

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15495

研究課題名(和文)植物ウイルス複製装置の分子解剖を基盤とした複製システムの包括的解析

研究課題名(英文)Comprehensive analysis of a plant virus replication system based on molecular dissection of the viral replication machinery

研究代表者

吉田 哲也(Yoshida, Tetsuya)

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・研究員

研究者番号：00809874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：植物プラス鎖RNAウイルスの一種であるタバコモザイクウイルス(TMV)の複製タンパク質による複製鋳型RNA認識機構の詳細は不明である。本研究では、TMVゲノムRNAの5'末端領域に由来する複数種の短鎖RNA断片の添加が、試験管内におけるTMV複製タンパク質-ウイルスRNA間相互作用およびTMV RNA複製を阻害することを明らかにした。また、一部の短鎖RNA断片がTMV RNAおよびその他のRNAの翻訳を阻害することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、TMV複製タンパク質による複製鋳型RNAの認識に重要なRNA配列の同定に資する解析系を構築することに成功したと考えられる。また、複数種の短鎖RNA断片がTMV RNAの複製をトランスに阻害したことから、複製タンパク質によるゲノムRNAの認識過程がウイルス防除の標的となり得ること、当該短鎖RNA断片がウイルス防除に利用し得ることを示すことができたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Detailed mechanism of how replication proteins of tobacco mosaic virus (TMV) recognize the viral genomic RNA is unknown. This study revealed that small RNA fragments derived from a 5'-proximal region of the TMV genomic RNA inhibited the binding of TMV replication proteins to viral RNA, and TMV RNA replication in vitro. Some small RNA fragments also inhibited the translation of TMV and non-viral RNA.

研究分野：植物ウイルス学

キーワード：植物ウイルス トバモウイルス 複製 翻訳 試験管内翻訳複製系

### 1. 研究開始当初の背景

植物ウイルスは世界の農業生産に甚大な被害を与えることから、有効な防除法の構築に向けその感染過程を理解することは重要な課題である。植物ウイルスの感染過程のうち、複製は最初に位置しウイルスのゲノム核酸の増幅を担う重要ステップである。植物ウイルスは一般に、ウイルス複製タンパク質、ウイルスゲノム RNA、宿主因子などを含む複製複合体を宿主生体膜上に形成し、この内部でウイルスゲノムを複製する。世界の農業生産に大きな被害をもたらすトバモウイルスは、約 6,400 塩基のプラス 1 本鎖 RNA をゲノムに持つ。トバモウイルスの複製タンパク質は、複製に先立ち、複製タンパク質とゲノム RNA を含む pre-membrane-targeting complex (PMTC) と呼ばれるリボヌクレオプロテイン複合体を形成すること、PMTC は宿主生体膜に結合し成熟型の複製複合体を形成すること、複製タンパク質が翻訳と共役してウイルスゲノム RNA の 5'末端の約 70 塩基の領域(ヌクレアーゼ耐性を示すことから、nuclease-resistant (NR) 領域と呼称)に結合することで PMTC が形成されることがこれまでに示されている (Komoda et al., 2007; Kawamura-Nagaya et al., 2014)。しかし、PMTC 形成に際しトバモウイルスの複製タンパク質がどのように NR 領域を認識するかの詳細は明らかとなっていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、トバモウイルスの一種であるタバコモザイクウイルス (TMV) の複製タンパク質による NR 領域認識機構の解明に向けた実験系の構築と、それを利用した複製タンパク質-NR 領域間相互作用に重要な RNA 配列の同定および性状解析を目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) まず、TMV ゲノムの NR 領域に由来する様々な配列を持つ 9-33 塩基の短鎖 RNA 断片およびネガティブコントロールとして TMV ゲノムの外被タンパク質コード領域に由来する 30 塩基の短鎖 RNA 断片を用意した (図 1)。続いて、TMV ゲノムの NR 領域を含む 5'末端の 110 塩基の領域にストレプトマイシン結合アプタマーである StreptoTag を連結した RNA (TMV1-110-st) を *in vitro* 転写により合成した後、TMV1-110-st をストレプトマイシン付きビーズに結合させた。ここに、予め各種短鎖 RNA 断片とインキュベートした TMV の 126-kDa 複製タンパク質の部分断片 MetIR を加えた。ビーズ上に存在する MetIR をウエスタンブロットにより解析することで、各種短鎖 RNA 断片が複製タンパク質-ウイルス RNA 間相互作用にどのような影響を与えるかを調べた。

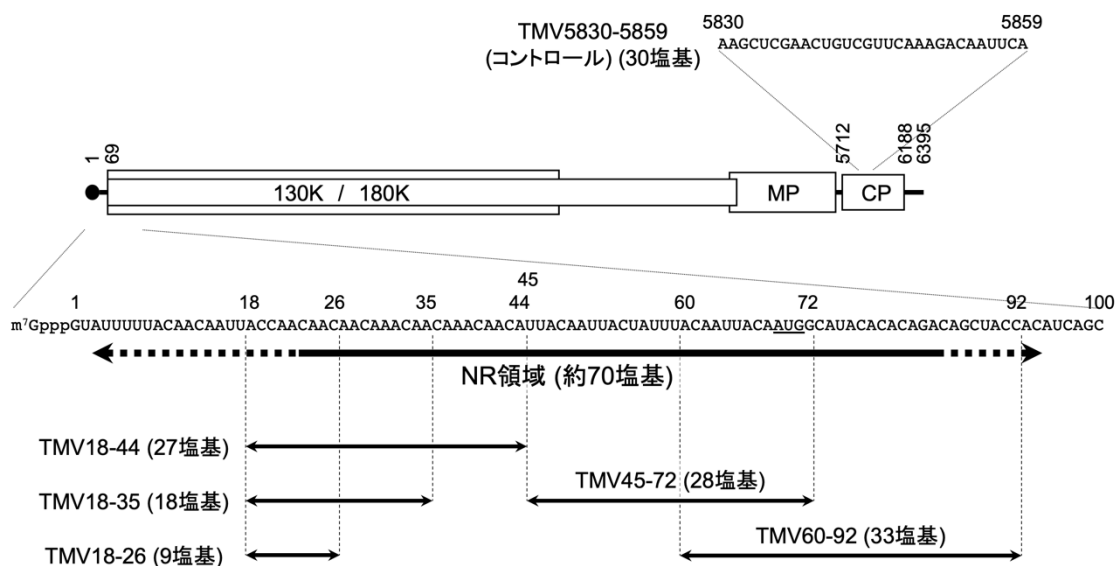


図 1. 本研究で用いた短鎖 RNA 断片

(2) 各種短鎖 RNA 断片の存在下で、TMV RNA を試験管内翻訳複製系 BYL (Komoda et al., 2004) に添加し、翻訳および複製反応に供試した。TMV 複製タンパク質および新生 RNA の蓄積をそれぞれウエスタンブロットおよびオートラジオグラフィにより解析することで、各種短鎖 RNA 断片がウイルス RNA の翻訳・複製にどのような影響を与えるかを調べた。

(3) 各種短鎖 RNA 断片の存在下で、ルシフェラーゼ RNA を膜画分を除いた BYL において翻訳させた後、ルシフェラーゼ活性を測定することにより、短鎖 RNA 断片がウイルス RNA 以外の RNA の翻訳に影響を与えるかを解析した。

#### 4. 研究成果

(1) NR 領域に由来する短鎖 RNA 断片が複製タンパク質-ウイルス RNA 間相互作用に与える影響の解析

解析に供試した短鎖 RNA 断片のうち、TMV5830-5859 (ネガティブコントロール) および TMV18-26 は MetIR の TMV1-110-st への結合を阻害しなかった。一方、TMV18-35、TMV18-44、TMV45-72、TMV60-92 は MetIR の TMV1-110-st への結合を阻害した。このうち、TMV18-44 は他の短鎖 RNA 断片よりも低濃度で結合を阻害した。これらのことから、複数種の短鎖 RNA 断片が MetIR に結合することにより、競合的に MetIR の TMV1-110-st への結合を阻害することが示唆された。

(2) NR 領域に由来する短鎖 RNA 断片がウイルス RNA の複製に与える影響の解析

解析に供試した短鎖 RNA 断片のうち、TMV5830-5859 および TMV18-26 は BYL における TMV RNA の複製を阻害しなかった (図 2)。一方、TMV18-35、TMV18-44、TMV45-72、TMV60-92 は BYL における TMV RNA の複製を阻害した。このうち TMV18-44 は他の短鎖 RNA 断片よりも低濃度で複製を阻害した。これらのことから、MetIR の TMV1-110-st への結合を阻害した短鎖 RNA 断片 (TMV18-35、TMV18-44、TMV45-72、TMV60-92) は、TMV RNA 複製も阻害することが明らかとなった。

また、TMV5830-5859、TMV18-26、TMV18-35、TMV18-44 の存在下では、TMV 複製タンパク質の蓄積は影響を受けなかった (図 2)。このことから、TMV18-35 と TMV18-44 は、複製タンパク質の NR 領域への結合を阻害することにより TMV RNA 複製を阻害している可能性が考えられた。一方、TMV45-72 および TMV60-92 の存在下では、TMV 複製タンパク質の蓄積が予想外に阻害された。このことから、TMV45-72 および TMV60-92 による TMV RNA の複製阻害は、翻訳阻害によっても引き起こされていると考えられた。

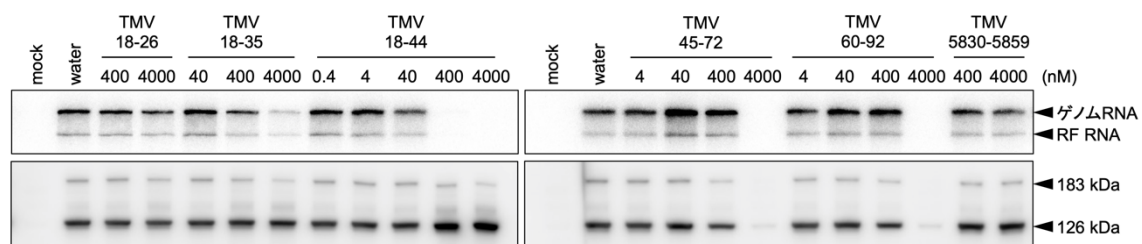


図 2. 短鎖 RNA 断片が TMV RNA の翻訳および複製に与える影響

(3) NR 領域に由来する短鎖 RNA 断片がルシフェラーゼ RNA の翻訳に与える影響の解析

TMV45-72 の存在下では、濃度依存的に試験管内におけるルシフェラーゼ活性が減少した。一方、TMV5830-5859 および TMV18-44 の存在下では、ルシフェラーゼ RNA の翻訳は阻害されないかされたとしても TMV45-72 を加えた場合より軽微だった。このことから、TMV45-72 は標的配列非依存的に RNA の翻訳を阻害することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉田哲也, 石川雅之, 石橋和大
2. 発表標題 タバコモザイクウイルス複製タンパク質-ゲノムRNA間相互作用の解析
3. 学会等名 令和4年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉田哲也, 石川雅之, 石橋和大
2. 発表標題 タバコモザイクウイルス複製タンパク質の認識するRNAモチーフ解析系の構築
3. 学会等名 ウイルス学若手研究集会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田哲也, 石川雅之, 石橋和大
2. 発表標題 タバコモザイクウイルス複製タンパク質の認識するRNA配列の解析
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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