

「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 生理機能研究グループ 耐病性研究チーム長)

「タバコモザイクウイルスの増殖機構」

1. 研究実施の概要

本研究は、タバコモザイクウイルスと非常に近縁のトマトモザイクウイルス (ToMV) RNA の複製に関与する宿主因子を生化学的に同定し、複製機構を解明することを目的とする。前年度までに、タバコ BY-2 細胞において人為的に ToMV 感染を誘導する方法を確立し、感染誘導細胞から脱液胞化を経て、生体内と同様のパターンで ToMV 関連 RNA を合成する複製複合体を大量に調製する方法を開発した。本年度は、複製複合体を界面活性剤で処理して、可溶化の可否を調べた。その結果、両イオン性のリソフォスファチジルコリン (LPC) が唯一 RdRp 活性を維持したまま複製タンパク質を可溶化できることを見いだした。そこで、FLAG タグを融合した複製タンパク質をコードする ToMV RNA を複製する細胞から膜を調製し、LPC で処理して、可溶化された複製タンパク質を精製した。その結果、RdRp 活性、これまでに遺伝学的に ToMV の複製に関与することが示唆されてきた宿主膜タンパク質 TOM1, TOM2A 等いくつかの既知タンパク質とともに、新規の宿主タンパク質が共精製された。新規タンパク質のいくつかについては、LC-MS/MS 解析により部分アミノ酸配列情報を得、遺伝子まで同定した。また、移行タンパク質あるいは ToMV RNA に結合する新規宿主因子の候補を得た。今後、これら新規宿主タンパク質が実際にウイルス増殖に関与するか否かを、遺伝学的手法と生化学的手法を用いて明らかにしてゆく。さらに、非膜結合複製タンパク質が RNA サイレンシング抑制にかかわることをさらに裏付ける実験結果を得るとともに、RNA サイレンシング抑制能が低い ToMV 変異株感染細胞抽出液から RISC 活性を検出することにも成功した。

2. 研究実施内容

(1) ToMV 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 ToMV RNA 翻訳-複製系を用いて ToMV RNA の複製機構を解明することを目的とする。前年度までに、膜を除去した BYL 中で ToMV 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 (pre-membrane-targeting complex: PMTC) が、約 80S の沈降係数を有することを明らかに

した。平成17年度は、FLAG タグを C 末端側にもつ 180K 複製タンパク質をコードする ToMV 誘導体を mdBYL で翻訳し、タグを用いたアフィニティー精製を行った。精製産物を膜と混合すると ToMV RNA の複製が起きたので、これは PMTC を含むことが示唆された。さらに、精製産物は ToMV RNA と 130K および 180K タンパク質を含んでいた。現在、アフィニティー精製により PMTC を大量に得、宿主因子が含まれないか検討中である。また、ToMV RNA の翻訳・複製には、ToMV RNA に結合するタンパク質が関与することが予想される。そこで我々は、ToMV RNA の両末端非翻訳領域配列にストレプトマイシン結合性の RNA 配列、Strepto Tag を連結した RNA を脱液胞化シロイヌナズナプロトプラスト抽出液と混合し、ストレプトマイシンを結合したレジンでトラップすることにより結合タンパク質を得た。さらに、こうして得られた ToMV RNA 結合タンパク質 10 種以上について、LC-MS/MS 解析により部分アミノ酸配列を得、同定した。

(2) ToMV 複製複合体の性状の解析

ステロイドホルモン添加により ToMV 感染を誘導した BY-2 細胞から調製した BYL の膜画分をリソフオスファチジルコリンで処理すると、複製タンパク質および RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) 活性が可溶化できることを明らかにした。さらに、アフィニティー精製用タグを融合した複製タンパク質をコードする ToMV を感染誘導した細胞から、膜結合性の複製タンパク質を可溶化、精製すると、TOM1, TOM2A の他に、いくつかの宿主タンパク質が共精製された。これら宿主タンパク質についても、LC-MS/MS 解析により部分アミノ酸配列を得、同定した。

(3) ToMV RNA の複製と細胞間移行の連携機構の解析

ToMV RNA の複製と移行のリンクを探るため、アフィニティー精製用タグを付加した移行タンパク質を発現する ToMV 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、タグ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。これら宿主タンパク質についても、LC-MS/MS 解析により部分アミノ酸配列を得、同定した。

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

前年度までの研究で、RNA サイレンシングサプ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。このことから、非膜結合複製タンパク質がサイレンシングの抑制に重要であることが示唆された。このことから、複製タンパク質を膜につなぎとめる役割を担う宿主膜タンパク質 TOM1 を過剰発現するタバコにおいては、野生型 ToMV も弱毒株のように振る舞うのではないかと考えられた。この予想通り、TOM1 過剰発現植物では野生型 ToMV の蓄積低下と無病徴化が観察された。また、L₁₁ 感染誘導 BY-2 細胞の脱液胞化プロトプラスト抽

出液にウイルスゲノム配列に対する RISC 活性を検出することができた。

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（農業生物資源研究所、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、複製複合体の構成要素の同定と各因子の機能、RNA 複製と細胞間移行の連携機構、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（石川県立大学、助教授）
- ②研究項目：各種 TMV 変異株の感染誘導系の構築

「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、助教授）
- ②研究項目：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

- Momoko Asano, Rena Satoh, Atsuko Mochizuki, Shinya Tsuda, Takuya Yamanaka, Masamichi Nishiguchi, Katsuyuki Hirai, Tetsuo Meshi, Satoshi Naito, and Masayuki Ishikawa. (2005) Tobamovirus-resistant tobacco generated by RNA interference directed against host genes. **FEBS Lett.** 579(20), 4479-4484.
- Masashi Mori & Koji Dohi. (2005) The “resurrection method” for modification of specific proteins in higher plants. **FEBS Lett.** 579, 6210-6216.
- Koji Dohi, Masaki Nishikiori, Atsushi Tamai, Masayuki Ishikawa, Tetsuo Meshi, Masashi Mori. (2006) Inducible virus-mediated expression of a foreign protein in suspension-cultured plant cells. **Arch. Virol.** *In press.*

（2）特許出願

H17 年度出願件数：1 件（CREST 研究期間累積件数：11 件）