

自己評価報告書

平成23年 4月20日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008~2011

課題番号：20380026

研究課題名 (和文) 植物 DNA ウイルスの細胞質移行機構の解明

研究課題名 (英文) Intracellular movement of plant viruses

研究代表者

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

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：DNA ウイルス

1. 研究計画の概要

細胞質ではオルガネラなど 20 nm 以上の大きな構造体は自然拡散では移動できない。しかし、それ以上の大きさを持つ植物 DNA ウイルスは、植物細胞に侵入後、細胞質を移行して複製の場である核に到達し、複製後、再び細胞質を移行して隣接細胞へと動いていくことができる。その機構は不明である。そこで、本研究では、植物 DNA ウイルスが細胞骨格 (微小管、アクチン繊維) とモータータンパク質 (ダイニン、キネシン、ミオシン) を細胞内移行に利用しているという仮説を立て、それを検証することを目的とする。

(1) ウイルス感染性クローンの構築

植物 DNA ウイルスでは、カリモウイルス科ウイルス (カリモウイルス) とジェミニウイルス科ウイルス (ジェミニウイルス) が重要である。それらを入手し、ゲノム DNA を抽出し、感染性クローンを構築する。

(2) ウイルスの細胞質移行に細胞骨格およびモータータンパク質がどの程度関与するかの解析

細胞骨格形成阻害剤がウイルス感染に及ぼす影響を調べる。ウイルス粒子表面に存在するウイルスタンパク質と、モータータンパク質との相互作用を調べる。モータータンパク質遺伝子のノックダウンあるいはノックアウトが、ウイルス感染に及ぼす影響を調べる。

(3) ウイルスおよび細胞骨格の可視化

ウイルス粒子を可視化するために、ウイルス粒子表面に存在するタンパク質に蛍光タグを導入する。細胞骨格を可視化した細胞におけるその局在を観察する。

2. 研究の進捗状況

(1) 植物 DNA ウイルスであるジェミニウイルス 7 種類の感染性クローンを構築し、カリモウイルス 2 種類の感染性クローンを入手した。そのうち、Beet curly top virus (BCTV), Beet severe curly top virus, Beet mild curly top virus, カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の 4 種類が、実験植物であるシロイヌナズナに感染することを確認した。

(2) DNA ウイルスの感染に対する微小管形成阻害剤 propyzamide およびアクチン繊維形成阻害剤 latrunculin B の影響を調べたところ、両者とも CaMV 感染率を低下させたが、LatB の影響がより大きかった。CaMV の外被タンパク質と植物のモータータンパク質との相互作用を酵母ツーハイブリッド法で調べたところ、ダイニンの構成因子である light chain 8 ホモログとの相互作用が検出されたが、ダイニンの他の構成因子の遺伝子がシロイヌナズナゲノム中に存在しないことから、さらなる検証が必要である。

(3) モータータンパク質遺伝子をヘアピン型に配置し、それらのサイレンシングを誘導してそれらの遺伝子をノックダウンするコンストラクトを構築した。シロイヌナズナのみオシン遺伝子がアグロバクテリウムの T-DNA でノックアウトされたタグラインを入手した。

(4) CaMV の外被タンパク質と virion-associated protein (P3)、および BSCTV の外被タンパク質に 6 アミノ酸から成る小さなテトラシステインタグを挿入した。タバコ培養細胞の微小管とアクチン繊維を GFP で可視化した細胞株を入手した。

3. 現在までの達成度

②おおもむね順調に進展している。

(理由)

実験に必要な感染性クローンを構築し、シロイヌナズナを含む宿主植物への感染系を確立した。カリモウウイルスの感染課程に微小管、アクチン繊維の両方が関与することが示唆された。ウイルスタンパク質は GFP などのかさ高い蛍光タンパク質で標識するとその機能を失う場合があることから、小さなペプチドタグを選択し、その植物細胞内での検出条件を確立した。一方、モータータンパク質遺伝子の不活化と、そのウイルス感染への影響の解析は重要であり、さらに迅速に進める必要がある。

4. 今後の研究の推進方策

(1) モータータンパク質遺伝子をヘアピン RNA により一過的にノックダウンする系、および、それらの遺伝子をアグロバクテリウムの T-DNA でノックアウトしたシロイヌナズナのタグラインを用いて、DNA ウイルスの感染へのモータータンパク質の関与を明らかにする。

(2) カリモウウイルスおよびジェミニウイルスの粒子外側に存在するウイルスタンパク質にテトラシステインタグを挿入した変異ウイルスを宿主植物に感染させ、FlAsH および ReAsH 試薬を用いてそれらを可視化する。GFP で可視化された細胞骨格を持つ植物培養細胞にそれらウイルスを感染させ、細胞骨格とウイルスの局在を観察する。

5. 代表的な研究成果

(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 5 件)

① Hirata, H., Yamaji, Y., Komatsu, K., Kagiwada, S., Oshima, K., Okano, Y., Takahashi, T., Ugaki, M. and Namba, S. Pseudo-polyprotein translated from the full-length ORF1 of capillovirus is important for pathogenicity, but a truncated ORF1 protein without variable and CP regions is sufficient for replication.

Virus Research 152: 1-9, 2010. 査読あり

② Chen, H., Tamai, A., Mori, M., Ugaki, M., Tanaka, Y., Samadder, P. P., Miyao, A., Hirochika, H., Yamaoka, N., Nishiguchi, M. Analysis of rice RNA-dependent RNA polymerase 1 (OsRDR1) in virus-mediated RNA silencing after particle bombardment. Journal of General Plant Pathology 76:

152-160, 2010. 査読あり

③ Netsu, O., Hirastuka, 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: 1731-1735, 2008. 査読あり

[学会発表] (計 4 件)

① 早川豪人、鈴木匡、宇垣正志

Beet severe curly top virus のウイルス鎖遺伝子の発現活性化に関するタンパク質の同定

平成 23 年度日本植物病理学会大会講演要旨集 p.165、2011 年 3 月 28 日、東京農工大学

② 寺田良介、川島祐介、小野里歩、鈴木匡、宇垣正志

Beet severe curly top virus の感染性クローンの構築と感染葉からの欠損 DNA の検出
平成 22 年度日本植物病理学会大会講演要旨集 p.152、2010 年 4 月 19 日、国立京都国際会館

③ Ueno, T., Suzuki, M., Ugaki, M.

Phylogenetic analysis of Tomato yellow leaf curl isolates occurring in central Japan

XIV International Congress of Virology, 2008 年 8 月 14 日、Istanbul Convention and Exhibition Center, Istanbul, Turkey

④ Netsu, O., Kuwata, S., Hibi, T., Ugaki, M., Suzuki, M.

Phylogene2b protein of Peanut stunt virus is important for local and systemic accumulation.

XIV International Congress of Virology, 2008 年 8 月 14 日、Istanbul Convention and Exhibition Center, Istanbul, Turkey

[図書] (計 1 件)

宇垣正志

遺伝子組換え法による抵抗性育種

植物病理学 眞山滋志・難波成任編、文永堂、p. 276-280, 2010.