

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：82112

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2011

課題番号：23658043

研究課題名（和文） トマト黄化えそウイルス遺伝子操作系の開発

研究課題名（英文） Development of a reverse-genetics system for Tomato spotted wilt virus

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）：

トマト黄化えそウイルス（TSWV）の感染を cDNA から開始する実験系の確立を目指して、TSWV のヌクレオキャプシドタンパク質および RNA ポリメラーゼ（L タンパク質）をそれぞれ大腸菌と出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）で発現させ、精製した。これらをゲノム RNA と様々な条件で混合したが、RNA 合成活性は観察されなかった。この結果を受けて、TSWV ゲノムにコードされるタンパク質とゲノム RNA を発現させるためのプラスミドを構築し、アグロインフィルトレーション法によって *Nicotiana benthamiana* 葉に導入したが、この場合も感染は確認されなかった。一方、これらの実験の過程で翻訳伸長因子 eEF1A が TSWV の転写反応を活性化する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Toward establishing an experimental system in which infection with *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) can be initiated from its cDNA, we expressed TSWV nucleocapsid protein and RNA polymerase (the L protein) in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*, respectively. We purified these proteins and mixed with *in vitro*-synthesized TSWV RNA in various conditions, however, we could not detect RNA synthesis. We also constructed plasmids to express TSWV-coded proteins and RNA *in vivo*, and introduced these plasmids into *Nicotiana benthamiana* leaves by the Agro-infiltration method, infection with TSWV did not occur. In the course of these trials, we obtained results that suggest that the translation elongation factor eEF1A plays important roles in mRNA transcription of TSWV.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

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、植物、マイナス鎖 RNA ウイルス、複製、転写、宿主因子

1. 研究開始当初の背景

トマト黄化えそウイルス（TSWV）は、難防除性の昆虫アザミウマにより媒介されるウイルスで、さまざまな作物に感染し、激し

い病徴を現して農業生産に大きな打撃を与えている。TSWV はブニヤウイルス科に属するマイナス鎖 RNA ウイルスである。マイナス鎖 RNA ウイルスはウイルス粒子内にヌク

レオキャプシド (N) タンパク質に覆われたゲノム RNA と RNA ポリメラーゼを含む(以下この複合体を単に「リボヌクレオプロテイン (RNP)」と呼ぶ)。感染後、RNA ポリメラーゼはゲノム RNA あるいはその相補鎖 RNA を鋳型として mRNA を合成し、ウイルスタンパク質を発現する (図 1)。mRNA の 5' 末端近傍は、宿主の mRNA に由来し、いわゆる「キャップスナッチング機構」により導入される。また、複製の過程では、RNP からキャップの付いていない全長相補鎖 RNA が合成される。TSWV はこのような生活環をもつため、ウイルス RNA のみを植物に直接接種しても RNA ポリメラーゼを発現することができず、感染は起こらない。

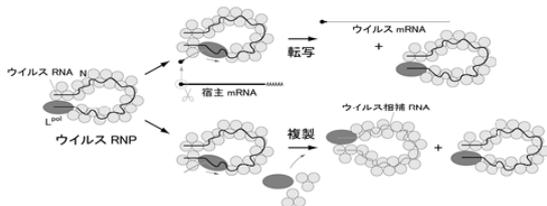


図1 TSWV RNA の複製と転写

感染性のあるウイルスを cDNA から再生する実験系は、当該ウイルスの遺伝子産物の機能の解明をはじめとするウイルス学的な性格付け、ひいては基礎的な知見に基づいたウイルス対策の立案のために必須である。しかし、TSWV をはじめとする植物のマイナス鎖 RNA ウイルスでは cDNA からのウイルス再生系は確立されていない。

2. 研究の目的

TSWV は、植物病原体として大きな農業被害をもたらしている。ウイルスの防除のためには、ウイルスの増殖機構、媒介昆虫等による伝搬機構および病原性発現機構を明らかにする必要がある。しかし、これらの解析の要となる遺伝子操作系が TSWV については確立されていない。本研究は、TSWV のウイルス粒子に含まれ、感染性の中核を担うリボヌクレオプロテイン複合体を試験管内で再構築し、これを植物細胞に導入して感染を成立させる系、あるいは、TSWV にコードされるタンパク質と RNA を生体内で発現させ、自己集合させる系を確立することにより、TSWV の遺伝子操作を可能にすることを目的とした。

3. 研究の方法

TSWV RNA に対するクローン化 cDNA から感染を起こす実験系を構築するために、ヌ

クレオキャプシド (N) タンパク質、RNA ポリメラーゼ (L タンパク質) およびマイナス鎖ゲノム RNA からなり、感染性の実体を担うリボヌクレオプロテイン (RNP) 複合体を再構成する。材料として、出芽酵母

(*Saccharomyces cerevisiae*) あるいは大腸菌で発現させて精製した L および N タンパク質、および試験管内転写反応により合成したゲノム RNA を用いる。この際、必要に応じ、脱液胞化タバコプロトプラスト抽出液 (RNase およびプロテアーゼの活性が非常に低く、この抽出液を用いてプラス鎖 RNA ウイルスであるトバモウイルスのゲノム RNA を翻訳し、複製させることができる: Komoda *et al.* 2004, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 1863-1867) を添加し、分子集合に必要な宿主細胞由来の因子を補う。さらに、これを植物に接種して感染を成立させる。

植物細胞内における TSWV にコードされたタンパク質と RNA の発現は、それぞれをコードするプラスミドをもつ

Agrobacterium tumefaciens を混合して *Nicotiana benthamiana* の葉に浸潤させることにより行った。

4. 研究成果

TSWV の RNP 複合体の再構築に向けて、同複合体の構成タンパク質である L タンパク質および N タンパク質を、ヘテロローガスな系で発現させることを試みた。N タンパク質は大腸菌で発現させることができた。大腸菌で発現させ、精製した N タンパク質は、RNA 結合能を有していた (図 2)。

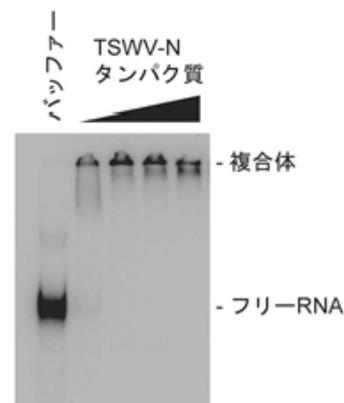


図2 精製した TSWV N タンパク質の RNA 結合能. 大腸菌で発現させ、精製した TSWV N タンパク質あるいはバッファーと ^{32}P 標識した約 340 ヌクレオチドの 1 本鎖 RNA を混合してインキュベートしたあと非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により解析した。

一方、L タンパク質は、大腸菌では発現さ

することができなかったが、配列を出芽酵母における発現に至適化した cDNA を用いることにより、出芽酵母内で発現させることができた (図 3)。

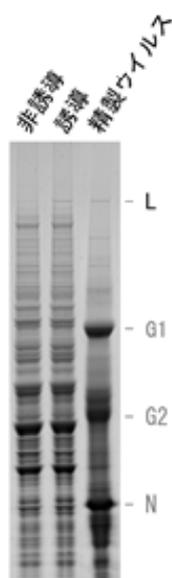


図3 出芽酵母における TSWV Lタンパク質の発現。誘導前、誘導後の酵母からの可溶性タンパク質あるいは精製 TSWV を SDS-PAGE で分離し、クマシーブリリアントブルーで染色した。L の発現はウエスタン解析によっても確認された。

しかし、部分精製した Lタンパク質に RNA ポリメラーゼ活性は確認できなかった。Nタンパク質、Lタンパク質と鋳型 RNA を混合しても顕著な鋳型特異的 RNA 合成は観察されなかった。細胞由来の成分が、RNP の再構築あるいは RNA ポリメラーゼ活性の発現に必要な可能性を考え、脱液胞化タバコプロトプラスト抽出液を添加したが、残念ながらこの場合も鋳型特異的な RNA 合成活性は検出されなかった。ただし、脱液胞化タバコプロトプラスト抽出液には比較的高い内在性の RNA 合成活性があるので、微弱な活性を見逃している可能性は否定できない。

以上の結果を受けて、方針を変更し、ウイルスにコードされるタンパク質とウイルス RNA を、ウイルス RNA に対する cDNA から、植物細胞の中で発現することを計画した。TSWV ゲノムにコードされる各タンパク質 (5種類) をアグロインフィルトレーション法によって発現させるためのプラスミドを構築した。各タンパク質および T7 RNA ポリメラーゼを発現する植物に、T7 プロモーターの下流に TSWV ゲノムをコードするプラスミドを接種したが、感染は確認されなかった。

一方、ウイルス粒子から調製した vRNP と脱液胞化タバコプロトプラスト抽出液を混合すると転写反応が起きることを見いだした。さらに、脱液胞化タバコプロトプラスト抽出液から転写活性化因子を精製したところ、これが翻訳伸長因子 eEF1A である可能性が示唆された。そこで eEF1A の阻害剤を脱液胞化タバコプロトプラスト抽出液に添加したところ転写活性化能が阻害された。従って、eEF1A は TSWV の vRNA からの転写を活性化する宿主因子であると考えられた。

主目的とした TSWV の遺伝子操作系は確立できなかったが、本研究で確立した TSWV タンパク質の発現系を利用するなどしてさらなる試みを続けたい。TSWV の転写に宿主因子が必要であることの発見は、TSWV の転写と複製の分子機構を考える上で非常に重要であると考えられる。

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 0 件)

〔学会発表〕 (計 1 件)

薦田圭介、石橋和大、河村和恵、石川雅之、飯哲夫。トマト黄化えそウイルスの mRNA 合成を活性化する宿主因子の探索。平成 24 年度日本植物病理学会大会、2012 年 3 月、福岡。

〔図書〕 (計 0 件)

〔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