

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月16日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380033

研究課題名（和文） トマトモザイクウイルスの RNA 複製複合体形成機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of the mechanisms of tomato mosaic virus RNA replication complex formation

研究代表者

石川 雅之（ISHIKAWA MASAYUKI）

独立行政法人農業生物資源研究所・植物・微生物間相互作用研究ユニット・ユニット長
研究者番号：70192482

研究成果の概要（和文）：宿主の7回膜貫通型タンパク質 TOM1 および低分子量 GTP 結合タンパク質 ARL8 は、トマトモザイクウイルス（ToMV）の効率のよい複製に必要である。脱液胞化植物プロトプラスト抽出液を用いた試験管内 ToMV RNA 翻訳複製反応を TOM1 あるいは ARL8 を欠損するシロイヌナズナ生体膜を用いて行くと、マイナス鎖 RNA の合成はほとんど検出されなかった。また、出芽酵母において、ToMV 複製タンパク質と TOM1、ARL8 の両方を共発現させると複製タンパク質はグアニリルトランスフェラーゼ活性を獲得したが、複製タンパク質による RNA 合成は検出されなかった。これらの結果から、複製タンパク質は TOM1 と ARL8 が共存する膜との相互作用によりグアニリルトランスフェラーゼ活性を獲得できるが、ポリメラーゼ活性を獲得するにはさらに別の要因が必要であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：A host seven-pass transmembrane protein TOM1 and a small GTP-binding protein ARL8 are required for efficient multiplication of tomato mosaic virus (ToMV) RNA. When in vitro ToMV RNA replication reactions using evacuated plant protoplast extracts were performed using *Arabidopsis thaliana* membranes that lack either one of these proteins, negative-strand RNA synthesis was hardly detectable. When the replication protein of ToMV was co-expressed with TOM1 and ARL8, the proteins gained guanylyltransferase activity, but could not catalyze ToMV RNA replication. Thus, interaction with TOM1- and ARL8-containing membranes confers guanylyltransferase activity to ToMV replication protein, however, it is not sufficient for the activation of its RNA polymerase activity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2010年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2011年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

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：感染・増殖、ウイルス、植物、複製

1. 研究開始当初の背景

真核生物を宿主とするプラス鎖 RNA ウイルスは、オルガネラ膜上に、ウイルスがコードする複製タンパク質および宿主タンパク質からなる複製複合体を形成し、その中で子孫 RNA を複製する。プラス鎖 RNA ウイルスの一種であるトマトモザイクウイルス (ToMV) の複製には宿主因子 TOM1 (7 回膜貫通型タンパク質) および ARL8 (低分子量 GTP 結合タンパク質) が必要である。TOM1 については、ToMV 複製タンパク質と相互作用することから、複製タンパク質の膜結合への関与が示唆されていたが、その詳細な機能は不明であった。ARL8 は膜表面タンパク質で(可溶性画分にも微量検出される)、TOM1 と相互作用することが知られていたが、ToMV RNA 複製における機能はやはり不明であった。

2. 研究の目的

本研究は、ToMV の複製機構に関する知識を深め、ウイルス感染の人為的制御法開拓の基盤を構築することを目的とする。真核生物を宿主とするプラス鎖 RNA ウイルスは、オルガネラ膜上に、ウイルスがコードする複製タンパク質および宿主タンパク質からなる複製複合体を形成し、その中で子孫 RNA を複製する。これまでのところ、RNA 複製複合体の形成機構は不明のままである。本研究では、試験管内 ToMV RNA 複製系において、TOM1 あるいは ARL8 を欠損させたとき、複製複合体形成がどのような状態で停止するのかを解析することにより、正常な複製複合体形成がどのような中間段階を経て起きているのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

脱液胞化プロトプラスト抽出液の調製と、抽出液を用いたウイルス RNA 翻訳・複製反応は Komoda らの論文 (Komoda, Naito and Ishikawa, 2004. Replication of plant RNA virus genomes in a cell-free extract of evacuated plant protoplasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 1863-1867.) に記載された方法で行った。ToMV 複製タンパク質のグアニリル化は、反応液に $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ と *S*-アデノシルメチオニンを添加することにより行った。RNA へのキャップ付加は ToMV RNA の 5'末端約 30 ヌクレオチドに相当する RNA を基質として用いて行った。

4. 研究成果

ToMV の複製複合体形成がどのような中間段階を経て形成されるのかを解析する準備として、TOM1 およびそのホモログである TOM3, THH1 を欠損したシロイヌナズナ、ARL8 の 3 個のホモログを欠損したシロイヌナズナ、および野生型株シロイヌナズナから液体培養細胞を樹立した。これらの細胞からプロトプラストを調製し、エレクトロポレーションにより ToMV RNA を導入しても、ToMV RNA の複製は起きないことを確認した。そこで、これらシロイヌナズナ培養細胞から得た生体膜を用いて試験管内で ToMV RNA の複製を行わせる系を確立し、TOM1 あるいは ARL8 遺伝子が欠損したシロイヌナズナ培養細胞から得た生体膜を用いた反応ではマイナス鎖 RNA 合成が起きないことを見いだした。このことから TOM1 と ARL8 はマイナス鎖合成が起きる前の段階で複製タンパク質に作用していることが示唆された。

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、TOM1 あるいは ARL8 のホモログをもたない。そこで、出芽酵母で TOM1 あるいは ARL8 あるいはそれら両方を共発現させたとき ToMV の複製タンパク質の活性あるいは様態に変化が起きるかを調べることを計画した。そのために、ToMV の複製タンパク質コード領域をプロモーター下流に挿入し、出芽酵母に導入したが、複製タンパク質の発現はみられなかった。ToMV の複製タンパク質コード領域にはポリ A 付加配列様の配列が見いだされたことから、当該配列に同義置換を導入し、再度出芽酵母に導入すると、複製タンパク質の発現が観察された。この実験系を用いて、TOM1 が共発現すると、ARL8 の存在の有無にかかわらず、膜結合複製タンパク質の比率が高くなること、TOM1 と ARL8 が共発現すると、複製タンパク質の RNA キャッピング能が活性化されることを見いだした。タバコウイルス RNA の複製における子孫 RNA のキャッピングは、①子孫 RNA 5'末端 3 リン酸のガンマ位リン酸基の除去、②複製タンパク質の GMP 化、③複製タンパク質に共有結合した GMP 残基の子孫 RNA 5'2 リン酸への転移を経て起こる。TOM1 あるいは ARL8 の有無と各ステップの進行の可否の関係を明らかにするために、複製タンパク質の GMP 化および 5'2 リン酸末端をもつ RNA へのキャップ付加能を調べた。その結果、両活性とも、TOM1 と ARL8 が共発現したときに限って検出されることが明らかになった。また、生体膜を除去した、脱液胞化タバコプロトプラスト抽出液で ToMV RNA を翻訳して複製タンパク質を合成しても、そのままでは複製タンパク質の GMP 化能は微弱だった

が、除去してあった膜を再添加することにより活性は劇的に上昇した。

この研究の過程で、グアニリル化を受ける複製タンパク質が、ジスルフィド結合を介して形成された、膜結合性の巨大な複合体に含まれることを見いだした。さらに、複製タンパク質のジスルフィド結合が、ToMVのRNA複製に重要であることを示唆する結果を得た。

以上により、TOM1はToMV複製タンパク質の膜結合を促進するが、単独ではGMP化能を賦与できず、さらにARL8が共存することで当該酵素活性が活性化されると考えられた。出芽酵母では複製タンパク質のRNAポリメラーゼ活性は検出されず、この活性の獲得には出芽酵母には欠けている何らかの要因が存在すると考えられた。複製タンパク質のジスルフィド結合形成に関しては、新規の発見であり、後継課題でその複製における役割を追求したい。

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4件)

Masaki Nishikiori, Masashi Mori, Koji Dohi, Hideyasu Okamura, Etsuko Katoh, Satoshi Naito, Tetsuo Meshi and Masayuki Ishikawa. (2011) A host small GTP-binding protein ARL8 plays crucial roles in tobamovirus RNA replication. **PLoS Pathogens** 7 (12): e1002409. (査読あり)

Katsunori Murota, Yuka Hagiwara-Komoda, Keisuke Komoda, Hitoshi Onouchi, Masayuki Ishikawa and Satoshi Naito. (2011) Arabidopsis cell-free extract, ACE, a new in vitro translation system derived from Arabidopsis callus cultures. **Plant and Cell Physiology** 52 (8): 1443-1453. (査読あり)

Kazuhiro Ishibashi, Tetsuo Meshi and Masayuki Ishikawa. (2011) Gaining replicability in a nonhost by Tobacco mild green mosaic virus compromises its silencing suppression activity in a host. **J. Virol.** 85 (4): 1893-1895. (査読あり)

Kazuhiro Ishibashi, Masaki Nishikiori, and Masayuki Ishikawa. (2010) Interactions between Tobamovirus Replication Proteins and Cellular Factors: Their Impacts on Virus Multiplication. **Mol.**

Plant-Microbe Interact. 23 (11): 1413-1419. (査読あり)

[学会発表] (計6件)

錦織雅樹、飯哲夫、石川雅之、トマトモザイクウイルス複製タンパク質のジスルフィド結合を介した高分子量化. 平成24年度日本植物病理学会大会、2012年3月、福岡.

Masaki Nishikiori, Tetsuo Meshi, Masayuki Ishikawa. A plant small GTP-binding protein ARL8 plays a crucial role in Tobamovirus RNA replication. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. 2011年9月、札幌.

錦織雅樹、森正之、土肥浩二、岡村英保、加藤悦子、内藤哲、飯哲夫、石川雅之. (2011) トバモウイルスRNA複製における宿主因子TOM1, ARL8の機能解析. 日本植物病理学会報 77(3):196.

Masaki Nishikiori, Tetsuo Meshi, Masayuki Ishikawa. (2010) Toward understanding the mechanisms of tobamovirus replication complex formation EMBO Workshop 2010: Genomic approaches to interactions between plant viruses their hosts and their vectors. 2010年6月、Fenestrelle (イタリア). (招待講演)

岡村英保、錦織雅樹、相宏宇、石川雅之、加藤悦子. NMR緩和測定による低分子量Gタンパク質NtARL8の立体構造変化の解析. 第48回NMR討論会、2009年11月、福岡.

Masayuki Ishikawa. Host proteins for virus accumulation or resistance: Their association with replication proteins of tobamoviruses the 9th International Plant Molecular Biology Congress. 2009年10月、St. Louis, 米国. (招待講演)

[図書] (計3件)

石橋和夫、石川雅之. (2010). トバモウイルスと植物との相互作用. **遺伝** 64 (5) 60-65.

石橋和夫、石川雅之. (2010) トバモウイルスの宿主域制限機構. **蛋白質核酸酵素** 55(1):88-93.

石川雅之. (2009) 内在性遺伝子の発現抑制によるウイルス抵抗性植物の作出. **農業技術** 64(4):145-148.

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

石川 雅之 (ISHIKAWA MASAYUKI)

独立行政法人農業生物資源研究所・植物科学
研究領域・植物-微生物間相互作用研究ユニッ
ト・ユニット長

研究者番号：70192482

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし