

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 25 年 6 月 6 日現在

機関番号：82112

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23880032

研究課題名（和文）イネ縞葉枯ウイルス逆遺伝学実験系の開発と利用

研究課題名（英文）Development of the reverse genetics system for Rice stripe virus

研究代表者

石橋 和大（ISHIBASHI KAZUHIRO）

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・任期付研究員

研究者番号：20611742

研究成果の概要（和文）：

イネ縞葉枯ウイルス（RSV）はヒメトビウンカを媒介昆虫とするマイナス鎖 RNA ウィルスである。植物のマイナス鎖 RNA ウィルスは遺伝子操作ができないため、増殖機構の分子生物学的解析がほとんど行われていない。本研究では、RSV の遺伝子操作実験系の開発を試みた。感染性 RSV 粒子の試験管内再構成を目指して、構成要素であるヌクレオキャプシドタンパク質および RNA ポリメラーゼを、活性を有する形で得ることに成功した。残念ながらこれらの因子と RNA を混合しても感染性ウイルス粒子の再構築には至らなかったが、マイナス鎖 RNA ウィルスの RNA ポリメラーゼは巨大なため、活性を有する精製標品が得られた例はこれまでに数少ないことから、今後植物マイナス鎖 RNA ウィルスの研究を発展させるための基盤を作ることができたと考えている。

研究成果の概要（英文）：

Rice stripe virus (RSV) is a negative-strand RNA virus that infects Rice plants transmitted by small brown plant hopper. Due to the unavailability of reverse genetics systems, knowledge about how plant negative-strand RNA viruses multiply is limited. In this project, I tried to develop a reverse genetics system of RSV. To reconstitute an infectious ribonucleoprotein (RNP) complex, I succeeded to express and purify the nucleocapsid protein and RNA polymerase of RSV, components of RSV RNP. Although mixtures of these proteins with viral RNA did not result in formation of the infectious RNP, the materials obtained in this project would help further development of the study of plant negative-strand RNA viruses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：植物病理学

キーワード：植物・病原体相互作用, 感染・増殖

1. 研究開始当初の背景

農作物に多大な被害をもたらす昆虫媒介性植物ウイルスのうち、昆虫体内でも増殖するものの多くはマイナス鎖 RNA ウイルスである。ウイルスの増殖機構の解析には、遺伝子操作実験（逆遺伝学実験）系が強力なツールとなるが、RNA ウイルスの場合、cDNA からの感染ができて初めて遺伝子操作が可能となる。プラス鎖 RNA ウイルスのゲノムは mRNA として機能し、RNA のみで感染性を示すため、多くのプラス鎖 RNA ウイルスの逆遺伝学実験系が 1980 年代以降に確立され、増殖機構の解明に著しく貢献してきた。一方、マイナス鎖 RNA ウイルスのゲノムはヌクレオキャプシドタンパク質および RNA ポリメラーゼとリボヌクレオタンパク質複合体 (RNP) を形成しており、裸の RNA は感染性をもたない。このことが主な原因となり、植物のマイナス鎖 RNA ウイルスの逆遺伝学実験系は未だ確立されておらず、増殖過程の分子レベルでの理解はほとんど進んでいない。したがって、マイナス鎖 RNA ウイルスの研究を行うにあたり、逆遺伝学実験系を開発することが急務であった。

2. 研究の目的

イネ縞葉枯ウイルス (RSV) は、ヒメトビウンカを媒介昆虫とするマイナス鎖 RNA ウイルスであり、国内のみならずアジア地域の稲作に多大な被害を与えるウイルスである。本研究は、RSV の逆遺伝学実験系を確立し、マイナス鎖 RNA ウイルスの増殖機構の解明に向けた基盤を作ることを目的とする。

逆遺伝学実験系の確立に成功すればウイルス遺伝子の機能解析が容易になり、植物細胞および昆虫細胞内における増殖、細胞間移行、媒介過程、病徴発現など増殖過程の様々な段階に関与するウイルス遺伝子を明らかにすることが可能となる。これにより、現在知見が乏しいマイナス鎖 RNA ウイルスの増殖サイクルについての理解が深まれば、新規ウイルス防除策の構築に向けた第一歩となることが期待できる。また、逆遺伝学実験系はウイルスのベクター化や弱毒ウイルスの開発等にも応用可能である。特に RNA4 にコードされる p4 タンパク質は感染植物中での宿主タンパク質よりも多く蓄積する非常に発現量の多いタンパク質であるため、当該 ORF を用いた遺伝子発現ベクターは有用なものとなるだろう。

3. 研究の方法

(1) RSV RNP の試験管内再構築

RSV ゲノム RNA より cDNA を作製し、クローン化する。このとき、ゲノム鎖および相補鎖いずれの RNA も転写できるよう、cDNA

を 2 種類の逆向きに配置した試験管内転写用プロモーターの間に挟む。ヌクレオキャプシドタンパク質は分子量約 35,000 と比較的小さいため、大腸菌等を用いて可溶性タンパク質として発現できる条件を検討する。一方、RNA ポリメラーゼは分子量約 330,000 と巨大なため、発現は困難を伴うかもしれない。そこで、高分子量タンパク質の発現に実績のある出芽酵母や試験管内翻訳の利用、アグロインフィルトレーション法による植物細胞での発現を試みる。発現に成功したら、粗抽出液あるいは部分精製標品等を用いて RNA ポリメラーゼ活性の有無を調べる。活性の測定は、RNA ポリメラーゼとゲノム鎖あるいは相補鎖となるウイルス RNA を混合し、RSV 粒子がもつ RNA ポリメラーゼ活性についての既報の方法 (Toriyama, J. Gen. Virol. 67: 1247-1255 [1986]) に従って行う。このとき、ヌクレオキャプシドタンパク質が RNA ポリメラーゼ活性を調節する可能性があるため、反応系に添加する。

活性のあるタンパク質を得ることができたら、様々なバッファー条件において RNP の再構築を試み、これを植物あるいは昆虫に接種して増殖するかどうか調べる。ウイルスの増殖が確認されたらウイルス粒子を回収し、これが cDNA クローン由来の配列をもっているか確かめた後、再度接種して感染性を確認する。

(2) 植物細胞内における RSV RNP の構築

RNP の再構築による逆遺伝学実験がうまくいかなかった場合、細胞内でウイルスタンパク質および RNA を発現させることによる逆遺伝学実験系の確立を試みる。RNA ポリメラーゼおよびヌクレオキャプシドタンパク質をアグロインフィルトレーション法等によって植物細胞で一過的に発現し、さらにゲノム RNA あるいは相補鎖 RNA を導入することによりウイルスが増殖するかどうか調べる。RNA の導入法については、試験管内転写産物の機械接種あるいは適切なプロモーターの下流に cDNA をもつプラスミドを利用する。

(3) RSV 逆遺伝学実験系の利用

RSV の逆遺伝学実験系の確立に成功したら、ウイルス cDNA に部位特異的変異導入 (フレームシフト変異, ナンセンス変異など) を行い、各遺伝子の機能を喪失した変異ウイルス株を作製する。各変異株の植物細胞および昆虫細胞における増殖能、植物葉における細胞間移行能、植物体および昆虫体内における全身移行能、媒介昆虫によるウイルスの獲得能・媒介能・継卵伝染能、植物における病徴等を調べ、各遺伝子がどの段階に必要なか明らかにする。ウイルス増殖が認められた場合に

はウイルスを回収し、これがcDNAクローン由来の配列をもっているか（機能を回復する変異をもっていないか）確かめる。また、増殖に必須でない遺伝子をレポーター遺伝子と置き換えることなどにより、RSVの遺伝子発現ベクター化の可能性を検討する。

4. 研究成果

(1) RSV RNPの試験管内再構築

RSVのゲノムをクローニングし、各分節のRNAを試験管内転写によって合成することに成功した。4分節あるゲノムのうち最長のもの（RNA1）は、大腸菌内で非常に不安定であったため、クローニングは困難を極めたが、菌株や培養条件を検討することにより成功した。

RSVのRNPの再構築を目指し、ヌクレオキャプシドタンパク質およびRNAポリメラーゼの発現と精製を行った。

ヌクレオキャプシドタンパク質は大腸菌を用いて合成することができた。精製したヌクレオキャプシドタンパク質の大部分は大腸菌由来のRNAと結合しており、外来のRNAとの結合活性を示さなかった。ヌクレアーゼ処理を行い大腸菌由来のRNAを分解することにより若干の結合活性が見られたが、効率は著しく低かった。一方で、RNA結合型と非結合型のヌクレオキャプシドタンパク質を分離して精製する条件を確立した。非結合型のヌクレオキャプシドタンパク質は、適切な温度・バッファー条件下でRNAと結合させると、沈降係数の大きなRNPを形成した。なお、この結合は配列非特異的であった（図1）。

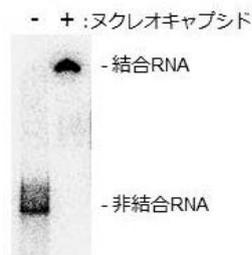


図1. RSVヌクレオキャプシドのRNA結合能。ゲルシフト法により、精製ヌクレオキャプシドタンパク質のRNA結合能を調べた。

RSV RNAポリメラーゼについてはさまざまな系で発現を試みたが、脱液胞化タバコプロトプラスト抽出液（BYL）を用いた試験管内翻訳および出芽酵母においてのみ発現が確認できた。RNAポリメラーゼを翻訳したBYL中で活性測定を試みたが、BYL中に存在する非キャップRNA分解活性により鋳型RNAが分解されたため、うまくいかなかった。またBYLを用いた試験管内翻訳では、翻訳後に

RNAポリメラーゼを精製してヌクレアーゼを除去するには十分な量を得ることができなかった。一方、出芽酵母を用いた発現系においてRNAポリメラーゼを大量に発現させることができた。酵母細胞破碎液はBYL同様ヌクレアーゼ活性が高かったため、カラムクロマトグラフィーによりRNAポリメラーゼを精製した。二価カチオンの種類や濃度など反応条件を検討したところ、鋳型特異的なRNAポリメラーゼ活性を検出することができた（図2）。

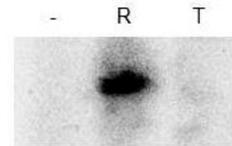


図2. RSV RNAポリメラーゼによる鋳型特異的RNA合成活性。鋳型存在下で $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ の取り込みを検出した。-: 鋳型なし。R: RSV 3'末端 (40 nt)。T: TSWV 3'末端 (40 nt)。

しかし、RNAポリメラーゼ活性は数十塩基までの短い鋳型を用いたときのみ検出され、現在までのところ数千塩基からなるゲノム全長の複製には成功していない。また、得られたRNAポリメラーゼおよびヌクレオキャプシド標品とRNAを混合し、宿主植物への接種を試みたが、感染は確認できなかった。

本研究の目標であったRSVの遺伝子操作実験系の確立には至らなかったものの、RSV粒子の構成因子を活性を有する形で得ることができたことは大きな進展である。本研究で得られた材料は、感染性RNPの構築に向けた詳細な条件検討に用いるだけでなく、RNAポリメラーゼの鋳型特異性等を含む生化学的解析に利用可能であり、今後の研究に向けた基盤となる。

2) 植物細胞内でのRSV RNPの構築

植物細胞内でのRSV粒子再構築を目指し、各タンパク質およびRNAのアグロインフィルトレーションによる*Nicotiana benthamiana*葉での一過的発現を試みた。しかし、RNAポリメラーゼの発現が認められなかったため中断した。

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3件）

（原著論文）

Masaki Nishikiori, Shigeru Sugiyama, Hongyu Xiang, Mayumi Niiyama, Kazuhiro Ishibashi, Tsuyoshi Inoue, Masayuki Ishikawa, Hiroyoshi Matsumura, Etsuko Katoh (2012) Crystal

structure of the superfamily 1 helicase from *Tomato mosaic virus* *Journal of Virology* 86(14):7565-7576

Hongyu Xiang, Kazuhiro Ishibashi, Masaki Nishikiori, Mauren C. Jaudal, Masayuki Ishikawa, Etsuko Katoh (2012) Expression, purification, and functional characterization of a stable helicase domain from a tomato mosaic virus replication protein. *Protein Expression and Purification* 81(1):89-95

(総説)

Kazuhiro Ishibashi, Shuhei Miyashita, Etsuko Katoh, Masayuki Ishikawa (2012) Host membrane proteins involved in the replication of tobamovirus RNA. *Current Opinion in Virology* 2(6):693-698

[学会発表] (計 11 件)

森川憂乃, 石橋和大, 水本祐之, 木村謙太郎, 松本耕平, 木場章範, 石川雅之, 奥野哲郎, 曳地康史 (2013) トマト植物における *Pepper mild mottle virus* の細胞間移行を可能にする 130K/180K タンパク質のアミノ酸置換は一細胞における複製効率を向上させる **平成 25 年度日本植物病理学会大会**

加藤悦子, 錦織雅樹, 杉山成, 相宏宇, 新山真由美, 石橋和大, 井上豪, 石川雅之, 松村浩由 (2013) ウイルススーパーファミリー1ヘリカーゼの結晶構造解析 **第 1 回物構研サイエンスフェスタ**

錦織雅樹, 杉山成, 相宏宇, 新山真由美, 石橋和大, 井上豪, 石川雅之, 松村浩由, 加藤悦子 (2012) ウイルススーパーファミリー1ヘリカーゼ様ドメインの結晶構造解析 **第 12 回日本蛋白質科学会年会**

Katoh E, Nishikiori M, Sugiyama S, Xiang H, Niiyama M, Ishibashi K, Inoue T, Matsumura H, Ishikawa M (2012) Crystal structure and interaction with host factors of the superfamily 1 helicase from *Tomato mosaic virus* *XV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions*

Kawamura K, Ishibashi K, Ishikawa M (2012) Characterization of a ribonucleoprotein complex that serves as a precursor of tobacco mosaic virus replication complex *XV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions*

Morikawa Y, Ishibashi K, Mizumoto H, Kimura K, Matsumoto K, Kiba A, Ishikawa M, Okuno T, Hikichi Y (2012) Mutations in the 130K/180K

replication protein genes of *Pepper mild mottle virus* that confer the ability to systemically infect tomato plants reduce its infectivity in original hosts *XV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions*

薦田圭介, 石橋和大, 河村和恵, 石川雅之, 飯哲夫 (2012) 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**

宮下脩平, 石橋和大, 石川雅之 (2012) トマトモザイクウイルス細胞感染成立過程の数理モデル **平成 24 年度日本植物病理学会大会**

Morikawa Y, Ishibashi K, Mizumoto H, Kimura K, Matsumoto K, Kiba A, Ishikawa M, Okuno T, Hikichi Y (2012) Mutations in 130K/180K replication protein genes in *Pepper mild mottle virus* confer the ability to induce systemic infection in tomato plants *The 2nd Korea-Japan Joint Symposium and the 2012 Annual Meeting of PSJ*

Miyashita S, Ishibashi K, Kishino H, Ishikawa M (2012) Detailed analysis of the genetic bottlenecks in single-cell infections of *Tomato mosaic virus* *The 2nd Korea-Japan Joint Symposium and the 2012 Annual Meeting of PSJ*

Miyashita S, Ishibashi K, Kishino H, Ishikawa M (2011) Detailed analysis of the genetic bottlenecks in single-cell infections of *Tomato mosaic virus* *International Union of Microbiological Societies 2011 Congress*

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石橋 和大 (ISHIBASHI KAZUHIRO)

独立行政法人農業生物資源研究所・研究員
研究者番号：20611742