

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19380031
 研究課題名（和文） トマトモザイクウイルス複製タンパク質によるRNAサイレンシング抑制機構の解析
 研究課題名（英文） Studies on the mechanisms of RNA silencing suppression by the replication protein of Tomato mosaic virus.
 研究代表者
 飯 哲夫（Meshi Tetsuo）
 独立行政法人 農業生物資源研究所 植物科学研究領域 領域長
 研究者番号：40157813

研究成果の概要：

植物のRNAサイレンシング誘起の初期過程において、small interfering RNA (siRNA)は2本鎖RNA切断酵素DCLの働きにより作られ、HEN1によりメチル化される。DCLとHEN1が複合体を形成している可能性を検討したが、結果は否定的であった。これは、トマトモザイクウイルスの複製タンパク質が、生成後遊離した非メチル化2本鎖siRNAを競合的に奪取して、HEN1によるメチル化を介したRNAサイレンシング経路への流入を阻害している可能性と矛盾しない結果であった。また、試験管内合成したAGO1タンパク質が細胞抽出液中に存在する因子の助けを借りて遊離の2本鎖siRNAを取り込み、siRNA配列に特異的な標的RNA切断活性を現しうることを示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2008年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

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：感染生理、ウイルス、RNAサイレンシング

1. 研究開始当初の背景

植物は、病原体の攻撃を察知して種々の防御反応を誘起する。RNAサイレンシングは、植物がウイルスに対して示す主要な防御反応である。一方、ウイルスは、RNAサイレンシングのサプレッサーをコードし、これを発現することにより、持続的な増殖を遂げ

る。このせめぎ合いは、ウイルスの病徴の激しさや質を大きく左右する。従って、いかにしてRNAサイレンシングが誘起され、ウイルスがそれを回避しているかが理解できれば、広範な作物とウイルスの組み合わせに適用可能なウイルス病害低減策を打ち立てることができる可能性がある。

植物ウイルスに対して RNA サイレンシングが誘起される過程は以下のように考えられている。先ずウイルス RNA が未知の機構により 2 本鎖 RNA に変換され、2 本鎖 RNA 特異的 Dicer 様エンドヌクレアーゼ DCL2 あるいは DCL4 により、それぞれ 22 あるいは 21 ヌクレオチド (nt) の 2 本鎖 RNA (small interfering RNA: siRNA) を生じる。次いで siRNA の 3' 末端リボースの 2'-OH 基が、メチル化酵素 HEN1 によりメチル化され、AGO タンパク質に取り込まれ RNA-induced silencing complex (RISC) を形成し、標的 (ウイルス RNA) を分解する。動物の系において siRNA は、Dicer によって生じ AGO タンパク質に結合するまでタンパク質複合体中を受け渡されてゆくと考えられている。

ウイルスの RNA サイレンシングサプレッサーは、大きさやアミノ酸配列において共通性が見いだされないほど多様であり、作用機作も多岐にわたることが想像されてきた。しかし一方で、多くのウイルスの RNA サイレンシングサプレッサーが共通して 2 本鎖 siRNA に結合する能力をもち、これが RNA サイレンシングの抑制に重要であることが提唱されている。

トバモウイルス (ToMV を含む一群のウイルスの総称) においては、RNA 複製を司る 130K タンパク質が 2 本鎖 siRNA に結合する能力をもち、RNA サイレンシングのサプレッサーとして機能することがわかっている。さらに、感染細胞中で複製タンパク質は膜に結合した状態と結合していない状態の 2 つの様態をとっており、前者は RNA 合成に関与し、後者 (非膜結合=可溶性) 複製タンパク質は RNA サイレンシングサプレッサーとして機能していること；また、感染植物細胞内に蓄積した siRNA のメチル化の程度が低いことが明らかになっている。これらの結果から、トバモウイルスの 130K タンパク質は、DCL2 あるいは DCL4 によって 2 本鎖 siRNA が作られたあと、HEN1 によってメチル化される前の段階で 2 本鎖 siRNA を奪取し、RISC 形成を阻害すると予想された。ここで、RNA サイレンシングサプレッサーが容易に 2 本鎖 siRNA を奪取できるとすれば、2 本鎖 siRNA は RISC 形成経路において一旦遊離した状態を経るのか？あるいは、RISC 形成経路において 2 本鎖 siRNA がタンパク質複合体中を受け渡されてゆくなれば、RNA

サイレンシングサプレッサーはいかにして 2 本鎖 siRNA にアクセスするのか？という疑問が生じた。

2. 研究の目的

本研究は、130K タンパク質による RNA サイレンシング抑制機構の理解に向けて、先ずは RNA サイレンシングの誘起機構自体を解明することを目的とした。特に、非メチル化 2 本鎖 siRNA が DCL により作られたあと、HEN1 によってメチル化される前に、130K タンパク質が遊離の 2 本鎖 siRNA を奪取することにより RISC 形成を阻害する、という仮説の正当性を評価することに主眼を置いた。

3. 研究の方法

siRNA の生成、修飾 (メチル化) および標的 RNA の切断に関わるタンパク質 (複合体) の生化学的な性状解析を行う。これにあたり、解析対象となる細胞抽出液へのプロテアーゼあるいは非特異的ヌクレアーゼの混入は致命的である。植物細胞にはヌクレアーゼやプロテアーゼを多量に含む液胞が存在するため、細胞を直接破碎したのではこれらの因子を解析することは困難である。そこで、本研究では、非特異的ヌクレアーゼおよびプロテアーゼ活性の低い脱液胞化タバコ BY-2 プロトプラスト抽出液 (BYL) を用いて RNA サイレンシング関連活性およびタンパク質の解析を行った。また、必要に応じ、BYL を用いた試験管内翻訳反応により合成した RNA サイレンシング関連タンパク質を用いた。

4. 研究成果

(1) 植物において RNA サイレンシングに関わることが知られているタンパク質 (DCL2, DCL4, HEN1, AGO1) が BYL 中でどのような複合体を形成しているのかを明らかにする目的で、これらのタンパク質に対する抗体の作製を試みた。大腸菌で発現し精製した各タンパク質の部分断片を抗原として、ウ

サギを免疫した。HEN1およびAGO1については、抗血清を用いてBYLに含まれる内在性のタンパク質が検出できたが、DCLタンパク質は検出できなかった。

(2) 二本鎖 siRNA の生成にかかわる DCL とメチル化酵素 HEN1 の間に 130K タンパク質が介入できるかについての情報を得るために、DCL と HEN1 が複合体を形成しているかを検討した。前項で HEN1 を特異的に認識する抗体が作製できた。DCL については抗体が得られなかったため、DCL タンパク質を直接検出することはできなかった。そこで、³²P 標識した長鎖 2 本鎖 RNA を 2 本鎖 siRNA に変換する活性を指標にして DCL タンパク質の存在を推定することにした。BYL の抗 HEN1 抗体による免疫沈降物あるいは BYL を用いた試験管内翻訳反応により合成した HEN1-FLAG の抗 FLAG 抗体による免疫沈降物に長鎖 2 本鎖 RNA を添加したが、顕著な siRNA の産生はみられなかった。この結果は、HEN1 が DCL タンパク質と結合していることを示唆するものではなかった。なお、抗 FLAG 抗体で精製した HEN1-FLAG は、2 本鎖 siRNA をメチル化する活性をもっていた。このことから、メチル化活性発現に補助因子が必須ならば、HEN1-FLAG と共精製されることが予想された。そこで、精製画分に含まれるタンパク質を SDS-PAGE と銀染色で調べたが、HEN1-FLAG タンパク質以外には HEN1-FLAG mRNA を翻訳しなかったコントロールサンプルと異なるバンドは見いだされなかった。HEN1 タンパク質が、単独でフリーの 2 本鎖 siRNA をメチル化しているとすれば、フリーの二本鎖 siRNA をめぐって HEN1 と 130K タンパク質との間で競合が起きることが予想された。

(3) 我々は、研究の過程で、BYL を用いた試験管内翻訳反応により AGO1 を合成し、合成メチル化 2 本鎖 siRNA を添加すると、対応する RNA-induced silencing complex (RISC) が形成され

ることを見いだした。このとき、アフィニティー精製した AGO1 タンパク質に 2 本鎖 siRNA を添加しても RISC は形成されなかったが、精製した AGO1 タンパク質を BYL と混合してから 2 本鎖 siRNA を添加すると RISC が形成されたことから、2 本鎖 siRNA の AGO1 へのローディングを補助する因子が BYL 中に存在することが示唆された。さらに、BYL には内在性の HEN1 活性が存在し、合成非メチル化 2 本鎖 siRNA を添加すると急速にメチル化され、AGO1 タンパク質存在下ではメチル化 siRNA と同様に RISC を形成した。この実験系は、130K タンパク質が優先的に遊離 2 本鎖 siRNA に結合し、HEN1 によるメチル化を阻害する可能性を検討するために有用と考えられ、現在この系を利用した解析を進めている。

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 6 件)

Sasaki N., Ogata T., Deguchi M., Nagai S., Tamai A., Meshi T., Kawakami S., Watanabe Y., Matsushita Y., Nyunoya H. (2009). Over-expression of putative transcriptional coactivator KERP interferes with Tomato mosaic virus cell-to-cell movement. *Molecular Plant Pathology* 10 (2): 161-173.

Hagiwara-Komoda, Y., Hirai, K., Mochizuki, A., Nishiguchi, M., Meshi, T., Ishikawa, M. (2008). Overexpression of a host factor TOM1 inhibits tomato mosaic virus propagation and suppression of RNA silencing. *Virology* 376 (1): 132-139.

Hirai K., Kubota K., Mochizuki T., Tsuda S., Meshi, T. (2008). Antiviral RNA silencing is restricted to the marginal region of the dark green tissue in the mosaic leaves of Tomato mosaic virus-infected tobacco plants. *J. Virol.* 82 (7): 3250-3260.

Tsuda S., Kubota K., Kanda A., Ohki T.,

Meshi T. (2007). Pathogenicity of Pepper mild mottle virus is controlled by the RNA silencing suppression activity of its replication protein but not the viral accumulation. *Phytopathology* 97 (4): 412-420.

Kaido M., Inoue Y., Takeda Y., Sugiyama K., Takeda A. Mori M., Tamai A., Meshi T., Okuno T., Mise K. (2007). Downregulation of the NbNACa1 gene encoding a movement-protein-interacting protein reduces cell-to-cell movement of Brome mosaic virus in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20 (6): 671-681.

平井克之、玉井淳史、薦田（萩原）優香、飯哲夫、石川雅之 (2007). 「植物ウイルスの全身感染と RNA サイレンシング」 蛋白質核酸酵素 52 (10): 1248-1253.

〔学会発表〕 (計 4 件)

飯哲夫 (2009) 環境の中の植物 第 56 回応用物理学関係連合学術講演会講演 予稿集

石川雅之 (2008) トバモウイルスの宿主攻略戦略 植物科学シンポジウム「植物の力を人類の未来に活用する」 要旨集 pp. 16

平井克之、久保田健嗣、望月知史、津田新哉、飯哲夫 (2008) ウイルス感染によるタバコのモザイクパターン形成機構の解析 第 49 回日本植物生理学会年会講演 演要旨集: #345

平井克行、津田新哉、飯哲夫 (2007) トバモウイルス感染によるタバコモザイク病の病徴発現過程における RNA サイレンシングの役割 第 55 回日本ウイルス学会学術集会 抄録集: #349

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯 哲夫 (Meshi Tetsuo)
(独) 農業生物資源研究所 植物科学研究領域・領域長
研究者番号: 4 0 1 5 7 8 1 3

(2) 研究分担者

石川 雅之 (Ishikawa Masayuki)
(独) 農業生物資源研究所 植物・微生物間相互作用研究ユニット・上級研究員
研究者番号: 7 0 1 9 2 4 8 2