

「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) 農業生物資源研究所 植物科学研究領域 上級研究員)

「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近縁のトマトモザイクウイルス (ToMV) RNA の複製および複製に関連して起こると考えられるウイルスの細胞間移行と RNA サイレンシングの抑制に関与する宿主因子を生化学的に同定し、それらの過程の分子機構を解明することを目的とする。これまでに、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。この系を用いて得た感染細胞から、複製複合体を含む膜面分を調製し、可溶化して複製タンパク質を精製したところ、ToMV RNA の複製に関与することが遺伝学的に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、新規の低分子量 GTP 結合タンパク質の一種 ADP リボシル化因子様タンパク質 (ARLA1) が共精製された。ARLA1 遺伝子のノックダウンにより ToMV の増殖が抑制されたことから、ARLA1 は複製複合体の形成あるいは維持に重要な役割を果たすことが示唆された。また、複製複合体形成の途上にあると考えられる複合体を複数同定するとともに、その複合体に含まれる宿主因子の候補を多数得た。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裏付ける複数ラインの実験結果を得た。

2. 研究実施内容

(1) ToMV の複製複合体形成過程の解析

脱液胞化タバコ BY-2 プロトプラスト抽出液 (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。これまでに、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。本年度は、FLAG タグを C 末端側にもつ 130K 複製タンパク質を含む PMTC 様複合体を精製し、いくつかの宿主タンパク質を

LC-MS/MS 法により同定した。

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、LC-MS/MS 法により同定した。シロイヌナズナにおいて、そのうちのひとつである BTR1 に対応する遺伝子のノックアウトは ToMV の増殖を昂進させ、過剰発現は ToMV の増殖を低下させた。従って、BTR1 は ToMV の増殖に阻害的に働くことが示唆された。

(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可溶化し、複製タンパク質をアフィニティー精製したとき共精製されるタンパク質として低分子量 GTP 結合タンパク質の一種 ARL1A (ADP-ribosylation factor-like protein) を同定した。シロイヌナズナの当該タンパク質をコードする遺伝子 4 個のうち 2 個をノックアウトすると ToMV の増殖が阻害された。このことから ARL1A が ToMV の増殖に必要であることが明らかになった。

(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、2 種の宿主タンパク質が共精製された。これらのタンパク質をコードする遺伝子に T-DNA 挿入をもつシロイヌナズナにおける ToMV の増殖を調査したが、ToMV は正常に増殖した。従って、当該因子は ToMV の増殖に関与しないと考えられた。

(4) ToMV 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

これまでの研究で、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。また、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 の蓄積低下と無病徴化が観察された。本年度はアグロインフィльтраーション法を用いて、TOM1 の共発現が ToMV の複製タンパク質による RNA サイレンシング抑制を阻害することを明らかにした。

(5) ToMV ベクターを用いた有用タンパク質大量発現系の構築

ToMV 感染誘導系の実用化に向けて、抗体、ヒトサイトカイン、抗原等種々のタンパク質の合成を行うとともに、ウイルスベクター遺伝子を改良し大腸菌における安定性を高めた。また、有用タンパク質の生産の基盤として、動物にみられる O-結合型糖鎖の合成に必要な、

ヒトN-アセチルグルコサミン転移酵素、ガラクトース転移酵素それぞれに対応する遺伝子の cDNA をクローン化した。

3. 研究実施体制

(1) 石川グループ

① 研究者名

石川 雅之 ((独) 農業生物資源研究所 上級研究員)

② 研究項目

- ・ TMV の複製タンパク質の翻訳から複製複合体の形成に至る分子機構の解明
- ・ 複製複合体の構成要素の同定と各因子の機能の解明
- ・ RNA 複製と細胞間移行の連携機構の解明
- ・ TMV 複製タンパク質による RNA サイレンシング抑制機構の解明

(2) 森グループ

① 研究者名

森 正之 (石川県立大学 生物資源工学研究所 助教授)

② 研究項目

- ・ TMV RNA の培養細胞における同調感染系の構築と利用

(2) 藤山グループ

① 研究者名

藤山 和仁 (大阪大学 生物工学国際交流センター 助教授)

② 研究項目

- ・ TMV ベクターを用いた糖タンパク質大量発現系の構築

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- 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 calls. **Arch. Virol.** 151, 1075-1084.
- Koki Fujisaki, Gerald B. Ravelo, Satoshi Naito and Masayuki Ishikawa. (2006) Involvement of *THH1*, an *Arabidopsis thaliana* homologue of the *TOM1* gene, in tobamovirus multiplication. **J. Gen. Virol.** 87 (8), 2397-2401.
- Masaki Nishikiori, Koji Dohi, Masashi Mori, Tetsuo Meshi, Satoshi Naito, and

Masayuki Ishikawa. (2006) Membrane-bound tomato mosaic virus replication proteins participate in RNA synthesis and are associated with host proteins in a pattern distinct from those that are not membrane bound. **J. Virol.** 80 (17), 8459-8468.

○Keisuke Komoda, Natsuki Mawatari, Yuka Hagiwara-Komoda, Satoshi Naito, and Masayuki Ishikawa. (2007) Identification of a ribonucleoprotein intermediate of tomato mosaic virus RNA replication complex formation. **J. Virol.** 81 (6), 2584-2591.

○Masanori Kaido, Yosuke Inoue, Yoshika Takeda, Kazuhiko Sugiyama, Atsushi Takeda, Masashi Mori, Atsushi Tamai, Tetsuo Meshi, Tetsuro Okuno and Kazuyuki Mise. (2007) Downregulation of the NbNACa1 gene encoding a movement-protein-interacting protein reduces cell-to-cell movement of Brome mosaic virus in *Nicotiana benthamiana*. **Molecular Plant-Microbe Interactions** *in press*

(2) 特許出願

平成 18年度特許出願:3 件 (CREST 研究期間累積件数:14 件)