

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 3 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06276

研究課題名(和文) 菌類RNAウイルスの新規リボソーム内部進入部位の機能構造

研究課題名(英文) Functional structure of internal ribosomal entry site in an RNA mycovirus

研究代表者

千葉 壮太郎 (CHIBA, SOTARO)

名古屋大学・アジアサテライトキャンパス学院(農)・特任准教授

研究者番号：70754521

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：IRES(リボソーム内部進入部位)を介した翻訳では、mRNAのキャップ構造非依存的にRNAの高次構造によって翻訳開始複合体が取り込まれる。一部の動植物のウイルスがこの機構を利用してタンパク質生産をすることが知られる。本研究では、このIRESの活性測定法を糸状菌で初めて確立し、菌類ウイルス(マイコウイルス)にもこの機構を利用して感染する種がいることを明らかにした。さらに、マイコウイルスの代表種であるCryphonectria hypovirus 1(ハイポウイルス科)のゲノム5'末端近傍に存在するIRESの重要RNA構造を変異解析で明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Internal ribosomal entry site (IRES) recruits factors involved in translation initiation complex via specific RNA folding structures in a cap-independent manner. Some animal and plant viruses are known to use this machinery for their protein production. In this study, we developed an assay system for investigating IRES activity in filamentous fungi and discovered that fungal viruses (mycoviruses) holding IRES elements are present, for the first time. By taking mutagenesis approach, important RNA sequences and potential structures were identified from 5' untranslated region of genomic RNA of Cryphonectria hypovirus 1 (CHV1, Hypoviridae) which is a representative of mycoviruses. Interestingly, the functional IRES needed a part of coding region of CHV1 p29, the most upstream open reading frame for multifunctional RNA silencing suppressor.

研究分野：ウイルス学

キーワード：菌類ウイルス RNAウイルス ハイポウイルス IRES 翻訳開始 レポーターアッセイ RNA高次構造

1. 研究開始当初の背景

一般に、ウイルスは限られたゲノム上に数種の遺伝子をコードするが、これらを効率的に発現するために多種多様な機構を駆使する。本研究で取上げる「リボゾーム内部進入部位 (IRES)」は、特徴的な RNA の高次構造により、リボゾームや翻訳開始因子等を直接リクルートする RNA 領域を指す。つまり、通常の真核生物性 mRNA とは異なり、IRES による翻訳ではキャップ・ポリ A 構造に依存しない翻訳開始機構によりポリペプチド合成を行う (図 1)。実際に、多くのウイルスが宿主の基本翻訳ルールに則さず、IRES 依存的にタンパク質を生産し、増殖、生存している。

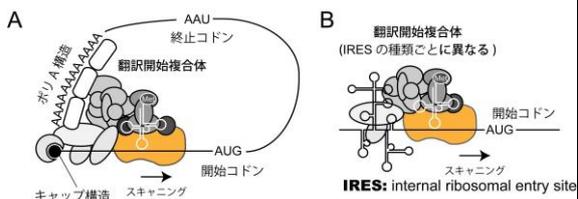


図 1. 通常の翻訳開始複合体 (A) と IRES 依存的翻訳開始複合体 (B) のイメージ。

これまでに、動物ウイルスで 4 つのクラスに分類される IRES が明らかにされており、これを標的とする抗ウイルス剤開発の研究も進められている。夫々が詳細に解析されており、IRES の予測・検出プログラムが開発され利用されている。一般に、より複雑で高度に折りたたまれた RNA 構造をもつ IRES ほど必要とする宿主の翻訳開始関連因子の数が少なくなり、緩やかな構造の IRES では必要な宿主因子の数が多く、という傾向が認められる。最近では、これら IRES の一部分を切り取って三次元構造が決定され、宿主因子結合による RNA の構造変化が示されるなど、全容解明に向けての研究が進展している。

一方で、植物や菌類に感染するウイルスの IRES については知見が乏しいのが現状である。植物ウイルスにおいては、Tobacco mosaic virus など単純な構造の IRES が報告されているが、これらの翻訳開始複合体形成の詳細は不明である。また、菌類ウイルスでは実験的な証明が伴わず、最近までその存在が推察されるに留まっていた。

2. 研究の目的

IRES は、分子生物学的実験に利用されている。例えば、翻訳開始を独立して行える特性から、mRNA 一分子から 2 つ以上のタンパク質合成を行なうことができる。発現したい 2 つの遺伝子の間に IRES を配置することで、前方の遺伝子はキャップ・ポリ A 依存的な翻訳、後方の遺伝子は IRES 依存的な翻訳により、独立したサイクルでタンパク質が合成される。この様な仕組みで、任意の遺伝子とトラ

ンスフェクションの成功を示す GFP などのレポーター遺伝子を同時に発現するプラスミドクローンなどが動物培養細胞の実験系で利用されている。しかし、これまでに、菌類ウイルスの IRES エレメントは未発見のままであり、この様な応用展開への道は拓かれていなかった。同時に、菌類においては IRES の存在そのものが分裂酵母の飢餓状態において一部の mRNA に利用される例以外では、詳細が不明であるため、IRES を保持する可能性の高い種々の菌類ウイルスの RNA 配列を解析し、詳細を明らかにする。申請者らが構築した糸状菌で有効なデュアル・ルシフェラーゼ実験系は、糸状菌をプラットフォームにした IRES 活性測定に有効だと考えられたため、本研究ではこの実験系を利用して、初めて菌類ウイルス由来の RNA 分子に IRES が存在することを証明する。さらに、最終的には、その RNA 機能構造を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

糸状菌において有効なデュアル・ルシフェラーゼ実験系では、モデル糸状菌である赤パンカビ (*Neurospora Crassa*) のコドン使用頻度に最適化したホタルルシフェラーゼ遺伝子 (OFluc) と、ウミシイタケルシフェラーゼ (ORluc) を使用する。この両者を Pgpd-1 恒常発現プロモーターの支配下に、ORluc、OFluc の順にタンデムに配置することで、ORluc は内部標準としてキャップ・ポリ A 依存型の翻訳を、OFluc は IRES エレメントが上流に存在した場合の翻訳を化学発光測定 (測定単位: RLU) によりモニターできる (図 2)。そこで、本研究では、化学発光測定機 (Glo-Max) を導入し、この実験系のセットアップを行なった後、IRES の存在が示唆されていた *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1; ハイポウイルス科) の部分配列を用いて、菌類ウイルスの IRES エレメントを詳細に解析した。この時の活性比較は、非 IRES と IRES 候補の間で、OFluc/ORluc の比活性を比較することで行なった。また、解析のプラットフォームは、CHV1 の自然宿主である、*C. parasitica* の標準株 (EP155) を用いた。

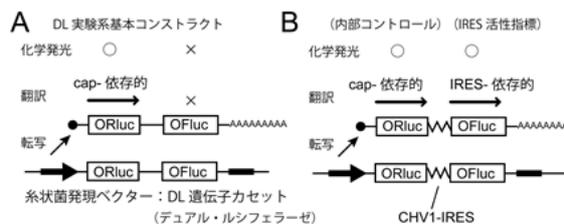


図 2. DL 実験系を用いた IRES の活性測定システム. 基本コンストラクトのイメージ (A) と IRES 配列を ORluc-OFluc 間に導入した場合のイメージ (B).

4. 研究成果

(1) Glo-Max (Promega) を利用したデュアル・ルシフェラーゼ実験系の確立

C. parviticum の形質転換ベクター pCPX-HY3 に図 2A の ORluc、OFIuc 遺伝子を導入した pCH-DLst と、ORluc の終始コドンを 3 つ連続して並べた pCH-DLst3、ORluc の終始コドンを取り除いた pCH-DL (ORluc-OFIuc 融合タンパク質を翻訳する) を構築し (図 3A)、標準株 EP155 に導入した。それぞれの形質転換株を 10 株程度、ハイグロマイシン耐性により選抜し、デュアル・ルシフェラーゼ解析に供試した (Dual Luciferase Assay System, Promega)。試薬量を半分にし、測定時間 1 秒の条件で高いルシフェラーゼ活性を検出することが判明したので、以後、この条件で検討することとした。pCH-DL は両ルシフェラーゼの高い活性を示したのに対し、pCH-DLst3 では OFIuc の活性が相対的に 10^3 RLU 程度低減していたので、pCH-DLst3 を IRES の活性測定に用いることが可能であると判断した (図 3B)。また、pCH-DLst は、終始コドンの読み過ぎしがあるためか、pCPX-DLst3 の 10 倍 OFIuc 活性が検出されたため、今後は使用しないこととした。以上から、pCPX-DLst3 の ORluc と OFIuc の間に IRES 候補配列を挿入することで、IRES 依存的な OFIuc の翻訳を定量解析するレポーター実験系が整備された。

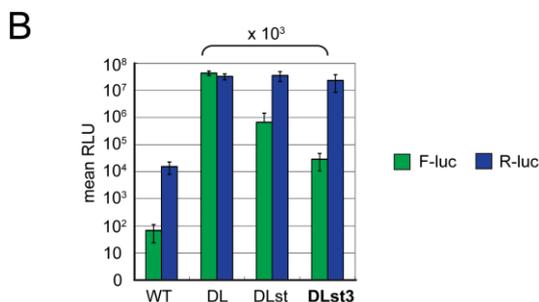
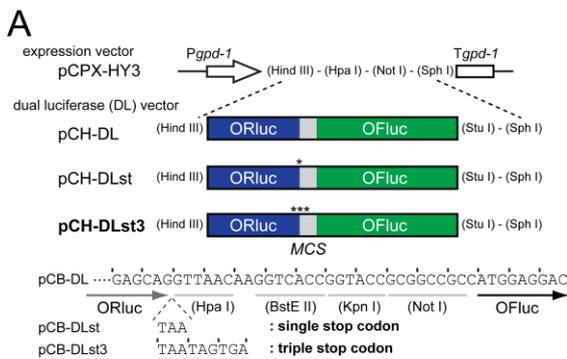


図 3. デュアル・ルシフェラーゼ実験系の基本コンストラクト作製 (A) と化学発光試験の検証 (B)。

(2) CHV1 のゲノム 5' 末端領域からの IRES 活性検出

pCH-DLst3 のルシフェラーゼ遺伝子間に菌類ウイルスゲノムの 5' 末端領域とそれに連なるコード領域から 72 塩基を付加した配列

を挿入し、IRES 活性測定を行なった。ウイルス配列は *C. parviticum* に自然感染する CHV1、CHV2、CHV3 (ハイポウイルス科)、MyRV1 のセグメント 11 (レオウイルス科) を使用した (図 4A)。また、コントロールとして、CHV1 の 5' 非翻訳領域 (5' UTR) アンチセンス配列をコード領域に連結した CHV1-as を用いた。レポーター試験を行なった結果、ハイポウイルス CHV1 と CHV2 には明らかな IRES 活性が認められたのに対し、CHV1-as と MyRV1-S11 は pCH-DLst3 (empty) と同程度の比活性を示し、IRES エレメントを保持しないと判断された (図 4B)。CHV3 に関しては、およそ CHV1 の 8% 程度の IRES 活性が見られたが、これは CHV1、CHV2 と CHV3 の間に見られる遺伝子構造の差異によるもの (前者は 2 ORF; 後者は 1 ORF) と考察された。

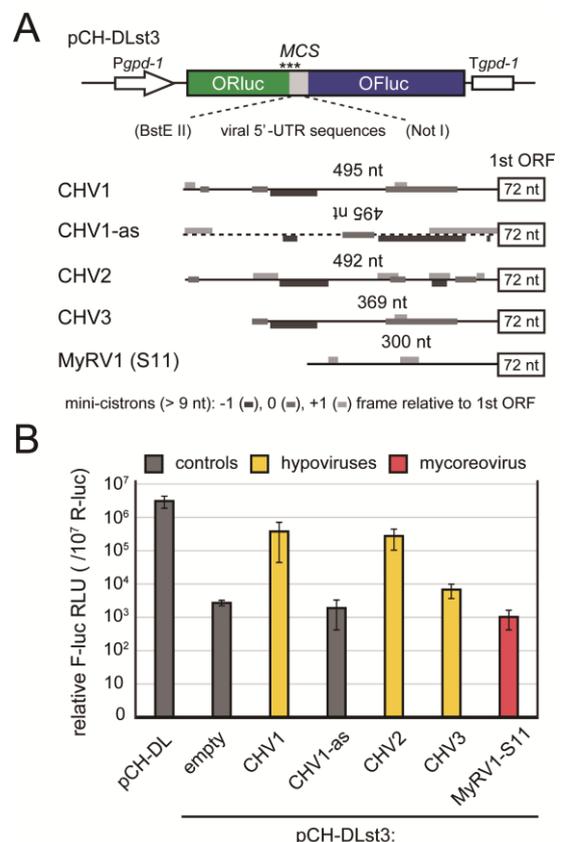


図 4. ハイポウイルス 5' 末端領域からの IRES エレメントの検出. (A) pCH-DLst3 に挿入したウイルス配列. (B) レポーター試験の結果.

(3) CHV1-IRES エレメントは内部プロモーター活性による疑似陽性ではない

上記の IRES 活性が、導入した DNA 配列の内部プロモーター活性による疑似陽性であるか検討した。pBS-SK(+) クローニングベクターをベースに DLst3 のデュアル・ルシフェラーゼ遺伝子カセットを T7 RNA polymerase プロモーター下流に挿入し (pBS-DLst3)、*in vitro* transfection によって多量にキャッピング RNA 分子を合成した。同様に、CHV1、MyRV1-S11 の 5' 末端配列を挿入したコンス

トラクトを作製し、試験管内 RNA 合成をした。これらを *C. parasitica* の調製プロトプラスト (2.0×10^7 cells/ml) と混合し、エレクトロポレーション法で合成 RNA を細胞内に導入した。回復培地で 2 時間インキュベーションした後、すべての細胞を回収して合成 RNA 由来のルシフェラーゼによる化学発光試験を行なった (図 5A)。その結果、CHV1 の配列を挿入した RNA 分子のみで、高い OFluc/ORluc 比活性が検出され、CHV1 の 5' 末端配列には IRES エlement が存在することが直接的に証明された (図 5B)。さらに、pCH-DLst3-CHV1 の Pgpd プロモーター配列を除去したコンストラクトを作製し、これで形質転換した菌株の化学発光試験を行なったところ、若干の内部プロモーター活性があることが示唆されたが、導入コピー数や挿入箇所により、シグナル強度が大きく異なるデータが得られ、正確な解析が不可能であった。今後、内部プロモーター活性を正確に検証するには、実験系の改善が必要となる。

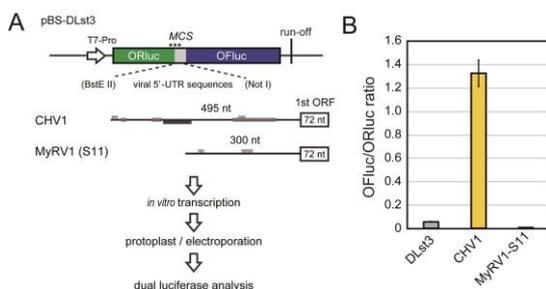


図 5. 合成 RNA のトランスフェクションによる IRES 活性測定. (A) 試験管内転写用コンストラクトとアッセイの手順. (B) 化学発光試験の結果.

(4) 遺伝子変異解析による CHV1-IRES エlement の構造解析

CHV1 ゲノム RNA の 5' UTR の 2 次構造は、図 6 (赤線) のように実験的に予測されている (Mu *et al.*, 2011, *Virus Research*, 161, 203-208.). そこで、ステムループ構造を複数セットにした領域 (SL1~SL8) を欠失した変異配列を用いて、IRES 活性測定を行なった。その結果、5' 末端側の SL1、SL2 の欠失変異配列は全長配列と同等かやや低い IRES 活性を示した。SL3 の欠失変異配列は全長配列よりも IRES 活性が高く、1RNA 分子における複製・転写・翻訳の調節因子である可能性が考えられた。SL4、SL5、SL6、SL7、SL8 の欠失配列は顕著に低い IRES 活性を示した。特に、コード領域 (図 6, 青線) 付近の SL7、およびコード領域を含む SL8 の欠失配列においては、殆ど IRES 活性を失っていたことから、この近傍の構造が IRES のコア構造であると考えられた。コード領域を IRES エlement として含む例は稀であり、CHV1 の IRES は新規の構造 Element である可能性が示唆された。さらに SL4、SL5、SL6、SL7、SL8 の個別のステムループ構造について、さらに変異解析を

行なったところ、殆どのステムループ構造が IRES の活性に寄与するという結果が得られた (以上の結果については、未発表データであるため図示は控える)。したがって、CHV1 の IRES は SL4-SL8 までの RNA 折りたたみ構造が高度に調和して翻訳開始機構として機能していることが明らかになった。現在、この結果を受けて、IRES 活性の著しく低下した変異を、ウイルス感染性 cDNA クローンにフィードバックし、ウイルスの増殖や生存における IRES の役割を解析している。

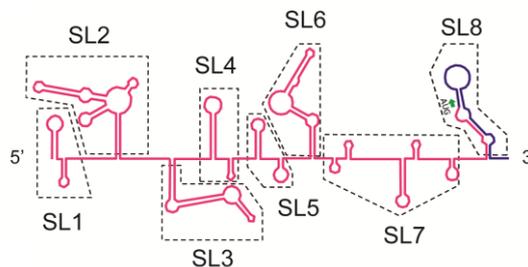


図 6. CHV1 RNA ゲノム 5' 末端領域の想定 2 次構造と欠失変異配列 (SL1~SL8) の作製.

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 1 件+5 件)

主原著論文

① Sotaro Chiba, Atif Jamal, Nobuhiro Suzuki. (2018) First Evidence for Internal Ribosomal Entry Sites in Diverse Fungal Virus Genomes. *mBio* 9. 2: e02350-17.

関連研究実績

②Ngin Chhay, Suon Seng, Toshiharu Tanaka, Akira Yamauchi, Edita C Cedicol, Kazuhito Kawakita, Sotaro Chiba. (2016) Rice productivity improvement in Cambodia through the application of technical recommendation in a farmers field school. *International Journal of Agricultural Sustainability*, vol. 15, 54-69.

③Sotaro Chiba, Nobuhiro Suzuki. (2016) Vigorous induction of dicer-like 2 gene by a virus interferes with an unrelated virus in the model phytopathogenic fungus *Cryphonectria parasitica*. *PSJ Plant Virus Disease Workshop Report*, Vol. 12, 51-57.

④Sotaro Chiba, Yu-Hsin Lin, Hideki Kondo, Satoko Kanematsu, Nobuhiro Suzuki. (2016) A novel betapartitivirus RnPV6 from *Rosellinia necatrix* tolerates host RNA silencing but is interfered by its defective RNAs. (2016) *Virus Research*, Vol.

219, 62-72.

⑤Hideki Kondo, Sakae Hisano, Sotaro Chiba, Kazuyuki Maruyama, Andika Ida Bagus, Kazuhiro Toyoda, Fumihiko Fujimori, Nobuhiro Suzuki. (2016) Sequence and phylogenetic analyses of novel totivirus-like double-stranded RNA from a field-collected powdery mildew fungi. *Virus Research*, Vol. 213, 353-364.

⑥Sotaro Chiba, Nobuhiro Suzuki. (2015) Highly activated RNA silencing via strong induction of dicer by one virus can interfere with the replication of an unrelated virus. *PNAS* Vol. 112 (35) E4911-E4918.

[学会発表] (計7件)

①水谷行善・須賀晴久・鈴木信弘・千葉壮太郎：フザリウム属菌のヴァイロコントロールを目指した菌類ウイルスの探索、アグリビジネス創出フェア、平成28年11月29日、愛知県名古屋市

② Yukiyoishi Mizutani, Adane Abraham, Haruhisa Suga, Nobuhiro Suzuki, Sotaro Chiba. Screening friendly viruses: Characterization of a novel mitochondrial viruses with potential to control phytopathogenic fungus *Fusarium boothii*. Joint Symposium of Naogya Univ., Toa Univ., and HZAU, Oct 20, 2017. Busan, Korea.

③水谷行善・須賀晴久・鈴木信弘・千葉壮太郎：赤かび病菌感染ウイルスに関する研究、菌類・植物ウイルス研究ミニシンポジウム、平成28年9月21日、岡山県倉敷市

④千葉壮太郎・鈴木信弘：Vigorous induction of dicer-like 2 gene by a virus interferes with an unrelated virus in the model phytopathogenic fungus *Cryphonectria parasitica*. 日本植物病理学会植物ウイルス病研究会、平成28年3月24日、岡山県倉敷市

⑤千葉壮太郎・鈴木信弘：RNAサイレンシング活性化による異種菌類ウイルス間の新規緩衝作用(I)、日本植物病理学会大会、平成28年3月23日、岡山県岡山市

⑥林諭昕・千葉壮太郎・近藤秀樹・兼松聡子・鈴木信弘：RNAサイレンシング活性化による異種菌類ウイルス間の新規緩衝作用(II)、日本植物病理学会大会、平成28年3月23日、岡山県岡山市

⑦千葉壮太郎・鈴木信弘：Highly activated

RNA silencing via strong induction of dicer by one virus can interfere with the replication of an unrelated RNA viruses. 日本ウイルス学会、平成27年11月24日、福岡県福岡市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千葉 壮太郎 (CHIBA, Sotaro)
名古屋大学・アジアサテライトキャンパス
学院(農) 特任准教授
研究者番号：70754521