

「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、ウイルスの増殖には細胞内に既存の分子が巧みに利用される。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。本研究は、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、あるいは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の分子機構を解明し、関与する宿主因子を同定することを目的とする。

これまでの研究で、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 (pre-membrane-targeting complex: PMTCと命名) を見いだした。本年度は、PMTCの性状を蔗糖密度勾配遠心法で解析し、それがリボソームより速く沈降する巨大な複合体であることを示唆する結果を得た。今後、PMTCを精製し含まれる因子を同定する。

(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た。本年度は、膜に結合した複製タンパク質が界面活性剤処理でアグリゲートを形成することを見いだした。膜に結合していない複製タンパク質では同処理によってアグリゲートができないので、膜結合に際し、複製タンパク質は大きなコンフォメーション変化を受けると推測された。また、本研究で開発されたTMV感染誘導系を利用したタンパク質大量発現に向けての応用研究も行った。

(3) TMVの移行タンパク質と相互作用する宿主タンパク質の候補をプルダウン法により得た。

(4) TMVの複製タンパク質によるRNAサイレンシング抑制の連携機構解析の基盤として、BYLを用いて2本鎖RNAからRNA-induced silencing complex (RISC) 形成に至る過程の試験

管内での再現を試みた。その結果、サイレンシングの最初のステップに相当すると考えられる、2本鎖RNAを21-25ヌクレオチドの断片に切断する活性を検出した。

具体的内容は「研究実施内容」に詳述する。

2. 研究実施内容

(1) TMVの複製複合体形成過程の解析

BYLをベースにした試験管内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生化学的に同定することを目的とする。本年度は、膜を除去したBYL中でTMV RNAを翻訳した際に形成され、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 (PMTC) が、蔗糖密度勾配遠心法による分画においてリボソームと同様あるいはそれより速く沈降する領域にピークを形成することを明らかにした。同分画において、ほとんどのTMV複製タンパク質はより沈降係数の小さな画分に分画されたが、一部、PMTCの活性ピーク付近にもピークを形成した。このことから、PMTCはTMV RNAと130K, 180K複製タンパク質を含む巨大な複合体であることが示唆された。さらに、この中には宿主由来と考えられるタンパク質も含まれている可能性が示唆され、詳細を検討中である。また、複製複合体が膜表面に形成される際に重要な役割を果たすと考えられる宿主膜タンパク質TOM1およびそのホモログであるTOM3の発現を抑制したBY-2細胞を作製し、これから調製したBYLを用いて、TOM1, TOM3がPMTCの膜結合あるいはマイナス鎖RNA合成開始に関与するかを調べようと考えた。しかし、TOM1およびTOM3のノックダウンによっては試験管内TMV RNA複製を完全に抑制することはできなかった。ここで新たに第三のTOM1/TOM3ホモログの存在が明らかになったため、現在三重欠損BY-2細胞株を作製中である。

(2) TMV複製複合体の性状の解析

ToMV感染誘導BY-2細胞由来の脱液胞化プロトプラスト抽出液に含まれる1本鎖および2本鎖ToMV RNA合成活性は、強く膜に結合し、界面活性剤に高い感受性を示した。このことは、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を示唆する。本年度は、界面活性剤Triton X-100処理後の複製タンパク質の状態を知るために、より詳細な解析を行った。その結果、膜に結合した複製タンパク質をTriton X-100処理すると、複製タンパク質は蔗糖密度勾配遠心において非常に速く沈降することが明らかとなった。これは、複製タンパク質がアグリゲートを形成したと解釈される。一方、膜に結合していない複製タンパク質は、Triton X-100処理しても蔗糖密度勾配遠心においてほとんど沈降せず、可溶性の状態を保った。これらの知見から、膜に結合した複製タンパク質と膜に結合していない複製タンパク質は、大きく異なるコンフォメーションをとっているのではないかと考えられる。界面活性剤処理で複製タンパク質がアグリゲートを形成することがわかったので、当初計画した化学架橋剤で複製複合体を処理した後界面活性剤で可溶化、精製し、クロスリンクされたタンパク質を同定する試みはペンディングとした。

(3) TMV RNAの複製と細胞間移行の連携機構の解析

TMV RNAの複製と移行のリンクを探るため、タンデムアフィニティー精製(TAP)タグを付加

した移行タンパク質を発現するTMV誘導体をBY-2細胞で誘導感染できる系を確立した。同株を発現誘導処理し、TAP精製を行ったところ、いくつかの宿主由来タンパク質が共精製された。現在これらの宿主タンパク質の同定を急ぐとともに、複製タンパク質が有意に共精製されていないか検討中である。

(4) TMVの複製タンパク質によるRNAサイレンシング抑制の連携機構の解析

昨年度までの研究で、TMVがコードするサブレッサー(130Kタンパク質)はsmall interfering RNA(siRNA)生成以降で作用し、新規のRISC形成を阻害していること；サブレッサー機能が低下した弱毒変異株L₁₁の130Kタンパク質は非膜結合画分に野生株に比して少量しか蓄積しないことを明らかにした。RNAサイレンシングおよび130Kタンパク質によるその阻害の分子機構解明のためには、試験管内でRISC形成を再現する実験系を用いることが望ましい。そこで、BYLに2本鎖RNAを添加してRISC形成に至る過程の試験管内での再現を試みた。その結果、2本鎖RNAを約25ヌクレオチドの断片と約21ヌクレオチドの断片に切断するDicer様活性を検出した。さらに、約21ヌクレオチドの断片を産生する活性はATP依存的であるのに対し、約25ヌクレオチドの断片を産生する活性はATP非依存性であることを明らかにした。今後、RISC活性を検出できる条件を模索する。

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）
- 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）
- 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、助教授)

- 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

尾之内グループ

- ① 研究分担グループ長：尾之内 均(北海道大学大学院農学研究科、助手・助教授)
- ② 研究実施項目：TMV複製複合体形成機構の解明

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

- Hatsugai, N., Kuroyanagi, M., Yamada, K., Meshi, T., Tsuda, S., Kondo, M., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I. (2004) A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. **Science** 305, 855-858.
- Sato, M., Nakahara, K., Yoshii, M., Ishikawa, M. and Uyeda, I. (2005) Selective involvement of members of the eukaryotic initiation factor 4E family in the infection of *Arabidopsis thaliana* by potyviruses. **FEBS Lett.** 579, 1167-1171.

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：2件（CREST研究期間累積件数：12件）