

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名：タバコモザイクウイルスの増殖機構

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

石川 雅之 ((独)農業生物資源研究所 植物・微生物間相互作用研究ユニット
上級研究員)

主たる共同研究者

森 正之 (石川県立大学 生物資源工学研究所 准教授)

飯 哲夫 ((独)農業生物資源研究所 グループ長)(平成15年7月～平成16年3月)

尾之内 均 (北海道大学大学院農学研究科 助教授)(平成16年3月～平成17年3月)

鈴木 英治 (秋田県立大学生物資源学部 助教授)(平成15年4月～平成18年3月)

中村 保典 (秋田県立大学生物資源学部 教授)(平成18年4月～)

藤山 和仁 (大阪大学生物工学国際交流センター 准教授)(平成18年11月～)

3. 研究内容及び成果

3-1. 研究内容

ウイルスは、ウイルスゲノムにコードされた因子のみならず細胞内の既存の分子にも依存して増殖する。従って、ウイルスの増殖機構を解明し、ウイルス増殖の人為的コントロール、あるいは物質生産や遺伝子導入手段などとしてのウイルスの有効利用の基礎を構築するには、ウイルスにコードされた因子のみならず宿主因子も含めた機能解析が必要である。本研究は、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、ウイルス増殖に関する宿主因子を同定し、その増殖機構を分子レベルで理解することを目的とした。

本研究では、TMVをモデルとして、RNA複製に関わる宿主因子を同定し、複製機構の詳細を明らかにすることを目的として、第1の研究項目「TMVの複製タンパク質翻訳から複製複合体形成に至る分子機構の解析」および第2の研究項目「TMV複製複合体の構成要素の同定と各因子の機能解析」を設定した。また、ウイルスが植物体で増殖するためには、複製に加えて感染域の拡大あるいは宿主抵抗性からの回避が必要である。TMVの複製タンパク質は、ウイルスRNA複製のみならず、移行タンパク質(MP)によるプラスモデスマータを介した隣接細胞への移行、およびRNAサイレンシングの抑制に関与することが示唆されていた。そこで本研究では、複製タンパク質がいかにしてこれらの多機能性を発揮するのかを理解することを目的として、第3の研究項目「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析」を設定した。さらに、これらの研究を効率よく進めるため、第4の研究項目「タバコBY-2培養細胞におけるTMV誘導感染系の構築と利用」を設定した。以下本研究により得られた主要成果を述べる。

3-2. 研究成果

3-2-1. TMVの複製タンパク質翻訳から複製複合体形成に至る分子機構の解析(石川グループ・尾之内グループ・鈴木グループ)

本研究全体の基礎となる実験系として、タバコBY-2細胞由来脱液胞化プロトプラスト抽出液(BYL)を用いた試験管内TMV RNA翻訳・複製系を完成させた。この系を用いて、TMV RNAが翻訳されて複製タンパク質が合成され、膜上に複製複合体が形成されるまでの過程がどのような中間的状态を経て進行するかを明らかにするために、超遠心で生体膜を除去したBYL(membrane-depleted BYL: mdBYL)を用いた。

mdBYLでTMV RNAを翻訳すると130K, 180K 複製タンパク質とTMV RNAを含む複合体

(pre-membrane-targeting complex: PMTC)が形成された。この段階では、相補鎖RNAの合成は観察されなかった。精製したPMTCを生体膜(P30 BYL)と混合すると、相補鎖RNAが合成され、複製が観察された。このことから、複製複合体がPMTCを経て形成されることが明らかになった。

さらに、PMTCの形成がTMV RNAの翻訳と共役しており、一旦フリーになった複製タンパク質はPMTCを形成できないこと;翻訳と共役して130Kタンパク質がTMV RNAと結合して複合体(core PMTC)を形成すれば、その後フリーの180Kタンパク質がエントリーしてPMTCを形成しうることを明らかにした。

複製複合体形成に関わる宿主因子同定の試みの一環として、TMV RNAの5'あるいは3'末端近傍領域に特異的に結合する宿主因子を、ストレプトマイシン結合性RNAアプタマーを付加した標的RNAを用いて脱液胞化プロトプラスト抽出液から精製し同定した。そのうちのひとつBTR1がTMV RNAの5'末端領域に特異的に結合し、TMVの増殖に阻害的に働くことを明らかにした。これまでのウイルス研究は専ら、ウイルスの増殖を正に制御する因子に焦点を当ててきたが、本知見は、ウイルス増殖を負に制御する因子の存在とその重要性を示している。

3 - 2 - 2 . TMV複製複合体の構成要素の同定と各因子の機能解析(石川グループ・鈴木グループ)

TMVを含む真核生物プラス鎖RNAウイルスは知られる限り例外なくオルガネラ膜の細胞質側表面に複製複合体を形成し、その中でRNA複製反応を行う。我々は、脱液胞化の手法を用いてRNase活性の混入を避けることにより、生体内と同様のパターンでRNAを合成するTMV RNA複製複合体を得、これを用いて解析を行った。

TMV RNA複製複合体は膜の表面に強く結合していた。複製複合体を形成する膜に結合した複製タンパク質を界面活性剤Triton X-100で処理すると非常に速く沈降するアグリゲートを形成する一方、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。これらの結果は、膜が複製複合体の活性発現そして恐らくは構造維持に非常に重要であること、膜に結合した複製タンパク質は、膜に結合していない複製タンパク質とは大きく異なるコンフォメーションをとっている可能性を示唆する。

さらに、界面活性剤リソフィスファチジルコリン(LPC)がTMVの複製タンパク質を、RNA合成活性を保ったまま可溶化できる(RNA合成パターン等の性質は変化するものの)ことを見いだした。膜画分をLPCで可溶化し、180Kタンパク質を精製すると、NtTOM1, NtTOM2A, 翻訳伸長因子eEF1A, 熱ショックタンパク質HSP70および新規宿主因子(低分子量GTP結合タンパク質)を含む複数の宿主因子と130Kタンパク質が共精製された。精製画分には、TMV RNA-依存RNAポリメラーゼ(RdRp: TMV RNAを鋳型として相補鎖RNAを合成する)活性が検出された。

NtTOM1, NtTOM2Aはすでに遺伝学的にTMV RNA複製に関与することが示されている。同定された低分子量GTP結合タンパク質は4個の相同な遺伝子にコードされていた。それぞれ単独の遺伝子欠損はTMVの増殖に影響を与えなかったが、そのうちの特定の2個を欠損させると、植物の生育は正常であるにもかかわらず、TMV RNAの複製が強く抑制された。

この結果は、本低分子量GTP結合タンパク質がTMV RNAの複製に必須であり、従って、この遺伝子は、通常の遺伝学的方法では同定できなかったであろうことを意味する。一方、可溶性画分の180Kタンパク質とは、少量の130Kタンパク質およびeEF1A, HSP70しか共精製されなかった。(3 - 2 - 1)の結果とあわせてこれらの結果は、複製タンパク質がRNA合成能を獲得するためには、翻訳後、PMTCの形成、膜および複数の宿主タンパク質との逐次的な結合という複数のステップを踏んで、複製複合体中の複製タンパク質にみられるコンフォメーションに至る必要があることを示唆する。

3 - 2 - 3 . 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析(飯グループ・石川グループ)

RNAサイレンシングは、ウイルスに対する抵抗性の一環と考えられるが、一方多くの植物ウイルスはRNAサイレンシングを抑制する機能をもっている。我々は、TMVの130K複製タンパク質がRNAサイレンシングを抑制することを見いだした。本項では130K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を目的とした。

TMVの弱毒株L11の130Kタンパク質は野生型(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。BY-2プロトプラストにL11あるいは野生株TMV RNAを感染させ、複製タンパク質の様態を細胞分画法により詳細に調べたところ、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がわかった。このことから、非膜結合状態にある(可溶性)130Kタンパク質がRNAサイレンシング抑制に関わる可能性が考えられた。

可溶性130Kタンパク質の量的低下のみでRNAサイレンシング抑制不全を説明できるか検討するために、TMVの複製タンパク質の膜結合に関与する宿主膜タンパク質TOM1を用いた。GFPを発現する*N. benthamiana*の葉にカリフラワーモザイクウイルスの35S RNAプロモーターでドライブされるGFP遺伝子をもつ遺伝子カセットをアグロインフィルトレーションにより導入する実験で、野生型130Kタンパク質を共発現させると、RNAサイレンシングの抑制によりGFPの過剰発現が起きる。さらにここにTOM1を共発現させると、GFPの過剰発現は抑制された。このとき、130Kタンパク質の非膜結合/膜結合量比は、TOM1の共発現により低下した。この結果は、過剰発現したTOM1により130Kタンパク質が生体膜表面にトラップされ、非膜結合状態の130Kタンパク質の濃度が減少したことによりRNAサイレンシング抑制機能が十分に発揮されなかったためであると解釈される。

植物におけるRNAサイレンシング誘起機構を解明し、植物ウイルスがコードするRNAサイレンシングサプレッサーの作用機作を正確に理解するには、植物細胞抽出液を用いてRNAサイレンシング関連反応を再現する実験系を確立する必要がある。そこで、BYLを用いたRNAサイレンシングの生化学的解析手法の基盤確立を目指した。

BY-2細胞において野生株TMV-GFPウイルスおよびRNAサイレンシング抑制機能が低いL11-GFPウイルスを感染誘導すると、前者が感染誘導後5日目までGFP蛍光を維持したのに対し、L11-GFP感染誘導細胞では誘導2日目以降GFP蛍光の急激な低下が観察され、RNAサイレンシングが誘起されていることが示唆された。

感染誘導後2日目に脱液胞化プロトプラスト抽出液を調製し、GFPあるいはTMV配列をもつRNAとインキュベートしたところ、L11-GFP誘導細胞抽出液にTMV(L11)-GFP配列特異的な切断活性(RISC活性)が検出された。

Small interfering RNA (siRNA) 蓄積の経時変化を調べたところ、L11-GFP、野生型TMV-GFP間で質的には大きな違いは見られないものの、野生型TMV-GFPではsiRNAの蓄積がL11-GFPに比して遅れた。

蓄積したsiRNAの3'末端リボースの2'-Oメチル化の程度を調べたところ、L11-GFPを複製する細胞のsiRNAはほぼ完全にメチル化されていたのに対し、野生型TMV-GFPを複製する細胞のsiRNAにはかなりの割合でメチル化されていないものが検出された。また、L11-GFPあるいは野生型TMV-GFPを複製する細胞由来のBYLにおけるDicer様活性は、非感染細胞由来のBYLと同様であった。

以上の結果から、130Kタンパク質はDicer様活性を阻害することなくsiRNAの蓄積を遅延させ、RISC形成を強く抑制することがわかった。

3 - 2 - 4 . タバコBY-2培養細胞におけるTMV誘導感染系の構築と利用(森グループ・藤山グループ)

研究項目(3 - 2 - 2)と(3 - 2 - 3)を遂行するためには、多量のTMV感染BY-2細胞が必要であった。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。ここでは、感染誘導が容易にモニターできるよう、外被タンパク質遺伝子をGFPに置換したキメラTMVを用いた。結果として、最大で95%以上の細胞でホルモン添加によるTMVの感染の誘導が起こる形質転換BY-2を作出できた。また、この実験系を、有用タンパク質あるいは構造解析用の標識タンパク質の生産に応用した。

4 . 事後評価結果

4 - 1 . 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

論文発表		招待・口頭・ポスター		報道	特許	
国内	国外	国内	国外		国内	海外
0	18	38	16	4	13	2

論文に関しては、非常に競争が激しい分野であり、当初の期待のように論文発表が順調に行われなかったきらいはあるが、PNASをはじめとして複数の論文を世界的な雑誌に発表しており、当該分野において比較的高い評価を受けたと判断できる。現時点で未発表のインパクトの高いデータがあるので、これらの発表にも期待したい。

特許出願数は多く評価出来る。特にTMVウイルスをベクターとしたタンパク質高発現システムについては、新規のタンパク質合成の基本システムとして期待したい。このシステムはそのメカニズムを考えると従前のシステムと大きく異なることから、非常にインパクトのあるシステムを提供できる可能性がある。

4 - 2 . 成果の戦略目標・科学技術への貢献

総合的には、当初設定した計画に対して終始一貫して取り組んでおり、その全ての課題について一定程度以上の成果が得られたと考えられる。TMVウイルスの複製機構における植物細胞側の因子の同定について、脱液胞化プロトプラスト抽出液(BYL)を調整して、TMVの複製タンパク質翻訳から複製複合体形成に至る分子機構の解析を行った。さらに、複製複合体の構成要素の同定と各因子の機能解析を行った。これらの実験は本研究グループが独自に開発したシステムに則って行ったものであり高く評価できる。一方、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析は、当該分野の競争が非常に激しいこともあって、論文発表が期待していたペースで順調に行かなかったことは残念であるが、独自の発見も行っている点では評価できる。

科学技術への貢献に関しては、TMVウイルスの複製機構における植物細胞側の因子の同定について、脱液胞化プロトプラスト抽出液(BYL)を用いて、TMVの複製タンパク質翻訳から複製複合体形成に至る分子機構の解析システムを確立し、新規のホストタンパク質の同定に成功した点は高く評価できる。

今後の展開として、本研究で開発されたウイルス誘導感染システムは、本研究で行われたTMVの感染機構の研究だけでなく、他のウイルスについても適用可能だと考えられこの分野の進展に期待できる。また、本研究で開発された外来タンパク質の大量発現システムは様々なタンパク質の基礎的な研究に応用可能と考えられる。

4 - 3 . その他の特記事項(受賞歴など)

BY - 2 (タバコ培養細胞)を用いてTMV誘導感染系を構築し、*in vitro*での外来タンパク質の大量発現に成功した点は、産業界に与えるインパクトは大きく、評価できる。

受賞歴としては、日本植物病理学会学生優秀発表賞(錦織雅樹)の1件