

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06046

研究課題名(和文)植物ウイルス由来RNAサイレンシング抑制因子群の作用機構の解析

研究課題名(英文)Inhibitory mechanism of the viral suppressors of RNA silencing

研究代表者

児玉 浩明(Kodama, Hiroaki)

千葉大学・大学院園芸学研究院・教授

研究者番号：70302536

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：植物は植物ウイルスを認識し、RNAサイレンシングによりウイルスRNAの分解をガイドする短鎖RNA(siRNA)を産生する。一方、植物ウイルスはVSRと呼ばれるタンパク質を産生して、RNAサイレンシングを阻害する。本研究ではsiRNAの形成に関わるRDR6ノックダウン株を用い、強毒性のCucumber mosaic virus (CMV) 2bタンパク質がRDR6存在下でのみRNAサイレンシングを抑制することを明らかにした。また細胞内局在性が大きく異なるように改変したCMV 2bタンパク質を導入したが、いずれもRDR6が関与するRNAサイレンシングを阻害することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物にはウイルス感染後、ウイルスRNAを分解する仕組みがあるが、ウイルスはこの仕組みを阻害するVSRと呼ばれるタンパク質を有している。本研究では1200種以上の植物に感染するキュウリモザイクウイルスのVSRが植物のウイルスRNA分解機構を阻害する仕組みの一部を明らかにした。今後、VSRの作用を受けないウイルスRNA分解機構を作り出すことができれば、作物の安定的な生産に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Plant cells produce the small interfering RNA (siRNA) to cope with the infection of RNA viruses. On the other hand, RNA viruses produce proteins called viral suppressors of RNA silencing (VSRs). Cucumber mosaic virus 2b protein is a representative VSR. Here, we showed 2b proteins encoded by highly virulent CMV strains can inhibit RNA silencing under the presence of RDR6, a key protein for RNA silencing. In addition, we here show that both a 2b protein localized mainly in the cytosol and a 2b protein localized exclusively in the nucleus can inhibit RNA silencing. Since RDR6 synthesizes a complementary RNA in the cytosol, a trace level of 2b protein can efficiently inhibit the RNA silencing step in which RDR6 is involved.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：RNAサイレンシング RNAサイレンシング抑制因子 RDR6 キュウリモザイクウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 植物は植物ウイルスを認識し、RNAサイレンシングによりウイルス RNA の分解をガイドする短鎖 RNA (siRNA) を産生する。一方、植物ウイルスは Viral Suppressors of RNA silencing (VSRs) と呼ばれるタンパク質を産生して、RNAサイレンシングを阻害する。VSR が阻害する RNAサイレンシングのステップを明らかにすることは、ウイルス病害の制御に向けて重要であるが、これまでの VSR の研究は、各研究者が材料としているウイルス株の VSR を各研究者が個別の手法を用いて実施されてきたため、異なるウイルスの種間、同一ウイルス種でも異なる株間での VSR の阻害機構を相互に比較検討することが困難であった。

(2) Cucumber mosaic virus (CMV) の VSR である 2b タンパク質は核に局在するが、CMV はサイトゾルで複製される。したがって 2b タンパク質の核局在が VSR の機能とどう関係するのか、不明であった。

## 2. 研究の目的

(1) CMV, および Tobacco etch virus (TEV) の VSR である 2b タンパク質について、5 種類の CMV 株 (植物への病原性からみて、強毒性 CMV3 株、弱毒性 CMV2 株) の 2b タンパク質の VSR の作用機構を比較する。さらに TEV の 2b タンパク質とも比較する。

(2) CMV 2b タンパク質に核排除シグナル (nuclear export signal, NES) [1] を結合させた融合タンパク質、核局在シグナル (nuclear localizing signal, NLS) を結合させた融合タンパク質を植物に導入し、RNAサイレンシング抑制因子としての機能性を調べるとともに、宿主植物のタンパク質の発現に与える影響を調べることで、2b タンパク質の核局在性と VSR としての機能性の関係について明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) RNAサイレンシング経路のうち、(i) RNA-dependent RNA polymerase 6 (RDR6) による 1 本鎖 RNA から 2 本鎖 RNA への変換のステップ、(ii) 長鎖 2 本鎖 RNA から Dicer による短鎖 2 本鎖 RNA へのプロセシングのステップ、(iii) 短鎖 2 本鎖 RNA から 1 本鎖 RNA が AGO1 タンパク質に取り込まれ、RNA 分解をガイドするステップ、の大きく 3 段階のステップに VSR の作用点があると考えられている。2b タンパク質においても、VSR としての阻害機構として、(a) RDR6 による 2 本鎖 RNA への変換を阻害 [2]、(b) 2 本鎖 RNA と結合し、AGO1 への siRNA の取込みを阻害 [3]、(c) AGO1 タンパク質に結合して RNA 分解を阻害 [4]、の 3 つの阻害機構が報告されている。しかし AGO1 による RNA 分解産物が RDR6 によってさらに 2 本鎖 RNA

(2 次 siRNA と呼ばれる) へ変換されることで RNAサイレンシングによる RNA 分解が促進されることが知られており、2 次 siRNA 形成機構が AGO1 による RNA 分解の下流に存在することで VSR の阻害機構の解明を複雑にしている。本研究では、RDR6 の発現量を減らした RDR6 ノックダウンタバコ株と野生型タバコ株を用いることで、RDR6 の関与の有無による VSR 効果の違いを明らかにする。方法としては、タバコ葉にホタルルシフェラーゼ発現コンストラクト、ルシフェラーゼに対する siRNA を発現し RNAサイレンシングを誘導するコンストラクト、2b タンパク質の発現コンストラクトを組み合わせ Agrobacterium infiltration を行い、ルシフェラーゼの発現量を定量することで、VSR による RNAサイレンシングの抑制度合いを定量化する [2]。

(2) 強毒性 CMV である IA 株由来の 2b タンパク質に、核局在シグナルをさらに付加した融合タンパク質 (IA2b-NLS)、核排出シグナルを付加した融合タンパク質 (IA2b-NES) を作成した。細胞内局在を明らかにするために、これらの 2b タンパク質に GFP タンパク質をさらに融合させた (GFP-IA2b, GFP-IA2b-NLS, GFP-IA2b-NES)。細胞内局在はタマネギ表皮細胞に GFP 融合タンパク質の発現コンストラクトをパーティクルガンにて導入し、蛍光顕微鏡にて観察した。また、IA2b-NES、IA2b-NLS を発現する形質転換タバコを作成し、 $\alpha$ -リノレン酸合成酵素遺伝子 (*NtFAD3* 遺伝子) を標的とした siRNA を発現するコンストラクトを導入した inverted repeat-induced posttranscriptional gene silencing (IR-PTGS) 株である R11 株、および、*NtFAD3* 遺伝子を導入して得られた sense transgene-induced posttranscriptional gene silencing (S-PTGS) 株である S44 株と交配させることで、2b タンパク質の細胞内局在と RNAサイレンシング抑制機能との関連を調べた。さらに、これらの形質転換タバコ株を用いてプロテオーム解析を実施した。

## 4. 研究成果

### (1) CMV、TAV に由来する 2b タンパク質の VSR 評価

IR-PTGS では、標的遺伝子配列が逆位反復配列として転写され、2 本鎖 RNA が形成される。この長鎖 2 本鎖 RNA がプロセシングされて siRNA が形成され、標的遺伝子の mRNA が分解される。今回、ホタルルシフェラーゼ発現コンストラクト (図 1、LUC) をホタルルシフェラーゼに対する IR-PTGS を誘導するコンストラクト (図 1、hp) と同時に植物細胞に導入すると、ル

シフェラーゼの発現量が RNA サイレンシングにより低下する。この実験系において、強毒性 CMV である 3 株 (IA 株、SD 株、Fny 株)、弱毒性 CMV である 2 株 (Q 株、LS 株) がコードする 2b 遺伝子を同時に導入することで、各 2b タンパク質の VSR 機能を評価した (図 1)。タバコ野生株 (図 1、WT 株) で実験すると、強毒性の IA 株に由来する 2b は RNA サイレンシングを抑制し、ホタルルシフェラーゼの発現量が増加した。しかし、弱毒性の Q 株に由来する 2b は RNA サイレンシングを抑制できず、ホタルルシフェラーゼ活性が低い状態のままであった。強毒性の SD 株、Fny2b 株に由来する 2b タンパク質においては図 1 に示した IA 株と、弱毒性の LS 株に由来する 2b タンパク質は図 1 に示した Q 株と同じ結果を示した。これらの結果は、2b タンパク質の VSR 活性と CMV の病原性との間には相関があることを示している。一方、タバコ野生株で観察された IA2b、Fny2b、SD2b の VSR 活性は、RDR6 ノックダウンタバコ ( $\Delta$ RDR6 タバコ、図 1) では観察されなかったことから、強毒性 CMV に由来する 2b タンパク質による RNA サイレンシングの抑制メカニズムは、RDR6 による 2 本鎖 RNA 形成過程に依存することが明らかになった。

一方、TAV 2b 株に由来する 2b タンパク質では、WT タバコ、 $\Delta$ RDR6 タバコの両方において RNA サイレンシングを抑制し、ホタルルシフェラーゼ活性が増加した。TAV 2b タンパク質は 2 本鎖 siRNA に結合して AGO1 タンパク質への siRNA の取込みを阻害することが報告されており [3]、本研究はその報告と矛盾しないものであった。また、TAV 2b タンパク質の VSR のメカニズムと CMV 2b タンパク質の VSR のメカニズムは共通すると考えられてきたが、本研究から両タンパク質の VSR 機構には異なる点が存在することが明らかになった。

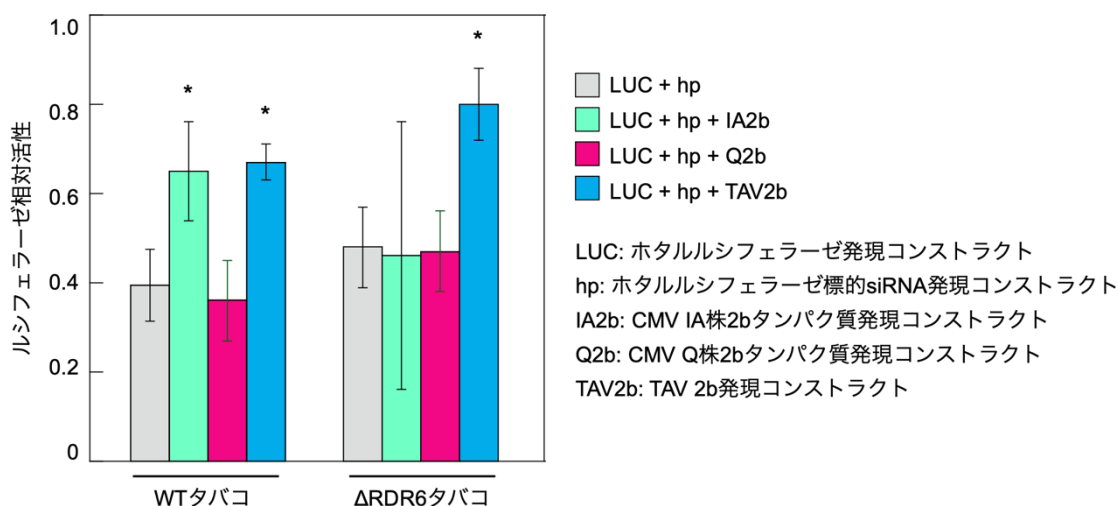


図 1 2bタンパク質のVSR機能評価

タバコ野生株 (WTタバコ)、RDR6ノックダウンタバコ ( $\Delta$ RDR6タバコ) の葉に、各種発現コンストラクトを組み合わせAgroinfiltration法により導入した。ホタルルシフェラーゼの活性は、ウミシイタケルシフェラーゼ活性で標準化している。\* LUC + hp と比較して有意差あり ( $p < 0.05$ )。

## (2) 異なる細胞内局在性を示す CMV 2b タンパク質の VSR 評価

CMV IA 株由来の IA2b 遺伝子を、S-PTGS の表現型を示す S44 株に導入すると RNA サイレンシングが阻害されて、S44 株の導入遺伝子である  $\alpha$ -リノレン酸合成酵素遺伝子 (*NtFAD3* 遺伝子) が過剰発現した表現型となる。しかし、IR-PTGS の表現型を示す R11 株に IA2b 遺伝子を導入しても RNA サイレンシングは阻害されない [5]。S-PTGS においては、導入遺伝子から転写された標的遺伝子の mRNA が RDR6 によって認識されて長鎖 2 本鎖 RNA が形成されることで、RNA サイレンシングが生じる。したがって RDR6 による 2 本鎖 RNA 形成は S-PTGS に含まれ、IR-PTGS には含まれない過程である。IA2b による RNA サイレンシングが R11 株では観察されず、S44 株で観察されることは、RDR6 による 2 本鎖 RNA 形成過程を 2b タンパク質が阻害することで説明される。一方、2b タンパク質は核に局在するが、VSR としての機能において核に局在することにどのような意味があるのかは不明である。そこで、IA 株の 2b 遺伝子に、核局在シグナルを付加した IA2b-NLS 遺伝子と、核排出シグナルを付加した IA2b-NES 遺伝子を作成した。これらの遺伝子をタマネギ表皮細胞に導入し、2b タンパク質の細胞内局在を調べたところ図 2 A に示したように、予想された結果が得られた。すなわち、GFP-IA2b では、核に強い蛍光が認められるものの、一部、サイトゾルにも蛍光が認められる。GFP-IA2b-NLS では GFP の蛍光が核にのみ検出された。一方、GFP-IA2b-NES では核の蛍光は弱まり、サイトゾルにおいて蛍光が強く検出された。つぎに、これらの 2b 遺伝子を R11 株、S44 株にて発現させたところ、R11 株の表現型である IR-PTGS は、IA2b、IA2b-NLS、IA2b-NES とともに R11 株と比べて変化せず、RNA サイレンシングは阻害されなかった (図 2 B)。一方、S44 株の表現型で

ある S-PTGS においては、IA2b、IA2b-NLS、IA2b-NES すべてにおいて S-PTGS が阻害され、 $\alpha$ -リノレン酸含量が野生株よりも多くなる過剰発現の表現型となった (図 2 C)。この結果から、RDR6 による 2 本鎖 RNA 形成がサイトゾルで行われるとすると、IA2b-NLS においても S-PTGS が抑制されることから、2b タンパク質はきわめて効率よく、限られた分子数で RDR6 による 2 本鎖 RNA 形成を阻害すると考えられた。IA2b-NES を導入したタバコ株では、一旦、IA2b-NES は核に輸送された後、サイトゾルへと排出されると考えられる。プロテオーム解析を実施した結果、核に局在する PCNA (proliferating cell nuclear antigen) タンパク質が IA2b-NES の発現により量的に増加することが明らかになった。IA2b タンパク質が核内において DNA 複製等に重要な役割を果たしている PCNA と相互作用していること、さらに IA2b-NES によって PCNA の細胞内局在性が変化しタンパク質量に変化が生じた可能性ある。また、CMV の増殖を AGO2 が抑制することが知られているが [6]、IA2b-NLS を導入したタバコ株では IA2b および IA2b-NES と比較して AGO2 量が減少していた。核内の IA2b タンパク質が増加することで AGO2 の量的減少が生じることを示している。このように 2b タンパク質の細胞内局在の変動を調べることで、ウイルスの増殖や植物の病徴に与える影響に関して新しい知見が得られることが今後、期待される。

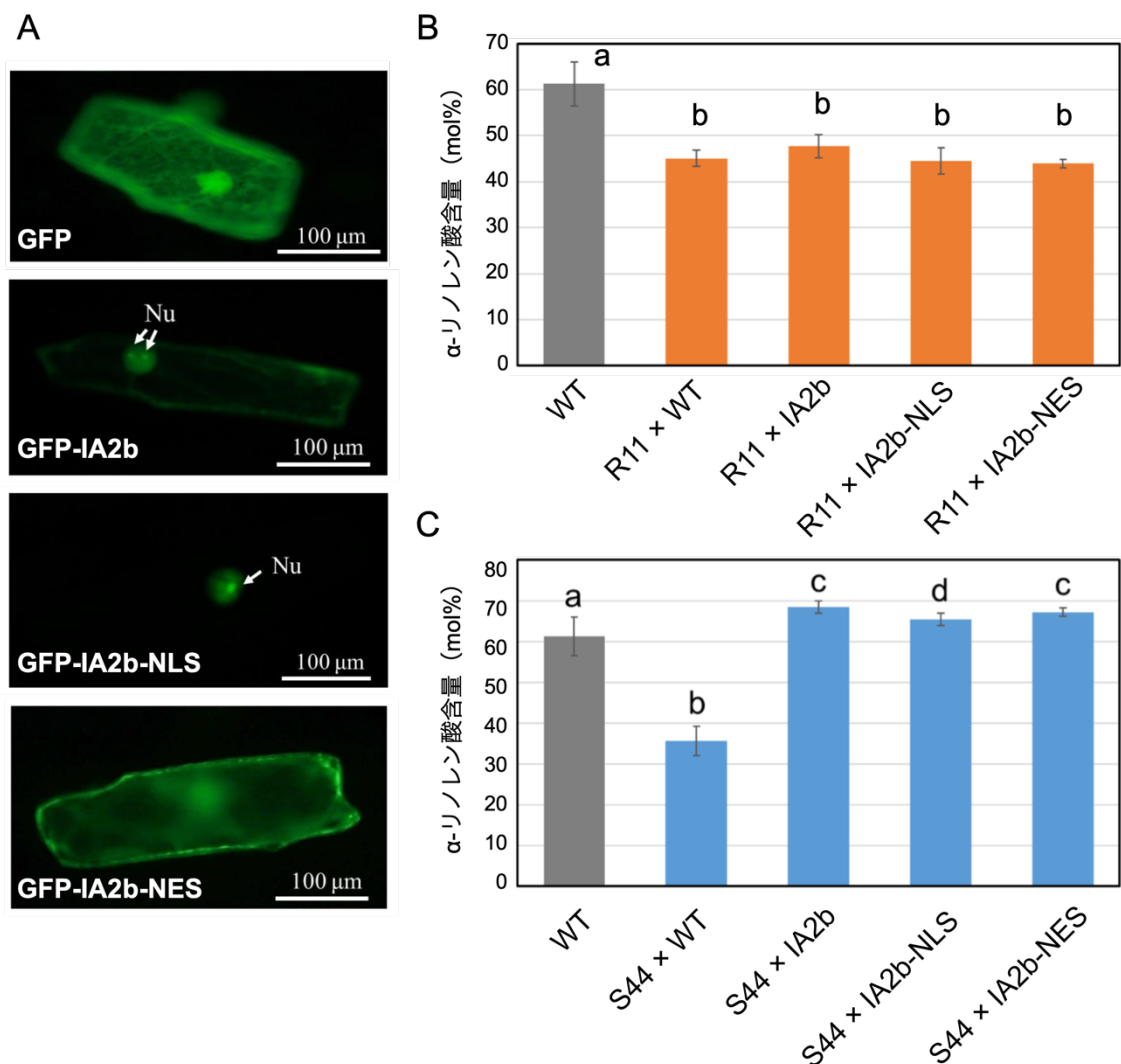


図2 細胞内局在性を变化させたIA2bタンパク質によるVSR効果

(A) IA2b、IA2b-NLS、IA2b-NESの細胞内局在性。GFPとの融合タンパク質として発現させ、蛍光を検出した。(B、C) IA2b、IA2b-NLS、IA2b-NES遺伝子を導入した形質転換タバコにおけるRNAサイレンシング抑制効果。IR-PTGSの表現型を示すR11株、およびS-PTGSの表現型を示すS44株との交配によって得られた植物の葉における $\alpha$ -リノレン酸含量。R11株では $\alpha$ -リノレン酸合成酵素遺伝子

(NtFAD3) 配列を有するヘアピンRNAからsiRNAが形成される。S44株ではNtFAD3遺伝子の過剰発現コンストラクトを導入して得られたRNAサイレンシング株である。S44株ではRNAサイレンシングが抑制されることで表現型が過剰発現へと変化し、 $\alpha$ -リノレン酸含量が野生株よりも増加する。

<引用文献>

1. González, I., Rakitina, D., Semashko, M., Taliansky, M., Praveen, S., Palukaitis, P., Carr, J.P., Kalinina, N., Canto, T. (2012) RNA binding is more critical to the esuppression of silencing function of Cucumber mosaic virus 2b protein than nuclear localization. *RNA* 18: 771-782
2. Shimokawa, M., Hirai, S., Kodama, H. (2019) Protein 2b of *Cucumber mosaic virus* strains IA and SD preferentially suppresses RDR6-dependent silencing pathway. *Plant Biotechnol. Rep.* 13: 193-199
3. Chen, H.Y., Yang, J., Lin, C., Yuan, Y.A. (2008) Structural basis for RNA-silencing suppression by Tomato aspermy virus protein 2b. *EMBO Rep.* 9: 754-760
4. Zhang, X., Yuan, Y.R., Lin, S.S., Tuschl, T., Patel, D.J., Chua, N.H. (2006) Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev.* 20: 3255-3268
5. Koizumi, M., Shimotori, Y., Saeki, Y., Hirai, S., Oka, S., Kodama, H. (2017) Effects of the 2b protein of Cucumber mosaic virus subgroup IB strain IA on different transgene-induced RNA silencing pathways. *Plant Mol. Biol. Rep.* 35: 265-272
6. Wang, X.B., Jovel, J., Udomporn, P., Wang, Y., Wu, Q., Li, W.X., Gascioli, V., Vaucheret, H., Ding, S.W. (2011) The 21-nucleotide, but not 22-nucleotide, viral secondary small interfering RNAs direct potent antiviral defense by two cooperative argonautes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 23: 1625-1638

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 梅山幸子・宮原平・小口太一・太田大策・小関良宏・児玉浩明
2. 発表標題 プロモーター配列を標的とするsiRNA産生台木が穂木に与える影響
3. 学会等名 日本農芸化学会 関東支部 2020年度大会
4. 発表年 2020年

〔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
研究分担者	宮原 平  (Miyahara Taira)  (90720889)	千葉大学・大学院園芸学研究科・講師    (12501)	

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
---------	---------