

平成 21 年 5 月 11 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007-2008  
 課題番号：19580046  
 研究課題名（和文） 非破壊定量システムを利用したダイアンソウイルス増殖関連  
 宿主遺伝子の単離  
 研究課題名（英文） Isolation of host factor genes involved in the multiplication of  
 dianthvirus using non-destructive quantification system  
 研究代表者 海道真典 (KAIDO MASANORI)  
 京都大学・大学院農学研究科・助教  
 研究者番号：20314247

研究成果の概要：マメ科植物の重要病害ウイルスである *Red clover necrotic mosaic virus* (RCNMV) の細胞間移行過程において中心的な役割を演ずる移行タンパク質 (MP) の細胞内での局在性とその機構を詳細に調べた。MP は自身の C 末端 68 アミノ酸を通じて小胞体膜に RCNMV 複製酵素と共局在し、それは RCNMV ゲノム複製には影響しないが、細胞間移行にとって必須の過程であることを明らかにした。さらに RCNMV MP と細胞内で相互作用する宿主因子タンパク質を免疫沈降法によって精製できることを明らかにした。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：植物病理学

キーワード：植物ウイルス・細胞間移行・小胞体膜・細胞内局在性・宿主因子

## 1. 研究開始当初の背景

ウイルスはごく限られた数の遺伝子しかコードしておらず、その増殖の各過程において宿主タンパク質をハイジャックしてこれと協調して自身の増殖に利用する。本研究を申請した 2006 年の段階で、植物ウイルスの増殖に関与する宿主因子として、数例の報告があったのみで、植物ウイルスの増殖戦略の多様性を考えたとき、その数は絶対的に不足していた（今も状況に大きな変化はないが）。

宿主因子遺伝子の探索法として最も確実性が高いのは、ゲノムサイズの小さなモデル

生物に変異処理を施し、変異体の中からウイルス感染性が増大あるいは減少した変異体を選抜し、原因遺伝子（変異遺伝子）を特定するという遺伝学的な手法である。しかし膨大な数のシロイヌナズナ植物体にウイルスを接種する作業は多大な労力が必要な上、失敗なく確実にウイルスを感染させることは意外に難しいため、擬陽性の個体が多数得られてしまい、接種実験にかかる労力をさらに大きくしてしまうという問題点があった。さらに、ウイルス増殖量を簡便かつ定量的に調べるというシステムが無かったために、多数

のウイルス接種植物から核酸あるいはタンパク質を抽出してノーザンあるいはウェスタン分析を行うという多大な労力が必要であった。これらが大きな阻害要因となって、宿主遺伝子の解明は進んでいなかった。

## 2. 研究の目的

*Red clover necrotic mosaic virus* (RCNMV) は *Tombusviridae* 科に属する二分節型ゲノム構造をとる(+)鎖 RNA ウイルスである。RCNMV はゲノム RNA1 と RNA2 の間の分子間相互作用を介したサブゲノム RNA 合成機構という非常にユニークな遺伝子発現機構をもつ。さらに申請者らはこのウイルスが、自身のゲノム RNA 複製と関連する RNA サイレンシング抑制機構という、他に類例のないサイレンシング抑制活性を有することや、感染細胞においてキャップとポリ A 配列を持たないゲノム RNA1 が、3'末端の非翻訳領域の働きによってタンパク質翻訳を行うというメカニズムを、ウイルス側からのアプローチによって明らかにしてきた。これらの研究結果を受けて、RCNMV の翻訳および複製に関与する宿主植物因子の解明が研究の更なる進展にとって必要となってきた。

そのため、変異処理を施したシロイヌナズナ植物からウイルス増殖レベルが減少した変異個体を同定し、さらに変異遺伝子を特定するという従来の遺伝学的手法を大幅に改良した手法を確立し、RCNMV の翻訳と複製の段階に関与する宿主植物遺伝子を同定することを目的として研究を行った。

## 3. 研究の方法

ウイルス接種の手間を省き、さらに接種ミスによる擬陽性個体の選抜を防ぐために、RCNMV の一細胞レベルでの増殖に必須ではない外被タンパク質 (CP) 遺伝子をホタルのルシフェラーゼ遺伝子と置き換えた組み換え RCNMV を 35S プロモーター下流から発現するような形質転換シロイヌナズナ植物を作出した。

これを 96 穴の組織培養用プレートの寒天培地上に播種し、25°C で生育させた植物体を 17°C に移して組み換えウイルスの複製を誘導してルシフェラーゼを発現させ、その後これにルシフェリンを噴霧し、発光の様子を LAS1000 イメージングアナライザーで定量化した。

RCNMV の移行タンパク質 (MP) の細胞内局在の観察では、MP と緑色蛍光タンパク質 (GFP) との融合タンパク質 (MP:GFP) の遺伝子を CP 遺伝子と置換した組み換えウイルス RNA を *in vitro* で転写し、*N.*

*benthamiana* 植物に機械接種した。また MP:GFP と種々の RCNMV 成分を、アグロバクテリウムを介した一過的発現システムによって *N. benthamiana* 植物に接種した。そして共焦点レーザー顕微鏡観察によって細胞内局在性を決定した。さらに、親水性アミノ酸残基に富む MP の C 末端を 10~70 アミノ酸まで欠失させた変異 MP と GFP との融合タンパク質を発現するような組み換え RCNMV を作製して、*in vitro* 転写産物を *N. benthamiana* 植物に接種し、その細胞内局在性と細胞間移行能を、共焦点レーザー顕微鏡観察によって調べた。

また RCNMV MP と相互作用する宿主植物因子の探索計画では、MP の C 末端に Flag 配列-3C protease 認識配列-HA 配列という 3 種のアミノ酸配列をタンデムに配したような組み換えウイルスの cDNA を作製し、アグロバクテリウムを介して *N. benthamiana* 植物に注入して大量に発現させた。この葉から可溶性タンパク質画分を精製し、まず抗 HA 抗体による免疫沈降を行い、次にプロテアーゼ処理を行い、さらに抗 Flag 抗体による免疫沈降操作を行い、MP を含む画分を高度に精製し、そこに宿主因子タンパク質候補と見られる複数のバンドを検出した。

## 4. 研究成果

(1) 当初の目的である組み換え RCNMV 発現シロイヌナズナを利用したウイルス複製解析システムは成功せず、ウイルス増殖関連宿主因子遺伝子の探索計画は頓挫した。その原因は、形質転換シロイヌナズナにおける組み換え RCNMV の複製が極端に低いレベルに留まり、ルシフェラーゼ活性による発光が検出できなかったことによる。

組み換え RCNMV を発現する形質転換用ベクター DNA を、アグロバクテリウムを介して *N. benthamiana* 葉に注入したところ、ルシフェラーゼが発現し、注入葉へのルシフェリン基質の噴霧によって発光を容易に検出することができた。それにも拘わらず形質転換シロイヌナズナ植物では発光を検出できなかったのは、おそらく野生型ウイルスと比較して複製能力が低下した組み換え RCNMV を導入遺伝子から転写する形質転換植物細胞内では、野生型と比較してゆっくりと複製過程が進行し、したがって RCNMV が持つ複製依存的な RNA サイレンシング抑制活性を十分に発揮することができずに組み換え RCNMV RNA 分子が分解されてしまったものと考えられる。

(2) RCNMV の細胞間移行機構を分子レベルで明らかにする目的で、RCNMV 移行タンパク質 (MP) の *N. benthamiana* 植物細胞における細胞内局在性について詳細に調べた。

MP と GFP との融合タンパク質 (MP:GFP) を発現する組み換えウイルスの接種実験から、MP:GFP の局在部位として原形質連絡系が存在する細胞壁とともに表層小胞体 (ER) が同定され、さらに同所において RCNMV の複製酵素成分タンパク質 p27 と共局在する性質をもつことがわかった。興味深いことに MP:GFP を単独で一過的に発現させた場合には、ER には局在せずに専ら細胞壁にのみ局在することがわかった。ウイルス感染と単独発現の違いによって MP の細胞内局在性が変化するという報告例は無い。そこで MP:GFP と共に様々な組み合わせの RCNMV 成分を共発現させ、MP:GFP を ER へ誘導する RCNMV 因子を探索したところ、(MP をコードしていない) RNA1 の複製が起きる条件下でのみ MP:GFP が ER へ誘導されるという結果を得た。RCNMV 複製酵素成分タンパク質 (p27 および p88 タンパク質) はそれら自身が ER 局在性を有するが、これらのタンパク質自体には MP:GFP を ER へリクルートする能力はなかったことから、RCNMV MP は複製酵素複合体に含まれる宿主タンパク質と相互作用するということが強く示唆された。この現象のウイルス学的意義について調べるために、ER 局在性を失わせるような C 末端欠失 MP を発現する組み換えウイルスを作製し、植物に接種したところ、変異 MP の ER 局在性の喪失と組み換え RCNMV の細胞間移行能の喪失が平行関係にあることがわかった。C 末端欠失 MP は細胞壁への局在性もタンパク質の安定性も、野生型 MP と同レベルであり、また MP は RCNMV ゲノム RNA の複製には全く関与しないことから、RCNMV MP の ER 局在性はウイルスの細胞間移行戦略にとって必須の過程であることが強く示唆された。現在、変異 MP の原形質連絡排除限界増大能力が落ちていない (傍証は得ている) ことを確認するための particle bombardment 実験を準備している。

細胞壁への移行タンパク質の局在は多くのウイルスで報告されており予想通りの結果であるが、ER への MP 局在は数種類のウイルスで報告されているのみであり、また MP の ER への局在性がウイルスゲノムの複製によって誘導されるという報告は全く新規なものである。また MP の ER 局在性および複製酵素との共局在性の、ウイルス感染における意義は明らかになっておらず、この研究で得られた知見は植物ウイルスの感染機構の解明にとって非常に重要なものと言える。

(3) ウイルス解析と平行して、RCNMV の細胞間移行に関与する宿主因子を同定する目的で、Tandem Affinity Purification 用のタグ配列を付加した MP を発現する組み換え

RCNMV を感染させた *N. benthamiana* 葉から 2 段階免疫沈降法による MP の精製を行い、*in vivo* において MP と結合する能力を有する複数の宿主因子候補タンパク質を得た。近日中に候補タンパク質の質量分析を行い、遺伝子を同定する予定である。これらについては大量発現および発現抑制形質転換植物を作出してその機能について詳しく解析する予定である。

## 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)

- ① K. Fujisaki, F. Iwahashi, M. Kaido, T. Okuno and K. Mise (2009) Genetic analysis of a host determination mechanism of bromoviruses in *Arabidopsis thaliana*. *Virus Research* 140, 103-111. 査読有
- ② H. Iwakawa 他8名、7番目(2008) A viral noncoding RNA generated by cis-element-mediated protection against 5' → 3' RNA decay represses both cap-independent and cap-dependent translation. *Journal of Virology* 82, 10162-10174. 査読有
- ③ K. Okamoto, H. Nagano, H. Iwakawa, H. Mizumoto, A. Takeda, M. Kaido, K. Mise and T. Okuno (2008) cis-Preferential requirement of a -1 frameshift product p88 for the replication of *Red clover necrotic mosaic virus* RNA1. *Virology* 375, 205-212. 査読有
- ④ H. Iwakawa, M. Kaido, K. Mise and T. Okuno (2007) 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. 査読有

- ⑤ N. Akamatsu, A. Takeda, M. Kishimoto, M. Kaido, T. Okuno and K. Mise (2007) Phosphorylation and onteraction of the movement and coat proteins of Brome mosaic virus in infected barley protoplasts. *Archives of Virology* 152, 2087-2093. 査読有
- ⑥ M. Kaido 他9名、1番目 (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, 671-681. 査読有

[学会発表] (計 20 件)

- ① 海道真典・築野靖子・三瀬和之・奥野哲郎 *Red clover necrotic mosaic virus* (RCNMV) 移行タンパク質 (MP) の ER 局在性は細胞間移行に影響する 平成 21 年度日本植物病理学会大会 2009. 3. 27 山形県山形市
- ② S. Sarawaneeyaruk, H. Iwakawa, M. Kaido, K. Mise and T. Okuno Host-deendent roles of the 5' untranslated region (UTR) of *Red clover necrotic mosaic virus* (RCNMV) RNA1 in cap-independent translation mediated by its 3' UTR 平成 21 年度日本植物病理学会大会 2009. 3. 27 山形県山形市
- ③ 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 平成 21 年度日本植物病理学会大会 2009. 3. 27 山形県山形市
- ④ 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 平成 21 年度日本植物病理学会大会 2009. 3. 27 山形県山形市
- ⑤ 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 平成 21 年度日本植物病理学

会大会 2009. 3. 27 山形県山形市

- ⑥ 檜林大樹・海道真典・奥野哲郎・三瀬和之 *Melandrium yellow fleck virus* (MYFV) RNA3 の 5' 非翻訳領域内に存在する短い open reading frame (ORF) がウイルス感染に与える影響 平成 21 年度日本植物病理学会大会 2009. 3. 27 山形県山形市
- ⑦ 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 第 56 回日本ウイルス学会学術集会 2008. 10. 26 岡山県岡山市
- 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面分への 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 第 56 回日本ウイルス学会学術集会 2008. 10. 26 岡山県岡山市
- ⑨ M. Kaido, Y. Tsuno, K. Mise and T. Okuno ER-targeting of *Red clover necrotic mosaic virus* movement protein is dependent on the viral RNA replication. XIV. International Congress of Virology 2008 Aug. 13 Istanbul, Turkey
- ⑩ H. Iwakawa, H. Mizumoto, Y. Imoto, K. Takigawa, S. Sarawaneeyaruk, M. Kaido, K. Mise, T. Okuno 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 2008 Aug. 13 Istanbul, Turkey
- ⑪ A. Mine, A. Takeda, M. Kaido, K. Mise and T. Okuno 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 2008 Aug. 13 Istanbul, Turkey
- ⑫ S. Sarawaneeyaruk, H. Murakami, H. Iwakawa, M. Kaido, K. Mise and T. Okuno 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 2008 Aug. 13 Istanbul, Turkey
- ⑬ 築野靖子・三瀬和之・奥野哲郎・海道真典 *Red clover necrotic mosaic virus* RNA の複製は移行タンパク質の細胞内局在性に影響する 平成 20 年度日本植物病理学会大会 2008. 4. 27 島根県松江市
- ⑭ 岩川弘宙・水本祐之・海道真典・三瀬和之・奥野哲郎 *Red clover necrotic mosaic*

virus RNA1 に由来するノンコーディング RNA の生成メカニズムと機能解析 平成 20 年度日本植物病理学会大会 2008. 4. 27 島根県松江市析

- ⑮ 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 平成 20 年度日本植物病理学会大会 2008. 4. 27 島根県松江市
- ⑯ 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 平成 20 年度日本植物病理学会大会 2008. 4. 27 島根県松江市
- ⑰ 永野秀昭・井本裕佳・海道真典・三瀬和之・奥野哲郎 カーネーションリングスポットウイルスのゲノム RNA3' 末端配列のウイルス感染性における意義 平成 20 年度日本植物病理学会大会 2008. 4. 27 島根県松江市
- ⑱ 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 平成 20 年度日本植物病理学会大会 2008. 4. 27 島根県松江市
- ⑲ 檜林大樹・海道真典・奥野哲郎・三瀬和之 *Melandrium yellow fleck virus* (MYFV) RNA3 の 5' 非翻訳領域の反復配列は *Nicotiana benthamiana* での全身感染に必須ではないがウイルスの感染競合に影響する 平成 20 年度日本植物病理学会大会 2008. 4. 27 島根県松江市
- ⑳ 岩橋福松・林瑞恵・猿渡洋介・檜林大樹・海道真典・奥野哲郎・三瀬和之 *Spring beauty latent virus* (SBLV) 感染シロイヌナズナに誘導される全身壊疽病徴発現への病害抵抗性経路の関与 平成 20 年度日本植物病理学会大会 2008. 4. 27 島根県松江市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

海道 真典 (KAIDO MASANORI)

京都大学 大学院農学研究科 助教

20314247