

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18380029

研究課題名（和文） 植物パラレトロウイルスのポリシストロニック翻訳機構の解明と
その遺伝子工学的応用研究課題名（英文） Analysis and application of polycistronic translation of
plant pararetrovirus

研究代表者

鈴木 匡（SUZUKI MASASHI）

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号：40282694

研究成果の概要：

植物パラレトロウイルスのもつ、1本の mRNA から複数のタンパク質を翻訳するポリシストロニック翻訳機構の解明を行った。その結果、既知のカリフラワーモザイクウイルス P6 と同様、ダイズ退緑斑紋ウイルス P6 のポリシストロニック翻訳を活性化する翻訳トランスアクティベーター（TAV）活性を本研究で初めて証明した。さらに、CaMV P6 の TAV 活性は非宿主でも認められたのに対し、SbCMV P6 の TAV 活性は宿主特異性があることが示された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2007 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2008 年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：植物病理学

キーワード：植物パラレトロウイルス、ポリシストロニック翻訳

1. 研究開始当初の背景

パラレトロウイルスは、複製過程で DNA、RNA 両核酸の形をとり、逆転写酵素を持つウイル

スで、ゲノムが DNA であるものをいう（図1）。ゲノム DNA から 19S mRNA と、35S mRNA が転写される。35S mRNA は、ポリシストロニック

翻訳機構により5種類のタンパク質に翻訳され、その翻訳の活性化は 19S mRNA から翻訳される ORF VI にコードされる P6 の翻訳トランスアクティベーター (TAV) 活性に依存している (図2)。植物パラレトロウイルスは大きくカリモウイルス科に分類されており、もっとも研究されているのはカリモウイルス属のカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) である。すでに P6 の TAV 活性が証明されており、P6 と相互作用する宿主タンパク質として、リボソームラージサブユニットを構成するタンパク質が同定されていた。一方、ソイモウイルス属のダイズ退緑斑紋ウイルス (SbCMV) では、詳細な研究がされていなかった。

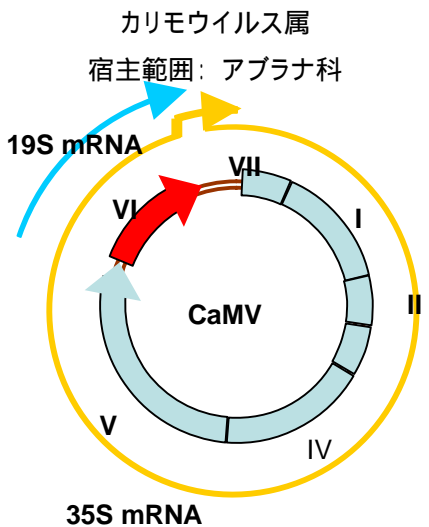
また、植物パラレトロウイルスの宿主特異性は P6 が決定することが示唆されていたが、それが TAV 活性によるものなのかは、全く知見がなかった。

2. 研究の目的

宿主の異なるパラレトロウイルスとして、CaMV と SbCMV を用いて、それらの P6 の TAV 活性を宿主植物、非宿主植物で解析し、パラレトロウイルスの宿主決定機構を明らかにするとともに、得られた知見を応用して植物における新たなポリシストロニック翻訳系を構築することを目的とする。

P6 の TAV 活性検定には、構成的発現プロモーター下流に、第二 ORF に CAT 遺伝子を挿入したプラスミドを構築し、P6 遺伝子をクローニングしたプラスミド (図3) とともに植物へ共導入するのが一般的であった。本研究では、非常に感度が高く、定量的な測定が可能な、ホタルルシフェラーゼ (Fluc) を第二 ORF に挿入した。さらに、導入した植物細胞の活性の高低は、内部標準として構成的発現プロモーターである 35S プロモーター下流にウミシイタケルシフェラーゼ (Rluc) を挿入し、両者に特異的に発光検出可能な基質を加えてルミノメーターで検出し、(Fluc の値/Rluc の値) で TAV 活性を評価した (図4)。

Cauliflower mosaic virus (CaMV)



Soybean chlorotic mottle virus (SbCMV)

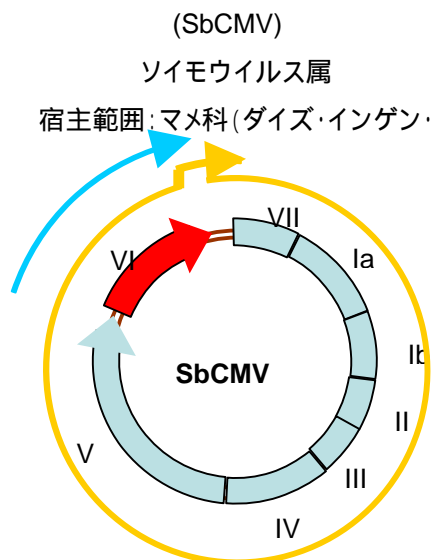


図1 CaMV と SbCMV のゲノム構造

3. 研究の方法

遺伝子導入には、遺伝子銃を用いた。CaMV の宿主で SbCMV の宿主ではないシロイヌナズナ、SbCMV の宿主で CaMV の非宿主であるインゲン等さまざまな植物種に導入し、TAV 活性を評価した。

また、TAV 活性に関与する宿主タンパク質の探索として、SbCMV P6 と相互作用するインゲンのタンパク質のスクリーニングは、Gal4 システムを用いた酵母 two hybrid 法を用いた。

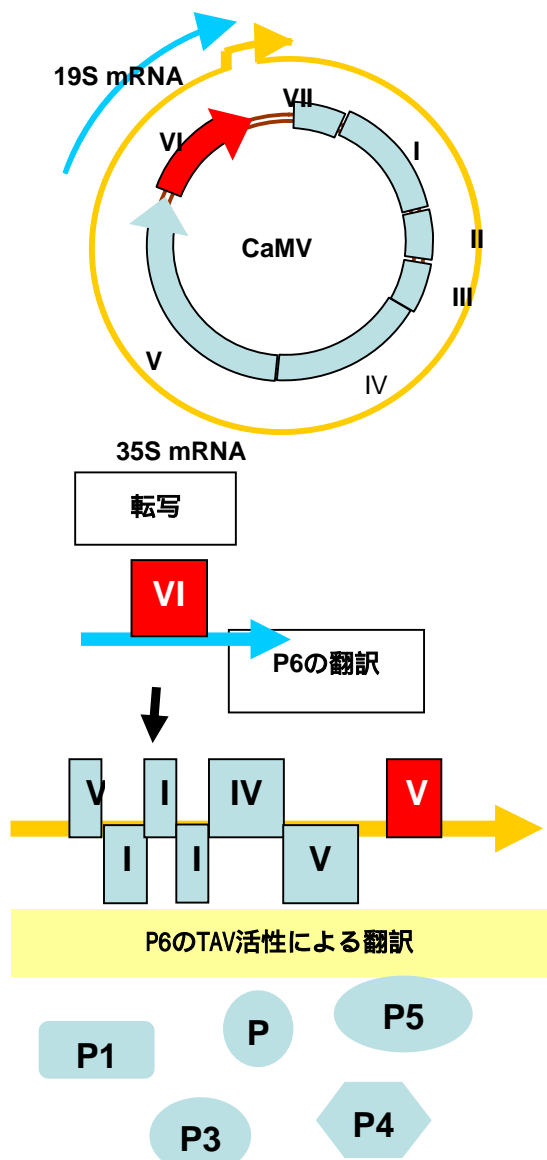


図2. 植物パラレトロウイルスの翻訳機構

4. 研究成果

(1) 内部標準として 35S プロモーターにウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子 (Fluc) を連結したコンストラクトを用い、インゲン葉にボンパードメントすると、第二 ORF の Fluc の活性は見られなかったが、SbCMV ゲノムや SbCMV の P6 を共導入すると、Fluc の活性は上昇し、SbCMV の P6 が TAV 活性を持つことが

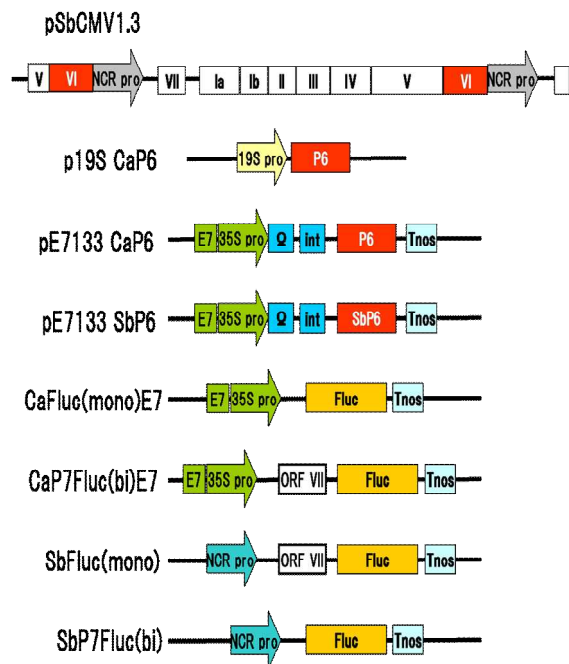


図3 植物に導入したコンストラクト

証明できた。さらに、SbCMV の非宿主である *Nicotiana benthamiana* へ同様に共導入しても Fluc の活性は見られなかったことから、SbCMV の P6 は非宿主では TAV 活性がないことが示唆された。

(2) 同様の TAV 活性検定の系を用いてシロイヌナズナやカブに感染する CaMV が、様々な植物で TAV 活性があるか検証を行った。その結果、CaMV の P6 は、宿主植物であるシロイヌナズナやカブでは高い TAV 活性を示したが、非宿主植物であるインゲンでも TAV 活性を有することが確認された。

(3) TAV 活性に関与する宿主因子候補として数種リボソームタンパク質が P6 と相互作用することが示唆されていた。本研究では SbCMV P6 と相互作用するタンパク質が数百ほどスクリーニングされた。これらすべてが P6 と in vivo で相互作用するのかわ不明だが、いくつかインゲンのリボソームタンパク質が含まれていた。そこで、CaMV P6 がインゲンでも TAV 活性を示したことから、酵母 two hybrid 法で CaMV P6 とインゲンリボソームタンパク質のシロイヌナズナのホモログが相互作用するのではないかと考え、検定した。しかし、CaMV P6 とは相互作用しなかった。

以上のことから、SbCMV では P6 の TAV 活性は宿主特異性に関与するが、CaMV では関与しないことが示唆された。そのため、ポリシストロニック遺伝子発現系の構築にはさらなる解析が必要であることが示唆されたが、応用面では CaMV P6 を用いることで適用植物が広がることが期待された。

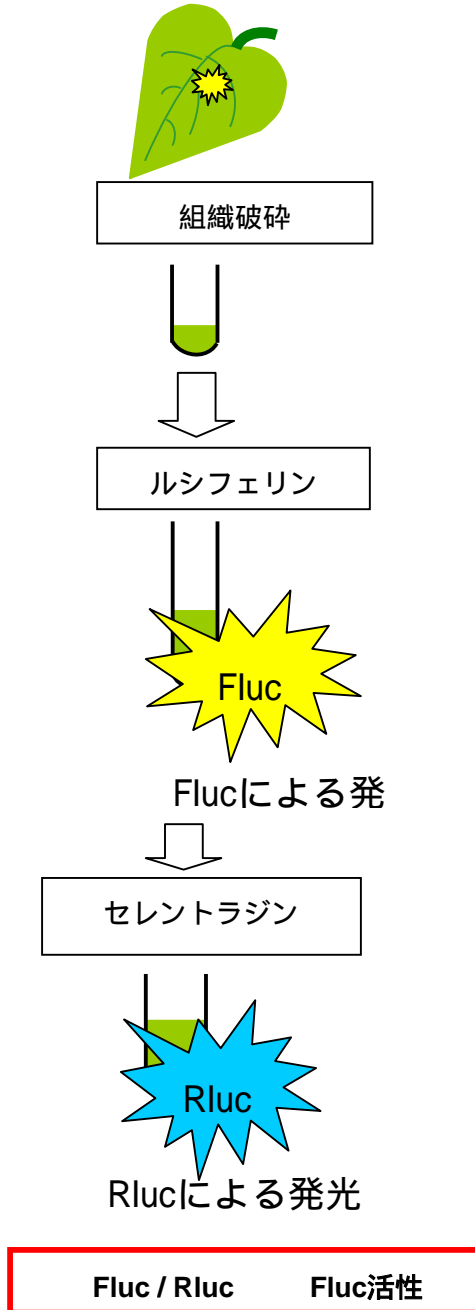


図4. Dual luciferase assay

最近、P6 にサイレンシングサプレッサー活性があることが示された。そのため、CaMV では宿主特異性は P6 の TAV 活性以外の機能が宿主特異性に関与する可能性が示唆され、さら

なる解析が必要であることが示された。

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 4 件)

(1) Takeshita, M., Matsuo, Y., Suzuki, M., Furuya, N., Tsuchiya, K. and Takanami, Y. Impact of a defective RNA 3 from Cucumber mosaic virus on helper virus infection dynamics. *Virology*, 印刷中 査読有

(2) Yoshii A., Shimizu T., Yoshida, A., Hamada, K., Sakurai, K., Yamaji Y., Suzuki M., Namba, S. and Hibi T. NTH201, a novel class II KNOTTED1-like protein, facilitates the cell-to-cell movement of Tobacco mosaic virus in tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 21 (5), 586-596. 2008. 査読有

(3) Netsu, O., Hiratsuka, K., Kuwata, S., Hibi, T., Ugaki, M. and Suzuki, M. Peanut stunt virus 2b cistron plays a role in viral local and systemic accumulation and virulence in *Nicotiana benthamiana* *Archives of Virology*, 153 (9), 1731-1735. 2008. 査読有

(4) Takeshita, M., Matsuo, Y., Yoshikawa, T., Suzuki, M., Furuya, N., Tsuchiya, K. and Takanami, Y. Characterization of a defective RNA derived from RNA 3 of the Y strain of cucumber mosaic virus. *Archives of Virology*, 153, 579-583, 2008. 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

(1) 根津 修・平塚和之・桑田 茂・日比忠明・宇垣正志・鈴木 匡 ラッカセイわい化ウイルス(PSV) 2b タンパク質の N 末端領域欠失による RNA サイレncing のサプレッサー能への影響 日本植物病理学会 2009年3月、山形市

(2) Netsu, O., Hiratsuka, K., Kuwata, S., Hibi, T., Ugaki, M. and Suzuki, M. Functions of the 2b protein of Peanut stunt virus in viral replication, movement and pathogenicity. XIV. International Congress of Virology. 2008年8月、イスタンブール

(3) Ueno, T., Suzuki, M. and Ugaki, M. (2008). Phylogenetic analysis of *Tomato yellow leaf curl virus* isolates occurring in central Japan. XIV. International Congress of Virology. 2008年8月、イスタンブール

(4) 根津 修・平塚和之・桑田 茂・日比忠明・宇垣正志・鈴木 匡 ラッカセイわい化ウイルス(PSV) 2bタンパク質のRNAサイレンシングのサブレッサー能解析 日本植物病理学会 2007年3月、宇都宮市

(5) 塩田 聡・大谷 肇・根津 修・鈴木 匡・桑田 茂 キュウリモザイクウイルス(CMV)2bタンパク質とジャガイモYウイルス(PVY) HC ProとのRNAサイレンシング抑制能の比較. 日本植物病理学会 2007年3月、宇都宮市

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 匡 (SUZUKI MASASHI)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号：40282694

(2)研究分担者

(3)連携研究者

宇垣 正志 (UGAKI MASASHI)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：20323438

日比 忠明 (HIBI TADAAKI)

法政大学・生命科学部・教授

研究者番号：50261954