

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02963

研究課題名(和文) トマト黄化えそウイルスの複製に関与する宿主因子の機能解明

研究課題名(英文) Functional analyses of host factors involved in tomato spotted wilt virus RNA replication

研究代表者

石橋 和夫 (Ishibashi, Kazuhiro)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・上級研究員

研究者番号：20611742

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルスの増殖は宿主に依存している。これまでに多くのモデルウイルスを用いて複製に必要な宿主因子が同定されてきたが、植物のマイナス鎖RNAウイルスの複製に関与する宿主因子の情報はほとんどなかった。本研究では独自に開発した出芽酵母を用いたトマト黄化えそウイルス(TSWV)複製系を用いて、TSWVの複製に関与する宿主因子の機能解析を行った。その結果、TSWVの複製には多くの膜輸送関係の因子が必要であること、TSWVのRNAポリメラーゼおよびヌクレオキャプシドタンパク質は出芽酵母細胞内で宿主のオルガネラ膜を含むコンパートメントに共局在することなどを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、難防除病原ウイルスであり、世界中に被害をもたらしているトマト黄化えそウイルス(TSWV)の複製機構の解析を行い、新たにTSWVの複製に必要な宿主因子を同定した。植物のマイナス鎖RNAウイルスでこのような宿主因子はこれまでに報告されておらず、マイナス鎖RNAウイルスの研究を大きく進めることが出来た。また、同目の類似ウイルスとしてヒトの病原ウイルスも含まれることから、本研究で明らかになったTSWVの複製機構に関する知見は、TSWV抵抗性植物の作出だけでなく、これらの動物ウイルスに対する新たな抗ウイルス戦略の開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Viruses multiply with the aid of their hosts. Host factors utilized by viruses have been identified using some model viruses, however, little information on host factors for plant negative-strand RNA viruses is available. In this study, functional characterization of host factors for tomato spotted wilt virus (TSWV) RNA replication was performed using yeast *Saccharomyces cerevisiae*. We revealed that TSWV RNA replication requires host membrane traffic systems and TSWV L and N proteins colocalizes in host membrane-derived compartments.

研究分野：植物ウイルス学

キーワード：トマト黄化えそウイルス マイナス鎖RNAウイルス 出芽酵母 宿主因子 プニヤウイルス

1. 研究開始当初の背景

ウイルスは多様であり、ゲノムの構成や配列はもちろんのこと、遺伝子の発現機構や宿主範囲などもウイルスによって異なるため、一般にあるウイルスについて明らかになったことは他のウイルスには当てはまらない。これまで、ウイルスの複製機構の研究はいくつかのモデルウイルスを用いて重点的に行われてきた。植物ウイルスの場合、モデルウイルスとして複製機構の研究対象となってきたのはいずれもプラス鎖 RNA ウイルスである。一方、マイナス鎖 RNA ウイルスには、TSWV など農作物に被害を与える多くの病原ウイルスが含まれるが、ウイルスゲノムの遺伝子操作ができないことなどの技術的な制約により、複製機構の詳細は不明であった。

マイナス鎖 RNA ウイルスのゲノム RNA は、ウイルス粒子中で RNA ポリメラーゼおよびヌクレオキャプシドタンパク質と複合体 (RNP) を形成した状態で存在し、裸の RNA は感染性をもたない。宿主細胞内に侵入したマイナス鎖 RNA ウイルスの RNP は、ゲノム RNA を鋳型に mRNA の転写を行うとともに、ゲノム複製の鋳型となる相補鎖 RNA の合成を行う。相補鎖 RNA は、転写された mRNA より新たに翻訳されたヌクレオキャプシドタンパク質および RNA ポリメラーゼと RNP を形成し、ゲノム RNA を合成する。マイナス鎖 RNA ウイルスで最も研究が進んでいるインフルエンザウイルスでは、RNAi 等を利用した様々なスクリーニングの結果から、複製サイクルはウイルス因子と多くの宿主因子との協働で行われることが示唆されている。しかし、植物のマイナス鎖 RNA ウイルスの複製において機能する宿主因子はほとんど明らかになっていない。インフルエンザウイルスが核内で複製するのに対し、TSWV は細胞質で複製するため、両者が利用している宿主因子は大きく異なるはずである。

出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) は、単細胞のモデル真核生物として様々な生命現象の解明に貢献してきた。植物ウイルス研究においてもブロムモザイクウイルス (BMV) やトマトブッシースタントウイルス (TBSV) が出芽酵母細胞内で複製することが示され、遺伝子破壊株ライブラリーを用いたゲノムワイドな宿主因子のスクリーニングにより、それぞれ 100 以上の遺伝子が同定された (Kushner et al. 2003; Panavas et al. 2005)。我々は、TSWV ゲノムの一分節 (S RNA) を RNA ポリメラーゼおよびヌクレオキャプシドタンパク質とともに出芽酵母細胞で発現させることにより、S RNA の複製が起きることを見出し、この実験系を用いて複製に必要なシス配列を同定した (Ishibashi et al. 2017)。この実験系の確立により、TSWV を初めての植物マイナス鎖 RNA ウイルス複製機構研究のモデルウイルスとする基盤が整ったと考え、ゲノムワイドなスクリーニングを行い TSWV RNA の複製に関与する宿主因子候補を 100 個近く同定した (未発表、科研費若手 A (H26-H30) による成果)。興味深いことに、プラス鎖 RNA ウイルスとマイナス鎖 RNA ウイルスは全く異なる機構で複製すると考えられているにもかかわらず、TSWV の複製に関与すると考えられた宿主因子候補の一部は、BMV や TBSV のものと共通していた。

2. 研究の目的

本研究は、先行研究において同定した TSWV RNA の複製に関与する宿主因子候補の機能を解明し、これによりマイナス鎖 RNA ウイルスの複製機構の理解を深めることを目的とする。解析対象とする宿主因子候補の中には、膜輸送関係の因子など BMV や TBSV の複製にも関与することが報告されているものが多く存在した。プラス鎖 RNA ウイルスは宿主の生体膜を変形させて複製複合体を作ることが知られており、BMV および TBSV の複製においてこれらの因子は複製複合体の形成過程において膜を変形させる働きを持つと考えられている。一方、マイナス鎖 RNA ウイルスの複製と生体膜の関係についてはほとんど知見がなく、膜輸送関係の因子が TSWV の複製においてどのように働いているのか予想がつかない。したがって、これらの宿主因子の機能を解析することにより、マイナス鎖 RNA ウイルスの複製と生体膜との関係について新たな知見が得られると期待できる。これは、マイナス鎖 RNA ウイルスの複製機構に関する重要な発見となるだけでなく、進化的に無関係で全く異なる機構で複製すると考えられているプラス鎖 RNA ウイルスとマイナス鎖 RNA ウイルスを、同一の宿主因子の働きという視点から比較できることとなり、そこに共通性が見いだせればウイルスの進化についての重要な知見となることが期待できるほか、RNA ウイルスに共通する性質を標的とした汎用的なウイルス防除法の開発に繋がる可能性がある。

3. 研究の方法

本研究ではまず、これまでにスクリーニングにより同定した変異株において、原因遺伝子を発現させることにより TSWV の複製が回復するか調べる相補実験を行う。市販の出芽酵母変異株ライブラリーは利用できるマーカー遺伝子の数が少なく扱いにくいいため、保有している野生型系統を用いて候補遺伝子の破壊株を作り直し、TSWV の複製が低下するかどうか確認した上でこれを用いる。TSWV RNA の複製に関わることが確認できた宿主因子の変異株において、TSWV の複製過程がどこまで進行しており、どこで破たんが起きているかを明らかにすることにより、TSWV 複製における当該宿主因子の機能を解明する。具体的には細胞分画や蛍光顕微鏡観察などにより

ウイルスタンパク質の局在等を調べる他、タンパク質間相互作用や RNP の形成の有無等を解析する。

4. 研究成果

宿主因子候補遺伝子のうち合計 74 個について遺伝子破壊株を作出した。各変異株について TSWV の複製試験を行ったところ、結果が振れる傾向にあったため、複数回の試験で再現的に TSWV の複製が大きく低下する 10 株を選抜した。当該変異株に野生型遺伝子を相補することにより TSWV の複製が回復したことから、これらの遺伝子は TSWV の複製をサポートする働きを担うものと結論付けた。

各変異株において TSWV の複製がどの段階で停止しているかを解析することにより、当該宿主因子の機能の推定を試みた。いくつかの変異株では TSWV タンパク質の蓄積が著しく低下しており、mRNA の転写あるいは翻訳、もしくはタンパク質の安定性の段階で影響がある可能性が考えられた。これらの遺伝子については TSWV の複製に特異的に作用している可能性は低いと考えられたため、以降の解析は行わなかった。

TSWV の宿主因子候補遺伝子に膜輸送系の遺伝子が多く含まれていたことから、TSWV タンパク質の細胞内局在を解析する実験系を構築した。RNA ポリメラーゼである L タンパク質およびヌクレオキャプシドタンパク質である N タンパク質それぞれについて蛍光タンパク質を融合したコンストラクトを作製したところ、L は C 末端側に、N は N 末端側に融合したときに複製可能であった。出芽酵母細胞内での両タンパク質の局在を蛍光顕微鏡観察により調べたところ、L タンパク質および N タンパク質ともに細胞質の他に未同定のコンパートメントに局在した。さらに、Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) 法を用いて両タンパク質の共局在の有無について調べたところ、両タンパク質が共に蓄積していると考えられる小さな領域が存在することが明らかになった (図 1)。複製の鋳型となるレプリコン RNA が存在しないときにはこのような共局在パターンは示さなかったことから、この特徴的な共局在パターンは複製時に特異的なものであると考えられた。この BiFC で検出されたスポットはゴルジ体マーカーと共局在を示したことから、当該スポットはゴルジ体もしくはゴルジ体に由来する細胞内区画を示しており、TSWV の RNP が存在する可能性が高いと考えられた。

宿主因子候補である膜輸送系の遺伝子が欠損した出芽酵母では、このような TSWV の RNP が存在すると想定されるスポットが減少もしくは縮小する傾向が見られ、TSWV は宿主膜輸送システムを利用してこのスポットを形成している可能性が示唆されたが、更なる検証が必要である。

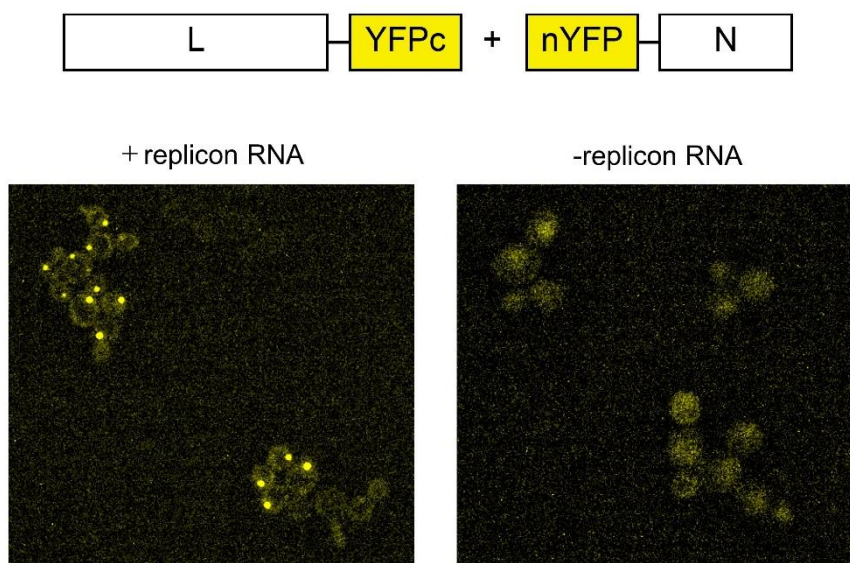


図 1. BiFC 法による酵母細胞内における TSWV L および N タンパク質の共局在

また、TSWV タンパク質の局在を密度勾配遠心法により解析したところ、少なくとも L タンパク質の一部はゴルジ体マーカーと同じ画分に画分されたが、酵母細胞の強いプロテアーゼ活性のために明瞭な結果は得られなかった。

この他に各候補遺伝子産物と TSWV タンパク質の相互作用解析を酵母ツーハイブリッド法および免疫沈降法により行ったが、相互作用が確認できた組み合わせはなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	山溝 千尋 (Yamamizo Chihiro)		
研究協力者	渡邊 希香 (Watanabe Kikyo)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関