

平成22年6月1日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2004～2009

課題番号：16087209

研究課題名（和文） 二重殻ウイルスの構造形成と感染性に関する研究

研究課題名（英文） The assembly mechanism and infectivity of the
Double-layered virus particles

研究代表者

大村 敏博 (OOMURA TOSHIHIRO)

(独) 農研機構・中央農研・病害虫検出同定法研究チーム・専門員

研究者番号：20355499

研究成果の概要（和文）：二重殻構造をしているレオウイルス科を構成する12の属の内、3属に属する植物ウイルスを対象にし、主にイネ萎縮ウイルスを用い、ウイルスの細胞への侵入の様態、ウイルスが自己の12本に分節した2本鎖RNAを自己収納する機構、自分の各種タンパク質を素材にして自己組織化して粒子を構築する機構、その細胞内構築過程におけるウイルスの全12種タンパク質の機能と役割、宿主因子との応答の様態、及び増殖後のウイルスが細胞内を移動し、細胞外へ排出されるに至る全プロセスを構造学的視点から解明した。

研究成果の概要（英文）：X-ray crystallographic, cryoelectron microscopic, electron tomographic studies of isolated Rice dwarf virus particles, its component proteins and ultra-thin sections of virus-infected tissues, combined with in vivo studies using virus-infected insect vector cells revealed the mechanism of viral entry into cells, packaging of all the 12 genome segments and 7 component proteins, functions and roles of each of 12 viral proteins during viral assembly in viro, interaction between virus and host factors, viral transfer of intra- inter-cells, and viral exit from infected cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度	8,400,000	0	8,400,000
2005年度	16,800,000	0	16,800,000
2006年度	15,600,000	0	15,600,000
2007年度	15,600,000	0	15,600,000
2008年度	14,200,000	0	14,200,000
2009年度	10,900,000	0	10,900,000
総計	81,500,000	0	81,500,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学、構造生物学

キーワード：生体超分子、ウイルス、タンパク質、分子認識、構造構築機構

1. 研究開始当初の背景

ウイルス病の制御には伝染様式等の諸性質の解明、診断技術の開発、ゲノム構造の解析、構成タンパク質の機能解明及びウイルスと宿主との応答反応等様々な領域の研究が必要である。課題提案者が行ってきたこれら研究の内、病気の治療を目的とした分子領域の研究において、ウイルスの構造構築機構の解明に関する研究はウイルスの制御につながる多大な情報を提供することが期待される。

二重程度のタンパク質層から形成される殻の内側に10～12本に分節した2本鎖RNAゲノムを収納し、転写複製機能を内包するレオウイルス科に属するウイルスは規則性の高い構造をした異種高分子から成るものとしては、生物界で最も巨大な自己複製体の一つである。高輝度放射光結晶構造解析手法等、最先端の技術の適用によってこのような複雑な超分子の解析が可能になったため、家畜や人のウイルスである Bluetongue virus、Reovirus 及び本研究で主に用いるイネ萎縮ウイルス (Rice dwarf virus; RDV) の主要な構成タンパク質の一部が原子レベルで近年相次いで解析された。

このように国際的な構造解析技術が開発されたことから、超分子としてのウイルス粒子の構造形成の仕組みを原子、分子、細胞レベルで解析し、ウイルス機能抑制のための条件を解明する研究ステージに到達したものと期待されていた。

2. 研究の目的

二重程度のタンパク質層から形成される殻の内側に10～12本に分節した2本鎖RNAゲノムを収納し、転写複製機能を内包

するレオウイルス科に属するウイルスは規則性の高い構造をした異種高分子から成るものとしては、生物界で最も巨大な自己複製体の一つである。本研究では、イネ萎縮ウイルスを主な対象として、ウイルスゲノムをタンパク質層の内部にコンパクトに収納、保護し、かつ細胞感染後にそのウイルスゲノムが転写体を効率的に大量生産することを可能にするという目的を異にする両機構を同じ超分子組成の中に組み込んだ生体分子の構造構築に関わる分子、細胞情報を得、ウイルス機能抑制のための情報を得る。

3. 研究の方法

イネ萎縮ウイルスは12本に分節した2本鎖RNA (dsRNA) を2層のタンパク質が包み込む約70nmの正20面体粒子である。各dsRNAはおおむね1種類のタンパク質をコードしている。本研究では感染性を有する二重殻ウイルスであるRDVを主に用い、ウイルス粒子形成のプロセスを解明する。またウイルスがコードする12種類のタンパク質に対する抗体を使用した組織免疫電子顕微鏡法等によって、ウイルス粒子の構築過程における各タンパク質の役割を明らかにする。これらの解析によって本ウイルスの構造タンパク質の自己組織化および粒子構築プロセスを明らかにする。

4. 研究成果

イネ萎縮ウイルスはクラスリン被覆ピットという構造を経由して媒介昆虫の細胞に侵入することが判明した。

イネ萎縮ウイルスとイネ・ゴール・ドワー

フ・ウイルスの P8 外殻蛋白質の三次元シミュレーションを行ったところ、タンパク質のサイズ及び静電ポテンシャルの両性質から両ウイルスの外殻タンパク質からなるキメラ粒子の構築が可能であると想定された。そこでイネ萎縮ウイルスの内殻に各ウイルスの外殻蛋白質を様々な割合で反応させたところ、その比率に応じてキメラ粒子を構築できることが明らかになった。

イネ萎縮ウイルスの P2 タンパク質はウイルス粒子の二層目に配置されているが、本タンパク質は媒介昆虫細胞を融合させる機能を有することが判明した。

イネ萎縮ウイルスの P8 タンパク質の 3 量体は径約 590 Å のチューブを形成するが、本チューブのクライオ電子顕微鏡像と X 線結晶構造解析像とを組み合わせた疑似原子分解能構造解析によって、P8 タンパク質 3 量体の横どうしの静電相互作用による復元力によって内殻粒子を穏やかに締め付ける力が、ウイルス粒子を超分子の状態に維持する根元的原理の一つであることを明らかにした。

イネラギッドスタントウイルスをクライオ電子顕微鏡単粒子構造解析法で解析したところ、レオウイルスに共通に見られる薄い内殻層が認められた。さらに本内殻層の上表面にクランプ及び長いタレット構造が存在し、イネ萎縮ウイルスとは異なる特異的な構造が見られた。

イネ萎縮ウイルスの 12 種タンパク質のうち、非構造タンパク質である Pns6、Pns11 および Pns12 は感染細胞内においてウイルスの合成工場であるバイロプラズマを形成した。その内部ではウイルスのゲノム RNA が合成され、さらにウイルス粒子内部を構成する P1、P3、P5 および P7 が集積し、内殻粒子を構築した。その後、内殻粒子にバイロプラズマの周縁に集積していた P2、P8 および P9 が

結合し、外殻を形成して完全粒子となり、放出されるという、ウイルス粒子の構造構築プロセスが明らかになった。また、非構造タンパク質である Pns4 は、径約 10 nm のミニチューブを形成することが判明した。

イネ萎縮ウイルスの Pns10 タンパク質は径約 85nm のチューブを構築し、その中をウイルス粒子が安全に近隣細胞に移行するための手段として使用されているが、本チューブは螺旋構造をしており、その内部にウイルスを固定し、チューブの伸長に伴ってウイルスも移行することが明らかになった。

感染した媒介昆虫細胞内においてイネ萎縮ウイルスはバイロプラズマと称されるウイルス合成工場でアSEMBLした後にバイロプラズマに隣接する小胞体に取り込まれ、細胞内を移行した後に細胞外に排出されることが判明した。

本ウイルスは自身が構築するチューブを利用して細胞間移行する際に、宿主である昆虫細胞のミオシンを利用することが明らかになった。

ウイルス媒介に関与する昆虫細胞因子群の機能解析について、イネ萎縮ウイルス (RDV) と同属のイネ・ゴール・ドワーフ・ウイルス (RGDV) 媒介昆虫ツマグロヨコバイの細胞には、増殖したウイルスをマイクロチューブを介した輸送により排出する機構が存在することが判明し、ウイルスに感染した昆虫宿主において、宿主サイドの因子がウイルス複製のプロセスに関与していることが明らかになった。

RDVは、キャプシド内部でRNA依存RNAポリメラーゼにより12本に分節した二本鎖RNAの複製を同時かつ連続して行い、転写したmRNAを細胞質へ放出する。この効率的な転写機構は、キャプシド内部に12本に分節した二本鎖RNAが、正二十面体の各頂点に転写

構造複合体を中心として螺旋状に、かつ液晶状態で機能的に組織化されることで可能となっていることがクライオ電顕を用いた構造解析により明らかになった。

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 16 件)

- ① Hagiwara, K., Higashi, T., Miyazaki, N., Naitow, H., Cheng, H., Nakagawa, A., Mizuno, H., Tsukihara, T., and Omura, T. (2004). The Amino-terminal region of major capsid protein P3 is essential for self-assembly of single-shelled core-like particles of Rice dwarf virus. *Journal of Virology* 78, 3145-3149. 査読有
- ② Miyazaki, N., Hagiwara, K., Naitow, H., Higashi, T., Cheng, R., Tsukihara, T., Nakagawa, A., and Omura, T. Transcapsidation and the Conserved Interactions of Two Major Structural Proteins of a Pair of Phytoreoviruses Confirm the Mechanism of Assembly of the Outer Capsid Layer. *J.Mol.Biol.* (2005) 345, 229-237. 査読有
- ③ Wei, T., Shimizu, T., Hagiwara, K., Kikuchi, A., Moriyasu, Y., Suzuki N., Chen, H., and Omura, T. (2006). The Pns 12 protein of Rice dwarf virus is essential for formation of viroplasm and nucleation of viral assembly complexes. *Journal of General Virology* 87:429-438 査読有
- ④ Hagiwara, K., Higashi, T., Takahashi, K., Hara, N., Aoki, H., Miyazaki N., Wang, Q-Y., Zhu, Y., Yatou, O., Tanaka, H. and Omura, T. (2006). In vitro but not in planta encapsidation of Rice gall dwarf virus core particles by the outer capsid P8 protein of Rice dwarf virus expressed in transgenic rice plants. *Journal of General Plant Pathology* 72: 186-189. 査読有
- ⑤ Wei, T., Kikuchi, A., Suzuki, N., Shimizu, T., Hagiwara, K., Chen, H. and Omura, T. (2006). Pns4 of Rice dwarf virus is a phosphoprotein, localized around the viroplasm matrix and forms minitubules. *Archives of Virology* 151: 1701-1712. 査読有
- ⑥ Wei, T., Kikuchi, A., Moriyasu, Y., Suzuki, N., Shimizu, T., Hagiwara, K., Chen, H., Takahashi, M., Ichiki-Uehara, T. and Omura, T. (2006). The spread of Rice dwarf virus among cells of its insect vector exploits virus-induced tubular structures. *Journal of Virology* 80, 8593-8602. 査読有
- ⑦ Moriyasu, Y., W. Maruyama-Funatsuki, A. Kikuchi, K. Ichimi, B. Zhong, J. Yan, Y. Zhu, H. Suga, Y. Watanabe, T. Ichiki-Uehara, T. Shimizu, K. Hagiwara, H. Kamiunten, K. Akutsu and T. Omura. (2007). Molecular analysis of the genome segments S1, S4, S6 S7 and S12 of a Rice gall dwarf virus isolate from Thailand; completion of the genomic sequence. *Archives of Virology* 152, 1315-1322. 査読有
- ⑧ Wei, T., Chen, H., Ichiki-Uehara, T., Hibino, H., and Omura, T. (2007). Entry of Rice dwarf virus into cultured cells of its insect vector involves clathrin-mediated endocytosis. *Journal of Virology*, 81, 7811-7815. 査読有

- ⑨ Zhou, F., Pu, Y., Wei, T., Liu, H., Deng, W., Wei, C., Ding, B., Omura, T. And Li, Y. (2007). The P2 capsid protein of the nonenveloped rice dwarf phyto-reovirus induces membrane fusion in insect host cells. Proceedings of National Academy of Sciences of USA 104, 19547-19552. 査読有
- ⑩ Katayama, S., Wei, T., Omura, T., Takagi, J. and Iwakaki, K. (2007). Three-dimensional architecture of virus-packed tubule. Journal of Electron Microscopy. 56, (3) 77-81. 査読有
- ⑪ Wei, T., Shimizu, T. and Omura, T. (2008). Endomembranes and myosin mediate assembly into tubules of Pns10 of Rice dwarf virus and intercellular spreading of the virus in cultured insect vector cells. Virology, 372, 349-356. 査読有
- ⑫ Wei, T., Hibino, H. and Omura, T. (2008). Rice dwarf virus is engulfed into and released via vesicular compartments in cultured insect vector cells. Journal of General Virology. 89 (11), 2915-2920. 査読有
- ⑬ Iwasaki, K., Miyazaki, N., Hammer, L., Zhu, Y., Omura, T., Wu, B., Sjoborg, F., Yonekura, K., Murata, K., Namba, K., Caspar, D. L., Fujiyoshi, Y. and Cheng, R. H. (2008). Pleomorphic configuration of the trimeric capsid proteins of rice dwarf virus that allows formation of both the outer capsid and tubular crystals. Journal of Molecular Biology 383 (1), 252-265. 査読有
- ⑭ Miyazaki, N., Uehara-Ichiki, T., Xing, L., Bergman, L., Higashiura, A., Nakagawa, A., Omura, T. and Cheng, R. H. (2008). Structural evolution of Reoviridae revealed by Oryzavirus in acquiring the second capsid shell. Journal of Virology 82 (22), 11344-11353. 査読有
- ⑮ Wei, T., Uehara-Ichiki, T., Miyazaki, N., Hibino, H., Iwasaki, K. and Omura, T. (2009). Association of Rice gall dwarf virus with microtubules is necessary for viral release from cultured insect vector cells. Journal of Virology 10830-10835. 査読有
- ⑯ Miyazaki, N., Wu, B., Hagiwara, K., Wang, C. Y., Xing, L., Hammer L., Higashiura, A., Tsukihara, T., Nakagawa, A., Omura, T., and Cheng, H. (2010). The functional organization of the internal components of Rice dwarf virus. The Journal of Biochemistry in press 査読有
- [学会発表] (計 22 件)
- ① 秋田総理、東浦彰史、Pu Yingying、清水巧、一木珠樹、笹谷孝英、鈴木守、中川敦史、大村敏博. イネ黒条萎縮ウイルス由来バイロプラズマタンパク質のX線結晶構造解析. 第9回日本蛋白質科学会年会. 2009.5.20-22. 京都市国際会議場
- ② 東浦彰史、篠原智子、秋田総理、清水巧、一木珠樹、鈴木守、笹谷孝英、大村敏博、中川敦史. イネ縞葉枯ウイルス由来タンパク質P4のX線結晶構造解析とその機能解析. 第9回日本蛋白質科学会年会、2009.5.20-22. 京都市国際会議場
- ③ 秋田総理、東浦彰史、Pu Yingying、清水巧、一木珠樹、笹谷孝英、鈴木守、中川敦史、大村敏博. イネ黒条萎縮ウイルス由

- 来バイロプラズマタンパク質のX線結晶構造解析. 生体超分子の構造解析と機能制御の原子機構第5回ワークショップ. 2009.7.27-29. 湘南国際村センター
- ④ 岩崎憲治、宮崎直幸、Taiyun Wei、一木珠樹、日比野啓行、大村敏博. 微小管とRice gall dwarf virus. 生体超分子の構造解析と機能制御の原子機構第5回ワークショップ. 2009.7.27-29. 湘南国際村センター
- ⑤ 清水巧、Taiyun Wei、宮崎直幸、一木(植原)珠樹、日比野啓行、岩崎憲治、大村敏博. 媒介昆虫細胞内におけるRice gall dwarf virusのミトコンドリアへの局在. 第57回日本ウイルス学会学術集会. 2009.10.25-27. 東京都都市センターホテル
- ⑥ 一木(植原)珠樹、ウエイタイユン、宮崎直幸、日比野啓行、岩崎憲治、大村敏博. Rice gall dwarf virusは、マイクロチューブルを介して昆虫細胞内を移行し細胞外に放出される. 第57回日本ウイルス学会学術集会. 2009.10.25-27. 東京都都市センターホテル
- ⑦ 大村敏博. 二重殻ウイルスの複製機構. 特定領域研究「生体超分子構造」第6回公開シンポジウム. 2009.12.1-2. 豊中市千里ライフサイエンスセンター
- ⑧ 秋田総理、東浦彰史、北尾雅博、清水巧、一木珠樹、笹谷孝英、鈴木守、月原富武、中川敦史、大村敏博. 植物レオウイルスがコードするバイロプラズマタンパク質のX線結晶構造解析. 特定領域研究「生体超分子構造」第6回公開シンポジウム. 2009.12.1-2. 豊中市千里ライフサイエンスセンター
- Cheng, R. H., Tsukihara, T. and Nakagawa, A. The assembly of the double-layered capsids of phytoreoviruses. Structure-based study of viral replication. Chen, R. H. and Miyamura, T. eds. World Scientific. 2007. p. 463-482.
- ② 岩崎憲治、宮崎直幸、片山寿美枝、大村敏博. 顕微鏡. イネ萎縮ウイルスのライフサイクルにおける超分子複合体の解析. 2009. p.82-86.
- ③ 大村敏博. 日本結晶学会誌、ファイトレオウイルスの2層タンパク質構造の構築機構(MS36). 2009. p.73-74.
- ④ 宮崎直幸、岩崎憲治、大村敏博. VIRUS REPORT. クライオ電子顕微鏡単粒子解析法を用いたウイルス構造解析. 2009. p.52-61.
- ⑤ 片山寿美枝、宮崎直幸、Taiyun Wei、日比野啓行、大村敏博、岩崎憲治. 大阪大学超高压電子顕微鏡センター平成20年度年報. イネ萎縮ウイルスの昆虫細胞における伝搬機構の解明. 2009. p.41-44.
6. 研究組織
- (1)研究代表者
大村 敏博 (OMURA TOSHIHIRO)
農研機構・中央農研・専門員
研究者番号：20355499
- (2)研究分担者
一木 珠樹 (ICHIKI TAMAKI)
農研機構・中央農研・主任研究員
研究者番号：70355501

[図書] (計5件)

- ① Omura, T., Miyazaki, N., Naitow, H.,