

「植物の機能と制御」

平成14年度採択研究代表者

石川 雅之

(独立行政法人農業生物資源研究所 チーム長)

「タバコモザイクウイルスの増殖機構」

1. 研究実施の概要

ウイルスはゲノム上に限られた遺伝情報しかコードしていない。このため、ウイルスの増殖を司るマシナリーは、ウイルスゲノムにコードされた因子とともに細胞内の既存の分子を巧みに流用して構築される。従って、ウイルスの増殖機構を理解し、ウイルス増殖の人為的コントロールあるいはウイルスの有効利用の基礎を構築するためには、ウイルスにコードされた因子のみならずウイルス増殖に関与する宿主因子も含めた解析が必要である。しかし、真核生物を宿主とするウイルスの増殖に関与する宿主因子の解明は遅れている。本研究では、我々が新規に開発した、脱液胞化タバコBY-2培養細胞抽出液 (BYL) をベースにした試験管内タバコモザイクウイルス (TMV) RNA翻訳-複製系を用いて TMV RNAの複製機構を解析し、関与する宿主因子を同定する。また、複製に密接に連携して起こると考えられる、RNAサイレンシングからの回避と細胞間移行に関わる宿主因子を同定し、TMVの増殖機構を分子レベルで明らかにする。

平成15年度の本研究で、以下の成果が得られた。

(1) 試験管内TMV RNAの複製過程において膜表面に複製複合体が形成される前段階にあると考えられる複合体 (中間複合体) を見いだした。複製複合体形成過程を途中で停止させ、解析可能な中間体が検出できたことは、この過程を詳細に解析する上で大きな前進である。

(2) タバコBY-2細胞において人為的にTMV感染を誘導する方法を確立し、感染誘導細胞から複製複合体を大量に調製する方法を開発した。得られた複製複合体の活性は界面活性剤に高い感受性を示し、膜が複製複合体の活性発現、そして恐らくは構造維持に本質的に必要であることが示唆された。今後中間複合体および複製複合体を膜結合状態のまま精製し、その性質を詳細に調べるとともに、構成因子を網羅的に同定する。これにより、複製に関与する宿主因子に関する知見を得る。

(3) TMV RNA複製と細胞間移行および RNAサイレンシング抑制の連携機構に関しては、標的ウイルスタンパク質の生物活性を残したままアフィニティー精製用タグを付加することに成功するなど、解析基盤の充実という点で進展があった。具体的内容は「研究実施内容」に詳述する。

2. 研究実施内容

研究項目番号は「1. 研究実施の概要」における番号に対応する。

(1) TMV RNAの複製複合体形成機構の解析：TMV RNA複製複合体が膜表面に形成されるまでの過程がどのように進行するのかを解明することが本項目のゴールである。そのための第一歩として、本研究では試験管内TMV RNA複製過程を膜表面に複製複合体が形成される直前で停止させ、蓄積してくる中間体を同定することを計画した。当初、複製複合体を膜に繋ぎとめる働きをもつと考えられる、TMV の増殖に必須な宿主膜タンパク質TOM1とそのホモログであるTOM3の発現をRNA interference法で抑制したタバコBY-2細胞から調製したBYL を用いればこの目的が達せられると考え、実行した。しかし、エレクトロポレーションで TMV RNA を導入してもほとんど TMV RNA の複製が観察されなかった細胞から調製した BYL を用いても、試験管内系では TMV RNAの複製は完全には阻害されなかった（複製効率は低下したが）。この結果は、当該細胞においてTOM1, TOM3の発現が完全には抑制できていないか、試験管内では TMV RNAの複製がTOM1, TOM3 非依存的経路によっても複製可能である可能性を示唆する。そこで、方針を切り替え、超遠心分離で膜を除去したBYL で TMV RNA を翻訳した。膜のない状態で翻訳後、反応液に RNA 合成基質を加えても、TMV RNA の複製は起こらなかったが、そこに超遠心分離で除いた膜を加えると複製が起きた。膜を加えると複製を起こすことのできる実体は、100,000 x g 遠心の沈殿画分に回収された。これは、膜表面に複製複合体が形成される前段階の複合体であると考えられた。

(2) TMV RNA複製複合体の解析：本研究開始時に、TMV 感染 BY-2 プロトプラストを脱液胞化し、破碎して得た抽出液の膜画分が、生体内と同様のパターンの TMV 関連 RNA 合成能をもつ複製複合体を含むことがわかっていて、しかし、多量の感染プロトプラストを得る方法がなかったため、複製複合体構成因子を同定することは困難であった。そこで、本研究では先ず、多量の TMV 感染 BY-2 細胞を得る方法を模索した。タバコBY-2細胞をステロイドホルモン誘導性プロモーター下流にリボザイム配列を付加した完全長 TMV cDNA を挿入した遺伝子カセットで形質転換した。この形質転換細胞をステロイドホルモン処理すると、コンストラクトにより差があるものの、最大 80% の細胞で感染が誘導された。このようにして多量に得た TMV 感染細胞から脱液胞化プロトプラストを調製し、破碎して得た細胞抽出液は、1本鎖 TMV ゲノミックおよびサブゲノミック RNA を合成する膜結合性の活性を含んでいた。さらに、界面活性剤を限界ミセル濃度以上の濃度で加えると、試した限り全ての界面活性剤について、その活性は失活した。この結果は、複製複合体の活性、そして恐らくは構造の維持にインタクトな膜構造が必須であることを示唆する。そこで、今後、無関係な膜表在タンパク質を高塩濃度処理等によりできる限り除去したうえで、複製複合体を含む膜と含まない膜の構成タンパク質の比較を行い、複製複合体構成因子を同定する。これにより、複製に関連する宿主因子に関する知見を得る。また、TMV の外被タンパク質コード領域を GFP 遺伝子で置換したウイルスゲノムをステロイドホルモンにより感染誘導すると、GFP が細胞内の主要タンパク質として検出されるほど高

発現することがわかった。そこで、この系を有用真核生物タンパク質の大量生産に応用できないか検討中である。

(3) TMV RNA 複製と細胞間移行および RNA サイレンシング抑制の連携機構の解析：

TMVの130K複製タンパク質は、宿主の防御反応であるRNAサイレンシングを抑制する。また、TMVの弱毒株L11の130Kタンパク質は強毒株の130Kタンパク質より低いRNAサイレンシング抑制能をもつ。平成14年度の本研究において、L11感染細胞中では非膜結合状態にある130Kタンパク質の蓄積レベルが低いことを見いだした。そこで、平成15年度は、L11変異によって非膜結合130Kタンパク質が分解されやすくなっている可能性を考慮し、プロテアソーム阻害剤 (clasto-lactacystein- β -lactone: CLBL) 処理がTMV 感染プロトプラストにおける 130K タンパク質の膜結合/非膜結合比に与える影響を調査した。CLBL 処理により、ユビキチン化されたタンパク質の蓄積 (つまり分解阻害) は観察されたが、130K タンパク質の非膜結合/膜結存量比は大きな影響を受けず、130K タンパク質のプロテアソームによる分解を積極的に指示するデータは得られなかった。今後は、さらに別種のタンパク質分解酵素阻害剤の効果を検討するとともに、L11 変異によって 130K タンパク質が膜に結合しやすくなっている可能性についても検討を加えて、非膜結合130Kタンパク質の蓄積が低下する原因を追及し、RNAサイレンシング抑制との因果関係を明らかにする。また、より直接的に 130K タンパク質の機能を解析するために、BYL を用いて試験管内で RNA サイレンシングの再現を試み、一部有望な結果を得ているので、これも並行して進める。

平成14年度の研究において、TMV に感染したタバコ BY-2 プロトプラストを破碎し、細胞分画して移行タンパク質と複製蛋白質の挙動を調査し、一部の画分に両タンパク質が同時に存在することを明らかにした。平成15年度は、細胞間移行能を保持させたまま移行タンパク質にアフィニティー精製用タグを導入することを試み、これに成功した。既にこのタグ付き移行タンパク質をもつキメラ TMV ゲノムの感染をステロイドホルモン添加により高率で誘導できる BY-2 細胞株を得ている。今後、この細胞株を用いて移行タンパク質と複製蛋白質の架橋剤でクロスリンクされるかなどを問い、複製と細胞間移行の連携機構の解明につなげる。

3. 研究実施体制

石川グループ

- ① 研究分担グループ長：石川 雅之 (独立行政法人農業生物資源研究所、生理機能研究グループ、耐病性研究チーム長；平成16年3月16日まで北海道大学 大学院農学研究科、助教授)
- ② 研究項目：TMVの複製蛋白質の翻訳から複製複合体の形成に至る分子機構の解明および複製複合体の構成要素の同定と各因子の機能解明

飯グループ

- ① 研究分担グループ長：飯 哲夫（独立行政法人農業生物資源研究所、生理機能研究グループ長；平成15年6月30日まで京都大学 大学院理学研究科、助教授）
- ② 研究項目：RNA複製と細胞間移行の連携機構の解明およびTMV複製蛋白質によるRNAサイレンシング抑制機構の解明

森グループ

- ① 研究分担グループ長：森 正之（石川県農業短期大学、農業資源研究所、助教授）
- ② 研究項目：タバコBY-2培養細胞におけるT-DNAカセットからのTMV感染誘導系の構築

鈴木 グループ

- ① 研究分担グループ長：鈴木 英治（秋田県立大学 生物資源科学部 生物生産科学科）
- ② 研究実施項目：同定されたTMV増殖関連因子遺伝子候補の大量シーケンシング

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

（1）論文（原著論文）発表

- Kenji Kubota, Shinya Tsuda, Atsushi Tamai, and Tetsuo Meshi (2003). Tomato Mosaic Virus Replication Protein Suppresses Virus-Targeted Posttranscriptional Gene Silencing. **J. Virol.** 77 (20), 11016-11026.
- Keisuke Komoda, Satoshi Naito, and Masayuki Ishikawa (2004). Replication of plant RNA virus genomes in a cell-free extract of evacuated plant protoplasts. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 101 (7), 1863-1867.
- Motoyasu Yoshii, Masaki Nishikiori, Kayo Tomita, Norimichi Yoshioka, Reiko Kozuka, Satoshi Naito, and Masayuki Ishikawa (2004). The *Arabidopsis Cucumovirus Multiplication 1* and *2* Loci Encode Translation Initiation Factors 4E and 4G. **J. Virol.** 78 (12), 6102-6111.

（2）特許出願

H15年度特許出願件数：9件（CREST研究期間累積件数：10件）