

論文の内容の要旨

論文題目 植物パラレトロウイルスの生存戦略

氏名 大前奈月

【序論】

ウイルスは、そのゲノムとして DNA あるいは RNA をもつ。RNA をゲノムとするウイルスは、動物ウイルスでは同程度の数報告があるが、DNA をゲノムとするウイルスは、植物ウイルスではこれまで 3 科のみが知られており動物ウイルスよりもはるかに少ない。この理由は不明である。そこで本研究では、植物宿主が DNA ウイルスを動物宿主より強く抑制している可能性について検討した。

トランスポゾン(TE)や DNA ウイルスなどの外来 DNA の転写を宿主が抑制する機構として、シトシン (C) メチル化があり、これはシトシンメチル基転移酵素による C へのメチル基付加である。この修飾は動物と植物の両方で見られるが、標的配列や関わる因子が異なる。動物ではシトシンメチル化は主に CG のみで起こり、ゲノムのほとんどの部分(98-99 %程度)が均一にメチル化される。一、植物は、植物固有のシトシンメチル化酵素を持ち、CG に加え CHG と CHH (H=A or C or T、以下 non-CG)もメチル化され得る。動植物における DNA のシトシンメチル化は、外来 DNA の複製に対する重要な防御機構のひとつとなっている。

植物を宿主とするカリモウイルス科ウイルスは、2 本鎖環状 DNA をゲノムとして持ち、宿主細胞の核内で転写されるため、宿主によるシトシンメチル化の標的になる可能性があるが、これまでその詳細な検討はなされていなかった。そこで本研究では、カリモウイルス科カリモウイルス属のタイプ種であるカリフラワーモザイクウイルス(CaMV)がカブ(*Brassica rapa*)に感染した際に受けるウイルスゲノム DNA のシトシンメチル化と、それに対する CaMV の感染戦略を解析し、植物で DNA ウイルスが少ない理由を考察した。

【結果と考察】

1. 核内 CaMV ゲノムのシトシンメチル化

CaMV 粒子は、昆虫媒介により植物細胞に侵入し、2 本鎖環状 DNA ゲノムを核内に移行させ、ゲノムからウイルス遺伝子を転写・翻訳する。同時に、ゲノムのほぼ全長に相当するプレゲノム RNA (pgRNA) を転写する。pgRNA は細胞質に形成される封入体と呼ばれるウイルスタンパク質由来構造物の中でゲノム DNA へと逆転写され、そこで

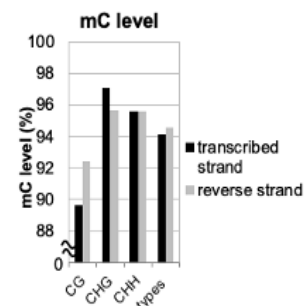


図 1. 各タイプのシトシンメチル化レベル

生成されたウイルス粒子は原形質連絡から隣接細胞へ移行する。

まず核内の CaMV ゲノムのメチル化状態を調べるため、CaMV を接種した後 43 日(dpi)のカブの葉から核を単離し、CaMV ゲノム DNA のメチル化

パターンをバイサルファイトシーケンス法で調べた。その結果、プロモーター領域を含めたゲノム全体が高度にメチル化を受け、non-CGの方がCGよりもメチル化率がわずかに高かった(図1,2)。また、プロモーター領域はORFよりもわずかにメチル化率が高く、ORF内では non-CG が高度にメチル化されていた。一方、CGのメチル化率が低いクローンも一定数見られた。高度なメチル化は 14 dpi ですでに観測され、35S コアプロモーター領域以外は 43 dpi まで大きな変化が見られなかった(図3)。

2. CaMV 粒子内ゲノムのシトシンメチル化

CaMV ゲノムは封入体の中で pgRNA の逆転写により生成され、外被タンパク質と結合して粒子となる。CaMV 感染カブから精製した CaMV 粒子(図 4A)に含まれるゲノム DNA のプロモーター領域と ORF の一部のシトシンメチル化を解析したところ、ウイルス粒子内の CaMV ゲノムはメチル化を受けていないことが示された(図 4B)。

3. CaMV プロモーターのシトシンメチル化の転写活性への影響

前述のように、感染植物の核内で CaMV ゲノムのプロモーターは高度にメチル化されていた(図 2)。そこで、メチル化がプロモーターの転写活性に影響するかを調べるため、CaMV の 35S プロモーターと β -グルクロニダーゼ(GUS)レポーターをもつプラスミド(図 5A)をそのまま、あるいは *in vitro* でシトシンメチル化したのちに、カブのプロトプラストに導入し、GUS レポーターの活性を測定した。その結果、シトシンメチル化によりプロモーターの転写活性がほぼ無くなることが示された(図 5B)。

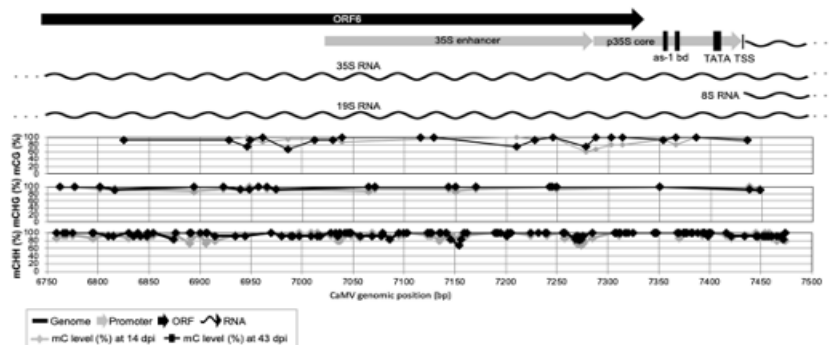


図2. 35S promoter周辺のシトシンメチル化レベル

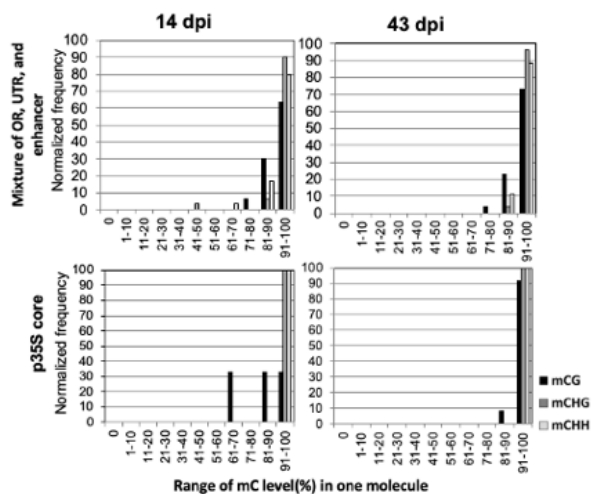


図3. シトシンメチル化レベルごとの分子の割合

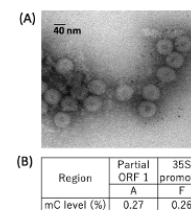


図4. 粒子内ゲノムのメチル化

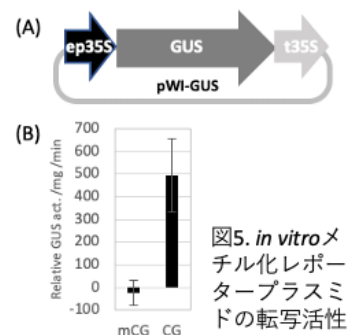


図5. *in vitro* メチル化レポータープラスミドの転写活性

4. 感染葉での CaMV ゲノムの転写活性

前述のように、CaMV ゲノムは感染植物の核内でプロモーター領域を含めて高度にメチル化されているが(図 2)、14 dpi、43 dpi とも、感染葉は葉脈透過や葉の矮化など明確な病徴を示し、病徴が新しい葉へと拡大していた。感染葉での CaMV ゲノムの転写活性を調べるため、14 dpi と 43 dpi の葉の核内での CaMV 転写物の蓄積量を半定量 RT-PCR で解析した。その結果、14 dpi、43 dpi の両方で CaMV 転写物が検出され、その量はほぼ同程度であった(図 6)。CaMV 転写物が既知の核内残留シグナルをもたないこと、細胞質で翻訳あるいは逆転写されること、および、一般的な核内 RNA の安定期間を考慮すると、43 dpi の CaMV 転写物は 14 dpi の転写物が分解されず残存したものである可能性は低く、CaMV ゲノムは感染植物の核内で新規に転写されている可能性が示唆された。

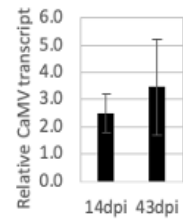


図 6. 感染葉の核内の相対CaMV転写物量

5. 核内 CaMV ゲノムの *de novo* メチル化機構

前述のように、ウイルス粒子内の CaMV ゲノムはメチル化されていなかったため(図 4)、核内の CaMV ゲノムのメチル化には *de novo* メチル化が関わるといえる。植物では *de novo* メチル化の機構として small RNA (sRNA) を介した RNA-dependent DNA methylation (RdDM) が知られ、21、22 または 24 塩基(nt)の sRNA が関わる。CaMV の *de novo* メチル化の機構の推定のため、14 dpi の感染カブの CaMV ゲノム由来の sRNA の発現を sRNA シー

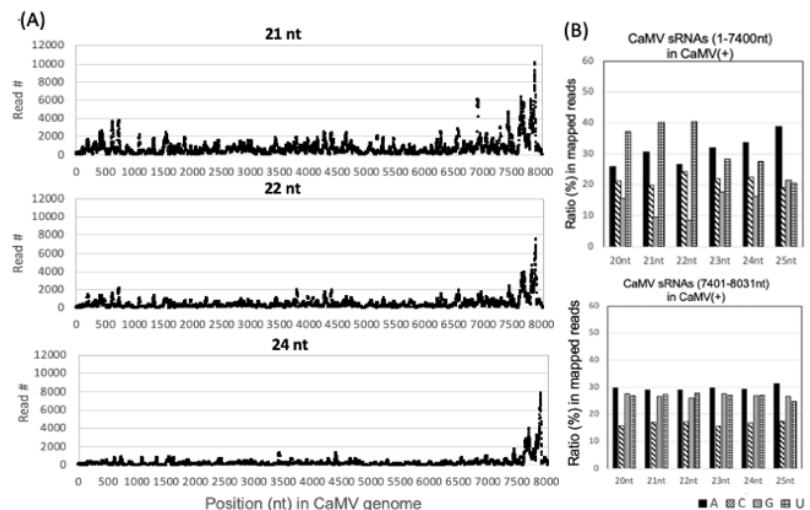


図 7. CaMV由来sRNA発現パターンと 5'末端の塩基の傾向

ケンス法で解析した。感染葉に蓄積されていた sRNA の発現パターンは、pgRNA の 5'非翻訳領域(7431 番-8031 番塩基周辺)から発現し高度に蓄積するものと、他の領域全体から弱く発現するものの二つのパターンが見られた(図 7A)。これらの異なる発現パターンの sRNA 画分について 5'末端の塩基の種類の傾向を調べたところ、前者は 21 から 25-nt の sRNA 種ではほぼ同様であったが、後者では A および U を 5'末端に持つ sRNA が比較的濃縮されていた(図 7B)。うち A を 5'末端に持つ sRNA については、同科植物シロイヌナズナにおいて RdDM に関わることが報告されており、カブにおいてもこの領域のメチル化に関わる可能性がある。一方、pgRNA の 5'非翻訳領域から生成される大量の sRNA には、pgRNA の他の領域を標的とする植物宿主の RNA 干渉を飽和させるはたらきが示唆されている。

6. 核内 CaMV ゲノムと宿主 LTR レトロトランスポゾンのメチル化レベルの比較

パラレトロウイルスおよびレトロウイルスは、複製様式および逆転写酵素のアミノ酸配列の

相同性から、LTR
レトロトランスポ
ゾンに由来すると
考えられている。
そこで、CaMV ゲ
ノムのメチル化パ

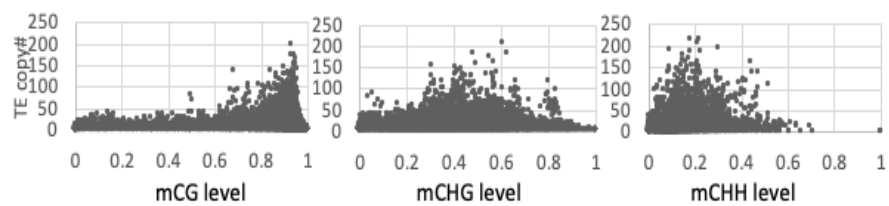


図8.カブの各TEのコピー数と各タイプのメチル化レベルの関係

ターンとカブの染色体 DNA 内の LTR レトロトランスポゾンのメチル化パターンとを比較するため、カブの全ゲノムメチル化解析を行った。その結果、カブの LTR レトロトランスポゾンの CG、CHG、CHH のメチル化率はそれぞれ 81、42、17%であり、他の領域と同様に CG、CHG、CHH の順にメチル化率が低下しており、核内 CaMV ゲノムと比較すると特に non-CG においてメチル化率に違いが見られた。各 TE ファミリーのコピー数とメチル化率との関係を調べると、CG ではコピー数が増えるとメチル化率が高いものが増える傾向があったが、CHG、CHH にはそのような傾向はみられなかった(図 8)。このように CaMV ゲノムと LTR レトロトランスポゾンでは、特に non-CG においてメチル化の頻度が異なっており、これにはコピー数以外の理由、たとえば、ゲノムの形状の違い(CaMV は環状、TE は線状)等が関わっている可能性が考えられた。

【結論】

CaMV ゲノムは感染植物の核内で、プロモーター領域を含めてすべての領域で CG および non-CG のシトシンが高度にメチル化されていた。*in vitro* でメチル化したウイルスプロモーターの転写活性測定実験から、核内でメチル化されたウイルスプロモーターの転写活性は低いと考えられた。細胞質で生成されるウイルス粒子内のゲノムは非メチル化状態であり、転写活性をもつと考えられた。一方、核内の CaMV ゲノムが高度にメチル化されていた時点でも、感染葉での CaMV の転写は継続しており、ウイルスの感染は拡大していた。この現象を説明するモデルとして、細胞質で生成された非メチル化ゲノムが継続的に核内に再供給されることで、転写を継続するというモデルが考えられる。また、核内に運ばれた CaMV ゲノムが速やかに *de novo* メチル化を受ける機構には、CaMV ゲノム全体に弱く発現していて A を 5'末端に持つ sRNA が関わる可能性が示唆された。

以上、植物は動物と比較して、CG のみならず non-CG をもメチル化する能力をもち、核内のウイルス DNA ゲノムをほぼ完全にメチル化していた。これが、植物 DNA ウイルスの種類が少ない一因である可能性がある。一方、数少ない DNA ウイルスである CaMV は、核内で DNA のままで複製するのではなく、強力な 35S プロモーターから pgRNA を短時間で効率的に転写し、それを細胞質で逆転写することでメチル化フリーのウイルスゲノムをウイルス粒子にパッケージし、それを継続的に核内に供給することで植物核内のメチル化活性に対抗していると想像された。