

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（A）
 研究期間：2006-2008
 課題番号：18208004
 研究課題名（和文）ダイアンソウウイルスの RNA 複製と RNA サイレンシング抑制に関わる宿主因子の同定
 研究課題名（英文） Identification of host factors involved in RNA replication of dianthovirus and its RNA silencing suppression
 研究代表者
 奥野 哲郎（OKUNO TETSURO）
 京都大学・大学院農学研究科・教授
 00221151

研究成果の概要：農業上の重要病原体の 1 つである植物ウイルスの複製機構を明らかにするため、ウイルスゲノム RNA 複製装置に含まれるタンパク質と RNA を解析した。その結果、RNA 複製に重要なタンパク質-タンパク質、およびタンパク質-RNA 相互作用の分子基盤を明らかにした。また、ウイルスが RNA 複製あるいはタンパク質の翻訳に利用すると考えられる植物タンパク質を同定した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
18 年度	17300000	5190000	22490000
19 年度	9400000	2820000	12220000
20 年度	9400000	2820000	12220000
年度			
年度			
総 計	36100000	10830000	46930000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：ウイルス、RNA、複製、翻訳、病原性、抵抗性、RNA サイレンシング

1. 研究開始当初の背景

多くの植物ウイルスで RNA サイレンシング サプレッサーが報告されていたが、いずれのサプレッサーもウイルスがコードするタンパク質であった。申請者は、一本鎖プラスセンス RNA をゲノムとして持つダイアンソウウイルス属 *Red clover necrotic mosaic virus* (RCNMV) をモデルウイルスとして用い、RNA ウイルスの植物への感染機構の研究を行ってきた。そして、ウイルスの RNA サイレンシング抑制機構において、RCNMV が以下の 4 つの特徴を持つことを明らかにしていた。(1) RNA

複製酵素成分タンパク質 (p27 と p88) 以外にウイルス RNA を必要とする。(2) RNA サイレンシング抑制活性がウイルス RNA 複製、特にマイナス鎖 RNA 合成と強くリンクしている。(3) RNA サイレンシング経路で二本鎖 RNA の切断、特にマイクロ RNA (miRNA) のプロセッシングに関与する Dicer 様タンパク質 1 (DCL1) の変異体アラビドプシスに効率よく感染できない。(4) DCLs が介在する miRNA の生合成を阻害する。これらの結果から、申請者は、DCLs を含む RNA サイレンシング関連タンパク質を RCNMV は RNA 複製の宿主因子として用い、

RNA サイレンシングを抑制するというモデルを提唱した。RNA サイレンシング関連因子と相互作用するタンパク質のウイルスによる利用の可能性については動物レトロウイルスで報告されていたが、その詳細については明らかではなかった。

2. 研究の目的

本研究では、モデルウイルス RCNMV のウイルス RNA 複製に関わる複製酵素タンパク質 p27 と p88 の機能ドメインと RNA 複製に必要なウイルス RNA シス因子を明らかにし、それらの情報をもとに、RCNMV の RNA 複製に関わる宿主因子、特に RNA 複製複体に含まれる宿主因子を同定することを目的とした。本研究で同定される因子は、ウイルス RNA の複製と RNA サイレンシング経路の双方で重要な働きをしていることが予想され、ウイルス RNA 複製機構と RNA サイレンシング機構、すなわちウイルスの病原性発現と植物の抵抗性機構の分子応答の解明に繋がる。

3. 研究の方法

(1) タンパク質間あるいはタンパク質-RNA 間の相互作用に関わる p27 と p88 のドメインを以下の方法で調べた。p27 と p88、あるいはエピトープタグ融合 p27 と p88 を RCNMV RNA とともにアグロインフィルトレーション法、あるいはタバコ BY-2 細胞由来の脱液胞化プロトプラスト抽出液 (*in vitro* 翻訳複製系; BYL) で発現させ、免疫アフィニティー精製、ショ糖密度勾配遠心分離、および電気泳動等を用いて p27 と p88、p27 及び p88 自身の結合、これらタンパク質の RNA との結合、膜画分へのリクルート、RNA 複製複体形成などに必要なタンパク質ドメインと RNA ドメインを解析した。

(2) ウイルスタンパク質のキャップ非依存的翻訳と RNA 合成に必須の RNA1 の 3' 非翻訳領域 (UTR) に様々な変異を導入し、翻訳と RNA 合成に及ぼす影響を *in vitro* 及びプロトプラストで解析した。同様の解析を RNA 2 においても行った。

(3) 生物活性を持つエピトープタグ融合 p27 と p88 を免疫沈降タグとして用い、アグロバクテリウム介在一過的発現/ベンタミアーナ系 (アグロインフィルトレーション法) とタバコ BY2 培養細胞から調整した *in vitro* 翻訳複製系 (BYL) で RCNMV の RNA 複製複体に含まれるタンパク質をアフィニティー精製し、質量分析によるタンパク質同定解析に用いた。

(4) ストレプトマイシンに結合する能力を持つ RNA 配列 (ストレプトタグ) を付加した RNA1 及び RNA2 の様々な RNA 断片を作成した。これらの RNA をタバコ BY-2 細胞由来の脱液胞化プロトプラスト抽出液内でウイルス複

製酵素と反応させ、結合タンパク質をストレプトマイシン結合カラムで精製し、質量分析によるタンパク質同定解析に用いた。

4. 研究成果

(1) RCNMV がコードする RNA 複製酵素成分タンパク質である p27 と p88 の相互作用

① p27 の N 末端と C 末端側の 2 カ所が p27 : p27 の結合に関与

様々な領域に欠失を持つ p27 あるいはアラニンスキャニング変異 p27 を用いた解析から、少なくとも p27 の C 末端から 40 アミノ酸の領域が p27-p27 の結合に必要であること、また N 末端 40 アミノ酸の領域は p27 の安定性に関わり、N 末端 80 アミノ酸内にも p27-p27 の結合に必要な領域が存在することが分かった。

② p27 : p27 結合と p27 : p88 結合に特異的に関わるアミノ酸

タンパク質-タンパク質間の相互作用に関わると考えられるアミノ酸配列 (疎水性アミノ酸に囲まれた荷電あるいは芳香族環アミノ酸) であり、且つダイアンソウイルス間で保存されているアミノ酸配列 4 カ所に焦点を絞り C 末端から 40 アミノ酸の領域でアミノ酸変異を導入し調べると、207 番目のチロシン、214-215 番目のアルギニン、222 番目のアルギニンは p27 : p27 と p27 : p88 のいずれの結合にも重要であること、一方、230 番目のフェニルアラニンは p27 : p27 間の結合には必要でないが、p27 : p88 の結合に必要であることが分かった。p27 : p88 の結合は効率的なマイナス鎖合成に必要であった。

p27 単独では 380kDa の複合体が、p27+p88+RNA では 480kDa の複合体が形成されることが分かった。

ER 膜への局在性と RNA リクルートメント

p27 は単独で ER 膜に局在するが、局在化には C 端側半分は必要でなかった。一方、C 端側半分に含まれる 157-197 番目のアミノ酸領域が RNA の膜へのリクルートメントに重要であることが分かった。

(2) RNA 複製複体に含まれる宿主因子

アグロインフィルトレーション系と BYL 系いずれにおいてもエピトープタグ融合 p27 および p88 特異的に免疫沈降する宿主タンパク質として HSP70 とその他数種のタンパク質が検出された。HSP70 はストレス関連タンパク質でトムプスウイルスの複製酵素複体に含まれていることが最近報告された。HSP70 ホモログ遺伝子 (cDNA) をタバコ細胞から単離し、アグロインフィルトレーション法を用い *Nicotiana benthamiana* で過剰発現させると共接種した RCNMV の複製を促進した。この結果は HSP70 が RCNMV RNA 複製酵素複体に含まれる宿主因子であることを強く示唆する。また、HSP 関連タンパク質が RNA

サイレンシング経路で重要な役割を果たすことが知られており、RCNMV の RNA サイレncing抑制機構と関連性において、今後の研究に繋がる。

(3) RCNMV RNA に結合する宿主タンパク質

ストレプトタグ法を用い RCNMV RNA に特異的に結合する宿主タンパク質を分離し、質量分析により約 10 種のタンパク質を同定した。その内の 3 つは、RNA1 の 5'-UTR に結合する AC rich binding factor (ACBF)、Threonyl-tRNA synthetase (ThrRS)、RNA1 の 3' UTR に結合する Poly(A)-binding protein(PABP)である。これら 3 種の遺伝子の完全長 cDNA をタバコ BY-2 細胞より単離した。これらのタンパク質の過剰発現はウイルス RNA 合成と RNA1 の 3'-UTR に存在する 3'TE-DR1 が介在する cap 非依存的翻訳を促進したことから、翻訳と RNA 複製に関与する宿主因子である可能性が強く示唆された。

(4) ウイルスタンパク質の翻訳と RNA 複製制御に関わる新たなウイルス RNA の発見

感染後期に RCNMV RNA1 の 3'-UTR に由来する約 450 塩基の低分子量 RNA (SR1f) が細胞内に蓄積することを見出した。SR1f は、ゲノムから転写されるサブゲノム RNA ではなく、RNA1 3'-UTR の 5'側近傍に存在する RNA 因子が 5'→3'エクソリボヌクレアーゼ分解から 3'側の RNA を守ることにより蓄積する分解中間体であることを示した。また、SR1f は、*in vitro* で cap 依存的翻訳と cap 非依存的翻訳をいずれも濃度依存的に抑制すること明らかにした。SR1f は、感染後期でのウイルスの翻訳を抑制し、複製段階へとスムーズに移行させるリボレギュレーターである可能性が示唆された。分解からのプロテクションによってウイルスゲノムから制御 RNA が生じるといふ本発見は動物ウイルスを含め初めての報告であり、ウイルス学分野には大きなインパクトを与えると思われる。

(5) p88 は RNA 複製においてシスにのみ機能する

RCNMV は、2 分節の 1 本鎖プラスセンス RNA をゲノムとして持つウイルスである。RNA1 には RNA 複製酵素成分タンパク質の p27 と p88 がコードされており、p88 は p27 のフレームシフト産物として翻訳される。RNA1 は単独で効率よく複製できる。しかし、p27 のみが翻訳される RNA1 変異体は p88 をトランスに補足しても複製できないことが分かった。一方、p88 のみが翻訳される RNA1 変異体は p27 をトランスに補足すると効率よく複製した。この違いは各複製酵素成分の量によるものではなかった。このことから p88 は自らが翻訳された RNA1 に対してシスに作用し、その場合にのみ RNA1 を複製できる機能を持つことが分かった。このような機構は翻訳から RNA 複製への制御スイッチとして機能しているこ

とが示唆される。一方、複製酵素をコードしていない RNA2 は RNA1 からトランスに供給される p88 と p27 により効率よく複製される。RNA2 の 3'-UTR には 2 つのステムループ構造 (SL7 と SL8) からなる約 35 塩基の領域が存在し、SL7 と SL8 は p27 複製酵素タンパク質との結合における必要十分因子であることを明らかにした。

(6) RNA1 の翻訳と RNA 複製に関わる RNA 領域と二次構造

RNA1 の cap 非依存的翻訳は 3'-UTR に存在する RNA 因子 (3'TE-DR1) に依存して行われる。翻訳と RNA 合成における 3'-UTR の機能を推定 RNA 構造に基づいて解析したところ、cap 非依存的翻訳とマイナス鎖 RNA 合成に必要な RNA ドメインはそれぞれ独立していることが分かった。

3'TE-DR1 依存翻訳機構での 3'-UTR 以外の RNA 解析では、5'末端のステムループ構造も重要であることが分かった。また、3'TE-DR1 依存 cap 非依存的翻訳はリボソームスキヤニング機構で行われ、5'-UTR の要求性は宿主によりことなることを示した。翻訳におけるウイルス因子の要求性が宿主により異なる例はこれまで報告されておらず、本結果は、ウイルスと植物の相互作用研究の新たな展開への布石となろう。

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 7 件)

- ① Iwakawa, H., Mizumoto, H., Nagano, H., Imoto, Y., Takigawa, K., Sarawaneeyaruk, S., H., Kaido, M., Mise, K. and Okuno, T. A Viral Non-coding RNA Generated by *cis*-Element-mediated Protection against 5'→3' RNA Decay Represses Both Cap-independent and Cap-dependent Translation. *J. Virol.* 82 (20) 10162-10174, 2008. 査読有
- ② Okamoto, K., Nagano, H., Iwakawa, H., Mizumoto, H., Takeda, A., Kaido, M., Mise, K., and Okuno, T. *cis*-Preferential requirement of a -1 frameshift product p88 for the replication of *Red clover necrotic mosaic virus* RNA1. *Virology* 375: 205-212, 2008. 査読有
- ③ 奥野哲郎、峯彰、ウイルスと RNA サイレncing、ウイルス、58 (1) 61-68, 2008. 査読なし

- ④ 奥野哲郎、竹田篤史、蛋白質 核酸 酵素、植物における環境と生物ストレスに対する応答、ウイルスと RNA サイレンシング、52(6)、p. 692-697, 2007. 査読なし
- ⑤ Iwakawa, H., Kaido, M., Mise, K. and Okuno, T. *cis*-Acting core RNA elements required for negative-strand RNA synthesis and cap-independent translation are separated in the 3'-untranslated region of *Red clover necrotic mosaic virus* RNA1. *Virology* 369: 168-181, 2007. 査読有
- ⑥ Kaido, M., Y. Inoue, Y. Takeda, K. Takeda, M. Mori, A. Tamai, T. Meshi, T. Okuno, K. Mise. Downregulation of the NbNACa1 gene encoding a movement-protein-interacting protein reduces cell-to-cell movement of Brome mosaic virus in *Nicotiana benthamiana*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20, (6), 671-681, 2007. 査読有
- ⑦ Mizumoto, H., Iwakawa, H., Kaido, M., Mise, K., and Okuno, T. Cap-independent translation Mechanism of *Red clover necrotic mosaic virus* RNA2 differs from that of RNA1 and is linked to RNA replication. *J. Virol.* 80(8): 3781-3791, 2006. 査読有

[学会発表] (計 18 件)

- ① 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* RNA1 の 3' 端非翻訳領域における -1 フレームシフトに必要なシス因子の同定, 日本植物病理学会大会, 2009 年 3 月 27 日, 山形市
- ② 岩川弘宙・安夢楠・峯彰・海道真典・三瀬和之・奥野哲郎. Strepto Tag 法を用いた *Red clover necrotic mosaic virus* RNA2 に存在する複製酵素リクルート因子の同定. 日本植物病理学会大会, 2009 年 3 月 27 日, 山形市
- ③ 峯彰・竹田篤史・海道真典・三瀬和之・奥野哲郎. *Red clover necrotic mosaic virus* 複製酵素タンパク質が形成する複合体の性状解析. 日本植物病理学会大会, 2009 年 3 月 27 日, 山形市
- ④ 峯彰・海道真典・三瀬和之・奥野哲郎. *Red clover necrotic mosaic virus* の非構造

タンパク質 p27 および p88 の相互作用はウイルス複製酵素複合体形成、RNA 複製および RNA サイレンシングの抑制に必要である. 日本植物病理学会大会 2008 年 4 月 27 日松江市

- ⑤ Iwakawa, H., Mizumoto, H., Imoto, Y., Takigawa, K., Sarawaneeyaruk, S., Kaido, M., Mise, K., Okuno, T. A viral non-coding RNA generated by *cis*-element-mediated protection against 5' → 3' decay represses both cap-independent and dependent translation. XIV. International Congress of Virology, Aug. 13, 2008, Istanbul, Turkey.
- ⑥ Mine, A. Takeda, A., Kaido, M., Mise, K., and Okuno T. Interactions between p27 and p88 replicase proteins of *Red clover necrotic mosaic virus* are required for viral RNA replication and RNA silencing suppression. XIV. International Congress of Virology. Aug. 13, 2008, Istanbul, Turkey.
- ⑦ Sarawaneeyaruk, S., Murakami, H., Iwakawa, H., Kaido, M., Mise, K., and Okuno T. Host-specific roles of the 5' untranslated region (UTR) of *Red clover necrotic mosaic virus* RNA1 in cap-independent translation XIV. International Congress of Virology. Aug. 13, 2008, Istanbul, Turkey.
- ⑧ 峯彰・安夢楠・岩川弘宙・海道真典・三瀬和之・奥野哲郎. 複製酵素タンパク質による膜画分への RNA リクルートメントにおける *Red clover necrotic mosaic virus* ゲノム RNA2 3' UTR の役割. 日本ウイルス学会, 岡山市, 2008 年 10 月 26 日
- ⑨ 岩川弘宙・安夢楠・峯彰・海道真典・三瀬和之・奥野哲郎. 分節ゲノムを持つダイアンソウイルスの RNA 複製制御機構. 日本ウイルス学会, 岡山市, 2008 年 10 月 26 日
- ⑩ 峯彰・海道真典・三瀬和之・奥野哲郎. *Red clover necrotic mosaic virus* の非構造タンパク質 p27 および p88 の相互作用はウイルス複製酵素複合体形成、RNA 複製および RNA サイレンシングの抑制に必要である. 日本植物病理学会大会, 2008 年 4 月 27 日, 松江市
- ⑪ 安夢楠・岩川弘宙・海道真典・三瀬和之・奥野哲郎. レッドクローバーネクロティックモザイクウイルス RNA2 の 3' UTR に存在する二つの新規なステムループ構造は RNA2 の複製に重要である. 日本植物病理学会大会, 2008 年 4 月 27 日, 松江市
- ⑫ サラワニヤラック シリラック・岩川弘

- 宙・海道真典・三瀬和之・奥野哲郎. *Red clover necrotic mosaic virus* RNA1 の 3' 翻訳促進因子によるキャップ非依存的翻訳はリボソームスキヤニング機構を利用する. 日本植物病理学会大会, 2008年4月27日, 松江市
- ⑬ 奥野哲郎, RNA複製プロセスを介してRNAサイレンシングを抑制する植物RNAウイルス. 第55回日本ウイルス学会学術集会、シンポジウム、2007年10月23日、札幌市
- ⑭ 峯彰・海道真典・三瀬和之・奥野哲郎、*Red clover necrotic mosaic virus* のRNA複製酵素成分間結合が複製とRNAサイレンシング抑制に与える影響. 第55回日本ウイルス学会学術集会、2007年10月23日、札幌市
- ⑮ 岩川弘宙・海道真典・三瀬和之・奥野哲郎 (2007) *Red clover necrotic mosaic virus* RNA1 の3' 非翻訳領域に由来するSmall RNAの生成機構. 第55回日本ウイルス学会学術集会、2007年10月23日、札幌市
- ⑯ 峯彰・岩川弘宙・竹田篤史・海道真典・三瀬和之・奥野哲郎、共免疫沈降法を用いた*Red clover necrotic mosaic virus* の複製酵素タンパク質間の相互作用の解析. 日本植物病理学会大会, 2007年3月28日, 宇都宮市
- ⑰ サラワニヤック シリラック・岩川弘宙・村上裕美・水本祐之・海道真典・三瀬和之・奥野哲郎、*Red clover necrotic mosaic virus* RNA1 とサブゲノムRNA1aのキャップ非依存性翻訳における5' 非翻訳領域の役割. 日本植物病理学会大会, 2007年3月28日, 宇都宮市
- ⑱ 岩川弘宙・海道真典・三瀬和之・奥野哲郎、*Red clover necrotic mosaic virus* のマイナス鎖RNA合成に小胞体膜は必須か? 日本植物病理学会大会, 2007年3月28日, 宇都宮市

[図書] (計5件)

- ① 奥野哲郎、化学同人、植物生理学 (三村徹郎・鶴見誠二 編) 基礎生物学テキストシリーズ、2009年、病原体に対する植物の防御、p. 174-191.
- ② 田中千尋、奥野哲郎、京都大学学術出版会、生物資源から考える21世紀の農学 (第3巻) 「植物を守る」(佐久間正幸編) 2008年、植物を病気から守る. p. 195-241.
- ③ 奥野哲郎、北海道大学出版会、微生物の病原性と植物の防御応答(上田一郎 編)、2007年、ダイアンソウイルスのRNAサイレンシング抑制機構、p. 203-213.

- ④ Okuno, T. and H. Mizumoto, Transworld Research Network, In Recent Advances in RNA virus replication, ed., K. L. Hefferon. 2006, Replication of *Red clover necrotic mosaic virus*, p247-264.
- ⑤ 奥野哲郎、日本植物病理学会、植物感染生理談話会論文集、2006年、植物ウイルスの感染戦略、p157-167.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥野 哲郎
京都大学・農学研究科・教授
00221151

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし