

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：32675

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657038

研究課題名(和文)植物細胞のウイルス増殖抑制機構とその解除因子の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the virus propagation-interference mechanism in plant cells and search for suppressing factors of this process

研究代表者

長田 敏行(NAGATA, Toshiyuki)

法政大学・生命科学部・教授

研究者番号：10012519

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：イネプロトプラストにTMV-RNAを導入してもTMVの増殖を見ることはないが、CMV-RNAとTMV-RNAを同時に導入すると、CMVが増殖した細胞ではTMVが増殖できるという以前の研究を、マイクロRNAの見地から分子機構解明を行った。植物細胞ではウイルス増殖にRNAサイレンシングが働くが、ウイルス遺伝子産物中にサイレンシングを抑制するものがあると予想される。本研究で、CMVの2b遺伝子産物にそのような可能性があることが示され、それと作用するタンパク質がイネ細胞にあると推定された。2b遺伝子を恒常的にイネ細胞0cに発現させてウイルス増殖にどのような影響を与えるかの結論は今後に持ち越された。

研究成果の概要(英文)：We have shown previously that the propagation of TMV was not observed in rice protoplasts, when TMV-RNA was solely introduced into them. However, TMV propagation was observed, when both TMV-RNA and CMV-RNA were introduced into rice protoplasts. This observation may be interpreted from the viewpoints of microRNA functioning. Generally speaking, it is said that upon virus infection, RNA silencing functions; however, in some of virus products, factors that suppress RNA silencing function upon virus infection. Thus, in this study one of such factors is supposed to be a gene product of 2b of CMV. It is inferred that certain factors in rice cells have been identified that interact with the 2b protein.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：イネ細胞 タバコモザイクウイルス キュウリモザイクウイルス RNAサイレンシング サプレッション  
エレクトロポレーション

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 研究代表者は、1988年に「植物ウイルスであるタバコモザイクウイルス(TMV)RNAを、イネプロトプラストへエレクトロポレーションで導入しても、ウイルスの増殖を観察しなかったが、キュウリモザイクウイルス(CMV)RNAを導入するとウイルスの増殖を確認した。ところが、CMV-RNAとTMV-RNAを同時にイネプロトプラストへ導入すると、CMVの増殖した細胞の何割かにTMVが増殖していること」を確認した。その時点では、この観察に適切な解釈を与えることが出来なかったため、その事実のみを論文発表した(Plant Cell Rep. 7, 333, 1988)。ところが、その後マイクロRNAが発見され、その細胞内での興味深い挙動が明らかにされることにより、代表者らが1988年に報告した内容は新しい見地から見直すべきであるという見地に達したのが本研究開始の段階の動機である。

(2) 上記の点から、次のような可能性を考えて、かつての結果を見直すこととした。即ち、マイクロRNA系の作用を考慮したイネ細胞内でのウイルスの増殖に関しては、まず、細胞内では多くのウイルスが増殖を抑制されている可能性があり、TMV-RNAでウイルス増殖が見られなかったことは、この機構が第一義的に作用しているものと考えられる。一方、CMV-RNAでウイルス増殖が見られたことはCMVでは、宿主細胞のウイルス増殖抑制機能(RNA Silencing、あるいはInterference)が解除されたものと考えられ、抑制解除(Suppressionと呼ばれている)が起こったかと考えられる。そして、そのようなことが起こる条件では、本来増殖抑制されているTMVの増殖が可能になったものと考えた。そこで、このような見解の妥当性を考えて本研究に取り掛

かることとした。

## 2. 研究の目的

(1) まず、元となる現象を再確認する必要があるが、時間も経過しているのかつての方法をそのまま採用することは困難である。そこで、現時点でどのようなことが可能であるかを検討して、条件の再現を確立することが第一条件であった。かつては、ウイルスをそのまま利用することが出来、そこから直接RNAの精製を行ったが、それは現在ではそれぞれのウイルスにおいてクローン化されたDNAがあるので、クローン化されたDNAを入手し、そこからRNAを精製することを行うこととした。また、かつてはウイルスの増殖を細胞レベルで直接ウイルスに対する蛍光抗体を用いて染色し、蛍光顕微鏡下で判定していたが、現時点では培養した細胞の抽出物中にて、抗体を用いて判定する必要があることから、まず、これらの技術的問題の解決から出発する必要があるため、その点の解明を第一の目的とした。

(2) 第2点は、2004年以降イネゲノムは決定されているので、その情報を用いてイネゲノム中に上記背景に掲げた抑制因子、その解除因子の探索を行うことを第二の目的とした。また、手掛かりとしては介在する抑制因子、あるいはその解除因子を分子生物学的方法で推定できる可能性があるため、それらを併用して仮説の検証に援用することとした。

## 3. 研究の方法

(1) まず、ウイルス増殖系は従来の方法に従って、イネOc細胞を用いることとした。これは理研ストックセンターより入手した。細胞増殖の様子はかつての条件とほぼ同じ状態であることを確認することが出来た。また、エレクト

トポレーション装置は市販の物とは仕様が異なるので、所属機関のワークショップに依頼して作成し、かつてとほぼ同機能の装置を入手することができた。

(2) ウイルス RNA については、まず、TMV は用いずに関連ウイルスであるトマトモザイクウイルス(ToMV)を用いることとしたが、これは(独)農業生物資源研究所石川雅之博士よりクローン化された DNA を入手した。TMV と ToMV は、ゲノム的にもきわめて近縁であることが分かっている。一方、CMV は、大阪府立大学大木 理博士よりクローン化された DNA を入手して利用することとした。これらのクローン化 DNA を用いて、大腸菌で RNA を生産し、抽出し、精製してから、実験を遂行することとした。

(3) 細胞内においてウイルスの産物同定は、細胞を一定時間培養して細胞抽出物を調製し、これを SDS-PAGE にかけてタンパク質を泳動させて、その泳動パターンを確認する。このパターンがウイルス感染の有無でどのように異なるかをウイルス産物に対する抗体によるイムノプロットングで調べる。

(4) なお、ウイルス増殖抑制機能(RNA Silencing)を抑制する現象(Suppression)に関わる機能を持つタンパク質として、CMV の遺伝子産物の一つである 2b タンパク質がシロイヌナズナで同定されているが、これについては単離・精製が可能であるので、その大腸菌での増殖をはかり、それと相互作用するタンパク質の追跡も生化学的に行うこととした。ただし、2b タンパク質がイネ細胞でも同様に作用するかはこれまでのところ明らかにはなっていない。

(5) また、上記 2b タンパク質をイネ細胞に恒常的に生産させることは可能であるので、それらの細胞でウイルスの増殖のプロファイルがどのようになるかをも確かめることとした。そのためには、まず、2b の遺伝子を単離して、それをイネ細胞の形質転換系に導入して、形質転換体を作ることが第一ステップであるので、そのための作業を行うこととした。

#### 4. 研究成果

(1) イネ細胞の増殖は、従前と同様に行うことが出来ることが確認された。ただし、プロトプラストの調製は、当時よりは酵素の質がやや低下しているので、調製されたプロトプラストの活性はやや低いと判断された。一方、増殖の維持に関しては、別に行っているタバコ細胞とは明らかに増殖の速度はおとり、しかも 1 週間植継ぎのインターバルを遅らせるとオートリシスに相当する現象があることが見られた。ただし、この点は今回の研究の主目標ではないので観察に止めた。

(2) イネプロトプラストへ ToMV-RNA 感染、および ToMV-RNA と CMV-RNA の共感染の後、1 日間細胞を培養した後 SDS-PAGE で電気泳動を行い、ゲルを抗体を用いてウイルスタンパク質の検出を行った。元々の直接的蛍光抗体法に比べ、検出感度が低く、この点の技術的改良が今後の問題として残った。

(3) 多成分系ウイルスである CMV の 2b 遺伝子産物が、RNA 増殖阻止(RNA Silencing)を抑制する可能性があり(Suppression)、それを分子レベルで示す一つの方法は 2b タンパク質を大腸菌で増殖させ、これと特異的に作用するタンパク質をイネ細胞に探索することである。こ

のために、2b タンパク質の産生を大腸菌で試みたが、産物は見られるものの発現量が著しく低下し、2b タンパク質が大腸菌の成育に影響を与えることが観察され、この点の改善が課題として残った。また、2b タンパク質と相互作用するタンパク質の追跡は、His-tag 標識した 2b タンパク質を調製し、これをニッケルカラムに載せ、そこにイネ細胞抽出物を流してアフィニティー・クロマトグラフィーを行ったところ 3 種類の 2 タンパク質が候補として挙がってきた。従って、このようなタンパク質の存在は確実と思われる。しかし、なおその同定には更なる検討が必要である。イネゲノムにそれらを追跡することは継続中である。

(4) 多成分系ウイルスである CMV がウイルス増殖の抑制を解除する機能があるなら (Suppression に相当)、それはウイルスの遺伝子産物にその原因がある可能性があるので、5 ケの成分をイネ細胞に発現させて、その細胞がウイルス感染にどのような挙動を示すかを調べることとした。このため、アグロバクテリウムによるイネ細胞の形質転換を試みたが、Oc 細胞は形質転換に抵抗性があり、他の品種ニホンバレ、キンマゼでは、形質転換体が得られたものの肝心の Oc 細胞では、他研究室でも報告のあるように困難であった。また、一過性の遺伝子発現では発現は確認されたもののそのレベルは低く、なお決定的な結果は得られていない。

従って、現時点での結論としては、提出した仮説は妥当であると考えるが、細部の証明についてはなお更なる検討が必要であると判断している。

## 5. 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] (計 12 件)

Nagata, Toshiyuki, DuVal, A., Lack, W.W., Newbitt, M., Schnull, M., Crane, P.R.: *Paulownia tomentosa*. A Chinese plant in Japan. *Curtis's Botanical Magazine*, 査読有、Vol. 30, 261-274, 2013

Crane, P.R., Nagata, Toshiyuki, Murata, J., Ohi-Toma, T., DuVal, A., Newbitt, M., Jarvis, C.: *Ginkgo biloba*. Connections with people and art across thousand years. *Curtis's Botanical Magazine*, 査読有、Vol. 30, 239-260, 2013

Nagata, Toshiyuki, DuVal, A., Lack, H.W., Loudon, G., Nesbitt, M., Schnull, M., Crane, P.R.: An unusual xylotheques with plant illustrations from early Meiji Japan. *Economic Botany*, 査読有、Vol. 67, 87-92, 2013

長田敏行, DuVal, A., 東馬哲雄、邑田仁、Crane, P.: 小石川、キュー、ベルリンダーレム植物園をつなぐ「加藤竹斎」図版、日本植物園協会誌、査読有、Vol. 48, 112-113, 2013

Sano, T., Hayashi, T., Kutsuna, N., Nagata, Toshiyuki, Hasezawa, S.: Role of actin microfilaments in phragmoplast guidance to the cortical division zone. *Current Topics in Plant Science*, 査読有、Vol. 13, 87-94, 2012

Nishii, K., Nagata, Toshiyuki, Wang, C.-N., Möller, M.: Light as environmental regulator for germination and macrocotyledon development in *Streptocarpus rexii* (Gesneriaceae). *South African Journal of Botany*. 査読有、Vol. 81, 50-60, 2012

Nishii, K., Wang, C.-N., Spada, A., Nagata, Toshiyuki, Möller, M.: Gibberellin as a suppressor of lateral dominance and inducer of apical growth in the unifoliate *Streptocarpus wendlandii* (Gesneriaceae). *New Zealand Journal of Botany*. 査読有、Vol. 50, 1-21, 2012.

Sano, T., Yoshihara, T., Handa, K. Sato, M.H.

Nagata, Toshiyuki and Hasezawa, S.: Metal ion homeostasis mediated by NRAMP transporters in plant cells: Focused on increased resistance to iron and cadmium ion. In Cross Talk and Membrane Trafficking Pathways, Roberto Weigert ed., Chapter 10, pp.213-228, 査読有、InTech Open Pub., Rijeka, Croatia, 2012.

Masamura, N., Ohashi, W., Tsuge, N., Imai, S., Ishii-Nakamura, A., Hirota, H., Nagata, Toshiyuki and Kumagai, N.: Identification of amino acid residues essential for onion lachrymatory factor synthase activity. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 査読有、Vol. 73, 447-453, 2012.

長田敏行、東馬哲雄、邑田仁、Crane, P.: 小石川植物園-王立キュー植物園-ベルリン・ダーレム植物園をつなぐもの、遺伝、査読なし、Vol. 66, 578-582, 2012

長田敏行: バイオマスの拡がり、遺伝、査読なし、Vol. 66, 79-81, 2012

長田敏行: ジャガイモゲノムの決定、遺伝、査読なし、Vol. 66, 8-11, 2012

[学会発表](計 6 件)

長田敏行: サステナビリティにより覚醒された科学哲学への関心、日本科学哲学学会年会、東京都千代田区市ヶ谷、2013 年 11 月 21 日-23 日(招待講演)

長田敏行: イチヨウの生命誌、日本メンデル協会公開講演会、長野県下諏訪町、2013 年 11 月 9 日(招待講演)

長田敏行、A. DuVal、東馬哲雄、邑田仁、P.R. Crane: 小石川、キュー、ベルリン-ダーレム植物園をつなぐ「加藤竹斎」図版、日本植物園協会第 48 回大会、茨城県つくば市、2013 年 5 月 30 日 6 月 1 日

清水隆、長田敏行: 新奇細胞増殖因子

NtXYL1 の解析、日本植物生理学会大会、岡山県岡山市、2013 年 3 月 21 日-3 月 23 日

長田敏行、東馬哲雄、邑田仁、P.R. Crane: 1878 年からの贈りもの、日本植物学会大会、兵庫県姫路市、2012 年 9 月 13 日-16 日

T. Shimizu, T. Nagata: A novel cell division factor that induced cell division in auxin-starved tobacco BY-2 cells. The 3<sup>rd</sup> EMBO Conference of Plant Molecular Biology, Matera, Italy, May 27-30, 2012

[図書](計 1 件)

長田敏行: イチヨウの自然誌と文化史、裳華房, pp.204 (2014)

[産業財産権]

なし

[その他]

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長田 敏行(NAGATA, Toshiyuki)  
法政大学・生命科学部・教授  
研究者番号: 1 0 0 1 2 5 1 9

### (2) 研究分担者

なし