

博士論文

植物 RNA ウイルスに対する高度抵抗性の
分子機構に関する研究

吉田 哲也

目次

第1章 緒論.....	4
1.1 植物病	4
1.2 植物ウイルス	5
1.3 植物ウイルスの感染過程.....	5
1.3.1 単細胞での増殖.....	5
1.3.2 細胞間移行	6
1.3.3 長距離移行	7
1.4 ポテックスウイルス.....	9
1.5 植物ウイルスに対する抵抗性機構.....	11
1.5.1 RNAサイレンシングによる抵抗性.....	12
1.5.2 劣性抵抗性	12
1.5.3 NLR型遺伝子による優性抵抗性.....	13
1.5.4 non-NLR型遺伝子による優性抵抗性.....	15
1.6 ポテックスウイルスに対する non-NLR型抵抗性遺伝子 <i>JAX1</i>	18
第2章 <i>JAX1</i> 抵抗性の標的となるウイルス因子の解析	20
2.1 序文.....	20
2.2 材料および方法.....	21
2.2.1 プラスミド.....	21
2.2.2 植物およびアグロバクテリウム.....	23
2.2.3 リアルタイム RT-PCR	24
2.2.4 共免疫沈降.....	25
2.2.5 ウェスタンブロット解析.....	25
2.3 結果.....	29
2.3.1 <i>JAX1</i> はポテックスウイルスの移行関連因子欠損変異体の蓄積を阻害する	29
2.3.2 <i>JAX1</i> はポテックスウイルスのレプリコンの増殖を阻害する	31
2.3.3 <i>JAX1</i> はポテックスウイルスの複製酵素と相互作用する	32
2.4 考察.....	35
2.4.1 <i>JAX1</i> 抵抗性発現に必要なウイルス因子.....	35
2.4.2 <i>JAX1</i> が標的とするウイルス因子	35

第3章 ポテックスウイルスに対する JAX1 抵抗性の分子機構の解析	37
3.1 序文	37
3.2 材料および方法	39
3.2.1 プラスミド	39
3.2.2 BYL の調製	40
3.2.3 <i>in vitro</i> 実験用鋳型 RNA の調製	41
3.2.4 <i>in vitro</i> 翻訳／複製実験	42
3.2.5 タイムコース JAX1 添加実験のための JAX1 の精製	44
3.2.6 スクロース密度勾配遠心	45
3.2.7 BN-PAGE	46
3.3 結果	48
3.3.1 植物細胞抽出液を用いたポテックスウイルスの翻訳および複製の再構成	48
3.3.2 JAX1 は <i>in vitro</i> でポテックスウイルスの複製を阻害する	50
3.3.3 ポテックスウイルス複製過程の初期に JAX1 を添加するほど効率良く複製 が阻害される	53
3.3.4 ポテックスウイルスの高分子量複製酵素複合体の同定	56
3.3.5 JAX1 はポテックスウイルスの高分子量複製酵素複合体にターゲティングす る	58
3.4 考察	61
3.4.1 ポテックスウイルスの複製複合体前駆体	61
3.4.2 JAX1 がポテックスウイルスの複製に与える影響	63
3.4.3 JAX1 抵抗性打破 PVX 変異体の複製活性	64
第4章 総合考察	66
4.1 JAX1 の標的因子および作用機構	66
4.2 JAX1 と Tm-1 の比較	67
4.3 JAX1 と RTM1 の比較	67
4.4 JAX1 の作物における利用の可能性	68
摘要	70
謝辞	74
引用文献	75

第 1 章 緒論

1.1. 植物病

植物は、常にウイロイド、ウイルス、ファイトプラズマ、細菌、糸状菌などの病原体による攻撃に曝されている。病原体が栽培植物に感染すると、病害を引き起こし、収量や品質の低下をもたらす。また、昆虫による食害（虫害）や雑草との競合による障害（雑草害）、不適な栽培環境による障害（生理障害）などによっても、植物生産は大きな影響を受ける。これらの病害、虫害、雑草害、生理障害などは併せて植物病と呼ばれる。

作物の理論上可能な生産額のうち、約 36%が植物病によって失われていると試算されている（図 1.1）（難波, 2008）。その内訳は、病害および生理障害による損失が約 14%、虫害による損失が約 10%、雑草害による損失が約 12%であると推定されている。

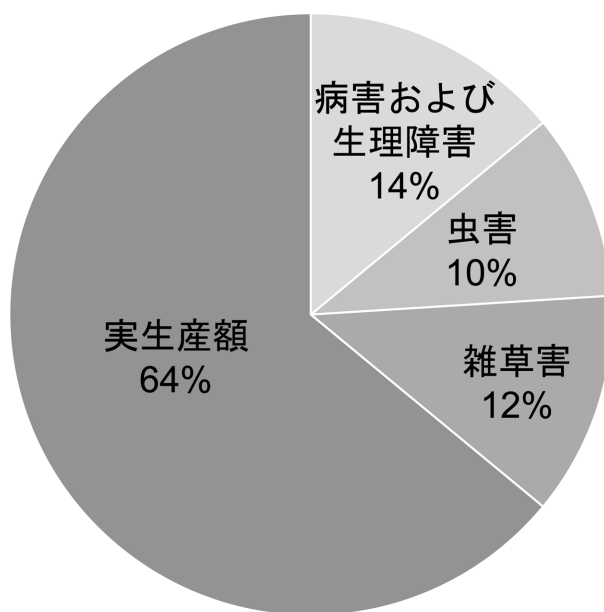


図 1.1 植物病による減収率

理論上可能な作物生産額を 100%とした場合の各植物病（病害および生理障害、虫害、雑草害）による減収率および実生産額。難波, 2008 を基に作成。

1.2. 植物ウイルス

植物ウイルスは植物病を引き起こす病原体の一つである。糸状菌や細菌と異なり、ウイルスは細胞構造を持たない無生物であり、自身の代謝系を持たないため宿主細胞内でのみ増殖が可能である。ウイルスは、ゲノム核酸の構成成分から DNA ウイルスと RNA ウイルスに大別され、さらに DNA ウイルスは 1 本鎖 DNA ウイルスと 2 本鎖 DNA ウイルスに、RNA ウイルスは 1 本鎖 RNA ウイルスと 2 本鎖 RNA ウイルスに分類される。また 1 本鎖 RNA ウイルスは、mRNA と同じ方向にタンパク質のコードされるプラス鎖 RNA ウイルスと、mRNA とは逆の方向にタンパク質のコードされるマイナス鎖 RNA ウイルスに分類される。ウイルスの分類群は国際ウイルス分類委員会により定められており、ウイルスの性状ごとに目、科、属、種の順に分類される。植物ウイルスは、植物に対して葉のモザイクや黄化、果実の輪紋や奇形、植物体の萎縮や壊死などの様々な症状を引き起こす。病害のうち、ウイルスによる被害は糸状菌による被害に次いで 2 番目に大きいと考えられており (Reddy *et al.*, 2009)、安定的な植物生産の確保には植物ウイルス病の防除が不可欠である。

1.3 植物ウイルスの感染過程

植物ウイルスの感染過程は、主に単細胞での増殖、細胞間移行、長距離移行の 3 つに分けられる (図 1.2)。以下では、プラス鎖 RNA ウイルスの各感染過程の概要について述べる。

1.3.1 単細胞での増殖

ウイルスが植物体の傷口や昆虫の吸汁等を介して細胞内に侵入した後、まずウイルス

粒子を構成する外被タンパク質 (coat protein; CP) がゲノムより解離し、ゲノム RNA が露出する (脱外被) (図 1.3)。続いて、ゲノム RNA を鋳型として、複製酵素が翻訳される。翻訳された複製酵素は、生体膜上に様々な宿主因子やウイルス RNA とともに複製複合体と呼ばれる構造を形成する (den Boon and Ahlquist, 2010)。複製複合体は、後述する RNA サイレンシングなどの宿主の防御機構からウイルスゲノムを保護する働きがあると考えられている。電子顕微鏡観察により、一部のウイルスは生体膜を陥入させ小球状の複製複合体を形成することが示されている (Schwartz *et al.*, 2002; Fernández de Castro *et al.*, 2017; Nagy, 2016)。複製複合体では、複製酵素の働きによりゲノム RNA からマイナス鎖 RNA が合成され、次いでマイナス鎖 RNA を鋳型にプラス鎖 RNA が合成される。ウイルスの種類によっては、サブゲノム RNA というゲノム RNA と 3'側を同じくするが長さの短い RNA が合成される場合もある (Sztuba-Solińska *et al.*, 2011)。サブゲノム RNA は、一つのゲノムに多数の open reading frame (ORF) を有する植物ウイルスの遺伝子発現機構として様々なウイルスに広く認められる。大量に合成されたプラス鎖 RNA は、複製複合体から細胞質へと放出され、新たな翻訳や複製の鋳型となる。植物ウイルスの複製には多数の宿主因子が関与することが明らかにされており (Nagy and Pogany, 2012; Hyodo and Okuno, 2014)、そのような因子の網羅的同定や、複製における機能の解析が盛んに行われている。

1.3.2 細胞間移行

単細胞で増殖したウイルスゲノムは原形質連絡 (plasmodesmata; PD) を介して隣接細胞へ移行する。この過程は細胞間移行と呼ばれる。細胞間移行は植物ウイルスに特徴的な感染過程である。植物ウイルスは一般に、細胞間移行において中心的な役割を果たす移行タンパク質 (movement protein; MP) と呼ばれる因子をゲノムにコードしている。PD には排除分子量限界が存在し、通常はウイルスのような巨大分子は通過することができない。MP は PD へと局在し排除分子量限界を拡大する性質を有しており、隣接細

胞へのウイルスの移行を可能にする。MP は様々な細胞内輸送経路を利用して PD へ局在することが知られている (Schuelz *et al.*, 2011)。

1.3.3 長距離移行

植物ウイルスは細胞間移行を繰り返し、表皮細胞から葉肉細胞、維管束鞘細胞、維管束柔細胞、篩部伴細胞、篩要素へと到達し、篩要素を介して植物体全体へと感染を拡大する。この過程は長距離移行と呼ばれる。一部のウイルスでは、篩部に加えて木部を介した長距離移行も観察されている (Wan *et al.*, 2015)。多くのウイルスは粒子の形態で長距離移行すると考えられているが、粒子とは異なるウイルスゲノムとウイルスタンパク質または宿主タンパク質により構成される複合体の形態で長距離移行すると考えられているウイルスも存在する (Hipper *et al.*, 2013; Folimonova and Tilsner, 2018)。また、ウイルスの長距離移行に正または負の機能を持つ宿主因子がこれまでに多数同定されている (Hipper *et al.*, 2013)。このような因子の種類は植物種およびウイルス種ごとに様々であり、ウイルスの長距離移行の様式の多様性を示唆する。

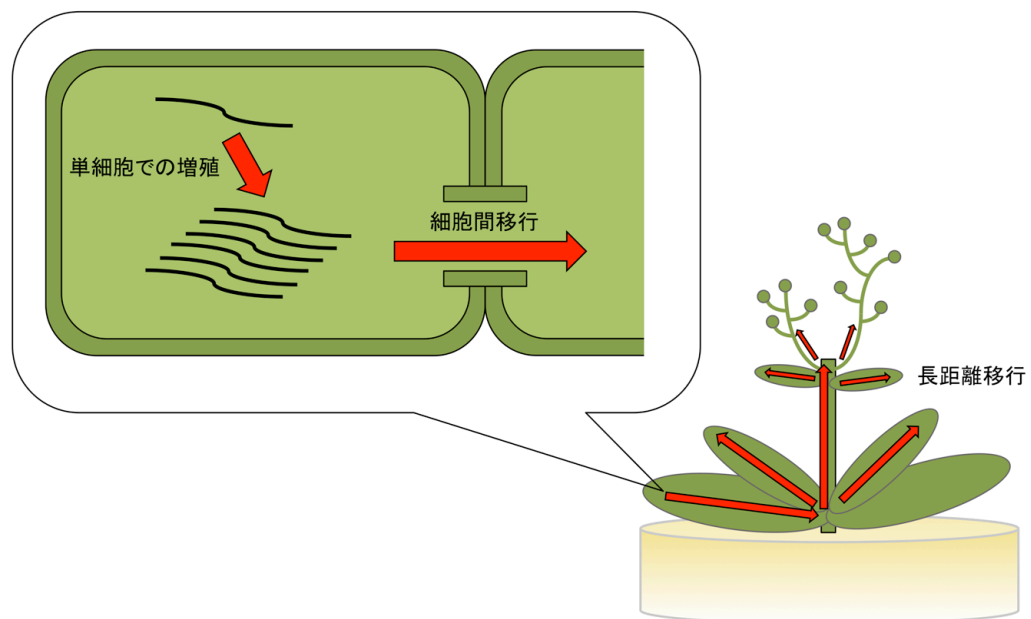


図 1.2 植物ウイルスの感染過程

植物ウイルスの感染過程は単細胞での増殖、細胞間移行、長距離移行の3段階に分けられる。

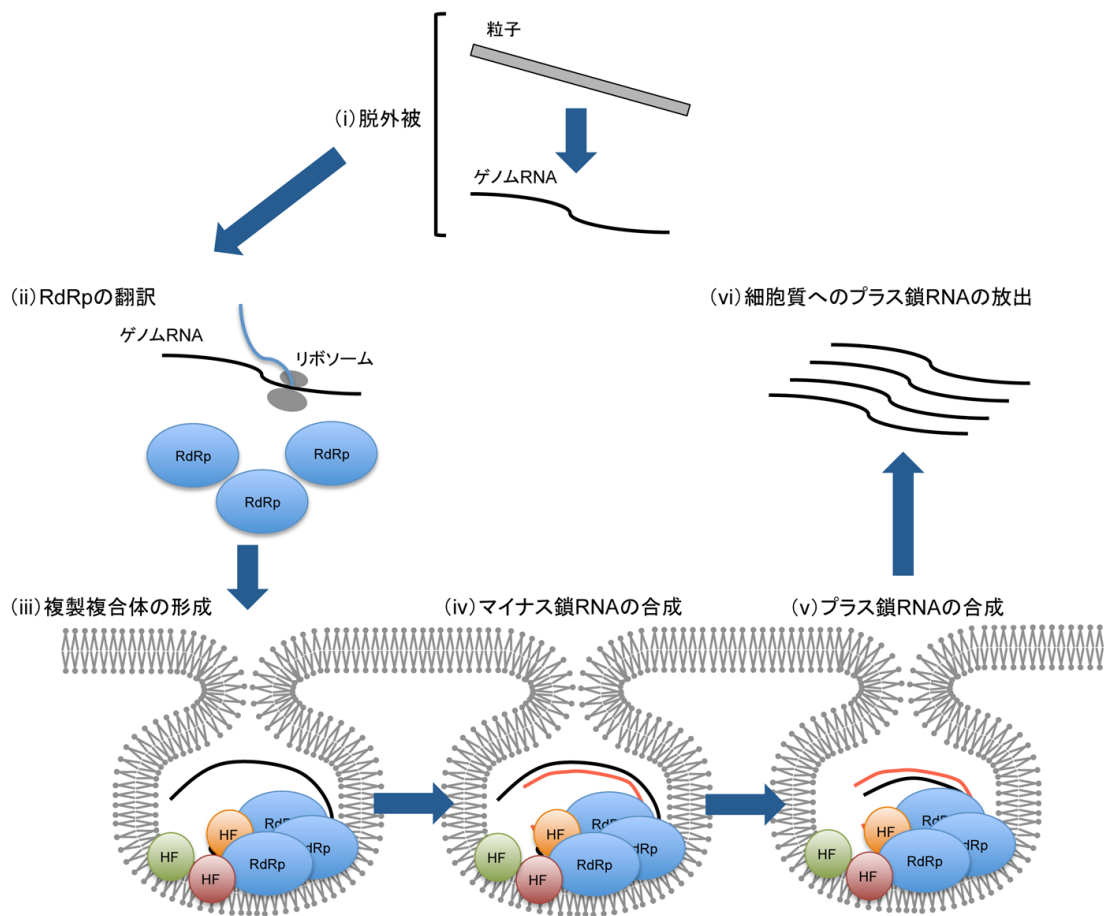


図 1.3 植物ウイルスの単細胞での増殖モデル

ここではプラス鎖 RNA ウイルスの増殖過程を示す。(i) 細胞内に侵入したウイルス粒子から外被タンパク質が解離し（脱外被）、ゲノム RNA が露出する。(ii) ゲノム RNA から複製酵素（RNA-dependent RNA polymerase; RdRp）が翻訳される。(iii) 生体膜上で RdRp、ウイルスゲノム RNA、宿主因子（host factor; HF）を含む複製複合体が形成される。(iv) 複製複合体内でゲノム RNA からマイナス鎖 RNA（赤線）が合成される。(v) マイナス鎖 RNA を鋳型にプラス鎖 RNA（黒線）が合成される。(vi) 多数のプラス鎖 RNA が細胞質に放出される。

1.4 ポテックスウイルス

本研究の対象とするポテックスウイルスは、ティモウイルス目アルファフレキシウイルス科ポテックスウイルス属に属するウイルスの一群である (Adams *et al.*, 2012)。2019年3月現在、38種が知られており、タイプ種は *Potato virus X* (PVX) である。粒子の形態は長さ 470–580 nm のひも状である (図 1.4)。接触伝搬され、本研究で用いる PVX および *plantago asiatica mosaic virus* (PIAMV) を含めた多数のポテックスウイルスが農業生産に大きな被害をもたらす (Wang *et al.*, 2011; Conijn, 2014; Hanssen and Thomma, 2010; Koh *et al.*, 2014)。単分節のプラス1本鎖RNAからなる 5.9–7.0 kb のゲノムを持ち、ゲノム上には2つの非翻訳領域 (untranslated region; UTR) および5つの ORF (5'末端から順に ORF1–5) を有している (Adams *et al.*, 2012) (図 1.5)。ゲノム RNA の 5' および 3' 末端にはそれぞれキャップ構造および poly(A) 配列が存在する。

ORF1 は複製酵素 (RNA-dependent RNA polymerase; RdRp) をコードしており、ウイルスの複製過程において中心的な役割を担う。RdRp には3つのドメインが含まれており、N末端側からメチルフェラーゼドメイン、ヘリカーゼドメイン、ポリメラーゼドメインを有する。ORF2–4 は移行タンパク質である triple gene block protein (TGBp) 1–3 をそれぞれコードする (Verchot-Lubicz *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2014)。また TGBp1 はヘリカーゼドメインを持ち、後述する RNA サイレンシングサプレッサーとしても働くことが知られている (Senshu *et al.*, 2009)。PIAMV の TGBp1 は宿主の RNA-dependent RNA polymerase 6 (RDR6) および suppressor of gene silencing 3 (SGS3) と相互作用し、2本鎖 RNA 合成過程を阻害することでサイレンシングを抑制することが示されている (Okano *et al.*, 2014)。ORF5 は外被タンパク質 (CP) をコードし、ウイルス粒子の形成および細胞間移行に関与する (Ozeki *et al.*, 2009)。RdRp はウイルスのゲノム RNA から翻訳され、それ以外の因子はサブゲノム RNA から翻訳されると考えられている。ポテックスウイルスには3本のサブゲノム RNA が存在すると考えられており、TGBp1 はサブゲノム RNA1 から、TGBp2 および TGBp3 はサブゲノム RNA2 から、CP はサブゲノ

ム RNA3 から翻訳されると考えられている (Verchot *et al.*, 1998; Verchot-Lubicz *et al.*, 2007)。TGBp3 は、リボソームによる TGBp2 の開始コドンの読み過ごし (リーキースキャニング) によって翻訳されることが示唆されている (Verchot *et al.*, 1998)。

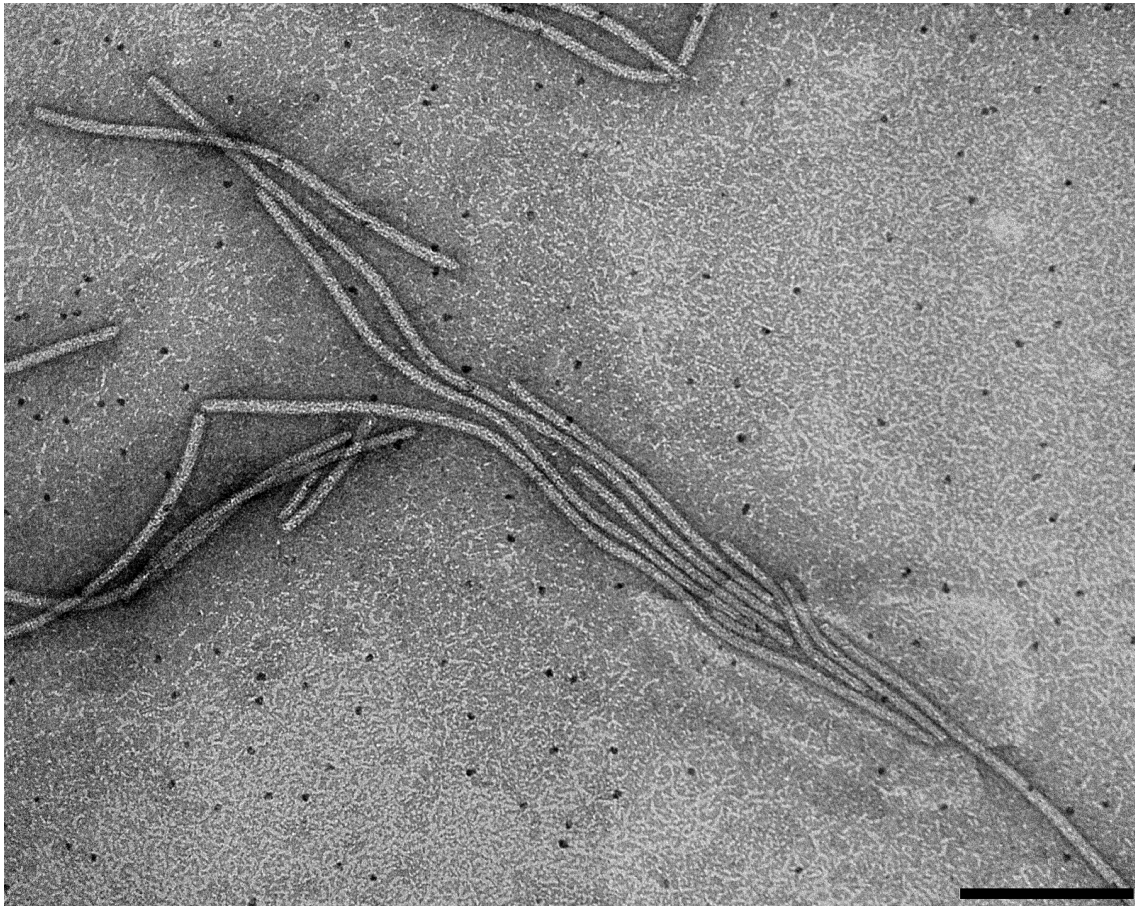


図 1.4 ポテックスウイルスの粒子
PVX の粒子の電子顕微鏡像。スケールバーは 200 nm。

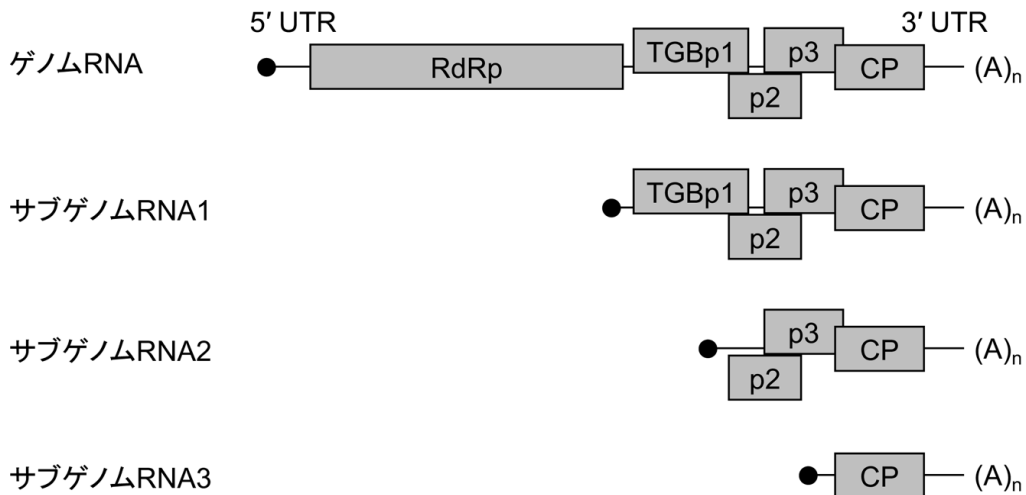


図 1.5 ポテックスウイルスのゲノムおよびサブゲノムの構造
 ゲノム RNA から RdRp が、サブゲノム RNA1 から TGBp1 が、サブゲノム RNA2 から TGBp2 および TGBp3 が、サブゲノム RNA3 から CP が翻訳されると考えられている。黒丸はキャップ構造を、(A)_n はポリ A 配列を表す。

1.5 植物ウイルスに対する抵抗性機構

ウイルスは独自の代謝系を持たず宿主に依存した感染環を有することから、ウイルスのみを標的とした化学農薬の開発は困難であるため、ウイルスの化学的な防除は困難である。そのため、植物ウイルスの防除法は、感染植物の除去、健全種苗の利用、弱毒ウイルスの利用、媒介生物の制御といった一部の方法に限られる。ウイルス防除法の一つとして、ウイルスに抵抗性を示す植物品種の利用が行われている。抵抗性植物品種の利用は、効果的かつ経済的で環境負荷も小さいことから有用な防除法である(難波, 2008)。このため、植物が持つウイルス抵抗性の分子機構を研究する意義は大きい。

植物ウイルス抵抗性は主に RNA サイレncing、劣性抵抗性、優性抵抗性に分類できる。また優性抵抗性は、抵抗性遺伝子の種類により nucleotide-binding leucine-rich repeat

(NLR) 型遺伝子による抵抗性と、それ以外の non-NLR 型遺伝子による抵抗性に大別できる。以下でそれぞれの抵抗性機構の特徴について述べる。

1.5.1 RNA サイレンシングによる抵抗性

RNA サイレンシングは配列特異的な遺伝子発現制御機構であり、植物においてウイルスに対する抵抗性機構としても機能する (Pumplin and Voinnet, 2013)。RNA サイレンシングにおいては、ウイルスの複製中間体やゲノム RNA が形成する高次構造などの 2 本鎖 RNA が宿主の Dicer-like タンパク質により切断され、21–24 塩基の small interfering RNA (siRNA) が産生される。siRNA は宿主の Argonaute タンパク質を中核とする RNA-induced silencing complex (RISC) と呼ばれる複合体に取り込まれる。RISC は siRNA と相補的な配列を有する RNA にターゲティングし、RNA の切断や翻訳抑制を誘導しウイルス増殖を阻害する。切断を受けた RNA を鋳型として、宿主の RDR6 や SGS3 の働きにより、新たに 2 本鎖 RNA が形成され、サイレンシング反応は増幅される。RNA サイレンシングに対抗するために、ウイルスは多様な種類の RNA サイレンシングサブプレッサーを有することが知られている (Csorba *et al.*, 2015)。サブプレッサーは RNA サイレンシングに関与する多様な因子を標的とし、サイレンシングの様々な過程を抑制することでウイルス増殖を促進する働きを持つ。

1.5.2 劣性抵抗性

植物ウイルスは宿主細胞内の多様な因子を利用することで感染を成立させる。このため、ウイルス感染に必要な因子をコードする遺伝子を欠損した植物にウイルスは感染できない。このような抵抗性は劣性遺伝することから劣性抵抗性と呼ばれる (Truniger and Aranda, 2009; Hashimoto *et al.*, 2016)。現在クローニングされている劣性抵抗性遺伝子のうちの多くは、タンパク質の翻訳開始因子である eukaryotic translation initiation factor (eIF)

4E もしくはそのアイソフォームである eIFiso4E をコードすることが知られている (Wang and Krishnaswamy, 2012; Bastet *et al.*, 2017)。真核生物の翻訳開始反応において、eIF4E は mRNA のキャップ構造に結合し、足場タンパク質である eIF4G と複合体を形成した後、リボソーム 40S サブユニットをリクルートする働きを持つ。いくつかの植物ウイルスタンパク質の翻訳に eIF4E アイソフォームが関わるということが解明されており (Yoshii *et al.*, 2004; Truniger *et al.*, 2008; Keima *et al.*, 2017)、eIF4E アイソフォームの欠損による劣性抵抗性の分子機構が明らかにされつつある。また、近年 eIF4E アイソフォーム以外の因子をコードする劣性抵抗性遺伝子が複数報告されている (Hashimoto *et al.*, 2016)。

1.5.3 NLR 型遺伝子による優性抵抗性

優性遺伝する遺伝子により引き起こされる植物ウイルス抵抗性は優性抵抗性と呼ばれる。植物ウイルスに対する優性抵抗性遺伝子は 200 以上知られており、そのうちのいくつかはクローニングされている (de Ronde *et al.*, 2014)。病原体に対する植物の抵抗性のうち、抵抗性品種に最も広く利用され研究も行われているのが真正抵抗性であり、真正抵抗性を司る遺伝子は NLR 型タンパク質をコードする。これまでに NLR 型のウイルス抵抗性遺伝子が少なくとも 18 個同定されている (de Ronde *et al.*, 2014)。NLR 型タンパク質は、ウイルスだけでなく糸状菌、細菌、昆虫などに対する抵抗性にも関わるタンパク質であり、標的病原体の受容体として働く。シロイヌナズナのゲノムには NLR 型遺伝子が約 160 個存在することが明らかとなっている (Guo *et al.*, 2011)。

典型的な NLR 型タンパク質は、N 末端側から coiled-coil (CC) ドメインまたは Toll/Interleukin-1 Receptor (TIR) ドメイン、nucleotide-binding (NB) ドメイン、leucine-rich repeat (LRR) ドメインを有する。CC および TIR ドメインは、下流のシグナル伝達経路に重要な役割を果たすと考えられている (Monteiro and Nishimura, 2018)。NB ドメインは ATP の加水分解を介した NLR 型タンパク質の活性化に関与する。LRR ドメインは標

的タンパク質の特異的認識に関わっていると考えられている (de Ronde *et al.*, 2014)。NLR 型タンパク質中で最も多様性に富むドメインであることから、選択圧を受けており標的タンパク質の多様化をもたらす進化に関わると考えられている。

NLR 型タンパク質は細胞質で直接的もしくは間接的に標的ウイルスタンパク質を認識した後、ATP の加水分解を介して活性化し、核に移行し防御応答関連遺伝子の転写等を活性化するというモデルが提唱されている (図 1.6) (Slootweg *et al.*, 2010; Tameling *et al.*, 2010; Bhattacharjee *et al.*, 2013; Padmanabhan *et al.*, 2013; Padmanabhan and Dinesh-Kumar, 2014)。NLR 型抵抗性遺伝子を介した抵抗性に際しては、一般に過敏反応が誘導されウイルスの感染が抑制される (Mandadi and Scholthof, 2013)。

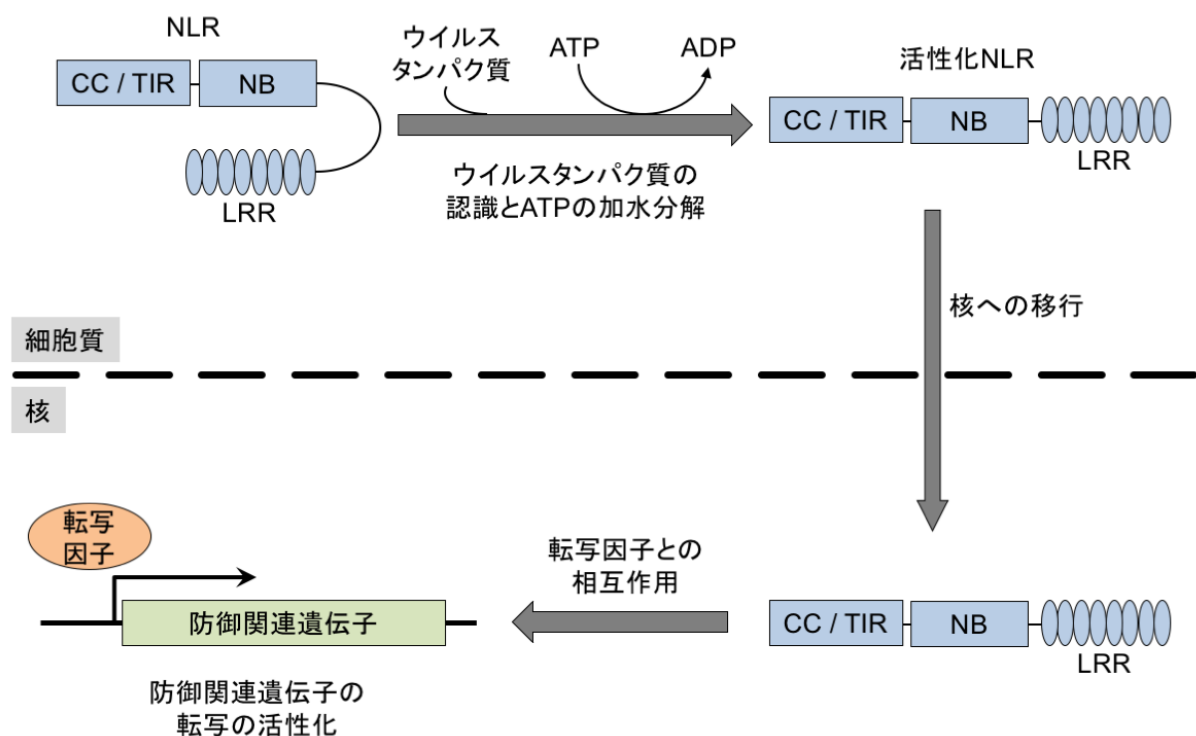


図 1.6 NLR 型タンパク質による植物ウイルス抵抗性

NLR 型タンパク質が標的ウイルスタンパク質の認識および ATP の加水分解を経て活性化し、核へと移行する。核へ移行した NLR 型タンパク質は転写因子と相互作用し防御関連遺伝子の転写を活性化することで抵抗性を誘導する。

1.5.4 non-NLR 型遺伝子による優性抵抗性

近年、NLR 型抵抗性遺伝子群に属さない優性抵抗性遺伝子（non-NLR 型抵抗性遺伝子）が複数単離されており、NLR 型抵抗性遺伝子とは異なる性状を有することが明らかになりつつある（de Ronde *et al.*, 2014; Gouveia *et al.*, 2017）。non-NLR 型抵抗性遺伝子は、多様な種類のタンパク質をコードしており、互いに必ずしも相同性を示さない。従って、各 non-NLR 型抵抗性遺伝子は多様な分子機構により抵抗性を発揮するものと考えられている。これまでに、表 1.1 のような non-NLR 型抵抗性遺伝子が単離されている。

野生トマトより単離された *Tm-1* は、TIM-barrel ドメインタンパク質をコードしており、トバモウイルス属ウイルスである tomato mosaic virus (ToMV) に対する抵抗性を発揮する（Ishibashi *et al.*, 2007）。*Tm-1* は ToMV の複製タンパク質に結合し、生体膜上における ToMV 複製複合体の形成を妨げることで、ToMV の複製を阻害することが示されている（Ishibashi *et al.*, 2007; Ishibashi and Ishikawa, 2013; Ishibashi and Ishikawa, 2014; Ishibashi *et al.*, 2014）。

Ty-1 は RNA-dependent RNA polymerase をコードする野生トマト由来の遺伝子であり、ベゴモウイルス属ウイルスである tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) の感染を阻害する（Verlaan *et al.*, 2013）。*Ty-1* 抵抗性には、転写型遺伝子サイレンシングの活性化が関与することが示されている（Butterbach *et al.*, 2014）。

イネの *STV11* はテヌイウイルス属ウイルスである rice stripe virus (RSV) に対する抵抗性遺伝子であり、スルホトランスフェラーゼをコードする（Wang *et al.*, 2014）。*STV11* は防御応答に重要な植物ホルモンであるサリチル酸からスルホサリチル酸を生成する活性を有することが明らかとなっており、生成されたスルホサリチル酸を介してサリチル酸の蓄積量が上昇することが RSV 抵抗性に関与することが示唆されている。

トウモロコシの遺伝子 *Scmv1* はチオレドキシシン様タンパク質をコードし、ポティウイルス属ウイルスである sugarcane mosaic virus (SCMV) に抵抗性を発揮する。*Scmv1* は単細胞における SCMV の蓄積を阻害することが示されているが、その作用機構の詳細

は不明である (Liu *et al.*, 2017)。また、オーキシン結合タンパク質をコードする *Scmv2* も SCMV に抵抗性を発揮することが明らかとなっているが、その分子機構は不明である (Leng *et al.*, 2017)。

シロイヌナズナの *restricted tobacco etch virus movement 1* (*RTM1*)、*RTM2*、*RTM3* はそれぞれジャカリンレクチン、熱ショックタンパク質、meprin and TRAF homology (MATH) ドメインタンパク質をコードし (Chisholm *et al.*, 2000; Whitham *et al.*, 2000; Cosson *et al.*, 2010)、ポティウイルス属ウイルスである tobacco etch virus (TEV)、lettuce mosaic virus (LMV)、plum pox virus (PPV) に抵抗性を発揮する (Mahajan *et al.*, 1998; Revers *et al.*, 2003; Decroocq *et al.*, 2006)。RTM 抵抗性は TEV の複製および細胞間移行は阻害しないが、長距離移行を阻害することが示されている (Mahajan *et al.*, 1998)。また、遺伝子座 *RTM4* および *RTM5* が抵抗性に関与することが明らかとなっているが、未だ遺伝子の同定はなされていない (Cosson *et al.*, 2012)。RTM 抵抗性は、過敏反応様の反応を示さないことが知られているが (Mahajan *et al.*, 1998)、分子機構の詳細は不明である。

表 1.1 植物ウイルスに対する non-NLR 型抵抗性遺伝子

植物種	遺伝子名	タンパク質種	標的ウイルス種	標的ウイルス属	遺伝子の機能	文献
トマト	<i>Tm-1</i>	TIM-barrelドメインタンパク質	ToMV	<i>Potyvirus</i>	ウイルス複製阻害	Ishibashi <i>et al.</i> , 2007
トマト	<i>Ty-1</i>	RNA 依存 RNA 合成酵素	TYLCV	<i>Begomovirus</i>	転写型ジーンサイレンシングの活性化	Verlaan <i>et al.</i> , 2013
イネ	<i>STV11</i>	スルホトランスフェラーゼ	RSV	<i>Tenuivirus</i>	スルホサリチル酸の生成	Wang <i>et al.</i> , 2014
トウモロコシ	<i>Scmv1</i>	チオレドキシソクシン様タンパク質	SCMV	<i>Potyvirus</i>	不明	Liu <i>et al.</i> , 2017
	<i>Scmv2</i>	オーキシソクシン結合タンパク質			不明	Leng <i>et al.</i> , 2017
シロイヌナズナ	<i>RTM1</i>	ジャカリンレクチン	TEV, LMV, PPV	<i>Potyvirus</i>	不明	Chisholm <i>et al.</i> , 2000
	<i>RTM2</i>	熱ショックタンパク質			不明	Whitham <i>et al.</i> , 2000
	<i>RTM3</i>	MATHドメインタンパク質			不明	Cosson <i>et al.</i> , 2010
シロイヌナズナ	<i>JAX1</i>	ジャカリンレクチン	PIAMV, PVX, AV3, WCIMV	<i>Potexvirus</i>	不明	Yamaji <i>et al.</i> , 2012

1.6 ポテックスウイルスに対する non-NLR 型抵抗性遺伝子 JAX1

ポテックスウイルスの一種である *plantago asiatica mosaic virus* (PIAMV) に対して抵抗性を発揮するシロイヌナズナエコタイプ Bay-0 より、non-NLR 型抵抗性遺伝子 *jacalin-type lectin required for potexvirus resistance 1* (*JAX1*) が同定されている (Yamaji *et al.*, 2012) (表 1.1)。*JAX1* は、単一のジャカリンレクチンドメインを有するタンパク質をコードしており、NLR 型抵抗性遺伝子とは遺伝子構造が異なっている (図 1.7A)。

JAX1 は細胞レベルで PIAMV の増殖を阻害することが示されている (Yamaji *et al.*, 2012)。また、*JAX1* は NLR 型タンパク質による抵抗性に特徴的な防御応答遺伝子の発現、細胞死、活性酸素種の産生を誘導しないことが明らかとなっている。*JAX1* を形質転換した *Nicotiana benthamiana* は、4 種のポテックスウイルス (PIAMV、PVX、*asparagus virus 3* [AV3]、*white clover mosaic virus* [WCIMV]) に抵抗性を発揮することが示されている。

また、野生型 *N. benthamiana* を台木、*JAX1* を形質転換した *N. benthamiana* を穂木として接ぎ木を行い、台木に対して PVX を接種することにより、穂木において *JAX1* 抵抗性打破ウイルス株が単離されている (Sugawara *et al.*, 2013)。単離されたウイルス株のゲノムの 1092 番目の塩基は A から C または T に変異しており、この塩基置換により RdRp の 336 番目のアミノ酸がグルタミンからヒスチジンに変異していることが明らかとなっている。当該変異を導入した PVX 変異株は *JAX1* 発現 *N. benthamiana* 上で増殖活性を有することが示されている (図 1.7B)。また、当該アミノ酸残基はポテックスウイルスに広く保存されていることが示されている。

以上から、*JAX1* 抵抗性は細胞レベルで発揮されること、NLR 型タンパク質による抵抗性とは異なる機構で発揮されること、ポテックスウイルスの RdRp が関与することが示唆されたが、*JAX1* 抵抗性の分子機構の詳細は不明であった。本研究では、*JAX1* 抵抗性の分子機構の解明を目的として研究を行った。第 2 章では、*JAX1* が標的とするポテックスウイルス因子の解析を行い、第 3 章では植物細胞抽出液を用いた *JAX1* の作用

機構の生化学的解析を行った。

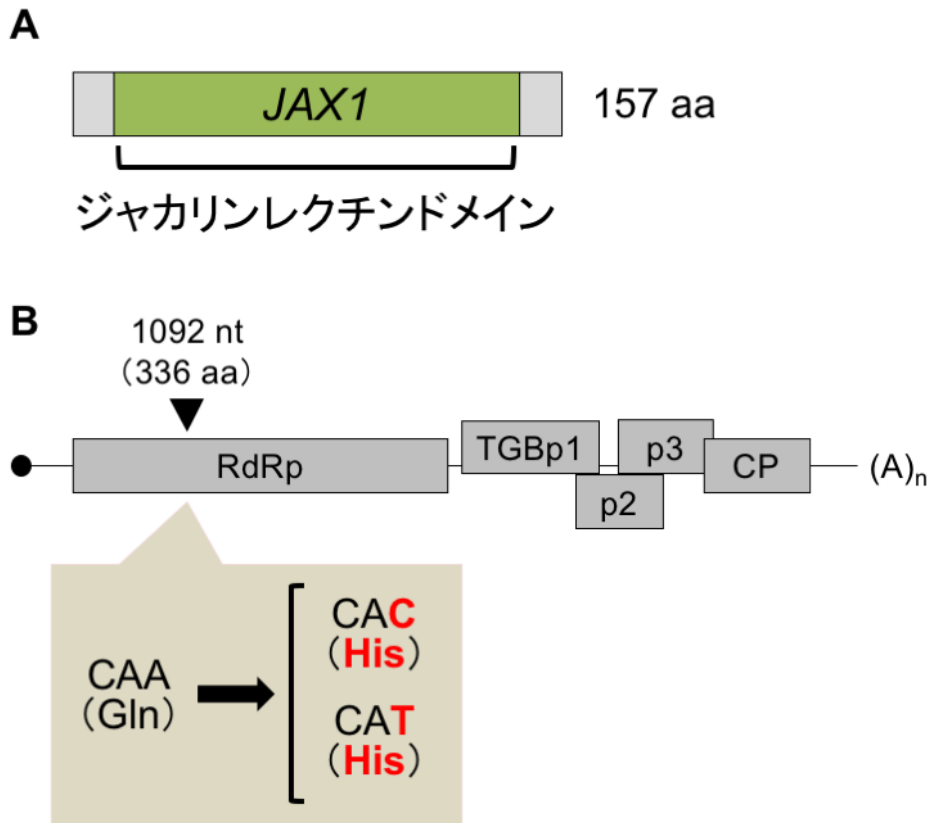


図 1.7 JAX1 のドメイン構造および JAX1 抵抗性打破を引き起こす PVX ゲノムの変異
(A) JAX1 タンパク質のドメイン構造。JAX1 は 157 アミノ酸からなり、中央に単一のジャカリンレクチンドメインを有する。(B) JAX1 抵抗性の打破を引き起こす PVX の変異。ゲノムの 1092 番目の塩基 A が C または T に変異し、RdRp の 336 番目のアミノ酸残基グルタミンがヒスチジンに変異すると PVX は JAX1 抵抗性を打破する。

第2章 JAX1 抵抗性の標的となるウイルス因子の解析

2.1 序文

NLR 型タンパク質による植物ウイルス抵抗性においては、NLR 型タンパク質が特定の標的ウイルスタンパク質を認識することで下流の抵抗性反応が誘導される (de Ronde *et al.*, 2014)。これまでに多数の NLR 型タンパク質において、標的となるウイルス因子が同定されている。また、non-NLR 型抵抗性タンパク質である Tm-1 の標的因子はウイルスの複製タンパク質であることがこれまでに明らかとされている (Ishibashi *et al.*, 2007)。

JAX1 が標的とするウイルス因子についてはこれまで不明であるが、JAX1 抵抗性を打破する PVX は RdRp 中に 1 アミノ酸変異を有することから (Sugawara *et al.*, 2013)、RdRp が JAX1 抵抗性に関与することが示唆されている。本章では、JAX1 が標的とするウイルス因子について解析を行った。

2.2 材料および方法

2.2.1 プラスミド

(1) PIAMV-GFP 変異体および PIAMV-53U-RdRp の発現用ベクター

N. benthamiana の展開葉で PIAMV-GFP および PIAMV-GFP Δ CP を発現させるため、既報のコンストラクト pLi1-CPNsGFP-mtfCP および pLi1-CPNsGFP Δ CP (Minato *et al.*, 2014) を使用した。また、PIAMV-GFP Δ TGBp1、PIAMV-GFP Δ TGBp2、PIAMV-GFP Δ TGBp3 を発現させるため、pLi1-CPNsGFP-mtfCP の TGBp1、TGBp2、TGBp3 の開始コドンを変異させたコンストラクト pLi1-CPNsGFP-mtfCP Δ TGBp1、pLi1-CPNsGFP-mtfCP Δ TGBp2、pLi1-CPNsGFP-mtfCP Δ TGBp3 をそれぞれ構築した。pLi1-CPNsGFP-mtfCP Δ TGBp1 の構築にあたって、まず pLi1-CPNsGFP-mtfCP を鋳型にプライマーLi2606F および LidelTG1R、LidelTG1F および oligodT (表 2.1) を用いて polymerase chain reaction (PCR) を行った。得られた PCR 産物を鋳型に、プライマーLi2606F および oligodT を用いてリコンビナント PCR を行った。PCR 産物を *Bgl*III および *Spe*I で切断し、同酵素で切断した pLi1-CPNsGFP-mtfCP に挿入した。pLi1-CPNsGFP-mtfCP Δ TGBp2 は、LidelTG2R および LidelTG2F をそれぞれ LidelTG1R および LidelTG1F の代わりに用い、同様の方法で構築した。pLi1-CPNsGFP-mtfCP Δ TGBp3 は、LidelTG3R、LidelTG3F および Li6095R をそれぞれ LidelTG1R、LidelTG1F および oligodT の代わりに用い、同様の方法で構築した。また、PIAMV-53U-RdRp を発現させるため既報のコンストラクト p53U-RdRp1 (Komatsu *et al.*, 2011) を用いた。

(2) JAX1、RTM1、GUS、p19 の発現用ベクター

N. benthamiana の展開葉で JAX1、RTM1、 β -glucuronidase (GUS)、tomato bushy stunt virus の RNA サイレンシングサプレッサーp19 を発現させるため、まずこれらの DNA 断片をエントリーベクターpENTA (Himeno *et al.*, 2010) にクローニングした。pENTA に挿入

した JAX1、RTM1、GUS を、Gateway LR クロナーゼ II (Thermo Fisher Scientific) を用いた LR 反応によりベクター pEarleyGate 202 (Earley *et al.*, 2006) へ導入した。pENTA に挿入した p19 はベクター pE7133-GW (Netsu *et al.*, 2015) へ LR 反応により導入した。

(3) PVX-53U-RdRp-myc-WT および PVX-53U-RdRp-myc-A1092C の発現用ベクター

N. benthamiana の展開葉で PVX-53U-RdRp-myc-WT および PVX-53U-RdRp-myc-A1092C を発現させるため、pCAM-53U-UK3RdRp-myc-WT および pCAM-53U-UK3RdRp-myc-A1092C をそれぞれ構築した。cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S プロモーターの直下に GFP 発現 PVX-UK3 分離株 (PVX-UK3-GFP) の配列が連結されたベクター pCXI (Uhde-Holzem *et al.*, 2010) を鋳型に、プライマー PRDb-F2 および polydT-SpSIR (*SalI* 認識配列を含む) を用いて PCR を行った。PCR 産物を *BlnI* (認識配列は ORF1 内に存在) および *SalI* (認識配列は poly(A)配列の直下に存在) で処理し、*BlnI* および *XhoI* (認識配列は ORF5 内および poly(A)配列の直下に存在) で処理したベクター pCXV にクローニングし、pCX-a と名付けた。pCXV は CaMV 35S プロモーターの直下に PVX-UK3 分離株の配列が連結されたベクターである。構築した pCX-a は、poly(A)配列の直下に存在した *XhoI* 認識配列が別の配列に置き換わっており、ORF5 内にも *XhoI* 認識配列を持つ。

続いて、プライマー PRDb-F2 および PVX-RDmycR を用いて PVX の配列を PCR により増幅後、*BlnI* および *XhoI* で処理し、同じ制限酵素で処理した pCX-a とライゲーションさせた。得られたベクターを *SpeI* で処理後、末端を Klenow fragment により平滑化し、*SacI* で処理した。得られた断片を *SacI* および *PmaCI* で処理したベクター pCAMBIA1301 にクローニングした。得られたベクターを pCAM-53U-UK3RdRp-myc-WT と名付けた。pCAM-53U-UK3RdRp-myc-A1092C の構築のため、GENEART Site-Directed Mutagenesis System (Thermo Fisher Scientific) を用いて、付属のマニュアルに準じて pCAM-53U-UK3RdRp-myc-WT のウイルスゲノムの 1092 番目の塩基 A を C に変異させた。変異導入に際してプライマー UK3-A1092C-F および UK3-A1092C-R を用いた。

(4) PIAMV-53U-RdRp-myc-WT および PIAMV-53U-RdRp-myc-G1046C の発現用ベクター

ー

N. benthamiana の展開葉で PIAMV-53U-RdRp-myc-WT および PIAMV-53U-RdRp-myc-G1046C を発現させるため、ベクター pCAM-53U-Li1RdRp-myc-WT および pCAM-53U-Li1RdRp-myc-G1046C をそれぞれ構築した。pCAM-53U-Li1RdRp-myc-WT の構築のため、既報のベクター pLi1 (Ozeki *et al.*, 2006) を鋳型にプライマー PIAMV-1F および LiRDMycR を用いて PCR を行った。pLi1 は、CaMV 35S プロモーターの下流に PIAMV Li1 分離株の全ゲノム配列が連結されたバイナリーベクターである。PCR 産物を *Mfe*I および *Xba*I で切断し、*Mfe*I および *Spe*I で切断した pLi1 にクローニングした。pCAM-53U-Li1RdRp-myc-G1046C の構築のため、GENEART Site-Directed Mutagenesis System (Thermo Fisher Scientific) を用いて pCAM-53U-Li1RdRp-myc-WT のウイルスゲノムの 1046 番目の塩基 G を C に変異させた。変異導入に際してプライマー Li-G1046C-F および Li-G1046C-R を用いた。

2.2.2 植物およびアグロバクテリウム

N. benthamiana は人工気象室で 15 時間明期 (25°C) / 9 時間暗期 (20°C) の条件で生育させた。また、*Agrobacterium tumefaciens* EHA105 株にバイナリーベクターを導入し実験に用いた。

各コンストラクトは、アグロインフィルトレーション法 (Johansen and Carrington, 2001) により植物細胞内で発現させた。各コンストラクトを導入したアグロバクテリウムをアグロインフィルトレーションバッファー (10 mM MgCl₂, 10 mM MES, 150 μM アセトシリンゴン, pH5.6) を用いて懸濁し、OD₆₀₀ を 1.0 に調製した後、各図に記した比率で混合した。室温、遮光下で静置した後、*N. benthamiana* の展開葉の背軸側より 1 mL シリ

ンジを用いて菌液を浸潤させた。

2.2.3. リアルタイム RT-PCR

(1) RNA 抽出および cDNA 合成

アグロインフィルトレーションした *N. benthamiana* の展開葉より、ISOSPIN Plant RNA (Nippon gene) を用いて、付属のマニュアルに準じて RNA 抽出および DNase 処理を行った。DNase 処理後の RNA から、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて cDNA を合成した。RNA に 10×RT buffer 1 μL、25×dNTP mix (100 mM) 0.4 μL、10×random primers 1 μL、Multiscribe Reverse Transcriptase 0.5 μL を添加し、蒸留水で 10 μL にメスアップした後、25°C で 10 分、37°C で 2 時間反応させた。

(2) リアルタイム PCR

得られた cDNA は、SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa) および Thermal Cycler Dice Real Time System III (TaKaRa) を用いたリアルタイム PCR 解析に供試した。100 倍希釈した cDNA 2.5 μL に forward primer (5 μM) 0.8 μL、reverse primer (5 μM) 0.8 μL、SYBR Premix Ex Taq II 10 μL、蒸留水 5.9 μL を加えた。95°C で 30 秒処理した後、40 サイクルの PCR 反応 (95°C 5 秒、60°C 30 秒の 2 ステップを 1 サイクルとする) を行い、95°C 15 秒、60°C 30 秒、95°C 15 秒の反応に供試した。内部標準としてユビキチンの mRNA を用いた。PIAMV-53U-RdRp の増幅には PIRep-F3 および PIRep-R3 を、ユビキチンの増幅には NbUBQ-26F および NbUBQ-136R をプライマーとして用いた (表 2.1)。

2.2.4 共免疫沈降

アグロインフィルトレーションした *N. benthamiana* の葉をメスで刻んだ後、葉を 0.1 g あたり 0.4 mL の抽出バッファー (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 15 mM MgCl₂, 120 mM KCl, 0.1% 3-Mercapto-1,2-propanediol, 20% glycerol, 1 tablet/10 mL Complete Mini protease inhibitor cocktail [Roche]) 中で磨砕した。1,000×g、4°C、10 分の条件で遠心した後、上清を回収し 2,000×g、4°C、20 分の条件で遠心した。この間に、EZview Red anti-FLAG M2 affinity gel の洗浄を行った。1 サンプルあたり 50 μL のビーズ (50%スラリー) を用意し、ビーズに 1 mL の wash buffer (1×phosphate buffered saline [PBS; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ · 12H₂O, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4], 0.05% Tween 20, 0.1% 3-Mercapto-1,2-propanediol) を加え、転倒混和した後、12,500×g、4°C、1 分の条件でスイングローターを用いて遠心後、上清を廃棄した。なお、以降の遠心は全てスイングローターを用いて行った。沈殿に再度 1 mL の wash buffer を加え、同様の操作を 4 回繰り返した。植物サンプルの遠心後、上清を 0.45 μm フィルター (Advantec) を用いて濾過した。濾液のうち、50 μL を抗 FLAG 抗体精製前タンパク質として回収し、残りをビーズに添加した。サンプルを添加したビーズを 4°C で 2 時間混和した後、8,200×g、4°C、1 分の条件で遠心し、上清を廃棄した。1 mL の wash buffer を加えて転倒混和し、8,200×g、4°C、30 秒の条件で遠心後上清を廃棄する作業を 3 回繰り返した。沈殿に対し wash buffer に溶解した 150 μg/mL 3×FLAG peptide を 500 μL 加え、4°C で 30 分間混和した。8,200×g、4°C、30 秒の条件で遠心後、上清を抗 FLAG 抗体精製後タンパク質として回収した。

2.2.5 ウェスタンブロット解析

(1) SDS-PAGE

タンパク質サンプルを 4×SDS-PAGE sample buffer (250 mM Tris-HCl [pH 6.8], 9.2%

SDS, 20% 3-Mercapto-1,2-propanediol, 40% glycerol, 0.02% bromophenol blue) に溶解し、95°Cで5分間処理した。ゲルおよびバッファーとして、NuPAGE 4–12% Bis-Tris protein gel (Thermo Fisher Scientific) および MOPS buffer (Thermo Fisher Scientific) をそれぞれ用いて、180 V、60 分の条件で sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を行った。

(2) ブロットニング

100%メタノールに 1 分間浸した polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレン (Immobilon-P; Merck) に泳動後のゲルを密着させ、ウェット式ブロットニング法によりタンパク質を転写した。ブロットニングバッファー (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% [v/v] メタノール) を満たしたタンク式装置を用いて、100 V、60 分の条件で転写を行った。

(3) ブロッキング

ブロットニング後のメンブレンを PBST (1×PBS, 0.05% [v/v] Tween20) で洗浄後、ブロッキングバッファー (5% [w/v] スキムミルク, 1×PBST) 中で 1 時間振盪した。

(4) 抗体反応

ブロッキング後のメンブレンを PBST で洗浄後、抗体反応を行った。一次抗体としては、抗 myc 抗体 (clone 4A6; Millipore) および抗 FLAG 抗体 (clone M2; Sigma-Aldrich) を用いた。Can Get Signal Solution I (ToYoBo) を用いて、抗 myc 抗体は 1,000 倍に、抗 FLAG 抗体は 2,000 倍に希釈し、37°Cで 40 分間メンブレンと反応させた。PBST でメンブレンを洗浄後、horseradish peroxidase で標識されたヤギ抗体を用いた二次抗体反応を行った。一次抗体として抗 myc 抗体および抗 FLAG 抗体を反応させたメンブレンを、それぞれ Can Get Signal Solution II (ToYoBo) を用いて 3,000 倍および 4,000 倍に希釈した抗マウス抗体 (GE Healthcare) と 37°Cで 40 分間反応させた。PBST で洗浄した後、

メンブレンに Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad) もしくは Clarity Max Western ECL Substrate (Bio-Rad) を滴下し、標識したタンパク質を LAS 4000 mini (FUJIFILM) を用いて検出した。検出後のメンブレンは Quick-CBB (Wako) で染色した。

表 2.1 本章で用いたオリゴヌクレオチドの配列

オリゴヌクレオチド名	配列 (5'-3')
Li2606F	CAAAGTCTCCACATATGCCG
LidelTG1R	GGGCTGAGATGACTATGTCCGTGTTAATCGGAGTTAAGG
LidelTG1F	CCTTAACTCCGATTAACACGGACATAGTCATCTCAGCCC
oligodT	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTGTTTTTTTTT TTTTTTTTTT
LidelTG2R	GAGGTGGTGGGCTCCGGACGTGTAGTTGGGCTCGGTG
LidelTG2F	CACCGAGCCCAACTACACGTCCGGAGCCCACCACCTC
LidelTG3R	CGGCCTCCGTGTGGGAGTGCGTGAAGTTGTCGCCGACGTG
LidelTG3F	CACGTCCGGCGACAACCTTCACGCACTCCCACACGGAGGCCG
Li6095R	CAGACTTTCACTGGTTGTAG
PRDb-F2	CCTGAGCCCCAGACACACATG
polydT-SpSIR	AAAAGTCGACACTAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTA
PVX-RDmycR	TTTACTCGAGTCACAGGTCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTCG CATGCAAGAAAGTTTCTGAGGCGGGGA
UK3-A1092C-F	ATTTTTGCCAAAGTCAGACACTTAATTAATCATCTGACTT
UK3-A1092C-R	AAGTCAGATGATTTAATTAAGTGTCTGACTTTGGCAAAAAT
PIAMV-1F	GAAAACAAACCTACACAAACCA
LiRDMycR	TTTATCTAGATCACAGGTCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTCAC TAGTATCGGAGTTAAGGAAAGATGAACC
Li-G1046C-F	CTGGGCAAATTCAGACACCTCATCAGCACCAAGGAG
Li-G1046C-R	CTCCTTGGTGCTGATGAGGTGTCTGAATTTTGCCAG
PIRep-F3	AATCCCCAGACTTCCATGAGCACC
PIRep-R3	TTTTCTTTGCGCCGAGCTTCTC
NbUBQ-26F	CGGCATGCTTAACACATGCA
NbUBQ-136R	AGCCGTTTCCAGCTGTTGTTC

2.3 結果

2.3.1 JAX1 はポテックスウイルスの移行関連因子欠損変異体の蓄積を阻害する

JAX1 抵抗性に関与するウイルス因子の特定を目的として、PIAMV 変異体を用いた解析を行った。green fluorescent protein (GFP) を発現する PIAMV 感染性クローン (PIAMV-GFP) およびポテックスウイルスの細胞間移行に必要な TGBp1、TGBp2、TGBp3、CP をコードする ORF をそれぞれ欠損した PIAMV-GFP 変異体 (図 2.1 左; それぞれ PIAMV-GFP Δ TGBp1、PIAMV-GFP Δ TGBp2、PIAMV-GFP Δ TGBp3、PIAMV-GFP Δ CP) を *N. benthamiana* の展開葉においてネガティブコントロールの GUS もしくは JAX1 とともにアグロインフィルトレーション法により接種し、GFP 蛍光の観察を行った。その結果、いずれの PIAMV-GFP 変異体を接種した場合も、GUS 発現区に比べ JAX1 発現区では GFP 蛍光が低下した (図 2.1 右)。このことから、JAX1 抵抗性の発現には TGBp1、TGBp2、TGBp3、CP は必須でないことが明らかとなった。

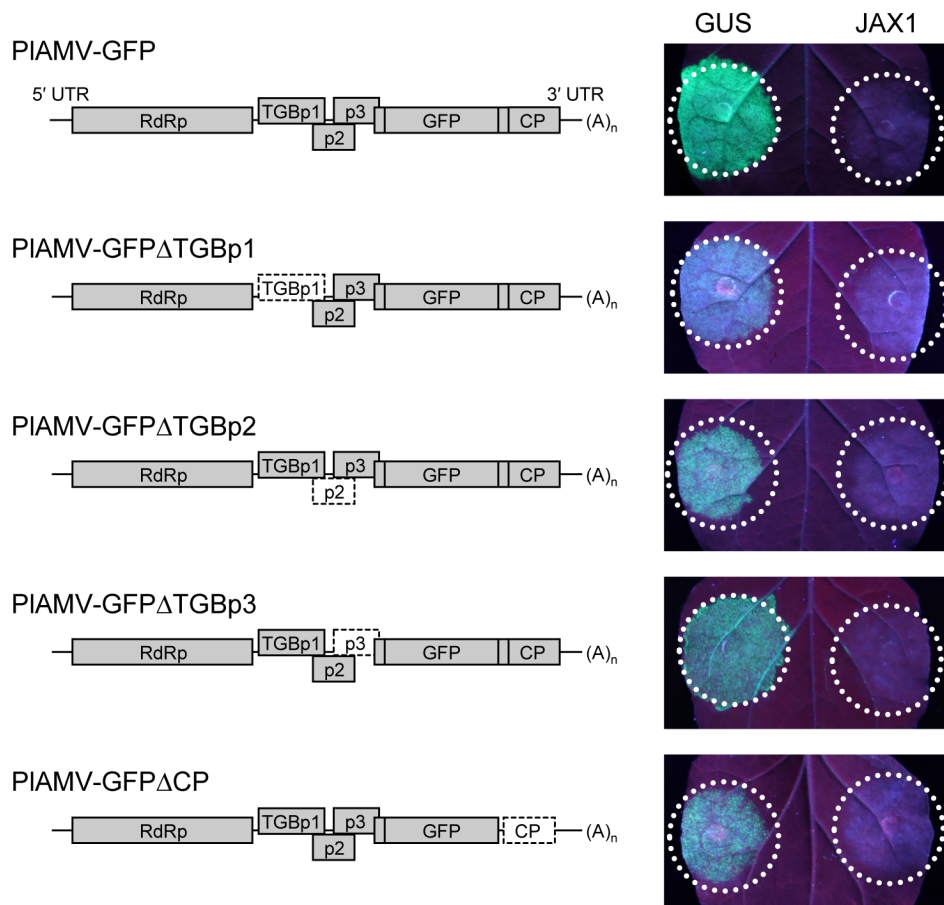


図 2.1 PIAMV 移行関連因子欠損変異体に対する JAX1 の影響の解析
 PIAMV-GFP および TGBp1、TGBp2、TGBp3、CP を欠損した PIAMV-GFP 変異体のゲノム構造 (左)。各ウイルスコンストラクトと GUS または JAX1 を発現するアグロバクテリウム菌液 (OD₆₀₀=1) を等量ずつ混合し *N. benthamiana* の展開葉に浸潤させた。接種後 5 日で GFP 蛍光を観察した (右)。

2.3.2 JAX1 はポテックスウイルスのレプリコンの増殖を阻害する

JAX1 抵抗性の発現に TGBp1、TGBp2、TGBp3、CP が必須でないことが示されたことから、JAX1 が PIAMV ゲノムの残りの領域 (RdRp、5'および 3' UTR) を標的とするかを確認するため、PIAMV-53U-RdRp を用いた解析を行った。PIAMV-53U-RdRp は RdRp をコードする ORF1 と複製に必要な 5'および 3' UTR のみを有するレプリコンである (Komatsu *et al.*, 2011) (図 2.2 左)。PIAMV-53U-RdRp は細胞間移行能および長距離移行能を有さないが、RdRp 産生能および新生ゲノム RNA 合成能を有する。PIAMV-53U-RdRp を *N. benthamiana* の展開葉において GUS もしくは JAX1 とともにアグロインフィルトレーション法により接種し、リアルタイム PCR 法によりウイルス蓄積量を解析した。その結果、GUS 発現区に比べ JAX1 発現区では PIAMV-53U-RdRp の蓄積量が顕著に低下した (図 2.2 右)。このことから、JAX1 抵抗性は PIAMV ゲノムの RdRp コード領域と 5'および 3' UTR 領域のみを有するレプリコンに対しても発揮されることが示された。

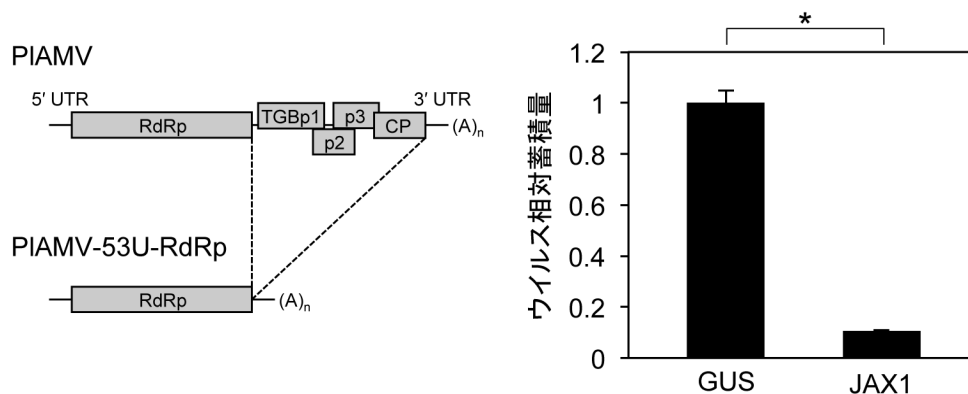


図 2.2 PIAMV-53U-RdRp に対する JAX1 の影響の解析

PIAMV-53U-RdRp の構造 (左)。PIAMV-53U-RdRp と GUS または JAX1 を発現するアグロバクテリウム菌液 ($OD_{600}=1$) を等量ずつ混合し *N. benthamiana* の展開葉に浸潤させた。接種後 1.5 日で RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR 法によりウイルス蓄積量を定量した (右)。内部標準にはユビキチン遺伝子を用いた。GUS 発現区における平均値を 1.0 とした。エラーバーは標準誤差を表す。アスタリスクは Student の *t* 検定により有意差が認められたことを示す ($p < 0.001$)。

2.3.3 JAX1 はポテックスウイルスの複製酵素と相互作用する

JAX1 抵抗性は、PIAMV の RdRp のみをコードするレプリコンに対しても発揮されることが示されたこと、JAX1 抵抗性を打破する PVX 株は RdRp にアミノ酸変異を有すること (Sugawara *et al.*, 2013) から、JAX1 はウイルスの RdRp を標的にしている可能性が考えられた。そこで、共免疫沈降法により JAX1 とポテックスウイルス RdRp の相互作用を解析した。

まず、PVX の RdRp を発現するコンストラクト PVX-53U-RdRp-myc-WT および PVX-53U-RdRp-myc-A1092C を用いた解析を行った。PVX-53U-RdRp-myc-WT は、PVX ゲノムより TGBp1-3 および CP が除去されており、5'および3' UTR と myc タグの付加された RdRp を含むコンストラクトである。PVX-53U-RdRp-myc-A1092C は、PVX-53U-RdRp-myc-WT の 1092 番目の塩基 A を C に置換し、JAX1 抵抗性の打破を引き起こす RdRp の 336 番目のアミノ酸残基グルタミンのヒスチジンへの変異を導入したコンストラクトである。両コンストラクトを、FLAG タグの付加された JAX1 または RTM1 (それぞれ FLAG-JAX1 および FLAG-RTM1) とともに、*N. benthamiana* の展開葉において、アグロインフィльтраーション法により導入した。導入した葉から全タンパク質を抽出後、抗 FLAG 抗体ビーズを用いて精製し、ウエスタンブロット解析を行った。その結果、PVX-53U-RdRp-myc-WT 由来 RdRp が FLAG-JAX1 によって共精製されたのに対し、FLAG-RTM1 によっては共精製されなかった (図 2.3A)。一方で、PVX-53U-RdRp-myc-A1092C 由来 RdRp は、FLAG-JAX1 および FLAG-RTM1 のいずれによっても共精製されなかった (図 2.3A)。

続いて、PIAMV においても、コンストラクト PIAMV-53U-RdRp-myc-WT および PIAMV-53U-RdRp-myc-G1046C を用いて同様の解析を行った。PVX において JAX1 抵抗性の打破に関与する RdRp の 336 番目のアミノ酸残基グルタミンはポテックスウイルス属内で広く保存されており、PIAMV の RdRp においては 320 番目のアミノ酸残基に相当する (Sugawara *et al.*, 2013)。PIAMV-53U-RdRp-myc-WT は、myc タグの付加された

RdRp を発現する PIAMV-53U-RdRp である。PIAMV-53U-RdRp-myc-G1046C は、PIAMV-53U-RdRp-myc-WT の 1046 番目の塩基 G を C に置換し、RdRp の 320 番目のアミノ酸残基をグルタミンからヒスチジンに変異させたコンストラクトである。PVX の場合と同様に、PIAMV-53U-RdRp-myc-WT 由来 RdRp が FLAG-JAX1 によって共精製されたのに対し、FLAG-RTM1 によっては共精製されなかった (図 2.3B)。また、PIAMV-53U-RdRp-myc-G1046C 由来 RdRp は、FLAG-JAX1 および FLAG-RTM1 のいずれによっても共精製されなかった (図 2.3B)。

以上の結果から、JAX1 は PVX および PIAMV の野生型 RdRp と相互作用する一方で、JAX1 抵抗性打破に関与するアミノ酸に変異を導入した RdRp とは相互作用しないことが示された。

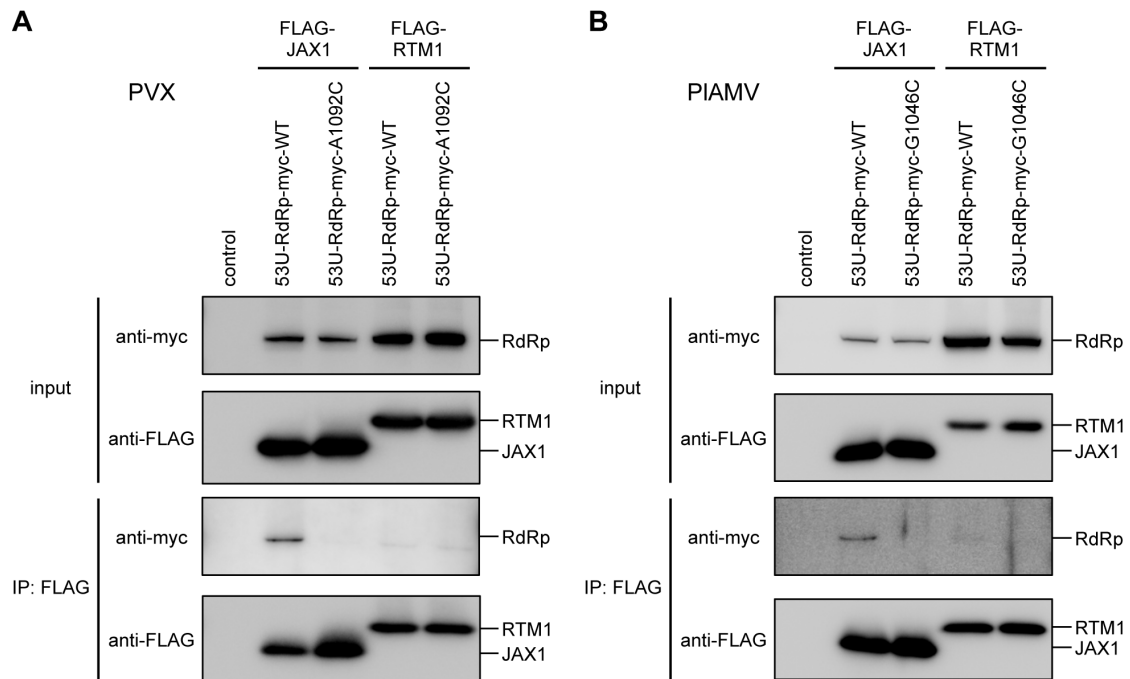


図 2.3 ポテックスウイルスの RdRp と JAX1 の相互作用の解析

(A) PVX RdRp と JAX1 の共免疫沈降解析。PVX-53U-RdRp-myc-WT または PVX-53U-RdRp-myc-A1092C と FLAG-JAX1 または FLAG-RTM1 を発現するアグロバクテリウム菌液 ($OD_{600}=1$) を等量ずつ混合し *N. benthamiana* の展開葉に浸潤させた。2.5 日後に非接種葉 (control) および接種葉よりタンパク質を抽出し、抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降に供した。FLAG 精製前 (input) および FLAG 精製後 (IP: FLAG) のタンパク質サンプルをウエスタンブロット法により解析した。RdRp を抗 myc 抗体で、JAX1 および RTM1 を抗 FLAG 抗体で検出した。(B) PIAMV RdRp と JAX1 の共免疫沈降解析。PIAMV-53U-RdRp-myc-WT または PIAMV-53U-RdRp-myc-G1046C と FLAG-JAX1 または FLAG-RTM1 と p19 を発現するアグロバクテリウム菌液 ($OD_{600}=1$) を 10 : 10 : 1 の比で混合し *N. benthamiana* の展開葉に浸潤させた。1.5 日後に非接種葉 (control) および接種葉よりタンパク質を抽出し、抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降に供した後、(A) と同様に解析した。

2.4 考察

2.4.1 JAX1 抵抗性発現に必要なウイルス因子

本章では、JAX1 抵抗性発現に必要なポテックスウイルス因子に関する解析を行った。JAX1 の発現により TGBp1-3 または CP を欠損した PIAMV-GFP 変異体の蛍光は低下した (図 2.1)。また、JAX1 は RdRp をコードする ORF1 と 5'および 3' UTR のみを有する PIAMV レプリコンの増殖を抑制した (図 2.2)。

これらの結果は、JAX1 抵抗性の発現には TGBp1-3 および CP は必須でないこと、RdRp および UTR が存在すれば十分であることを示している。TGBp1-3 および CP はポテックスウイルスの細胞間移行に必須の因子であり (Park *et al.*, 2014; Ozeki *et al.*, 2009)、これらの因子のいずれかを欠損したポテックスウイルス変異体は細胞間移行能を消失することが知られている。このため、今回の実験で用いたポテックスウイルス変異体は、感染過程のうち単細胞での増殖までしか達成できないと考えられる。従って、JAX1 は翻訳や新生 RNA 合成などから構成される複製以前の感染過程を阻害していることが示唆される。このことは、JAX1 が細胞レベルで抵抗性を発揮するという過去の知見 (Yamaji *et al.*, 2012) からも支持される。

2.4.2 JAX1 が標的とするウイルス因子

共免疫沈降解析により、JAX1 は PVX および PIAMV の野生型の RdRp とは相互作用するが、JAX1 抵抗性打破に関与するアミノ酸残基に変異を有する RdRp とは相互作用しないことが示された (図 2.3)。この結果は、JAX1 と RdRp の相互作用が JAX1 抵抗性に重要であることを示唆しており、JAX1 が標的とするウイルス因子が RdRp である可能性が考えられる。2.4.1 で述べたように JAX1 がウイルスの複製以前の過程を阻害すると予想されることと合わせて考えると、JAX1 は RdRp に結合しその機能を直接的に

阻害することにより抵抗性を発揮する可能性が考えられる。

また図 2.3 の結果は、抵抗性打破ウイルス株は、RdRp における 1 アミノ酸変異により JAX1 との相互作用を回避することで抵抗性を打破していることを示唆している。これまでに、抵抗性因子との相互作用を免れることにより抵抗性を打破するウイルス株の例が報告されている。ToMV は複製タンパク質のアミノ酸変異により当該タンパク質と Tm-1 との間の結合を回避し、抵抗性を免れることが知られている (Ishibashi *et al.*, 2007; Ishibashi *et al.*, 2014)。JAX1 とポテックスウイルスの関係においても同様の現象が認められた可能性が考えられる。

今回 PIAMV の 1046 番目の塩基 G の C への変異 (RdRp の 320 番目のアミノ酸残基グルタミンのヒスチジンへの置換を伴う) により、RdRp の JAX1 への結合性が失われることが明らかとなった (図 2.3B)。しかし、当該変異により PIAMV が JAX1 抵抗性を打破するか否かは実験的に検証されておらず現時点で不明である。これを解析し、PIAMV においても JAX1-RdRp 間の結合性と JAX1 抵抗性を打破するか否かが相関するかを解明することは今後の課題と考えられる。

本章の解析により、JAX1 がポテックスウイルスの RdRp を標的とし、複製以前の過程を阻害することが示唆された。このことから、JAX1 が RdRp の機能を直接的に阻害することで抵抗性を発揮する可能性が考えられた。この仮説を検証するため、第 3 章では *in vitro* でポテックスウイルスの複製に対する JAX1 の影響について解析した。

第3章 ポテックスウイルスに対する JAX1 抵抗性の分子機構の解析

3.1 序文

第2章の解析より、JAX1 はポテックスウイルスの RdRp に結合し、RdRp の機能を阻害し複製を阻害することで抵抗性を発揮する可能性が考えられた。本章では、JAX1 によるウイルス増殖阻害機構をより詳細に明らかにするため、*in vitro* におけるポテックスウイルス複製系の確立と、この系を用いた JAX1 のポテックスウイルスに与える影響の生化学的解析を試みた。

これまでに、植物プラス鎖 RNA ウイルスの複製機構について、*in vitro* 系を用いた詳細な解析がなされている。中でも、脱液胞化タバコ BY-2 プロトプラスト抽出液 (BYL) を用いた解析系 (Komoda *et al.*, 2004) が広く用いられている。BYL は液胞を除いたタバコ BY-2 プロトプラストの抽出液から核成分を除去したものであり、液胞中の多量のプロテアーゼやヌクレアーゼが含まれていないことから高い翻訳活性を有する (Komoda *et al.*, 2004)。また、ウイルスの複製に必要な多数の因子を含んでおり、BYL にウイルス RNA を添加することによりウイルスの翻訳および複製が引き起こされることが知られている。これまでに、トバモウイルス、カルモウイルス、ブロモウイルス、ダイアンソウイルス、トンプスウイルスなどの多様なプラス鎖 RNA ウイルスが BYL で複製することが示されている (Komoda *et al.*, 2004; Iwakawa *et al.*, 2007; Gursinsky *et al.*, 2009)。しかし、BYL を用いたポテックスウイルスの複製系はこれまでに確立されていない。

BYL を用いることで、トバモウイルスの複製機構がこれまで特に詳細に解析されている。BYL を 30,000×g の超遠心処理に供し、沈殿 (膜画分; BYLP30) と上清 (可溶性画分; BYLS30) とに分け、BYLS30 にトバモウイルス RNA を加えると、ウイルスタンパク質の翻訳は認められるものの、新生 RNA の合成は認められないことが示されている (Komoda *et al.*, 2007)。しかし、BYLS30 でウイルス RNA を翻訳させた後に BYLP30

を加えると新生 RNA が合成されることが明らかとなっている。また、BYLS30 で形成される複合体 (pre-membrane-targeting complex; PMTC) はウイルス複製タンパク質とウイルスゲノム RNA を含むことが明らかとなっている (Komoda *et al.*, 2007; Kawamura-Nagaya *et al.*, 2014)。このことから、トバモウイルスの複製は、複製タンパク質の翻訳、PMTC の形成、PMTC の生体膜へのターゲティング、生体膜上での複製複合体の形成、新生 RNA の合成という過程に分けられると考えられている (Komoda *et al.*, 2007; Ishibashi and Ishikawa, 2016)。

本章では、BYL 中でポテックスウイルスのタイプ種である PVX の翻訳および複製の再構成を試みた。さらにこの系を用いることで、JAX1 の作用機構を解析した。

3.2 材料および方法

3.2.1 プラスミド

(1) PVX-53U-RdRp-WT および PVX-53U-RdRp-A1092C の *in vitro* 翻訳／複製用ベクター

PVX-53U-RdRp-WT および PVX-53U-RdRp-A1092C を *in vitro* で翻訳／複製させるため、pT7-53U-UK3RdRp-WT および pT7-53U-UK3RdRp-A1092C をそれぞれ構築した。まず pCXV を鋳型に、プライマーPRDb-F2 (表 2.1) および PVX-Rd-XhR (*XhoI* 認識配列を含む) (表 3.1) を用いて PCR を行った。PCR 産物を *BlnI* および *XhoI* (認識配列は ORF1 の直下に存在) で処理した後、同じ制限酵素で処理した pCX-a にクローニングし、得られたベクターを pCX-53U-UK3RdRp と名付けた。pCX-53U-UK3RdRp を *AgeI* および *SpeI* で処理した後、得られた断片を同じ制限酵素で処理したベクター pL61 にクローニングし、pT7-53U-UK3RdRp-WT と名付けた。pL61 は、T7 プロモーターの直下に PVX-UK3-GFP の配列が連結されたベクターである。pT7-53U-UK3RdRp-A1092C の構築のため、GENEART Site-Directed Mutagenesis System (Thermo Fisher Scientific) を用いて pT7-53U-UK3RdRp-WT のウイルスゲノムの 1092 番目の塩基 A を C に変異させた。変異導入に際してプライマーUK3-A1092C-F および UK3-A1092C-R (表 2.1) を用いた。

(2) JAX1 および RTM1 の *in vitro* 翻訳用ベクター

C 末端に FLAG タグの付加された JAX1 および RTM1 を *in vitro* で翻訳させるためのベクターをクローニングした。JAX1 および RTM1 の cDNA を鋳型にプライマー pNK-JAX1-F と pNK-JAX1-R および pNK-RTM1-F と pNK-RTM1-R (表 3.1) を用いて PCR を行った。PCR 産物を *BamHI* および *SalI* で処理し、同じ制限酵素で処理したベクター pNK (Netsu *et al.*, 2015) にクローニングした。RTM1 をクローニングしたプラスミドを pNK-RTM1-FLAG と名付けた。クローニングされた JAX1 の開始コドン

GENEART Site-Directed Mutagenesis System (Thermo Fisher Scientific) により、プライマー JAX1-1Mmut-F および JAX1-1Mmut-R を用いて変異させた。得られたプラスミドを pNK-JAX1-FLAG と名付けた。

また、C 末端に 3×FLAG タグの付加された JAX1 を *in vitro* で翻訳させるためのベクターを構築した。オリゴヌクレオチド 3×FLAG-temp を鋳型にプライマー BamNco-3×FLAG-F および SpeStop-3×FLAG-R を用いて PCR を行った。PCR 産物を *Bam*HI および *Spe*I で処理し、同じ制限酵素で処理した pNK-JAX1-FLAG にクローニングし、pNK-JAX1-3×FLAG と名付けた。

3.2.2 BYL の調製

BYL の調製は Komoda らの報告 (Komoda *et al.*, 2004) をもとに行った。タバコ BY-2 培養細胞を、4 本の 300 mL フラスコ中の培地 (1 袋/L MS Salt [WAKO], 30 g/L sucrose, 100 mg/L myo-inositol, 1 mg/L thiamine HCl, 200 mg/L KH₂PO₄, 0.2 mg/L 2,4-D) 100 mL に 5 mL ずつ植え継ぎ、3 日間 26°C で振盪培養した。培養細胞を 50 mL チューブに分注し、150×g、23°C、2 分の条件で遠心した。この際、減速は低速で行った。上清を廃棄後、細胞に細胞壁分解酵素液 (1% [w/v] Cellulase Onozuka RS [Yakult Pharmaceutical], 0.1% [w/v] Pectolyase Y-23 [Kyowa Chemical Products], 0.4 M mannitol, pH 5.5) を計 150 mL 加え、300 mL フラスコ 2 本に分注し、25°C で 2 時間振盪した。酵素処理後の細胞を 50 mL チューブに分注し、150×g、23°C、5 分の条件で遠心した。上清を廃棄後、wash buffer (12.5 mM NaOAc, 5 mM CaCl₂, 0.37 M mannitol, pH 5.8) で 25 mL までメスアップし、チューブ 2 本分の培養細胞をチューブ 1 本にまとめた。150×g、23°C、3 分の条件で遠心し、上清を廃棄後 wash buffer を用いて 50 mL までメスアップする作業を 2 回繰り返した後、再度同じ条件で遠心を行い、上清を廃棄した。酵素処理後の遠心において、減速は低速で行った。得られたプロトプラストを、35% (v/v) (1.5 mL) -70% (v/v) (1.5 mL) パーコ

ール濃度勾配上に重層された 10–35% (v/v) (5.5 mL) パーコール濃度勾配の上に載せた。各パーコール溶液は、Percoll PLUS (GE Healthcare) をバッファー (終濃度 0.7 M mannitol, 20 mM MgCl₂, 5 mM PIPES-KOH [pH 7.0]) 中に溶解させることで作成した。2.75 mL の 10%パーコール溶液層の下に 2.75 mL の 35%パーコール溶液を入れた後、Gradient mate (BioComp) を用いて 86°、5 rpm、2 分 48 秒および 86°、20 rpm、12 秒の条件で処理し、10–35% (v/v) 濃度勾配を形成させた。この層の下に 1.5 mL の 35%および 70%パーコール溶液をこの順で入れ、最終的な濃度勾配を形成させた。プロトプラストをパーコール溶液に重層した後、SW41 Ti ローター (Beckman Coulter) を用いて、10,000×g、25°C、1 時間の条件で遠心した。この際、加速および減速は低速で行った。遠心後、35%パーコール溶液と 70%パーコール溶液との間に位置する脱液胞化プロトプラストを 15 mL チューブに回収し、wash buffer で 14 mL にメスアップした。脱液胞化プロトプラストを 150×g、23°C、3 分の条件で遠心し、上清を廃棄後 wash buffer を用いて 14 mL までメスアップする作業を 2 回繰り返した後、同じ条件で遠心後、上清を廃棄した。なお、減速は低速で行った。得られた沈殿は、3–3.5 倍量の TR buffer (30 mM HEPES-KOH [pH 7.4], 80 mM KOAc, 1.8 mM Mg(OAc)₂, 2 mM dithiothreitol [DTT], 1 tablet/10 mL Complete Mini protease inhibitor cocktail [Roche]) に溶解した後、ダウンスホモジナイザーを用いて破碎した。破碎後の液を 1.5 mL チューブに分注し、800×g、4°C、10 分の条件で遠心した。上清を BYL として回収し、液体窒素で急冷後–80°C で使用まで保管した。

また、100 μL の BYL を S110AT ローター (Hitachi-koki Co.) を用いて 30,000×g、4°C、15 分の条件で超遠心し、90 μL の上清を BYLS30 として使用した。残った上清 10 μL および 25 μL の TR buffer で沈殿を溶解し、BYLP30 として使用した。

3.2.3 *in vitro* 実験用鋳型 RNA の調製

BYL を用いた *in vitro* 実験に使用した JAX1-FLAG、RTM1-FLAG、JAX1-3×FLAG、

PVX-53U-RdRp-WT、PVX-53U-RdRp-A1092C の RNA は、AmpliCap-Max T7 High Yield Message Maker Kit (CELLSCRIPT) を用いた *in vitro* 転写反応により調製した。pNK-JAX1-FLAG、pNK-RTM1-FLAG、pNK-JAX1-3×FLAG を *NotI* を用いて直鎖化した。また、pT7-53U-UK3RdRp-WT、pT7-53U-UK3RdRp-A1092C を *SpeI* を用いて直鎖化した。直鎖化したプラスミド 1 µg を蒸留水で 5.5 µL にメスアップした後、10×T7 transcription buffer 2 µL、Cap/NTP premix 8 µL、100 mM DTT 2 µL、RNase inhibitor 0.5 µL、T7 enzyme solution 2 µL を加え、37°C、90 分の転写反応に供試した。転写の鋳型として用いたプラスミドを分解させるために DNase I (1 unit/µL) 0.8 µL を加え、37°C で 15 分反応させた後、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA を精製した。また、*in vitro* 実験に使用した PVX および TMV の精製粒子 RNA は、それぞれ PVX-UK3 株 (Kavanagh *et al.*, 1992) および TMV-OM 株 (Watanabe *et al.*, 1999) の感染植物から精製した粒子より抽出した。

3.2.4 *in vitro* 翻訳／複製実験

(1) ウイルス翻訳／複製実験

3.2.3 で調製したウイルス RNA を 25 µL の BYL 反応液 (12.5 µL BYL, 0.75 mM ATP, 0.1 mM GTP, 25 mM creatine phosphate, 25 µM of each amino acid, 80 µM spermine, 5 µg creatine kinase [Roche], 10 units of Ribonuclease inhibitor [TaKaRa], TR buffer で容量を調整) に添加し、25°C で 1 時間静置した。翻訳を停止させるために 10 mM puromycin を 0.5 µL だけ添加し、25°C で 10 分静置した。反応液 5 µL をウエスタンブロット解析用に回収し、残りの溶液を複製活性試験に供試した。

ウエスタンブロット解析に際しては、サンプルを 5×gel sample buffer (250 mM Tris-HCl [pH 6.8], 10% SDS, 50% glycerol, 500 mM DTT, 0.04% bromophenol blue) に溶解した後、70°C で 10 分処理した。SDS-PAGE、ブロットニング、ブロッキング、抗体反応は 2.2.5 と同様の手順で行った。PVX の RdRp の検出のため、一次抗体として Can Get Signal

Solution I を用いて 2,000 倍に希釈した抗 PVX RdRp 抗体を用いた。抗 PVX RdRp 抗体は、6×ヒスチジンタグを付加した PVX-OS 株 (Kagiwada *et al.*, 2002) の RdRp の N 末端側 353 アミノ酸を大腸菌を用いて発現後、Ni カラムで精製し、家兎に免疫して作製した。二次抗体としては、Can Get Signal Solution II を用いて 4,000 倍に希釈した抗ウサギ抗体を用いた。FLAG タグ付き JAX1 および RTM1 を添加した実験においては、両タンパク質の検出のため、一次抗体として Can Get Signal Solution I を用いて 2,000 倍に希釈した抗 FLAG 抗体を、二次抗体として Can Get Signal Solution II を用いて 4,000 倍に希釈した抗マウス抗体を用いた。

複製活性試験に際しては、5 μ L の 5×replication mixture (5 mM ATP, 5 mM GTP, 5 mM UTP, 125 μ M CTP, 1 μ L [α -³²P]CTP [29.6 TBq/mmol; PerkinElmer], 50 mM DTT, 500 μ g/mL actinomycin D [Wako Pure Chemicals], 25 mM Mg(OAc)₂) を添加し、25°C で 1 時間静置した。静置後、蒸留水 171 μ L、Dr. GentLE Precipitation Carrier (TaKaRa) 4 μ L、フェノール 200 μ L を加え懸濁し、21,500×g、23°C、10 分の条件で遠心した。上清 185 μ L に、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) (PCI) 200 μ L を加え懸濁し、21,500×g、23°C、10 分の条件で遠心した。上清 170 μ L にエタノール 700 μ L、7.5 M 酢酸アンモニウム 100 μ L を加え懸濁し、21,500×g、4°C で 45 分以上遠心した。上清を廃棄後、70%エタノール 200 μ L を加え 21,500×g、4°C、10 分の条件で遠心し、上清を廃棄後風乾した。抽出した RNA を蒸留水 15 μ L に溶解し、RNA 3 μ L に loading buffer (8 M urea, 12% glycerol, 10 mM EDTA, 0.017% bromophenol blue, 0.012% xylene cyanol) 5 μ L を加えた。RNA を 8 M urea-2.4% アクリルアミドゲル、泳動用バッファー (400 mM Tris, 200 mM NaOAc, 7.3 mM EDTA · 2Na, pH 7.2) を用いて低温室において 180 V、120 分の条件で電気泳動した。電気泳動後、ゲルをメチレンブルー染色液 (500 mM NaOAc, 2.67 mM methylene blue, pH 5.2) で染色した。ゲルを乾燥させた後、イメージングプレート (BAS IP MS 2040E; GE healthcare) に密着させた。[α -³²P]CTP の検出は FLA-5000 (FUJIFILM) を用いて行った。S1 ヌクレアーゼ処理に際しては、RNA に 10×S1 buffer (TaKaRa) 5 μ L、S1 nuclease (TaKaRa) 1 μ L を添加し蒸留水で 50 μ L にメスアップし

た後、23°Cで25分反応させた。蒸留水 146 μL 、Dr. GenTLE Precipitation Carrier (TaKaRa) 4 μL 、PCI 200 μL を加え懸濁し、21,500 $\times g$ 、23°C、10分の条件で遠心した後、上記と同様の条件でエタノール沈殿に供試し、RNA を精製した。

(2) タイムコース JAX1 添加実験

PVX-53U-RdRp-WT RNA を 19 μL の BYLS30 反応液 (9.5 μL BYLS30, 0.75 mM ATP, 0.1 mM GTP, 25 mM creatine phosphate, 25 μM of each amino acids, 80 μM spermine, 3.8 μg creatine kinase [Roche], 7.6 units of Ribonuclease inhibitor [TaKaRa], TR buffer で容量を調整) に添加し、25°Cで1時間静置した。この際、PVX-53U-RdRp-WT RNA 添加後 0、15、30、45、60 分のいずれかの時点で 3.2.5 で調製した JAX1 またはネガティブコントロールである TR buffer を 1 μL 添加した。翻訳開始 60 分後に JAX1 もしくは TR buffer を添加した直後に 10 mM puromycin を 0.5 μL 加えた。25°Cで10分静置した後、BYLP30 を 5 μL 加え、15°Cで1時間静置した。反応液 5 μL をウエスタンブロット解析用に回収し、残りの溶液を複製活性試験に供試した。以降の操作は 3.2.4 (1) と同様である。ウイルス複製産物のシグナル強度はソフトウェア ImageJ (National Institutes of Health) を用いて定量した。

3.2.5 タイムコース JAX1 添加実験のための JAX1 の精製

タイムコース JAX1 添加実験に使用した JAX1 は、BYLS30 中で翻訳後アフィニティ精製により調製した。3 μg の FLAG タグ付き JAX1 の RNA を 100 μL の BYLS30 反応液に添加後、25°Cで2時間静置し JAX1 を翻訳させた。この間に、EZview Red anti-FLAG M2 affinity gel (Sigma-Aldrich) の洗浄を行った。50 μL のビーズ (50%スラリー) に 150 μL の TR buffer を加え、タッピングにより攪拌した後、1,400 $\times g$ 、4°C、30 秒の条件でスイングローターを用いて遠心後、上清を廃棄した。なお、以降の遠心は全てスイングロー

ターを用いて行った。沈殿に再度 150 μL の TR buffer を加え、同様の操作を繰り返した。翻訳反応終了後の溶液を 50 μL のビーズに加え、4°C で 90 分静置した。この際、15 分おきにチューブをタッピングし、溶液を攪拌した。1,400 \times g、4°C、30 秒の条件で遠心後、上清を廃棄し、TR buffer 150 μL を加え、溶液をタッピングにより攪拌した。同様の作業を 4 回繰り返し、再度 1,400 \times g、4°C、30 秒の条件で遠心後、上清を廃棄した。沈殿に対して、TR buffer に溶解した 400 ng/ μL 3 \times FLAG ペプチド (Sigma-Aldrich) を 40 μL だけ加え、4°C で 30 分静置した。この際、10 分おきにタッピングにより溶液を攪拌した。1,400 \times g、4°C、1 分の条件で遠心後、上清を回収した。沈殿に対して、再度 TR buffer に溶解した 400 ng/ μL 3 \times FLAG ペプチドを 40 μL 加え同様の操作を繰り返した後、再度上清を回収し、先に回収した上清と混和し精製 JAX1 とした。

3.2.6 スクロース密度勾配遠心

スクロース密度勾配遠心は、Komoda らの報告 (Komoda *et al.*, 2007) をもとに行った。バッファー (30 mM HEPES-KOH [pH 7.4], 80 mM KOAc, 1.8 mM EDTA, 2 mM DTT) にスクロースを溶解させ、15%および 40% (w/v) のスクロース溶液を調製した。超遠心用チューブに 1 mL の 40%スクロース溶液を入れ、その上に 1 mL の 15%スクロース溶液を重層した。チューブを Gradient mate (BioComp) にセットし、85°、20 rpm、1 分の条件で濃度勾配を作成した。サンプルをスクロース濃度勾配の上に重層した後、S55S ローター (Hitachi-koki Co.) を用いて 100,000 \times g、4°C、2 時間の条件で超遠心した。超遠心後は自然減速させ、溶液を当量ずつ計 10 個のチューブに回収し、上層から画分 1–10 とした。

3.2.7 BN-PAGE

4 μL のサンプルに、2.5 μL の NativePAGE 4×Sample Buffer (Thermo Fisher Scientific)、0.7 μL の NativePAGE 5% G-250 Sample Additive (Thermo Fisher Scientific)、2.8 μL の蒸留水を加えた後、NativePAGE 3–12% Bis-Tris Protein Gel (Thermo Fisher Scientific) を用いて blue native (BN) -PAGE に供試した。この際、Dark Blue Cathode Buffer (200 mL 1×NativePAGE Running Buffer, 10 mL NativePAGE Cathode Additive) を用いて 150 V で 30 分泳動した後、Light Blue Cathode Buffer (200 mL 1×NativePAGE Running Buffer, 1 mL NativePAGE Cathode Additive) を用いて 150 V で 60 分泳動した。また、マーカーとして NativeMark Unstained protein standard (Thermo Fisher Scientific) を用いた。BN-PAGE 後のゲルは、2.2.5 (2) と同様の手順でブロッキング反応に供試した。ブロッキング反応直後に、マーカーを泳動した部分を PVDF メンブレンから切り出し、Quick-CBB に浸した。メンブレンの残りの部分は 8% 酢酸に浸し、15 分間振盪した後、蒸留水で洗浄した。メンブレンをメタノールに浸し、蒸留水で洗浄した後、SDS バッファー (50 mM Tris-HCl [pH 6.8], 2% SDS, 0.8% 3-Mercapto-1,2-propanediol) に浸し、50°C で 1 時間振盪した。メンブレンを PBST で洗浄した後、2.2.5 (3) と同様の手順でブロッキング反応に供試した。ブロッキング反応後に、2.2.5 (4) と同様の手順で抗体反応を行い、タンパク質を検出した。一次抗体としては、Can Get Signal Solution I を用いて 2,000 倍に希釈した抗 PVX RdRp 抗体および抗 FLAG 抗体を用いた。一次抗体として抗 PVX RdRp 抗体および抗 FLAG 抗体を反応させたメンブレンに対して、Can Get Signal Solution II を用いて 2,000 倍に希釈した抗ウサギ抗体および抗マウス抗体をそれぞれ反応させた。

表 3.1 本章で用いたオリゴヌクレオチドの配列

オリゴヌクレオチド名	配列 (5'-3')
PVX-Rd-XhR	TTTACTCGAGTTAAAGAAAGTTTCTGAGGCGGGGA
pNK-JAX1-F	TATAATTTCACTCGAGGTCGACAATGGCTACACCATCAGGTTC A
pNK-JAX1-R	CCTTGTAGTCCCATGGGGATCCCTTAGCAGGAGAAAGCGGTGC
pNK-RTM1-F	TATAATTTCACTCGAGGTCGACAATGAAGATAGGACCTGTAGG GA
pNK-RTM1-R	CCTTGTAGTCCCATGGGGATCCGCCAGTACAATTTTTGACTCT
JAX1-1Mmut-F	AATTTCACTCGAGGTCGACATAAGCTACACCATCAGGTTCAA
JAX1-1Mmut-R	TTTGAACCTGATGGTGTAGCTTATGTCGACCTCGAGTGAAATT
3×FLAG-temp	CAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGACTACA AGGACGACGATG
BamNco-3×FLAG-F	AAGGGATCCCATGGGACTACAAAGACCATGACGGTGATT
SpeStop-3×FLAG-R	TTTACTAGTTTACTTGTGCATCGTCGTCCTTGAGTCG

3.3 結果

3.3.1 植物細胞抽出液を用いたポテックスウイルスの翻訳および複製の再構成

ポテックスウイルスの複製に対する JAX1 の影響を *in vitro* で調べることを目的として、まず BYL を用いたポテックスウイルス翻訳／複製系の構築を試みた。系の構築に際しては、ポテックスウイルスのタイプ種である PVX を用いた。

PVX のゲノムから TGBp1-3 と CP を除去し、5'および3' UTR と RdRp をコードする ORF1 からなる変異体 PVX-53U-RdRp-WT を構築し、その *in vitro* 転写 RNA もしくは野生型 PVX の精製粒子 RNA を BYL に添加した。25°C、60 分の翻訳反応に供試し、ウエスタンブロット法により RdRp の翻訳の有無を解析した。その結果、いずれの PVX RNA を添加した場合も RdRp の蓄積が認められた (図 3.1A レーン 2、3)。

続いて翻訳反応液に[α -³²P]CTP およびその他のヌクレオチドを添加し、25°C、60 分の複製反応に供試した。RNA を抽出後、電気泳動およびオートラジオグラフィにより新生 RNA の有無を解析した。その結果、いずれの PVX RNA を添加した場合も、複製産物と考えられる特異的な 2 本のバンドが認められた (図 3.1A レーン 2、3)。

これらのバンドの性状を調べるため、抽出 RNA を 1 本鎖の核酸の特異的分解酵素である S1 ヌクレアーゼで処理した。その結果、2 本のバンドのうち上側のバンドは分解が認められたが、下側のバンドは分解が認められなかった (図 3.1B レーン 3-6)。このことは、上側のバンドは 1 本鎖の新生ウイルスゲノム RNA であるのに対し、下側のバンドは replicative form (RF) と呼ばれるウイルスゲノム RNA のプラス鎖とマイナス鎖から構成される 2 本鎖 RNA であることを示唆している。ポジティブコントロールとして、BYL 中で複製することが示されている tobacco mosaic virus (TMV) (Kawamura-Nagaya *et al.*, 2014) の精製粒子 RNA を用いたところ、新生ゲノム RNA および S1 ヌクレアーゼに抵抗性を示す RF の合成が認められた (図 3.1B レーン 7、8)。このことから、本実験で用いている BYL の品質に問題がないことが確かめられた。以

上より、BYL を用いた PVX の翻訳および複製の再構成系を確立した。

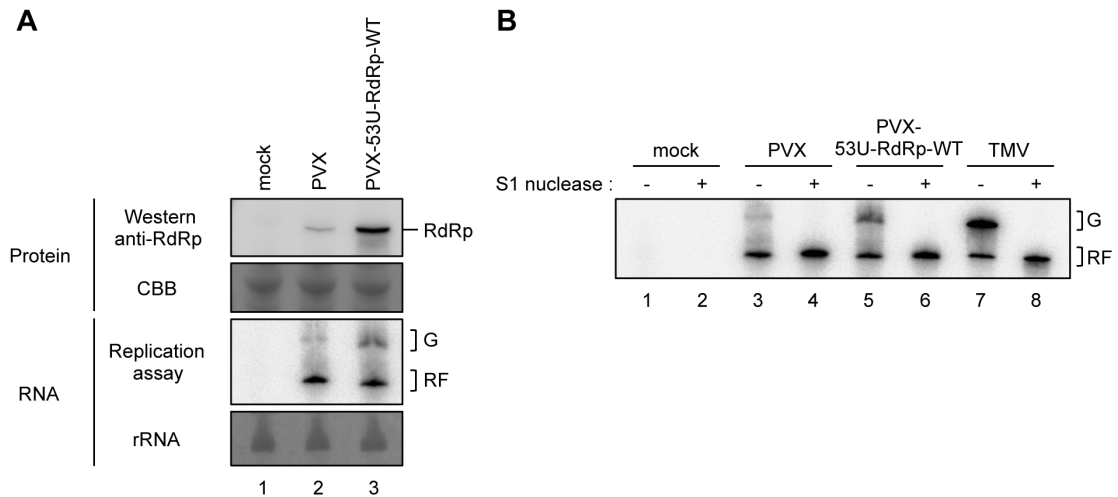


図 3.1 BYL を用いた PVX の *in vitro* 翻訳／複製の再構成

(A) PVX の翻訳および複製系の確立。蒸留水 (レーン 1)、100 ng の PVX 精製粒子 RNA (レーン 2)、1 μ g の *in vitro* 転写 PVX-53U-RdRp-WT RNA (レーン 3) を 25 μ L の BYL 反応液に添加し、翻訳および複製反応に供試した。RdRp の蓄積は抗 RdRp 抗体を用いたウエスタンブロット法により解析した。 32 P で標識された新生 RNA は電気泳動およびオートラジオグラフィにより検出した。Coomassie brilliant blue (CBB) 染色した BYL 内在性タンパク質およびメチレンブルー染色した ribosomal RNA (rRNA) はローディングコントロールとして示した。(B) ウイルスの *in vitro* 複製産物に対する S1 ヌクレアーゼ処理。蒸留水 (レーン 1、2)、100 ng の PVX 精製粒子 RNA (レーン 3、4)、1 μ g の *in vitro* 転写 PVX-53U-RdRp-WT RNA (レーン 5、6)、100 ng の TMV 精製粒子 RNA (レーン 7、8) を BYL 反応液に添加し複製反応に供試した。抽出 RNA (レーン 1、3、5、7) および抽出 RNA を S1 ヌクレアーゼで処理したもの (レーン 2、4、6、8) を電気泳動およびオートラジオグラフィに供試した。RdRp およびゲノム RNA (G)、RF RNA (RF) の位置を図の右に示した。

3.3.2 JAX1 は *in vitro* でポテックスウイルスの複製を阻害する

新たに確立した PVX の BYL 内翻訳／複製系を用いて、JAX1 の PVX に対する影響について解析を行った。JAX1 もしくはネガティブコントロールとして、ポテックスウイルスの増殖に影響を与えないことが示されている RTM1 (Yamaji *et al.*, 2012) の RNA を BYL に添加後翻訳反応に供試し、各タンパク質を合成させた (図 3.2A)。これらタンパク質の存在下で PVX 精製粒子 RNA および PVX-53U-RdRp-WT の *in vitro* 転写 RNA を BYL に添加し翻訳反応に供試した。ウエスタンブロット法により解析したところ、JAX1 および RTM1 のいずれの存在下においても、RdRp の蓄積は影響を受けなかった (図 3.2B レーン 2-7)。このことは、JAX1 および RTM1 は RdRp の翻訳には影響を与えないことを示している。続いて、これらの反応液を複製反応に供試したところ、JAX1 存在下において PVX 精製粒子 RNA および PVX-53U-RdRp-WT RNA の新生 RNA の合成は顕著に阻害された (図 3.2B レーン 3、6)。RTM1 存在下においては、新生 RNA 合成は影響を受けなかった (図 3.2B レーン 4、7)。これらの結果は、JAX1 は *in vitro* で RdRp の翻訳を阻害しないが PVX の複製を阻害することを示している。

続いて、JAX1 抵抗性打破変異を有する PVX-53U-RdRp の複製が JAX1 により影響を受けるか解析した。*in planta* において PVX に JAX1 抵抗性の打破を引き起こす 1092 番目の塩基 A の C への変異を PVX-53U-RdRp-WT に導入し、PVX-53U-RdRp-A1092C と名付けた。PVX-53U-RdRp-A1092C の *in vitro* 転写 RNA を、上記と同様に JAX1 および RTM1 存在下で *in vitro* 翻訳および複製反応に供試した。その結果、RdRp の翻訳は JAX1 および RTM1 のいずれの存在下でも影響を受けなかった (図 3.2B レーン 8-10)。また、JAX1 存在下における新生 RNA 合成活性は、ウイルス RNA 単独および RTM1 存在下の場合と同等だった (図 3.2B レーン 8-10)。このことから、PVX-53U-RdRp-A1092C は *in vitro* において JAX1 によるウイルス複製阻害を打破していることが明らかとなった。

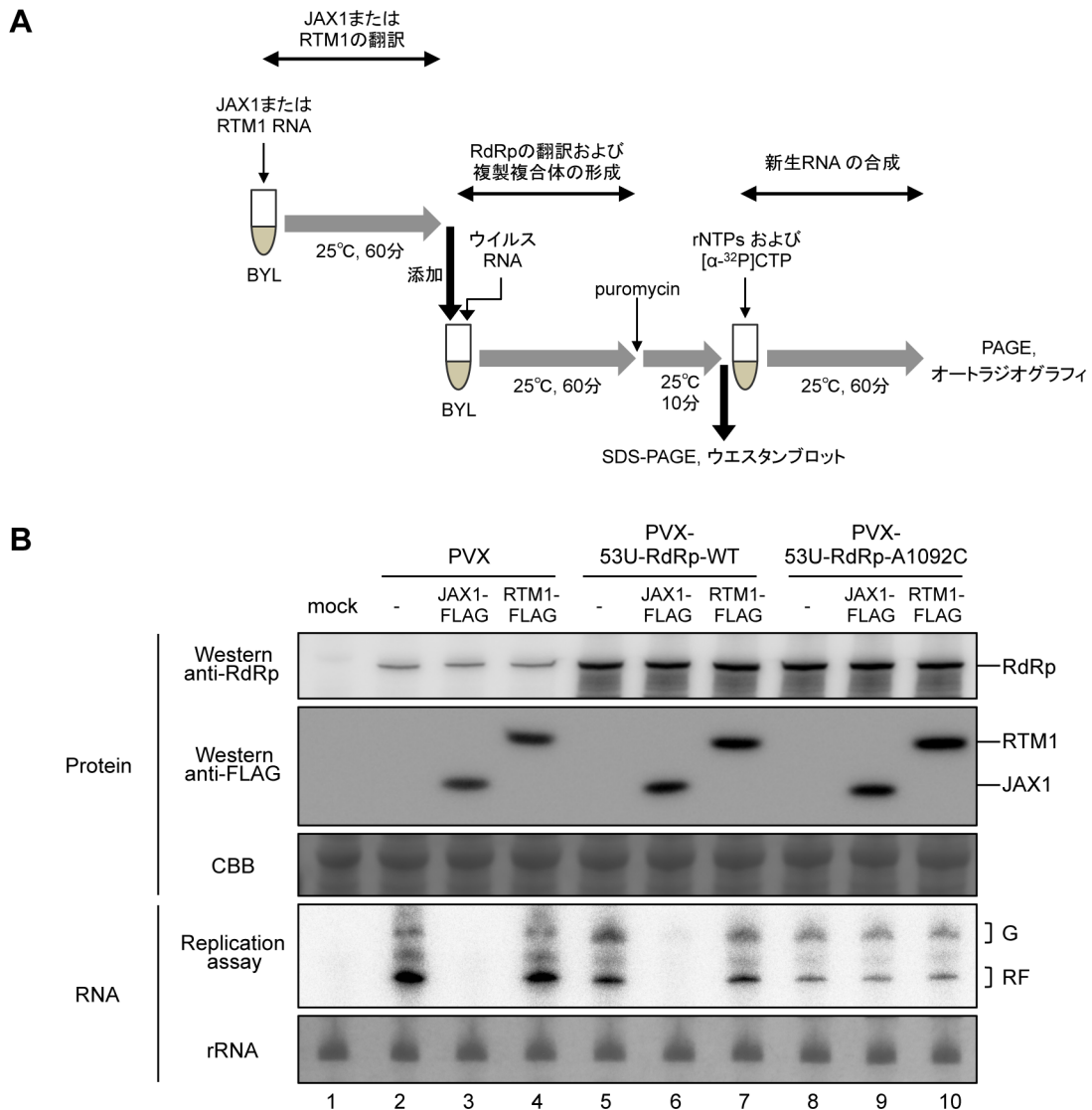


図 3.2 JAX1 が PVX の翻訳および複製に与える影響

(A) 実験系の概要。JAX1 または RTM1 の RNA を BYL 反応液に添加し、25°C で 60 分インキュベートした (JAX1 または RTM1 の翻訳)。この反応液を、ウイルス RNA を加えた BYL 反応液に添加し、25°C で 60 分インキュベートした (RdRp の翻訳および複製複合体の形成)。puromycin を添加し翻訳を停止させた後、rNTP および $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ を添加し、25°C で 60 分インキュベートした (新生 RNA の合成)。(B) JAX1 が PVX に与える影響。蒸留水 (レーン 1、2、5、8)、250 ng の FLAG タグの付加された JAX1 の RNA (レーン 3、6、9)、250 ng の FLAG タグの付加された RTM1 の RNA (レーン 4、7、10) を 5 μL の BYL 反応液に添加し翻訳反応に供試した。各反応液を、蒸留水 (レーン 1)、100 ng の PVX 精製粒子 RNA (レーン 2-4)、1 μg の PVX-53U-RdRp-WT の *in vitro* 転写 RNA (レーン 5-7)、1 μg の PVX-53U-RdRp-A1092C の *in vitro* 転写 RNA (レーン 8-10) を加えた 20 μL の BYL 反応液に添加し、翻訳および複製反応に供試した。RdRp と FLAG タグの付加された JAX1 および RTM1 の蓄積はそれぞれ抗 RdRp 抗体と抗 FLAG 抗体を用いたウエ

スタンプロット法により解析した。³²P で標識された新生 RNA は電気泳動およびオートラジオグラフィにより検出した。CBB 染色した BYL 内在性タンパク質およびメチレンブルー染色した rRNA をローディングコントロールとして示した。RdRp、JAX1、RTM1 およびゲノム RNA (G)、RF RNA (RF) の位置を図の右に示した。

3.3.3 ポテックスウイルス複製過程の初期に JAX1 を添加するほど効率良く複製が阻害される

3.3.2 の解析の結果、JAX1 は RdRp の翻訳に影響を与えることなく PVX の複製を阻害することが明らかとなった。一般にプラス鎖 RNA ウイルスの複製過程においては、翻訳された RdRp はウイルス RNA および宿主因子と複製複合体前駆体を形成する (Nagy, 2008; Mine and Okuno, 2012; Ishibashi and Ishikawa, 2016)。その後、この複合体が生体膜にターゲティング後複製複合体を形成し、新生ウイルス RNA が合成される。そこで、複製のいずれの過程において JAX1 が働くのかを明らかにするため、膜成分の除かれた BYL の画分である BYLS30 を用いた解析を行った。トバモウイルスの複製複合体前駆体は BYLS30 中で形成されることが示されている (Komoda *et al.*, 2007)。

まず BYLS30 反応液において FLAG タグの付加された JAX1 を翻訳した後、アフィニティ精製した。続いて PVX-53U-RdRp-WT RNA を BYLS30 反応液に添加し、25°C、60 分の翻訳反応に供試した (図 3.3A)。その際、翻訳開始後 0、15、30、45、60 分に精製 JAX1 またはコントロールとしてバッファを添加した。反応液に puromycin を加え翻訳を停止させた後、膜画分 BYLP30 を添加した。15°C、60 分の膜結合反応に供試し、BYLS30 で形成された複製複合体前駆体を生体膜にターゲティングさせ、複製複合体を形成させた。さらに [α - 32 P]CTP およびその他のヌクレオチドを添加し、25°C、60 分の複製反応に供試した。

その結果、いずれの時間でバッファを添加した場合も PVX 新生 RNA 合成活性はほとんど同じだった (図 3.3B レーン 7-11)。一方、JAX1 を翻訳開始後 0 分で加えた場合は、PVX 複製活性は顕著に低下した (図 3.3B レーン 2)。JAX1 を添加する時間が遅くなるほど PVX 複製活性は上昇し、翻訳開始後 60 分で JAX1 を添加した場合は、バッファ添加区と同等の複製活性を示した (図 3.3B レーン 3-6)。JAX1 およびバッファをいずれの時間で加えた場合も RdRp の蓄積量は同等だった (図 3.3B レーン 2-11)。

以上から、JAX1 を翻訳および複製複合体前駆体形成過程の初期に添加するほど複製

が強く阻害されることが示された。このことから、JAX1 が活性を有する複製複合体前駆体の形成を阻害していることが示唆された。

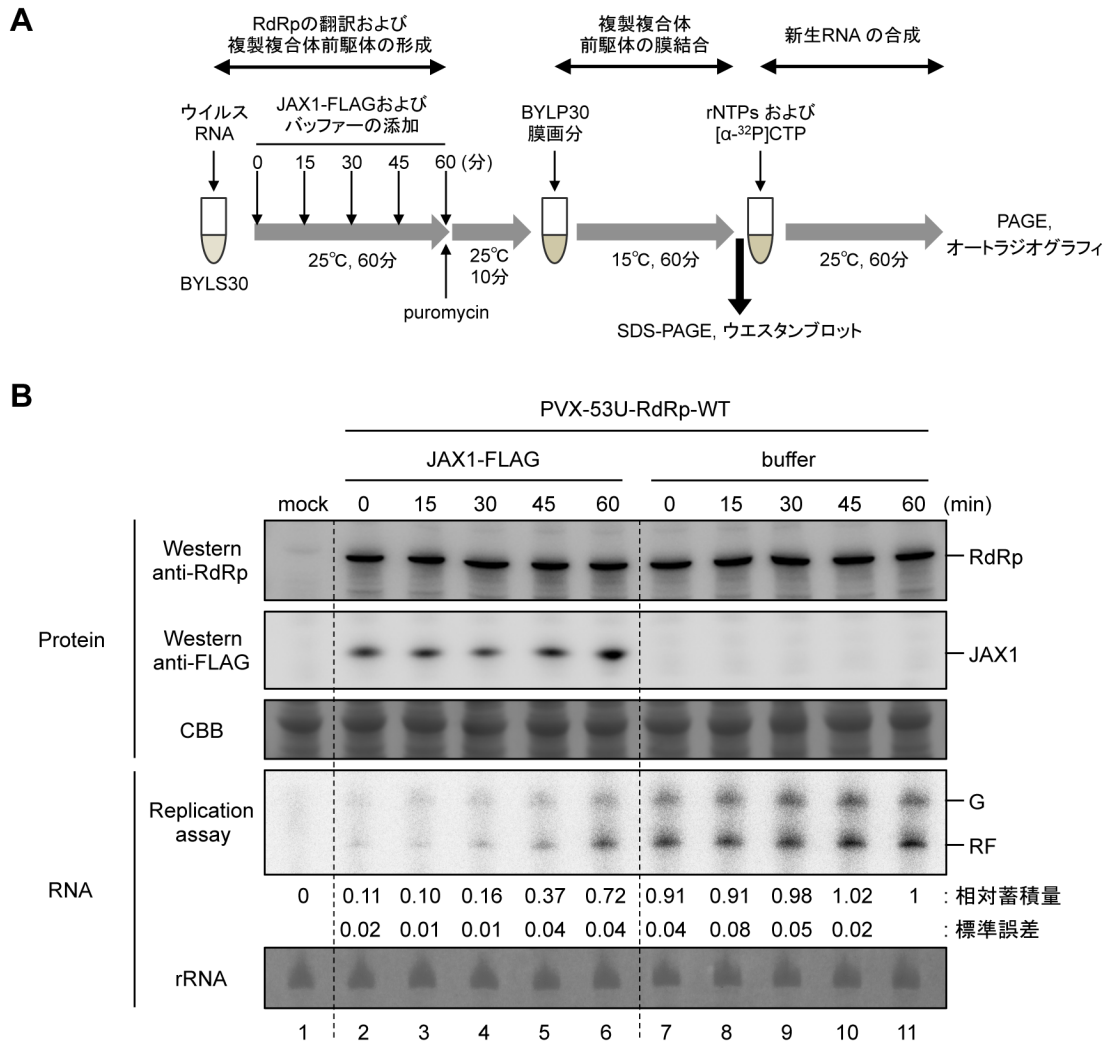


図 3.3 JAX1 によるウイルス複製阻害のタイムコース解析

(A) 実験系の概要。ウイルス RNA を BYLS30 反応液に添加し、25°C で 60 分インキュベートした (RdRp の翻訳および複製複合体前駆体の形成)。精製 JAX1-FLAG もしくはバッファをウイルス RNA 添加後 0、15、30、45、60 分で添加した。puromycin を添加し翻訳を停止させた後、BYLP30 画分を加え、15°C で 60 分インキュベートした (複製複合体前駆体の膜結合)。rNTP および $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ を添加し、25°C で 60 分インキュベートした (新生 RNA の合成)。(B) PVX 複製に対する JAX1 の影響。蒸留水 (レーン 1) もしくは 1 μg の PVX-53U-RdRp-WT の *in vitro* 転写 RNA (レーン 2-11) を加えた BYLS30 反応液を (A) の実験に供試した。RdRp および FLAG タグの付加された JAX1 の蓄積はそれぞれ抗 RdRp 抗体および抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンブロット法により解析した。 ^{32}P で標識された新生 RNA は電気泳動およびオートラジオグラフィにより検出した。新生ウイルス RNA の図の下の数字は、独立した 3 回の実験から算出された RF RNA のシグナル強度の相対蓄積量 (平均および標準誤差) を示す。CBB 染色した BYL 内在性タンパク質およびメチレンブルー染色した rRNA はローディングコントロールとして示した。RdRp、JAX1 およびゲノム RNA (G)、RF RNA (RF) の位置を図の右に示した。

3.3.4 ポテックスウイルスの高分子量複製酵素複合体の同定

上記の結果を受け、JAX1 がどのように活性を有する複製複合体前駆体の形成を阻害しているかの解析を試みた。それに先立ち、まずスクロース密度勾配遠心法による複製複合体前駆体の同定を試みた。BYLS30 反応液中で PVX-53U-RdRp-WT および PVX-53U-RdRp-A1092C の RNA を翻訳させ、複製複合体前駆体を形成させた後、スクロース密度勾配遠心に供試した (図 3.4A)。得られた 10 個の画分を SDS-PAGE および BN-PAGE により解析した。また、各画分に BYLP30 膜画分を加え 60 分インキュベートした後に複製反応に供試した。

PVX-53U-RdRp-WT を用いた場合、SDS-PAGE およびウエスタンブロット解析により、RdRp が画分 2-7 に検出された (図 3.4Bi)。一方 BN-PAGE 解析により、1,000 kDa 以上の RdRp 複合体が画分 4-7 に検出された。複製活性試験の結果、強い複製活性が画分 5、6 に検出され、弱い複製活性が画分 4、7 に検出された (図 3.4Bii)。従って、画分 4-7 に検出される高分子量 RdRp 複合体が複製活性に重要であることが示唆された。JAX1 抵抗性打破変異体 PVX-53U-RdRp-A1092C を用いた SDS-PAGE および BN-PAGE 解析を行った場合も、PVX-53U-RdRp-WT を用いた場合と同様の結果が得られた (図 3.4Ci)。PVX-53U-RdRp-A1092C を用いた複製活性試験の結果、PVX-53U-RdRp-WT よりは弱いものの画分 5、6 に複製活性が検出された (図 3.4Cii)。以上の結果から、高分子量 RdRp 複合体が複製複合体前駆体であることが示唆された。

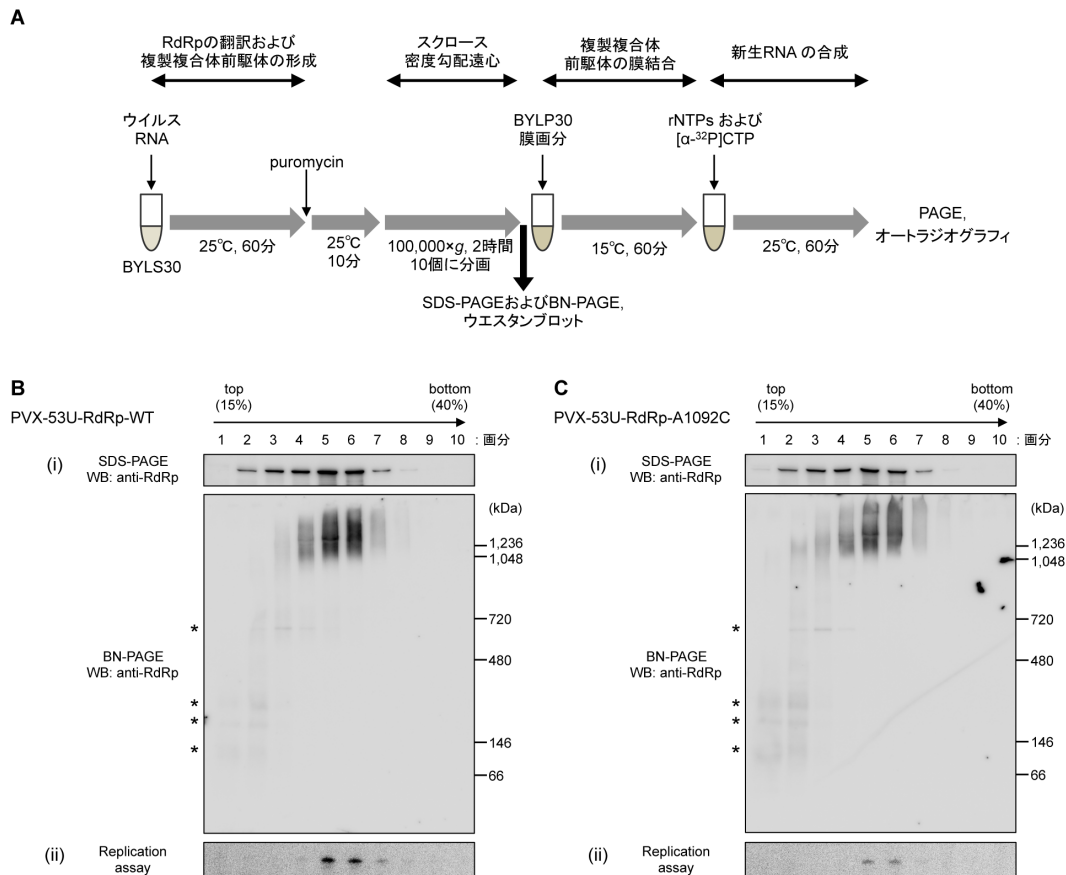


図 3.4 スクローズ密度勾配遠心を用いた PVX 複製複合体前駆体の検出

(A) 実験系の概要。ウイルス RNA を BYLS30 反応液に添加し、25°C で 60 分インキュベートした (RdRp の翻訳および複製複合体前駆体の形成)。puromycin を添加し翻訳を停止させた後、100,000×g、2 時間のスクローズ密度勾配遠心に供試し、10 個に分画した (スクローズ密度勾配遠心)。各画分に BYLP30 画分を加え、15°C で 60 分インキュベートした (複製複合体前駆体の膜結合)。rNTP および $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ を添加し、25°C で 60 分インキュベートした (新生 RNA の合成)。(B および C) PVX 複製複合体前駆体の検出。9 μg の PVX-53U-RdRp-WT (B) または PVX-53U-RdRp-A1092C (C) の RNA を 180 μL の BYLS30 反応液に添加し翻訳反応に供試した。4.5 μL の 10 mM puromycin を添加後、翻訳停止反応に供試し、15–40% スクローズ密度勾配遠心に供試した。(i) 10 個の画分を SDS-PAGE および BN-PAGE に供試し、抗 PVX RdRp 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。(ii) 各画分を複製活性試験に供試した。20 μL のサンプルを 5 μL の BYLP30、クレアチンリン酸 (終濃度 30 mM)、クレアチンキナーゼ (終濃度 0.2 mg/mL)、ATP (終濃度 0.75 mM) を含む膜画分反応液と混合し膜結合反応に供試した。20 μL のサンプルを複製反応に供試した後、抽出 RNA を S1 ヌクレアーゼ処理し、RF RNA を PAGE およびオートラジオグラフィにより検出した。分子量を図の右に示した。アスタリスクは非特異的なシグナルを示す。

3.3.5 JAX1 はポテックスウイルスの高分子量複製酵素複合体にターゲティングする

続いて高分子量 RdRp 複合体と JAX1 の関わりを解析した。ウイルス RNA の翻訳開始時に、JAX1 を翻訳させた BYLS30 反応液を加え、3.3.4 と同様の実験を行った (図 3.5A)。まず RdRp の分画パターンを SDS-PAGE および BN-PAGE により解析した。PVX-53U-RdRp-WT および PVX-53U-RdRp-A1092C のいずれを用いた場合も、JAX1 の有無に関わらず RdRp の分画パターンはほぼ同様であり、高分子量 RdRp 複合体が画分 4-7 に検出された (図 3.5Bi、Ci)。

また JAX1 の分画パターンを SDS-PAGE および BN-PAGE により解析した。PVX-53U-RdRp-WT を用いた場合、JAX1 は SDS-PAGE により主に画分 1-3 に検出されたが、少量が画分 4-6 に検出された (図 3.5Bii)。BN-PAGE により調べたところ、多量の JAX1 が画分 1-3 の 66 kDa 以下の位置に顕著に検出された。一方で画分 4-6 の高分子量 RdRp 複合体に相当する 1,000 kDa 以上の位置にも JAX1 が検出された。一方、PVX-53U-RdRp-A1092C を用いた場合、JAX1 は SDS-PAGE 解析により画分 1-3 に検出されたが、画分 5、6 には検出されなかった (図 3.5Cii)。BN-PAGE により調べたところ、JAX1 は画分 1-3 の 66 kDa 以下の位置に顕著に検出されたが、画分 4-6 の高分子量の位置には検出されなかった。

さらに各画分の複製活性について解析した。PVX-53U-RdRp-WT を用いた場合、画分 4-7 の複製活性は JAX1 により顕著に低下した (図 3.5Biii)。一方 PVX-53U-RdRp-A1092C を用いた場合は、画分 5、6 は複製活性を保っていた (図 3.5Ciii)。

以上より、JAX1 は PVX-53U-RdRp-WT の高分子量 RdRp 複合体にターゲティングするが、PVX-53U-RdRp-A1092C の当該複合体にはターゲティングしないことが示された。このことから、JAX1 は PVX の複製複合体前駆体にターゲティングし、当該複合体に何らかの影響を与えることで複製を阻害することが示唆された。

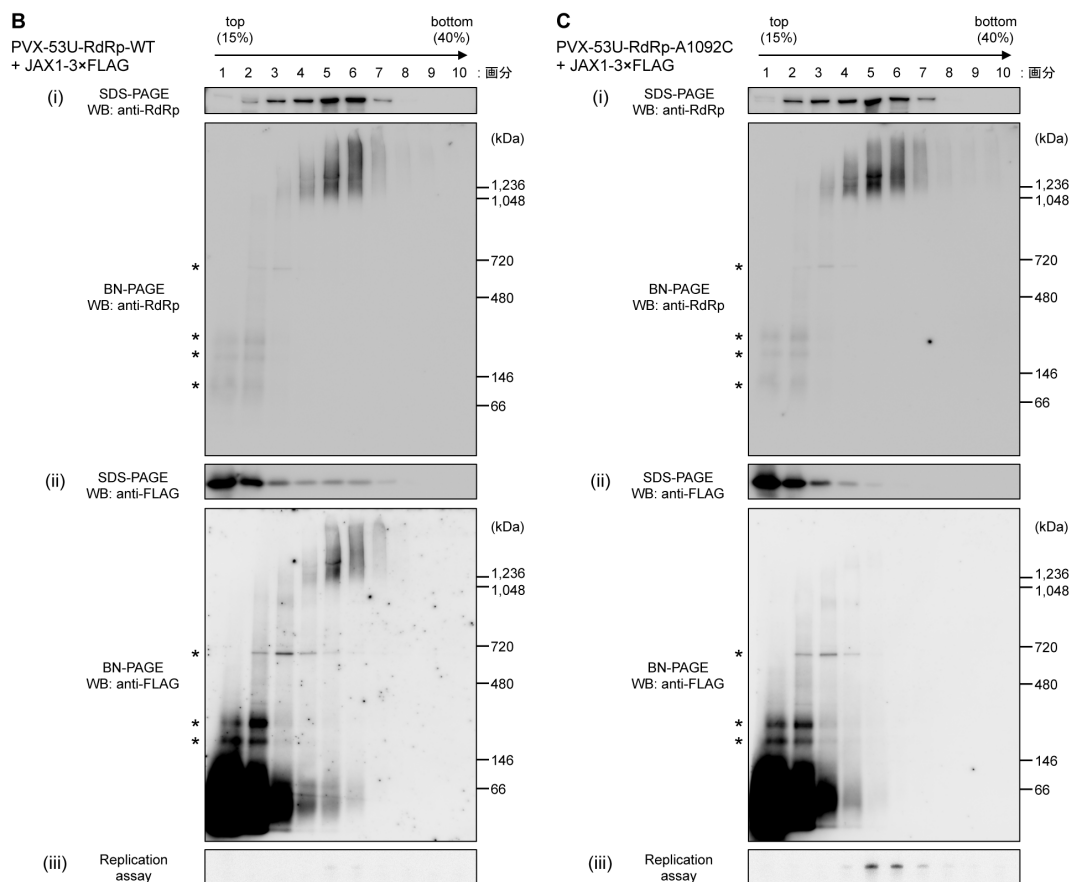
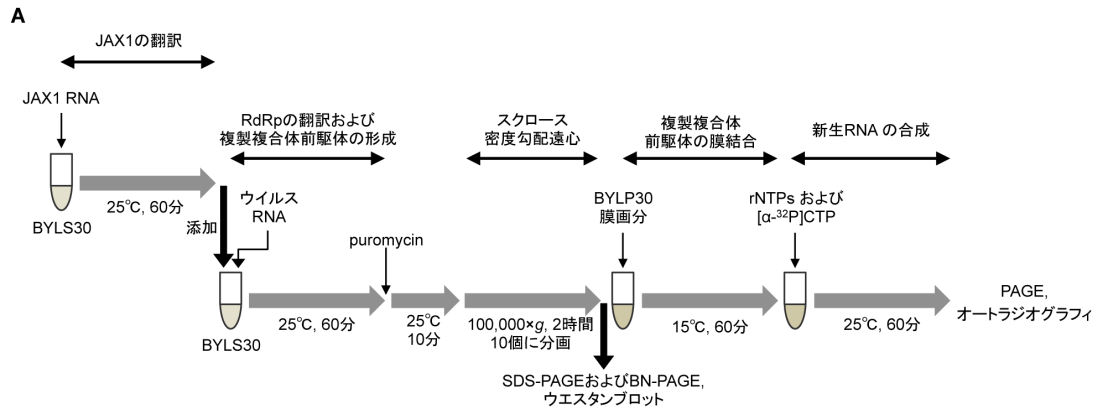


図 3.5 PVX 複製複合体前駆体への JAX1 のターゲティング

(A) 実験系の概要。JAX1 の RNA を BYLS30 反応液に添加し、25°C で 60 分インキュベートした (JAX1 の翻訳)。この反応液を、ウイルス RNA を加えた BYLS30 反応液に添加し、25°C で 60 分インキュベートした (RdRp の翻訳および複製複合体前駆体の形成)。puromycin を添加し翻訳を停止させた後、100,000×g、2 時間のスクロース密度勾配遠心に供試し、10 個に分画した (スクロース密度勾配遠心)。各画分に BYLP30 画分を加え、15°C で 60 分インキュベートした (複製複合体前駆体の膜結合)。rNTP および [α-³²P]CTP を添加し、25°C で 60 分インキュベートした (新生 RNA の合成)。(B および C) PVX 複製複合体前駆体および JAX1 の検出。2.25 μg

の 3×FLAG タグの付加された JAX1 の RNA を 45 μ L の BYLS30 反応液に添加し翻訳反応に供試した。この液を 9 μ g の PVX-53U-RdRp-WT (B) または PVX-53U-RdRp-A1092C (C) の RNA を添加した 135 μ L の BYLS30 反応液に添加し翻訳反応に供試した。4.5 μ L の 10 mM puromycin を添加後、翻訳停止反応に供試し、15–40% スクロース密度勾配遠心に供試した。(i および ii) 10 個の画分を SDS-PAGE および BN-PAGE に供試し、抗 PVX RdRp 抗体 (i) または抗 FLAG 抗体 (ii) を用いたウエスタンブロット解析を行った。(iii) 各画分を図 3.4Bii および Cii と同様の方法で複製活性試験に供試した。分子量を図の右に示した。アスタリスクは非特異的なシグナルを示す。

3.4 考察

本章では、JAX1 抵抗性の分子機構の解明を目的として、*in vitro* 系を用いた解析を行った。まず BYL を用いて PVX の翻訳と複製を *in vitro* で再構成し、JAX1 が *in vitro* で PVX の複製を阻害することを明らかにした。また、JAX1 を PVX の複製複合体前駆体形成の初期に加えるほど効率よく複製を阻害すること、JAX1 が複製複合体前駆体にターゲティングすることを明らかにした。

3.4.1 ポテックスウイルスの複製複合体前駆体

植物の培養細胞抽出液である BYL を用いることにより、*in vitro* で PVX の翻訳および複製を再構成した (図 3.1)。本実験系を用いることにより、ポテックスウイルスの翻訳および複製に関与する宿主因子やウイルスゲノム領域、RdRp 領域の特定や機能の解析などが可能であると考えられる。

また、PVX の RNA を翻訳させた BYLS30 において、高分子量 RdRp 複合体を検出した (図 3.4)。この複合体の存在した画分に膜画分を添加し複製反応に供試したところ PVX 複製活性が検出されたことから、この複合体がウイルス複製に重要であることが示唆された。Komoda らは、トバモウイルスの複製タンパク質が PMTC と呼ばれる複製複合体前駆体を形成すること、PMTC が生体膜にターゲティングし複製複合体を形成することを示している (Komoda *et al.*, 2007)。このトバモウイルスの複製モデルがポテックスウイルスにも当てはまるとすれば、PVX の高分子量 RdRp 複合体はトバモウイルスにおける PMTC に相当するものと考えられる。すなわち高分子量 RdRp 複合体は複製複合体前駆体であり、生体膜にターゲティング後、複製複合体を形成し新生ウイルス RNA を合成するものと考えられる (図 3.6)。

本研究では、PVX が形成する複製複合体前駆体が 1,000 kDa 以上の巨大なタンパク質複合体であることを明らかにした (図 3.4)。一方、ポテックスウイルスとは遠縁なダイ

アンソウイルス属ウイルスである red clover necrotic mosaic virus (RCNMV) が小胞体膜上で形成する複製複合体は約 480 kDa であることが知られている (Mine *et al.*, 2010)。この複合体は PVX 複製複合体前駆体より分子量が小さいが、このような複合体の分子量の違いの一因は、ウイルス間の複製タンパク質の分子量の違いにある可能性が考えられる。すなわち RCNMV の複製タンパク質は 27 kDa および 88 kDa であり、約 166 kDa の PVX の RdRp より分子量が小さいことが一因である可能性がある。さらに、複合体中に含まれる宿主のタンパク質やその他の因子の構成の差異が原因である可能性も考えられる。トンプスウイルス、ブロモウイルス、ダイアンソウイルスなどについては、複製複合体中に含まれる多数の宿主因子が同定されており、その一部の機能が明らかにされている (Nagy, 2008; Mine *et al.*, 2010; Mine *et al.*, 2012)。ポテックスウイルスの複製複合体前駆体に含まれる宿主因子の種類や機能などについては不明であり、興味を持たれる。また、生体膜上に形成されると考えられる複製複合体の分子量やそこに含まれる宿主因子の種類や機能などについても興味を持たれる。これらを明らかにし、他のウイルスとの間の共通点および相違点を明らかにすることが今後の研究課題の一つと考えられる。

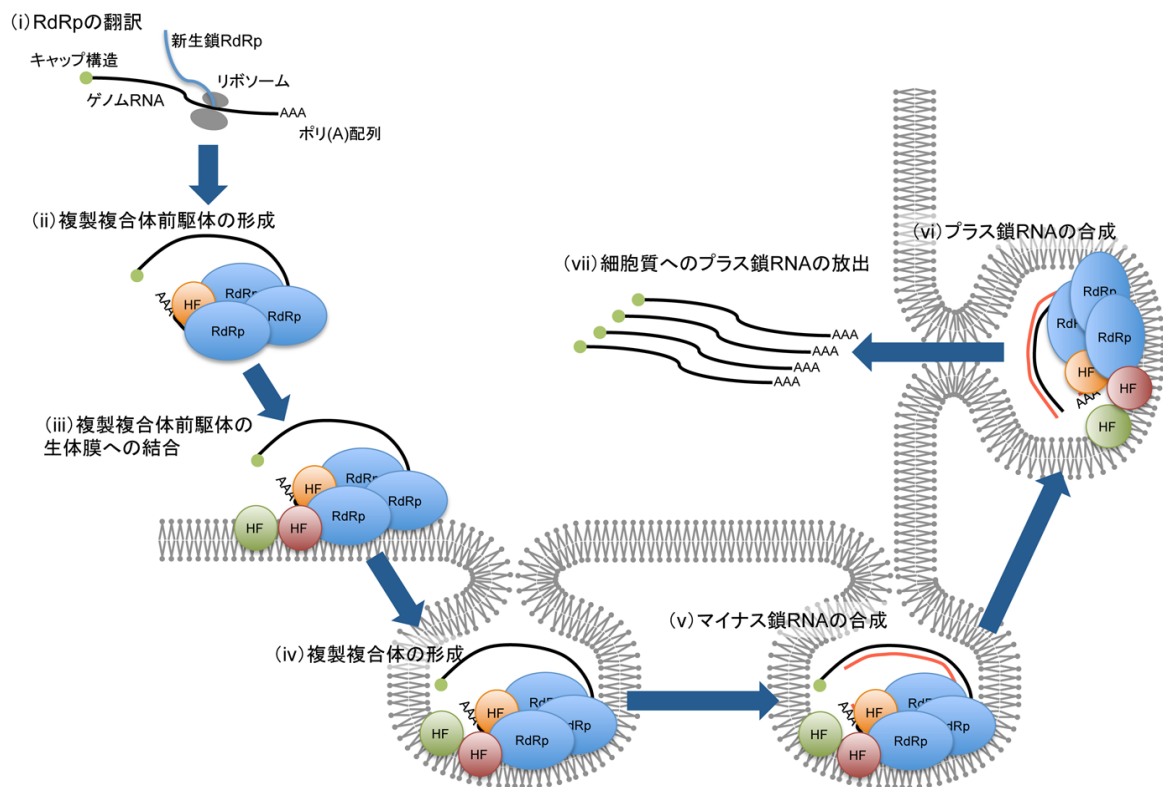


図 3.6 PVX の予想複製モデル

(i) 細胞質においてウイルスゲノム RNA から RdRp が翻訳される。(ii) 翻訳された RdRp は、ウイルスゲノム RNA と高分子量の複製複合体前駆体を形成する。複製複合体前駆体には何らかの宿主因子 (HF) が含まれる可能性がある。(iii) 複製複合体前駆体は生体膜に結合する。(iv) 生体膜に結合した複製複合体前駆体は複製複合体を形成する。複製複合体には何らかの宿主因子が含まれる可能性がある。(v) 複製複合体中で、ゲノム RNA を鋳型としてマイナス鎖 RNA (赤線) が新規に合成される。(vi) マイナス鎖 RNA からプラス鎖 RNA (黒線) が新規に合成される。(vii) プラス鎖 RNA は細胞質に放出される。

3.4.2 JAX1 がポテックスウイルスの複製に与える影響

本章では JAX1 が PVX 増殖を阻害する分子機構を *in vitro* で解析することを試みた。JAX1 は PVX の新生 RNA 合成を阻害したが、RdRp の蓄積に影響を与えなかった (図 3.2)。このことは、JAX1 によるウイルス複製阻害は RdRp の翻訳阻害により引き起こ

されるのではないことを意味している。また「RdRp の翻訳および複製複合体前駆体の形成」(図 3.3A) の過程の初期に JAX1 を添加するほど効率よく複製が阻害された (図 3.3B)。RdRp の翻訳が JAX1 により影響を受けていないことを考えると、図 3.3 の結果は JAX1 が正常な複製複合体前駆体の形成を阻害していることを示唆する。

JAX1 は野生型 PVX の複製複合体前駆体にターゲティングしたが、抵抗性打破 PVX 変異体の複製複合体前駆体にはターゲティングしなかった(図 3.5)。第 2 章の結果より、JAX1 は 2 種のポテックスウイルスの野生型 RdRp と相互作用した一方で、抵抗性打破に関与するアミノ酸残基に変異を有する RdRp とは相互作用しなかった (図 2.3)。このことから、JAX1 は RdRp との相互作用を介して複製複合体前駆体にターゲティングしている可能性が考えられる。一方、上層の画分 (画分 1-3) に含まれる JAX1 の量に比べ、PVX の複製複合体前駆体 (画分 4-6) に検出される JAX1 の量は顕著に少なかった (図 3.5)。このため、ウイルス複製阻害に重要な JAX1 の量はごく僅かである可能性が考えられる。添加した JAX1 のうちの少量が効率よく働くことによりウイルス複製を阻害しているのかもしれない。

複製複合体前駆体の分画パターンは、JAX1 の有無により大きな変化がなかったが(図 3.4、3.5)、JAX1 は当該複合体のコンフォメーションや修飾の変化を引き起こすか、複製に重要な宿主因子のリクルートもしくは機能に影響を与えることで当該複合体の機能を阻害している可能性が考えられる。JAX1 が複製複合体前駆体にどのような影響を与えているのかについては今後の研究課題であると考えられる。複製複合体前駆体の性状を JAX1 の存在下および非存在下で詳細に比較することにより、JAX1 がウイルス複製に与える影響を完全に解明できる可能性がある。

3.4.3 JAX1 抵抗性打破 PVX 変異体の複製活性

先行研究により、JAX1 抵抗性打破 PVX 変異体 PVX-A1092C の *N. benthamiana* の接

種葉における蓄積量は野生型 PVX と同等であることが示されている (Sugawara *et al.*, 2013)。一方本研究では、JAX1 抵抗性打破変異を有する PVX レプリコン PVX-53U-RdRp-A1092C の BYL における新生 RNA 合成活性は、野生型 PVX レプリコン PVX-53U-RdRp-WT よりも低かった (図 3.2)。このような違いは両実験の条件の違いに起因する可能性が考えられる。本研究では細胞抽出液 BYL を用いているのに対し、先行研究では植物体を用いている。BYL を用いた解析は、植物体を用いた解析に比べウイルス間の蓄積量の違いをより厳密に評価できるため、微妙な複製活性の違いを検出できたのかもしれない。

またこれまでの研究により、PVX の JAX1 抵抗性打破を引き起こすアミノ酸変異に相当する変異を導入した PIAMV 変異体 PIAMV-G1046C は、植物体への全身感染能を失うことが明らかとなっている (Sugawara *et al.*, 2013)。PIAMV-G1046C が JAX1 抵抗性を打破するかは不明であるものの、当該変異が PIAMV の適応度を低下させることが示唆される。今回 PVX-53U-RdRp に JAX1 抵抗性打破変異を導入したところ複製活性が低下したことから、PVX において JAX1 抵抗性の打破と複製活性の維持がトレードオフの関係にあることが示唆される。他のウイルスにおいても、植物の抵抗性打破変異ウイルス株は適応度が低下する例が複数知られている (Kobayashi *et al.*, 2014)。JAX1 とポテックスウイルスの関係においても同様の現象が生じていることが考えられる。

第4章 総合考察

4.1 JAX1の標的因子および作用機構

本研究では、ジャカリンレクチンをコードする non-NLR 型抵抗性遺伝子 *JAX1* の作用機構について解析を行った。第2章では、*N. bethamiana* の展開葉を用いた *in planta* の実験を行い、*JAX1* 抵抗性の標的ウイルス因子について解析した。その結果、*JAX1* 抵抗性の発現にはポテックスウイルスの TGBp1-3 および CP は不要であることが明らかとなった。また、*JAX1* はポテックスウイルスの野生型 RdRp とは相互作用する一方で、抵抗性打破に關与するアミノ酸変異を有する RdRp とは相互作用しないことが明らかとなった。以上から、*JAX1* の標的ウイルス因子が RdRp であること、*JAX1* はウイルスの複製以前の感染過程を阻害することが示唆された。第3章では、BYL を用いた *in vitro* の実験を行い、*JAX1* がポテックスウイルスの増殖を阻害する機構についてより詳細に解析した。その結果、*JAX1* は PVX の RdRp の翻訳を阻害しないが複製を阻害することが明らかとなった。また、*JAX1* は PVX の複製複合体前駆体形成以前の段階で働くことが明らかとなった。さらに、*JAX1* は野生型 PVX の複製複合体前駆体にはターゲティングするが、抵抗性打破 PVX の当該複合体にはターゲティングしないことが明らかとなった。以上から、*JAX1* はポテックスウイルスの RdRp を標的とし、PVX 複製を阻害することで抵抗性を発揮することが明らかとなった。

JAX1 はウイルス抵抗性タンパク質として典型的な NLR 型のタンパク質ではないことから、その分子機能に興味を持たれていた。今回、*JAX1* はウイルスの複製複合体前駆体にターゲティングし複製を阻害するという機構により抵抗性を発揮することが明らかとなり、non-NLR 型抵抗性タンパク質によるウイルス抵抗性メカニズムの多様性の一端が明らかとなった。non-NLR 型抵抗性タンパク質のなかには、未だ機能が明らかになっていないものも含まれており、それらの機能に興味を持たれる。

4.2 JAX1 と Tm-1 の比較

non-NLR 型抵抗性タンパク質として最も研究の進んでいる Tm-1 は、JAX1 と同様にウイルス複製タンパク質を標的とし、複製を阻害することで抵抗性を発揮する因子である (Ishibashi *et al.*, 2007)。Tm-1 は ToMV の複製タンパク質のヘリカーゼドメインに結合すること (Ishibashi *et al.*, 2014)、ToMV 複製タンパク質と宿主生体膜上のタンパク質との結合や複製鋳型 RNA のヌクレアーゼからの保護などを阻害し、正常な複製複合体の形成を阻害することが示されている (Ishibashi and Ishikawa, 2013)。また Tm-1 を ToMV の複製複合体形成より後に添加すると複製が阻害されないが、複製複合体形成より前に添加すると複製が阻害されることが示されている (Ishibashi *et al.*, 2007)。

本研究で、PVX 複製複合体前駆体の形成後に JAX1 を添加してもウイルス複製活性は大きな影響を受けないことを明らかにした (図 3.3B レーン 6)。一方、Tm-1 は ToMV の複製複合体前駆体形成後に加えても複製を阻害することが示されていることから (Ishibashi *et al.*, 2007)、Tm-1 と JAX1 は異なる機能を有することが示唆される。JAX1 は Tm-1 の作用点よりも早い段階のウイルス複製過程に作用している可能性が考えられる。JAX1 は、PVX の複製複合体前駆体にターゲティングしたことから、この複合体に何らかの変化をもたらすことにより複製活性を阻害している可能性がある。

4.3 JAX1 と RTM1 の比較

これまでに non-NLR 型ウイルス抵抗性遺伝子である *RTM1* も *JAX1* と同様にジャカリンレクチンをコードしており、ポティウイルスに対する抵抗性に関与することが示されている (Chisholm *et al.*, 2000)。当該抵抗性については、*RTM1* 以外にも複数の遺伝子が関与すること (Whitham *et al.*, 2000; Cosson *et al.*, 2010; Cosson *et al.*, 2012)、ポティウイルスの長距離移行を阻害すること (Mahajan *et al.*, 1998) などが示されているが、抵抗

性の分子機構は不明である。また、ポティウイルスの一種である PPV は外被タンパク質 (CP) の変異により RTM 抵抗性を打破することが示されている (Decroocq *et al.*, 2009)。

本研究により、JAX1 はポテックスウイルスの RdRp を標的とし複製を阻害すること、JAX1 抵抗性打破ウイルス株の RdRp とは結合しないことが示された。このことから、RTM 抵抗性は長距離移行を阻害するために CP を標的としていること、また抵抗性打破ウイルス株の CP を標的としない可能性が考えられる。その一方で、yeast two hybrid 法を用いた解析により PPV の CP と RTM1、RTM2、RTM3 とは直接的な相互作用を示さないことが明らかとなっていることから (Cosson *et al.*, 2010)、RTM1 は CP を直接の標的としているのではなく、CP を含むタンパク質複合体を標的としているのかもしれない。JAX1 と RTM1 との間で異なるウイルス因子を標的としていることが、ウイルスの複製阻害と長距離移行阻害という両抵抗性の表現型の差異の一因となっているのかもしれない。

4.4 JAX1 の作物における利用の可能性

一部の例外はあるものの (Maekawa *et al.*, 2012; Narusaka *et al.*, 2013)、ある植物の NLR 型抵抗性遺伝子を別の遠縁な植物で働かせる試みは一般に困難であることが知られている (Mukhtar, 2013; Moffett, 2017)。遠縁な植物の NLR 型遺伝子を導入すると、autoimmunity と呼ばれる過剰な免疫応答が誘導されたり、逆に免疫応答が認められなかったりする例が報告されている。このような現象が生じる理由の詳細は不明であるものの、抵抗性発現に必要な因子が植物間で保存されていないことが一因と考えられている (Moffett, 2017)。

一方先行研究では、アブラナ科植物のシロイヌナズナの遺伝子である *JAX1* を遠縁なナス科植物の *N. benthamiana* に導入しても、問題なくポテックスウイルスに抵抗性を発揮することが明らかとなっている (Yamaji *et al.*, 2012)。このような遠縁な植物への *JAX1*

の導入が成功した要因の一部は、JAX1 の作用機構によって説明できるかもしれない。JAX1 は核を持たない細胞抽出液である BYL で PVX の増殖を阻害したことから、抵抗性発現には核を介した遺伝子発現制御が必要ないと考えられる。また JAX1 は RdRp にターゲティングし直接的に複製を阻害した。従って、抵抗性発現に下流で働く様々な因子を必要とする NLR 型タンパク質に比べ、JAX1 は抵抗性発現のために必要とするその他の因子が少ない、あるいは存在しないために、シロイヌナズナとは遠縁な植物でも抵抗性を発揮した可能性が考えられる。このことから、*N. benthamiana* 以外の様々な植物に導入しても JAX1 は機能を発揮する可能性が考えられる。ポテックスウイルスは様々な科の植物に感染し病害を引き起こすことが知られている。加えて、JAX1 は広範囲のポテックスウイルス種に抵抗性を発揮する (Yamaji *et al.*, 2012)。以上から、JAX1 を様々な植物に導入することにより、ポテックスウイルスによる多様な病害に対する有用な防除法を構築できる可能性がある。これを検証するためには、実用植物に JAX1 を導入し、ウイルス抵抗性を評価することが肝要と考えられる。

摘要

植物ウイルスは植物病害を引き起こす病原体の一つであり、植物ウイルスによる作物生産の損失は糸状菌に次いで大きい。植物ウイルス病が一度発生すると、昆虫、土壌、種子等を介して急速に感染域を拡大させ、特定の作物生産に甚大な被害を及ぼすことがあるため、安定的な作物生産のためには植物ウイルス病の防除が重要である。一方で、糸状菌や細菌とは異なり、ウイルスは独自の代謝系を持たず宿主因子に大きく依存して増殖することから、ウイルスのみを標的とする化学農薬の開発が困難である。このように一般的に植物ウイルスの防除は困難であるものの、抵抗性品種を利用したウイルス防除は環境負荷も小さく、高い防除効果を発揮する場合が多い。そのため、植物がもつウイルス抵抗性メカニズムを研究する意義は大きい。

植物が病原体に対して示す抵抗性のうち、抵抗性品種に最も多く利用され研究も行われているのが真正抵抗性であり、真正抵抗性を司る抵抗性遺伝子は **nucleotide-binding leucine-rich repeat (NLR)** 型タンパク質をコードする。植物ウイルスに対する抵抗性反応において、NLR 型タンパク質はウイルスに対する受容体として働き、下流にシグナルを伝達し防御応答を誘導することが明らかとなっている。一方、NLR 型遺伝子以外の抵抗性遺伝子 (**non-NLR 型抵抗性遺伝子**) が近年複数単離されており、真正抵抗性とは異なる性質を示すことが明らかになりつつある。**non-NLR 型抵抗性遺伝子** は多様な種類のタンパク質をコードしており、それぞれ異なる機能を有すると考えられているが、それらによる抵抗性メカニズムは十分に解明されていない。

これまでに、植物プラス鎖 RNA ウイルスであるポテックスウイルス属ウイルスに対する **non-NLR 型抵抗性遺伝子 *jacalin-type lectin required for potexvirus resistance 1 (JAX1)*** がシロイヌナズナより同定されている。**JAX1** は単一のジャカリンレクチンドメインを有するタンパク質をコードしており、**potato virus X (PVX)** や **plantago asiatica mosaic virus (PIAMV)** などのポテックスウイルスに広く抵抗性を発揮する。**JAX1** は細胞レベルでウイルスの増殖を抑制し、複製酵素 (**RNA-dependent RNA polymerase; RdRp**) 中の 1 ア

ミノ酸置換により PVX は JAX1 抵抗性を打破することから、JAX1 抵抗性にはウイルスの RdRp が関与することが示唆されている。しかし、JAX1 がウイルス抵抗性を発揮する分子機構の詳細は不明である。そこで本研究では、JAX1 抵抗性の分子機構の解明を試みた。

1. JAX1 抵抗性の標的となるウイルス因子の解析

まず、JAX1 が標的とするウイルス因子の同定を試みた。ポテックスウイルスのコードするタンパク質のうち、移行タンパク質 (triple gene block protein 1, 2, 3; TGBp1, 2, 3) および外被タンパク質 (coat protein; CP) は細胞間移行に必要であることが知られている。green fluorescent protein (GFP) を発現する PIAMV 感染性クローンのこれらの遺伝子をそれぞれ欠損した変異体を作製し、JAX1 とともに *Nicotiana benthamiana* の展開葉においてアグロインフィルトレーション法により接種し、GFP 蛍光を観察した。その結果、JAX1 発現区ではいずれの変異体でも GFP 蛍光が低下し、ウイルス抵抗性が引き起こされた。このことから、JAX1 抵抗性発現にはこれらのウイルス因子が必須でないことが示唆された。続いて、PIAMV 感染性クローンから TGBp1, 2, 3 および CP が除去され RdRp のみをコードするレプリコン PIAMV-53U-RdRp を、JAX1 とともに *N. benthamiana* の展開葉においてアグロインフィルトレーション法により導入した。リアルタイム PCR 法によりウイルス蓄積量を解析した結果、JAX1 発現区ではウイルス蓄積量が有意に低下した。このことから、JAX1 による抵抗性は RdRp のみをコードするレプリコンに対しても発揮されることが明らかとなり、JAX1 はウイルスの複製以前の過程を阻害することが示された。

以上の結果から、JAX1 は RdRp を標的とする可能性が考えられたため、JAX1 と RdRp の相互作用を解析した。PVX および PIAMV の RdRp を JAX1 とともに *N. benthamiana* の展開葉においてアグロインフィルトレーション法により導入し、共免疫沈降法を用いて相互作用を解析した。その結果、PVX および PIAMV のいずれにおいても野生型 RdRp

は JAX1 と相互作用したが、JAX1 抵抗性打破に關与するアミノ酸変異を導入した RdRp 変異体は JAX1 と相互作用しなかった。以上の結果から、JAX1 は RdRp を標的としており、RdRp の機能を阻害することで抵抗性を發揮する可能性が示唆された。

2. ポテックスウイルスに対する JAX1 抵抗性の分子機構の解析

JAX1 がポテックスウイルスの増殖を阻害するメカニズムを詳細に解析するため、まず *in vitro* におけるポテックスウイルス複製系を確立した。複数のウイルスにおいて *in vitro* 複製系が確立されている脱液胞化タバコ BY-2 プロトプラスト抽出液 (BYL) 中での PVX の複製を解析した。BYL に PVX の RNA および翻訳や複製の基質を添加しインキュベートしたところ、RdRp の翻訳および PVX の新生 RNA の合成が認められ、BYL を用いた PVX の *in vitro* 複製系の確立に成功した。続いて、この系を用いて JAX1 の PVX に対する影響について解析した。野生型 PVX、PVX の RdRp のみをコードするレプリコン PVX-53U-RdRp-WT および JAX1 抵抗性を打破する変異体レプリコン PVX-53U-RdRp-A1092C の RNA を JAX1 とともに BYL 中で翻訳・複製反応に供試した。その結果、JAX1 存在下において、野生型 PVX および PVX-53U-RdRp-WT の複製は顕著に阻害されたが、PVX-53U-RdRp-A1092C の複製は影響を受けなかった。また、いずれの RdRp の翻訳も阻害されなかった。以上の結果から、JAX1 は PVX の RdRp の翻訳に影響せず、複製を阻害することが明らかとなった。

続いて、超遠心処理により生体膜を除いた BYL 画分 (BYLS30) を用いて、JAX1 がウイルス複製のいずれの過程で作用しているのかを解析した。植物プラス鎖 RNA ウイルスの複製の過程を詳細に区別すると、細胞質における RdRp の翻訳、RdRp およびウイルス RNA を含む複製複合体前駆体の形成、複製複合体前駆体の生体膜への結合、生体膜上での複製複合体の形成、複製複合体での新生 RNA 合成などに分けられる。BYLS30 においては、RdRp の翻訳および複製複合体前駆体の形成が生じると考えられる。そこで BYLS30 に PVX-53U-RdRp-WT の RNA を添加し、一定時間ごとに JAX1 を

添加後、膜画分を添加し複製活性を調べたところ、早期に JAX1 を添加するほど効率よく複製が阻害された。このことから、JAX1 は活性を有する複製複合体前駆体の形成を阻害する可能性が高いと考えられた。

そこで、PVX の複製複合体前駆体の検出および JAX1 の当該複合体への影響の解析を試みた。野生型レプリコン PVX-53U-RdRp-WT および変異体レプリコン PVX-53U-RdRp-A1092C の RNA を BYLS30 中でインキュベートし、複製複合体前駆体を形成させた後に、それらをスクロース密度勾配遠心により分画し、各画分を blue native-PAGE およびウエスタンブロット解析に供試した。また各画分に膜画分を添加後、複製活性試験に供試した。その結果、いずれの RNA を用いた場合も、複数の画分に RdRp を含み 1,000 kDa を超える高分子量複合体が検出され、これらの画分に複製活性が検出された。このことから、当該複合体が PVX 複製複合体前駆体であると考えられた。JAX1 存在下で同様の解析を行ったところ、PVX-53U-RdRp-WT の高分子量 RdRp 複合体に JAX1 が検出され、この複合体を含む画分の複製活性は顕著に低下した。一方、PVX-53U-RdRp-A1092C の当該複合体には JAX1 は検出されず、この複合体を含む画分は複製活性を保っていた。これらの結果から、JAX1 は PVX の複製複合体前駆体にターゲティングし、当該複合体に何らかの影響を与えることで複製を阻害することが示唆された。

本研究により、JAX1 がポテックスウイルスの RdRp を標的とすること、複製複合体前駆体にターゲティングし複製を阻害することにより抵抗性を発揮することが示された。これは今までに報告されていない新たなウイルス抵抗性メカニズムである。本研究の成果はウイルスに対する抵抗性機構の解明に学術面から寄与するとともに実用的にも将来的なウイルス病耐性戦略の構築に貢献しうると考えられる。

謝辞

本研究の遂行に当たり、指導教員の東京大学大学院 農学生命科学研究科 難波成任名誉教授ならびに山次康幸准教授には、研究環境および研究課題を与えて頂いたのみならず、終始親身なご指導を賜りました。衷心より感謝申し上げます。同研究科 前島健作助教、酪農学園大学 農食環境学群 薦田優香講師、東京農工大学大学院 農学研究院 小松健准教授には、日々丁寧かつ有益なご助言、ご指導を頂きました。厚く御礼申し上げます。

また、University of Cambridge, Department of Plant Sciences の David Charles Baulcombe 教授にはベクター pCXI、pCXV、pL61 を分譲頂きました。農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門 石川雅之ユニット長ならびに石橋和大主任研究員には *in vitro* ウイルス翻訳／複製系の構築に当たり多大なご支援を頂きました。心より感謝申し上げます。

さらに、種々のお力添えを頂いた東京大学大学院 農学生命科学研究科 植物病理学研究室ならびに植物医科学研究室の博士研究員、学生、技術補佐員の皆様に深く謝意を表します。最後に、常に研究生活を支えてくれた家族に感謝の意を表します。

引用文献

Adams MJ, Candresse T, Hammond J, Kreuze JF, Martelli GP, Namba S, Pearson MN, Ryu KH, Vaira AM (2012) Family *Alphaflexiviridae*. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (eds) *Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier/Academic Press, London, pp 904–919.

Bastet A, Robaglia C, Gallois JL (2017) eIF4E resistance: natural variation should guide gene editing. *Trends Plant Sci* 22:411–419.

Bhattacharjee S, Garner CM, Gassmann W (2013) New clues in the nucleus: transcriptional reprogramming in effector-triggered immunity. *Front Plant Sci* 4:364.

Butterbach P, Verlaan MG, Dulleman A, Lohuis D, Visser RGF, Bai Y, Kormelink R (2014) Tomato yellow leaf curl virus resistance by *Ty-1* involves increased cytosine methylation of viral genomes and is compromised by cucumber mosaic virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:12942–12947.

Chisholm ST, Mahajan SK, Whitham SA, Yamamoto ML, Carrington JC (2000) Cloning of the *Arabidopsis RTM1* gene, which controls restriction of long-distance movement of tobacco etch virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:489–494.

Conijn CGM (2014) Developments in the control of lily diseases. *Acta Hort* 1027:213–229.

Cosson P, Schurdi-Levraud V, Le QH, Sicard O, Caballero M, Roux F, Le Gall O, Candresse T, Revers F (2012) The RTM resistance to potyviruses in *Arabidopsis thaliana*: natural variation of

the *RTM* genes and evidence for the implication of additional genes. *PLoS One* 7:e39169.

Cosson P, Sofer L, Le QH, Léger V, Schurdi-Levraud V, Whitham SA, Yamamoto ML, Gopalan S, Le Gall O, Candresse T, Carrington JC, Revers F (2010) *RTM3*, which controls long-distance movement of potyviruses, is a member of a new plant gene family encoding a meprin and TRAF homology domain-containing protein. *Plant Physiol* 154:222–232.

Csorba T, Kontra L, Burgyán J (2015) Viral silencing suppressors: tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence. *Virology* 479–480:85–103.

de Ronde D, Butterbach P, Kormelink R (2014) Dominant resistance against plant viruses. *Front Plant Sci* 5:307.

Decroocq V, Salvador B, Sicard O, Glasa M, Cosson P, Svanella-Dumas L, Revers F, García JA, Candresse T (2009) The determinant of potyvirus ability to overcome the *RTM* resistance of *Arabidopsis thaliana* maps to the N-terminal region of the coat protein. *Mol Plant Microbe Interact* 22:1302–1311.

Decroocq V, Sicard O, Alamillo JM, Lansac M, Eyquard JP, García JA, Candresse T, Le Gall O, Revers F (2006) Multiple resistance traits control *Plum pox virus* infection in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact* 19:541–549.

den Boon JA, Ahlquist P (2010) Organelle-like membrane compartmentalization of positive-strand RNA virus replication factories. *Annu Rev Microbiol* 64:241–256.

Earley KW, Haag JR, Pontes O, Opper K, Juehne T, Song K, Pikaard CS (2006)

Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant J* 45:616–629.

Fernández de Castro I, Fernández JJ, Barajas D, Nagy PD, Risco C (2017) Three-dimensional imaging of the intracellular assembly of a functional viral RNA replicase complex. *J Cell Sci* 130:260–268.

Folimonova SY, Tilsner J (2018) Hitchhikers, highway tolls and roadworks: the interactions of plant viruses with the phloem. *Curr Opin Plant Biol* 43:82–88.

Gouveia BC, Calil IP, Machado JPB, Santos AA, Fontes EPB (2017) Immune receptors and co-receptors in antiviral innate immunity in plants. *Front Microbiol* 7:2139.

Guo YL, Fitz J, Schneeberger K, Ossowski S, Cao J, Weigel D (2011) Genome-wide comparison of nucleotide-binding site-leucine-rich repeat-encoding genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 157:757–769.

Gursinsky T, Schulz B, Behrens SE (2009) Replication of *Tomato bushy stunt virus* RNA in a plant *in vitro* system. *Virology* 390:250–260.

Hanssen IM, Thomma BPHJ (2010) *Pepino mosaic virus*: a successful pathogen that rapidly evolved from emerging to endemic in tomato crops. *Mol Plant Pathol* 11:179–189.

Hashimoto M, Neriya Y, Yamaji Y, Namba S (2016) Recessive resistance to plant viruses: potential resistance genes beyond translation initiation factors. *Front Microbiol* 7:1695.

Himeno M, Maejima K, Komatsu K, Ozeki J, Hashimoto M, Kagiwada S, Yamaji Y, Namba S

(2010) Significantly low level of small RNA accumulation derived from an encapsidated mycovirus with dsRNA genome. *Virology* 396:69–75.

Hipper C, Brault V, Ziegler-Graff V, Revers F (2013) Viral and cellular factors involved in phloem transport of plant viruses. *Front Plant Sci* 4:154.

Hyodo K, Okuno T (2014) Host factors used by positive-strand RNA plant viruses for genome replication. *J Gen Plant Pathol* 80:123–135.

Ishibashi K, Ishikawa M (2013) The resistance protein Tm-1 inhibits formation of a tomato mosaic virus replication protein-host membrane protein complex. *J Virol* 87:7933–7939.

Ishibashi K, Ishikawa M (2014) Mechanisms of tomato mosaic virus RNA replication and its inhibition by the host resistance factor Tm-1. *Curr Opin Virol* 9:8–13.

Ishibashi K, Ishikawa M (2016) Replication of tobamovirus RNA. *Annu Rev Phytopathol* 54:55–78.

Ishibashi K, Kezuka Y, Kobayashi C, Kato M, Inoue T, Nonaka T, Ishikawa M, Matsumura H, Katoh E (2014) Structural basis for the recognition–evasion arms race between *Tomato mosaic virus* and the resistance gene *Tm-1*. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:E3486–E3495.

Ishibashi K, Masuda K, Naito S, Meshi T, Ishikawa M (2007) An inhibitor of viral RNA replication is encoded by a plant resistance gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:13833–13838.

Iwakawa HO, Kaido M, Mise K, Okuno T (2007) *cis*-Acting core RNA elements required for

negative-strand RNA synthesis and cap-independent translation are separated in the 3'-untranslated region of *Red clover necrotic mosaic virus* RNA1. *Virology* 369:168–181.

Johansen LK, Carrington JC (2001) Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the *Agrobacterium*-mediated transient expression system. *Plant Physiol* 126:930–938.

Kagiwada S, Yamaji Y, Nakabayashi H, Ugaki M, Namba S (2002) The complete nucleotide sequence of *Potato virus X* strain OS: the first complete sequence of a Japanese isolate. *J Gen Plant Pathol* 68:94–98.

Kavanagh T, Goulden M, Santa Cruz S, Chapman S, Barker I, Baulcombe D (1992) Molecular analysis of a resistance-breaking strain of potato virus X. *Virology* 189:609–617.

Kawamura-Nagaya K, Ishibashi K, Huang YP, Miyashita S, Ishikawa M (2014) Replication protein of tobacco mosaic virus cotranslationally binds the 5' untranslated region of genomic RNA to enable viral replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:E1620–E1628.

Keima T, Hagiwara-Komoda Y, Hashimoto M, Neriya Y, Koinuma H, Iwabuchi N, Nishida S, Yamaji Y, Namba S (2017) Deficiency of the eIF4E isoform nCBP limits the cell-to-cell movement of a plant virus encoding triple-gene-block proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Sci Rep* 7:39678.

Kobayashi K, Sekine KT, Nishiguchi M (2014) Breakdown of plant virus resistance: can we predict and extend the durability of virus resistance? *J Gen Plant Pathol* 80:327–336.

Koh KW, Lu HC, Chan MT (2014) Virus resistance in orchids. *Plant Sci* 228:26–38.

Komatsu K, Hashimoto M, Maejima K, Shiraishi T, Neriya Y, Miura C, Minato N, Okano Y, Sugawara K, Yamaji Y, Namba S (2011) A necrosis-inducing elicitor domain encoded by both symptomatic and asymptomatic *Plantago asiatica mosaic virus* isolates, whose expression is modulated by virus replication. *Mol Plant Microbe Interact* 24:408–420.

Komoda K, Mawatari N, Hagiwara-Komoda Y, Naito S, Ishikawa M (2007) Identification of a ribonucleoprotein intermediate of tomato mosaic virus RNA replication complex formation. *J Virol* 81:2584–2591.

Komoda K, Naito S, Ishikawa M (2004) Replication of plant RNA virus genomes in a cell-free extract of evacuated plant protoplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:1863–1867.

Leng P, Ji Q, Asp T, Frei UK, Ingvarsdén CR, Xing Y, Studer B, Redinbaugh M, Jones M, Gajjar P, Liu S, Li F, Pan G, Xu M, Lübberstedt T (2017) Auxin binding protein 1 reinforces resistance to *Sugarcane mosaic virus* in maize. *Mol Plant* 10:1357–1360.

Liu Q, Liu H, Gong Y, Tao Y, Jiang L, Zuo W, Yang Q, Ye J, Lai J, Wu J, Lübberstedt T, Xu M (2017) An atypical thioredoxin imparts early resistance to *Sugarcane mosaic virus* in maize. *Mol Plant* 10:483–497.

Maekawa T, Kracher B, Vernaldi S, Ver Loren van Themaat E, Schulze-Lefert P (2012) Conservation of NLR-triggered immunity across plant lineages. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:20119–20123.

Mahajan SK, Chisholm ST, Whitham SA, Carrington JC (1998) Identification and characterization of a locus (*RTMI*) that restricts long-distance movement of tobacco etch virus in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 14:177–186.

Mandadi KK, Scholthof K-BG (2013) Plant immune responses against viruses: how does a virus cause disease? *Plant Cell* 25:1489–1505.

Minato N, Komatsu K, Okano Y, Maejima K, Ozeki J, Senshu H, Takahashi S, Yamaji Y, Namba S (2014) Efficient foreign gene expression *in planta* using a plantago asiatica mosaic virus-based vector achieved by the strong RNA-silencing suppressor activity of TGBp1. *Arch Virol* 159:885–896.

Mine A, Hyodo K, Tajima Y, Kusumanegara K, Taniguchi T, Kaido M, Mise K, Taniguchi H, Okuno T (2012) Differential roles of Hsp70 and Hsp90 in the assembly of the replicase complex of a positive-strand RNA plant virus. *J Virol* 86:12091–12104.

Mine A, Okuno T (2012) Composition of plant virus RNA replicase complexes. *Curr Opin Virol* 2:669–675.

Mine A, Takeda A, Taniguchi T, Taniguchi H, Kaido M, Mise K, Okuno T (2010) Identification and characterization of the 480-kilodalton template-specific RNA-dependent RNA polymerase complex of red clover necrotic mosaic virus. *J Virol* 84:6070–6081.

Moffett P (2017) Transfer and modification of NLR proteins for virus resistance in plants. *Curr Opin Virol* 26:43–48.

Monteiro F, Nishimura MT (2018) Structural, functional, and genomic diversity of plant NLR proteins: an evolved resource for rational engineering of plant immunity. *Annu Rev Phytopathol* 56:243–267.

Mukhtar MS (2013) Engineering NLR immune receptors for broad-spectrum disease resistance. *Trends Plant Sci* 18:469–472.

Nagy PD (2008) Yeast as a model host to explore plant virus-host interactions. *Annu Rev Phytopathol* 46:217–242.

Nagy PD (2016) Tombusvirus-host interactions: co-opted evolutionarily conserved host factors take center court. *Annu Rev Virol* 3:491–515.

Nagy PD, Pogany J (2012) The dependence of viral RNA replication on co-opted host factors. *Nat Rev Microbiol* 10:137–149.

Narusaka M, Kubo Y, Hatakeyama K, Imamura J, Ezura H, Nanasato Y, Tabei Y, Takano Y, Shirasu K, Narusaka Y (2013) Interfamily transfer of dual NB-LRR genes confers resistance to multiple pathogens. *PLoS One* 8:e55954.

Netsu O, Hiraguri A, Uehara-Ichiki T, Komatsu K, Sasaya T (2015) Functional comparison of RNA silencing suppressor between the p5 protein of rice grassy stunt virus and the p3 protein of rice stripe virus. *Virus Res* 203:10–19.

Okano Y, Senshu H, Hashimoto M, Neriya Y, Netsu O, Minato N, Yoshida T, Maejima K, Oshima K, Komatsu K, Yamaji Y, Namba S (2014) In planta recognition of a double-stranded

RNA synthesis protein complex by a potexviral RNA silencing suppressor. *Plant Cell* 26:2168–2183.

Ozeki J, Hashimoto M, Komatsu K, Maejima K, Himeno M, Senshu H, Kawanishi T, Kagiwada S, Yamaji Y, Namba S (2009) The N-terminal region of the *Plantago asiatica mosaic virus* coat protein is required for cell-to-cell movement but is dispensable for virion assembly. *Mol Plant Microbe Interact* 22:677–685.

Ozeki J, Takahashi S, Komatsu K, Kagiwada S, Yamashita K, Mori T, Hirata H, Yamaji Y, Ugaki M, Namba S (2006) A single amino acid in the RNA-dependent RNA polymerase of *Plantago asiatica mosaic virus* contributes to systemic necrosis. *Arch Virol* 151:2067–2075.

Padmanabhan MS, Dinesh-Kumar SP (2014) The conformational and subcellular compartmental dance of plant NLRs during viral recognition and defense signaling. *Curr Opin Microbiol* 20:55–61.

Padmanabhan MS, Ma S, Burch-Smith TM, Czymmek K, Huijser P, Dinesh-Kumar SP (2013) Novel positive regulatory role for the SPL6 transcription factor in the N TIR-NB-LRR receptor-mediated plant innate immunity. *PLoS Pathog* 9:e1003235.

Park MR, Jeong RD, Kim KH (2014) Understanding the intracellular trafficking and intercellular transport of potexviruses in their host plants. *Front Plant Sci* 5:60.

Pumplin N, Voinnet O (2013) RNA silencing suppression by plant pathogens: defense, counter-defense and counter-counter-defense. *Nat Rev Microbiol* 11:745–760.

Reddy DV, Sudarshana MR, Fuchs M, Rao NC, Thottappilly G (2009) Genetically engineered virus-resistant plants in developing countries: current status and future prospects. *Adv Virus Res* 75:185–220.

Revers F, Guiraud T, Houvenaghel MC, Mauduit T, Le Gall O, Candresse T (2003) Multiple resistance phenotypes to *Lettuce mosaic virus* among *Arabidopsis thaliana* accessions. *Mol Plant Microbe Interact* 16:608–616.

Schoelz JE, Harries PA, Nelson RS (2011) Intracellular transport of plant viruses: finding the door out of the cell. *Mol Plant* 4:813–831.

Schwartz M, Chen J, Janda M, Sullivan M, den Boon J, Ahlquist P (2002) A positive-strand RNA virus replication complex parallels form and function of retrovirus capsids. *Mol Cell* 9:505–514.

Senshu H, Ozeki J, Komatsu K, Hashimoto M, Hatada K, Aoyama M, Kagiwada S, Yamaji Y, Namba S (2009) Variability in the level of RNA silencing suppression caused by triple gene block protein 1 (TGBp1) from various potexviruses during infection. *J Gen Virol* 90:1014–1024.

Slootweg E, Roosien J, Spiridon LN, Petrescu AJ, Tameling W, Joosten M, Pomp R, van Schaik C, Dees R, Borst JW, Smant G, Schots A, Bakker J, Goverse A (2010) Nucleocytoplasmic distribution is required for activation of resistance by the potato NB-LRR receptor Rx1 and is balanced by its functional domains. *Plant Cell* 22:4195–4215.

Sugawara K, Shiraishi T, Yoshida T, Fujita N, Netsu O, Yamaji Y, Namba S (2013) A replicase

of *Potato virus X* acts as the resistance-breaking determinant for JAX1-mediated resistance. *Mol Plant Microbe Interact* 26:1106–1112.

Sztuba-Solińska J, Stollar V, Bujarski JJ (2011) Subgenomic messenger RNAs: mastering regulation of (+)-strand RNA virus life cycle. *Virology* 412:245–255.

Tameling WI, Nooijen C, Ludwig N, Boter M, Slootweg E, Goverse A, Shirasu K, Joosten MH (2010) RanGAP2 mediates nucleocytoplasmic partitioning of the NB-LRR immune receptor Rx in the Solanaceae, thereby dictating Rx function. *Plant Cell* 22:4176–4194.

Truniger V, Aranda MA (2009) Recessive resistance to plant viruses. *Adv Virus Res* 75:119–159.

Truniger V, Nieto C, González-Ibeas D, Aranda M (2008) Mechanism of plant eIF4E-mediated resistance against a Carmovirus (*Tombusviridae*): cap-independent translation of a viral RNA controlled *in cis* by an (a)virulence determinant. *Plant J* 56:716–727.

Uhde-Holzem K, Schlösser V, Viazov S, Fischer R, Commandeur U (2010) Immunogenic properties of chimeric potato virus X particles displaying the hepatitis C virus hypervariable region I peptide R9. *J Virol Methods* 166:12–20.

Verchot J, Angell SM, Baulcombe DC (1998) In vivo translation of the triple gene block of potato virus X requires two subgenomic mRNAs. *J Virol* 72:8316–8320.

Verchot-Lubicz J, Torrance L, Solovyev AG, Morozov SY, Jackson AO, Gilmer D (2010) Varied movement strategies employed by triple gene block-encoding viruses. *Mol Plant Microbe*

Interact 23:1231–1247.

Verchot-Lubicz J, Ye CM, Bamunusinghe D (2007) Molecular biology of potexviruses: recent advances. *J Gen Virol* 88:1643–1655.

Verlaan MG, Hutton SF, Ibrahim RM, Kormelink R, Visser RGF, Scott JW, Edwards JD, Bai Y (2013) The tomato yellow leaf curl virus resistance genes *Ty-1* and *Ty-3* are allelic and code for DFDGD-class RNA-dependent RNA polymerases. *PLoS Genet* 9:e1003399.

Wan J, Cabanillas DG, Zheng H, Laliberté JF (2015) Turnip mosaic virus moves systemically through both phloem and xylem as membrane-associated complexes. *Plant Physiol* 167:1374–1388.

Wang A, Krishnaswamy S (2012) Eukaryotic translation initiation factor 4E-mediated recessive resistance to plant viruses and its utility in crop improvement. *Mol Plant Pathol* 13:795–803.

Wang B, MaYL, Zhang ZB, Wu ZM, Wu YF, Wang QC, Li MF (2011) Potato viruses in China. *Crop Prot* 30:1117–1123.

Wang Q, Liu Y, He J, Zheng X, Hu J, Liu Y, Dai H, Zhang Y, Wang B, Wu W, Gao H, Zhang Y, Tao X, Deng H, Yuan D, Jiang L, Zhang X, Guo X, Cheng X, Wu C, Wang H, Yuan L, Wan J (2014) *STVII* encodes a sulphotransferase and confers durable resistance to rice stripe virus. *Nat Commun* 5:4768.

Watanabe T, Honda A, Iwata A, Ueda S, Hibi T, Ishihama A (1999) Isolation from tobacco mosaic virus-infected tobacco of a solubilized template-specific RNA-dependent RNA

polymerase containing a 126 K/183 K protein heterodimer. *J Virol* 73:2633–2640.

Whitham SA, Anderberg RJ, Chisholm ST, Carrington JC (2000) Arabidopsis *RTM2* gene is necessary for specific restriction of tobacco etch virus and encodes an unusual small heat shock-like protein. *Plant Cell* 12:569–582.

Yamaji Y, Maejima K, Ozeki J, Komatsu K, Shiraishi T, Okano Y, Himeno M, Sugawara K, Neriya Y, Minato N, Miura C, Hashimoto M, Namba S (2012) Lectin-mediated resistance impairs plant virus infection at the cellular level. *Plant Cell* 24:778–793.

Yoshii M, Nishikiori M, Tomita K, Yoshioka N, Kozuka R, Naito S, Ishikawa M (2004) The *Arabidopsis cucumovirus multiplication 1* and *2* loci encode translation initiation factors 4E and 4G. *J Virol* 78:6102–6111.

難波成任 (2008) 植物医科学 (上) . 養賢堂, 東京