuno Identification of domains in p27 auxiliary replicase protein essential for its association with the endoplasmic reticulum membranes in *Red clover necrotic mosaic virus*. *Virology* 433: 131-141. (2012) (査読有)
 10. A. Mine, K. Hyodo, Y. Tajima, K. Kusumanegara, T. Taniguchi, M. Kaido, K. Mise, H. Taniguchi and T. Okuno Differential roles of Hsp70 and Hsp90 in the assembly of the replicase complex of a positive strand RNA plant virus. *Journal of Virology* 86: 12091-12104. (2012) (査読有)
 11. K. Hyodo, A. Mine, T. Taniguchi, M. Kaido, K. Mise, H. Taniguchi and T. Okuno The ADP-ribosylation factor 1 plays an essential role in the replication of a plant RNA virus. *Journal of Virology* 87: 163-176. (2013) (査読有)
- [学会発表] (計 18 件)
1. 兵頭究・峯彰・岩川弘宙・海道真典・三瀬和之・奥野哲郎 *Red clover necrotic mosaic virus* RNA 複製酵素成分タンパク質 p27 の RNA 結合活性はウイルスゲノム RNA2 の複製初期段階に重要である. 平成 22 年度日本植物病理学会大会 2010 年 4 月 19 日 京都市
 2. 田島由理・岩川弘宙・海道真典・三瀬和之・奥野哲郎 *Red clover necrotic mosaic virus* (RCNMV) RNA1 の効率良い-1 フレームシフト翻訳に必要な RNA-RNA 長距離相互作用の解析. 平成 22 年度日本植物病理学会大会 2010 年 4 月 19 日 京都市
 3. 峯彰・谷口貴子・谷口寿章・海道真典・三瀬和之・奥野哲郎 *Red clover necrotic mosaic virus* の RNA 合成を担う 480kDa 複合体の同定と性状解析. 平成 22 年度日本植物病理学会大会 2010 年 4 月 19 日 京都市
 4. 岩川弘宙・谷口貴子・谷口寿章・海道真典・三瀬和之・奥野哲郎 Poly(A)結合タンパク質 (PABP) は *Red clover necrotic mosaic virus* (RCNMV) の RNA1 の 3'非翻訳領域 (UTR) に結合し cap/poly(A)非依存的翻訳を促進する. 平成 22 年度日本植物病理学会大会 2010 年 4 月 19 日 京都市
 5. Y. Tajima, H-o. Iwakawa, M. Kaido, K. Mise and T. Okuno Analysis of long-distance RNA-RNA interaction required for an efficient -1 ribosomal frameshifting in *Red clover necrotic mosaic virus* RNA1. American Society for Virology 29th Annual Meeting 2010 年 7 月 18 日 Bozeman, Montana, USA
 6. K. Hyodo, A. Mine, H-o. Iwakawa, M. Kaido, K. Mise and T. Okuno RNA binding activity of *Red clover necrotic mosaic virus* replication protein p27 plays important roles in the early replication steps of viral genomic RNA2. American Society for Virology 29th Annual Meeting 2010 年 7 月 18 日 Bozeman, Montana, USA
 7. 兵頭究・峯彰・岩川弘宙・海道真典・三瀬和之・奥野哲郎 *Red clover necrotic mosaic virus* RNA 複製酵素成分タンパク質 p27 はウイルス RNA の複製初期段階において様々な役割を担っている. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月 9 日 徳島市
 8. 峯彰・谷口貴子・海道真典・三瀬和之・谷口寿章・奥野哲郎 Heat shock protein 70 (Hsp70)

- は *Red clover necrotic mosaic virus* (RCNMV) の RNA 複製酵素複合体の形成を制御している。平成 23 年度日本植物病理学会大会 2011 年 3 月 27 日 東京都府中市
9. M. Kaido, K. Abe, T. Taniguchi, H. Taniguchi, K. Mise and T. Okuno Chloroplastic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase of *Nicotiana benthamiana* plays a positive role in cell-to-cell movement of *Red clover necrotic mosaic virus*. XV International Congress of Virology 2011 年 9 月 13 日 Sapporo, Hokkaido, Japan
10. K. Hyodo, A. Mine, M. Kaido, K. Mise and T. Okuno ADP-ribosylation factor 1 plays an important role in RNA replication of *Red clover necrotic mosaic virus*. XV International Congress of Virology 2011 年 9 月 13 日 Sapporo, Hokkaido, Japan
11. H-O. Iwakawa, Y. Tajima, T. Taniguchi, M. Kaido, K. Mise, H. Taniguchi and T. Okuno Poly(A)-binding protein stimulates cap-independent translation of uncapped/nonpolyadenylated viral RNA via binding to the 3' untranslated region. XV International Congress of Virology 2011 年 9 月 13 日 Sapporo, Hokkaido, Japan
12. A. Mine, T. Taniguchi, M. Kaido, K. Mise, H. Taniguchi and T. Okuno Host heat shock protein 70 regulates proper assembly of the replicase complex of a positive-strand RNA plant virus. XV International Congress of Virology 2011 年 9 月 13 日 Sapporo, Hokkaido, Japan
13. K. Kusumanegara, A. Mine, K. Hyodo, M. Kaido, K. Mise and T. Okuno Identification of domains in *Red clover necrotic mosaic virus* p27 auxiliary replicase protein essential for its association with the endoplasmic reticulum membranes. 平成 24 年度日本植物病理学会大会 2012 年 3 月 29 日 福岡市
14. 兵頭究・峯彰・海道真典・三瀬和之・奥野哲郎 植物プラスセンス RNA ウイルスのゲノム複製における宿主 small GTPase ADP-ribosylation factor 1 の機能解析。平成 24 年度日本植物病理学会大会 2012 年 3 月 29 日 福岡市
15. K. Hyodo, A. Mine, T. Taniguchi, M. Kaido, K. Mise, H. Taniguchi and T. Okuno A cellular secretory pathway plays a critical role in replication of a positive-strand RNA plant virus. American Society for Virology 31st annual meeting 2012 年 7 月 21 日 Madison, Wisconsin, USA
16. 俵健二・兵頭究・峯彰・海道真典・三瀬和之・奥野哲郎 *Red clover necrotic mosaic virus* 感染の RNA サイレンシング関連遺伝子 mRNA 蓄積に及ぼす影響。平成 24 年度日本植物病理

- 学会関西西部会 2012 年 9 月 27 日 鳥取市
17. 恵口奏・三瀬和之・奥野哲郎・海道真典 *Germin-Like Protein* (GLP) 遺伝子は *Nicotiana benthamiana* における *Red clover necrotic mosaic virus* (RCNMV) 感染に関与する。平成 25 年度日本植物病理学会大会 2013 年 3 月 29 日 岐阜市
18. 田島由理・岩川弘宙・海道真典・三瀬和之・奥野哲郎 *Red clover necrotic mosaic virus* の二分節ゲノム RNA は翻訳に異なる翻訳開始因子を用いる。平成 25 年度日本植物病理学会大会 2013 年 3 月 29 日 岐阜市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ
京都大学大学院農学研究科植物病理学研究室
<http://www.plant-pathology.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

海道真典 (KAIDOU MASANORI)

京都大学大学院・農学研究科・助教

研究者番号：20314247

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

谷口寿章 (TANIGUCHI HISAAKI)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・教授

研究者番号：10257636