

博士論文

イチジクモザイクウイルスの
タンパク質機能に関する細胞生物学的研究

平成 25 年度博士課程入学

東京大学大学院 農学生命科学研究科

生産・環境生物学専攻

石川 一也

目次

第 1 章	緒論	
1.1.	はじめに	1
1.2.	ウイルスの分類	
	ウイルスの分類体系	3
	マイナス鎖 RNA ウイルス	4
1.3.	イチジクモザイクウイルス (FMV) とは -同定までの過程-	
	イチジク (<i>Ficus carica</i>) とは	5
	イチジクモザイク病	7
	<i>Fig mosaic virus</i> の同定	11
1.4.	FMV の性状	
	ウイルス学的性状	12
	FMV の遺伝子構造	13
	FMV の分類学的位置づけ	15
	<i>Emaravirus</i> 属の分類	17
1.5.	研究対象としての FMV と本研究の目的	20
第 2 章	国内で初めての FMV の検出	
2.1.	序論	
	島根県のイチジクに発生したモザイクなどの症状	22
2.2.	材料及び方法	
2.2.1	供試植物	24
2.2.2	媒介虫の走査型電子顕微鏡による観察	24
2.2.3	イチジク RNA の抽出	24
2.2.4	Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)	24
2.2.5	ダイレクトシーケンス	25
2.2.6	分子系統解析	26
2.2.7	抗 NP 抗体の作成 -コンピテントセルの作製-	26
2.2.8	抗 NP 抗体の作成 - pET30a ベクターへのクローニング-	26
2.2.9	抗 NP 抗体の作成 -リコンビナントタンパク質の発現誘導と発現の 確認-	27
2.2.10	抗 NP 抗体の作成 -SDS-PAGE および CBB 染色	28
2.2.11	抗 NP 抗体の作成 -リコンビナントタンパク質の精製-	28
2.2.12	抗 NP 抗体の作成 -血清からの抗体の精製と反応性の確認-	29
2.2.13	ウエスタンブロット解析	30
2.2.14	Double antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay (DAS-ELISA)	30

2.2.15	Tissue blot 法	31
2.3.	結果	
	病徴の観察	32
	FMV 特異的プライマーを用いた RT-PCR	37
	抗 NP 抗体の特異性と力価の評価	38
	DAS-ELISA による NP の検出	38
	感染葉における NP の分布	40
2.4.	考察	
	国内で初めての FMV の検出	41
	FMV の宿主個体内動態	41
第 3 章	新規ゲノムセグメント RNA5、RNA6 の発見	
3.1.	序論	
	これまでに推定されてきた FMV のゲノム構造	43
3.2.	材料及び方法	
3.2.1.	供試植物	46
3.2.2.	RT-PCR	46
3.2.3.	Rapid amplification of cDNA end (RACE)	47
3.2.4.	PCR 産物のクローニングと塩基配列解析	48
3.2.5.	ノーザンブロット	51
3.2.6.	配列解析と分子系統解析	52
3.3.	結果	
	FMV 分離株の収集	54
	ゲノムセグメントの同時増幅 -FMV 新規ゲノムセグメントの検出-	55
	新規 RNA セグメント RNA5、RNA6 の配列解析	58
	分離株間配列同一性の比較	63
	ノーザンブロット解析	69
	セグメント間の分子進化の比較解析	70
3.4.	考察	
	新規ゲノムセグメント RNA5、RNA6	73
	分離株ごとの分子進化について	74
	RNA5、RNA6 にコードされるタンパク質の機能	75
	その他の分離株における RNA5、RNA6 の存在	75
	その他の <i>Emaravirus</i> 属ウイルスにおける RNA5、RNA6 の存在	76
	<i>Emaravirus</i> 属のゲノムセグメントの本数	77
第 4 章	p4 タンパク質のウイルス細胞間移行に関わる機能の証明	
4.1.	序論	

	原形質連絡について	80
	ウイルスの細胞間移行と移行タンパク質	80
	移行タンパク質の基本的性状	81
4.2.	材料及び方法	
4.2.1.	p4 タンパク質配列を用いたドメインの予測	87
4.2.2.	発現ベクターへのクローニング	87
4.2.3.	アグロインフィルトレーション	88
4.2.4.	confocal laser-scanning microscopy (CLSM)	89
4.2.5.	ウエスタンブロット	90
4.2.6.	細胞間移行に関わる機能の検定	90
4.3.	結果	
	ドメイン検索	92
	蛍光局在解析	93
	Viral movement complementation assay	97
	限界排除分子量検定	99
	p4 タンパク質の細胞間移行能の検定	101
4.4.	考察	
	FMV の移行タンパク質の同定	103
	<i>Emaravirus</i> 属ウイルスにおけるホモログ	103
	p4 配列中に予測されたドメインに対する考察	103
	他のマイナス鎖 RNA ウイルスの MP との比較	104
第 5 章	NP は ER 流動によって受動的に細胞内を動く	
5.1.	序論	
	アクトミオシンシステムと ER 流動	105
	アクチン-ER ネットワークに沿って動くウイルスタンパク質凝集体	106
	NP と粒子形成	106
5.2.	材料及び方法	
5.2.1.	発現ベクターの作製	109
5.2.2.	アグロバクテリウムを用いた植物体内での遺伝子発現	110
5.2.3.	大腸菌発現タンパク質の精製と electrophoretic mobility shift assay (EMSA)	110
5.2.4.	膜画分の回収とシヨ糖濃度勾配遠心	111
5.2.5.	共免疫沈降とウエスタンブロット	111
5.2.6.	阻害剤実験	112
5.2.7.	CLSM	112
5.2.8.	免疫電子顕微鏡法	112
5.2.9.	電子顕微鏡観察	113

5.3.	結果	
	FMV 感染植物からの NP の検出	115
	NP は RNA 結合能を有する	116
	FMV 感染細胞の微細構造観察	118
	FMV 感染細胞中で NP は ER 近傍に凝集体として存在し ER 膜に包まれる	120
	一過的に発現させた NP は ER の近傍に凝集体を形成し ER と同調して動く	122
	NP 凝集体は ER 近傍の細胞質ゾル中に存在する	125
	NP は ER とは異なる分画パターンを見せる	127
	NB はアクチン-ER 網に沿って局在する	129
	NB の動きはアクチン-ミオシンシステムに依存している	131
	NB の局在には ER ネットワークの構造が関わっている	133
	ミオシン XI-1、XI-2、XI-K の優性阻害型は NB の動きを阻害する	135
	NP と優性阻害型ミオシンの結合は認められない	137
	ミオシン XI-1、XI-2、XI-K の優性阻害型は ER 流動を NB の動きと同様に阻害する	139
5.4.	考察	
	NB は ER 流動により細胞内を受動的に動いている	141
	ウイルス因子凝集体の動きに対する生物学的意義づけ	143
	FMV 粒子の細胞内動態に対する考察	144
	その他のマイナス鎖 RNA ウイルスとの比較	144
	ER に対してクラス XI ミオシンが果たす機能の違いについて	145
第 6 章	総合考察	
6.1.	FMD と FMV のリスクと防除について	146
6.2.	FMV のゲノム構造について	148
6.3.	本研究より明らかとなった FMV の細胞内感染環について	151
6.4.	おわりに	153
摘要		154
謝辞		158
引用文献		159

略号

aa: amino acid residue	PD: plasmodesmata
BFA: brefeldin A	PEG: polyethylene glycol
CFP: cyan fluorescent protein	PPSMV: pigeonpea sterility mosaic virus
CLSM: confocal laser-scanning microscopy	PVP: polyvinylpyrrolidone
DAS-ELISA: double antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay	PVX: potato virus X
DIG: digoxigenin	RGSV: rice grassy stunt virus
dpi: days postinfiltration	RLBV: raspberry leaf blotch virus
DM: desmotubule	RNP: ribonucleoprotein complex
DMB: double membrane bodies	RRV: rose rosette virus
DMSO: dimethyl sulfoxide	RSV: rice stripe virus
DTT: dithiothreitol	RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction
ER: endoplasmic reticulum	RdRp: RNA-dependent RNA polymerase
FMD: fig mosaic disease	RFP: red fluorescence protein
FMV: fig mosaic virus	SDS: sodium dodecyl sulfate
GFLV: grapevine fanleaf virus	TAE: Tris-acetate-EDTA
GFP: green fluorescent protein	TGBp: triple gene block protein
GUS: β -glucuronidase	TSWV: tomato spotted wilt virus
hpi: hours postinfiltration	ToMV: tomato mosaic virus
IgG: immunoglobulin G	UTR: untranslated region
IPTG:	vRNA: viral RNA
isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside	WMoV: wheat mosaic virus
LatB: latrunculin B	YFP: yellow fluorescent protein
MP: movement protein	
ManI: soybean α -1,2-mannosidase	
NB: NP body	
NP: nucleocapsid protein	
nt: nucleotide	
OD: optical density	
ORF: open reading frame	
PBS: phosphate buffered saline	

第 1 章 緒論

1. 1. はじめに

植物と菌類、細菌、ウイルスなどの寄生体は生態系の中で常にせめぎ合いながら、共に進化してきた。寄生体は宿主植物の生命システムを利用し、生産する栄養素を収奪して増殖してゆくため、宿主植物の生育を妨げる。しかし、人為的な影響を受けない環境下では、寄生体に一方的に搾取されるような植物種は淘汰され、寄生者に対して耐性のある植物種が選抜されていく。その結果、これらの寄生体が植物の生育に大きな影響をもたらす機会は非常に希有であり、これらの寄生体が「病原体」、その感染が「病気」と呼称され、顕在化するのは農業における作物生産の場にほとんど限られる。現代農業においては、特定の形質に特化した斉一な遺伝情報を有する作物種が大規模に植栽されるため、植物群としての病原に対する抵抗力が単純かつ脆弱となり、病原の感染による作物の収量の低下が引き起こされやすい状態となる。実際に植物の病気は作物の減収の要因の中で多くを占める。気候や栄養条件などの耕種的要因以外の、生物的な作物の減収要因は、雑草害、食害、病害の3つに大別される。主要穀物において病害による減収は全生産可能量の約 35%を占めると見積もられている (Oerke, 2006; Fig. 1-1 A)。食料不足が火急の問題となっている現代において、このような植物の病気による収量の低下を防ぐことは非常に大きな課題である。

植物に感染する病原の中でも特に、植物ウイルスは農薬などによる化学的防除が困難である。これは、ウイルスが独自の代謝系を持たず、宿主の代謝系に大きく依存した生活環を有するためである。このような事由から、主にウイルス病の防除は抵抗性品種の植栽や媒介昆虫の駆除などの耕種的防除に依存している現状がある。多くの作物でウイルス病による減収は相当な割合を占めており、減収量は、トウモロコシでは約 20%、ジャガイモでは約 30%を占めている (Oerke, 2006; Fig. 1-1 B)。このような現状と将来におけるリスクを考えるに、植物ウイルスに対する防除法を構築するための基盤を形成する研究の蓄積が不可欠だと考えられる。

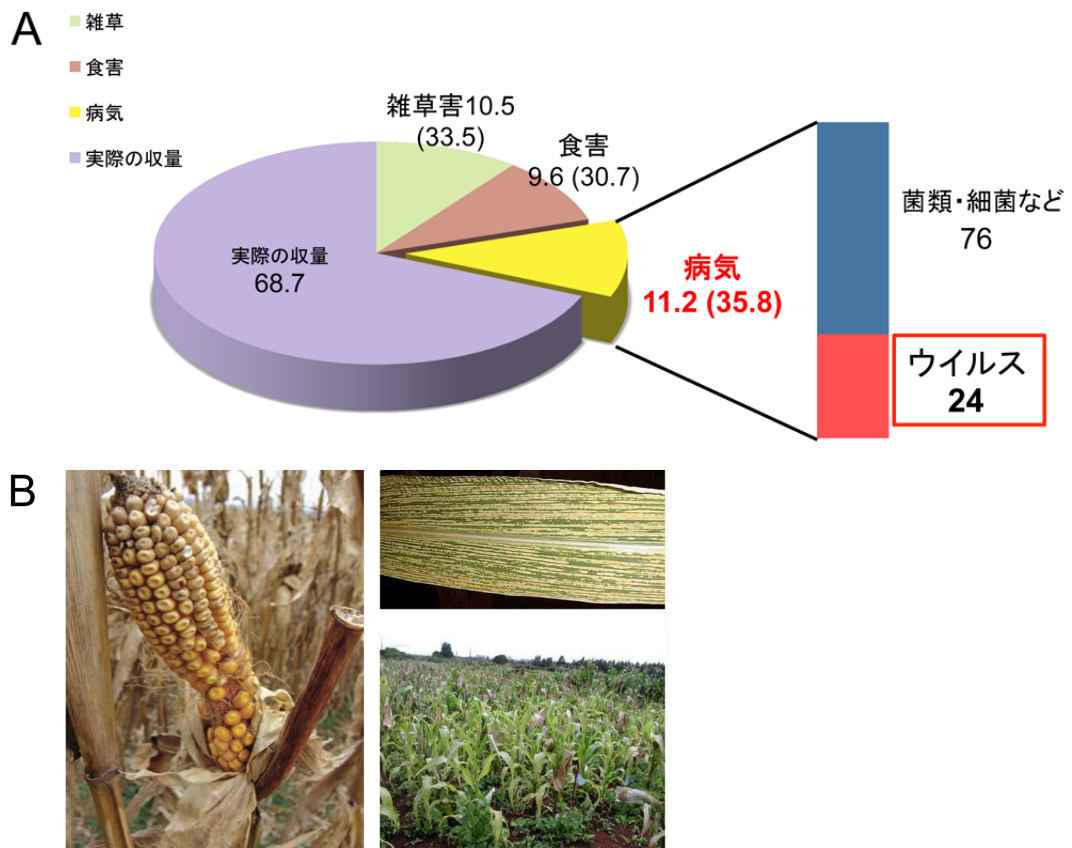


Fig. 1-1 ウイルスによる作物の減収

(A) トウモロコシの生産における減収要因。括弧の中は減収に占める割合を示す。単位は%。Oerke (2006)をもとに作成。

(B) ウイルス (*Maize stripe virus*) に感染したトウモロコシ。被害が甚大な場合、圃場全体で収穫が見込めなくなることもある。

1. 2. ウイルスの分類

ウイルスの分類体系

ウイルスの定義には様々なものがあるが、一般に「タンパク質の殻の内部にDNAかRNAの一方の核酸をゲノムとして有し、タンパク合成系やエネルギー生産系を持たない、宿主細胞中のみで増殖可能な微小病原体」と解釈されている。ウイルスはそのゲノム構成成分からDNAウイルスとRNAウイルスに大別され、DNAウイルスはそれぞれ二本鎖DNAウイルス (dsDNAウイルス) と一本鎖DNAウイルス (ssDNAウイルス)、RNAウイルスは二本鎖RNAウイルス (dsRNAウイルス) と一本鎖RNAウイルス (ssRNAウイルス) に分類される。さらに、一本鎖RNAウイルスはプラス鎖RNA (+鎖RNAウイルス) ウイルスとマイナス鎖RNA (-鎖RNAウイルス) ウイルスに分類される (Table 1-1)。各分類群に属するウイルスは性状に基づいて、科、属、種の順に分類される。

Table 1-1 ゲノム核酸に基づくウイルスの分類

核酸鎖の種類	鎖の本数	鎖の極性	ウイルス分類
DNA	二本鎖		dsDNA
	一本鎖		ssDNA
RNA	二本鎖		dsRNA
	一本鎖	プラス鎖	+鎖RNA
		マイナス鎖	-鎖RNA

マイナス鎖RNAウイルス

ssRNAウイルスのうち、プラス鎖RNAウイルスではウイルスゲノム自身が翻訳鋳型RNAとして働き、マイナス鎖RNAウイルスではウイルスゲノムから転写された相補鎖が翻訳鋳型RNAとして働く。動物ウイルスにおいては、マイナス鎖RNAウイルスに人畜共通感染症などの重要病原が多く存在し、研究が盛んに行われている。一方、植物ウイルスにおいては、約1000種の植物ウイルス種のうち、プラス鎖RNAウイルスが全体の70%以上を占め、マイナス鎖RNAウイルスは10%以下と少ない (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。その報告数の少なさに加え、感染性cDNAクローンの作製が困難であることなど実験手法が制限されることにより、その研究はほとんどなされてこなかった。しかし、ウイルスの検出技術の向上により、近年数多くのマイナス鎖RNAウイルスが植物病の病原として報告されている (Fig. 1-2)。また、多くのマイナス鎖RNAウイルスは宿主植物のみならず、媒介者体内においても増殖し永続的に伝搬能を有するため (Kormelink et al., 2011)、その防除は通常のウイルスよりも困難となる場合が多い。これらの事実は、マイナス鎖RNAウイルスが植物界にも高い割合で存在し、かつ病原としてのリスクが高いことを示唆している。

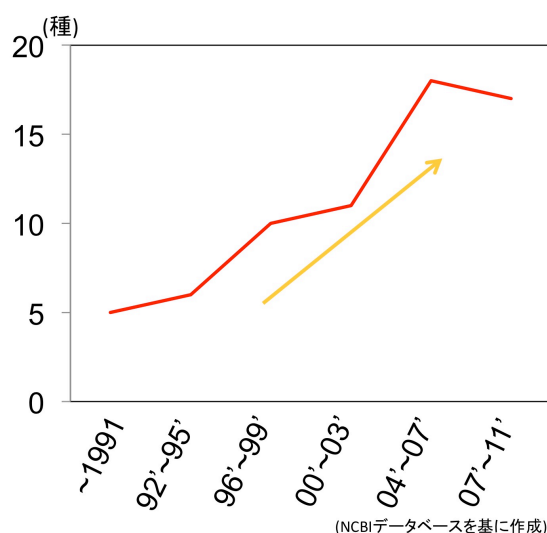


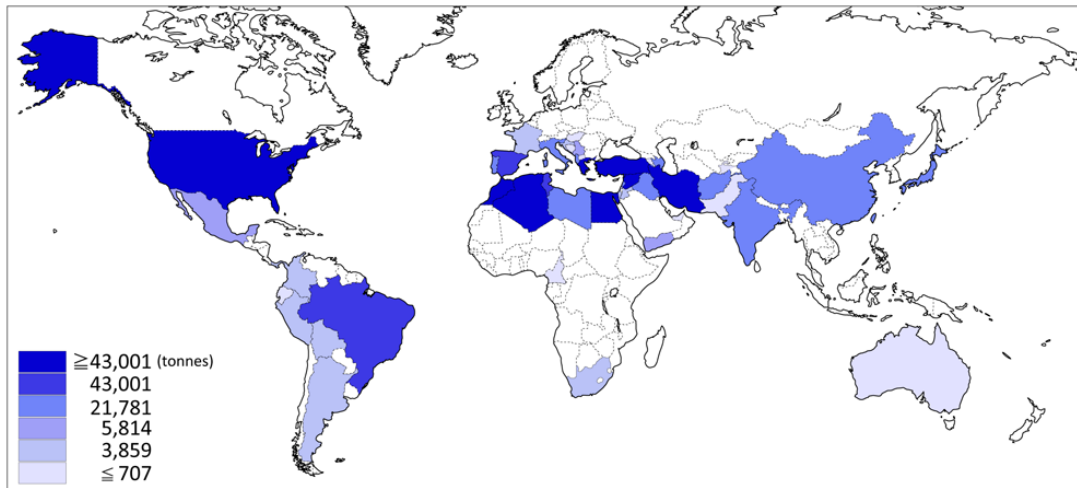
Fig. 1-2 マイナス鎖 RNA ウイルスの報告数の増加

1. 3. イチジクモザイクウイルス (FMV) とは -同定までの過程-

イチジク (*Ficus carica*) とは

イチジク (英名: fig、学名: *Ficus carica*) はクワ科イチジク属の落葉果樹で、比較的温暖な地域を好み、主に地中海地域で生産される (Fig. 1-3)。イチジクの起源はアラビア半島南部と考えられ、約1万1400年前の中東のヨルダン渓谷で既に栽培されていたことが分かっており、最も古くから生産されている作物の一つであると考えられている (Kislev et al., 2006)。イチジクの果実は果皮が薄く果肉が柔らかいため、輸送性・貯蔵性に乏しい。このため、海外では果実は生で食されるほか、乾燥させた形態でも多くが流通する。国内では乾燥形態ではあまり流通せず、生食用が主となるが、近年の輸送の高速化と、予冷・貯蔵など鮮度保持技術の向上により関東の市場には愛知県、和歌山県といった大型産地から出荷される割合が多い。特有の風味があり嗜好性が高いことから日本各地に名産地が点在し、町の振興にも利用されている。

<1993-2013年の国別平均生産量>



国	生産高(トン)
1 トルコ	262,643
2 エジプト	203,238
3 モロッコ	76,624
4 イラン	75,833
5 アルジェリア	72,898
6 ギリシャ	50,368
7 シリア	44,032
8 アメリカ	43,001
9 スペイン	42,856
10 チュニジア	25,785
⋮	
15 日本	15,152

<国内生産量 2012年>

都道府県	生産高(トン)
1 愛知	2,725
2 和歌山	2,333
3 福岡	1,390
4 大阪	1,345
5 兵庫	1,329

FAO STAT (Anonymous, 2015a)
農林水産省統計(農林水産省, 2015)
をもとに作成

Fig. 1-3 国内外のイチジク生産地域

イチジクモザイク病

イチジクには古くから世界的に「モザイク病 (fig mosaic disease: FMD)」が知られてきた。FMDに感染したイチジクは、樹勢が低下し、葉にモザイク、退緑、輪紋、奇形を生じ、輪紋はしばしば果実にも発生する (Blodgett and Gomec, 1967; Fig. 1-4)。その結果として収量と品質の低下を招き、生産高は大きく減じる。

FMDに関する初めての研究報告がなされたのは1933年のアメリカであるが、この文献では、イチジクの病気は紀元前3世紀の文献まで遡ることが出来ると記述され、遙か昔からイチジクに発生していた可能性が示唆されている (Condit and Horne, 1933; Fig. 1-5 A)。本報告では同時に、病徴を呈する個体に高頻度でフシダニの一種であるイチジクモンサビダニ (*Aceria ficus*) が観察されることから、FMDはこの虫により媒介されるウイルス病ではないかと推察されていた (Fig. 1-6)。その後、1955年にイチジクモンサビダニによってFMDが媒介されることが確かめられ (Flock and Wallace, 1955)、ウイルス病である可能性が強く示唆された。また、日本国内においても1962年に初めてのFMDの発生報告がなされ (Komuro, 1962; Fig. 1-5 B)、病徴からウイルス病ではないかと疑われていた。このようにFMDはウイルスを病原とする病気であると常に疑われてきたものの、機械接種が成功しないこと、慣行の手順ではウイルス粒子が十分に精製できないことから病原ウイルスの同定は困難を極めた。

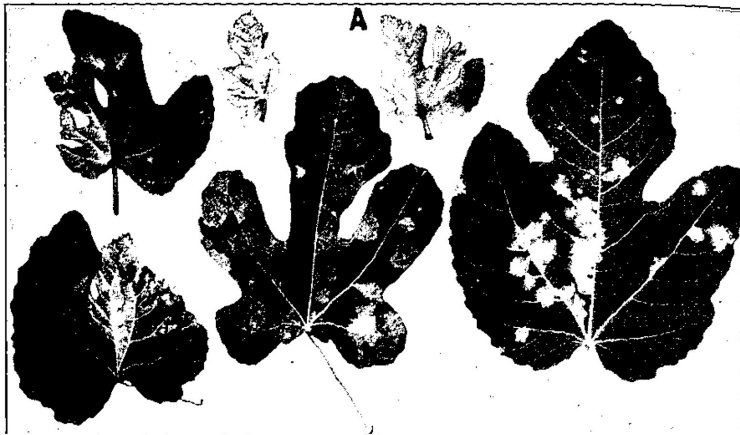
FMDの病原ウイルスを同定するために、様々な方法によるウイルス接種、ウイルス粒子精製などの同定の試みがなされてきたが、中でも感染葉細胞の透過型電子顕微鏡を用いた観察は盛んに行われてきた (Namba et al., 1979; Castellano et al., 2007; Elbeaino et al., 2007; Gattoni et al., 2009)。その過程で、多くのウイルスがFMDの病原の候補として挙げられてきたが、多くの場合、FMDの病徴を呈する葉には直径90~200 nm程度の二重膜に包まれた球状の構造物 (double membrane bodies: DMB) が特異的に観察された (Fig. 1-7)。このことから、このDMBがFMDの病原ウイルス粒子ではないかと考えられてきた。しかしながら、FMDの初報告から80年の間、実験的にウイルスを検出する試みはいずれも成功することがなかった。



(Walia et al., 2009)

Fig. 1-4 イチジクモザイク病による病徴

イチジクモザイク病に感染したイチジク。葉に激しい退緑症状を呈している。

A

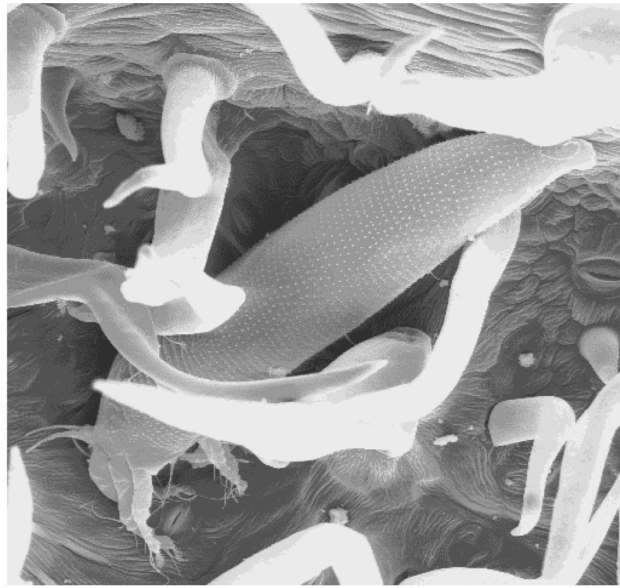
(Condit & Horne, 1933)

B

(Komuro, 1962)

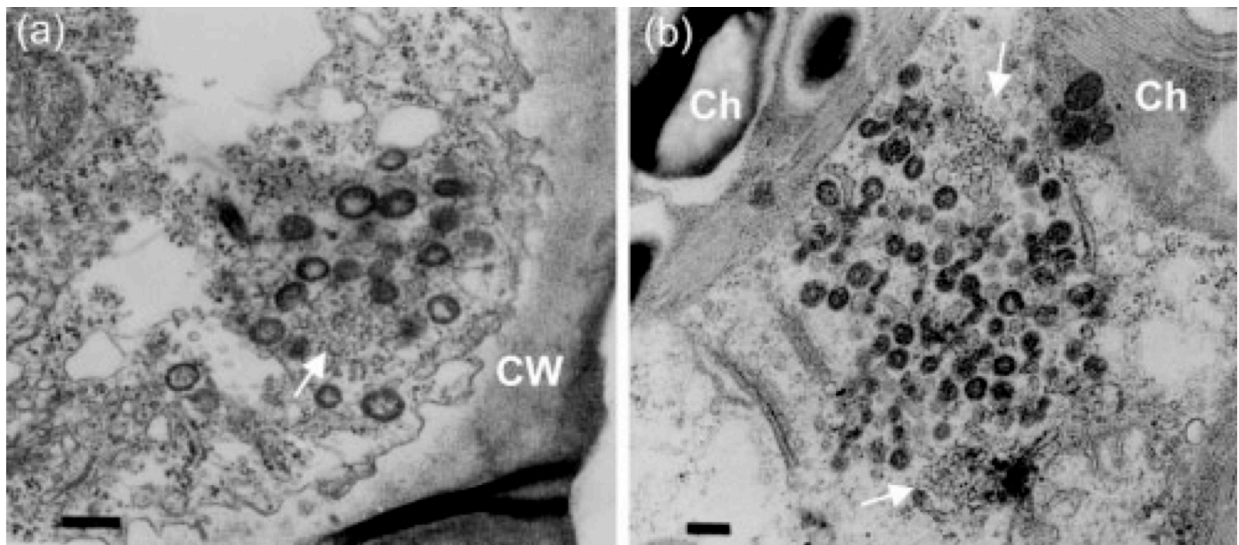
Fig. 1-5 イチジクモザイク病の報告

- (A) 世界で初めてのイチジクモザイク病の報告。葉にモザイク、奇形、輪紋などの症状が現れている。
- (B) 日本で初めてのイチジクモザイク病の報告。葉が激しい奇形症状を呈している。



(Serrano et al., 2004)

Fig. 1-6 イチジクモンサビダニの走査型電子顕微鏡観察像



(Elbeaino et al., 2009a)

Fig. 1-7 FMD 感染イチジク葉の電子顕微鏡観察

黒い円形の構造物が膜に二重に覆われた、感染イチジク特異的に見出される構造物 (DMB)。DMB に付随して観察される凝集したひも状の構造物が白い矢印で示されている。CW: 細胞壁。Ch: 葉緑体。Bars = 200 nm。

*Fig mosaic virus*の同定

2009年にFMDの病徴を呈するイチジクから新規マイナス鎖RNAウイルスが発見された (Elbeaino et al., 2009a; Walia et al., 2009)。ウイルスの同定には、RNAウイルスが複製時に2本鎖RNAを形成することを利用し、植物体から2本鎖RNAを特異的に抽出することで、ウイルスRNAを網羅的に回収する手法が用いられた。このようにしてFMD感染イチジクから精製された二本鎖RNAの塩基配列を解読すると、2005年に報告されたウイルス *European mountain ash ringspot-associated virus* と相同性を示す配列が得られた (Benthack et al., 2005)。この配列はFMDの病徴を示すイチジクから非常に高い割合で検出されたため、本ウイルスは *Fig mosaic virus* (FMV) と名付けられ、FMDの病原として提案された。その後イチジクモンサビダニを用いた接種実験により、FMVが病徴と一致して伝染することが確認されたため (Çağlayan et al., 2010)、FMVがFMDの病原であると決定された。FMVは同定から2015年12月現在に至るまでに多くの国で発生が確認されており (Fig. 1-8)、イチジクが栽培されているほとんどの国で発生していると考えられる (Elbeaino et al., 2009a; Walia et al., 2009; Çağlayan et al., 2010; Elbeaino et al., 2011; Elbeshehy and Elbeaino, 2011; Alhudaib, 2012; Minafra et al., 2012; Shahmirzaie et al., 2012)。



Fig. 1-8 FMV の発生が確認された地域

1. 4. FMVの性状

ウイルス学的性状

FMVは、マイナス鎖RNAウイルスの *Emaravirus* 属 (科には未帰属) に分類され、フシダニの一種であるイチジクモンサビダニ (*Aceria Ficus*) の吸汁、または感染個体を挿し木、接ぎ木することにより媒介される。媒介虫体内でウイルスの増殖が起るかは確かめられていない。ウイルスの物理的接触による伝搬は起らないと考えられる。その自然宿主はイチジク属植物に限られると考えられ、現在までにFMVの検出が報告されているのはイチジクのみである。実験的にはイチジクモンサビダニを用いた接種によってニチニチソウに感染するとの報告がある (Çağlayan et al., 2012)。

粒子は、宿主の膜を収奪して外膜 (エンベロープ) として纏っていると考えられ、90–200 nmの球状である (Fig. 1-9)。glycoproteinと呼ばれるタンパク質がスパイクの様にエンベロープを貫き、その被覆に関わっているとされる。粒子中にはヌcleoキャプシドタンパク質 (nucleocapsid protein: NP) と呼ばれるタンパク質がウイルスRNA複製酵素 (RNA-dependent RNA polymerase: RdRp) やウイルスゲノムRNAと結合して含まれていると考えられている (Patil and Kumar, 2015)。しかし、これらは全てその他のマイナス鎖RNAウイルスからの類推によるもので、粒子の構造やタンパク質の機能は実験的に証明されていない。

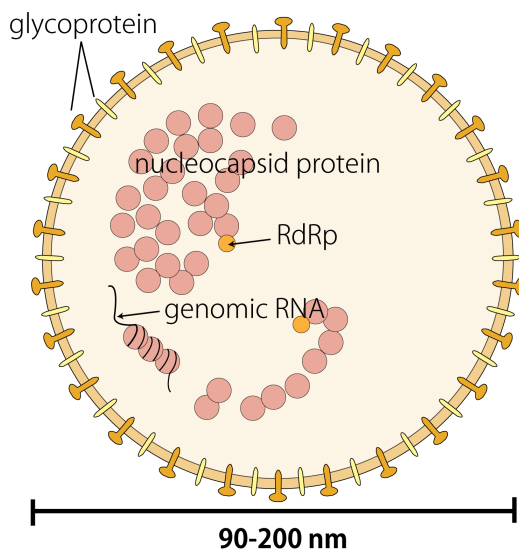


Fig. 1-9

FMVの粒子模式図

黄色で示されるものが glycoprotein。宿主由来の膜をスパイク状に貫いている。緑で示されるものが nucleocapsid protein (NP)。ゲノム RNA やウイルス RNA 複製酵素 (RdRp) と結合して粒子中に含まれると考えられる。

FMVの遺伝子構造

FMVイタリア分離株は全長7,039 塩基 (nucleotide: nt)のRNA1を有し、40 ntから6,933 ntにORF1が存在する (Fig. 1-10; Elbeaino et al., 2009b)。ORF1には全長2,298 aa (264 kDa) のRdRpがコードされると考えられている。RdRpは同じくマイナスRNA鎖ウイルスである *Bunyavirus*科ウイルスのRdRpと全長で13%以下の弱い配列同一性がある。また、*Bunyavirus*科ウイルスのRdRpの共通の6つのモチーフ (pre motif A、motif A-E) が保存されている。植物マイナス鎖RNAウイルスでRdRpの機能が実験的に検証された例はないが、動物ウイルスのRdRpとの相同性から、複製・翻訳に必須の機能があると推察されている。

FMVイタリア分離株は全長2,252 ntのRNA2を有し、53 ntから1,978 ntにORF2が存在する (Fig. 1-10; Elbeaino et al., 2009b)。ORF2には全長642 aa (73 kDa) の glycoprotein 前駆体がコードされると考えられている。*Bunyavirus*科ウイルスの glycoproteinと全長で8%以下の弱い配列同一性がある。*Bunyavirus*科ウイルスとの比較と、配列を用いたソフトウェア予測より、glycoprotein前駆体にはN末端に長さ24 aaのシグナルペプチドが予測されている。その切断を伴って宿主の分泌経路に入った glycoprotein前駆体は、宿主内のプロテアーゼによりプロセッシングを受け、2つの成熟した glycoprotein、Gn (21.5 kDa) と Gc (51.7 kDa) となると予測されている。Gnに2カ所、Gcに1カ所膜貫通領域が予測されており、これらの膜貫通領域が粒子形成の際にスパイクの様にエンベロープを貫き、それらを纏う機能に働いていると考えられている (King et al., 2011)。

FMVイタリア分離株は全長1,490 ntのRNA3を有し、100 ntから1,047 ntにORF3が存在する (Fig. 1-10; Elbeaino et al., 2009b)。ORF3には315 aa (35 kDa) のp3がコードされると考えられている。同じく *Emaravirus*属ウイルスである *Pigeonpea sterility mosaic virus*において粒子精製を試みた際に、分子量が32 kDaのタンパク質が主に回収されており、本タンパク質は主要な構造タンパク質であるNPではないかと推定されていた (Kumar et al., 2003)。この32 kDa のタンパク質とFMVのORF3にコードされるタンパク質p3と配列が相同であったことから、p3はNPではないかと考えられた (Elbeaino et

al., 2009b)。NPはマイナス鎖RNAウイルスに共通の構造タンパク質であり、ゲノムRNA、RdRpと結合し、エンベロープで被覆された粒子中に含まれていると考えられているが、*Bunyavirus*科ウイルスなど他属のウイルスのNPと配列相同性は認められない。NPは動物マイナス鎖RNAウイルスにおいては複製、翻訳に必須であることが報告されている (King et al., 2011; Ruigrok et al., 2011)。

FMVイタリア分離株は全長1,472 ntのRNA4を有し、82 ntから1,167 ntにORF4が存在する。ORF4には361 aa (40.5 kDa) の機能未知のタンパク質がコードされられている (Fig. 1-10; Elbeaino et al., 2009b)。

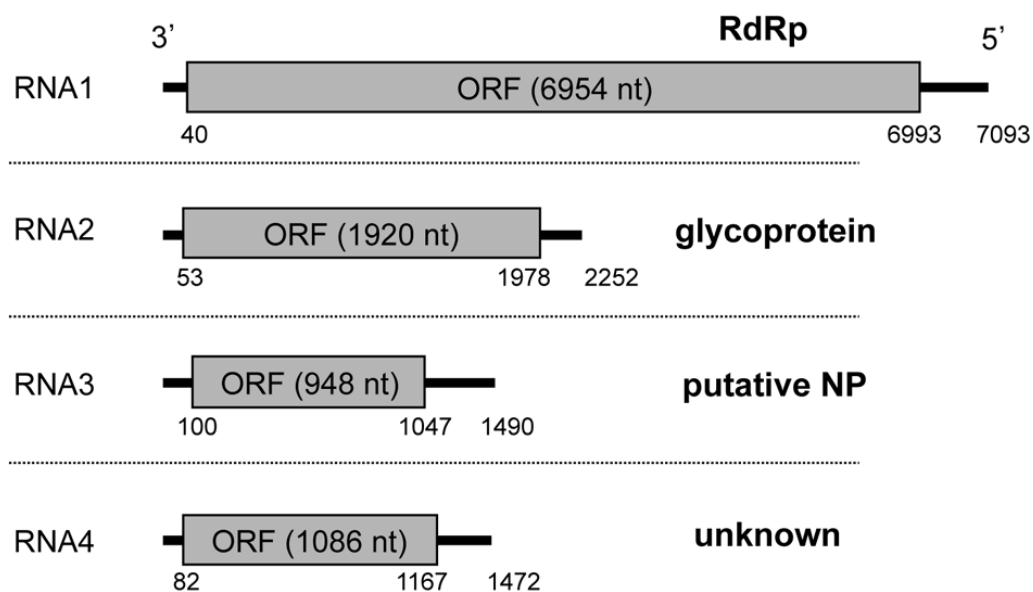


Fig. 1-10 FMV の予想全ゲノム図

Elbeaino et al., 2009b をもとに作成。

FMVの分類学的位置づけ

FMVは2009年に作られた新規ウイルス属である *Emaravirus* 属に分類される (Anonymous, 2015b)。 *Emaravirus* 属にはFMVを含め、2010年4月時点 (本研究開始時) で4種のウイルスが報告されていた。最初に配列が同定されたのは *Pigeonpea sterility mosaic virus* (PPSMV) で2003年にNPをコードすると考えられるセグメントの配列が報告された (Kumar et al., 2003)。次にwheat mosaic virus (WMoV) のNPをコードするセグメントの部分配列が2006年に報告された (Skare et al., 2006)。2007年に *European mountain ash ringspot-associated virus* (EMARaV) の4本のゲノムセグメントの配列が報告され (Mielke and Muehlbach, 2007)、次いで2009年に *Fig mosaic virus* (FMV) のゲノムが報告された (Elbeaino et al., 2009b)。これらのウイルスはいずれも4つ以上のセグメントを有すると考えられており、1つのセグメントに1つのORFが存在する (Mielke and Mühlbach, 2012)。各ウイルスについて、2010年4月時点でそれぞれのセグメントにコードされると考えられているタンパク質をTable 1-2に示す。2015年12月現在においては、ゲノムセグメントとウイルス種数が増えているが、その点については後述する。FMVはNP配列においてEMARaV、RRV、WMoV、PPSMVとそれぞれ、39%、60%、20%、22%の配列同一性を有する。またこれらのウイルス間では、セグメント両末端の13塩基の配列が完全に保存されている (Fig. 1-11)。この性質は分節マイナス鎖ウイルスの多くに見られる性質であり、 *Emaravirus* 属の両末端13塩基は *Bunyavirus* 科の *Orthobunyavirus* 属、 *Hantavirus* 属 (いずれも動物ウイルス属) と相同性が見られる。さらに生物学的性状の観点からも、 *Emaravirus* 属ウイルスはいずれもフシダニによって伝搬されるという共通の特徴を有する。

Table 1-2 Emaravirus 属ウイルスのゲノム構成 (2010 年 4 月当時)

Virus species	RNA1	RNA2	RNA3	RNA4	RNA5	RNA6
FMV	7018 nt 268 kDa RdRp	2253 nt 73 kDa glycoprotein	1490 nt 35 kDa NP	1485 nt 41 kDa unknown	-	-
EMARaV	7093 nt 266 kDa RdRp	2335 nt 75 kDa glycoprotein	1559 nt 35 kDa NP	1348 nt 27 kDa unknown	-	-
WMOV	7-8 kb?	2.5-2 kb?	1.4 kb 32 kDa NP	?	?	?
PPSMV	6.8 kb?	2.7 kb?	2.1 kb?	1.6 kb?	1.4 kb? 32 kDa NP	1.2 kb?

<i>Emaravirus</i>	AGU AGU GUU CUC C...	...G GAG UUC ACU ACU
<i>Orthobunyavirus</i>	AGU AGU GU_g CU...	...AG U_aC ACU ACU
<i>Hantavirus</i>	u AGU AGU GU_g CU...	...AG U_cu ACU ACU_a
<i>Tospovirus</i>	AG_a g c a a U...	...a u u g c u CU
<i>Nairovirus</i>	u c U c a a a g...	...c u u u g A g a
<i>Phlebovirus</i>	A c a c a a a g...	...c u u u g u g U
<i>Tenuivirus</i>	A c a c a a a g...	...c u A u g u g U

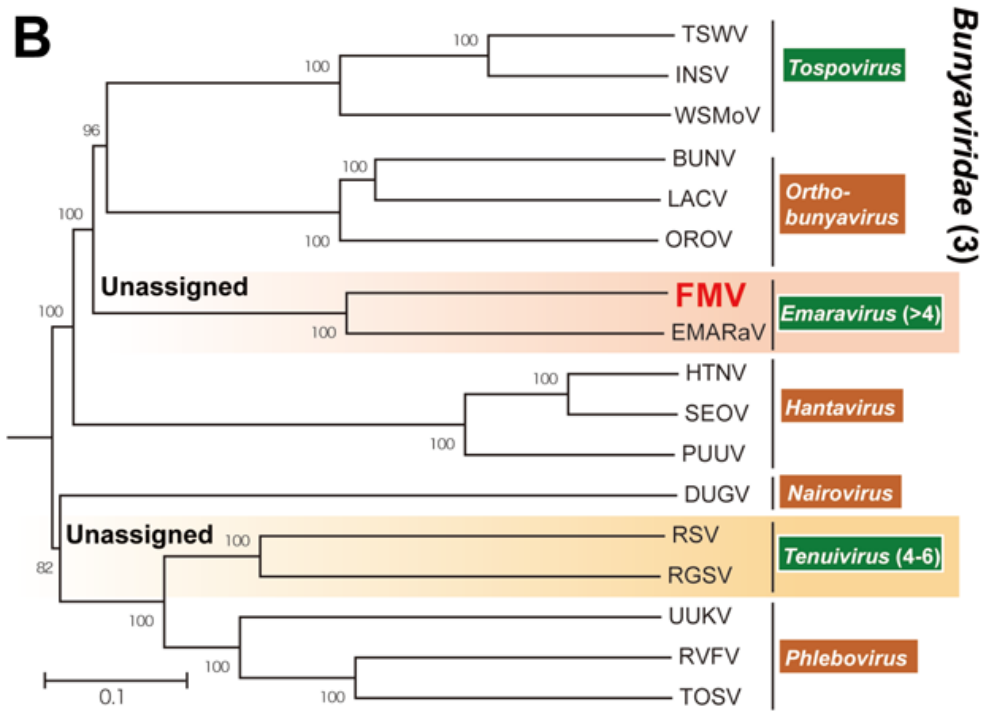
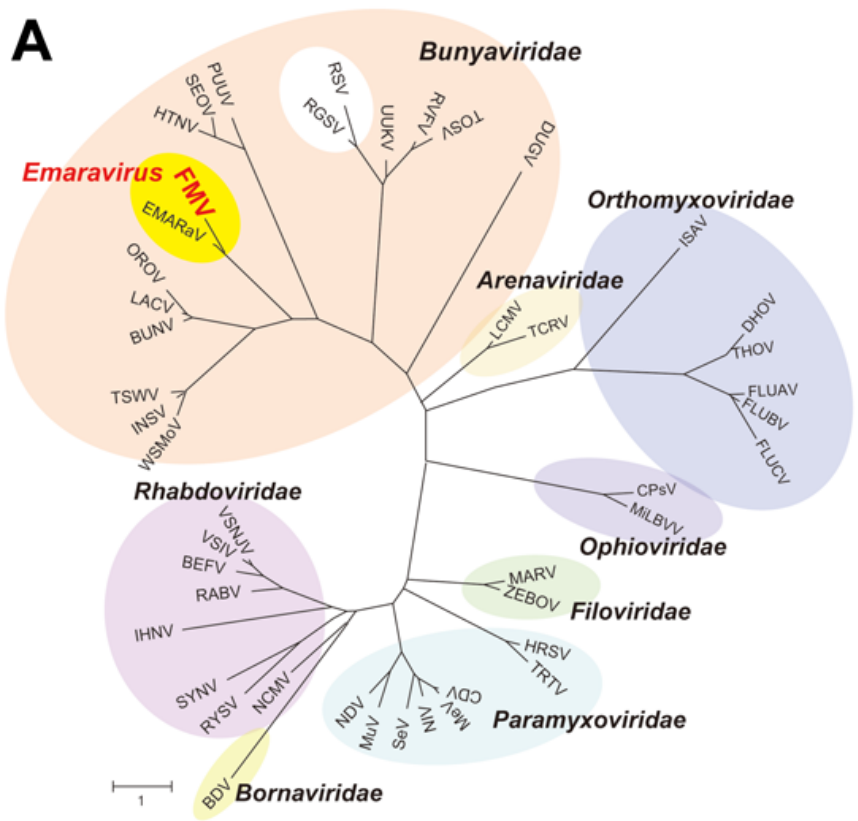
Fig. 1-11

分節マイナス鎖ウイルスの各属に保存されるゲノムセグメント両末端の配列

大文字で表示されている塩基は *Emaravirus* 属ウイルスの末端配列と同一であることを示す。

*Emaravirus*属の分類

マイナス鎖RNAウイルスにおけるFMVの属する *Emaravirus*属の位置付けを本項で説明する。全てのマイナス鎖RNAウイルスは、RdRp配列を用いた分子系統解析では一つの系統樹上に表され、共通の祖先を有することが示唆されている (Fig. 1-12 A; Kormelink et al., 2011)。分子系統樹ではFMVの属する *Emaravirus*属は、動物ウイルス属と植物ウイルス属が混在する *Bunyavirus*科に含まれるが (Fig. 1-12 B)、ゲノム構成が *Bunyavirus*科のウイルスと大きく異なる。すなわち、全ての *Bunyavirus*科ウイルスのゲノムが3つのセグメント、L segment、M segment、S segmentから構成されるのに対し、*Emaravirus*属に分類されるウイルスは4本以上のゲノムセグメントを有することが示唆されている。本性状の違いから *Emaravirus*属はいずれの科にも分類されない未帰属の分類群となっている。



(前頁)Fig. 1-12 マイナス鎖 RNA ウイルスの分子系統関係

(A) マイナス鎖 RNA ウイルスの RdRp アミノ酸配列を用いた無根系統樹。Kormelink et al., 2011 をもとに作成。

(B) *Bunyavirus* 科とその近縁のウイルスの RdRp アミノ酸配列を用いた分子系統樹。*Tenuivirus* 属と *Emaravirus* 属はいずれのウイルス科にも属さない。ウイルス属名が緑の四角で囲まれているウイルスは植物ウイルス属、茶色の四角で囲まれているのは動物ウイルス属。属名後の括弧の中の数値は属するウイルスのゲノムセグメント数。各ノードに表記されている数字はブートストラップ値 (%) である。アウトグループには Influenza A virus の配列を用いた。

スケールバーは一塩基あたりの置換率を示す。ウイルス略号は以下の通り。Borna disease virus (BDV), Bovine ephemeral fever virus (BEFV), Bunyamwera virus (BUNV), Canine distemper virus (CDV), Citrus psorosis virus (CPsV), Dhori virus (DHOV), Dugbe virus (DUGV), Hantaan virus (HTNV), Human respiratory syncytial virus (HRSV), Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV), Infectious salmon anemia virus (ISAV), Influenza A virus (FLUAV), Influenza B virus (FLUBV), Influenza C virus (FLUCV), Impatiens necrotic spot virus (INSV), La Crosse virus (LACV), Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV), Marburg virus (MARV), Measles virus (MEV), Mirafiori lettuce big-vein virus (MiLBVV), Mumps virus (MuV), Newcastle disease virus (NDV), Nipah virus (NIV), Northern cereal mosaic virus (NCMV), Puumala virus (PUUV), Rice grassy stunt virus (RGSV), Rice stripe virus (RSV), Rice yellow stunt virus (RYSV), Rift Valley fever virus (RVFV), Sendai virus (SeV), Seoul virus (SEOV), Sonchus yellow net virus (SYNV), Tacaribe virus (TCRV), Thogoto virus (THOV), Tomato spotted wilt virus (TSWV), Toscana virus (TOSV), Turkey rhinotracheitis virus (TRTV), Uukueniemi virus (UUKV), Vesicular stomatitis Indiana virus (VSIV), Vesicular stomatitis New Jersey virus (VSNJV), Watermelon silver mottle virus (WSMoV), Zaire Ebola virus (ZEBOV).

1.5. 研究対象としての FMV と本研究の目的

現在の定義では、キャプシドに覆われたゲノム核酸を有する微小な細胞内寄生体を「ウイルス」と総称している。その特異な性質から一見すると全てのウイルスは生物学的に互いに近いものであると思われるが、ある観点からは「ウイルス」はどの生物よりも幅広く複雑な概念であると言える。それはウイルス全体を見たときに、ほとんどのウイルス間で、ゲノムの一部領域にすら配列の相同性が認められないことや、RNAウイルスとDNAウイルスとで遺伝情報の乗っている核酸の種類が異なることから推察される。細胞を有するすべての生物が、リボソームRNAの配列を用いて一つの系統樹上に示されることや (Woese, 1987)、共通の遺伝情報としてDNAを有していることと比較すると、ウイルスがいかにか統一されていない概念か理解出来る。

しかし一方で、ゲノム配列に相同性のないウイルス間で驚くほど共通する性質が見出される。ほとんどの植物ウイルスがゲノムを保護するキャプシド、複製酵素、サイレンシングサプレッサーや移行タンパク質といった共通の機能を有するタンパク質を有し、これらのタンパク質を用いて宿主細胞機能の一部を搾取している。これはこれらの機構が、ウイルスが細胞内で増殖するための必須の機構であり、同時にあらゆる種類の植物細胞に共通した生存のために重要な機構である事を示している。すなわち、様々なウイルスの感染環を詳しく調べることで、より詳細なウイルスの普遍的な性状が見えてくると同時に、これまで不明であった重要な細胞機能も明らかとなってくると考えられる。

マイナス鎖RNAウイルスは、報告数が少ないことに加え、研究手法が制限されることが多いことから、これまでの植物ウイルス学においてその研究は疎かにされてきたと言える。マイナス鎖RNAウイルスの中でもFMVは、実験的に不都合な条件が揃っており、その性状はほとんどが謎に包まれている。以下にその条件を具体的に説明する。

第一に、周辺知見が非常に乏しい点が挙げられる。植物マイナス鎖RNAウイルスは全体としての知見が乏しい上に、FMVが属する *Emaravirus* 属は近年提案されたウイルス属で、そこに属するいずれのウイルスも基本的性状に関する知見がほとんどない。これらの要因がその他のウイルスとの比較解析を困難とし、研究の着想を妨げる原因となっている。

第二に、植物体へのウイルス接種が困難であることが挙げられる。ウイルスを実験植物に接種する場合、感染植物を適当なバッファーで磨砕し、粗汁液を物理的にこすり付ける方法が一般的であるが、FMVはこの方法で接種した際に感染性を示さない。媒介虫であるイチジクモンサビダニでの接種は可能であるが、イチジクモンサビダニは宿主がイチジク属植物に制限される。イチジク属植物は木本植物のみから構成され、実験に好適な生育の早い草本植物が存在しないため、媒介虫を用いた接種は実用的でない。さらにイチジクモンサビダニは体長が約0.2 mmで肉眼での確認が困難である上に、適切な環境条件下でなければ繁殖せず、維持・管理が難しい。これらのことからFMVは接種実験が難しく、ウイルスとして解析できる研究手法が大きく制限される。

第三に、粒子の精製が困難であることが挙げられる。ウイルス粒子の構成要素や粒子に含まれるゲノムを解析する際に、ウイルスの粒子精製は不可欠である。FMVの粒子は部分的に精製することは可能であるが、純度が低く、解析の妨げとなる。

第四に、ウイルスの感染性cDNAクローンが作製されていないことが挙げられる。感染性cDNAクローンとは、感染性ウイルスのゲノムを作るための鋳型となるRNAを、宿主細胞内で転写させることのできるようにクローン化されたcDNA配列を指す。感染性cDNAクローンを用いることで、人為的に変異や付加配列を導入したウイルスを作製することが可能であり、逆遺伝学的解析を行うために必須なツールである。最近、植物のマイナス鎖RNAウイルスで初めて完全長のcDNA感染性クローンが作製されたが (Wang et al., 2015)、FMVを含めた分節ゲノムを有する植物マイナス鎖RNAウイルスでは感染性cDNAクローンの作製に成功した例は未だない。

以上のことからFMVの研究には多くの困難が予測されたが、本研究では新規のウイルスFMVを国内で初めて同定したことを契機とし、その基本的性状を解き明かすと共に、ゲノムにコードされるタンパク質機能の解析を細胞生物学的に行い、FMVの感染環を解明することを目指した。

第2章 国内で初めてのFMVの検出

2.1. 序論

本章では、

国内で初めてイチジクモザイクウイルス (fig mosaic virus: FMV)を検出・報告した。

島根県のイチジクに発生したモザイクなどの症状

島根県はイチジクの生産量こそ全国16位（2011年；農林水産省統計より）であるが、地域ブランドとして高付加価値化し販売単価は全国でもトップクラスを誇っている。なかでも出雲市多伎町には多岐いちじく館や多岐いちじく温泉などが存在し、イチジクの栽培が町をあげた地域振興策の一つとなっている。多岐いちじく館ではコンテナを用いた温室加温栽培を行い（Fig. 2-1）、収穫したイチジクを同施設の直売所で販売している。2010年に本施設を含む複数の多岐町のイチジク圃場においてイチジクの葉にモザイクなどの症状が多発し問題となった。病徴を呈するのは品種「蓬萊柿」で、多岐町のイチジク圃場の約半数で発生しており、発病樹は多伎町で植栽されるイチジクの約10%にのぼると推計された。これを受け、2010年4月に島根県農業技術センターより東京大学植物病院に診断依頼があった。我々は、症状がイチジクモザイク病に酷似していることから、これらのイチジクにFMVが感染しているのではないかと考え様々な検証を行った。



Fig. 2-1 **イチジク生産の様子**

多岐いちじく館におけるイチジク栽培。イチジクをコンテナに植栽し、温室で加温栽培を行っている。

2. 2. 材料及び方法

2. 2. 1. 供試植物

島根県のイチジク圃場にて、品種「蓬萊柿」より少なくとも個体の一部に病徴を呈する 8 個体から、病徴葉を 1 枚ずつ、同 8 個体のうち 3 個体から無病徴葉 1 枚ずつ、さらに健全イチジク 3 個体から 1 枚ずつ、合計 14 枚の葉を採集した。これらのイチジクの葉を以降の病徴観察および RNA 抽出に供した。イチジクの果実における病徴は発生圃場にて観察・撮影した。

2. 2. 2. 媒介虫の走査型電子顕微鏡による観察

病徴を呈するイチジク葉に発生していたイチジクモンサビダニと思われるダニを採集し、走査型電子顕微鏡観察に供した。1% (w/v) 四酸化オスミウムで固定し、Hitachi S3000 走査型電子顕微鏡を用いて観察した。

2. 2. 3. イチジク RNA の抽出

病徴葉に関しては病徴を呈する領域を、無病徴葉に関しては無作為に切り出して、全 RNA を抽出した。0.2 g の植物組織を液体窒素にて磨砕し、RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用い、附属のマニュアルに従って RNA 抽出を行った。

2. 2. 4. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

抽出したイチジク全 RNA に対して RT-PCR を行った。約 500 ng の抽出全 RNA をテンプレートとし、逆転写反応 (reverse transcription) を行った。プライマーには 9 塩基長のランダムプライマー、Random Primer (N) 9 (TaKaRa) を用いた。合計容量 10 μ l に対し、逆転写酵素 Cloned AMV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) を 2.5 Unit、Ribonuclease Inhibitor (TaKaRa) を 10 Unit 添加し、30°C 10 min、42°C 30 min、70°C 15 min で行った。

逆転写産物 1 μ l をテンプレートとし、FMV の *RdRp* 遺伝子の 300 nt を特異的に

増幅するプライマーセット、E5-s (5'- CGG TAG CAA ATG GAA TGA AA -3') と E5-a (5'- AAC ACT GTT TTT GCG ATT GG -3') を用い cDNA に対して PCR を行った (Elbeaino et al., 2009a; Fig.2-2)。合計容量 10 μ l に対し、0.5 Unit の TaKaRa LA Taq (TaKaRa) を使用した。反応時間は、94°C 4 min の後、94°C 30 s、54°C 45 s、68°C 1 min を 1 サイクルとして 35 サイクル、68°C 7 min で行った。反応終了後、2%(w/v) agarose を Tris-acetate-EDTA (TAE) Buffer (40 mM Tris, 20 mM acetic acid, 1mM EDTA[pH 8.0])に溶解したアガロースゲルにより電気泳動を行い、目的の DNA 断片が増幅されているかを確認した。サイズマーカーは、100 bp Ladder (TaKaRa) を用いた。

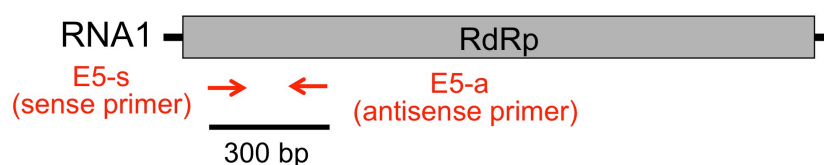


Fig. 2-2 FMV RdRp 遺伝子の特異的に増幅するプライマー

2.2.5. ダイレクトシーケンス

得られた PCR 産物が FMV 由来の配列であるか確認するため、DyeDeoxy Terminator 法 (Life Technologies) によるダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。5 μ l の PCR 産物に対して、2 μ l の ExoSAP-IT (GE Healthcare) を加え、37°C で 15 min、80°C で 15 min 処理し、PCR 反応時の余剰なプライマーおよび dNTP を不活化した。50–250 ng 相当の増幅 DNA を含む反応溶液と、E5-s および E5-a プライマーを用い、10 μ l の反応容量でシーケンス反応を行った。96°C 3 min の後、96°C 15 s、48°C 30 s、60°C 4 min を 1 サイクルとして 25 サイクルを行った。リアクション後の試料を純化するため、カラム Sephadex G-50 SuperFine (GE Healthcare) により精製した。精製した試料を乾燥し、15 μ l のホルムアミドで溶解し、よく混和した。95°C で 5 min 熱処理し、直ちに氷水中で急冷させて、変性処理を行った。熱変性後、PRISM 3130 DNA Sequencer (Life Technologies) により塩基配列の解読を行った。塩基配列の解析には DNA 解析ソフトウェア ATGC Ver. 4.2 (GENETYX Corp.) を用い

た。決定された塩基配列について、NCBI (National Center for Biotechnology Information) のサーバーを利用し、BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) による相同性検索を行った。

2.2.6. 分子系統解析

決定塩基配列と相同性のある既報の FMV 配列を GenBank データベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) より入手した。CLUSTALW アルゴリズム (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>) により塩基配列のアラインメントを行い (Thompson et al., 1994)、アラインメント配列を基に近隣結合法に基づく系統樹を作成した。進化モデルは Kimura 2-parameter model (Kimura, 1980) を使用し、系統樹描画には、MEGA 5.0 (Tamura et al., 2011) を用いた。ブートストラップ解析は 1,000 反復を行った。

2.2.7. 抗 NP 抗体の作成 -コンピテントセルの作成-

前培養として、グリセロールを含む培地中で -80°C で保存されていた BL21 株を 2 ml の LB 液体培地中で 37°C 、一晚振盪培養した。培養液 0.5 ml を 50 ml の LB 液体培地に植え継ぎ、 $\text{O.D.}_{600} = 0.4$ 前後まで 37°C で振盪培養した後、氷水中に 30 min 以上静置して急冷した。 $3,000 \times g$ 、 4°C で 10 min 遠心し集菌した後に、上清を除去し、氷上で 50 mM CaCl_2 溶液を 25 ml 加え、穏やかに懸濁した。氷上で 60 min 以上静置した後、 $3,000 \times g$ 、 4°C で 10 min 遠心して集菌した後、上清を除去し、50 mM CaCl_2 、25%(v/v) Glycerol 溶液を 2.5 ml 加えて再懸濁した。適量 (50 μl) ずつ 1.5 ml チューブに分注し、液体窒素で瞬間凍結させたいえ -80°C で保存した。

2.2.8. 抗 NP 抗体の作成 - pET30a ベクターへのクローニング -

FMV の NP 遺伝子コード領域を PCR で増幅し、大腸菌の発現ベクター pET30a ベクター (Novagen) にクローニングした。NP 遺伝子が座する RNA3 のシークエンスについては第 3 章で記述する。FMV の NP 遺伝子領域を増幅するための PCR 反応は、

酵素として KOD Plus (TOYOBO) を用い、反応時間は、94°C 2 min の後、94°C 15 s、55°C 30 s、68°C 1 min 30 s を 35 サイクル、68°C 7 min で行った。この際、制限酵素サイトとして、NcoI および XhoI の切断配列をプライマーに付加し PCR を行った。増幅産物をフェノール・クロロホルム処理とエタノール沈殿し、適当量の DW で溶解した。続いて、増幅断片を NcoI および XhoI 両酵素により切断した。0.7% TAE アガロースゲルで泳動後、EtBr と UV で可視化し、目的サイズの DNA 断片を UltraClean 15 DNA Purification Kit (Mo Bio) を用いてゲルより精製した。精製方法は、付属のプロトコルに従った。同様に pET 30a ベクターも NcoI と XhoI 両酵素により消化し、ゲルより精製した。精製したインサートとベクターを Ligation-Convenience Kit (ニッポンジーン) を用いて 16°C、5 min で ligation させた。ligation 後のプラスミドに対して *E. coli* DH5 α コンピテントセル (Takara) 50 μ l を氷上で混合し、30 min 静置した。その後、42°C で 1 min 熱ショックを与え、5 min 氷上で静置した。続いて、SOC 液体培地 (bacto-tryptone 20 g/l, yeast extract 5 g/l, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM glucose) を 1 ml 加え、37°C で 1 h 振盪培養した。形質転換された大腸菌を、LB/ Kanamycin (1 l あたり bacto-tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g, agarose 15 g, kanamycin 50 mg) 平板培地にプレーティングし、37°C で一晩置いた。培養後、形成の確認されたコロニーを LB/ Kanamycin 液体培地で 37°C、16 h 振盪培養した。培養後、アルカリ SDS (sodium dodecyl sulfate)法を用いた自動核酸分離装置 GENE PREP STAR PI-80 (Kurabo)でプラスミドを精製し、NP 遺伝子の挿入をインサート配列を増幅したプライマーセットを用いた PCR で確認した。挿入が確認された pET30a プラスミドベクターを *E. coli* BL21 株に形質転換した。

2. 2. 9. 抗 NP 抗体の作成 -リコンビナントタンパク質の発現誘導と発現の確認-

NP 遺伝子が挿入されている pET 30a ベクターを有する BL21 株を、2×YT / Kanamycin 液体培地 5 ml に植え継ぎ、前培養として 37°C で一晩振盪培養した。前培養後の培養液 2 ml を、50 ml の 2×YT / Kanamycin 液体培地に植え継ぎ、本培養として O.D.₆₀₀ = 0.7 付近になるまで 37 °C で振盪培養した。培養後、

isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)を終濃度 1 mM になるように加えて NP タンパク質の発現を誘導した。37°C で振盪培養を継続し、その後 3 h 後まで 1 h おきに 10 ml の培養液を採取した。すべての培養液を 3,000 \times g、4°C で 15 min 遠心して集菌した。上清を完全に除去し、沈殿した大腸菌の菌体を-20°C で保存した。

2. 2. 10. 抗 NP 抗体の作成 -SDS-PAGE および CBB 染色-

集菌した NP 発現大腸菌を、10 ml の培養液あたり 0.4 ml の Binding buffer (500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.9, 5 mM imidazole) に懸濁した。氷上で超音波破碎した後、破碎液を 12,000 \times g、4°C で 15 min 遠心し、可溶性画分（上清）と不溶性画分（沈殿）に分離した。不溶性画分には 0.4 ml の Binding buffer を加え、再懸濁した。可溶性画分および不溶性画分に、4 \times SDS-PAGE sample buffer (0.2 M Tris-HCl [pH 6.8], 8% SDS, 40% glycerol, 0.01-0.1% Bromophenol Blue [BPB]) を 1/3 量ずつそれぞれ加えた。95°C で 5 min 熱変性を行い、SDS-PAGE に供試した。ゲル組成は、Running ゲル (15 % [v/v] polyacrylamide, 373 mM Tris-HCl [pH 8.8], 0.1% SDS) とし、Stacking ゲル (4.5 % polyacrylamide, 124 mM Tris-HCl [pH 6.8], 0.1% SDS) とした。ゲル調製液を脱気した後に、終濃度がそれぞれ 0.1%(v/v) となるように APS (ammonium persulfate) および TEMED (*N,N,N',N'*-tetramethyl-ethylenediamine) を加え、ゲルを作成した。泳動バッファーとして Running Buffer (25 mM Tris, 190 mM glycine, 0.1% SDS) を用いた。泳動後の染色は、Quick-CBB 染色キット (Wako) を用いた。

2. 2. 11. 抗 NP 抗体の作成 -リコンビナントタンパク質の精製-

His-tag が付加された大腸菌発現タンパク質をアフィニティー精製した。2.2.9 で記述した方法にて NP の発現を誘導し、回収した菌体を、集菌前の培養液 100 ml あたり 5 ml の Binding Buffer (500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl [pH 7.9], 5 mM imidazole) に懸濁した。氷水上で超音波破碎した後、12,000 \times g、4°C で 15 min 遠心し、可溶性画分（上清）を除いて不溶性画分（沈殿）を得た。不溶性画分に 5 ml の Binding Buffer

を加え再懸濁した。12,000 ×g、4°C で 15 min 遠心し、上清を除いて不溶性画分を得た。不溶性画分に 6 M Urea を含む Binding Buffer を 5 ml 加え、よく懸濁し 4°C で 1 h 静置した。また、この段階で 50 μl を採取し、全タンパク質として 4°C で保存した。PD-10 カラム (GE healthcare) に、50%スラリーの His-tag bind resin (Qiagen) を 2 ml 入れ、カラムを作成した。樹脂を樹脂容量 (1 ml) の 3 倍量の滅菌水で洗浄し、樹脂容量の 5 倍量の Charge Buffer (50 mM NiSO₄) をカラムにアプライして樹脂にニッケルイオンをキレートした。樹脂容量の 3 倍量の 6 M Urea 入り Binding Buffer をアプライしてカラムを平衡化した後に、不溶性画分のタンパク質溶液をアプライした。この際に溶出した不溶性画分のタンパク質溶液を再度アプライし、樹脂に His-tag 融合 NP を十分に吸着させた。樹脂容量の 10 倍量の 6 M Urea 入り Binding Buffer と、樹脂容量の 6 倍量の 6 M Urea 入り Wash Buffer (500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl [pH 7.9], 60 mM imidazole) をアプライし、カラムを洗浄した。その後、樹脂容量の 6 倍量の 6 M Urea 入り Elute Buffer (500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl [pH 7.9], 1 M imidazole) をアプライし、吸着したタンパク質を溶出した。溶出された画分と、各段階でサンプリングしておいた画分を、それぞれ SDS-PAGE に供しタンパク質の洗浄・溶出効率を確認した。

2. 2. 12. 抗 NP 抗体の作成 -血清からの抗体の精製と反応性の確認-

精製した抗原タンパク質を用いて家兔を免疫し、抗血清を得た。この過程は、Eurofins Biotechnologies 社へ委託した。得られた抗血清から免疫グロブリン G (immunoglobulin G: IgG) を精製するため、Protein A による精製を行った。IgG 精製の手順は以下の通りである。

Protein A sepharose CL-4B (GE healthcare)担体を Running Buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 150 mM NaCl, 0.05%[w/v] Sodium Azide)で洗浄し、Column PD-10, Empty (GE healthcare)に 2 ml スラリーを充填した。カラムに 10ml の Running Buffer を流し平衡化した後に、抗血清 1 ml と Running Buffer 1 ml を混ぜ、カラムにアプライした。Running Buffer 10 ml を 2 回流しカラムを洗浄し、Eluting Buffer (100

mM Glycine-HCl, pH 3.0) を 12 ml 流し、抗体を溶出させた。この際、溶出画分を 1ml ずつ分画した。各画分を分光光度計で OD₂₈₀ を測定し、IgG タンパク質濃度を算出した。十分に高い濃度の画分を精製された抗 NP 抗体として用いた。

2. 2. 13. ウェスタンブロット解析

抗体の反応性を確認するためにウェスタンブロット解析を行った。2.2.10 と同様にして、His-tag 融合 NP を発現する大腸菌から抽出した不溶性画分を処理し、SDS-PAGE を行った。ただし、サンプルのタンパク質濃度は約 100 ng/μl 程度に希釈して用いた。SDS-PAGE 後の泳動ゲルを、Blotting Buffer (100 mM Tris, 192 mM Glycine, 20%[v/v] Methanol) を用い polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレン (Millipore) にブロッティングした。ブロッティングにはセミドライ式のブロッティング装置 (Bio-rad) を用い、条件は 10 V 30 min の後、15 V 30 min で行った。ブロッティングの終わったメンブレンを Blocking Buffer (1×phosphate buffered saline [PBS], 0.1%[v/v] Tween20, 5%[w/v] skim milk) に浸けて室温で 1 h 振盪し、ブロッキングした。メンブレンを PBST (1×PBS, 0.1%[v/v] Tween20) で軽くすすぎ、一次抗体溶液 (約 0.7 μg/ml 抗 FMV-NP 抗体を 0.5%(v/v) スキムミルク in PBST に溶解したもの) に浸して 37°C で 1 h 静置した。メンブレンを PBST で 3 回洗浄し、二次抗体溶液 (2 次抗体を PBST で 1/3,000 に希釈したもの) に浸して 37°C で 1 h 静置した。二次抗体として、horseradish peroxidase で標識された抗ウサギ IgG ヤギ抗体 (Amersham Pharmacia Biotech) を用いた。メンブレンを PBST で 3 回洗浄し、ECL Western Blotting Reagent Pack (Amersham Pharmacia Biotech) に浸けた後、ハイブリバックに封じた。LAS 4000 mini (FUJI FILM) を用いてシグナルを検出した。

2. 2. 14. Double antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay (DAS-ELISA)

罹病イチジクから FMV を検出するために DAS-ELISA を行った。抗 NP 抗体 (一次抗体) を Coating Buffer (15 mM Na₂CO₃, 34.9 mM NaHCO₃, pH 9.6) により 300-1,000 倍に希釈し、200 μl をそれぞれマイクロタイタープレート (Nunc) の各ウェルに加えた。蒸発を防ぐためにプレートをシールし、30°C に 4 h 静置して一次抗体を固相化した。反応後、抗体希釈液を除き、200 μl の PBST で 4 回洗浄した。罹病イチ

ジク葉を PBST で磨砕し、磨砕液 200 μ l をウェルに加えた。プレートをシールして 4°C で一晩静置し、一次抗体と反応させた。反応後、試料を除き、200 μ l PBST で 4 回洗浄した。アルカリフォスファターゼ標識抗 NP 抗体（二次抗体）を Conjugate Buffer (0.2 M Tris, 0.8%[w/v] NaCl, 2%[w/v] polyvinylpyrrolidone [PVP] K25, 1%[w/v] polyethylene glycol [PEG], 0.05%[w/v] Tween 20, pH 7.4) により 1,000 倍希釈し、200 μ l をそれぞれ各ウェルに加えた。なお、抗 NP 抗体のアルカリフォスファターゼ標識は Alkaline Phosphatase Labeling Kit-NH₂ (同仁) を使用した。プレートをシールし、30°C で 5 h 静置して二次抗体を反応させた。反応後、抗体希釈液を除き、200 μ l PBST で 4 回洗浄した。Diethanolamine Substrate Buffer (9.7%[v/v] Diethanolamine, pH 9.8) により *p*-Nitrophenyl phosphate disodium (*p*-NPP; Sigma-Aldrich) を 1 mg/ml となるように溶解し、基質として 200 μ l をウェルに加えて反応させた。プレートを遮光して常温で静置し、プレートリーダー (BIO-RAD) により 405 nm の吸光度を測定した。測定は、基質添加後 2 h で行った。各実験区につき 2 反復を行い、吸光度の平均値を求めた。メーカーのプロトコルに従い、吸光度がネガティブコントロール (健全イチジク葉) に対して 3 倍を超えた場合を陽性とみなした。

2. 2. 15. Tissue blot 法

病徴イチジク葉における FMV の局在を確認するために、Tissue blot 法を行った。Whatman 3MM (Whatman) の濾紙で病徴イチジク葉を挟み、濾紙の上から金槌で叩いた。挟んだ濾紙の一方を 2%(v/v) Triton X-100 に浸し、20 min 震盪し脱色した。PBST で 3 回洗った後に、スキムミルクを PBST で 5%(w/v) になるように溶かし、濾紙を 1 h 震盪した。その後、PBST で 3 回洗った。濾紙を一次抗体溶液 (PBST に約 10 μ g/ml 抗 FMV-NP 抗体および 0.5%[v/v] スキムミルクを加えた) に加え、37°C で 45 min 震盪した。PBST で 3 回洗った後に、濾紙を二次抗体溶液 (アルカリフォスファターゼ標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体 [Thermo Fisher Scientific] を PBST で 1/5,000 に希釈したもの) に浸し、37°C で 45 min 震盪し、PBST で 3 回洗浄した。AP バッファー (10 mM Tris-HCl [pH 9.5], 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂) で 10 min 震盪した後、DAS-ELISA と同様に Diethanolamine Substrate Buffer により *p*-Nitrophenyl phosphate disodium を 1 mg/ml となるように溶解した基質溶液を濾紙の上から滴下し、5-10 min 呈色反応させた後、水洗し反応を止めた。

2. 3. 結果

病徴の観察

島根県で発生したイチジクのモザイクなどの症状は、その病徴から FMD によるものと考えられた。そのため、病徴を詳細に観察し、これまでに報告されている FMD の特徴と比較した。まず、葉における病徴を観察した。イチジクは一般的に葉がいくつも切れ込んだ掌形をしているものが多いが、蓬莱柿の健全葉は卵形もしくは浅く切れ込んだ掌形をしている (Fig. 2-3 A)。罹病葉には植物ウイルス病の典型的な病徴であるモザイクが発生し、濃い緑色の領域と、退緑し黄化した領域が互い違いに存在していた (Fig. 2-3 B)。奇形の症状も多く観察された。葉の一部の成長が著しく抑制され、非対称な形となっていた (Fig. 2-3 C)。奇形を起こした葉はしばしば退緑を併発しており、葉脈に沿う形で黄化している様子が観察された。症状の強い葉はほぼ全体が退緑していた (Fig. 2-3 D)。一部の葉にはイチジクモンサビダニの吸汁痕が観察された。イチジクモンサビダニの吸汁を受けた場合、輪紋を呈した後に (Fig. 2-3 E)、時間の経過とともに輪紋の潤が褐変する (Fig. 2-3 F)。激しい病徴を呈している葉には葉柄部が狭窄するという異常も観察された。次に、果実の病徴を観察した。病徴を呈する個体は果実が小さくなる傾向にあるように思われた。また、健全な果実は一様に緑色であるのに比べて、一部の果実では果皮の一部に退緑の症状が観察された (Fig. 2-3 G)。以上のような果実における病徴は、葉よりも明瞭でない傾向があった。個体全体を観察すると、罹病樹は健全樹よりも節間が詰まり、樹勢が低下していた (Fig. 2-3 H)。また一部に病徴を呈する個体であっても、無病徴な枝が混在している個体が多く存在した。この場合、罹病枝は勢いが低下し、無病徴が優性となっていた。以上のような症状はいずれも FMD のものと酷似していた。

一部の罹病樹にはイチジクモンサビダニと思われるサビダニの発生が確認されたため、採集し走査型電子顕微鏡観察に供した。その結果、後体部の体環の数が 60 程度で、羽毛爪が 5 裂している様子が観察され、これはイチジクモンサビダニの形態学的特徴と一致していることから (上遠野, 2007)、その発生が確認された (Fig. 2-4)。FMD

と病徴が酷似していること、媒介虫であるイチジクモンサビダニの発生が確認されたこ

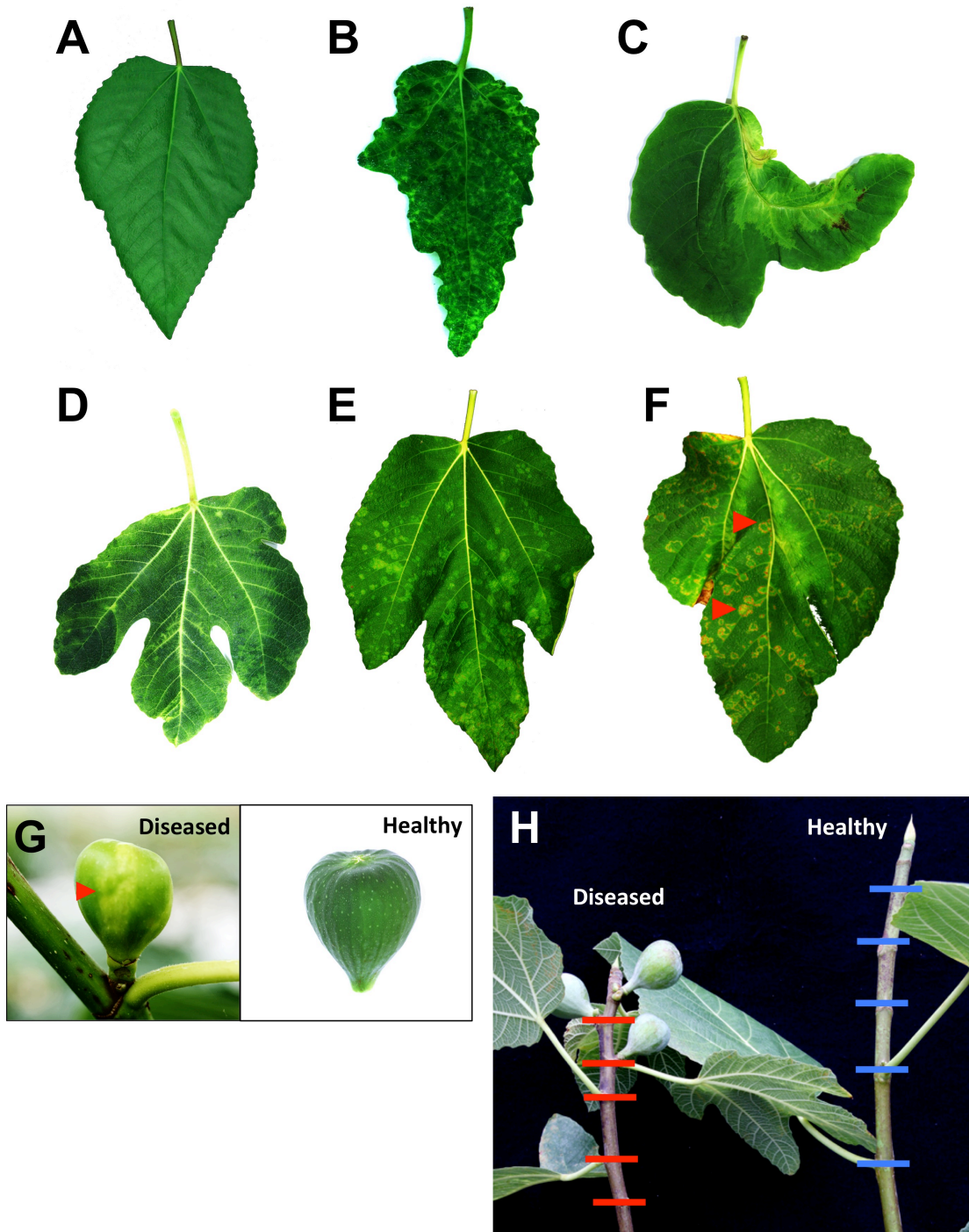


Fig. 2-3 島根県で発生したイチジクの症状

(A) 健全。(B) モザイク。(C) 奇形。(D) 退緑。(E) イチジクモンサビダニの吸汁による輪紋。(F) イチジクモンサビダニの吸汁による褐変。(G) 果実における病徴。矢尻は退緑している領域を示す。(H) 樹勢の低下。

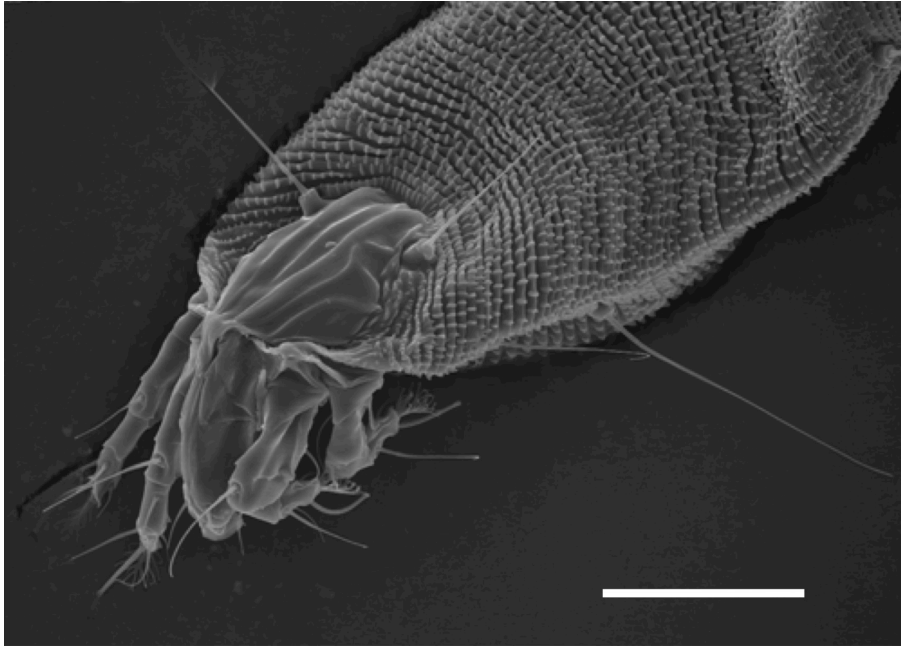


Fig. 2-4 イチジクモンサビダニの走査型電子顕微鏡観察
Bar = 20 μm 。

FMV 特異的プライマーを用いた RT-PCR

病徴を呈する罹病葉と無病徴葉、合計 14 枚の葉から全 RNA を抽出し RT-PCR を行った。PCR には、FMV RdRp 遺伝子の一部 (300 nt) を増幅する既報のプライマー E5-s、E5-a を用いた (Elbeaino et al., 2009a)。その結果、病徴を呈する葉のみから 300 bp の特異的な DNA 断片の増幅が確認された (Fig. 2-5 A)。健全樹から採集した葉の RNA からは増幅は確認されず、罹病樹においても病徴を呈さない葉から抽出した RNA からは増幅は確認されなかった。

続いて、増幅が確認された 8 サンプルについて RT-PCR 産物をダイレクトシーケンスした。その結果、全てのサンプル間で配列が 100%一致した。また、既報のトルコ、イラン、イタリアの FMV 分離株と配列を比較すると 83.5–91.5%の同一性が見られた。このことから、島根のモザイクなどの症状を呈するイチジクには FMV が感染していることが示唆された。ここで分離された FMV を JS1 分離株と名付けた。

次にこれらの FMV 分離株の上記 *RdRp* 遺伝子部分配列を用いて分子系統樹を作成した (Fig. 2-5 B)。その結果、JS1 分離株はトルコ分離株のうちの 1 つと最も近縁であることが示された。

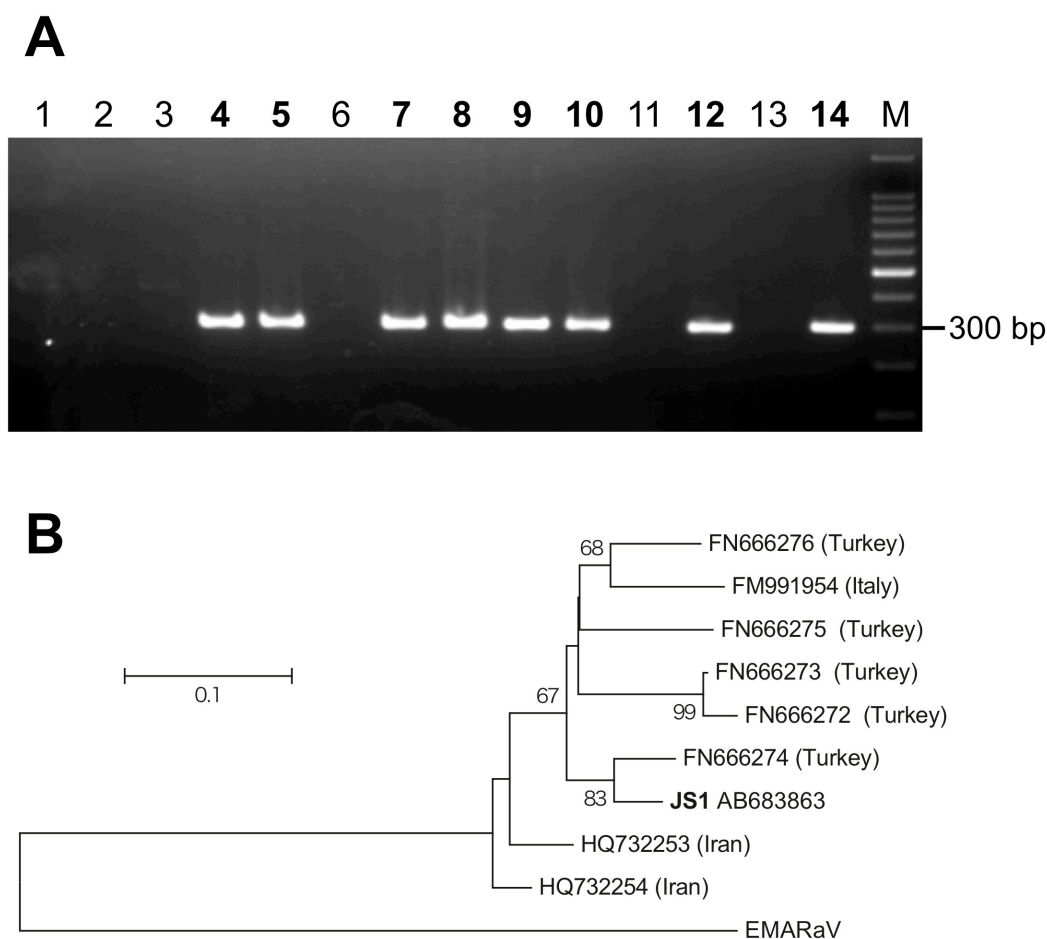


Fig. 2-5 RT-PCR による FMV の検出

(A) FMV 特異的プライマーを用いた RT-PCR 産物の電気泳動。1~3 レーンは健全 3 個体からそれぞれ採集した健全葉の RNA。4~14 レーンは罹病 8 個体から採集した 11 葉の RNA。(5、6)、(10、11)、(12、13) はそれぞれ同一個体から採集した葉の RNA。罹病個体からは無病徴の葉と病徴を呈する葉を選び、病徴葉はレーン番号が太字で記されている。M: 100bp Ladder。

(B) FMV の *RdRp* 遺伝子の部分塩基配列を用いた分子系統樹。FMV JS1 島根分離株に加え、既報のトルコ、イラン、イタリアの FMV 分離株の相当領域を使用した。島根分離株以外は分離株名の代わりにアクセッションナンバーで表記しており、括弧の中には国名を表記している。アウトグループには EMARaV 配列 (AY563040) を用いた。各ノードに表記されている数字はブートストラップ値 (%) である。50%以上のみを表記している。スケールバーは一塩基あたりの置換率を示す。

抗 NP 抗体の特異性と力価の評価

免疫学的手法により FMV を検出するために FMV の NP に対する抗体を作成した。NP 遺伝子を pET 30a ベクターにクローニングしたのち、*E. coli* BL21 大腸菌に導入し、発現を誘導した。His-tag が融合された NP の発現を誘導開始から時間を追って確認した (Fig. 2-6)。その結果、目的タンパク質は IPTG 添加後 3 h で不溶性画分に十分回収されることが分かった。そのため培養液量を増やし、同条件にて発現を誘導し菌体を回収した後に、His-tag 融合 NP の精製を行った (Fig. 2-7)。その結果、抗体の作出に十分な量の抗原が精製できたため、溶出画分を家兎に免疫し抗体を作成した。作出した抗体を精製するため血清を IgG 精製し、精製後の画分ごとに分光光度計により OD₂₈₀ を測定した。最も多量の IgG (2.16 mg/ml) を含んでいた画分を pH を 7~8 に調整し保存した。精製した抗 NP 抗体が目的通り反応するか確認するために、抗体作成時の不溶性画分をサンプルとしてウエスタンブロットを行った (Fig. 2-8)。その結果、NP に特異的に反応していることが示されたため、抗 NP 抗体として以降の解析に供試した。

DAS-ELISA による NP の検出

免疫学的に FMV を検出するために抗 NP 抗体を用いて DAS-ELISA を行った。健全葉と、RT-PCR で FMV が検出された罹病葉を用い反応を行った。その結果、罹病葉において各希釈倍率で、健全葉と比較して 4~6 倍の吸光値が観測された (Fig. 2-9)。そのため、免疫学的手法によっても罹病葉には FMV が感染していることが示された。

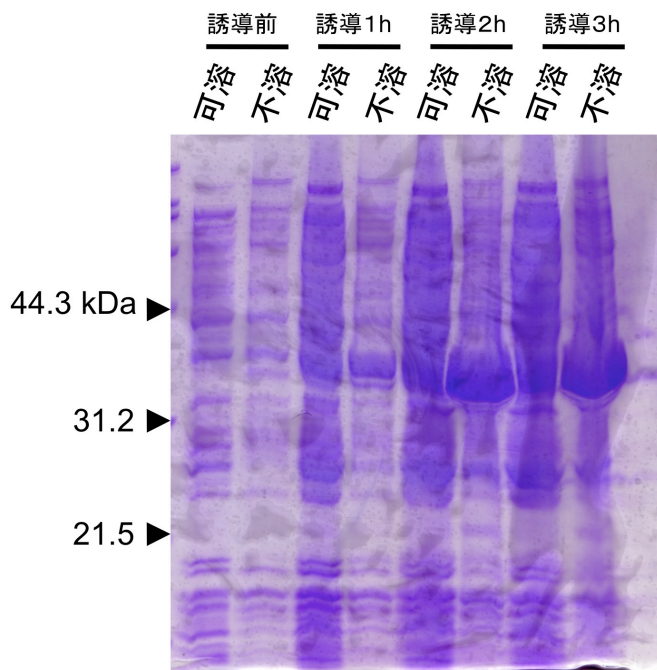


Fig. 2-6

NP の大腸菌での発現

IPTG の添加前と添加後 1 h、2 h、3 h に菌体を回収し可溶性と不溶性に分画した。目的の分子量（約 35 kDa）に NP の発現が誘導され、ほとんどが不溶性画分に回収されている。

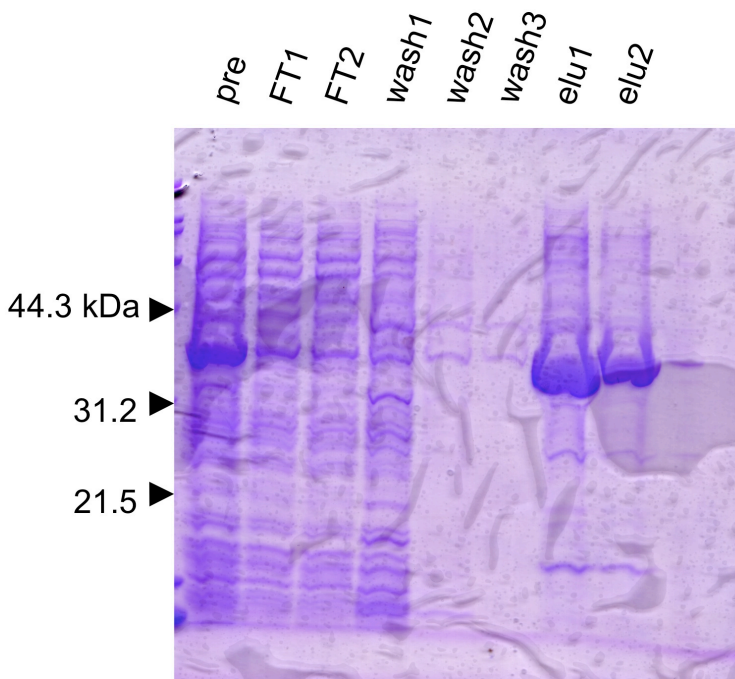


Fig. 2-7

大腸菌発現 NP の精製

Pre: 精製前の不溶性画分。FT: カラムに吸着しなかった画分。wash: 洗浄により流出した画分。elu: 溶出画分。

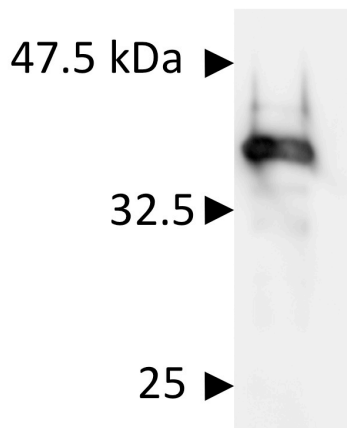


Fig. 2-8 抗 NP 抗体の反応性の確認
 作成した抗 NP 抗体を一次抗体として用いたウエスタン
 ブロット。目的の分子量の位置 (約 35 kDa) にシグナ
 ルが観察される。

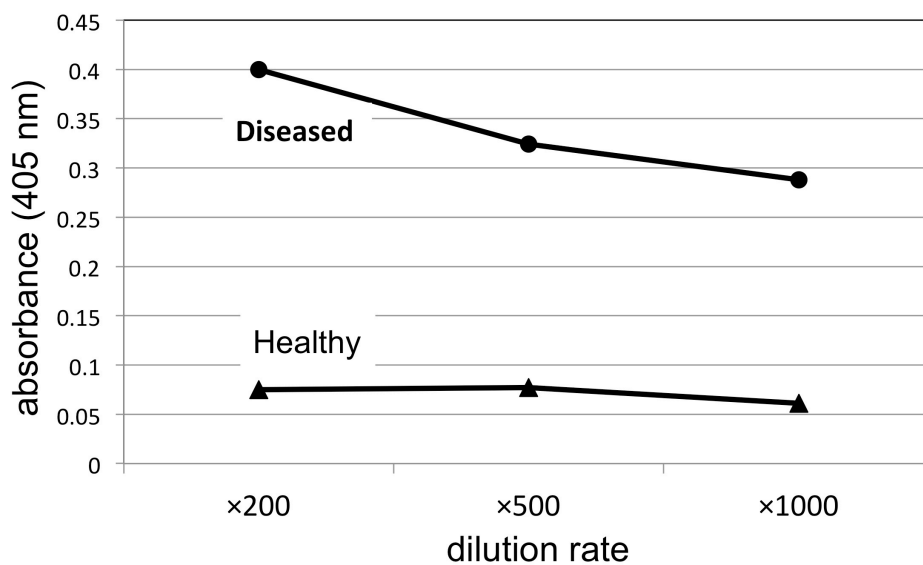


Fig. 2-9 抗 NP 抗体を用いた罹病イチジクに対する DAS-ELISA
 縦軸は 405 nm 波長の吸光値、横軸は一次抗体の希釈倍率を示す。二次抗体の希釈倍
 率は 1,000 倍。

感染葉における NP の分布

次に罹病葉内での FMV の分布を解析するため、健全葉と罹病葉に対して抗 NP 抗体を用いた Tissue blot を行った。Tissue blot は葉を濾紙などに押し付け、濾紙上にブロットされた目的のタンパク質を検出し、組織内の分布を調べる手法である。実験に供試した葉と検出結果を合わせて Fig. 2-10 に示す。罹病葉は葉脈に沿って退緑症状が出ていたが、その領域と一致してシグナルが検出された。それに対し、健全葉からはシグナルは検出されなかった。このことから、FMV は感染葉において病徴と一致する領域に分布していることが分かった。

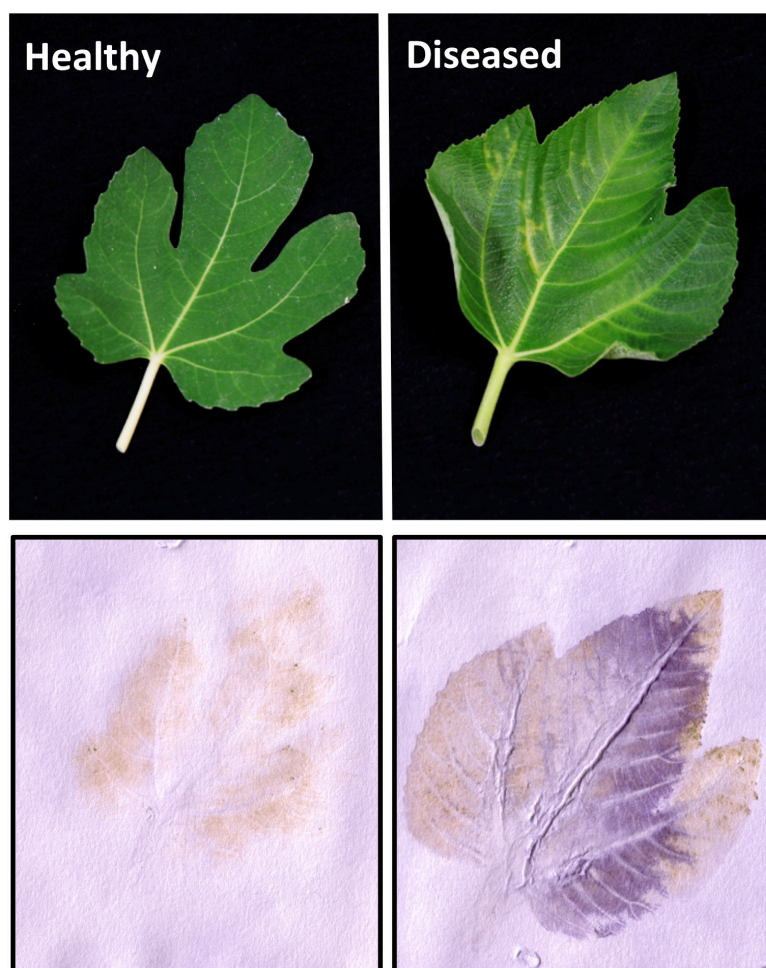


Fig. 2-10 抗 NP 抗体を用いた罹病イチジクに対する Tissue blot 使用した健全葉と罹病葉（上段）。罹病葉には葉脈に沿って退緑症状が観察される。Tissue blot による NP の検出（下段）。罹病葉には赤いシグナルが観察される。

2. 4. 考察

国内で初めての FMV の検出

本研究によって島根のモザイクなどの病徴を呈するイチジクには、FMV が感染していることが示された。FMV の発生報告は日本においては初めてであり、FMV に対する和名としてイチジクモザイクウイルスを提案した。FMD の報告は 1962 年以降頻繁になされていることから (Nitta et al., 1995; Shibao and Tanaka, 1998)、FMV は以前より日本国内に発生し、蔓延している可能性が高い。

FMD はイチジクのみならず、その他のイチジク属植物にも実験的に感染することが知られている (Blodgett and Gomec, 1967)。これまでのところ、世界的に自然条件下でイチジク以外から FMV が検出された報告はないが、他種植物への感染拡大にも十分な警戒が必要であると考えられる。日本においてはイチジク属植物にイチジク以外の有用な作物はないが、庭木や道端に植栽される植物は存在するため、これらに FMV が感染していた場合、イチジクへの感染源となる恐れがある。FMV は発見から間もなく、FMV に対する実用的で簡易な検出系は世界的にも確立されていない。今後は、FMV の性状を解明するとともに、簡易検出系の開発が急務となるだろう。

FMV の宿主個体内動態

イチジクモンサビダニの吸汁を受けると、輪紋症状の後に輪郭の褐変を伴う (Fig. 2-3 F) が、この褐変症状は「さび症状」と呼ばれる。本症状はイチジクモンサビダニの吸汁によりウイルスが侵入したことによるものであるのか、吸汁によるストレスによるものであるのか区別されていなかった。しかし本研究により、輪紋症状を呈する部分からも FMV が検出されること (Fig. 2-5 A)、イチジクモンサビダニの吸汁を受けても輪紋にはならず、さび症状のみが現れる場合があることが明らかとなった。これらの事実は、輪紋症状はイチジクモンサビダニの吸汁によるウイルスの侵入によるもので、ウイルスの感染部位に観察される症状であると考えられた。それに対し、さび症状はイチジクモンサビダニの吸汁自体が原因であると考えられた。

FMV に感染した多くの個体は、枝単位で病徴の有無が分かれていた。感染樹の無病徴の枝の葉からは FMV は検出されなかった (Fig. 2-5 A)。このことは、同一個体内でも枝単位でウイルスが偏在しており、FMV の分布は病徴と一致していることを示している。このような性質はウイルスが樹木に感染した際に見られる傾向であり (Adams, 1978)、診断や防除の際には注意が必要であると考えられる。

第 3 章 新規ゲノムセグメント RNA5、 RNA6 の発見

3. 1. 序論

本章の研究では、

FMV の 2 本の新規ゲノムセグメントを検出し配列解析を行った。

これまでに推定されてきた FMV のゲノム構造

2009年に報告されたFMVイタリア分離株を用いた解析では、ゲノムは4分節のセグメントに分かれていると考えられ、RNA1からRNA4はそれぞれ7.0 knt、2.3 knt、1.5 knt、1.5 kntの塩基長である (Fig. 3-1 A)。それぞれのセグメントは1つずつのORFを有すると考えられている。RNA1にはRdRp (264 kDa)が、RNA2にはグリコプロテイン (73 kDa)が、RNA3にはNP (35 kDa)が、RNA4には機能未知のタンパク質 (41 kDa) がコードされる (Elbeaino et al., 2009b)。すべてのセグメントはその両末端に13塩基の共通の保存配列 5'-AGUAGUGUUCUCC・・・GGAGUUCACUACU-3'を有する。これら両末端の保存配列は互いに相補的になっており、その結果、取手状の立体構造 "panhandle-structure" を形成すると考えられている (Fig. 3-1 B)。panhandle-structureは分節マイナス鎖RNAウイルスに共通した性質であり、複製と翻訳に大きく関わっていることが知られている (Barr et al., 2003; Kohl et al., 2004; Barr and Wertz, 2005; Gulyaev et al., 2010)。

上述のように本研究を開始した当初、FMV のゲノムは 4 分節であると報告されていた。そのように推定されてきた実験的な根拠は 2 つある。① FMV 感染イチジクより dsRNA を抽出し電気泳動を行い、4 本程度に分かれたバンドが特異的に観察されたこと (Elbeaino et al., 2009a)。② セグメントの末端に保存される 13 nt の配列をプローブとして用いたノーザンブロット解析により、FMV 感染イチジクから抽出された

RNA から 4 本程度のバンドが特異的に観察されたこと (Mielke and Muehlbach, 2007; Elbeaino et al., 2009b)。しかし、これらの手法は明瞭なシグナルが得られにくく、さらにバンドパターンを目視するだけでは、同等の長さの複数バンドが重なっていた場合に区別が困難である。

第 2 章において日本で初めて FMV を検出した後、FMV の疫学的な解析と全ゲノム配列の解読を目標とし、複数の FMV 分離株の収集と塩基配列の解読を試みた。FMV は 4 分節のゲノムを有すると報告されていたため、各分離株のセグメントごとに特異的なプライマーを設計し RT-PCR で増幅した後にシーケンスを進める必要があった。既報の配列を基にプライマーを設計するため、配列が未知の新たな分離株に対しては配列が合わないことも考えられ、煩雑な作業が予想された。そこで、FMV の各セグメントの両末端の 13 nt の保存配列に合うプライマーを設計し、RT-PCR を行うことで全てのセグメントを一度の RT-PCR 反応で増幅しようと試みた。結果として、本手法によって新規の RNA 配列が検出され、さらに一連の解析を行い、それらの配列がこれまでに報告されていない FMV の新規のゲノムセグメントであることを示した。

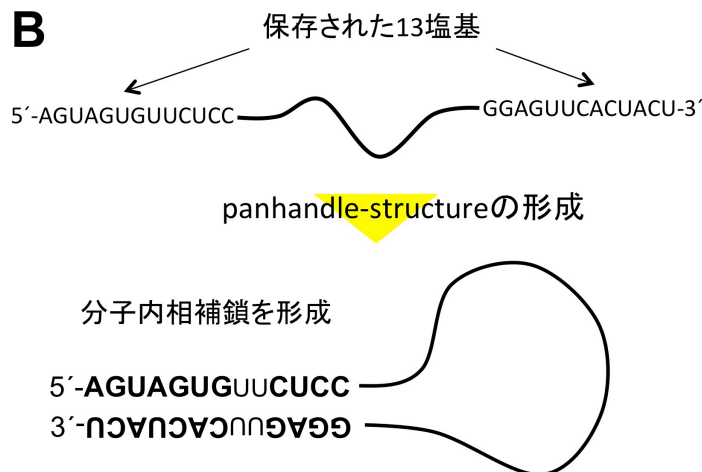
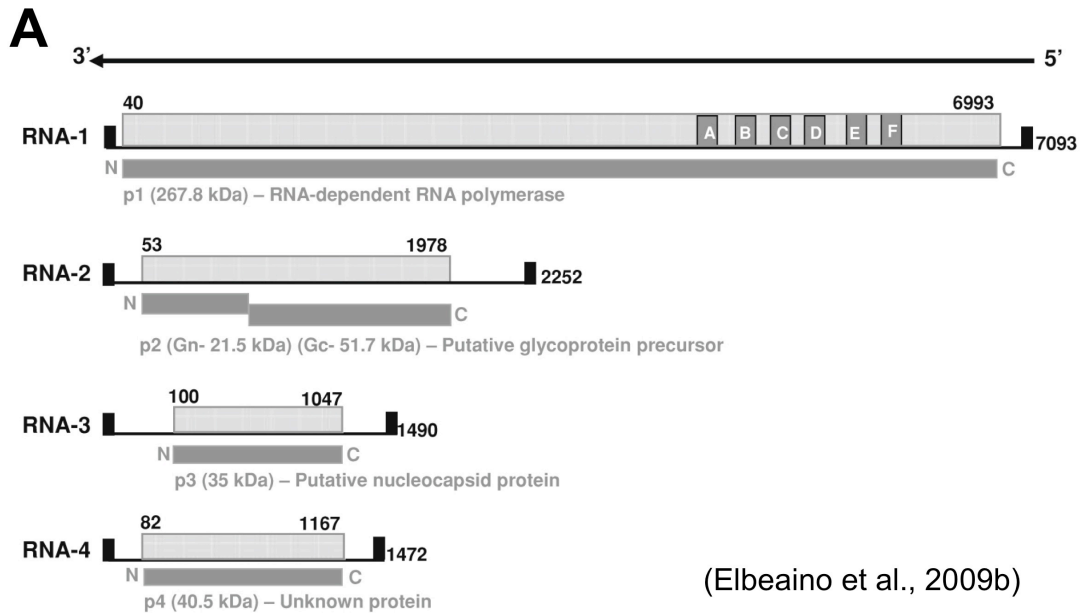


Fig. 3-1 FMV のゲノム模式図

- (A) FMV イタリア分離株 (Gr10) のゲノム構成模式図。FMV は 4 つのゲノムからなると考えられていた。RNA1 の ORF 中の灰色のボックスで示されるのは *Bunyaviridae* 科ウイルスの RdRp に保存されるモチーフ A~E。RNA2 にコードされる glycoprotein はポリプロテインとして翻訳後、2 つのタンパク質にプロセシングされる。
- (B) FMV ゲノムセグメントの両末端には互いに相補的な 13 塩基が保存され、panhandle-structure を形成する。

3.2. 材料及び方法

3.2.1. 供試植物

日本国内およびセルビアの 14 個体のイチジクから病徴を呈する葉を集めた。コントロールとして当研究室で維持している健全イチジクの葉を使用した。本研究で使用した分離株名とその由来を Table 3-1 に示す。判明したものに関してのみ品種を記載した。

Table 3-1 本実験で使用した FMV 分離株

番号	由来	品種	分離株
1	Japan (Shimane)	Houraishi	JS1
2	Japan (Fukuoka)	Houraishi	JF1
3	Japan (Fukuoka*)	Houraishi	JFT4
4†	Japan	Athenes	JTT-At
5†	Japan	King	JTT-Ki
6†	Japan	Lisa	JTT-Li
7†	Japan	Panachee	JTT-Pa
8†	Japan	Violette de Sollies	JTT-Vi
9	Serbia	-	SB1
10	Serbia	-	SB2-2
11	Serbia	-	SB2-3
12	Serbia	-	SB2-4
13	Serbia	-	SB2-5
14	Serbia	-	SB2-6

* No2 とは違う地域.

† 当研究室で維持しているイチジクから検出された FMV 分離株

3.2.2. RT-PCR

イチジクからの全 RNA の抽出は 2.2.3 と同様に行い、FMV の感染の確認には 2.2.4 と同様に RT-PCR を行った。

FMV ゲノムセグメントの同時増幅 RT-PCR は以下の手順で行った。プライマーとして FMV の全てのゲノムセグメントの両末端に保存されている 13 nt に合うものを使用した。5'のプライマーは 5TerE: 5'- AGT AGT GTT CTC C -3'、3'のプライマーは 3TerE: 5'- AGT AGT GAACTC C -3'である。逆転写反応は SuperScript III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) を使用した。合計容量 22.5 μ l で反応を行い 200 Unit の逆転写酵素と適当量の附属のバッファー、50 Unit の Ribonuclease Inhibitor (TaKaRa)、2.5 μ M の 3TerE プライマー、1 μ g の RNA を添加し、反応は 45°C 30 min、75°C 15 min で行った。その後、4 μ l の逆転写産物をテンプレートとし、TaKaRa LA Taq (TaKaRa) による PCR を行った。50 μ l の合計容量に 2.5 Unit のポリメラーゼと適当量の附属のバッファー、15 μ M の 5TerE と 3TerE プライマーを添加し、反応は、94°C 4 min の後、94°C 15 s、45°C 30 s、68°C 7 min を 35 サイクル、68°C 7 min で行った。反応終了後、0.7% TAE アガロースゲルにより電気泳動を行い、DNA 断片の増幅と長さを確認した。サイズマーカーは、1 kbp Ladder (NEB) を用いた。

3. 2. 3. Rapid amplification of cDNA end (RACE)

各 RNA セグメントの 5'、3'末端配列を決定するために、RACE を行った。5'-RACE System, version 2.0 (Thermo Fisher Scientific) を使用し、各反応の酵素やバッファーなどはいずれも本キットの推奨量に従った。逆転写反応は 1 μ g の RNA を使用し、セグメントごとに異なる gene specific primer 1 (gsp1) を使用した。使用したプライマーの配列一覧は Table 3-2 に示す。反応は 42°C 30 min、70°C 15 min で行った。以降はキットのマニュアルに従い RNase 処理、cDNA の純化、polyC のテーリングを行った。PCR 反応はキットに添付の anbridged anchor primer とセグメントごとの gene-specific primer 2 (gsp2; Table 3-2) を 20 μ M ずつと、5 μ l のテーリング反応後の反応液を使用し、上記 3.2.2 と同様に TaKaRa LA Taq を用い行った。gsp1 と gsp2 は対象 RNA セグメントの末端に余剰の配列が存在しなかった場合、PCR 増幅断片が約 300 bp となるように設計してある。反応終了後、2% TAE アガロースゲルにより電気

泳動を行い目的の大きさに DNA 断片が増幅されているかを確認した。RACE の PCR 断片のシーケンスベクターへのクローニングとシーケンスについては次項で記述する。

3. 2. 4. PCR 産物のクローニングと塩基配列解析

セグメント同時増幅産物と RACE 産物は 0.7%または 2%の TAE アガロースゲルで泳動した後に、バンド毎に UltraClean 15 DNA Purification kit で精製した。精製した DNA は TOPO TA Cloning kit (Thermo Fisher Scientific) にクローニングした。クローニングしたプラスミドは *E.coli* DH5 α 菌株 (TaKaRa) に導入し、LB / Kanamycin 固形培地にプレーティングした。生えてきた各コロニーを単離、2 \times YT / Kanamycin 培地で 37 $^{\circ}$ C、16 h 培養し、自動核酸分離装置でプラスミドを回収した。TOPO ベクターは M13 配列を有するため、配列挿入の確認の PCR とシーケンスには M13F (5'-GTA AAA CGA CGG CCA G -3') と M13R (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC -3') プライマーを用いた。PCR によって目的の大きさの挿入配列のあるプラスミドを選抜し、4~5 クローンをシーケンスすることによって全ての分離株の RNA3~RNA6 の配列を決定した。JS1 と SB1 の RNA1 と RNA2 全長の cDNA クローンに関しては M13 プライマーのみでは全長配列が決定できなかったため、加えてにある内部配列に合うプライマーを設計し、シーケンス解析に用いた (Table 3-2)。

Table 3-2 本章の研究でシーケンスとノーザン解析に使用したプライマー

セグメント	用途	プライマー名	配列 (5'-3')	サイト (nt)	分離株	
RNA 1	Sequencing	FMV1S4	AAAGGATAATACAAGTTACC	1897-1916	JS1	
		FMV1S5	AAGCATTAATAAGCCATTACTAGC	2710-2733		
		FMV1A5	ATCCCTTTCATACTGTGAGT	4506-4525		
		FMV1A4	TAGTACTTCACAAGCAATGACA	5379-5400		
		FMV1A3	GTAAGTGTCATACAAAGATG	6156-6175		
		SB1S1	GATGGTATGCTTGCTGAT	6269-6286		
		SB1S2	GAAAGAAAATATTTGTGGAT	5545-5564		
		SB1S3	ATTGATGAAAGAGGTGATT	4681-4699		
		SB1S4	GTAATTCTGTGTAATAATC	3374-3391		
		SB1A1	CTTCATTAGTTCCAATGT	715-732		SB1
		SB1A2	AGTATCATATAAAGATGT	872-889		
		SB1A3	TCTCATCAGAATGGGGATAT	1741-1760		
	SB1A4	ATTTAACAATCATTGGTG	2569-2586			
	RACE	1-5'gsp1	AACTGCAATAAAAATTAAGCT	6722-6741 / 6724-6743	JS1/SB1	
		1-5'gsp2	TATGTGATACATAAATATCG	6761-6780 / 6763-6782		
		1-3'gsp1	AATATTCCTTCTGAAAGTGA	248-267 / 250-269		
1-3'gsp2		CACTGCTTATAGATCTTTTC	194-213 / 196-215			
RNA 2	Sequencing	FMV2A2	AATTTATATGATATTTTGGC	1508-1527	JS1	
		SB2S	CACTTGCAAAGGCAGATGAT	608-628	SB1	
		SB2A	TATCTTTACTGTGATCTAAG	1678-1697		
	RACE	2-5'gsp1	ATGAATCAGCAAATGAATTC	1932-1951	JS1/SB1	
		2-5'gsp2	TTTCTGATGCGTTGCATCAC	2036-2055		
		2-3'gsp1	TCTTCATGGATAGTTGCAGT	314-333		
		2-3'gsp2	AGGTAATGATGTGACATATC	294-313		

RNA 3	RACE	3-5'gsp1	TATATTAATGTAATCTAAGT	1123-1142	JS1/SB1
		3-5'gsp2	TTAGCAATATATATCTATGT	1149-1168	
		3-3'gsp1	CATGACATATGTTACGATAC	333-352	
		3-3'gsp2	AAATTGCTAATATTCTGACT	301-320	
Northern	RNA3nor-s	GTGCAAGCTTTTACCTCT	280-297	JS1	
	RNA3nor-a	ATTGAACACTGTTGATAT	1263-1280		
RNA 4	RACE	4-5'gsp1	ACTGAGGAAGGATATGTTAT	1129-1148	JS1/SB1
		4-5'gsp2	TGCTATGTTTTGTTTACCTA	1210-1229	
		4-3'gsp1	TAGCTATCCTTGTCATTGCT	333-352	
		4-3'gsp2	AGCCTTAACTGGAAGCCTGA	248-267	
RNA 5	RACE	5-5'gsp1	TTAGCATCTTTTAGAGCTGG	1375-1394 / 1374-1393	JS1/SB1
		5-5'gsp2	GAGATTAGAAATGGCAAGAG	1425-1444 / 1481-1500	
		5-3'gsp1	GATAGCAAATGGTGCAATTG	314-333 / 302-321	
		5-3'gsp2	TGGCATTGAATCTAGGCATC	261-280 / 427-266	
	Northern	RNA5nor-s	TATGATTTCAACAAGATAT	100-117	JS1
		RNA5nor-a	TGTTTTATATATTCTATA	1083-1100	
RNA 6	RACE	6-5'gsp1	TTTATCTTTAATATCCTGGA	871-890	JS1/SB1
		6-5'gsp2	CTGAGGTTTATACCTGAGAT	932-951	
		6-3'gsp1	TCTACAATTACATGTGGTAT	324-343	
		6-3'gsp2	GGACATATCTAGTTTCTTGT	214-233	
	Northern	RNA6nor-s	TTAGATTCCTTGCATGAT	120-137	JS1
		RNA6nor-a	CTATAATTGTTAAGACTT	1103-1200	

*JS1/SB1 2つの分離株に対して同じプライマーを使用した。

3.2.5. ノーザンブロット

JS1 分離株の RNA3、RNA5、RNA6 がイチジク植物内で蓄積しているか確認するためにノーザンブロットを行った。極性の異なる RNA の蓄積を見るために両方向 (viral RNA [vRNA] と viral complementary RNA [vcRNA]) の RNA プローブを作成した。RNA3、RNA5、RNA6 のそれぞれ、280–1280 nt、100–1100 nt、120–1120 nt 領域に相当する部分を Table 3-2 のプライマーで増幅し、pGEM T-easy (Promega) ベクターにクローニングした。PCR のテンプレートとして 3.2.4 で TOPO ベクターにクローニングした cDNA 配列を用いた。塩基配列解析に使用した TOPO ベクターは SP6 ポリメラーゼ結合サイトがなかったため、RNA プローブの作成には使用しなかった。3.2.4 と同様の手順で目的配列が挿入されたプラスミドを構築し、挿入配列の直上もしくは直下を切断するために NcoI もしくは SalI で制限酵素処理した。切断したプラスミドをエタノール沈殿し、適量の蒸留水に溶解した後、T7 ポリメラーゼもしくは SP6 ポリメラーゼ (TaKaRa) を用い、DIG RNA labeling Mix (Roche Diagnostics) によって DIG ラベリングと転写反応を行い RNA プローブを作成した。

ノーザンブロットには、Digoxigenin (DIG) システム (Roche Diagnostic) を用いた。1 サンプルあたり 1 µg の RNA を使用し、ホルムアルデヒド変性アガロースゲル (1% [w/v] agarose, 5% [v/v] formaldehyde, 50 mM MOPS-KOH [pH 7.0]) により、50 V で 70 min 電気泳動を行った。泳動後にエチジウムブロマイド染色を行い、UV 照射下でのリボソーム RNA の染色像を指標に、各サンプル間で RNA 量が揃っていることを確認した。その後、泳動した RNA を Turboblotter system (GE Healthcare) を用いて Nyron Membrane positively charged (Roche Diagnostics) にブロッティングした。ブロッティング後のメンブレンを 2×SSC (300 mM NaCl, 30 mM sodium citrate, pH 7.4) を用いて洗浄し、紫外線クロスリンクによって RNA をメンブレンに固定した。DIG ラベルした RNA プローブを DIG Easy Hyb (Roche Diagnostics) で、T7 ポリメラーゼで転写したプローブは 2,000 倍希釈、SP6 ポリメラーゼで転写したプローブは 500 倍に希釈し、68°C で 12 h メンブレン上の核酸にハイブリダイゼーションさせた。次いで、メンブレンを洗浄液 1 (2×SSC, 0.1% SDS) を用いて室温 5 min、洗浄液 2 (0.2

×SSC, 0.1% SDS) を用いて 65°C 20 min で洗浄し、DIG Wash and Block Buffer Set (Roche Diagnostics) のブロッキングバッファーでブロッキング反応を行った。その後、Anti-Digoxigenin-Fab fragment 抗体 (Roche Diagnostics) を 10,000 倍希釈し、室温で 1 h 反応させた。DIG Wash and Block Buffer Set の洗浄バッファーで洗浄した後、検出バッファー (0.1 M Tris-HCl [pH 9.5], 0.1 M NaCl) に浸し、CDP-star (New England Biolabs) を用いて検出した。CDP-star を用いた化学発光の検出には LAS-4000 mini (Fujifilm) を使用した。

3. 2. 6. 配列解析と分子系統解析

決定された塩基配列を、DNA 解析ソフトウェア GENETYX-MAC Ver. 13.1 (GENETYX) により解析した。決定塩基配列および推定アミノ酸配列について、既報の配列と比較した。RNA5、RNA6 および p5、p6 のその他の既知配列との相同性検索は NCBI の BLAST プログラムを用いて行った。p5、p6 のドメイン検索は Pfam program (Finn et al., 2010; <http://pfam.sanger.ac.uk/>) を用いて行った。本研究によって明らかとなった FMV 14 分離株の RNA3~RNA6 配列の GenBank アクセッションナンバーは Table 3-3 (pp 64) に記す。JS1 分離株と SB1 分離株の RNA1 配列のアクセッションナンバーは、それぞれ AB697826、AB697827、RNA2 配列はそれぞれ AB697828、AB697829 である。これらの配列に加えて、Gr10 イタリア分離株の RNA1~RNA6 のゲノム配列 (AM941711、FM864225、FM991954、FM992851、HE803826、HE803827) を配列の比較と分子系統解析に使用した。これらの既知配列は NCBI サーバーを通じて GenBank データベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) より入手した。DDBJ のサーバーにおける CLUSTALW アルゴリズム (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>) により塩基配列のアラインメントを行い、マルチプルアラインメントを基に配列同一性を算出した (Thompson et al., 1994)。平均遺伝距離の算出には、MEGA 5.0 (Tamura et al., 2011) を用いた。同じアラインメント配列を分子系統解析において利用し、近隣結合法に基づく系統樹を作成した。進化モデルは p-distance (Takahashi and Nei, 2000) を使用し、系統樹描画には、MEGA

5.0 (Tamura et al., 2011) を用いた。FMV の RNA3 と RNA4 のアウトグループには RRV の RNA3、RNA4 配列 (HQ871944、HQ871945) を用いた。ブートストラップ解析は 1,000 反復行った。

3. 3. 結果

FMV 分離株の収集

日本国内（第2章のサンプルを含む）とセルビアより FMD とと思われる病徴を呈するイチジク葉を合計 14 サンプル収集した。これらのイチジク葉と健全イチジク葉より全 RNA を抽出し、既報の E5-s、E5-a プライマーにより FMV *RdRp* 遺伝子の部分配列を増幅する RT-PCR を行った (Elbeaino et al., 2009a)。その結果、14 サンプルすべてから特異的な増幅が確認された (Fig. 3-2)。これらの増幅断片をシーケンスし、既報の FMV イタリア分離株 Gr10 の配列と比較したところ、86.5–92.3% の配列同一性が見られた (Table 3-4 A; pp 67)。以上の結果から、これら 14 サンプルのイチジク葉には FMV が感染していることが確認され、これらの FMV 分離株を Table 3-1 (page 49) で示す通りに命名した。なお、SB2-6 分離株感染イチジク葉から抽出した RNA に関しては増幅効率が悪いように思われるが (Fig. 3-2 lane14)、これはプライマーの配列とウイルスの配列のミスマッチによると考えられる。

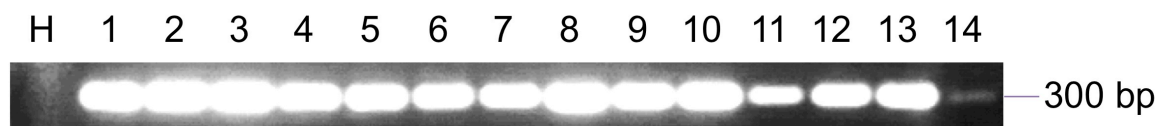


Fig. 3-2 FMV 分離株の収集

FMV 特異的プライマーE5-s、E5-a による RT-PCR。H: 健全イチジク。レーン番号は Table 3-1 の番号と一致している。

ゲノムセグメントの同時増幅 –FMV 新規ゲノムセグメントの検出–

FMVの4本のゲノムセグメントを1回のRT-PCRで同時に増幅することを試みた。FMVの各セグメントの両末端に共通して保存される13 ntの塩基配列にマッチするプライマーセット3TerE、5TerEを作成し、JS1 島根分離株とSB1 セルビア分離株に対してRT-PCRを行った。全てのFMVゲノムセグメントが増幅していた場合、4種の増幅断片が3本のバンドとなって観察されると考えられる(RNA3とRNA4はほぼ同一の長さであるため分離されない)。電気泳動にて増幅産物を確認した結果、予想に反して、3本のバンドではなく5本のバンドがFMV感染イチジクRNA特異的に観察された(Fig. 3-3 A)。Gr10分離株での報告によるとRNA1、RNA2、RNA3、RNA4はそれぞれ、7039 nt、2252 nt、1490 nt、1472 ntの長さである(Elbeaino et al., 2009b)。約7 kbp、2.2 kbp、1.5 kbpに観察されるバンドが、これらのゲノムRNA由来の増幅断片であると考えられたが、約1.7 kbpと約1.2 kbpに観察されるバンドはこれまでの報告では説明がつかなかった。健全イチジクRNAでは本バンドは観察されないため、これらのバンドは非特異的な増幅ではなく、ウイルスRNAが特異的に増幅しているものと考えられた。なお、長い断片ほどバンドが薄く見えるのは、一般的に長い配列ほどPCRによる増幅効率が悪くなるためであると考えられる。

約1.7 kbpと約1.2 kbpに観察されるバンドがその他のFMV分離株に感染したRNAでも増幅するかを確認するために、14分離株すべてに対して同様にRT-PCRを行った。その結果、14分離株すべてで同様の大きさのバンドが観察された(Fig. 3-3 B)。これらの結果より、これらのバンドはこれまでに発見されていないFMVのゲノムセグメント由来である可能性が高まった。

これらのバンドの由来を確認するために塩基配列を解読した。まず、JS1とSB1の約7 kbpと約2.2 kbpに観察された増幅断片のシーケンスを行った。これらの増幅断片はGr10のRNA1とRNA2と高い配列同一性を示し、その値はJS1のRNA1、RNA2に関して88.9%、92.7%、SB1のRNA1、RNA2に関して91.7%、94.0%であった。次に、14分離株すべての約1.5 kbpのバンドの配列を決定し、本バンドにはRNA3、RNA4由来の2つの増幅断片が含まれることが分かった。これらのRNAの分離株間の配列同

一性については別項で記述する。以上のバンドが予想通りに既報の FMV のゲノムセグメント由来であったのに対し、約 1.7 kbp と約 1.2 kbp のバンドはそれぞれ 14 分離株間で相同性を示すものの、RNA1～RNA4 とは全く相同性が見られず、既報のゲノムセグメントの一部領域が非特異的に増幅したものではないことが確認された。

次に、JS1 と SB1 の各 RNA に関して末端配列を調べるために、RACE 解析を行った。その結果、6 種全ての RNA セグメントにおいて両末端の 13 nt は置換、欠損、挿入変異や付加配列なく保存されており、既報の FMV ゲノムセグメントと同じ 13 nt が RNA セグメントの末端配列であることが確かめられた。

以上の結果から約 1.7 kbp と約 1.2 kbp のバンドはこれまでに報告されていない FMV の新規ゲノムセグメント由来である可能性が示唆され、これらの新規 RNA 種を、約 1.7 nt のものを「RNA5」、約 1.2 nt のものを「RNA6」と名付けた。

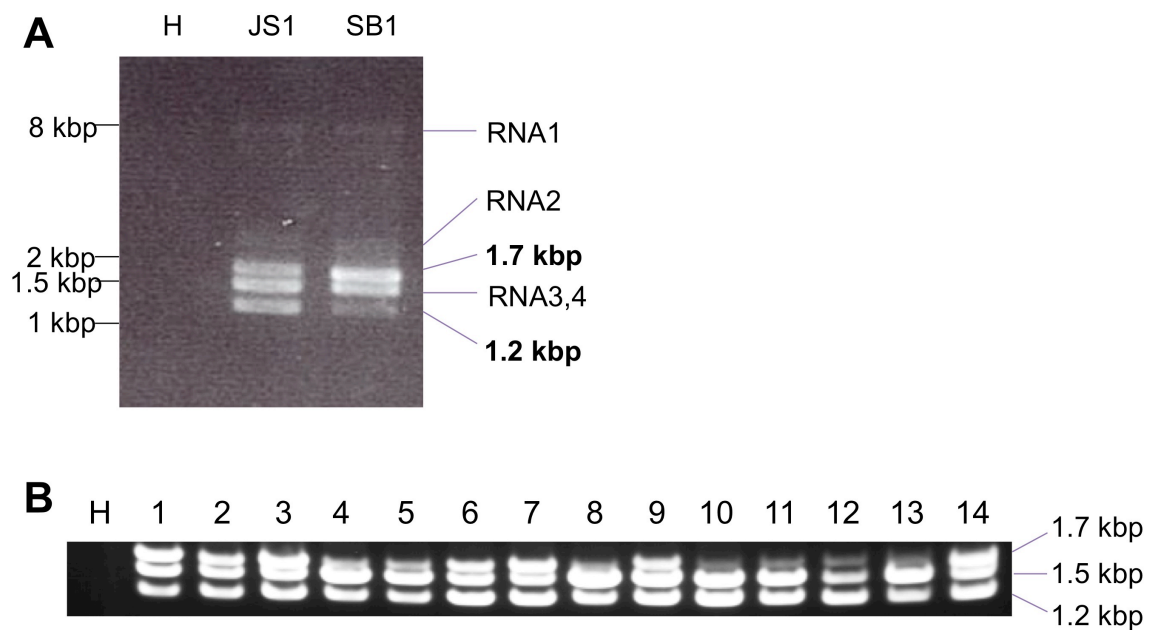


Fig. 3-3 FMV ゲノムセグメントの同時増幅 RT-PCR

(A) JS1 分離株と SB1 分離株に対して、セグメントの両末端に保存されている 13 塩基に合うプライマー-3TerE、5TerE を用いて RT-PCR を行った。RNA1~RNA4 に相当する大きさと、約 1.7 kbp と約 1.2 kbp の大きさに特異的な増幅が確認される。

(B) FMV 14 分離株に対する末端保存配列プライマーを用いた RT-PCR。14 分離株全てで 1.7~1.2 kbp に 3 本のバンドが確認される。

H: 健全イチジク。レーン番号は Table 3-1 の分離株の番号と一致している。

新規 RNA セグメント RNA5、RNA6 の配列解析

JS1 の RNA5 は viral RNA (vRNA) 3'末端側の 57 nt、5'末端側の 186 nt の日翻訳領域 (untranslated region: UTR) に挟まれて viral complementary RNA (vcRNA) 側に長さが 1509 nt の ORF (ORF5) が存在し、分子量が 59 kDa のタンパク質 (p5) をコードしていると推定される (Fig. 3-4 and Table 3-3)。vRNA とはマイナス鎖 RNA ウィルスにおけるゲノム RNA の鎖を表しており、vcRNA とはタンパク質がコードされる鎖を示す。FMV のゲノム RNA の極性に関しては、先行の研究 (Elbeaino et al., 2009a) で既に明らかとなっている。SB1 の RNA5 もほぼ同じ構造を有していたが、JS1 と比較して ORF の複数箇所に欠失変異が存在しコードされるタンパク質の長さがやや短くなっていた (486 aa, 57 kDa; Table 3-3)。欠失変異はそれぞれ 6、12、9、21 nt の大きさで、JS1 RNA5 の 234–239、250–261、346–354、1045–1065 nt に相当する領域に存在していた。その他の 12 分離株の RNA5 に関しても上記 2 分離株のいずれかとほぼ同様の構造を有しており、コードされるタンパク質 p5 は JS1 と同じ 59 kDa のものと、SB1 と同様に欠失変異により 57 kDa となった分離株が存在した (Fig. 3-4 and Table 3-3)。ORF5 の他に 200 nt 以上の有意な大きさの ORF は存在しなかった。RNA5 の末端配列はゲノムセグメント全てで保存される 13 nt を含め、配列末端領域に相補的な配列が高く保存されている。同様のセグメントごとの相補的な配列が RNA3 と RNA4 でも観察される (Fig. 3-5 A-C)。p5 アミノ酸配列に関してデータベース検索を行ったが、p5 はいかなる既知の配列とも相同性を示さず、ドメインも予測されなかった。

JS1 の RNA 6 は vRNA 3'末端側の 68 nt、5'末端側の 449 nt の UTR に挟まれて vcRNA に長さが 699 nt の ORF (ORF6) が存在し、分子量が 26 kDa のタンパク質 (p6) をコードしていると推定される (Fig. 3-4 and Table 3-3)。その他の 13 分離株に関してもほとんど同じ構造を有しており、JS1 と全く同じ長さの ORF であった。その他に 200 nt 以上の有意な大きさの ORF は存在しなかった。また、RNA6 もその他のセグメントと同様にセグメントに固有の末端相補的な配列が高く保存されていた (Fig. 3-5 D)。p6 のアミノ酸配列に関して BLAST 検索を行ったが GenBank データベースに報告されているいかなる配列とも有意な相同性を示さなかった。しかし、Pfam ドメイン検索によ

り、p6 の N 末側領域 (33-100 aa) に *Bunyavirus* 科ウイルスの RdRp ドメインの motif A の直下から motif B にかけての領域が 0.032 という期待値で予測された (Fig.3-4; Müller et al., 1994; Aquino et al., 2003; Elbeaino et al., 2009a)。

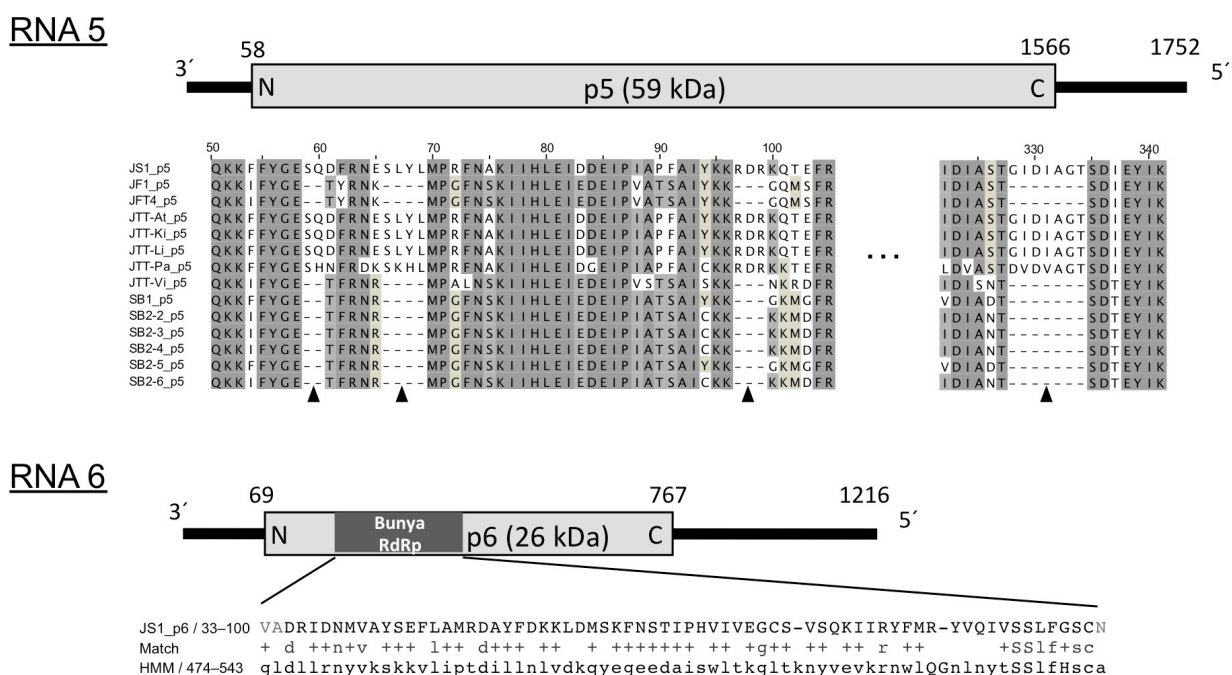


Fig. 3-4 RNA5 と RNA6 の模式図

ORF を灰色の四角で、UTR を黒線で示す。黒線上の数字は塩基番号を示す。14 分離株のアラインメントにおける矢戻は ORF5 中の欠失変異箇所を示す。黒色の四角は p6 の配列中に部分的な *Bunyavirus* 科ウイルスの RdRp ドメインが予測されたことを示す。その下方に Pfam 検索のアウトプットを示す。アラインメントは JS1 の p6 アミノ酸配列と *Bunyavirus* 科ウイルスの RdRp のコンセンサス配列を hidden Markov model (HMM) を用いて示している。

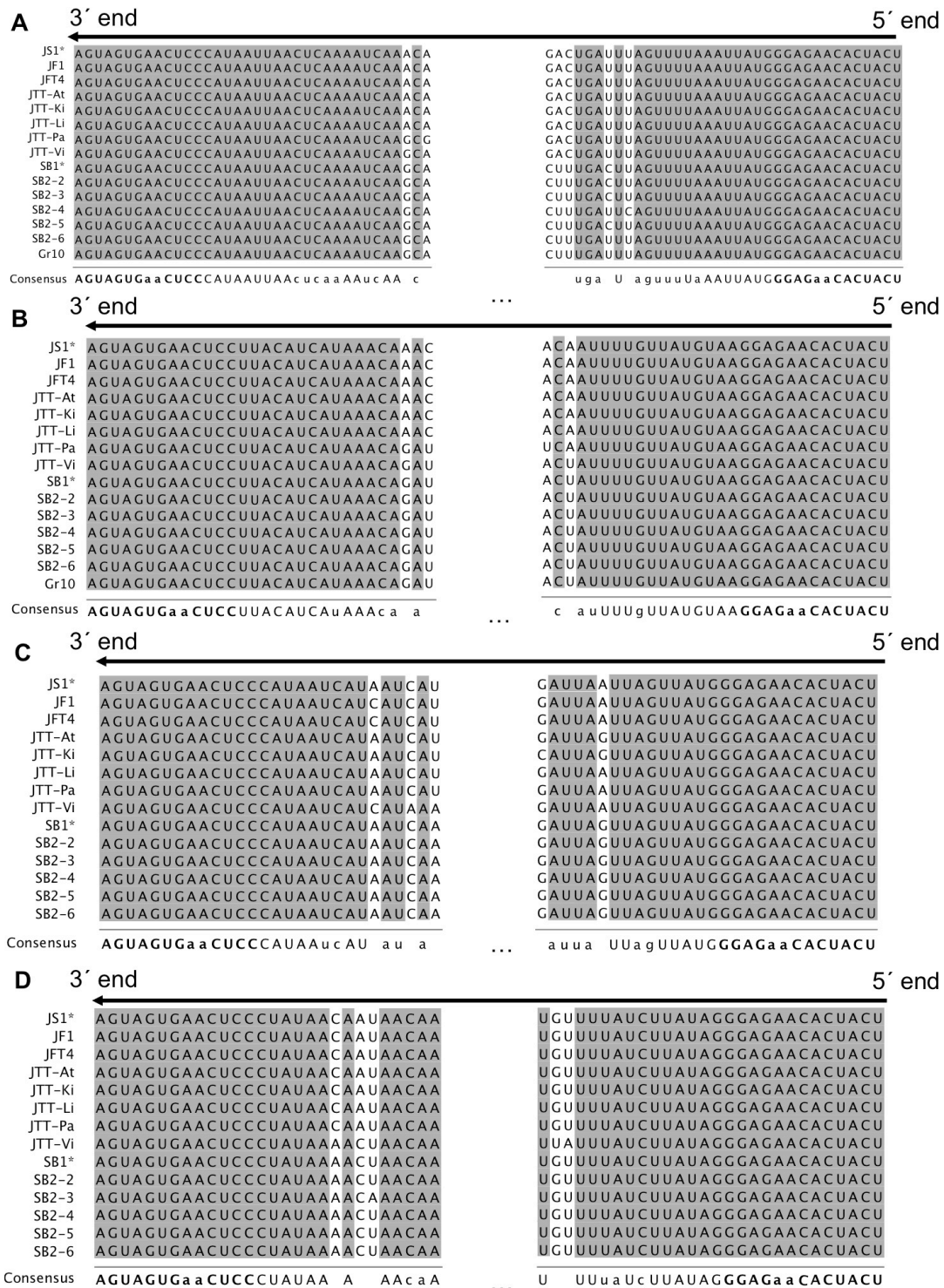


Fig. 3-5 セグメントごとの相補的な末端保存配列

(A) RNA3。 (B) RNA4。 (C) RNA5。 (D) RNA6。

各アラインメントの下方にコンセンサス配列を示す。太字は全てのセグメントで保存される13 ntを、大文字は反対末端と相補であることを示す。分離株のアスタリスクは RACE 解析を行ったことを意味する。

Table 3-3 本研究で配列解析を行った FMV ゲノムセグメントの配列とアクセッションナンバー

分離株	全長 (nt)	3'UTR (nt)	ORF (nt)	5'UTR (nt)	Acc No
RdRp 部分配列 (E5-s, E5-a プライマーによる RT-PCR 産物)					
JS1	260	-	-	-	AB683863*
JF1	260	-	-	-	AB697830
JFT4	260	-	-	-	AB697831
JTT-At	260	-	-	-	AB697832
JTT-Ki	260	-	-	-	AB697833
JTT-Li	260	-	-	-	AB697834
JTT-Pa	260	-	-	-	AB697835
JTT-Vi	260	-	-	-	AB697836
SB1	260	-	-	-	AB697837
SB2-2	260	-	-	-	AB697838
SB2-3	260	-	-	-	AB697839
SB2-4	260	-	-	-	AB697840
SB2-5	260	-	-	-	AB697841
SB2-6	260	-	-	-	AB697842
RNA3					
JS1	1490	99	948	443	AB697843
JF1	1490	99	948	443	AB697844
JFT4	1490	99	948	443	AB697845
JTT-At	1491	99	948	444	AB697846
JTT-Ki	1491	99	948	444	AB697847
JTT-Li	1490	99	948	443	AB697848
JTT-Pa	1492	99	948	445	AB697849
JTT-Vi	1490	99	948	443	AB697850
SB1	1490	99	948	443	AB697851
SB2-2	1490	99	948	443	AB697852
SB2-3	1490	99	948	443	AB697853
SB2-4	1491	99	948	444	AB697854
SB2-5	1490	99	948	443	AB697855
SB2-6	1491	99	948	444	AB697856
RNA4					
JS1	1485	81	1086	318	AB697857
JF1	1485	81	1086	318	AB697858
JFT4	1485	81	1086	318	AB697859
JTT-At	1485	81	1086	318	AB697860
JTT-Ki	1485	81	1086	318	AB697861
JTT-Li	1485	81	1086	318	AB697862
JTT-Pa	1486	81	1086	319	AB697863
JTT-Vi	1486	81	1086	319	AB697864
SB1	1486	81	1086	319	AB697865
SB2-2	1486	81	1086	319	AB697866
SB2-3	1486	81	1086	319	AB697867
SB2-4	1486	81	1086	319	AB697868
SB2-5	1486	81	1086	319	AB697869
SB2-6	1486	81	1086	319	AB697870
RNA5					

JS1	1752	57	1509	186	AB697871
JF1	1704	57	1461	186	AB697872
JFT4	1703	57	1461	185	AB697873
JTT-At	1752	57	1509	186	AB697874
JTT-Ki	1752	57	1509	186	AB697875
JTT-Li	1752	57	1509	186	AB697876
JTT-Pa	1752	57	1509	186	AB697877
JTT-Vi	1704	57	1461	186	AB697878
SB1	1704	57	1461	186	AB697879
SB2-2	1703	56	1461	186	AB697880
SB2-3	1703	56	1461	186	AB697881
SB2-4	1704	57	1461	186	AB697882
SB2-5	1704	57	1461	186	AB697883
SB2-6	1703	56	1461	186	AB697884
RNA6					
JS1	1216	68	699	499	AB697885
JF1	1215	68	699	498	AB697886
JFT4	1216	68	699	499	AB697887
JTT-At	1215	68	699	498	AB697888
JTT-Ki	1214	68	699	497	AB697889
JTT-Li	1215	68	699	498	AB697890
JTT-Pa	1216	68	699	499	AB697891
JTT-Vi	1216	68	699	499	AB697892
SB1	1216	68	699	499	AB697893
SB2-2	1216	68	699	499	AB697894
SB2-3	1215	68	699	498	AB697895
SB2-4	1216	68	699	499	AB697896
SB2-5	1216	68	699	499	AB697897
SB2-6	1216	68	699	499	AB697898

* 本配列は第 2 章の研究で報告した。

分離株間配列同一性の比較

新規 RNA セグメントの分離株間の配列多様性を調べるために、既報のゲノムセグメントである RNA3、RNA4 と共に RNA5、RNA6 とそれらにコードされると推定されるタンパク質アミノ酸配列について FMV 14 分離株間の同一性を調べた。RNA3 と RNA4 に関しては Gr10 分離株の配列も合わせて比較した。その結果、RNA3 と RNA4 は 15 分離株間でそれぞれ 93.0–99.9%、93.8–99.9%の塩基配列の同一性が見られた (Table 3-4, B and C)。NP と p4 はどちらも 97.8–100%のアミノ酸配列同一性が見られた。それに対し、RNA5 と RNA6 の塩基配列の同一性はやや低く、その値はそれぞれ 84.4–100%と 90.0–99.8%であった (Table 3-4, D and E)。これらにコードされるタンパク質 p5 と p6 についても同様の傾向が見られ、81.9–100%と 87.1–100%のアミノ酸配列の同一性であった。RNA3、RNA4、RNA5、RNA6 の 14 分離株間の平均遺伝距離を計算すると、塩基配列でそれぞれ 4.7、3.3、8.9、5.5%、コードされるタンパク質のアミノ酸配列でそれぞれ 1.1、1.0、10.8、7.3%であった。以上の解析から、RNA5、RNA6 とこれらのセグメントにコードされるタンパク質は分離株間で高い同一性を示すものの、その他のセグメントに比べると配列可塑性に富んでおり、特に RNA5 と p5 は多様性が高いことが明らかとなった。

Table 3-4 A RdRp 遺伝子部分領域の分離株間同一性

分離株	JS1	JF1	JFT4	JTT-At	JTT-Ki	JTT-Li	JTT-Pa	JTT-Vi	SB1	SB2-2	SB2-3	SB2-4	SB2-5	SB2-6	Gr10
JS1	89.2	89.2	89.2	98.1	96.9	97.7	88.5	97.3	90.4	89.6	89.6	89.6	96.9	88.5	87.3
JF1		100.0	100.0	89.6	89.2	89.2	92.7	88.8	96.5	99.6	96.5	96.5	88.5	92.7	92.3
JFT4			89.6	89.6	89.2	89.2	92.7	88.8	96.5	99.6	96.5	96.5	88.5	92.7	92.3
JTT-At				98.8	98.8	99.6	88.1	99.2	90.8	89.2	90.0	90.0	98.8	88.1	87.7
JTT-Ki					98.5	87.7	87.7	98.1	89.6	88.8	88.8	88.8	97.7	87.7	87.3
JTT-Li						87.7	87.7	99.6	90.4	88.8	89.6	89.6	98.5	87.7	87.3
JTT-Pa							87.3	87.3	91.2	92.3	91.2	91.2	86.9	100.0	89.6
JTT-Vi								90.0	90.0	88.5	89.2	89.2	98.1	87.3	86.9
SB1									96.2	96.2	99.2	99.2	89.6	91.2	92.3
SB2-2										96.2	96.2	96.2	88.1	92.3	91.9
SB2-3											99.2	99.2	88.8	91.2	92.3
SB2-4												99.2	88.8	91.2	92.3
SB2-5													88.8	91.2	92.3
SB2-6														86.9	86.5
Gr10															89.6

Table 3-4 B RNA3 と NP 配列の分離株間同一性 (右上が RNA3、左下が NP)

分離株	JS1	JF1	JFT4	JTT-At	JTT-Ki	JTT-Li	JTT-Pa	JTT-Vi	SB1	SB2-2	SB2-3	SB2-4	SB2-5	SB2-6	Gr10
JS1	96.4	99.9	96.5	98.9	96.4	94.3	94.3	94.5	94.8	93.9	94.0	94.5	93.9	93.9	93.3
JF1	99.4	96.4	99.3	96.5	99.3	93.2	94.0	94.3	94.5	93.4	93.5	94.1	94.1	93.4	93.4
JFT4	100.0	99.4	96.5	98.9	96.4	94.3	94.3	94.6	94.9	93.9	94.1	94.6	94.6	93.9	93.4
JTT-At	99.4	100.0	99.4	96.5	99.7	93.0	94.0	94.1	94.3	93.6	93.5	93.9	93.9	93.4	93.4
JTT-Ki	99.7	99.0	99.7	99.0	96.5	94.0	94.1	94.6	94.9	93.8	93.8	94.6	94.6	93.8	93.4
JTT-Li	99.0	99.7	99.0	99.7	98.7	93.2	94.0	94.1	94.3	93.6	93.5	93.9	93.9	93.4	93.4
JTT-Pa	98.7	99.0	98.7	99.0	98.4	98.7	94.6	94.5	94.7	94.3	94.5	94.3	94.3	94.4	94.3
JTT-Vi	98.1	98.1	98.1	97.8	97.8	98.1	98.1	95.2	95.5	94.4	95.0	95.1	95.1	94.8	94.1
SB1	99.7	99.7	99.7	99.4	99.4	99.0	98.4	99.7	99.7	96.6	96.2	99.2	96.2	96.2	95.6
SB2-2	99.7	99.7	99.7	99.4	99.4	99.0	98.4	99.7	99.7	96.8	96.6	99.6	96.6	96.6	96.0
SB2-3	98.7	98.7	98.7	98.4	98.4	98.1	98.7	96.6	99.0	95.5	95.5	96.4	95.6	94.8	94.8
SB2-4	98.4	98.4	98.4	98.1	98.1	98.4	97.8	96.3	98.7	97.8	97.8	96.3	96.3	99.3	95.6
SB2-5	99.7	99.7	99.7	99.4	99.4	99.0	98.4	99.3	100.0	99.0	98.7	96.5	96.5	95.7	95.7
SB2-6	98.4	98.4	98.4	98.1	98.1	98.4	98.4	96.3	98.7	98.4	99.4	98.7	98.7	95.8	95.8
Gr10	98.4	98.4	98.4	98.1	98.1	98.4	97.8	98.7	98.7	97.8	98.7	98.7	98.7	98.7	98.7

Table 3-4 C RNA4 と p4 配列の分離株間同一性 (右上が RNA4、左下が p4)

分離株	JS1	JF1	JFT4	JTT-At	JTT-Ki	JTT-Li	JTT-Pa	JTT-Vi	SB1	SB2-2	SB2-3	SB2-4	SB2-5	SB2-6	Gr10
JS1	99.0	99.9	98.9	99.2	99.0	95.3	95.8	95.5	95.3	95.1	95.8	95.3	95.1	95.8	94.4
JF1	99.4	99.0	98.8	99.0	98.9	94.9	95.2	94.9	94.8	94.6	95.3	94.7	94.7	94.7	93.8
JFT4	100.0	99.4	98.9	99.2	99.0	95.1	95.6	95.3	95.2	95.0	95.7	95.1	95.1	95.1	94.2
JTT-At	100.0	99.4	100.0	99.7	99.9	94.9	95.2	95.2	95.1	94.9	95.3	95.0	95.3	95.0	93.8
JTT-Ki	100.0	99.4	100.0	100.0	99.9	95.0	95.3	95.3	95.2	95.0	95.4	95.1	95.4	95.1	94.0
JTT-Li	100.0	99.4	100.0	100.0	99.9	95.0	95.3	95.3	95.2	95.0	95.4	95.1	95.4	95.1	94.0
JTT-Pa	98.9	98.3	98.9	98.9	98.9	96.9	97.4	97.4	97.4	97.2	96.7	97.5	97.5	97.5	95.3
JTT-Vi	98.6	98.1	98.6	98.6	98.6	98.6	98.4	97.9	97.7	97.7	98.6	97.8	98.6	97.8	96.0
SB1	98.6	98.1	98.6	98.6	98.6	98.1	99.4	97.7	97.4	97.3	99.6	97.5	99.6	97.5	95.9
SB2-2	98.6	98.1	98.6	98.6	98.6	98.6	99.4	99.7	99.7	99.5	97.9	99.8	99.8	99.8	96.0
SB2-3	98.6	98.1	98.6	98.6	98.6	98.6	100.0	100.0	99.7	99.7	97.7	99.9	99.7	99.9	95.8
SB2-4	98.3	97.8	98.3	98.3	98.3	98.3	99.2	99.7	99.7	99.7	97.6	99.7	97.6	99.7	95.7
SB2-5	98.6	98.1	98.6	98.6	98.6	98.6	100.0	100.0	100.0	99.7	97.7	99.7	97.7	99.7	96.2
SB2-6	98.6	98.1	98.6	98.6	98.6	98.6	100.0	100.0	100.0	99.7	100.0	99.7	100.0	99.7	95.8
Gr10	98.3	97.8	98.3	98.3	98.3	98.3	99.2	99.7	99.7	100.0	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7

Table 3-4 D RNA5 と p5 配列の分離株間同一性 (右上が RNA5、左下が p5)

分離株	JS1	JF1	JFT4	JTT-At	JTT-Ki	JTT-Li	JTT-Pa	JTT-Vi	SB1	SB2-2	SB2-3	SB2-4	SB2-5	SB2-6
JS1		86.3	86.0	98.6	98.5	98.6	93.4	84.4	86.0	85.6	85.8	85.7	85.6	85.8
JF1	84.5		97.9	86.3	86.2	86.3	86.6	87.1	89.2	88.3	88.6	88.5	89.2	88.6
JFT4	84.3	99.4		86.2	86.1	86.2	86.2	87.4	89.2	88.2	88.4	88.4	89.3	88.3
JTT-At	98.6	84.7	84.5		99.9	100.0	93.0	84.7	86.2	85.7	86.0	85.9	86.2	85.8
JTT-Ki	98.6	84.7	84.5	100.0		99.9	92.9	84.5	86.0	85.6	85.9	85.7	86.1	85.7
JTT-Li	98.6	84.7	84.5	100.0	100.0		93.0	84.7	86.2	85.7	86.0	85.9	86.2	85.8
JTT-Pa	93.4	83.5	83.3	94.2	94.2	94.2		84.4	86.5	85.9	86.0	85.9	86.6	85.9
JTT-Vi	81.9	87.4	87.2	82.7	82.7	82.7	81.3		91.1	90.4	90.6	90.5	91.1	90.5
SB1	83.3	89.3	89.1	83.5	83.5	83.5	82.7	88.5		93.8	93.9	93.8	99.8	93.9
SB2-2	83.5	89.1	88.9	83.7	83.7	83.7	83.5	89.9	93.0		99.5	99.4	93.7	99.8
SB2-3	83.7	89.3	89.1	83.9	83.9	83.9	83.7	89.7	92.8	99.4		99.8	93.9	99.5
SB2-4	83.5	89.1	88.9	83.7	83.7	83.7	83.5	89.9	93.0	99.6	99.8		93.7	99.5
SB2-5	83.3	89.3	89.1	83.5	83.5	83.5	82.7	88.5	100.0	93.0	92.8	93.0		93.8
SB2-6	83.5	89.1	88.9	83.7	83.7	83.7	83.5	89.9	93.0	100.0	99.4	99.6	93.0	

Table 3-4 E RNA6 と p6 配列の分離株間同一性 (右上が RNA6、左下が p6)

分離株	JS1	JF1	JFT4	JTT-At	JTT-Ki	JTT-Li	JTT-Pa	JTT-Vi	SB1	SB2-2	SB2-3	SB2-4	SB2-5	SB2-6
JS1	98.7	99.3	98.7	98.7	98.7	98.7	95.6	90.3	91.5	91.8	91.3	92.1	91.8	91.7
JF1	99.1	98.3	99.3	99.2	99.3	99.3	95.6	90.4	91.4	91.7	91.2	91.9	91.8	91.6
JFT4	97.8	97.8	98.5	98.5	98.5	98.5	95.3	90.0	91.2	91.4	91.0	91.8	91.5	91.3
JTT-At	99.1	97.8	97.8	99.5	99.8	99.8	95.5	90.5	91.5	91.8	91.3	92.1	91.8	91.7
JTT-Ki	98.7	99.1	97.4	99.6	99.5	99.5	95.5	90.4	91.4	91.7	91.2	91.9	91.8	91.6
JTT-Li	98.7	97.4	97.4	99.6	99.1	99.1	95.5	90.6	91.6	91.8	91.4	92.2	91.9	91.8
JTT-Pa	98.7	97.4	97.4	98.7	98.3	98.3	90.8	91.7	91.9	91.9	91.8	92.3	92.0	91.8
JTT-Vi	88.8	88.4	87.1	89.2	88.8	89.2	89.7	96.0	96.0	96.2	95.8	95.7	96.1	95.5
SB1	89.7	88.8	87.5	89.7	89.2	89.7	90.1	95.3	99.7	99.7	96.6	96.6	99.7	96.4
SB2-2	90.5	89.7	88.4	90.5	90.1	90.5	90.9	96.1	99.1	99.1	96.8	96.8	99.9	96.6
SB2-3	88.8	87.9	86.6	88.8	88.4	88.8	89.2	95.7	95.3	96.1	97.0	97.0	96.7	96.8
SB2-4	89.7	88.8	87.5	89.7	89.2	89.7	90.1	95.7	95.7	96.6	95.3	96.7	96.7	99.5
SB2-5	90.5	89.7	88.4	90.5	90.1	90.5	90.9	96.1	99.1	100.0	96.1	96.6	96.6	96.6
SB2-6	89.7	88.8	87.5	89.7	89.2	89.7	90.1	95.7	95.7	96.6	95.3	100.0	96.6	96.6

ノーザンブロット解析

RNA5 と RNA6 が感染イチジク内でゲノムセグメントと同様に蓄積しているかを確認するために、ノーザンブロット解析を行った。コントロールとして既報のゲノムセグメントである RNA3 の検出を行った。プローブには vRNA と vcRNA を検出するために両方向の RNA プローブをそれぞれ用いた。その結果、FMV 感染イチジクの全 RNA から、RNA3、RNA5、RNA6 の全長に一致する長さのシグナルが、vRNA と vcRNA を検出するいずれのプローブを用いた場合にも検出された (Fig. 3-6)。この事実は RNA5 と RNA6 がウイルスによって複製され、双方の極性の RNA 鎖が感染イチジク内で蓄積していることを示唆している。ノーザン解析が Elbeaino らによってなされた際には、vRNA のみが検出され vcRNA は検出されていなかった (Elbeaino et al., 2009a)。本実験の結果は、この先行研究における知見と矛盾するように思われるが、これは本研究とのプローブの感度の違いか、あるいはウイルス分離株ごとに vRNA と vcRNA の蓄積量比が異なることに起因しているものと考えられる。

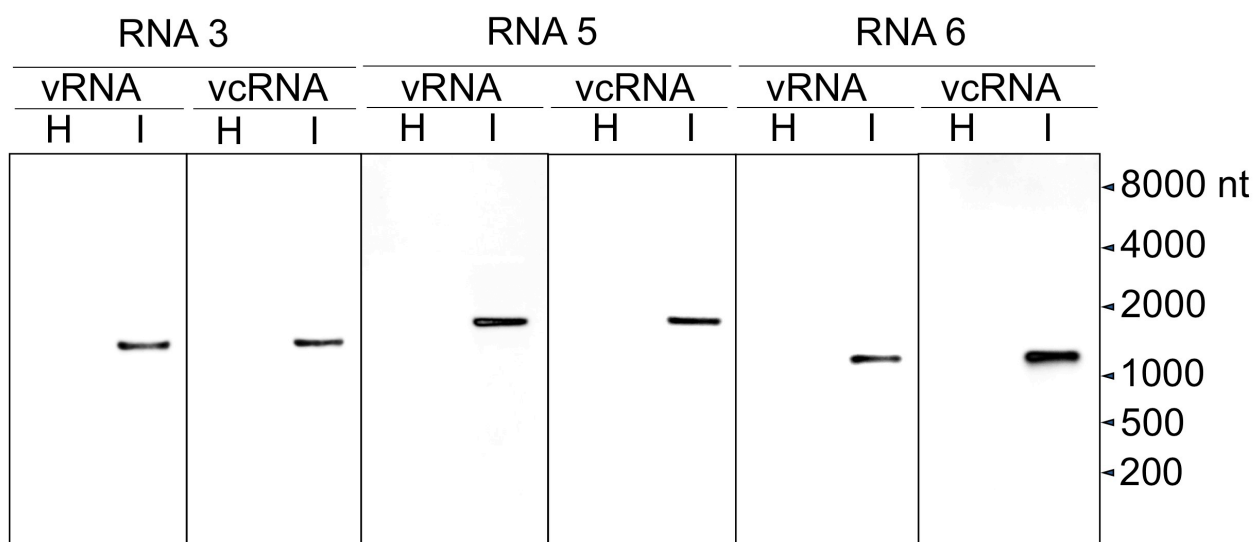


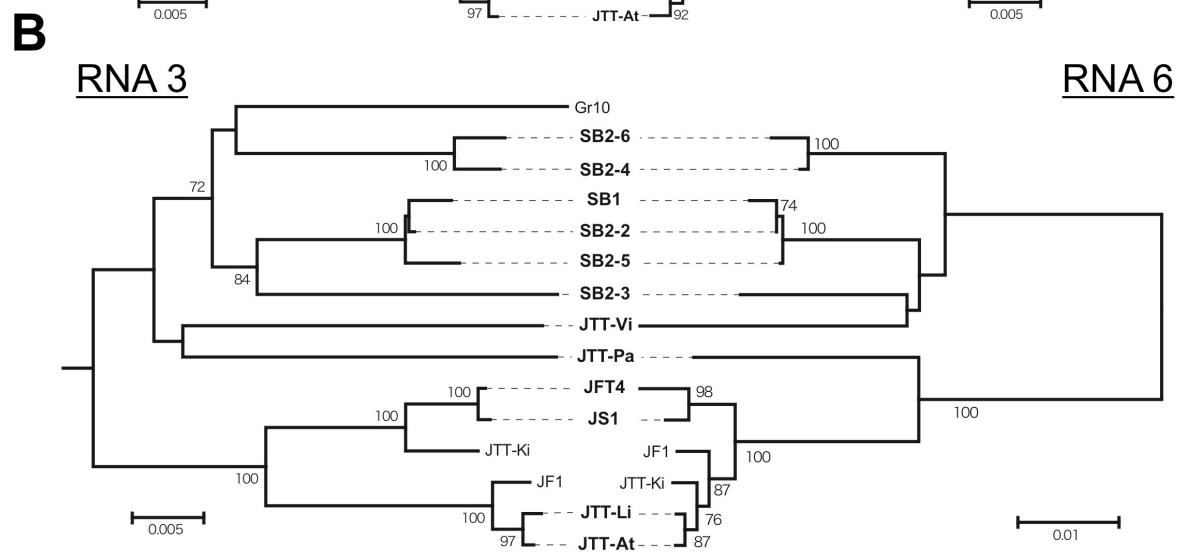
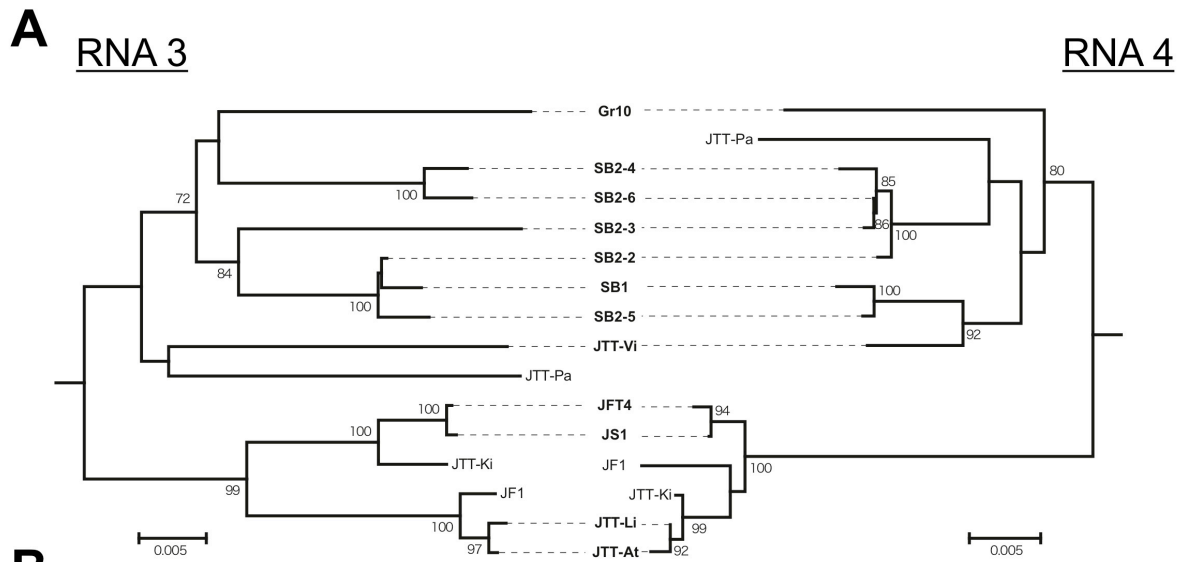
Fig. 3-6 ノーザンブロットによる RNA5、RNA6 の検出

H: 健全イチジク RNA。I: JS1 に感染したイチジク RNA。RNA3、RNA5、RNA6 のそれぞれ 280-1280、100-1100、120-1120 nt に相当する領域で RNA プローブを設計し、vRNA と vcRNA を別々に検出した。

セグメント間の分子進化の比較解析

これまでの一連の研究によって、RNA5 と RNA6 は FMV の新規ゲノムセグメントである可能性が非常に高いと考えられたが、さらなる証拠を得るためにセグメント間で分子進化が一致しているか比較解析を行った。分節ゲノムを有するウイルスでは、セグメント毎の配列を用いて分子系統樹を作成した場合、その樹形が似ることが知られている (Carroll et al., 2010; Tentchev et al., 2011)。そこで、RNA3、RNA4、RNA5、RNA6 に関して本研究で収集した 14 分離株と、RNA3、RNA4 に関しては Gr10 分離株を用いて分子系統樹を作成した。なお、RNA3 と RNA4 のアウトグループには RRV の配列を用いたが、RNA5 と RNA6 に関しては適切なアウトグループは存在しない。

作成した 4 つの分子系統樹は互いに似ていたが、特に RNA3-RNA4 (Fig. 3-7 A)、RNA3-RNA6 (Fig. 3-7 B)、RNA4-RNA5 (Fig. 3-7 C) 間で樹形が良く一致した。個々のセグメントにおける分子系統樹では、分離株は基本的に地理的条件を反映したクラスタリングとなった。6 つの日本分離株 (JS1、JF1、JFT4、JTT-At、JTT-Li、JTT-Ki) はいずれのセグメントにおいても 100% のブートストラップ値でクラスタリングし、全てのセルビア分離株と Gr10 イタリア分離株は 72% 以上のブートストラップ値でクラスタリングした。以上の結果から、RNA5 と RNA6 はその他の FMV ゲノムセグメントと同様の分子進化を辿ってきたことが示唆され、RNA5 と RNA6 は FMV のゲノムセグメントであることが強く示唆された。



C

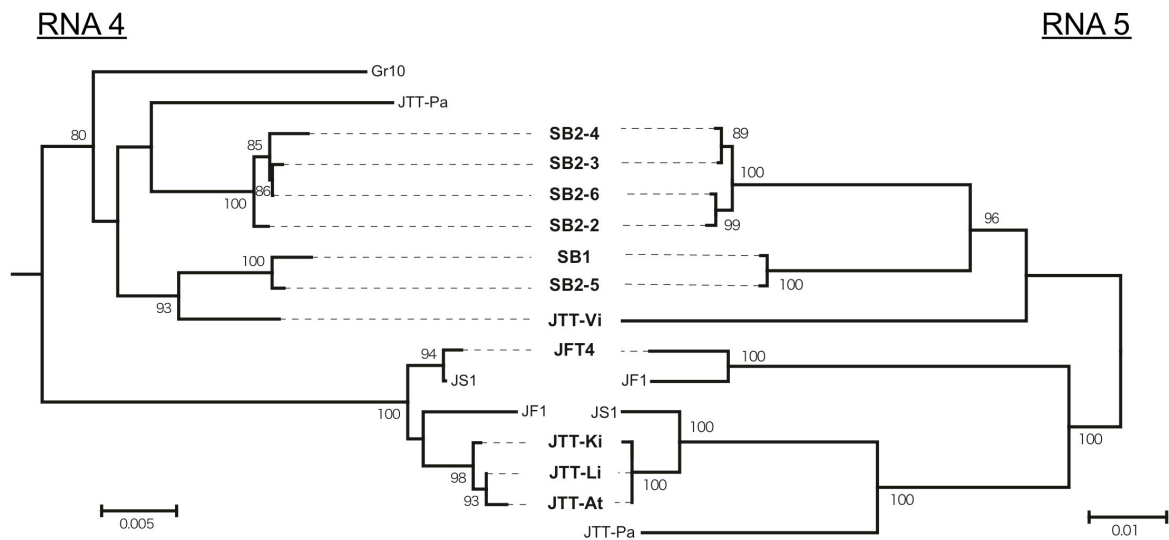


Fig. 3-7 セグメント間の分子進化比較解析

FMVの各分離株のRNA3、RNA4、RNA5、RNA6の完全長を用いて近隣結合法により分子系統樹を作成し、樹形を互いに比較した。RNA3とRNA4の分子系統樹のアウトグループにはRRVの配列を用いた。(A) RNA3-RNA4。(B) RNA3-RNA6。(C) RNA4-RNA5。各ノードに示す値はブートストラップ値。70%以上の値のみ表記している。スケールバーは一塩基あたりの置換率を示している。

3.4. 考察

新規ゲノムセグメント RNA5、RNA6

本実験により FMV の既報のセグメント RNA1~RNA4 に加えて、これまで発見されていないセグメント RNA5、RNA6 が存在していることが示された (Fig. 3-9 [pp 82])。RNA5、RNA6 は以下に挙げる四つの理由から FMV のゲノムセグメントであることが強く示唆された。

① 地理的条件が大きく異なる複数の地域から得られた 14 分離株すべてから、これらの RNA セグメントが検出された。日本で得られた分離株のみならず、セルビアから得られた分離株からも検出されることはこれらの RNA セグメントが FMV に普遍的に存在していることを強く示唆している。

② FMV の既報ゲノムと構成が酷似していた。RNA5 と RNA6 は既報のゲノムと同様に、配列上に単一の推定 ORF を有し、3'末端と 5'末端に 13 nt からなる配列が保存されている。このことは、これらの RNA 種が FMV のゲノムと同様の機構により複製・転写・翻訳されている可能性を示唆している。

③ 両方の極性の RNA 鎖が感染植物内に蓄積していた。ノーザンブロット解析により、RNA3 と同様に RNA5 と RNA6 で両方の極性の鎖 (vRNA、vcRNA) が感染植物に蓄積していることが示された。この結果は、これらの RNA がゲノムとして FMV の感染植物中で複製されていることを示している。

④ 既報のゲノムセグメントと共に分子進化をしていた。セグメントごとに描画した分子系統樹の間で樹形が似ていることにより、RNA5 と RNA6 は既報のゲノムセグメントと分子進化をともにしており、ゲノムであることが強く示唆される。

多分節ゲノムを有するウイルスは単分節ゲノムを有するウイルスと比較して、ゲノムを決定することが難しい。一般的には、精製した粒子より RNA 抽出を行い、抽出された RNA をシーケンスすることでゲノム配列を決定する手法が用いられる (Toriyama et al., 1997; Roggero et al., 2000)。しかしながら、FMV はウイルス粒子精製が困難であり、感染葉を分画しても十分な量の粒子と RNA を回収することは出来な

かった。そのため、本研究では複数の FMV 分離株から RNA5、RNA6 が検出されること、それらの分子進化がゲノムの分子進化と酷似していることを根拠とし、RNA5、RNA6 がゲノムセグメントであることを示した。

RNA ウイルスにはゲノム以外にも、サテライト RNA や defective RNA と呼ばれる、ウイルスに随伴し複製される、ゲノムではない RNA が存在することがある (Simon et al., 2004)。defective RNA は親ウイルスのゲノムの欠損変異により生じた RNA 種であり、親ウイルスのゲノムと配列の同一性を示すが、RNA5 と RNA6 はそのような特徴を有さないため defective RNA ではないことが分かる。一方、本研究で得られた実験結果からは RNA5 または RNA6 がサテライト RNA である可能性を完全に排除は出来なかった。しかし、RNA5 と RNA6 は複数地域由来の分離株の全てから検出され、ゲノムセグメントと分子進化を共にしていることから FMV の生活環に必須なセグメントであることが示唆され、ゲノムである可能性が非常に高いと判断される。

分離株ごとの分子進化について

セグメントごとの分子進化の比較では特定のセグメントにおいて、その他のセグメントと進化関係が一致しない分離株が存在するが (Fig. 3-7; JF1 の RNA5 や JTT-Ki の RNA3 など)、これらはゲノムセグメントの再集合 (reassortment) が起こった結果によるものと考えられる。ゲノムセグメントの再集合とはウイルス分離株間で一部のセグメントだけが入れ替わる現象であり、植物の分節マイナス鎖 RNA ウイルスでは *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) で報告されている (Tentchev et al., 2011)。また、JTT-Pa は RNA3、JTT-Vi は RNA3 と RNA5 においていずれの分離株とも強くクラスタリングしなかった一方で、JTT-Pa は RNA5 と RNA6、JTT-Vi は RNA4 と RNA6 においては高いブートストラップ値でその他の分離株とクラスタリングした。この原因としては、JTT-Pa と JTT-Vi は系統学的に大きく離れた分離株とゲノムの再集合を起こしたか、特定のセグメントを変化させる強い進化圧を受けてきたのかも知れない。今後、これらの分離株について生物学的特徴がその他の分離株と異なるか調べる必要が有る。

RNA5、RNA6 にコードされるタンパク質の機能

RNA5 と RNA6 にコードされるタンパク質 p5 と p6 はいかなる既知の配列とも有意な相同性を示さず、機能についての情報を得ることはできなかった。p5 に関してはアミノ酸配列中に欠失もしくは挿入変異が見られ、また、分離株間の配列同一性の比較から可塑性に富むことが分かっている。配列の可塑性は複数の植物ウイルスの RNA サイレンシングサブレッサーでも見られる特徴である (Margaria et al., 2007; EISayed et al., 2011; Tentchev et al., 2011)。これまでに FMV は RNA1 にコードされる p1 が RdRp、RNA2 にコードされる p2 が glycoprotein、RNA3 にコードされる p3 が NP であることが、その他のウイルス属との配列相同性から明らかとなっている。さらに第 5 章で述べる研究結果によって、RNA4 にコードされる p4 はウイルス移行タンパク質 (MP) であることが明らかとなっている。植物ウイルスは RdRp やキャプシドタンパク質、MP がサイレンシングサブレッサーの機能も同時に有していることがあるが、これまで知られている植物マイナス鎖 RNA ウイルスでは独立したタンパク質としてサイレンシングサブレッサーをコードしており (Bucher et al., 2003; Xiong et al., 2009)、RdRp、glycoprotein、NP や MP などが機能を兼ねているという報告はない。以上の状況的証拠から p5 が FMV のサイレンシングサブレッサーである可能性がある。p6 に関しては、配列中に *Bunyavirus* 科の RdRp のモチーフが弱く保存されていることが大きな特徴である。このことから、p6 は RdRp と協調的に働くタンパク質ではないかと推定される。いずれのタンパク質に関しても、その機能を知るためにさらなる研究が必要である。

その他の分離株における RNA5、RNA6 の存在

FMV の先行の研究において、全てのゲノムセグメントの vRNA 鎖の 3'末端に保存される 13 塩基配列を DNA プローブとして用いたノーザンブロット解析を基に、FMV Gr10 イタリア分離株は 4 本のゲノムを有するとされている (Elbeaino et al., 2009b; Fig. 3-8)。しかし、13 nt の長さのプローブはノーザンブロットに用いるものとしては

非常に短く、特異性の低下が予想される。実際に 1000–2000 nt に検出されるシグナルは不鮮明であり、その間に何本のバンドが観察されるのかは判断が不可能である。よって、FMV Gr10 イタリア分離株にも RNA5 と RNA6 が存在しているのではないかと推察された。実際に本研究の内容を発表した直後に Gr10 分離株においても RNA5、RNA6 が存在することが報告された (Elbeaino et al., 2012)。Gr10 分離株の RNA5 は本章で解析した 14 FMV 分離株と塩基配列において 84.4–93.4%、p5 アミノ酸配列において 81.9–94.6%の同一性が見られ、RNA6 は塩基配列において 90.7–95.8%、p6 アミノ酸配列において 78.2–85.0%の同一性が見られた。よって、Gr10 で見出された RNA5 と RNA6 は本章の研究により見出された RNA5 と RNA6 のそれぞれホモログであり、Gr10 分離株にも RNA5 と RNA6 が存在することが分かった。なお、Gr10 の配列同一性が低くなっているのは、Gr10 の p6 の C 末端領域が 4kDa 程短くなった ORF が予測されるためである。以上のことから、RNA5 と RNA6 は FMV に普遍的に存在するゲノムであることが示唆された (Fig. 3-9 [pp 82])。

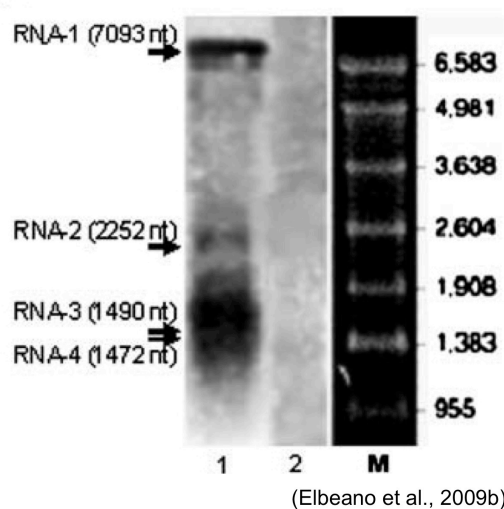


Fig. 3-8 Elbeaino et al による vRNA 鎖の 3' 末端 13 nt をプローブとして用いたノーザンプロット解析

レーン 1: FMV Gr10 イタリア分離株に感染したイチジク RNA。レーン 2: 健全イチジク RNA。M: RNA マーカー。

その他の Emaravirus 属ウイルスにおける RNA5、RNA6 の存在

本研究を行っている期間、及び報告後にも新規の Emaravirus と新規のゲノムセグメントの報告が相次いでおり、まず 2 種のウイルス PPSMV2 と RLBV が報告され

た (Table 3-5; McGavin et al., 2012; Elbeaino et al., 2015)。PPSMV2 は当初より 6 分節ゲノムと報告され、RLBV の両ウイルスは当初は 5 分節と報告されていたが、後に、さらに 3 本のセグメントが存在することが報告された (Lu et al., 2015)。さらに既に報告されていた 3 種のウイルスも、RRV に関しては 7 分節、PPSMV は 5 分節、WMOV は 8 分節であると情報が更新された (Elbeaino et al., 2014; Tatineni et al., 2014; Di Bello et al., 2015)。これらの新規に報告された配列のうち、FMV の RNA5 にコードされると考えられる p5 は PPSMV、PPSMV2、RRV の RNA5 の p5 とそれぞれ 29.2%、30.6%、36.0%の推定アミノ酸配列同一性が見られる。また、FMV の RNA6 は PPSMV2、RRV の p6 とそれぞれ 23.9%、30%の推定アミノ酸配列同一性が見られた。これらのことから、本研究により発見された FMV RNA5、RNA6 は Emaravirus 間で保存されるウイルスゲノムである可能性が高いと考えられる。

***Emaravirus* 属のゲノムセグメントの本数**

ゲノムセグメントの本数の違い、すなわちゲノム構成の違いは、それらのウイルスの性状の違いに直接的に反映されると考えられることから、ウイルスを研究する上で重要な性質であると考えられる。しかし、これまでに報告されている *Emaravirus* 属におけるセグメントの本数にはばらつきがある (Table 3-5)。これらのウイルスの中にも未だに報告されていないセグメントが存在する可能性が考えられると同時に、報告された配列のうちいずれかがゲノムセグメントでない可能性もある。Table 3-5 で示す通り、RRV、RLBV、WMOV では報告されたセグメントの中に互いに高い相同性のあるものが存在している (Tatineni et al., 2014; Di Bello et al., 2015; Lu et al., 2015)。これらの配列の多くが、次世代シーケンサーによる感染植物の網羅的な配列解読によるもので、その他の方法での解析を行っていない。分節数の多いウイルスでは、恐らく複製ユニットが trans に機能しやすいことから、ゲノムセグメントの多型が出現しやすい傾向にあると考えられる (Grigoras et al., 2009)。これらのどれがゲノムであるか決定するにはさらなる解析が必要であると考えられる。

Table 3-5 各 *Emaravirus* 属の推定ゲノムセグメントとコードされるタンパク質 (2015年12月現在)

Virus Species (自然宿主) (媒介虫)	RNA1	RNA2	RNA3	RNA4	RNA5	RNA6	RNA7	RNA8
FMV イチジク <i>Aceria ficus</i>	7018 nt 268 kDa RdRp	2253 nt 73 kDa GP†	1490 nt 35 kDa NP	1485 nt 41 kDa MP	1752 nt 59 kDa unknown	1216 nt 26 kDa unknown		
RRV バラ <i>Phyllocoptes fructiphilus</i>	7026 nt 265 kDa RdRp	2220 nt 74 kDa GP	1544 nt 36 kDa NP	1541 nt 41 kDa MP	1665 nt ^b 55 kDa unknown	1402 nt 27 kDa unknown	1649 nt ^b 54 kDa unknown	
PPSMV キマメ <i>Aceria cajani</i>	7022 nt 268 kDa RdRp	2223 nt 74 kDa GP	1442 nt 35 kDa NP	1563 nt 41 kDa MP	1801 nt 55 kDa unknown			
PPSMV2 キマメ <i>Aceria cajani</i>	7009 nt 266 kDa RdRp	2229 nt 74 kDa GP	1335 nt 35 kDa NP	1491 nt 41 kDa MP	1833 nt 55 kDa unknown	1194 nt 27 kDa unknown		
EMaRaV セイヨウウナナカマド <i>Phytoptus pyri</i>	7093 nt 266 kDa RdRp	2335 nt 75 kDa GP	1559 nt 35 kDa NP	1348 nt* 27 kDa unknown				
RLBV イチゴ <i>Phyllocoptes gracilis</i>	7062 nt 269 kDa RdRp	2135 nt 75 kDa GP	1365 nt 32 kDa NP	1675 nt 42 kDa MP	1718 nt 56 kDa unknown	1095 nt ^a 22 kDa unknown	1089 nt ^a 22 kDa unknown	1273 nt ^a 21 kDa unknown
WMoV トウモロコシ、コムギ <i>Aceria tosichella</i>	6981 nt 266 kDa RdRp	2211 nt 77 kDa GP	1439/1441 nt 33 kDa NP	1682 nt 42 kDa MP	1715 nt ^c 56 kDa unknown	1752 nt ^c 58 kDa unknown	1434 nt* 36 kDa unknown	1339 nt* 21 kDa unknown

同じアルフアベット (a, b, c)は互いに相同性があることを示している。

* その他の配列と相同性を示さない。

† GP: glycoprotein

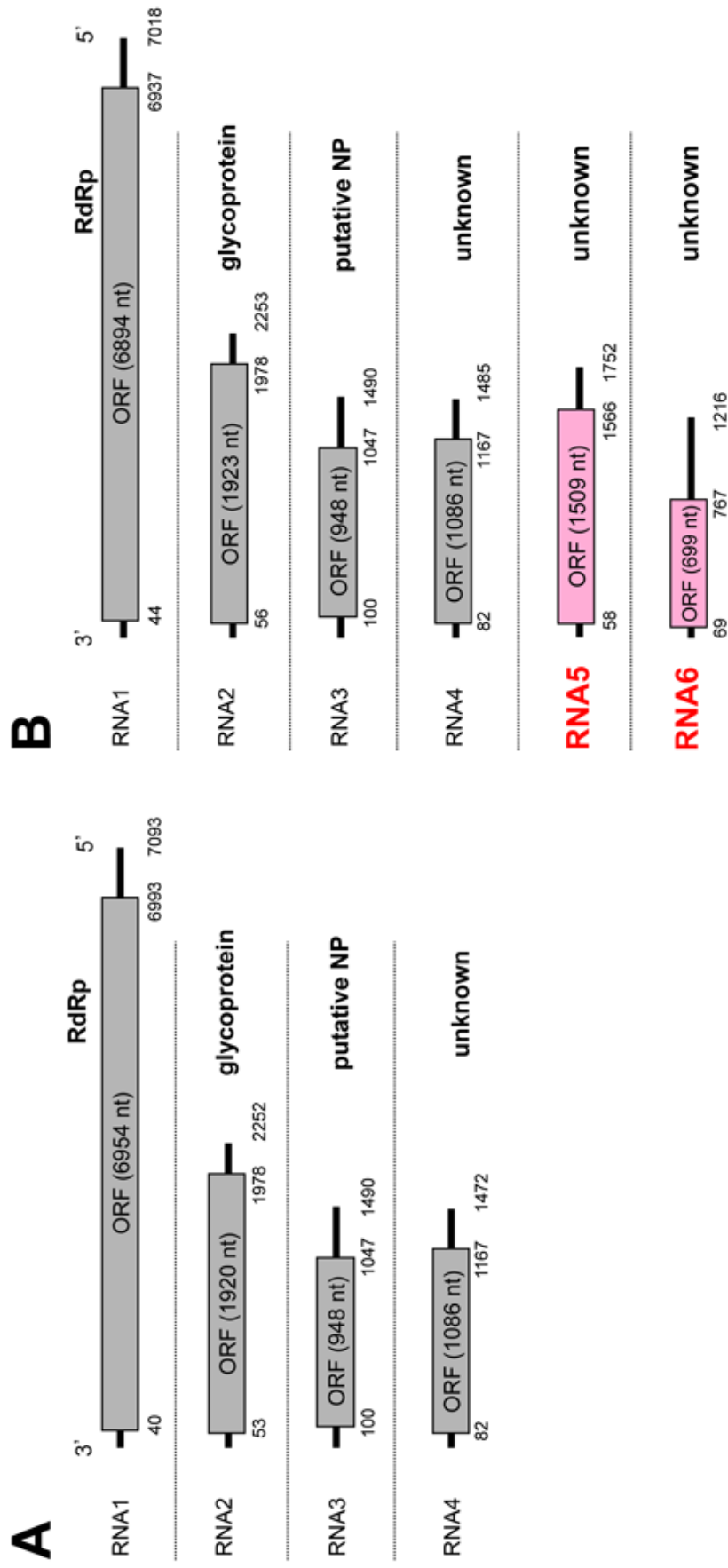


Fig. 3-9 本研究により明らかとなったFMVゲノム構造

(A) 2010年4月当時。Elbeaino et al. (2009b)を基に作成。Gr10イタリヤ分離株。

(B) 2013年1月現在。JS1日本分離株。

第4章 p4 タンパク質のウイルス細胞間移行に関わる機能の証明

4.1. 序論

植物ウイルスは移行タンパク質 (MP) を有する。 *Emaravirus* 属ウイルスにおいては研究開始時点において細胞間移行に関連する機能が示唆されたタンパク質は存在していなかった。本研究では FMV の MP を *Emaravirus* 属で初めて実験的に証明した。

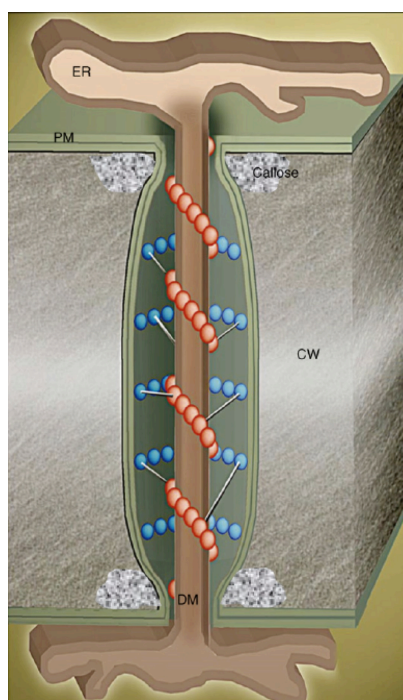
原形質連絡について

植物細胞はPD (plasmodesmata: 原形質連絡) と呼ばれる構造物を有する。PDは細胞壁を貫き細胞と細胞を繋ぐチャンネルであり、細胞間をsynplasticに接続し物質の輸送に重要な働きを担っていると考えられる。PDを介した物質の輸送には選択性があり、ある一定の分子量以上の物質の透過は妨げられていると考えられている (排除限界分子量の存在; Wolf et al., 1989)。PDの基本構造をFig. 4-1の模式図に示す。PDの内部にはデスマチューブル (desmotubule: DM) と呼ばれるER由来の膜構造が貫通しており、隣接細胞間を繋いでいる。PDの入口と出口のくびれた部分には β -1,3-glucaneが直鎖状に連結したカロースと呼ばれる多糖類が蓄積している。このカロースの蓄積とDMにより決定される空間の広さがPDの排除限界分子量を決定していると考えられている (Ueki and Citovsky, 2011; Kumar et al., 2015)。また、その他のPDを構成するタンパク質もPDにおける物質の透過に関係していると考えられている (Maule, 2008)。

ウイルスの細胞間移行と移行タンパク質

PDを介したウイルスの細胞間移行はウイルスの感染の成立に必須な過程であり、植物ウイルスは感染した細胞からPDを介して細胞間を移行し、全身へと感染を拡大する

(Harries and Ding, 2011)。植物ウイルスは植物細胞間を移行するために、自身のゲノムに移行タンパク質 (movement protein: MP) と呼ばれるタンパク質をコードし、PDにおける物質の排除限界分子量を拡大することで、ウイルス粒子やゲノムを隣接細胞へと輸送している (Wolf et al., 1989; Otulak and Garbaczewska, 2011)。その詳細なメカニズムに関しては未だ不明な点が多いが、PDを介した細胞間移行は動物ウイルスには存在せず、植物ウイルスに特有かつ普遍的な機構であることから、植物ウイルス学の中でも精力的に研究されている分野である。



(Maule, 2008)

Fig. 4-1 PD の基本構造

PD は細胞壁 (cell wall: CW) を貫き、隣接細胞間を繋ぐチャンネルである。PD の内部には細胞膜 (plasma membrane: PM) が貫入している。PD の中には desmotubule (DM) と呼ばれる ER 由来の膜構造が貫通している。PD の両細胞側にはカロース (callose) が蓄積している。物質が透過できるか否かは、DM と PM の間隙の空間の広さにより決定していると考えられている。PD の内部にはアクチン (赤球) やその他のタンパク質 (青球) も存在しており、これらのタンパク質も物質の PD の透過に関係していると考えられている。

移行タンパク質の基本的性状

MPは一般に、他のウイルス因子のない条件下で、以下の実験的性状を示す。① PDに局在する ② PDから管状の構造物 (tubule) を形成する ③ PDの限界排除限界分子量を拡大する ④ 細胞間移行能を欠失した変異ウイルスの細胞間移行を相補する ⑤ MP単独で細胞間を移行する (Harries and Ding, 2011; Otulak and Garbaczewska, 2011)。

① PDに局在する TMVを始め、多くの植物ウイルスのMPはPDに局在することが示され、そのことでウイルス細胞間移行を促進する機能を発揮していると考えられている

(Amari et al., 2010; Fig. 4-2)。

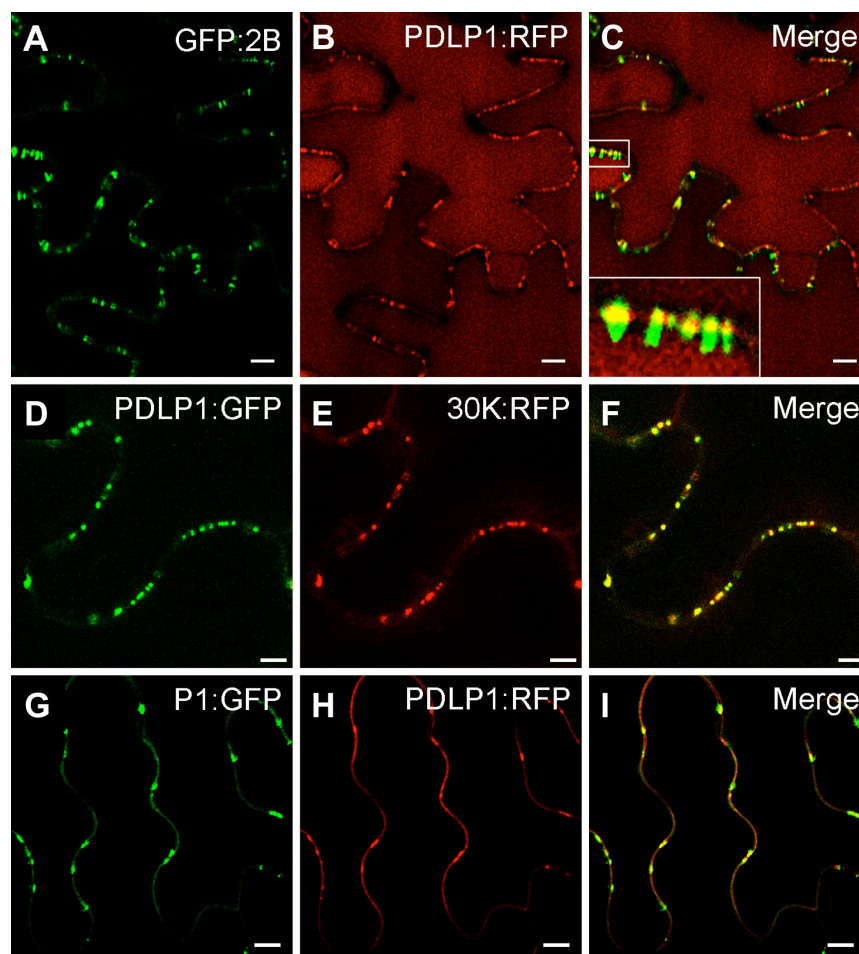
② PDから管状の構造物 (tubule) を形成する 一部のウイルスMPはPDから隣接細胞へ管状の構造物を伸長させることが知られている。TSWVはタバコプロトプラストに感染した際に、MPから成る特異的な管状の構造物を形成することが知られている (Kikkert et al., 1999; Fig. 4-3 A)。また、*Grapevine fanleaf virus* (GFLV) のMPでは単独で植物細胞に発現させた場合にも同様の構造物を形成することが知られている (Lazarowitz and Beachy, 1999; Fig. 4-3 B-E)。これらの構造物がどのようにして形成されるのか、その詳細は明らかとなっていないが、MPがPDを内側から目張りするように集合することで、その内部をウイルスの粒子やゲノムが通過することを可能にしているのではないかと考えられている (Lazarowitz and Beachy, 1999)。

③ 植物細胞の限界排除限界分子量を拡大する ウイルスMPがPDの有する限界排除分子量を拡大することを示す。*Tobacco mosaic virus* (TMV)のMPを発現させた植物細胞では、通常より大きい分子量の物質までPDを透過するようになることが知られている (Wolf et al., 1989)。この事実はTMVのMPを形質転換したタバコの葉に、指標となる分子量を有する物質を蛍光標識し物理的に細胞に注入することで確認されたが、近年は *green fluorescence protein* (GFP) の開発により、ウイルスMPとGFPを植物細胞に共発現させることで検証されるようになってきている (Crawford and Zambryski, 2000)。

④ 細胞間移行能を欠失した変異ウイルスの細胞間移行能を相補する ウイルスMPの細胞間移行を促進する機能は異なるウイルスに対しても発揮され、別種ウイルスの細胞間移行能欠失変異体の細胞間移行能をある程度相補することができる。ウイルスはMPなどにアミノ酸配列変異や欠失変異を導入すると細胞間移行能を失い、感染細胞から移行できなくなることが知られているが (Deom et al., 1987)、この細胞間移行能欠失変異ウイルスが感染した細胞に他の種のウイルスMPを発現させると細胞間移行能が一部回復することが知られている。この現象はMPが排除限界分子量を拡大する働きと密接な関係があると考えられる。Fig. 4-4では、*Tenuivirus*属の *Rice grassy stunt virus* (RGSV) のMPが *Tobamovirus*属の *Tomato mosaic virus* (ToMV) の細胞間移行能欠失変異体の移行を相補している様子を、GFP蛍光で可視化している (Hiraguri et al., 2011)。

⑤ MP単独で細胞間を移行する 植物細胞で発現させたウイルスMPは単独でMP自体が隣接細胞へと移行する性質を見せる。Fig. 4-5では、*Tenuivirus*属の*Rice stripe virus* (RSV)のMP:GFP融合タンパク質が*N. benthamiana*の細胞において、単独で隣接細胞へと移行している様子を示している (Xiong et al., 2008)。

*Emaravirus*属に属するウイルスにおいてMPは本研究開始時点 (2010年4月)で同定されておらず、本研究ではFMVのMPを同定することを目的とした。この当時は、FMVにRNA5、RNA6が存在することが示されておらず、RNA1からRNA3にコードされるタンパク質はそれぞれRdRp、glycoprotein、NPであると推定されていたことから、RNA4にコードされるタンパク質p4がMPではないかと考えた。そこでp4の細胞内局在やMPとしての性質の有無を検証し、結果としてp4がFMVのMPであることを証明した。



(Amari et al., 2010)

Fig. 4-2 ウイルス MP は PD に局在する

3 種のウイルスの MP を蛍光タンパク質と融合し、*N. benthamiana* 細胞内における局在を観察している (Amari et al., 2010)。

(A)–(C) GFLV の MP (2B) の N 末端に GFP を融合したもの (GFP:2B) と PD 局在タンパク質である plasmodesmata located protein1 (PDLP1) の C 末端側に red fluorescence protein (RFP) を融合したもの (PDLP1:RFP) を同一細胞内に共発現させた。(A) GFP:2B。(B) PDLP1:RFP。(C) A、B の重ね合わせ画像。

(D)–(F) TMV の MP (30K) の C 末端に RFP を融合したもの (30K:RFP) と PDLP1 の C 末端に GFP を融合したもの (PDLP1:GFP) を同一細胞内に共発現させた。(D) PDLP1:GFP。(E) 30K:RFP。(F) D、E の重ね合わせ画像。

(G)–(I) Cauliflower mosaic virus の MP (P1) の C 末端に GFP を融合したもの (P1:GFP) と PDLP1:RFP を共発現させた。(G) P1:GFP。(H) PDLP1:RFP。(I) G、H の重ね合わせ画像。

Bars: (A)–(C), 10 μ m; (D)–(I), 5 μ m。

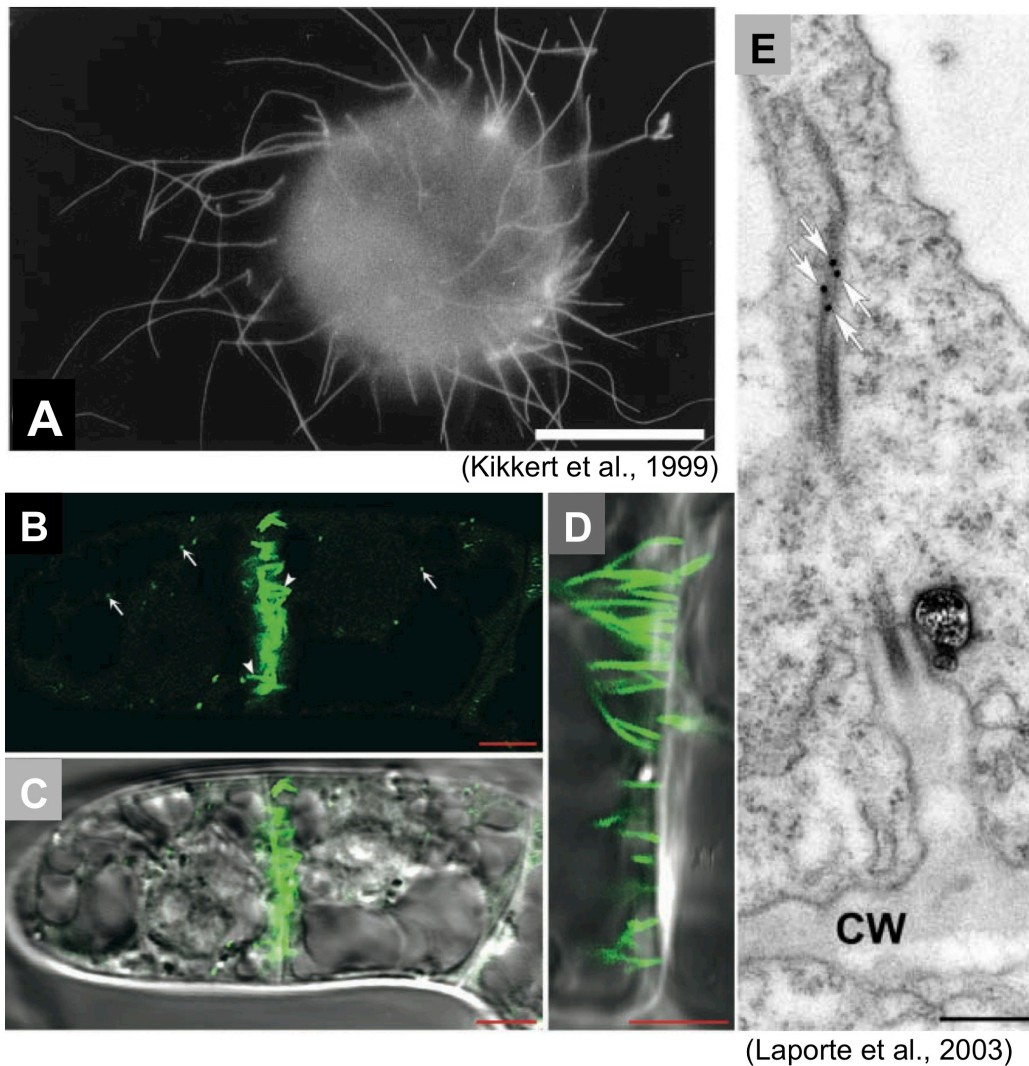
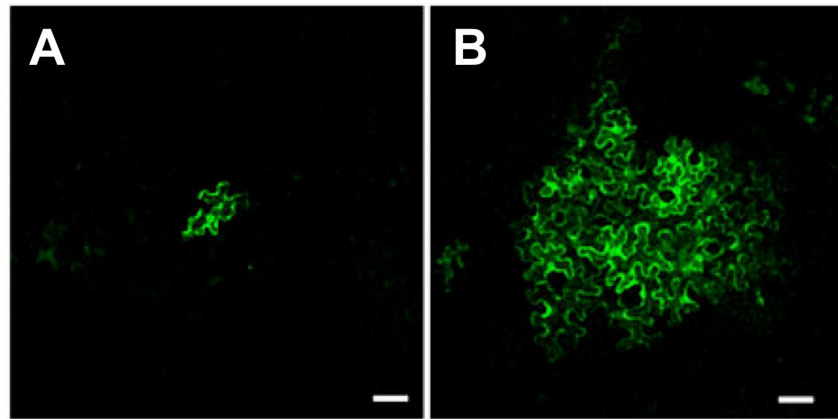


Fig. 4-3 ウイルス MP 管状の構造物 (tubule) を形成する。

- (A) TSWV が感染したタバコのプロトプラストを抗 MP 抗体で蛍光標識したもの。プロトプラスト表面から多くの tubule が形成されている。
- (B)-(E) BY-2 培養細胞で GFLV の MP:GFP 融合タンパク質を観察したもの。(B-D) 共焦点蛍光顕微鏡による局在観察。(B) 矢尻は管状の構造物、矢印は細胞質に局在する小球状の構造物を示す。(C) B に可視光像を重ねたもの。(D) C の拡大図。(E) 包埋切片の免疫電子顕微鏡観察。金コロイド標識された抗 GFP 抗体を作用させている。矢印が金コロイドを示す。Tubule に MP:GFP が局在しているのが分かる。

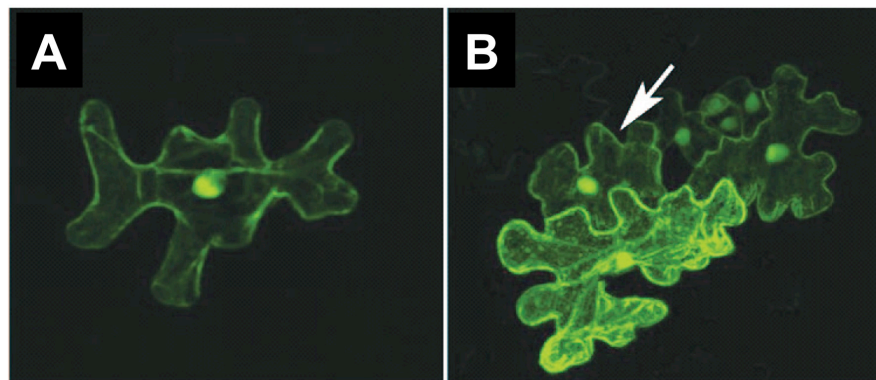
CW: 細胞壁。Bars: (A)-(C), 5 μ m; (D), 10 μ m; (E), 500 nm。



(Hiraguri et al., 2011)

Fig. 4-4 ウイルス MP は別種ウイルスの細胞間移行能を相補する

- (A) 細胞間移行能を欠失した ToMV を *N. benthamiana* の細胞に発現させた場合。ToMV が感染した細胞は GFP 蛍光を発する。ToMV は感染細胞のみに留まる。
- (B) 細胞間移行能を欠失した ToMV と RGSV の MP を共発現させた場合。ウイルスが細胞間移行して蛍光が拡大している様子が分かる。



(Xiong et al., 2008)

Fig. 4-5 ウイルス MP は単独で隣接細胞に移行する

- (A) GFP を *N. benthamiana* の細胞に発現させた場合。
- (B) RSV の MP と GFP を融合させて発現させた場合。隣接細胞に GFP 蛍光が移行しているのが分かる (白矢印)。

4.2. 材料および方法

4.2.1. p4 タンパク質配列を用いたドメインの予測

FMV JS1 島根分離株の p4 アミノ酸配列 (BAM13816) に関して、以下のソフトウェアを用いてドメイン予測を行った。分泌シグナルペプチドの検索を SignalP 4.0 を用いて行った (Petersen et al., 2011)。機能ドメイン検索を Pfam (Finn et al., 2009) と NCBI conserved domain search (Zhu et al., 1996; Sung et al., 2001; Marchler-Bauer and Bryant, 2004; Marchler-Bauer et al., 2009) を用いて行った。

4.2.2. 発現ベクターへのクローニング

アグロインフィルトレーション法によって *Nicotiana benthamiana* 展開葉でタンパク質を一過的に発現させるため、目的遺伝子をバイナリーベクターにクローニングした。クローニングには Gateway technology (Thermo Fisher Scientific) を利用した。Gateway technology は部位特異的組換え反応を利用したクローニング手法であり、組換え配列 *attL* 配列を有する Entry ベクター に標的配列をクローニングしておき、*attR* 配列を有する Destination ベクターとの間の組換え反応 (LR 反応) によって標的配列をもつ発現ベクターを作製する。本研究では、pUC 系ベクターに pENTR 1A ベクター (Thermo Fisher Scientific) 由来の *attL* 配列カセットを挿入した pENTA ベクターを Entry ベクターとして使用した。まず、Entry ベクターである pENTA に制限酵素サイト BamHI、XhoI を用いて目的の遺伝子をクローニングした。その後、各配列がクローニングされた pENTA と Destination ベクターである pEarleyGate ベクター (Earley et al., 2006) の間で LR 反応 (Thermo Fisher Scientific) を行って目的遺伝子を pEarleyGate ベクター配列中に乗せ替えてバイナリーベクターを作製した。pEarleyGate ベクターには様々な種類があり、種類によって付加するタンパク質を選択することができる。

第 3 章にてクローニングおよび配列決定した JS1 分離株 RNA4 の cDNA 配列 (AB697857) を鋳型として PCR を行い、p4 配列の増幅を行った。 *β -glucuronidase (GUS)*

配列を分子量 40 kDa になるように切り詰めた trGUS をクローニングした。trGUS の配列は第 4 章で用いた GUS がクローニングされたバイナリーベクター pCAMBIA1301.1 を鋳型として用い PCR で増幅した。forward プライマーとして 5'-CTG GGA TCC GGA TGC TTC GCG TCG GCA TCC GG -3'、reverse プライマーとして 5'-TCG CTC GAG GAG CTA GCT TGT TTG CCT CC -3'を用い PCR を行った。YFP、GUS、synthetic GFP (sGFP)、triple gene block protein 1 (TGBp1)、GFP タグした細胞間移行能欠失 PVX (PVX Δ TGBp1-GFP) の発現ベクターは当研究室保有のものを使用した (Senshu et al., 2009; Senshu et al., 2011)。YFP、GUS、sGFP、TGBp1 は pEarleyGate 100、PVX Δ TGBp1-GFP は pCAMBIA1301 にクローニングされている。

4. 2. 3. アグロインフィルトレーション

研究では、外来遺伝子の一過的発現、および感染性 cDNA クローンによるウイルス接種の際に、アグロインフィルトレーション法 (Johansen and Carrington, 2001) を用いた。アグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) の Ti プラスミド (tumor-inducing plasmid) 由来のバイナリーベクターの T-DNA 領域 (transferred DNA region) に外来遺伝子をクローニングし、そのバイナリーベクターによりアグロバクテリウムを形質転換する。アグロバクテリウム培養液を植物組織の細胞間隙に注入 (infiltration) すると、アグロバクテリウムにより植物細胞中に分泌された外来遺伝子が核へと移行し、遺伝子を一過的に発現させることができる。バイナリーベクターに遺伝子の代わりに感染性ウイルス cDNA クローンをクローニングしアグロインフィルトレーションすると、ウイルス接種法としても用いることができる。

バイナリーベクター形質転換用のアグロバクテリウムコンピテントセルは以下の手順に従って作成した。アグロバクテリウム (EHA105 菌株) のグリセロールストックを 2 \times YT 液体培地で 28 $^{\circ}$ C、OD₆₀₀ = 0.5 になるまで培養し、培養液を氷中で 10 min 静置した後、3,000 \times g で 5 min 遠心し、集菌した。沈澱に 5 ml の 20 mM CaCl₂ を加え激しく攪拌した後、再び 3,000 \times g で 5 min 遠心した。沈澱を 500 μ l の 20 mM CaCl₂

に溶解し、 -80°C で保存しコンピテントセルストックとした。

アグロバクテリウムへの形質転換は、freeze-thaw 法により行った (An, 1995)。アグロバクテリウムコンピテントセルに形質転換するバイナリーベクターを少量加え、液体窒素により 1 min 急冷し、SOC 培地を加え 28°C で 3 h 振盪培養した。その後、カナマイシンを加えた LB 固形培地に塗布し、 28°C で 48 h 静置培養した。

アグロインフィルトレーションを行うために、LB 固形培地から形質転換したアグロバクテリウムのシングルコロニーを選抜し、3 ml の $2\times\text{YT} / \text{Kanamycin}$ 液体培地で 16 h 振盪培養した。3,000 $\times g$ 、5 min 遠心してアグロバクテリウムを集菌し、インフィルトレーションバッファー (10 mM MgCl_2 , 10 mM MES [pH5.7], 150 μM acetosyringone) に懸濁した。懸濁液を遮光して室温において 3 h 静置した後、針のついていない 1 ml のシリンジにより第 7 葉が展開した時期 (播種後約 4 週間後) の *N. benthamiana* 展開葉の背軸側から注入した。

4. 2. 4. confocal laser-scanning microscopy (CLSM)

全てのCLSM観察はLeica TCS SP5を用いて行った。蛍光タンパク質の観察条件は以下のものである。YFPは458/514 dichroic mirrorを用いて、励起光 514-nm argon laser line、取得光 525–600 nmで取得した。GFPは、RSP 500 dichroic mirrorを用いて543-nm helium/neon laser lineで励起し585–650 nmを取得した。レンズはHCX PL Apo 63x/1.4-0.6 oil CSを用い、取得にはLAS AF version 2.7.3を使用した。画像は必要に応じてImageJ version 1.47t (NIH)とPhotoshop CS4 (Adobe)で処理を施した。

原形質分離は一過的発現葉を 4%(w/v) NaCl で 15 min 湿潤し行った (Oomen et al., 2011)。すべての画像の処理には Adobe Photoshop CS4 software (Adobe Systems) を用いた。

一過的発現葉のプロトプラスト化処理は以下の手順で行った。Tu バッファー (5 mM MES, 70 mM KCl, 100mM CaCl_2 , 0.4 M D-mannitol [pH 5.7]) に 1.5%(w/v) CELLULASE R10 (ヤクルト)、0.2%(w/v) MACEROZYME R10 (ヤクルト) となるように細胞壁分解酵素を溶解し酵素液を作成した。形質転換葉を酵素液に湿潤し、室温で

4 h 処理した後に、酵素液を除去し Tu バッファーに置換した。

4.2.5. ウェスタンブロット

ウェスタン解析は主に前述 2.2.13 の方法に従った。ただし、ポリアクリルアミドゲルにはプレキャストアルカリゲル (Gellex international)を用いた。ブロッティングにはタンク式装置を用い Blotting Buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20%[v/v] methanol)中で、100 V、60 min で PVDF メンブレンにトランスファーした。抗体の溶媒として Can Get signal immunoreaction enhancer solutions (Toyobo)を使用し、YFP 融合タンパク質の検出には 400 $\mu\text{g/ml}$ の anti-GFP 抗体 (Roche Diagnostics)を 3,000 倍希釈で用いた。

4.2.6. 細胞間移行に関わる機能の検定

viral movement complementation assay には PVX Δ TGBp1-GFP を発現するベクターを有するアグロバクテリウムを終濃度 $\text{OD}_{600} = 1.0 \times 10^{-4}$ に、GUS、TGBp1、FMV-p4 を発現するベクターを有するアグロバクテリウムを終濃度 $\text{OD}_{600} = 1.0$ になるように混和しインフィルトレーションを行った。PVX Δ TGBp1-GFP の細胞間移行を定量するために、20 感染スポットの蛍光面積を測定し平均と標準偏差を算出した。

限界排除分子量検定には sGFP を発現するベクターを有するアグロバクテリウムを終濃度 $\text{OD}_{600} = 1.0 \times 10^{-4}$ に、GUS、FMV-p4 を発現するベクターを有するアグロバクテリウムを終濃度 $\text{OD}_{600} = 1.0$ になるように混和しインフィルトレーションを行った。2 枚の葉からランダムに 20 個の蛍光スポットを選び、それらの蛍光面積を測定し平均と標準偏差を算出した。

FMV-p4 の単独での細胞間移行能検定には trGUS:YFP、FMV-p4:YFP を発現するベクターを有するアグロバクテリウムを終濃度 $\text{OD}_{600} = 1.0 \times 10^{-4}$ に調整してインフィルトレーションを行った。2 枚の葉からランダムに 20 個の蛍光スポットを選び、それらの蛍光面積を測定し平均と標準偏差を算出した。

以上の実験はすべて第 7 葉が展開した *N. benthamiana* を用いて行った。CLSM は

4.2.4 と同様の方法で行ったが、レンズとして HC PL Apo 10x/0.4 CS を用いた。蛍光面積の比較解析を行う実験では、倍率、レーザーの強さなどはすべて同じ条件で取得した。一断面のみを画像として取得して解析した場合、3次元方向に蛍光が拡散している場合を考慮できない。蛍光面積を適切に画像として取得するために、z軸切片の連続画像を重ね合わせ、3D 画像として取得、解析した。蛍光面積の測定には ImageJ version1.40 を用いた。

4. 3. 結果

ドメイン検索

JS1 分離株の p4 タンパク質アミノ酸配列を用いて複数のドメイン検索を行った。まず、SignalP4.0 を用いてシグナルペプチドを予測した結果、N 末端にシグナルペプチドが存在し、Gly₁₉/Met₂₀ で切断されることが予測された (Fig. 4-6)。予測通りにシグナルペプチドの切断が起きたとすると、成熟した FMV-p4 の分子量は 38.5 kDa となる。RLBV の p4 でも同様に N 末端配列に分泌シグナルの存在が予測されており、本結果と一致する (McGavin et al., 2012)。次に、Pfam と NCBI conserved domain search を用いてドメイン検索を行った。その結果、Pfam で Ser₇₀ から Arg₁₁₅ に glycoamylase ドメインが低い期待値で予測され、Asp₂₄₂ から Lys₃₃₉ に DnaK (bacterial heat shock protein 70) ドメインが予測された (Fig. 4-6)。FMV-p4 で予測された DnaK ドメインは heat shock protein70 (Hsp70) における基質結合領域に相当する (Zhu et al., 1996)。DnaK は原核生物における Hsp70 ホモログであり、Hsp70 は真核生物に普遍的に存在する分子シャペロンの 1 つとして知られている。RRV-p4 においても同様に、C 末領域に DnaK ドメインが予測されている (Laney et al., 2011)。プラス鎖 RNA ウイルスでは *Closterovirus* 属の *Beet yellow virus* のゲノムに Hsp70 ホモログがコードされ、この Hsp70 ホモログにはウイルス細胞間移行を促進する働きがあることが知られている (Agranovsky et al., 1998)。このことから、FMV-p4 にも同様にウイルス細胞間移行に関する機能があるのではないかと推察された。

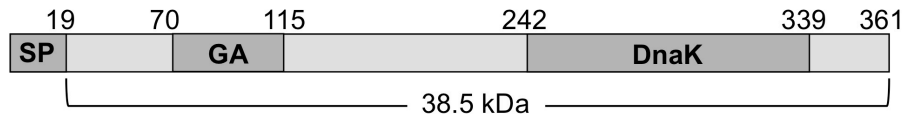


Fig. 4-6 FMV p4 の模式図

SignalP 4.0 により N 末端～19 aa にシグナルペプチド (SP) が予測された。Pfam と NCBI conserved domain search によりそれぞれ 70-115 aa に glycoamylase ドメイン (GA) と 242-339 aa に DnaK ドメイン (DnaK) が予測された。分泌シグナルを除く予想タンパク質分子量は約 38.5 kDa である。

蛍光局在解析

FMV p4 の機能に対する示唆を得るために、p4 の C 末端に YFP を融合させたタンパク質 (p4:YFP) の細胞内局在を解析した。アグロインフィルトレーション法を用い、*N. benthamiana* 葉に一過的に発現させ、2.5 日後 (days postinfiltration: dpi) に表皮細胞を共焦点レーザー顕微鏡にて観察すると、点状の蛍光スポットが細胞壁上に観察された (Fig. 4-7, A and B)。この局在性はウイルス MP が PD に局在しているものと酷似していた (Fig. 4-2 参照)。次に p4:YFP が PD に局在しているか確かめるために、原形質分離を誘導した細胞の観察を行った。PD に局在しているタンパク質は原形質分離の際、細胞膜と同時に剥離せず PD に係留し続けることが知られている (Oparka et al., 1994)。p4:YFP においても点状の蛍光スポットは細胞膜の剥離と同調せず、細胞壁上に観察され続けた (Fig. 4-7, C and D)。このことから、p4:YFP はその他のウイルス MP と同様に PD に局在していることが示された。3.5 dpi に葉肉細胞を観察すると、細胞膜上に蛍光が観察された。また、一部の PD からは管状の構造物 (tubule-like structure) が伸長している様子が観察された (Fig. 4-8, A and B)。この tubule-like structure は一部の植物ウイルスが構成するものと良く似ていた (Fig. 4-3 参照)。この観察から、3.5 dpi では p4:YFP は細胞膜上に蓄積していることが示唆されたが、p4 の N 末端領域にシグナルペプチドが予測されたことを考慮すると、細胞間隙に p4:YFP が放出されている可能性も考えられた。両者の局在は通常の観察では区別が困難であるため、接種葉をプロトプラスト化し、細胞壁を除去した形で蛍光局在を観察した。その結果、p4:YFP は細胞膜に蛍光が観察され局在していることが分かった (Fig. 4-8 C)。植

物細胞は液胞が大きく発達しているため細胞膜と細胞質局在の区別が難しいことが考えられたため、コントロールとして YFP を発現させた葉をプロトプラスト化して同様に局在を観察したが、明らかに細胞膜局在とは異なる蛍光パターンであることが確かめられた (Fig. 4-8 D)。さらに、p4:YFP 発現細胞を可溶性画分と膜画分に分け、抗 GFP 抗体 (YFP も検出可能) を用いてウエスタンブロット解析を行うと、p4:YFP の大きさに相当するシグナル (約 65 kDa) が膜画分のみから検出された (Fig. 4-8 E)。以上の結果から、p4:YFP は PD と細胞膜に局在していることが明らかとなった。

以上の一連の実験より、p4:YFP は発現初期 (2.5 dpi) には PD に局在し、時間の経過とともに PD から tubule-like structure を形成しながら細胞膜上に蓄積していくことが明らかとなった。時間の経過とともに合計の発現量が増加し、PD の局在容量を超えた p4:YFP が細胞膜にも蓄積していくことで、このような局在の変化が見られるのではないかと考えられる。細胞膜に局在するという知見は RLBV-p4 での報告と一致しているが (McGavin et al., 2012)、そのことに関するタンパク質機能への示唆については不明である。

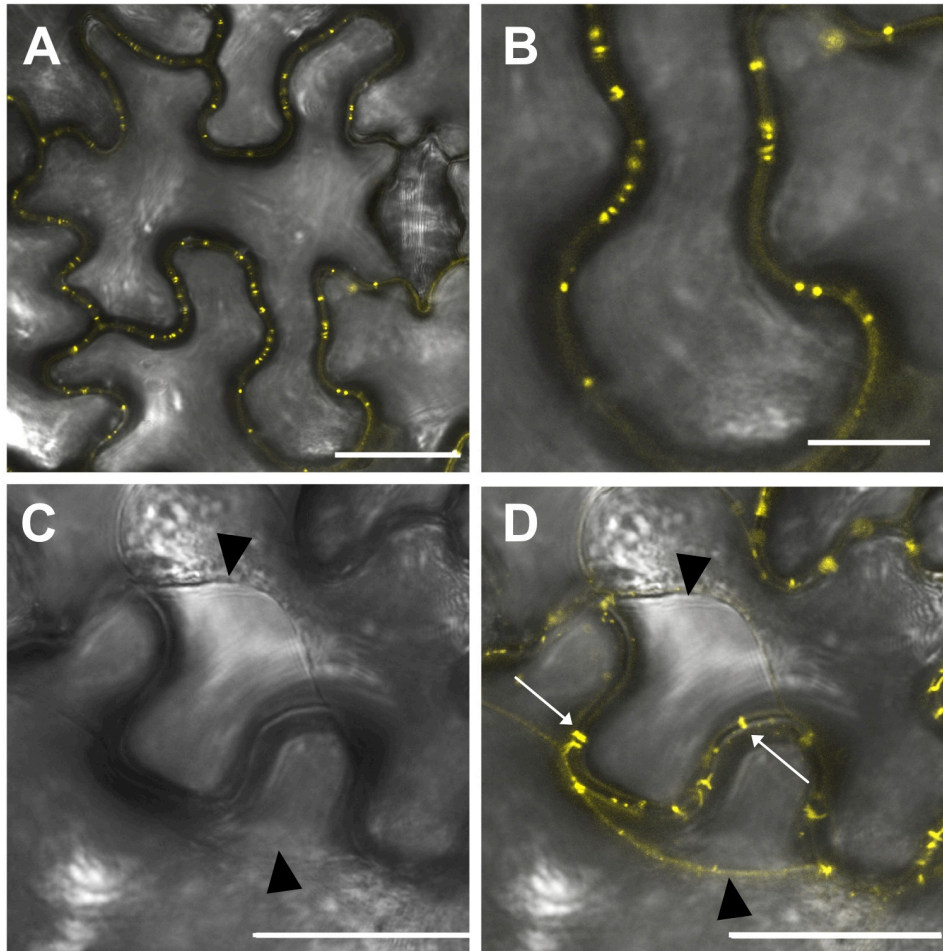


Fig. 4-7 p4:YFP は PD に局在する

アグロインフィルトレーション法により *N. benthamiana* の葉に p4:YFP を発現させ、2.5 dpi に観察した。

- (A) 細胞壁上に点状の蛍光局在が観察される。透過光による撮影画像を重ね合わせている。
- (B) (A)の拡大。
- (C), (D) 原形質分離した細胞。
- (C) 透過光像。黒の矢尻で示されるものが細胞壁から剥離した原形質膜。
- (D) 蛍光局在と C の重ね合わせ。白の矢印で示されるものが、PD に係留していると考えられる蛍光スポット。

Bars: (A), (C), (D), 25 μ m; (B), 10 μ m。

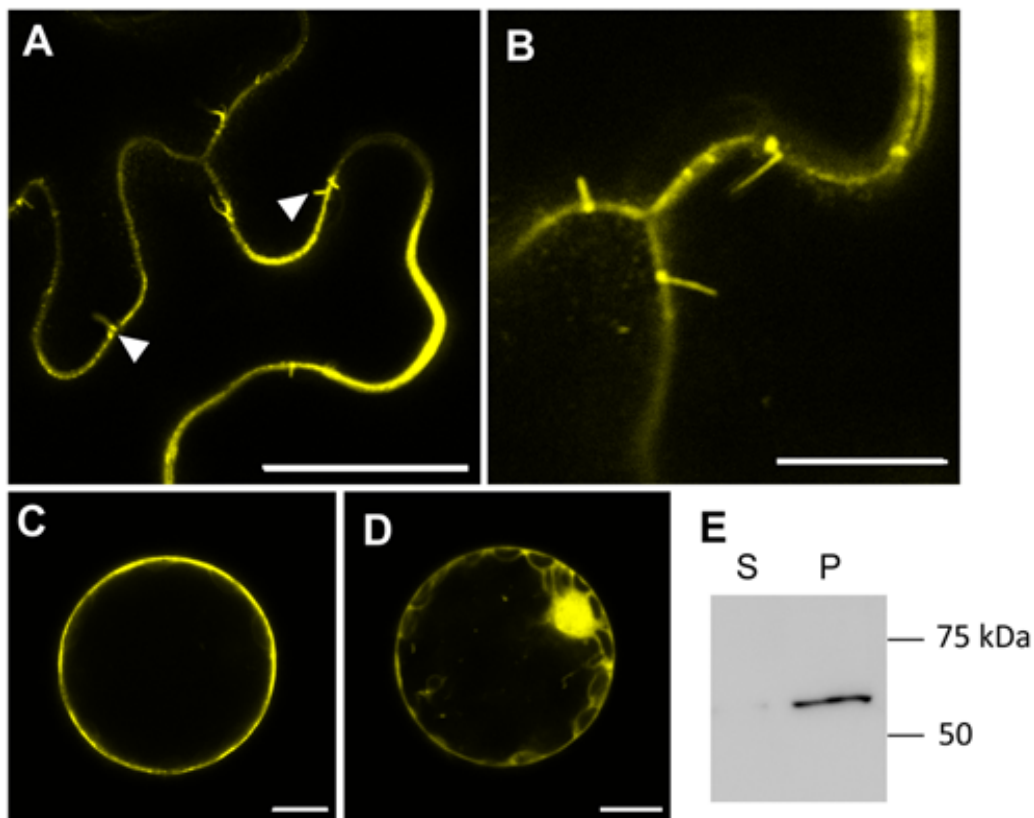


Fig. 4-8 p4:YFP は細胞膜に局在し tubule-like structure を形成する
 アグロインフィルトレーション法により *N. benthamiana* の葉に p4:YFP を発現させ、3.5 dpi に観
 察した。

- (A) p4:YFP が細胞膜上に観察され、その一部が細長い tubule-like structure を形成している
 (白矢尻)。
- (B) tubule-like structure は PD から伸長している。
- (C) p4:YFP 発現細胞をプロトプラスト化した。細胞膜上に蛍光が観察される。
- (D) コントロールとして、YFP 発現細胞をプロトプラスト化した。細胞質に蛍光が観察される。
- (E) p4:YFP 一過的発現細胞のウエスタンブロット解析。S: 可溶性画分。P: 膜画分。p4:YFP
 の予想分子量 (約 65 kDa) 付近にシグナルが観察される。

Bars: (A), 25 μ m; (B)–(D), 10 μ m。

Viral movement complementation assay

次に、ウイルス移行相補実験 (viral movement complementation assay) を行った。相補するウイルスにはプラス鎖 RNA ウイルスの *Potexvirus* 属に属する *Potato virus X* (PVX) を用いた。PVX は移行タンパク質として TGBp1 を有するが、同タンパク質に欠失変異を入れることで、細胞間移行能を失うことが知られている (Bayne et al., 2005)。本研究ではこの変異体にさらに coat protein に GFP を融合させて、ウイルス感染細胞を蛍光で可視化が可能なもの (PVX Δ TGBp1-GFP) を用いた (Senshu et al., 2011)。

PVX Δ TGBp1-GFP の細胞間移行がそれぞれ GUS (ネガティブコントロール)、TGBp1 (ポジティブコントロール)、FMV-p4 の発現により相補されるか実験を行った。GUS、TGBp1、FMV-p4 と PVX Δ TGBp1-GFP を発現するアグロバクテリウムを *N. benthamiana* 葉に接種し、4 dpi に観察を行い PVX Δ TGBp1-GFP が細胞間を移行しているか確認した。その結果、ネガティブコントロールの GUS では PVX Δ TGBp1-GFP は細胞間移行しなかったのに対し、FMV-p4 と TGBp1 とでは GFP 蛍光が隣接細胞に広がる様子が観察された (Fig. 4-9 A)。蛍光面積を定量すると、GUS と比較して FMV-p4 を発現させた場合の GFP 蛍光の平均面積は有意に大きく (Fig. 4-9 B)、FMV-p4 には PVX Δ TGBp1-GFP の細胞間移行を相補する働きがあることが示唆された。

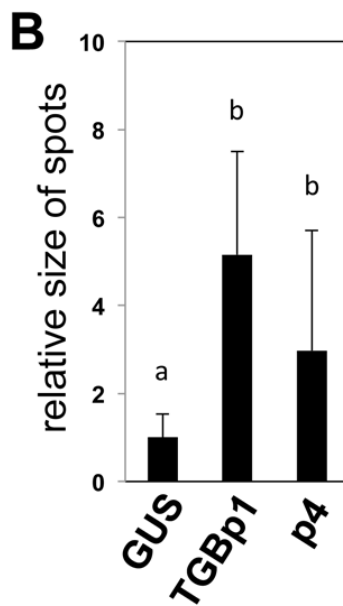
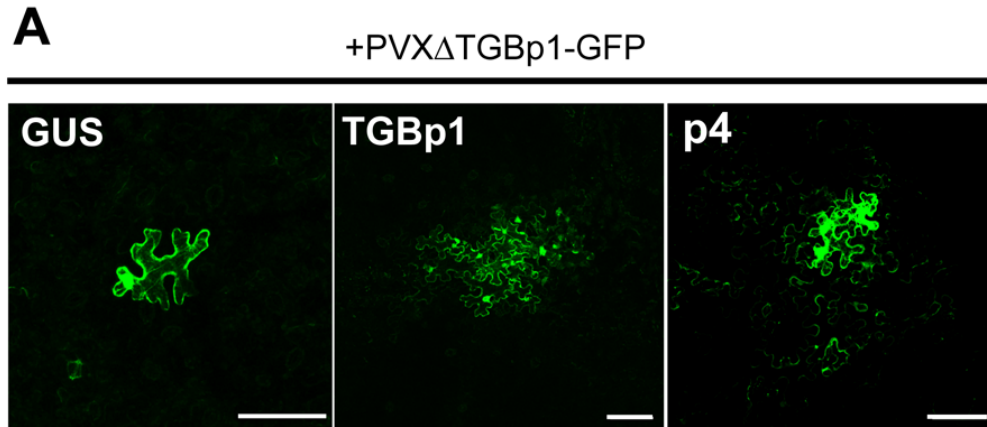


Fig. 4-9 FMV-p4 はウイルス細胞間移行を相補する

PVX Δ TGBp1-GFP を用いた viral movement complementation assay。

- (A) GUS、TGBp1、FMV-p4 でそれぞれ相補を行い、接種から 4 dpi に観察を行った。GUS では 1 細胞のみが光っているのに対し、TGBp1、FMV-p4 では隣接細胞への蛍光の拡大が観察される。Bars = 100 μ m。
- (B) 蛍光面積の定量。GUS の値を 1 として縦軸を相対値で示している。n = 20。エラーバーは標準偏差を示している。エラーバーの上のアルファベットが異なる群間には有意に差がある (Tukey's test; $P < 0.01$)。

限界排除分子量検定

FMV-p4 の PD 限界排除分子量の拡大能を調べるために sGFP 蛍光の拡散を指標とし実験を行った (Crawford and Zambryski, 2000)。sGFP は単独で植物細胞に発現させた場合ほとんど細胞間を移動することはできないが、ウイルス MP などの限界排除分子量を拡大するようなタンパク質とともに発現させると細胞間を拡散していくことが知られている。GUS、FMV-p4 と sGFP を *N. benthamiana* 葉に共発現させ、4 dpi で sGFP が拡散しているか観察を行った。その結果、GUS を発現させた葉ではほとんどの感染スポットで GFP 蛍光が 1 細胞に留まっていたのに対し、FMV-p4 を発現した葉では sGFP 蛍光の拡散が認められた (Fig. 4-10 A)。これらの実験区間では定量的にも有意に差が認められ (Fig. 4-10 B)、FMV-p4 は sGFP の拡散を助長しており PD の限界排除分子量を拡大する働きがあることが示された。

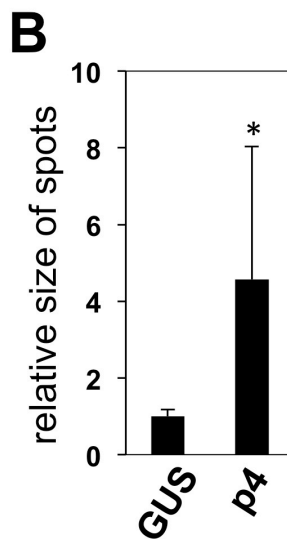
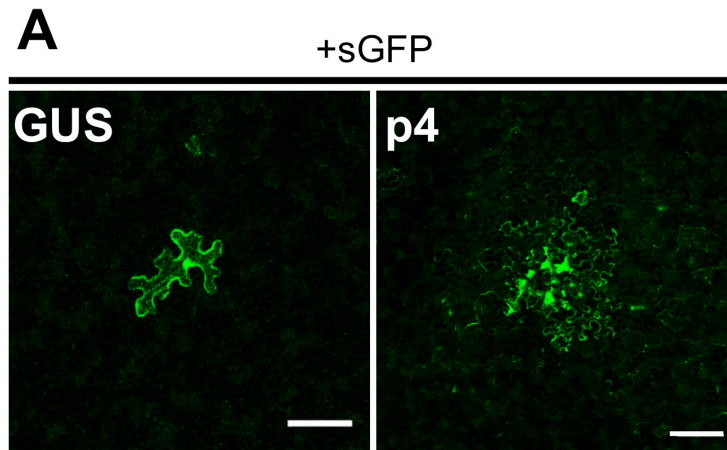


Fig. 4-10 FMV-p4 は限界排除分子量を拡大する

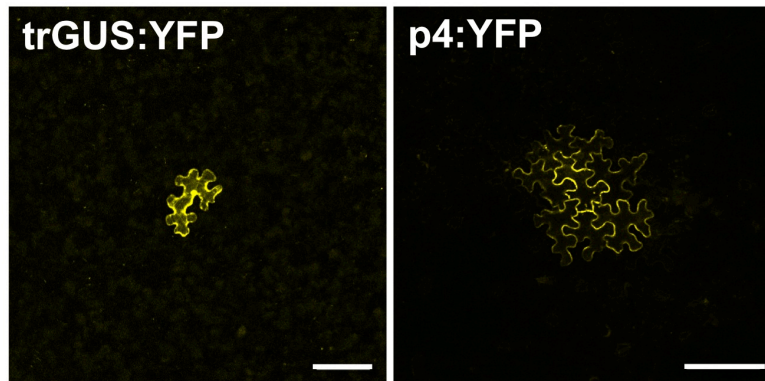
(A) sGFP と GUS、FMV-p4 を共発現させ、4 dpi に観察を行った。Bars = 100 μ m。

(B) 蛍光面積の定量。GUS の値を 1 として縦軸を相対値で示している。n = 20。エラーバーは標準偏差を示している。エラーバーの上のアスタリスクは GUS と比較して有意に差があることを示している (Student's t-test; $P < 0.01$)。

p4 タンパク質の細胞間移行能の検定

FMV-p4 が単独で細胞間を移行するか検証を行った。コントロールとして GUS を FMV-p4 とほぼ同じ分子量 (38.5 kDa) へ切り詰めた trGUS の C 末端に YFP を融合したもの (trGUS:YFP) を用いた。4 dpi に観察を行った結果、trGUS:YFP を発現させた葉ではほとんどのスポットで蛍光が 1 細胞に留まっていたのに対し、p4:YFP はほとんどのスポットで蛍光が隣接細胞へと移行していた (Fig. 4-11 A)。定量的にも有意に蛍光面積の差が認められ (Fig. 4-11 B)、FMV-p4 はその他のウイルスの因子なしに単独で隣接細胞に移行する働きがあることが示された。

A



B

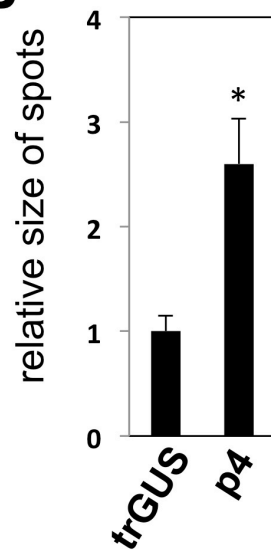


Fig. 4-11 p4:YFP は単独で細胞間を移行する

(A) trGUS:YFP、p4:YFP を単細胞で発現させ、4 dpi に観察を行った。Bars = 100 μ m.

(B) 蛍光面積の定量。trGUS:YFP の値を 1 として縦軸を相対値で示している。n = 20。エラーバーは標準偏差を示している。エラーバーの上のアスタリスクは trGUS:YFP と比較して有意に差があることを示している (Student's t-test; $P < 0.01$)。

5. 4. 考察

FMV の MP の同定

蛍光タンパク質を用いた局在解析により、FMV-p4 は PD と細胞膜に局在し、tubule-like structure を形成することが分かった。また、FMV-p4 は細胞間移行能を欠失したウイルスの細胞間移行を相補すること、sGFP の細胞間の拡散を助長すること、他のウイルスの因子なしに単独で細胞間を移行すること示された。以上のことから、MP に典型的な性質を有しており、p4 タンパク質は FMV の MP であることが示された。*Emaravirus* 属ウイルスにおいて実験的に MP が同定されたのは初めてである。

Emaravirus 属ウイルスにおけるホモログ

Emaravirus 属のその他のウイルス、EMARaV、RRV、RLBV においても RNA4 に p4 タンパク質がコードされている。FMV-p4 と RRV、RLBV の p4 は配列に相同性が見られるため同様の機能を有していると推察され、実際に、本研究の報告直後に RLBV の p4 が MP であることが示された (Yu et al., 2013)。

p4 配列中に予測されたドメインに対する考察

FMV-p4 配列を用いたドメイン検索により、N 末端に 19 aa のシグナルペプチドが予測された。同様の報告が RLBV の p4 でもなされており、*Emaravirus* 属の移行タンパク質に共通した特徴である可能性が高い。植物ウイルスがコードするタンパク質にシグナルペプチドが予測される例は珍しく、その機能に興味を持たれる。シグナルペプチドを有するタンパク質は ER にリクルートされた後、内膜を介した輸送系に入り、各細胞内小器官へと輸送されることから (Kim and Hwang, 2013)、*Emaravirus* 属の p4 タンパク質は分泌経路を利用し、PD や細胞膜へ局在しているものと考えられる。

また、ドメイン予測ソフトにより、C 末領域に DnaK ドメインが予測された。ウイルス MP と Hsp70 (真核生物における DnaK) は深い関係があると考えられ、結果中にも述べた BYV にコードされる Hsp70 ホモログが直接的な例であるが、その他にもマイ

ナス鎖 RNA ウイルスである *Tospovirus* 属の TSWV の MP は DnaJ-like protein と結合することが知られている (Soellick et al., 2000)。DnaJ は真核生物における Hsp40 をホモログとし、Hsp40 は宿主植物内で Hsp70 と協調して働くことが知られている (Qiu et al., 2006)。FMV-p4 アミノ酸配列中に DnaK ドメインが予測されることは、TSWV の MP と同様に FMV-p4 が Hsp40 と相互作用して機能していることを連想させる。今後は Hsp70 や Hsp40 を始めとした宿主の因子との協調的な働きに着目した解析が必要であろう。

その他のマイナス鎖 RNA ウイルスの MP との比較

FMV-p4 は tubule-like structure を形成することが明らかとなったが、この特徴は TSWV の MP でも報告されている (Fig. 4-3 を参照)。FMV と TSWV は分子系統的に関連があると考えられていることから TSWV の MP との機能的な関連に興味を持たれる。本研究では PVX Δ TGBp1-GFP を用いた移行相補実験により FMV-p4 が移行タンパク質であることを明らかとしたが、同じくマイナス鎖 RNA ウイルスである TSWV、RSV、RGSV でも同様の実験が行われており (Lewandowski and Adkins, 2005; Xiong et al., 2008; Hiraguri et al., 2011)、いずれも単独でウイルスの細胞間移行を促進する働きが示唆されている。今後は、より詳細な分子生物学的手法を用いながら、FMV-p4 とその他のマイナス鎖 RNA ウイルスの MP との共通点と相違点を明らかにしていきたいと考えている。

第5章 NPはER流動によって受動的に細胞内を動く

5.1. 序論

本章の研究では、

NPのRNA結合能を示すと同時に、細胞内局在と動態を解析し、NPの形成する凝集体がER流動によって受動的に細胞内を動いていることを示した。

アクチンシステムとER流動

アクチンシステムは細胞の内膜輸送や巨大分子の運搬、細胞内小器官の配置など、様々な細胞機能に関与していることが知られている (Vale, 2003)。アクチン繊維に沿った物質の運搬は、主にミオシンモーターによって行われていると考えられ、*A. thaliana* のミオシンはクラス VIII とクラス XI という、大きく 2 つのファミリーに分けられる。クラス XI は主にゴルジ体やミトコンドリア、核、ペルオキシソームなどの移動に関わっていると考えられ (Avisar et al., 2008; Sparkes et al., 2008; Avisar et al., 2009; Sparkes et al., 2009; Tamura et al., 2013)、13 個あるクラス XI ミオシン遺伝子のうち *XI-1*、*XI-2*、*XI-I*、*XI-K* は主に葉肉細胞で発現し機能することが示されている (Sparkes et al., 2009; Avisar et al., 2012; Tamura et al., 2013)。

植物細胞における ER は細胞皮層と液胞を貫通する原形質糸中を常に流動している動的な細胞内小器官である。ER は細胞質中に張り巡らされているアクチン骨格に沿って形成され、アクチン-ER ネットワークを構成している (Boevink et al., 1998)。ER 流動は *XI-1*、*XI-2*、*XI-K* ミオシンの働きによって発生し、同時に周辺の細胞質ゾルを動かしており原形質流動を発生させる主要因であると推察されている (Ueda et al., 2010; Avisar et al., 2012; Peremyslov et al., 2015)。

アクチン-ER ネットワークに沿って動くウイルスタンパク質凝集体

ウイルスを構成する因子は宿主の輸送系により輸送されていると考えられ、細胞間移行に関わるいくつかのタンパク質はアクチン-ERネットワークを利用して原形質連絡(plasmodesmata: PD)に運ばれることが知られている (Cotton et al., 2009; Harries et al., 2010; Amari et al., 2011; Yuan et al., 2011)。さらに細胞間移行に直接関与しないと考えられるウイルスタンパク質やタンパク質複合体もアクチン-ER に沿って活発に動く凝集体を形成することが知られている (Liu et al., 2005; Wei and Wang, 2008; Harries et al., 2009; Cui et al., 2010; Wei et al., 2010; Feng et al., 2013)。これらのタンパク質凝集体がこのような動きを見せるのは、ER 膜に係留ないしは ER 膜上に小胞を形成することで、ミオシンを積極的にリクルートし細胞間移行を達成するためであると考えられていた (Fig. 5-1; Laliberte and Sanfaçon et al., 2010; Niehl and Heinlein, 2011)。しかし、実際にこのような動きの原因とウイルス感染環における意義は実験的に究明されることなく、不明のままであった。

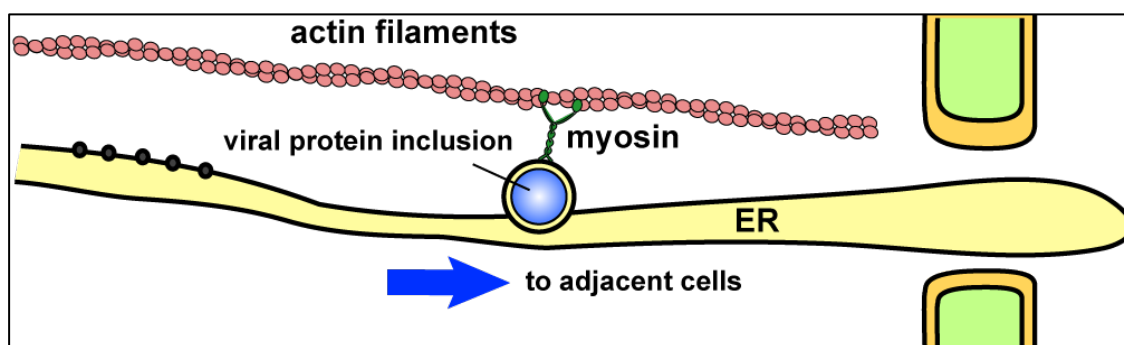


Fig. 5-1

これまでに考えてられてきたウイルスタンパク質凝集体の動きのモデル

NP と粒子形成

マイナス鎖 RNA ウイルスはエンベロープで被覆された粒子を形成するために、宿主の生体膜を収奪する。マイナス鎖 RNA ウイルスにコードされる構造タンパク質であ

る glycoprotein は、膜で包まれた特定のオルガネラにターゲティングし、リボヌクレオプロテイン複合体 (ribonucleoprotein complexes: RNPs) をパッケージングすることで、粒子を形成する (Fig. 5-2)。RNPs はゲノム RNA と結合した NP と少量の RdRp から構成され、複製や翻訳に不可欠な働きをすることが知られている (Cros and Palese, 2003; Kaukinen et al., 2005; Ruigrok et al., 2011)。NP はウイルス感染環において RNP 形成や粒子形成のほか、複製、翻訳、その他のウイルス因子の細胞内輸送など様々な過程に関わっていることが知られている (Cros and Palese, 2003; Kaukinen et al., 2005; Ruigrok et al., 2011)。

FMV においては細胞内の粒子の形態についての知見は乏しいものの、ウイルスとして同定される以前のモザイク症状を呈するイチジク葉を電子顕微鏡観察した研究が存在する。それらの研究では、二重の膜で囲まれた DMB (double-membrane body) と称される直径 80–200 nm の小球状構造が観察され、本構造が FMV の粒子ではないかと考えられていた (Martelli et al., 1993; Appiano et al., 1995)。さらに、FMV の属する *Emaravirus* 属では PPSMV の粒子精製を試みた際に、分子量が 32 kDa のタンパク質が主に回収されており、本タンパク質は主要な構造タンパク質である NP ではないかと推定されていた (Kumar et al., 2003)。この PPSMV の NP は FMV の ORF3 にコードされるタンパク質 p3 と相同であると推定されたことから、FMV の p3 についても NP ではないかと考えられてきた (Elbeaino et al., 2009b)。しかし、FMV において NP の機能が実験的に示された例はこれまでにない。

本研究ではまず、未検証であった NP の RNA 結合能を実験的に示した。次に、蛍光タンパク質 YFP と融合させた NP を一過的に発現させ、CLSM 下で観察すると細胞質中に多数の数 $\mu\text{m/s}$ の早さで動く小球状構造物が見られた。この凝集体がなぜどのようにして動いているのか様々な解析を行った結果、NP 凝集体は ER 膜を収奪するために ER の近傍の細胞質ゾルに局在しており、そのために ER 流動に巻き込まれる形でアクチン-ER 網に沿って動いている可能性が示唆された。

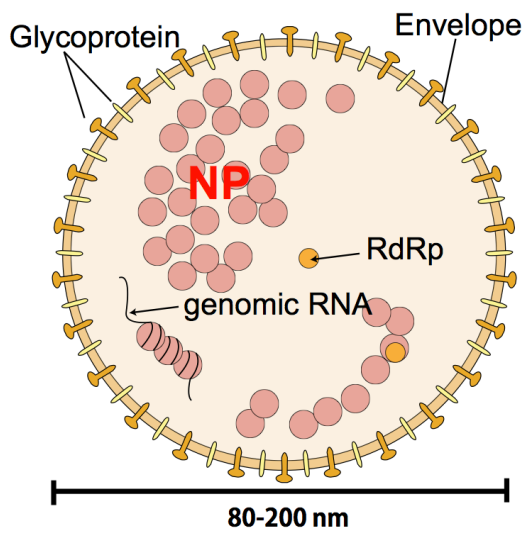


Fig. 5-2
マイナス鎖ウイルス粒子の模式図と NP

5. 2. 材料及び方法

5. 2. 1. 発現ベクターの作製

バイナリーベクターへのクローニングは第 4 章と同様の方法で Gateway technology を用いて行った (4.2.2 参照)。FMV NP 遺伝子については第 3 章で作出した RNA3 の cDNA 配列(AB697843)がクローニングされたプラスミドより PCR で増幅し、pEarleyGate 101 (C 末 YFP 融合)、pEarleyGate 102 (C 末 CFP 融合)、pEarleyGate C3myc (C 末 3×myc 融合)にクローニングした。pEarleyGate C3myc は所属研究室で作出したベクターであり、pEarleyGate 101 の YFP 配列部を 3×myc 配列に置き換えたものである。*Nicotiana tabacum* cv. *Samusun* および *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia-0 葉より全 RNA を RNeasy kit を用い 2.2.3 と同様の方法で抽出し、逆転写反応を dT20 プライマーにより 3.2.2 と同様に行った。COPII 輸送の阻害実験のために、*N. tabacum* の cDNA より *Sar1* 遺伝子 (D87821)を PCR にて増幅し、TOPO TA Cloning kit にサブクローニングした。inverse PCR と seamless cloning and assembly kit (Thermo Fisher Scientific)を使用し、*Sar1* の 74 番目のヒスチジンをロイシンに変異させるように配列に変異を導入した *Sar1H74L* 遺伝子を (Takeuchi et al., 1998)、pEarleyGate 100 (融合タンパク質無)にクローニングした。アクチンマーカーとして *A. thaliana* の cDNA より *Fimbrin 1* 遺伝子(AT4G26700)の actin binding domain 2 領域 (FABD)を PCR にて増幅し (Voigt et al., 2004)、pEarleyGate 104 (N 末 YFP 融合)にクローニングした。ミオシンの優性阻害体として *A. thaliana* の cDNA より *XI-1* (AT1G17580)、*XI-2* (AT5G43900)、*XI-J* (AT3G58160)、*XI-K* (AT5G20490)の C 末配列に相当する領域を PCR にて増幅し (Reisen and Hanson, 2007)、pEarleyGate NCFP (N 末 CFP 融合)にクローニングした。pEarleyGate NCFP については所属研究室で作出したベクターであり、pEarleyGate 104 の YFP 配列部を CFP 配列に置き換えたものである。核マーカーとして simian virus 40 (SV40)の核局在シグナル配列 (Kalderon et al., 1984)を N 末端に有する CFP 配列を PCR にて増幅し、pEarleyGate 100 (融合タンパク質なし)にクローニングした。本研究で使用した蛍光タンパク質が融

合したゴルジ体マーカーと ER マーカーは Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC; <http://www.arabidopsis.org/>) より購入した。ABRC stock numbers は以下のようである: ER-ck, CD3-953; ER-yk, CD3-957; ER-rk, CD3-959; G-ck, CD3-961; G-rk, CD3-967。GUS の発現ベクターは第 4 章で使用したものと同様である。

5. 2. 2. アグロバクテリウムを用いた植物体内での遺伝子発現

アグロインフィルトレーションによる一過的発現は 4.2.3 と同様に行った。複数のタンパク質を一過的に発現させる場合には、OD₆₀₀ = 1.0 に希釈したそれぞれの発現ベクターを有するアグロバクテリウム菌液を等量混和し接種した。

5. 2. 3. 大腸菌発現タンパク質の精製と electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

NP の N 末端に maltose binding protein (MBP) を融合させるために NP 遺伝子を pMal-c5X vector (New England BioLabs) に *NcoI* / *BamHI* サイトを使用してクローニングした。NP がクローニングされた pMal-c5X vector とクローニング前の pMal-c5X vector は上述した方法 (2.2.7–2.2.9) と同様に *E. coli* BL21 に形質転換し培養した。培養した菌液に 0.3 mM の IPTG を添加して、MBP:NP、MBP を 16°C、24 h で発現誘導した。発現した MBP:NP、MBP は Amylose Resin (New England BioLabs) を用い添付のプロトコルに従って精製した。

EMSA のテンプレート RNA の準備のために、第 3 章の RACE 解析で TOPO ベクターへクローニングした FMV RNA5 の 5' 末端配列 280 nt と TMV の 3' 末端配列 249 nt (Watanabe et al., 1999) を MEGAscript T7 kit (Ambion, Life Technologies) を用いて転写した。

2 × EMSA buffer (20 mM HEPES, 2.5 mM MgCl₂, 25 mM KCl, 2 mM dithiothreitol [DTT], 20% [v/v] glycerol, 0.1 mM EDTA) を用いて MBP:NP、MBP の希釈段階を作成した。約 200 pg の ³²P ラベルした FMV RNA5 5' 末端 RNA を添加した。競合実験においては約 1.0 ng の ³²P ラベルした FMV RNA5 5' 末端 RNA と 8 μM MBP:NP を混和した後に、図中標記の濃度の TMV の 3' 末端 RNA を添加した。いずれ

の場合も 4°C で 15 min 静置した後に、2% TAE アガロースゲルで電気泳動を行い RNA の泳動度の差を解析した。

5. 2. 4. 膜画分の回収とシヨ糖濃度勾配遠心

目的のタンパク質を一過的に発現した *N. benthamiana* 葉、もしくは 25°C の植物育成用チャンバーで育成した健全あるいは FMV に感染したイチジク (*F. carica*) 葉をバッファー A (50mM Tris-HCl [pH 7.5], 15mM MgCl₂, 120mM KCl, 20%[v/v] glycerol, 0.1%[v/v] 2-mercaptoethanol) を用いて磨砕した。1,000×g で 20 min 遠心し、その上清を 30,000×g で 30 min 遠心して沈殿を P30 画分として回収した。回収したタンパク質は 2×Laemmli sample buffer (Bio-Rad) と混和し、ウエスタン解析に供した。

シヨ糖濃度勾配遠心は Genovés et al. (2010) の方法に従った。5 mM の MgCl₂ を添加した含む溶解バッファー 200 μl に再懸濁した P30 画分を、同溶解バッファーで作成した 2.5 ml の 20%–60%(w/v) シヨ糖濃度勾配の上に乗せ、スイングローターを用い、4°C、max100,000×g の条件で 16 h 超遠心した。遠心後は 18 の画分に分け 150 μl ずつ上から回収した。回収した各サンプルは等量の 2×Laemmli sample buffer と混和した。

5. 2. 5. 共免疫沈降とウエスタンブロット

目的のタンパク質を一過的に発現させた *N. benthamiana* 葉を RIPA buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1%[v/v] Nonidet P-40, 1%[w/v] sodium deoxycholate, 0.1%[w/v] SDS, Complete Mini protease inhibitors [Roche Diagnostics]) で磨砕し、8,200×g で 2 回遠心し残渣を除去した。myc 配列を付加したタンパク質を EZview Red anti-c-Myc agarose (Sigma-Aldrich) と 4°C で結合させ、RIPA buffer で洗浄後、2×Laemmli sample buffer を添加して 95°C で 5 min 処理することで、担体より目的のタンパク質を解離させた。

ウエスタン解析は 4.2.5 の方法に従った。感染イチジクからの NP の検出には第 2 章で作出した抗 NP 抗体を用い、NP:3myc の検出には 1 mg/ml の anti-myc 抗体 (Millipore) を 3,000 倍希釈で、YFP 及び CFP 融合タンパク質の検出には 400 μg/ml の

anti-GFP 抗体 (Roche Diagnostics)を 3,000 倍希釈で用いた。

5. 2. 6. 阻害剤実験

latrunculin B (LatB; Sigma-Aldrich) もしくは brefeldin A (BFA; Thermo Fisher Scientific)は 0.5%(v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO)に溶解し、図中に示される濃度で使用した。LatBは 26 hours postinfiltration (hpi)の *N. benthamiana* 葉にインフィルトレーションし、さらに 10 h 後に効果を観察した。BFA は 18 hpi の *N. benthamiana* 葉にインフィルトレーションし、さらに 6 h 後に効果を観察した。

5. 2. 7. CLSM

CLSM観察は4.2.4と同様に行った。CFPは励起光 458-nm argon laser line、取得光 460–495 nm、mCherryは励起光543-nm helium/neon laser line、取得光 585–650 nm。CFPの単独観察では458/514 dichroic mirrorを用いて検出した。CFPとYFPの同時観察ではline-switching modeで458/514 dichroic mirrorを使用した。CFP、YFPとmCherryの同時観察では CFPとYFPを同時励起で観察し、mCherryとそれらを 488/543 dichroic mirrorを用いてline-switching modeで観察した。レンズはHCX PL Apo 63x/1.4-0.6 oil CSを用い、取得にはLAS AF version 2.7.3を使用した。画像は必要に応じてImageJ version 1.47t (NIH)とPhotoshop CS4 (Adobe)で処理を施した。

NBの動きの解析はImageJ time-lapse color coder pluginを用いて行った。300以上のNBをmobile NBとimmobile NBの割合の算出に使用し、うち10のmobile NBを無作為に選び平均速度を算出した。実験は3回行った。

ER流動の速度の測定はImageJ Kbi-Flow pluginを用いて行った(Ueda et al., 2010)。0.32 s間隔で40枚の画像を取得し速度を算出した。実験は2回の独立した試行で得られた6つ以上の連続画像に対して行った。

5. 2. 8. 免疫電子顕微鏡法

NP:YFPを一過的に発現させた30 hpiの*N. benthamiana*葉もしくはFMVに感染したイチジク葉を約1 × 4 mmに裁断し、一次固定液(50 mM sodium cacodylate [pH 7.4], 4%[w/v] paraformaldehyde, 0.1%[v/v] glutaraldehyde, 2 mM CaCl₂)に2 h湿潤した。イチジク葉を処理する場合はさらに60 mM sucroseを添加した。固定した葉はカコジル酸バッファー (50 mM sodium cacodylate, pH 7.4)で4回洗浄した後、二次固定液 (4%[w/v] 四酸化オスミウム, 3%[w/v] potassium ferricyanide)で1 h処理した。グリシン入りカコジル酸バッファー (50 mM sodium cacodylate [pH 7.4], 100 mM glycine)で4回洗浄した後に、濃度段階エタノール(50%、70%、80%、90%、95%、100%)で脱水処理を行った。LR White樹脂 (Polysciences) を1:1、2:1、3:1のLR White樹脂-エタノール混合液でサンプルに浸透させ、最終的に1%(v/v) 酸化ベンゾイル (Nisshin EM)を添加し脱気したLR White樹脂中に移した後に、4°Cで5日間紫外線照射を行い樹脂硬化させた。Leica EM UC7 ultramicrotomeを使い100 nmの超薄切片を作出しニッケルグリッド上に乗せた。切片を乗せたグリッドはブロッキングバッファー (2%[w/v] PVP 40K [Sigma-Aldrich], 2%[w/v] bovine serum albumin, 0.1% [w/v] NaN₃, 0.05%[v/v] Tween 20 in PBS)で30 min処理してブロッキングした。ブロッキング処理後のグリッドは抗NP抗体をPBSで1/200希釈 (約10 µg/ml)した抗体溶液で4°C 12 h処理した。PBSで洗浄した後に、15 nm金粒子で標識されている抗ウサギ抗体 (Cosmo Bio)をPBSで1/200に希釈した二次抗体液で4°C 12 h処理し、洗浄、乾燥させ、電子顕微鏡JEM 1400 Plus 透過型電子顕微鏡 (JEOL)で観察を行った。グリッドに対する処理は全て液柱中上で行った。

5. 2. 9. 電子顕微鏡観察

通常電子顕微鏡観察にはSpurr low-viscosity embedding medium (Sigma-Aldrich)を使用した。FMVに感染した*F. carica*葉を約1 × 4 mmに裁断し、一次固定液(50 mM sodium cacodylate [pH 7.4], 4%[w/v] paraformaldehyde, 1%[v/v] glutaraldehyde, 2 mM CaCl₂, 60 mM sucrose)に2 h湿潤した。上記と同様の方法で洗浄した後に、二次固定液 (2%[w/v] 四酸化オスミウム水溶液)で2 h処理した。脱水処理

を上記と同じ方法で行った後、Spurr樹脂を1:3、1:1、3:1のLR White樹脂-アセトン混合液でサンプルに浸透させた。その後、サンプルを脱気したSpurr樹脂に移し、60°C、3日で樹脂硬化を行った。80 nmの超薄切片を作出した後に、JEM 1400 Plus 透過型電子顕微鏡 (JEOL)で観察した。

5. 3. 結果

FMV感染植物からのNPの検出

FMV感染植物からウエスタン解析でNPが検出された例はこれまでにないため、抗NP抗体を用いてFMV感染イチジクからの検出を試みた。FMVの感染が確認されているイチジクと健全のイチジクの葉より膜画分P30を回収し、ウエスタン解析を行った。その結果、感染植物特異的に約35 kDaの位置にシグナルが検出された (Fig. 5-3)。これはNPの予想分子量と一致していることから、NPが感染植物内で蓄積していることが示唆された。なお、35 kDaの上方にある複数のバンドは分子量からNPが多量体化しているものであると考えられた。

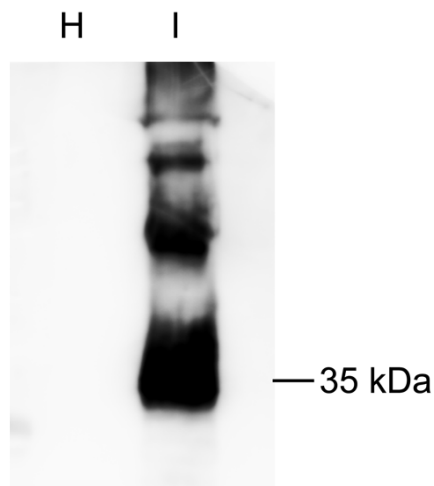


Fig. 5-3

FMV 感染植物からの NP の検出

健全(H)と FMV 感染(I)のイチジク葉から膜画分 P30 を回収し、抗 NP 抗体を用いてウエスタン解析を行った。

NPはRNA結合能を有する

NPはRNAと結合する性質があるため (Kormelink et al., 2011; Ruigrok et al., 2011)、FMVのNPにRNA結合能があるかどうかをEMSA (electrophoretic mobility shift assay)を用いて検証した。精製リコンビナントタンパク質MBP:NPと、³²PラベルしたFMV RNA 5'末端をテンプレートとしてEMSAを行った。その結果、1 μMのMBP:NPを混和した場合にテンプレートRNAの泳動度が遅れたバンドが見られ始め、6 μMでほとんど全量のテンプレートの泳動度が遅れていることが分かった (Fig. 5-4 A)。6 μMのMBP添加時には泳動度の遅れは見られないことから、テンプレートRNAとNPの結合が示唆された。さらに、MBP:NPと結合したと考えられるアップシフトしたRNAバンドは、ほとんどがゲルのウェルの中に留まっており、テンプレートRNAとMBP:NPは大きな複合体を形成していると考えられた。次に、NPが配列特異的なRNA結合能を有しているか検証するために、競合阻害実験を行った。³²PラベルしていないTMV RNA 3'末端を competitor として濃度を変えて添加した。その結果、TMV:FMVの分子数比が10:1の時にアップシフトしたバンドが弱くなり始め、50:1ではアップシフトしたバンドがほとんど見られなくなった (Fig. 5-4 B)。配列特異的な結合を示すウイルスタンパク質は100倍以上の competitor 存在下でもRNAと結合することから (Rajendran and Nagy, 2003; Martínez-Turiño and Hernández, 2010)、FMV NP単独でのRNA結合の配列特異性はごく弱い、ないものと考えられた。

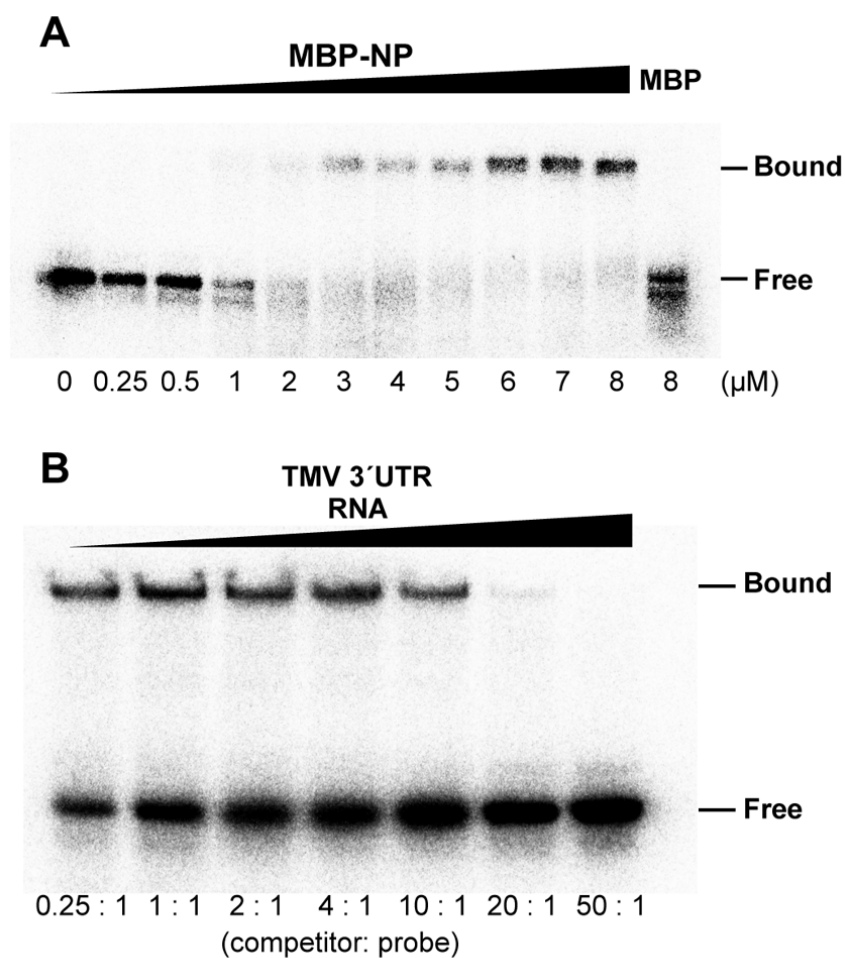


Fig. 5-4 NP は RNA と結合する

- (A) ^{32}P ラベルした FMV RNA 5' 末端と MBP:NP もしくは MBP を混和した。下の数字は添加したタンパク質濃度。
- (B) 競合阻害実験。 ^{32}P ラベルした FMV RNA 5' 末端と MBP:NP に ^{32}P ラベルしていない TMV 3' RNA を添加した。下の数字は competitor と ^{32}P ラベルした FMV RNA 5' 末端の分子数比。

FMV感染細胞の微細構造観察

次にFMV感染細胞での細胞内構造の変化を観察するために、FMVに感染したイチジク葉肉細胞を電子顕微鏡を用いて観察した。葉肉細胞を観察すると先行研究 (Martelli et al., 1993; Appiano et al., 1995)と一致してERのごく近傍にDMBと思われる構造物が観察された (Fig. 5-5 A)。拡大して観察すると二層の膜が区別して観察されたため、本構造がDMBであることが分かった (Fig. 5-5 A inset)。さらに、DMBがERから突き出てくるような様子も観察され、DMBはERから膜を収奪し出芽していると考えられた (Fig. 5-5 B)。DMBは電子密度の高い構造として観察されたが、これはvRNPを密にパッケージングし、二重の膜で纏われているためであると考えられた。さらに、先行研究と同様にDMBの近傍にはしばしばマトリックス (Matrix)と呼ばれる繊維状封入体が観察された (Fig. 5-5 C; Appiano et al., 1995; Elbeaino et al., 2009a)。マトリックスはリボソーム様の電子密度の高い粒状の構造を多く含むことから、主に変性したERから成るものと推察された。その他には、FMV感染時に特異的な構造変化は見出されなかった。

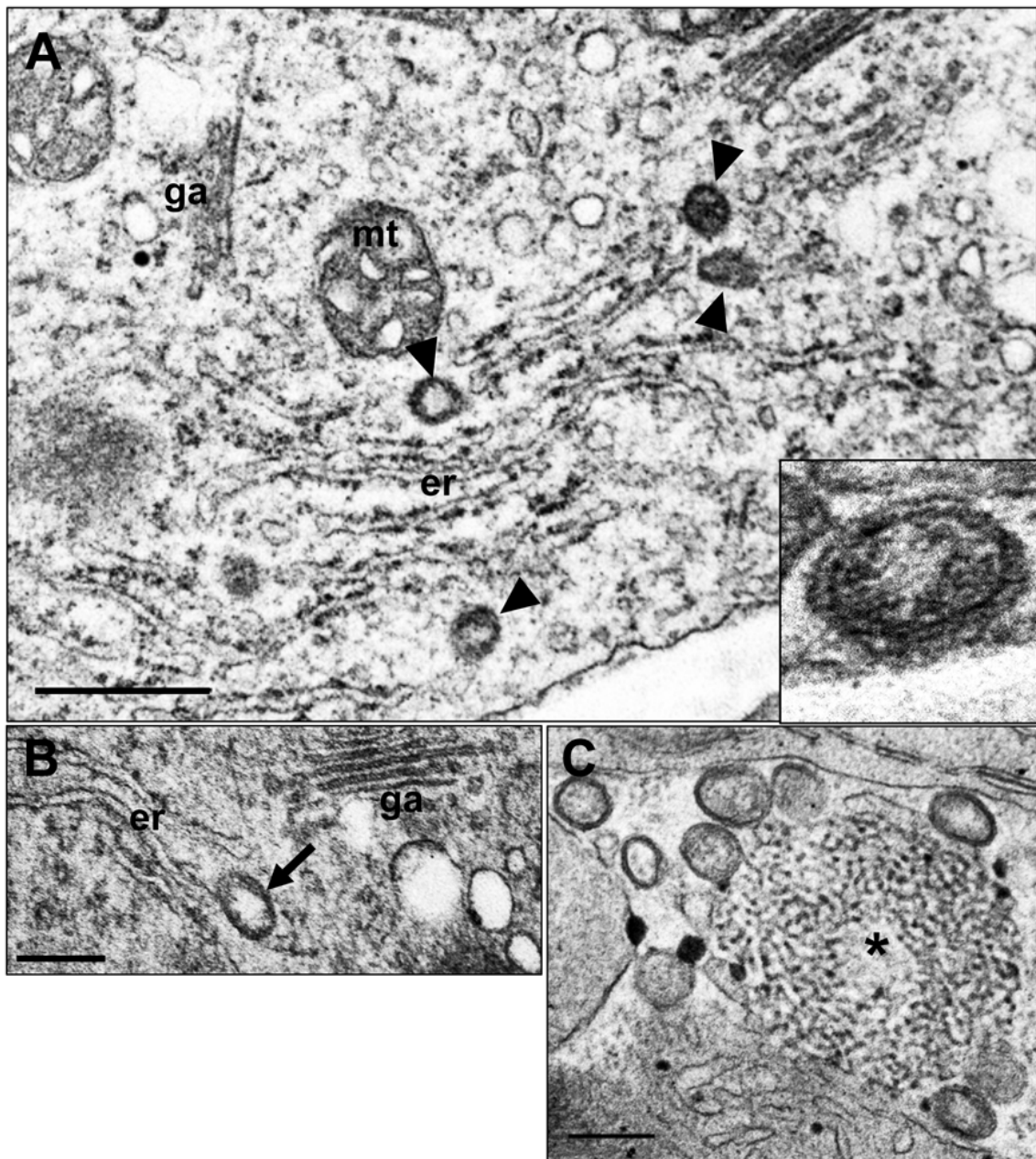


Fig. 5-5 FMV 感染細胞の電子顕微鏡観察

- (A) 電子密度の高い DMB が ER の近傍に観察される (矢尻)。inset は DMB が二層の膜を有することを示す。
- (B) ER から DMB が出芽していると思われる様子 (矢印)。
- (C) マトリックス (アスタリスク) が DMB と隣接している様子。
- er: ER、ga: ゴルジ体、mt: ミトコンドリア。Bars: (A), 500 nm; (B), (C), 200 nm。

FMV 感染細胞中で NP は ER 近傍に凝集体として存在し ER 膜に包まれる

FMV 感染細胞における NP の局在を観察するために、FMV 感染イチジク葉の切片に対して、抗 NP 抗体を用いて免疫電子顕微鏡法を行った。その結果、DMB の内部に強く NP が検出され、DMB は粒子として NP を密にパッケージングしていることが示唆された (Fig. 5-6 A 矢尻)。DMB の中には ER から出芽している途中であるように見えるものも存在した (Fig. 5-6 B 矢尻)。同時に ER の近傍には、膜で囲まれていない様子の NP の凝集体が観察された (Fig. 5-6, A and B 矢印)。膜で囲まれていない NP 凝集体の中には DMB よりも大きなものも存在し、このような NP 凝集体の近傍の ER は変形しているように観察された (Fig. 5-6 C)。また、マトリックスからは NP は検出されず (Fig. 5-6 D)、DMB の近くに存在するにもかかわらずマトリックスは NP を含んでいないことが示唆された。観察を通じて、その他のオルガネラには NP は検出されなかった。以上より、NP 凝集体は主に ER 膜に囲まれた DMB の形で存在するが、一部は ER 膜に囲まれずに ER の近傍に局在することが示唆された。このことから、NP 凝集体は ER 膜を収奪するためにその近傍に局在していると推察された。

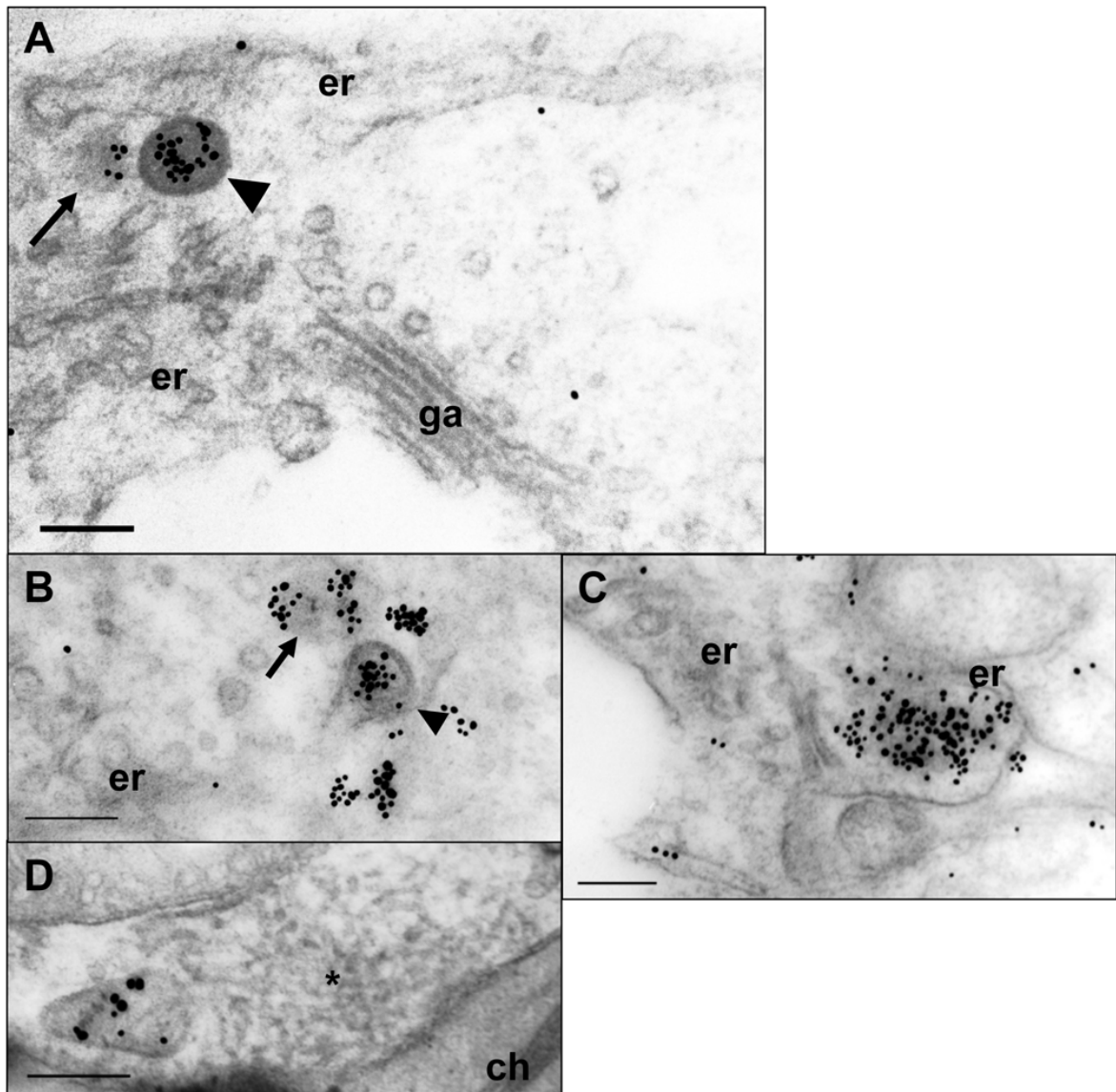


Fig. 5-6

FMV 感染細胞中で NP は ER の近傍に凝集体を形成し ER 膜で包まれる

FMV 感染イチジク葉肉細胞に対して、免疫電子顕微鏡法を抗 NP 抗体と 15 nm の金コロイド標識された抗ウサギ IgG 抗体を用いて行った。

(A), (B) DMB (矢尻)と膜に包まれていない NP 凝集体 (矢印)。

(C) ER を湾曲させる大きな NP 凝集体。

(D) マトリックスには NP は検出されない。

er: ER、ga: ゴルジ体、ch: 葉緑体。Bars = 200 nm。

一過的に発現させた NP は ER の近傍に凝集体を形成し ER と同調して動く

上述の免疫電子顕微鏡法を合わせた電子顕微鏡観察から、NP の形成する凝集体は粒子形成の核構造として中心的役割を果たしていると考えられた。さらに NP の局在について解析するために、NP の C 末端に YFP を融合させ (NP:YFP)、アグロインフィルトレーション法を用いて *N. benthamiana* 葉に一過的に発現させた。36 h 後 (hpi) に表皮細胞を CLSM で観察すると、NP:YFP は細胞質中に多数の小球状の凝集体を形成し、それらが動いている様子が見られた (Fig. 5-7 A)。以後、NP の形成するこのような凝集体を NP body (NB) と呼称することにする。NB の中にはほとんど動かないものと、活発に動いているものが存在した (Fig. 5-7 B)。動いている NB の速度は一定ではないが、平均すると 0.5 $\mu\text{m/s}$ 程度であると予想された。

FMV 感染細胞中では NB は ER の近傍に局在していたことから、NP:YFP と ER マーカーである SP:CFP:HDEL を共発現させた。SP:CFP:HDEL は CFP の N 末端に signal peptide と C 末端に ER 係留シグナル HDEL を有するタンパク質である (Nelson et al., 2007)。36 hpi では ER ネットワーク中に NB が位置し、ER tubule を縮め、ER の網状の構造を部分的に変性させる様子が観察された (Fig. 5-7 D)。このような構造は SP:CFP:HDEL のみを発現させた場合では観察されない (Fig. 5-7 C)。また、NB と ER の挙動を詳細に観察すると NB と ER が同調して動いているように見えた。このように同調して動いている様子は、原形質系上では ER が一方向に動いていることから観察しやすい (Fig. 5-7 E)。原形質系は核周辺から皮層へと液胞を貫く原形質であり、その内部にはアクチン-ER ネットワークが発達している (Hoffmann and Nebenführ, 2004)。48 hpi では NB は 36 hpi より大きくなり、その動きも遅くなる傾向がみられた (Fig. 5-7 F)。さらに ER が変性し、網状構造はほとんど見えなくなっていた。NB の動きや ER に近接する様子がゴルジ体の特徴と似ていると考えられたことから、ゴルジ体マーカータンパク質 (ManI:mCherry) と SP:CFP:HDEL、NP:YFP を共発現させた。すると、ManI:mCherry と NP:YFP は明らかに異なる局在を見せた (Fig. 5-7 G)。NP:YFP は ER の小さな網目部分を埋めるように局在し、一方、ManI:mCherry は比較的大き

い網目の中に ER tubule から少し離れて局在していた。このことから、NB はゴルジ体とは異なる領域に局在していることが示された。

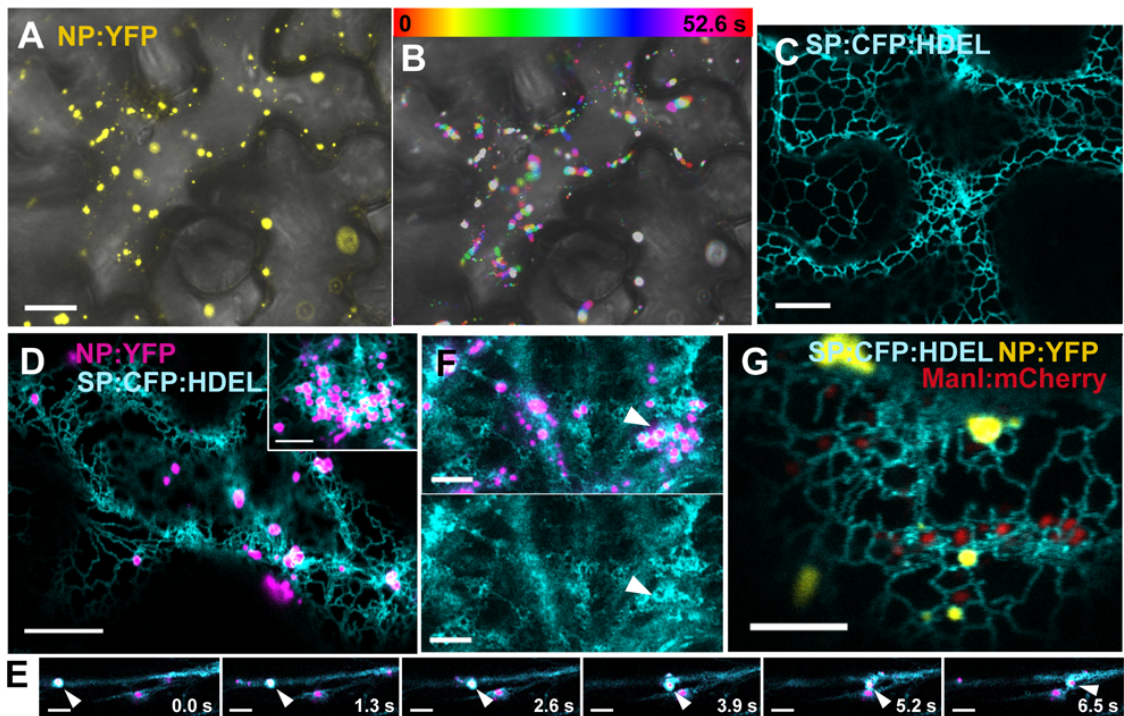


Fig. 5-7 一過的に発現させた NP は ER の近傍に局在し ER を変性させる

- (A), (B) NB の細胞内局在と動き。NP:YFP をアグロインフィルトレーション法にて *N. benthamiana* 葉で発現させ、36 hpi で観察した。明視野像を重ね合わせてある。(A) NP:YFP は NB を細胞質中に形成する。(B) (A)で示される像の連続画像を統合した。20 枚の画像を 2.6 s 間隔で取得した。
- (C) SP:CFP:HDEL のみを発現させた 36 hpi の細胞。
- (D), (E) NP:YFP (マゼンタ)と SP:CFP:HDEL を共発現させた 36 hpi の細胞。inset はさらに拡大した像を示している。
- (E) 1.3 s 間隔の連続画像。矢尻は原形質系中を ER と同調して動く NB を追跡している。
- (F) NP:YFP (マゼンタ)と SP:CFP:HDEL を共発現させた 48 hpi の細胞。上は重ね合わせ、下は SP:CFP:HDEL のみを示す。矢尻は1つの NB の場所を指している。いずれの画像も、Z 軸方向に 1 μ m 間隔で 10 枚の画像を取得し統合したものである。
- (G) NP:YFP、SP:CFP:HDEL、ManI:mCherry を共発現させた 36 hpi の細胞。
- Bars: (A), (B), 25 μ m; (C)–(G), 10 μ m; (C) inset, (E), 5 μ m。

NP 凝集体は ER 近傍の細胞質ゾル中に存在する

一過的に発現させた NP をさらに高い解像度で観察するために、免疫電子顕微鏡法を行った。NP:YFP を発現させた 30 hpi の *N. benthamiana* 葉を包埋し、切片に対して抗 NP 抗体と金コロイド標識された二次抗体を作用させた。すると、ER の近傍に電子密度の高い凝集体が多数観察され、それらは抗 NP 抗体で標識されたことから、CLSM で観察された NB と同一の凝集体であることが分かった (Fig. 5-8 A)。NB はしばしば不定形をとっていたが、およその直径は 100–500 nm であり、大きさ、形、局在の点から感染細胞で見られた NP の凝集体と良く似ていると考えられた。NB の中には入り組んだ ER ネットワークの中に入り込んでいるものも存在した (Fig. 5-8 B)。しかし、NB は ER の近傍には局在していたものの、明らかに ER とは空間的に離れていることが確認され、ER 近傍の細胞質ゾル中存在していることが分かった (Fig. 5-8 C)。接種後 40 hpi の葉を同様に観察すると、NB の直径は 30 hpi より大きくなっており、周辺の ER 構造が環状に変性している領域も存在した (Fig. 5-8 D)。このような構造は CLSM で観察された ER の変性した構造と似ていると考えられた (Fig. 5-7 F)。

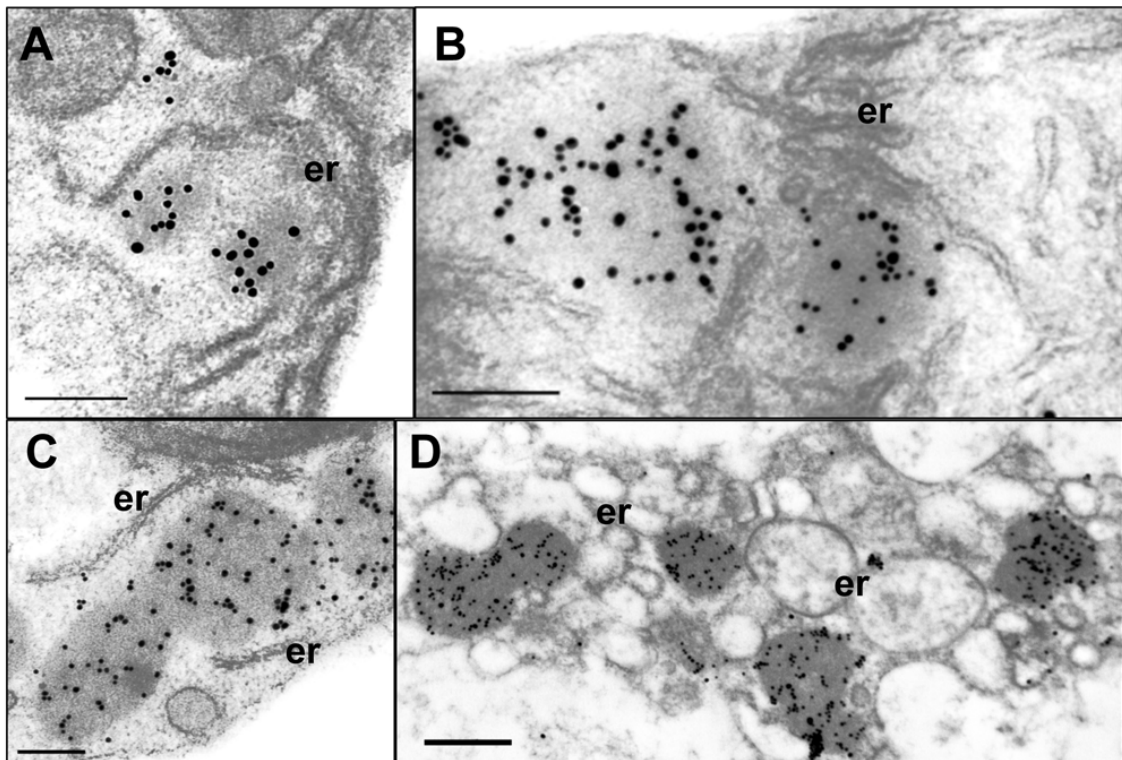


Fig. 5-8 一過的発現 NP の免疫電子顕微鏡法による観察

NP:YFP を一過的に発現した *N. benthamiana* 葉の超薄切片に対し、抗 NP 抗体（一次抗体）と 15 nm の金コロイド標識された抗ウサギ抗体（二次抗体）を作用させた。(A)-(C) 30 hpi に固定。(D) 40 hpi に固定。

- (A) ER の近傍に局在する NB。
- (B) ER tubule に囲まれる NB。
- (C) ER と NB は明瞭に区別される。
- (D) 激しく変性した ER の近くに局在する NB。

er: ER。Bars = 200 nm。

NP は ER とは異なる分画パターンを見せる

さらに NP の細胞内分布について情報を得るために、ショ糖濃度勾配遠心を行った。NP の C 末端に 3×myc タグを有する NP:3myc と ER マーカーである SP:CFP:HDEL を共発現させた *N. benthamiana* 葉から膜画分を回収し、濃度勾配遠心にかけた。各画分をウエスタン解析した結果、NP:3myc と SP:CFP:HDEL は同じ画分には検出されなかった (Fig. 5-9)。ウエスタン解析で検出されたシグナルを定量すると、NP:3myc は上方から下方の画分に向けて徐々に高くなっていくのに対し、SP:CFP:HDEL は中間の画分にピークが観察された。顕微鏡観察の結果も合わせて考えると、NP は細胞質ゾル中に存在するものの、凝集体を形成しているために膜画分の中に含まれ、凝集体ごとに密度と形状が異なり沈降度に差が出るために、下層に向かい連続して検出されたと考えられた。

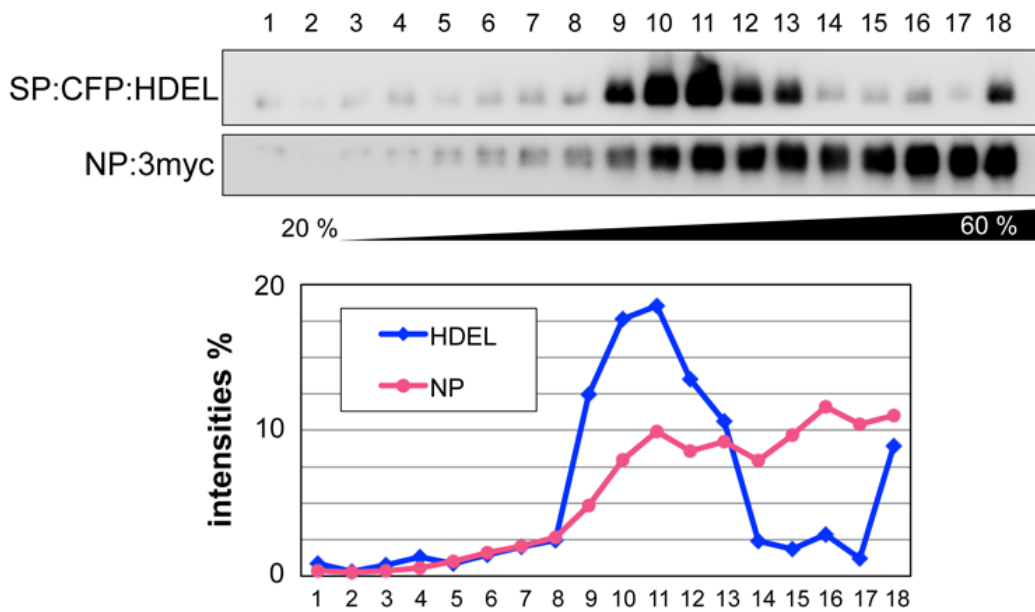


Fig. 5-9 NP と ER は異なる分画パターンを見せる

NP:3myc と SP:CFP:HDEL を一過的に発現させた 36 hpi の *N. benthamiana* 葉から P30 膜画分を回収し、20–60%のショ糖濃度勾配遠心にかけて。その後、抗 myc 抗体と抗 GFP 抗体を用いウエスタン解析を行った。各画分は上から下へと番号をふってある（1 から 18）。各画分のシグナル強度を定量し、グラフ化した。

NB はアクチン-ER 網に沿って局在する

NB の ER に沿った動き (Fig. 5-7 E) はアクトミオシンシステムを想起させたため、NP:CFP とアクチン繊維マーカーを共発現させた。アクチン繊維マーカーとして、*A. thaliana* の fimbrin 1 の C 末端半分 (アクチン結合ドメイン部に対応) に YFP を N 末端に付加した融合タンパク質 (YFP:FABD2) を使用した (Voigt et al., 2004)。その結果、NB はアクチン繊維に沿って局在している様子が観察された (Fig. 5-10, A and B)。アクチン繊維は NP:CFP の発現によっても構造に影響を受けていないように見えたが、反対に YFP:FABD2 の発現は NB の動きを止めていた (Fig. 5-10 C)。これは恐らく、FABD2 のアクチン結合活性によってアクチンの動きが阻害されたためと考えられ、先行研究によっても FABD2 の一過的過剰発現により細胞内小器官やウイルスの複製複合体の動きが阻害される例が知られている (Holweg, 2007; Hofmann et al., 2009)。さらに NB の局在について空間的な情報を得るために、NP:CFP と YFP:FABD2、ER 係留シグナル HDEL を付加した mCherry (SP:mCherry:HDEL) を共発現させた。その結果、アクチン繊維は ER に沿って走っており、ER が NB を囲んで局在している様子が観察された (Fig. 5-10 D)。

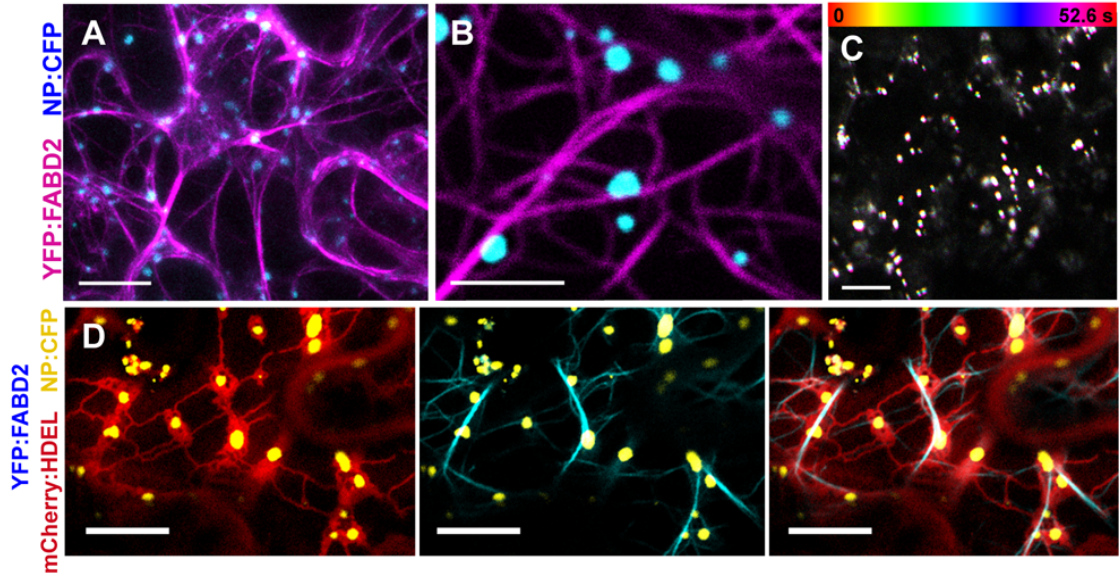


Fig. 5-10 NB はアクチン-ER 網に沿って局在する

(A), (B) NP:CFP と YFP:FABD2 (マゼンタ)を共発現させた細胞。

(C) NP:CFP と YFP:FABD2 を共発現させた細胞の NP:CFP の画像を 20 枚 2.6 s 間隔で連続取得し、統合した。

(D) NP:CFP (イエロー)と YFP:FABD2 (シアン)、SP:mCherry:HDEL を共発現した細胞。

画像は全て 36 hpi で撮影した。Bars: (A), (D), 10 μm ; (B), 5 μm ; (C), 25 μm 。

NBの動きはアクチンシステムに依存している

NBがどのようにして動いているのか調べるために、アクチンの重合阻害剤であるLatB処理を行った。まず、LatBが効いているか調べるために、ゴルジ体マーカーであるManI:CFP (Nelson et al., 2007)を発現している細胞に対してLatB処理を行った。ゴルジ体はアクチンシステムに依存して、アクチン-ER網に沿って動くことが知られている (Boevink et al., 1998; Nebenführ et al., 1999)。LatB処理によりゴルジ体の動きはほとんど完全に停止した一方で、溶媒の0.5%(v/v) DMSOではこのような効果は見られなかったことから (Fig. 5-11 A)、LatBのアクチン重合への阻害効果が確認された。次に、NP:YFP発現細胞に対してLatB処理を行うと、NPの局在は変化しなかったが、アクチン-ER網に沿った動きが停止した (Fig. 5-11 B)。このことから、NBの動きはアクチンシステムに依存していることが分かった。

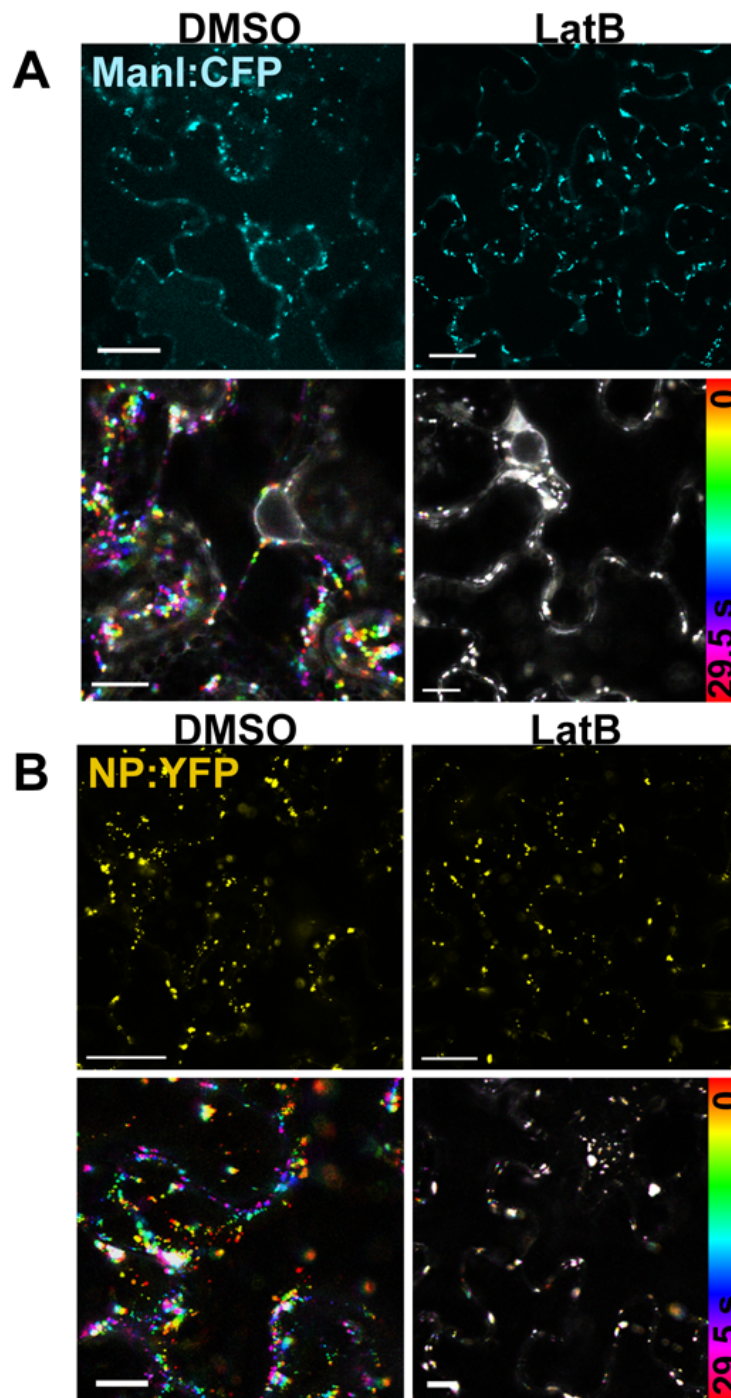


Fig. 5-11 NB の動きは LatB 処理により阻害される
 (A) ManI:CFP もしくは (B) NP:YFP の発現細胞に対し、50 μ M LatB もしくは 0.5%(v/v) DMSO を処理し、36 hpi で観察した。下段は 12 枚の画像を 2.6 s 間隔で連続取得し、統合した画像。Bars = 10 μ m。

NB の局在には ER ネットワークの構造が関わっている

NB は ER の近傍に局在していることから、ER ネットワークの構造が NB の局在や動きに関係しているか調べた。BFA は ER からゴルジ体への COPII 輸送を阻害する阻害剤であるが、50 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で処理した場合、ER ネットワークの構造が変化することが知られている (Schoelz et al., 2011)。まず、ゴルジ体と ER に対する BFA の影響を見るために、ManI:CFP を発現させた細胞に対し BFA を処理した。25 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で BFA を処理した場合、一部の ManI:CFP はゴルジ体に局在していたが、多くの ManI:CFP は ER に滞留し ER ネットワークが観察されるようになった (Fig. 5-12 B)。このような ER の CFP 蛍光は溶媒 0.5%(v/v)DMSO を処理した場合ではほとんど観察されない (Fig. 5-12 A)。50 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で BFA を処理した場合は、ER からゴルジ体への ManI:CFP の輸送はほとんど阻害され、ゴルジ体が観察されなくなるとともに、核周りの ER が発達したような異常な ER の構造が観察された (Fig. 5-12 C)。NP:YFP 発現細胞に対し、0.5%(v/v) DMSO または 25 $\mu\text{g/ml}$ BFA を処理した場合には NB の動きや局在に変化は見られなかった (Fig. 5-12, A', A'', B' and B'')。一方、50 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で BFA を処理した場合には、核周りに NP:YFP が異常に蓄積する様子が観察された (Fig. 5-12 C')。核は、SV40 ウイルスの核輸送シグナル配列を N 末端に有する CFP (NLS:CFP)により可視化した。このような異常に蓄積した NP:YFP は動く様子も観察されなかった (Fig. 5-12 C'')。COPII 輸送の阻害が NP:YFP の局在に影響を与えたという可能性を排除するために、COPII に重要な役割を果たすことが知られている小分子 GTPase Sar1 の優性阻害体 Sar1(H74L)を (Takeuchi et al., 1998)、ManI:CFP もしくは NP:YFP と共発現させた。ManI:CFP と共発現させた場合、ゴルジ体は見え ER ネットワークのみが見えており COPII 輸送が阻害されていることが確認された (Fig. 5-12 D)。一方、NP:YFP と共発現させた場合は局在と動きに変化は見られなかった (Fig. 5-12, D' and D'')。以上のことから、NB の局在と動きは ER ネットワーク構造に依存していることが分かった。

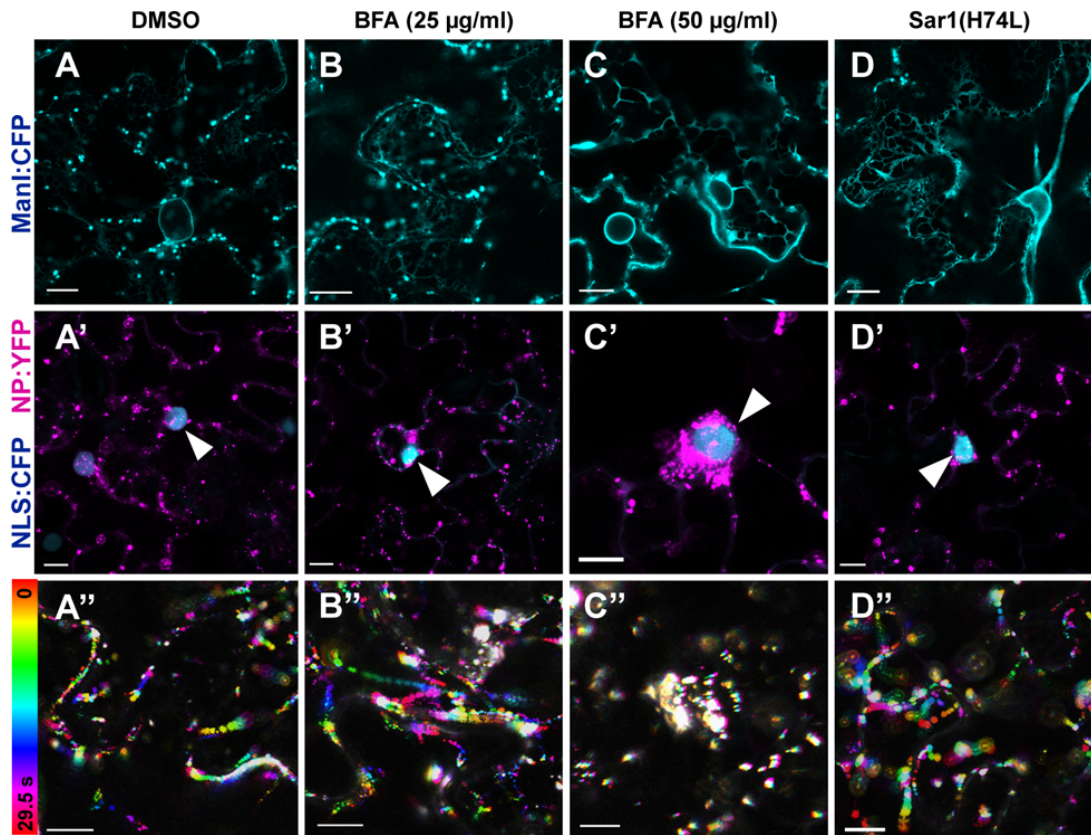


Fig. 5-12 NP の局在と動きは ER の構造変化の影響を受ける
 (A)-(D) ManI:CFP もしくは (A')-(D'') NP:YFP (マゼンタ)と NLS:CFP を発現させた細胞に対し、(A)-(A'') 0.5%(v/v) DMSO、(B)-(B'') 25 µg/ml BFA、(C)-(C'') 50 µg/ml BFA の処理または(D-D'') Sar1(H74L)の共発現を行った。(A'')-(D'') 12 枚の画像を 2.6 s 間隔で連続取得し、統合した画像。細胞は 36 hpi で観察した。Bars = 10 µm。

ミオシン XI-1、XI-2、XI-K の優性阻害型は NB の動きを阻害する

NBの動きのメカニズムを調べるために、アクチン繊維に沿った動きの原動力となるミオシンモーターの関与を調べた。N末端にCFPを融合した*A. thaliana*のクラスXIミオシンXI-1、XI-2、XI-J、XI-KのC末端領域 (CFP:XI-1t、CFP:XI-2t、CFP:XI-Jt、CFP:XI-Kt)とNP:YFPを共発現させた。この形態のミオシンはN末端側のモータードメインを欠損し、C末端側の積み荷結合ドメインのみを有することから、ミオシンの積み荷結合を優性阻害する (Avisar et al., 2008; Sparkes et al., 2008; Sparkes, 2011)。また、コントロールとしてGUSとNP:YFPを共発現させた。優性阻害型のミオシンの局在を見たところ、CFP:XI-1t、CFP:XI-2t、CFP:XI-Ktは点状の構造物として観察された一方で (Fig. 5-13, A, B and D)、CFP:XI-Jtは細胞質ゾルに拡散していた (Fig. 5-13 C)。これらの結果は先行研究と一致していた (Avisar et al., 2009)。NP:YFPの局在は、これらの優性阻害型ミオシンを発現させても、GUS発現時と比較して変化していなかった (Fig. 5-13 A-E)。また、NBとCFP:XI-1t、CFP:XI-2t、CFP:XI-Kt の点状の構造物はしばしば近接していたが、共局在することはなかった。一方で、NBの動きはCFP:XI-1t、CFP:XI-2t、CFP:XI-Kt を発現させた場合に強く阻害された (Fig. 5-13, A', B' and D')。CFP:XI-Jt もしくはGUSを発現させた細胞では、NBの動きは阻害されていないように思われた (Fig. 5-13, C' and E')。NBの動きの速度を計算するために、サンプルのドリフトと区別できないわずかな動きを見せているNBを選択的に除き、動いているNBの数を数えた後に、動いているNBの平均の速度と割合を計算した。CFP:XI-1t、CFP:XI-2t、CFP:XI-Kt を発現させた細胞におけるNBの平均速度はそれぞれ0.16、0.29、0.13 $\mu\text{m/s}$ であり、動いているNBの割合はそれぞれ4.4%、10.0%、1.3%であった (Fig. 5-13 F)。一方、CFP:XI-Jtを発現させた細胞のNBの速度はGUSを発現させた場合よりも早く、それぞれ0.75 $\mu\text{m/s}$ 、0.59 $\mu\text{m/s}$ であり、動いているNBの割合は37.7%、32.6%であった。

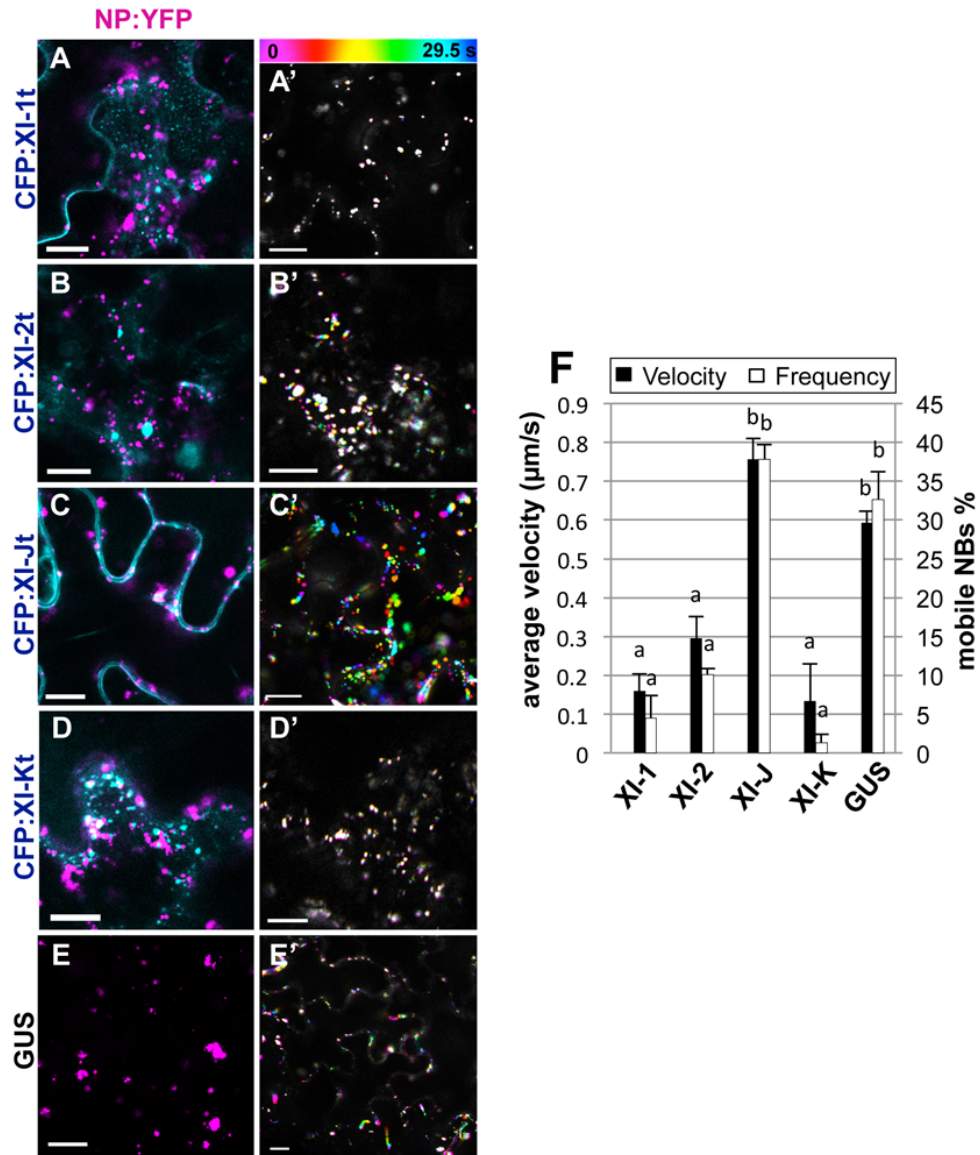


Fig. 5-13 優性阻害型ミオシンは NB の動きを阻害する

NP:YFP (マゼンタ)を (A) CFP:XI-1t、(B) CFP:XI-2t、(C) CFP:XI-Jt、(D) CFP:XI-Kt もしくは (E) GUS と共発現させ、36 hpi で観察した。(A')-(E') (A)-(E)と同条件の細胞における NP:YFP の動きを 12 枚 2.6 s 間隔で連続取得し、統合した画像。Bars = 10 μm 。

(F) NB の動く割合と平均速度を定量した。n = 3。エラーバーは標準偏差を示し、エラーバーの上のアルファベットが異なる群間には有意に差がある (Tukey's test; $P < 0.05$)。

NPと優性阻害型ミオシンの結合は認められない

次に、これらの優性阻害型のミオシンが結合してNPの動きを阻害しているのか確認するために、NP:3mycとCFPを融合した優性阻害型ミオシン (CFP:XI-1t, CFP:XI-2t, CFP:XI-Jt, CFP:XI-Kt) もしくはNP:YFPを共発現させ、共免疫沈降法を行った。ウエスタン解析を行った結果、粗抽出液でこれらのタンパク質がすべて発現していることが確認された (Fig. 5-14)。優性阻害型ミオシンは主に推定分子量の二倍の位置 (約170–200 kDa) にシグナルが検出された。これはミオシンの積み荷結合ドメインが二量体として働くことと一致している (Burkhard et al., 2001)。NP:YFPはNP:3mycと共沈降し、植物体内でNBを形成するという結果と一致したものの、優性阻害型ミオシンはNP:3mycとは共沈降されなかった。この結果より、NPはミオシンとは相互作用していない可能性が高いと考えられた。

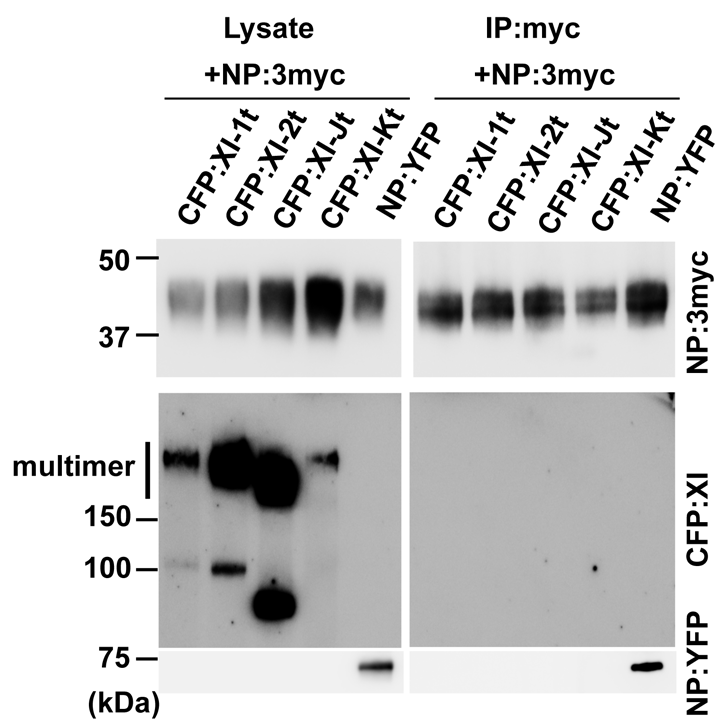


Fig. 5-14 NP と優性阻害型ミオシンの共免疫沈降

NP:3myc と CFP:XI-1t、CFP:XI-2t、CFP:XI-Jt、CFP:XI-Kt もしくは NP:YFP を共発現させ、共免疫沈降法を行った。ウエスタン解析には抗 myc 抗体と抗 GFP 抗体を使用した。

ミオシン XI-1、XI-2、XI-K の優性阻害型は ER 流動を NB の動きと同様に阻害する

これまでの結果から NB の動きは ER と深く関係しているにもかかわらず、細胞質に存在しミオシンとも結合しないことから、NB は ER 流動によって動いているのではないかと考えられた。この仮説を検証するために上記の優性阻害型ミオシンの ER 流動に対する影響を NB の場合と同様に調べた。SP:YFP:HDEL と CFP:XI-1t、CFP:XI-2t、CFP:XI-Jt、CFP:XI-Kt もしくは GUS を共発現させたところ、GUS を発現させた場合では原形質系における SP:YFP:HDEL の蛍光が観察されたが (Fig. 5-15 E)、CFP:XI-1t を発現させた場合には原形質系が確認されなくなり ER の網目状のネットワークも若干変性しているように観察された (Fig. 5-15 A)。CFP:XI-Kt を発現させた場合には、ER ネットワークが激しく変性した様子が頻繁に観察された (Fig. 5-15 D)。CFP:XI-2t、CFP:XI-Jt を発現させた場合には ER に対する影響は観察されなかった (Fig. 5-15, B and C)。連続画像を解析すると CFP:XI-1t、CFP:XI-2t、CFP:XI-Kt を発現させた場合には ER ネットワークの動きがほとんど観察されなくなっているのに対し、GUS もしくは CFP:XI-Jt を発現させた場合にはほとんど ER ネットワークの動きに影響は見られなかった (Fig. 5-15 A'-E')。ER 流動の最高速度と平均速度を計算すると、CFP:XI-1t、CFP:XI-2t、CFP:XI-Kt を発現させた細胞では、GUS もしくは CFP:XI-Jt を発現させた細胞に対して ER 流動の速度が有意に低くなっている結果が得られ (Fig. 5-15 F)、このような結果のパターンは NB に対するミオシン優性阻害のパターンとよく似ていると考えられた。ここで得られた ER の速度に関する結果は測定方法の違いから NB の速度と比較して一律に低いことを特筆しておく。これは、ER の速度計算に用いた ImageJ kbi plugin は (Ueda et al., 2010)、わずかな光点でも計算の対象としているためである。以上の結果から、NB と ER 流動の優性阻害型ミオシンの阻害パターンはよく似ており、NB と ER 流動は同じ力を原動力としていると考えられた。

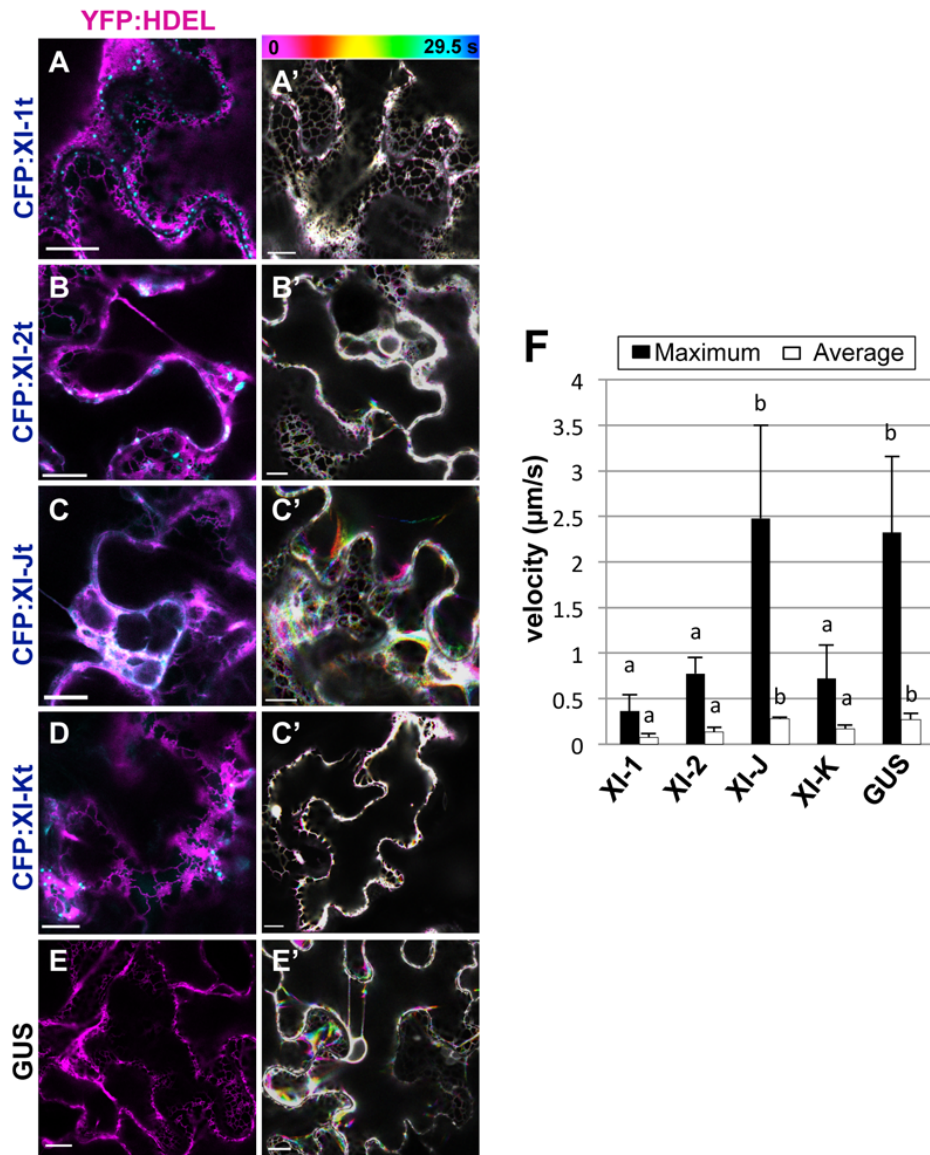


Fig. 5-15

優性阻害型ミオシンは ER 流動を NB の動きと同じパターンで阻害する

SP:YFP:HDEL (マゼンタ)を (A) CFP:XI-1t、(B) CFP:XI-2t、(C) CFP:XI-Jt、(D) CFP:XI-Kt もしくは (E) GUS と共発現させ、36 hpi で観察した。(A')-(E') (A)-(E)と同条件の細胞における SP:YFP:HDEL の動きを 12 枚 2.6 s 間隔で連続取得し、統合した画像。

Bars = 10 μm 。

(F) ER 流動の平均速度と最高速度を ImageJ kbi plugin を用いて定量した。n = 6。エラーバーは標準偏差を示し、エラーバーの上のアルファベットが異なる群間には有意に差がある (Tukey's test; $P < 0.05$)。

5. 4. 考察

NB は ER 流動により細胞内を受動的に動いている

本研究で得られた結果より、NB は粒子を形成するために ER 膜の近傍の細胞質ゾルに局在し、そのために ER 流動に巻き込まれて受動的にアクチン-ER ネットワークに沿って動いていると考えられた (Fig. 5-16)。このモデルは本研究で得られた以下の 4 つの証拠に基づいている。

第一に、NP はアクトミオシンシステムを原動力として動く凝集体を形成していることである。NP が凝集体 NB を形成することは、電子顕微鏡観察によって最もはっきりと示されている (Fig. 5-6 and Fig. 5-8)。このような NB は CLSM 下でアクチン-ER ネットワークに沿って細胞内を活発に動いていたものと同じと考えられる (Fig. 5-7, B and E)。さらに、LatB 処理で NB の動きが止まったことから、この動きはアクトミオシンシステムに依存していることが示された (Fig. 5-11)。

第二に、NB の動きはアクチン繊維及びミオシンとの直接相互作用によるものではないということである。優性阻害型ミオシンの発現は NB の動きを阻害したものの、これらの間には共局在も相互作用も認められなかった (Fig. 5-13 and Fig. 5-14)。さらに、BFA 処理はアクチン繊維には影響を与えないと考えられるが (Boevink et al., 1998)、NB の動きと局在を阻害した (Fig. 5-12)。ミオシンが積み荷に結合するには特異的な膜受容タンパク質が存在していることを考えると (Fagarasanu et al., 2009; Peremyslov et al., 2013)、細胞質ゾルに形成された凝集体である NB と直接相互作用しているとは考えづらく、ミオシンと直接結合して原動力を得ているオルガネラの動きによって NB は間接的に動かされているのではないかと考えられた。

第三に、NB は ER 膜付近の細胞質ゾルに局在していることである。CLSM や電子顕微鏡観察により NP 一過的発現時および FMV 感染細胞内で NB は ER の近傍に局在していることが示されたが (Fig. 5-6 and Fig. 5-8)、電子顕微鏡観察は NB が ER 膜とは明らかに離れた細胞質ゾルに局在していることも同時に示している。さらにシヨ糖濃

度勾配遠心で NP は ER とは異なる画分に回収されたことから、NB は ER 膜に係留されておらず、細胞質ゾル中に NB を形成していることが示唆された (Fig. 5-9)。

最後に、NB は ER 流動と非常に良く似た挙動を示すということである。CLSM 観察により ER 流動と NB の動きが同調している様子が観察されたほか (Fig. 5-7)、優性阻害型ミオシンによる阻害効果は ER 流動と NB の動きに対して同じパターンで見られた (Fig. 5-13 and Fig. 5-15)。このことから、ER 流動が NB の動きの原動力となっている可能性が示唆された。

以上の結果を合わせ、ER ネットワークがアクチン繊維に沿って流動することを踏まえると、ER 流動が ER 近傍に局在する NB を間接的に動かしていることが示唆された。先行の研究により、ER 流動の動きに合わせて ER 膜周辺の細胞質ゾルも動いている可能性が示唆されている (Ueda et al., 2010)。このことから、ER 流動による周辺細胞質ゾルの動きが NB の動きに対する原動力となっているのではないかと考えられた (Fig. 5-16)。

本研究から提唱する NB の動きに対するモデルは、植物細胞における小胞の動きのモデルとも良く一致すると考えられた。Peremyslov ら (2013)の研究により、XI-1、XI-K、XI-I ミオシンの内膜への結合は MyoB という受容膜タンパク質により介されていることが明らかとなっている。興味深いことに、優性阻害型の XI-K はあらゆるオルガネラや内膜の動きを止めるにもかかわらず、MyoB と XI-K はそのようなオルガネラや内膜とほとんど共局在しない。このようなことから、MyoB と XI-K は特定の内膜に対してのみ直接の原動力を与えており、その他の内膜は MyoB と XI-K が動かす内膜の動きによって受動的に動いているのではないかと考えられている。MyoB と XI-K は ER と同じ分画に回収されることから、MyoB と XI-K が直接動力を与えている対象は ER である可能性が高いと考えられている (Ueda et al., 2009; Peremyslov et al., 2013; Peremyslov et al., 2015)。本研究により提唱された NB の動きに対するモデルは以上の報告と親和性が高く、その確からしさを裏付けるとともに、受動的に動く対象の範囲をウイルスタンパク質凝集体にまで拡張するものとなっている。

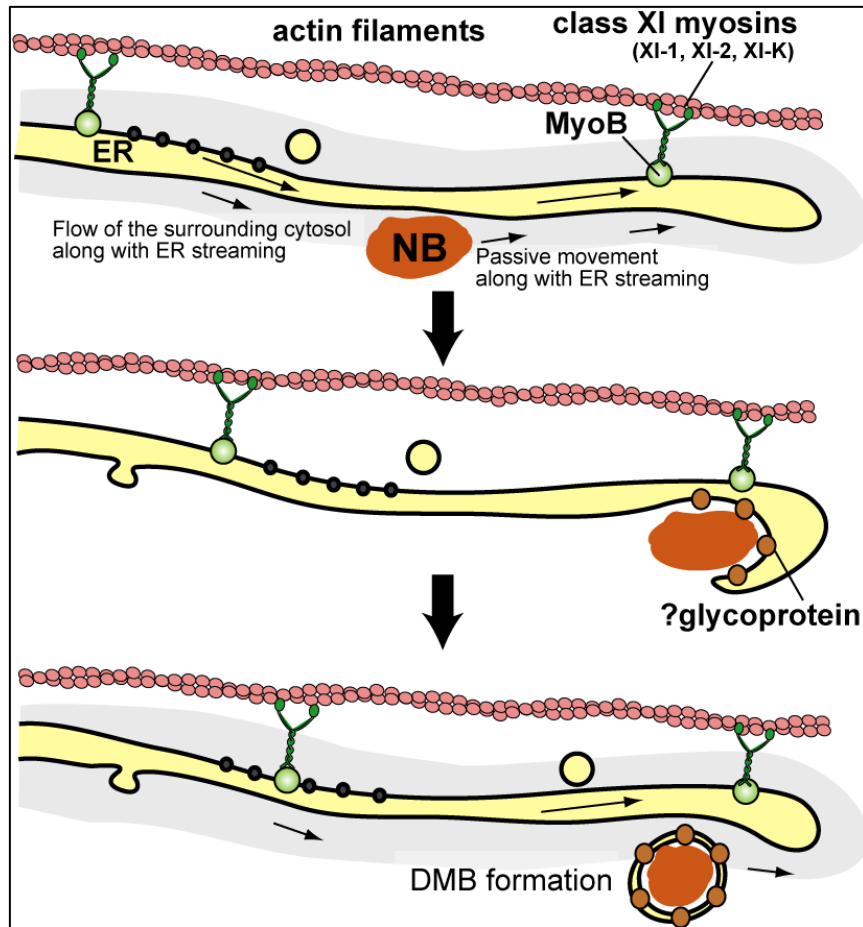


Fig. 5-16 本研究から得られた NB の動きに対するモデル

ウイルス因子凝集体の動きに対する生物学的意義づけ

これまでに多くのウイルス因子の形成する凝集体が高速で細胞内を動くことが知られている (Harries et al., 2010)。このような凝集体は内膜に係留されるか、あるいは小胞を形成することでミオシンと直接結合して原動力を得ていると考えられてきた (Laliberte and Sanfaçon et al., 2010; Niehl and Heinlein, 2011)。しかし本研究で推察されたモデルは、ER 流動により受動的にウイルス凝集体が動く、というものである。ER 流動はあらゆる植物細胞で恒常的に発生していると考えられることから、このモデルは多くのウイルスの細胞内挙動に対し適用可能であると考えられる。ウイルス因子凝

集体が細胞を動くことは慣例的に細胞間移行と結びつけて考えられてきたが、本研究はこのような動きに対して細胞間移行以外の説明がなされることを示している。ウイルス因子の凝集体が ER の近くに存在することで受動的な動きがもたらされる、言い換えると、アクチン-ER 網に沿った動きは凝集体と ER との空間的な近さを示していると考えられる。FMV NP の場合に関しては、ER 膜を収奪した粒子を形成することを考えると、粒子形成のために ER の近傍に局在しているのではないかと考えられた (Fig. 5-16)。

FMV 粒子の細胞内動態に対する考察

本研究で解決されない 1 つの疑問は、感染細胞で観察される DMB 粒子も単独発現時に観察される NB と同様に、アクチン-ER 網に沿って動いているのかどうか、ということである。分節ゲノムを有する植物マイナス鎖 RNA ウイルスでは完全な感染性クローンというのは未だに作製されておらず、ウイルスの細胞内挙動をイメージングするのに大きな制限がある。そのため FMV の複製複合体や粒子がどのように動いているのか検証することは困難である。しかし、FMV 感染細胞で NB と同様に DMB も ER の近傍に局在していることが示されていることから (Fig. 5-6)、DMB も ER 流動に乗って受動的に動いているのではないかと考えられる。

その他のマイナス鎖 RNA ウイルスとの比較

同じくマイナス鎖 RNA ウイルスである TSWV では、FMV の場合と同様に NP が凝集体を形成し (Ribeiro et al., 2009; Ribeiro et al., 2013)、アクチン-ER 網に沿って動くことが知られている (Feng et al., 2013)。FMV の場合と状況が似ていることから、TSWV NP の場合も ER 流動がその動きを介しているのではないかと考えられる。しかし、TSWV NP の場合は優性阻害型 XI-K は NP の動きに対して阻害効果を見せるが、XI-2 は阻害効果をほとんど見せず、FMV NP とは結果が異なることが明らかとなっている。当然ながら、両者の NP が異なるシステムで動いている可能性があるが、もう一つの説明として、TSWV NP の研究で用いられた優性阻害型ミオシンは *N. benthamiana* 由来のものであるのに対し、本研究は *A. thaliana* 由来のものであるとい

うことが挙げられる。これまでに植物種間でミオシンの機能を比較した報告はないが、*N. benthamiana* と *A. thaliana* で優性阻害型ミオシンの効果が異なる可能性があるのかもしれない。

ER に対してクラス XI ミオシンが果たす機能の違いについて

優性阻害型ミオシンを用いた実験は、クラス XI ミオシンの ER ダイナミクスと構造に対する機能に関して重要な示唆を与えている。CFP:XI-1t を発現させた細胞では原形質系中における ER が消失したのに対し、CFP:XI-2t および CFP:XI-Kt を発現させた細胞では ER 流動は停止したにもかかわらず、原形質系中における ER が観察された (Fig. 5-15)。アクチンの阻害剤処理により原形質系が消失することから、アクチンの重合化が原形質系の構成に関わると考えられている (Staiger et al., 1994; Shimmen et al., 1995; Hussey et al., 1998; Hoffmann and Nebenführ, 2004)。このことから、XI-1t はアクチン繊維の構成を阻害しているのではないかと推察された。XI-2t は ER の構造には変化が見られず、ER 流動のみを特異的に阻害していると考えられた (Fig. 5-15 B)。XI-Kt は ER の構造を激しく変性させるが、ER 流動への影響は XI-2t と同程度であった (Fig. 5-15, D and F)。このような ER の構造に与える影響の違いは先行研究でも報告されている (Griffing et al., 2014)。以上のことから、XI-1、XI-2、XI-K は ER の構成と動きに異なる機能を果たしていると考えられた。

第 6 章 総合考察

6. 1. FMD と FMV のリスクと防除について

FMD は地中海沿岸を中心とした地域では慢性的に発生しており、その正確な損害は算出出来ないと言われている (Blodgett and Gomec, 1967)。イチジクはアラビア半島南部が原産であると考えられ、比較的高温で雨量の少ない夏乾気候に適している植物である (株本, 1996)。生育に好適な環境の地中海沿岸地域では、栽培用に植栽されるのみならず、日当りの良い林縁や道ばたで生育しており、このような商業目的でないイチジクが、FMD の感染源となっていると考えられる。Fig. 6-1 はイタリアとブルガリアで撮影した写真であるが、道ばたでイチジクが生育しそれらのほとんどに FMD と考えられる病徴が現れている様子を示している。また、FMV の媒介虫であるイチジクモンサビダニ (*A. ficus*) はイチジク属植物への寄生に特化したフシダニであるため、イチジクと同様に高温小雨の気候を好む (新田, 2001)。このような条件が揃っている地中海沿岸地域では感染樹の伐採などの抜本的な対策を講じない限り、効果的な防除は困難であると考えられる。

一方日本国内では、FMD の発生は古くから各地で報告されていたが (Nitta et al., 1995; Shibao and Tanaka, 1998)、海外と比較した場合には被害は軽微である。その理由として、地中海沿岸地域と異なり、野生のイチジクがほとんど存在しないことに加え、日本は多雨でありイチジクモンサビダニが蔓延しづらいことが挙げられる。特に露地栽培の場合ではこの影響は顕著であり、梅雨によりその発生が抑えられていると考えられる (新田, 2001)。また、FMD が発生した場合にも、FMV は枝ごとに分布が分かれる傾向があることから (本研究第二章)、露地栽培では罹病樹であっても健全な枝が優先して成長し見た目上問題とならないこともある。しかし、空梅雨でイチジクモンサビダニが大量に発生した場合にこのような枝が感染源となり、一気に発生が拡大することもあるため、注意が必要である。一方でイチジク栽培ではハウス栽培が盛んに行われている。イチジクは整枝を行えば樹高を低く抑えることができ、気温や灌水量を調節し生育

に好適な環境を整えられることから、ハウスで栽培する利点大きい。一方で、雨の影響を受けないハウス栽培ではイチジクモンサビダニが発生しやすく、FMD のリスクが高くなると考えられる。特に近年、管理の省力化と品質の向上、田植え後の水稲用の温室の有効利用、糸状菌を病原とする株枯病やサツマイモネコブセンチュウによる食害など土壌伝染性の病虫害の回避を目的に、イチジクの温室コンテナ栽培が盛んになってきている (Hommi et al., 1994)。第 2 章で国内初発生が確認された圃場も温室コンテナ栽培を行っていた。温室コンテナ栽培では根圏が制限され、地植えよりも樹高が低くなり、分枝数が減るため、FMD に感染すればその影響が大きくなりやすい。以上のことから、日本においても FMD のリスクは高まっていると考えられる。



Fig. 6-1 **FMD 様の病徴を呈するイチジク**
(左上) 道路の舗装の間よりイチジクが生育する。ブルガリア。
(左下) モザイク症状。ブルガリア。
(右上) 樹全体に輪紋症状が見られる。イタリア。
(右下) 顕著な退緑症状。イタリア。

6. 2. FMV のゲノム構造について

本研究により、FMV のゲノムセグメントの本数とそれらにコードされるタンパク質の機能について複数の知見が得られた (Fig. 6-2)。まず、本研究開始時 (2010 年) では FMV のゲノムは 4 本であると考えられていたが、第 3 章の研究により新たに 2 本のゲノムセグメントが発見され FMV は少なくとも 6 本のゲノムを有することが示された。次に、RNA3 にコードされるタンパク質 p3 は他のウイルスからのわずかな間接的証拠から NP であると考えられていたが、第 5 章の研究により RNA 結合能と粒子に密に含まれることが示され、NP であることが証明された。さらに、RNA4 にコードされるタンパク質 p4 は既報のいかなる配列とも相同性を示さず機能が不明であったが、第 4 章の研究により MP であることが示された。RNA5、RNA6 にコードされるタンパク質 p5、p6 については機能が不明であるためさらなる解析が必要である。

FMV にさらに未知のゲノムセグメントが存在する可能性もある。第 3 章の研究においてはゲノムセグメントの両末端に保存される 13 nt に着目して RT-PCR で増幅することで新規のゲノムセグメントを検出したが、本方法では当該 13 塩基が保存されていないセグメントは増幅ができず、また 3 knt 以上のセグメントは増幅効率が落ちるため検出できていない可能性がある。一方で近年のシーケンス技術の向上により、ウイルス感染植物の RNA を網羅的に解読することでウイルスのゲノム報告を行うケースが増えている。特に *Emaravirus* 属ウイルスでは次世代シーケンサーで解読されたウイルス様配列をそのままゲノムとして報告する例が相次いでいる (Laney et al., 2011; McGavin et al., 2012; Elbeaino et al., 2015; Di Bello et al., 2015; Lu et al., 2015)。しかし、次世代シーケンサーを用いた網羅的な解読を行った場合でも、配列が全く未知のものは解読された大量の配列の中から見つけることが困難であるため、未知のゲノムセグメントが存在する可能性を残している。さらに、ウイルスにはサテライト RNA や defective RNA といったゲノム以外の配列も存在することが知られているため (Simon et al., 2004)、報告された配列がゲノムであるかどうかを検証が必要である。ウイルスゲノムを決定するための最も強力な方法は、ウイルス cDNA クローンをを用い、感染性を発揮するのに必要十分なセグメントを検証する方法であるが、*Emaravirus* 属を含め

た分節ゲノムを有するマイナス鎖 RNA ウイルスでは未だ感染性クローンが作出されていないことから、この方法を用いることができない。今後は FMV を含めた *Emaravirus* 属ウイルスが有する RNA 配列を全て決定するとともに、それらの配列がゲノムであるか、多角的な方法を用いて検証することが必要であると考えられる。

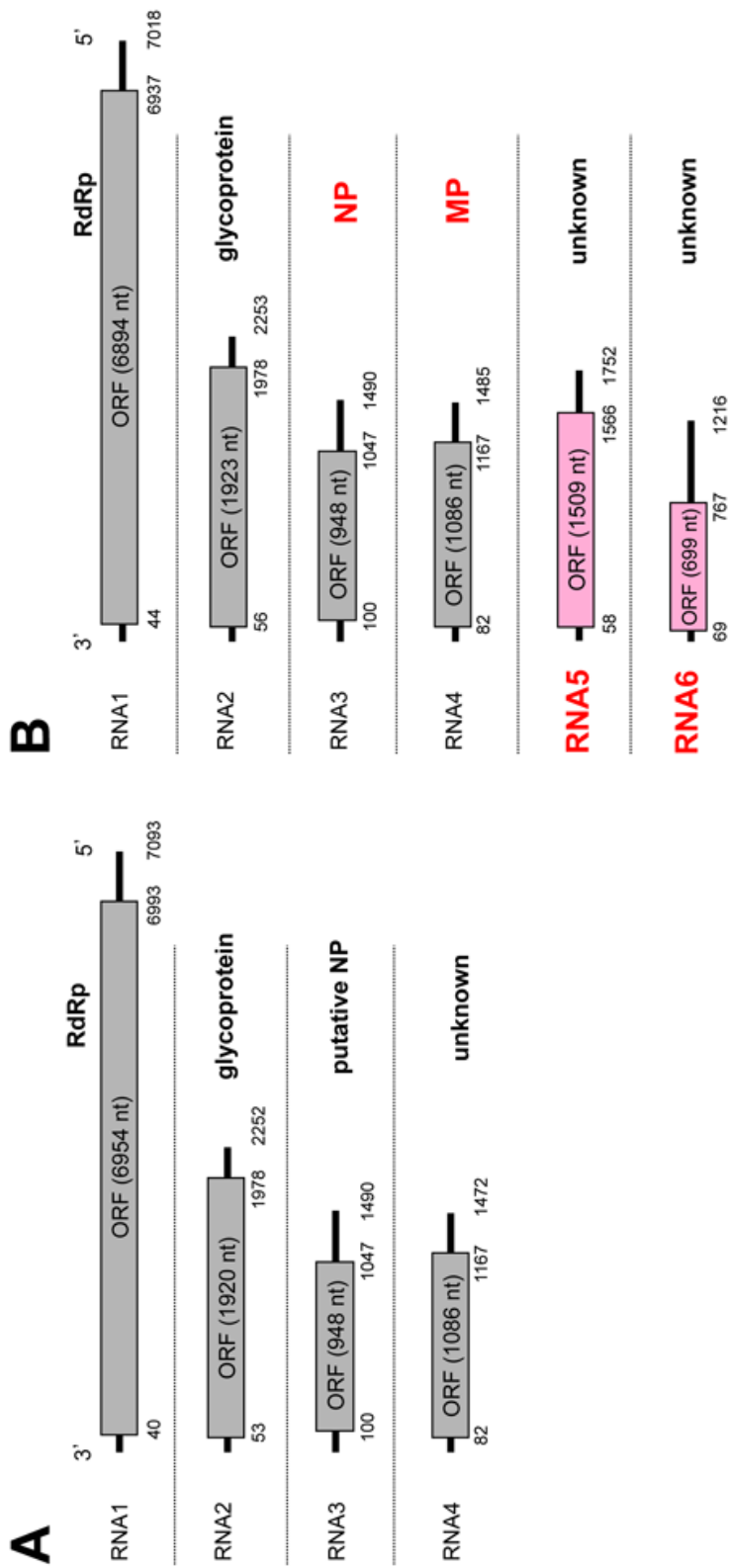


Fig. 6-2 本研究により明らかとなったFMVのゲノム構造

(A) 本研究開始時のゲノム構造 (2010年4月)。

(B) 本研究後のゲノム構造 (2015年12月)。

6. 3. 本研究より明らかとなった FMV の細胞内感染環について

第 5 章の FMV 感染植物の電子顕微鏡観察により、FMV は ER 膜を収奪して粒子を形成している可能性が強く示唆された。FMD 様の病徴を呈する葉の電子顕微鏡観察はかつてなされていたが (Martelli et al., 1993; Appiano et al., 1995)、免疫電子顕微鏡法を用い NP が DMB 内に含まれることを直接示したことで、DMB が FMV の粒子であることと、FMV 粒子が ER 膜から出芽していることを明確なものとした。動物マイナス鎖 RNA ウイルスではエンベロープの収奪にグリコプロテインが必要であり、粒子中には NP、vRNA と複製酵素が含まれる (Cros and Palese, 2003; Kaukinen et al., 2005; Ruigrok et al., 2011)。FMV についてもこれらの粒子構造は同様と推定され、Fig. 5-6 で観察された NB あるいは DMB には vRNA と RdRp が含まれているのではないかと推察される。

同じく第 5 章では NP の細胞内凝集体が、ER 流動によって受動的にアクチン-ER ネットワークに沿って動いていることを示した。このような動きは植物ウイルス学において、しばしばウイルス細胞間移行と結びつけられて考えられてきたが (Harries et al., 2010)、以下の理由から、本研究で観察されたこのような NP 凝集体の動きは細胞間移行に直接関与するものではないと考えられる。第一に、一過的に発現した NP は細胞間移行能を持たないにも関わらずこのような動きを見せること、第二に、NP の凝集体が PD の直径より大きく PD の通過が物理的に困難であること、第三に、このような動きは ER 流動の動きと区別が困難であり、実際にゴルジ体などのオルガネラも同様の動きを見せること、である。一方で、植物細胞が高速の原形質流動を行っているのは、細胞全体に物質を拡散するためであるという説もあることから (Verchot-Lubicz and Goldstein, 2010)、このような動きが NP の細胞内への拡散を助けており、その結果としてウイルスの細胞間移行を間接的に促進しているという可能性はあると考えている。また、細胞質ゾルに存在する NP 凝集体が ER 流動に完全に同調して動いていることは興味深い。一つの説明として、ER ネットワークによって細胞質が細かく分けられ、分けられた細胞質ゾルが ER と一体となり ER 流動に沿って動いているモデルが考え

られる。このような細胞内小器官の動態の影響はあらゆるウイルスが受けていると考えられ、原形質流動時に細胞の各地点においてどのような流れが発生しているのか詳細に解析することがウイルスに普遍的な細胞内動態の正確な把握に繋がると考える。

6. 4. おわりに

本研究では新規のウイルス FMV を国内で初めて検出したことを契機とし性状の解析を試み、新規ゲノムセグメントの報告とタンパク質の細胞生物学的解析を行った。FMV は実験手法が制限されることから、ウイルスそのものとしての形で解析することはほとんどできなかったが、実行可能な実験を組み合わせることでウイルスの基本的性状をある程度明らかにできたと感じている。ウイルスは細胞と密接に結びついた精緻な感染環を有しており、その全容は複雑かつ難解なものである。本研究の目的で述べた、ウイルス全体としての普遍性の解明はもとより、FMV の感染環の解明すら未だ遙か遠い道のりであるが、本研究で得られた知見が、作物生産性の向上と、ウイルス学や植物細胞学の基礎的知見の集積にわずかでも貢献することを望んでいる。

摘要

ウイルスはキャプシドに覆われたゲノム核酸を有する、細胞に寄生して増殖する微小な病原体の総称であり、その種類と性質は非常に多様である。特に近年の塩基配列技術の向上により、新たに多くの植物ウイルスが同定され始めている。ウイルスに対する新規防除法の基盤構築と、ウイルス学および細胞生物学的知見の集積に向けて、幅広いウイルス種の性状や細胞内感染環を明らかにすることは大きな意義があると考えられる。しかし、現状は特定のウイルス種や分野に研究が集中しており、多くのウイルス性状および細胞内感染環はほとんど不明である。

イチジクに頻発する病気として、モザイクなどの症状を引き起こすイチジクモザイク病が知られている。本病の病原は長らく不明であったが、2009年に海外で本病に罹病したイチジクより、新規のマイナス鎖 RNA ウイルス *Fig mosaic virus* (FMV) が発見され、病原として提案された。FMV は系統学的に既報のウイルスと大きく異なるため、2009年に新しく作られたウイルス属 *Emaravirus* 属に分類される。FMV は4本に分かれたゲノムセグメントを有し、RNA3にはヌクレオキャプシドプロテイン (NP)、RNA4には機能未知のタンパク質 (p4) がコードされると推察されている。しかし、FMVは機械接種が困難であること、感染性 cDNA クローンが作成されていないことなど、実験に不都合な性質を有するために研究が制限され、FMVの性状はほとんど明らかになっていない。本研究では、島根県のイチジクより国内で初めて FMV を検出したことを契機とし、FMVの基本的性状と細胞内感染環の解明を目的とした解析を行った。

1. 国内で初めての FMV の検出

日本国内においては 1962年にイチジクモザイク病の発生が報告されているが、FMVが検出された例はこれまでになかった。2010年に出雲市のイチジク圃場にてモザイクなどの症状が発生し問題となったため、病原を同定するために研究を開始した。罹病葉を観察した結果、モザイク、奇形、退緑などの病徴がイチジクモザイク病に酷似しており FMV の感染が疑われた。病徴を呈するイチジクより全 RNA を抽出し FMV に特異的なプライマーを用い RT-PCR を行ったところ、病徴を呈するイチジクから FMV と相同性を示す配列の増幅が確認され、これらのイチジクには FMV が感染していることが確かめられた。日本国内における FMV の発生報告は初めてであり、和名をイチジクモザイクウイルスと名付けた。

2. 新規ゲノム RNA セグメント「RNA5」、 「RNA6」 の発見

分節ゲノムを有するマイナス鎖 RNA ウイルスは、すべてのゲノムセグメントの両末端に互いに相補的な特定の共通配列を有する。この配列はゲノムセグメントが複製・翻訳される際の高次構造の形成に必須であると考えられ、FMV においても、すべてのゲノムセグメントの両末端に相補的な特定の 13 塩基の配列が保存されている。

国内で初めて FMV を検出したのちに、FMV のシーケンス解析を行う目的で日本とセルビアから合計 14 の FMV 分離株を集めた。全ゲノム配列の増幅を簡易に行うために、ゲノムセグメントの両末端に保存される 13 塩基の配列に合うプライマーを用いて RT-PCR を行い、全ゲノムセグメントの全長を一度に増幅することを試みた。その結果、予想に反し、全ての分離株から既報の 4 本のゲノムセグメントに加えて、いかなる配列とも相同性を示さない 2 種の配列の増幅が確認された。これら 2 種の RNA に対し両方の極性の RNA プローブを用いノーザンブロットを行うと、各 RNA 種でそれぞれ両方の極性の RNA 由来のシグナルが検出された。この結果から、感染植物内でこれらの RNA 種が複製されていることが示唆された。また、14 分離株から得られたこれらの RNA 種の配列を用いて分子系統解析を行い、既報のゲノムセグメントとの分子進化を比較すると、既報のゲノムセグメントと分子進化を共にしていることが明らかとなった。以上の結果から、これらの RNA 種は FMV の新規ゲノム RNA セグメントであることが強く示唆され、「RNA5」、 「RNA6」 と名付けた。

3. p4 のウイルス細胞間移行に関わる機能の同定

植物ウイルスは感染した細胞から plasmodesmata (PD: 原形質連絡) を通過して隣接細胞へと移行し、全身へと感染を拡大する。植物ウイルスは植物細胞間を移行するために、自身のゲノムに movement protein (MP: 移行タンパク質) と呼ばれるタンパク質をコードする。MP は PD に局在し、ウイルス粒子やゲノムの隣接細胞への輸送を促進していると考えられている。しかし、これまで FMV を含めた *Emaravirus* 属のウイルスで MP は同定されていなかった。

FMV の RNA4 にコードされる p4 は、いかなる配列とも相同性を示さずその機能は不明であった。p4 タンパク質に蛍光タンパク質を融合し、植物細胞で一過的に発現させ共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察すると、p4 は PD に局在した。この性質はウイルス MP に特徴的な性質であることから、p4 にウイルスの細胞間移行を促進する働きがあるか調べた。p4 を発現した細胞に細胞間移行能を欠失した potato virus X を感

染させると、細胞間移行能を欠失した *potato virus X* の隣接細胞への移行能が相補された。また、単一の細胞で p4 を発現させた場合、単独で p4 が隣接細胞へ移行することも確認された。以上の結果より、p4 にはウイルス細胞間移行を促進する働きが示唆され、p4 は FMV の MP であることが示された。

4. NP の細胞内動態の解析

アクチン・ミオシンシステムは細胞の内膜輸送や巨大分子の運搬、細胞内小器官の配置など、様々な細胞機能に関与していることが知られている。アクチン繊維に沿った物質の運搬は、主にミオシンモーターによって行われていると考えられ、*Arabidopsis thaliana* のミオシンはクラス VIII とクラス XI という、大きく 2 つのファミリーに分けられる。クラス XI ミオシンは主に細胞内小器官の移動に関わっており、13 個あるクラス XI ミオシン遺伝子のうち XI-1、XI-2、XI-I、XI-K は主に葉肉細胞で発現し機能することが示されている。

植物細胞における endoplasmic reticulum (ER: 小胞体) は細胞中を常に流動している動的な細胞内小器官である。ER は細胞質中に張り巡らされているアクチン繊維に沿って形成され、アクチン-ER 網を構成している。ER の動きは主にクラス XI-1、XI-2、XI-K ミオシンの働きによって発生し、ER の動きと同時に周辺の細胞質ゾルも動いていると推察されている。

これまでに複数のウイルスで、タンパク質凝集体がアクチン-ER 網に沿って動くことが報告されている。このような動きは、ウイルスタンパク質凝集体が ER 膜上に局在し形成した小胞に、ミオシンを直接リクルートすることによりもたらされ、ウイルスが ER 網を通じて原形質連絡を通過し隣接細胞へ移行する過程であると推察されていた。しかし、このようなウイルスタンパク質が動く機構について実際に解析された例はこれまでにない。

FMV の RNA3 にコードされていると推察される NP は、感染細胞中でゲノム RNA と結合し保護するとともに、複製・転写に必須な働きをしていると考えられている。FMV 感染細胞における NP の局在を抗 NP 抗体を用いた免疫電子顕微鏡法で観察すると、NP は ER 近傍の細胞質ゾルに凝集体を形成し、一部の NP 凝集体は ER 膜を収奪し粒子を形成している様子が観察された。蛍光タンパク質を融合した NP を植物細胞内で一過的に発現させ、共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞内局在を観察すると、細胞質に無数の凝集体を形成しアクチン-ER 網に沿って動いている様子が観察された。この動きは既報のウイルスタンパク質凝集体の動きと同様であると思われたため、そのメカニ

ズムを解明するために以下の実験を行った。まず、NPを一過的に発現した細胞を免疫電子顕微鏡法で観察すると、NPの凝集体はFMV感染細胞の場合と同様に、ER近傍の細胞質ゾルに形成されており、従来の予想とは異なりER膜上には局在していないことが分かった。次にNPの凝集体の原動力を調べるために、クラスXI-1、XI-2、XI-Kミオシンのモータードメインを欠失させた優性阻害型を作成した。これらの優性阻害型ミオシンを発現させた細胞では、ERの動きが止まりミオシンの働きが阻害されていることがわかった。次に優性阻害型ミオシンとNPを共発現させると、NP凝集体の動きはERの動きと同じパターンで阻害されたことから、NP凝集体はERと同じ原動力によって動いていると考えられた。しかし、NPと優性阻害型ミオシンは共局在せず、結合していないことが示唆されたことから、XI-1、XI-2、XI-KミオシンはNP凝集体を間接的に動かしていると考えられた。以上の結果より、NP凝集体は粒子形成のためにERの近傍の細胞質ゾルに局在しており、その結果としてクラスXIミオシンを原動力とするERの動きの影響を受け、受動的に動いていると考えられた。

本研究により性状のほとんどが不明であった新規ウイルスFMVの基本的性状が明らかになるとともに、感染細胞内でのウイルスの動態に対する示唆が得られた。FMVは大きく実験手法が制限されるウイルスであったが、実行可能な実験を組み合わせることにより、基本的性状の一部を明らかにすることが出来た。本研究をきっかけとして、これまでに解析されてこなかったウイルスの、基礎的知見の集積が進展することを期待している。

謝辞

本研究の遂行は以下の方々のご協力のもと行いました。厚く御礼申し上げます。

日本国内のイチジク葉サンプルは、島根県農業技術センターと福岡県植物防疫所のご協力のもと収集させていただきました。セルビアのイチジク葉サンプルの収集には Bojan Duduk 博士 (Institute of Pesticides and Environmental Protection, Belgrade-Zemun, Serbia) にご協力いただきました。

植物細胞の電子顕微鏡観察技術は渡辺京子 教授、井上優 氏 (玉川大学 生物資源学科) に熱心なご指導をいただきました。免疫電子顕微鏡法の技術については池田健一 准教授、井上加奈子 特別研究員 (神戸大学 農学研究科) にご助言いただきました。

本研究にあたり、東京大学大学院農学生命科学研究科 生産・環境生物学専攻 植物病理学研究室 難波成任 教授には、私の未熟な人格と偏狭な興味に合った親身なご指導と自由な研究主題を賜りました。同研究室の山次康幸 准教授、小松健 テニユアトラック 特任准教授 (現東京農工大学 大学院農学研究院)、東京大学農学生命科学研究科植物医科学研究室の大島研郎 教授 (現法政大学 生命科学部)、前島健作 助教、橋本将典 特別研究員には、有益な助言と、実験技術のご教授、ご校閲の労をいただきました。植物病理学研究室、植物医科学研究室のみなさまには、私のくだらない話から真面目な話まで聞いて頂き、楽しい研究の時間と様々な研究の着想を得ることができました。

最後に、私を常に応援し続けてくれた家族に感謝致します。

引用文献

- Adams, A.N. 1978. The detection of plum pox virus in *Prunus* species by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Ann. Appl. Biol.* 90: 215–221.
- Agranovsky, A.A., Folimonov, A.S., Folimonova, S.Y., Morozov, S.Y., Schiemann, J., Lesemann, D., Atabekov, J. G. 1998. Beet yellows closterovirus HSP70-like protein mediates the cell-to-cell movement of a potexvirus transport-deficient mutant and a hordeivirus-based chimeric virus. *J. Gen. Virol.* 79: 889–895.
- Alhudaib, A. 2012. Incidence of fig leaf mottle-associated virus and fig mosaic virus in Eastern province of Saudi Arabia. *Int. Jen. Virol.* 8: 128–132.
- Amari, K., Boutant, E., Hofmann, C., Schmitt-Keichinger, C., Fernandez-Calvino, L., Didier, P., Lerich, A., Mutterer, J., Thomas, C.L., Heinlein, M., Mèly, Y., Maule, A. J., Ritzenthaler, C. 2010. A family of plasmodesmal proteins with receptor-like properties for plant viral movement proteins. *PLoS Pathog.* 6: e10011119.
- Amari, K., Lerich, A., Schmitt-Keichinger, C., Dolja, V.V., Ritzenthaler, C. 2011. Tubule-guided cell-to-cell movement of a plant virus requires class XI myosin motors. *PLoS Pathog.* 7: e1002327.
- An, G. 1995. Binary Ti plasmid vectors. *Methods Mol. Biol.* 44: 47–58.
- Anonymous. 2015a. Food and Agriculture Organization of United Nations, Statical Data FAOSTAT. Available at: <http://faostat.fao.org>.
- Anonymous. 2015b. International Committee on Taxonomy of Viruses. Available at: <http://www.ictvonline.org/index.asp>.
- Appiano, A., Conti, M., Zini, N. 1995. Cytopathological study of the double-membrane bodies occurring in fig plants affected by fig mosaic disease. *Acta. Hort.* 386: 585–592.
- Aquino, V.H., Moreli, M.L. Moraes Figueiredo, L.T. 2003. Analysis of oropouche virus L protein amino acid sequence showed the presence of an additional conserved region that could harbour an important role for the polymerase activity. *Arch. Virol.* 148: 19–28.

- Avisar, D., Prokhnevsky, A.I., Makarova, K.S., Koonin, E.V., Dolja, V.V. 2008. Myosin XI-K is required for rapid trafficking of Golgi stacks, peroxisomes, and mitochondria in leaf cells of *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiol.* 146: 1098–1108.
- Avisar, D., Abu-Abied, M., Belausov, E., Sadot, E., Hawes, C., Sparkes, I.A. 2009. A comparative study of the involvement of 17 Arabidopsis myosin family members on the motility of Golgi and other organelles. *Plant Physiol.* 150: 700–709.
- Avisar, D., Abu-Abied, M., Belausov, E., Sadot, E. 2012. Myosin XIK is a major player in cytoplasm dynamics and is regulated by two amino acids in its tail. *J. Exp. Bot.* 63: 241–249.
- Barr, J.N., Elliott, R.M., Dunn, E.F., Wertz, G.W. 2003. Segment-specific terminal sequences of Bunyamwera bunyavirus regulate genome replication. *Virology* 311: 326–338.
- Barr, J.N., Wertz, G.W. 2005. Role of the conserved nucleotide mismatch within 39- and 59-terminal regions of Bunyamwera virus in signaling transcription. *J. Virol.* 79: 3586–3594.
- Bayne, E.H., Rakitina, D.V., Morozov, S.Y., Baulcombe, D.C. 2005. Cell-to-cell movement of *Potato Potexvirus X* is dependent on suppression of RNA silencing. *Plant J.* 44: 471–482.
- Benthack, W., Mielke, N., Büttner, C., Mühlbach, H.P. 2005. Double-stranded RNA pattern and partial sequence data indicate plant virus infection associated with the ringspot disease of European mountain ash (*Sorbus aucuparia L.*). *Arch. Virol.* 150: 37–52.
- Blodgett, E.C., Gomec, B. 1967. Fig mosaic. *Plant Dis. Rep.* 51: 893–896.
- Boevink, P., Oparka, K., Santa Cruz, S., Martin, B., Betteridge, B., Hawes, C. 1998. Stacks on tracks: the plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network. *Plant J.* 15: 441–447.
- Bucher, E., Sijen, T., Haan, P., Goldbach, R., Prins, M. 2003. Negative-strand tospoviruses and tenuiviruses carry a gene for a suppressor of gene silencing at analogous genomic positions. *J. Virol.* 77: 1329–1336.

- Burkhard, P., Stetefeld, J., Strelkov, S.V. 2001. Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol.* 11: 82–88.
- Çağlayan, K., Serçe, Ç.U., Barutcu, E., Kaya, K., Medina, V., Gazel, M., Soylu, S., Çalışkan, O. 2010. Comparison by sequence-based and electron microscopic analysis of fig mosaic virus isolates obtained from field and experimentally inoculated fig plant. *Plant Dis.* 94: 1448–1452.
- Çağlayan, K., Elci, E., Serçe, Ç., Kaya, K., Gazel, M., Medina, V. 2012. Detection of fig mosaic virus in viruliferous eriophyid mite *Aceria ficus*. *J. Plant Pathol.* 94: 629–634.
- Carroll, S. A., Bird, B.H., Rollin, P.E., Nichol, S.T. 2010. Ancient common ancestry of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Mol. Phylogenet. Evol.* 55: 1103–1110.
- Castellano, M.A., Gattoni, G., Minafra, A., Conti, M., Martelli, G.P. 2007. Fig mosaic in Mexico and South Africa. *J. Plant Pathol.* 89: 441–444.
- Condit, I.J., Horne, W.T. 1933. A mosaic of the fig in California. *Phytopathology* 23: 887–896.
- Cotton, S., Grangeon, R., Thivierge, K., Mathieu, I., Ide, C., Wei, T., Wang, A., Laliberte, J.F. 2009. Turnip mosaic virus RNA replication complex vesicles are mobile, align with microfilaments, and are each derived from a single viral genome. *J. Virol.* 83: 799–809.
- Crawford, K.M., Zambryski, P.C. 2000. Subcellular localization determines the availability of non-targeted proteins to plasmodesmatal transport. *Curr. Biol.* 10: 1032–1040.
- Cros, J.F., Palese, P. 2003. Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses. *Virus Res.* 95: 3–12.
- Cui, X., Wei, T., Chowda-Reddy, R.V., Sun, G., Wang, A. 2010. The *Tobacco etch virus* P3 protein forms mobile inclusions via the early secretory pathway and traffics along actin microfilaments. *Virology* 397: 56–63.
- Deom, C.M., Oliver, M.J., Beachy, R.N. 1987. The 30-kilodalton gene product of tobacco mosaic virus potentiates virus movement. *Science* 237: 390–394.
- Di Bello, P.L., Ho, T., Tzanetakis, I.E. 2015. The evolution of emaraviruses is

- becoming more complex: seven segments identified in the causal agent of Rose rosette disease. *Virus Res.* 210: 241–244.
- Earley, K.W., Haag, J.R., Pontes, O., Opper, K., Juehne, T., Song, K., Pikaard, C.S. 2006. Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant J.* 45: 616–629.
- Elbeaino, T., Digiario, M., De Stradi, A., Martelli, G.P. 2007. Identification of a second member of the family *Closteroviridae* in mosaic-disease figs. *J. Plant Pathol.* 89: 119–124.
- Elbeaino, T., Digiario, M., Alabdullah, A., De Stradis, A., Minafra, A., Mielke, N., Castellano, M.A., Martelli, G.P. 2009a. A multipartite single-stranded negative-sense RNA virus is the putative agent of fig mosaic disease. *J. Gen. Virol.* 90: 1281–1288.
- Elbeaino, T., Digiario, M., Martelli, G.P. 2009b. Complete nucleotide sequence of four RNA segments of fig mosaic virus. *Arch. Virol.* 154: 1719–1727.
- Elbeaino, T., González Rodríguez, À.M., Grajal-Martín, M.J., Digiario, M. 2011. Survey of fig viruses in Canary Islands. *J. Plant Pathol.* 93: 737–739.
- Elbeaino, T., Digiario, M., Martelli, G.P. 2012. RNA-5 and -6, two additional negative-sense RNA segments associated with fig mosaic virus. *J. Plant Pathol.* 94: 421–425.
- Elbeaino, T., Digiario, M., Uppala, M., Sudini, H., 2014. Deep sequencing of pigeonpea sterility mosaic virus discloses five RNA segments related to emaraviruses. *Virus Res.* 188: 27–31.
- Elbeaino, T., Digiario, M., Uppala, M., Sudini, H. 2015. Deep sequencing of dsRNAs recovered from mosaic-diseased pigeonpea reveals the presence of a novel emaravirus: pigeonpea sterility mosaic virus 2. *Arch. Virol.* 160: 2019–2029.
- Elbeshehy, E.K.F., Elbeaino, T. 2011. Viruses infecting figs in Egypt. *Phytopathol. Mediterr.* 50: 327–332.
- EISayed, A.I., Komor, E., Weig, A.R. 2011. Molecular characterization of Hawaiian sugarcane yellow leaf virus genotypes and their phylogenetic relationship to strains from other sugarcane-growing countries. *Eur. J. Plant Pathol.* 129: 399–412.

- Fagarasanu, A., Mast, F.D., Knoblach, B., Jin, Y., Brunner, M.J., Logan, M.R., Glover, J.N., Eitzen, G.A., Aitchison, J.D., Weisman, L.S., Rachubinski, R.A. 2009. Myosin-driven peroxisome partitioning in *S. cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 186: 541–554.
- Feng, Z., Chen, X., Bao, Y., Dong, J., Zhang, Z., Tao, X. 2013. Nucleocapsid of *Tomato spotted wilt tospovirus* forms mobile particles that traffic on an actin/endoplasmic reticulum network driven by myosin XI-K. *New Phytol.* 200: 1212–1224.
- Finn, R.D., Mistry, J., Tate, J., Coggill, P., Heger, A., Pollington, J.E., Gavin, O.L., Gunasekaran, P., Ceric, G., Forslund, K., Holm, L., Sonnhammer, E.L., Eddy, S.R., Bateman, A. 2009. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* 38: 1–12.
- Flock, R.A., Wallace, J.M. 1955. Transmission of fig mosaic by the eriophyid mite *Aceria ficus*. *Phytopathology* 45: 52–54.
- Gattoni, G., Minafra, A., Castellano, M.A., De Stradis, A., Boscia, D., Elbeaino, T., Digiario, M., Martelli, G.P. 2009. Some properties of fig latent virus 1, a new member of the family *Flexiviridae*. *J. Plant Pathol.* 91: 555–564.
- Genovés, A., Navarro, J.A., Pallás, V. 2010. The intra- and intercellular movement of Melon necrotic spot virus (MNSV) depends on an active secretory pathway. *Mol. Plant Microbe Interact.* 3: 263–272.
- Griffing, L.R., Gao, H.T., Sparkes, I. 2014. ER network dynamics are differentially controlled by myosins XI-K, XI-C, XI-E, XI-I, XI-1, and XI-2. *Front. Plant Sci.* 5: 218.
- Grigoras, I., Timchenko, T., Katul, L., Grande-Pérez, A., Vetten, H.J., Gronenborn, B. 2009. Reconstitution of authentic nanovirus from multiple cloned DNAs. *J. Virol.* 83: 10778–10787.
- Gulyaev, A.P., Fouchier, R.A.M., Olsthoorn, R.C.L. 2010. Influenza virus RNA structure: unique and common features. *Int. Rev. Immunol.* 29: 533–556.
- Harries, P., Ding, B. 2011. Cellular factors in plant virus movement: At the leading edge of macromolecular trafficking in plants. *Virology* 411: 237–243.
- Harries, P.A., Palanichelvam, K., Yu, W., Schoelz, J.E., Nelson, R.S. 2009. The

- cauliflower mosaic virus protein P6 forms motile inclusions that traffic along actin microfilaments and stabilize microtubules. *Plant Physiol.* 149: 1005–1016.
- Harries, P.A., Schoelz, J.E., Nelson, R.S. 2010. Intracellular transport of viruses and their components: utilizing the cytoskeleton and membrane highways. *Mol. Plant Microbe Interact.* 23: 1381–1393.
- Hiraguri, A., Netsu, O., Shimizu, T., Uehara-Ichiki, T., Omura, T., Sasaki, N., Nyunoya, H., Sasaya, T. 2011. The nonstructural protein pC6 of rice grassy stunt virus trans-complements the cell-to-cell spread of a movement-defective tomato mosaic virus. *Arch. Virol.* 156: 911–916.
- Hoffmann, A., Nebenführ, A. 2004. Dynamic rearrangements of transvacuolar strands in BY-2 cells imply a role of myosin in remodeling the plant actin cytoskeleton. *Protoplasma* 224: 201–210.
- Hofmann, C., Niehl, A., Sambade, A., Steinmetz, A., Heinlein, M. 2009. Inhibition of tobacco mosaic virus movement by expression of an actin-binding protein. *Plant Physiol.* 149: 1810–1823.
- Holweg, C.L. 2007. Living markers for actin block myosin-dependent motility of plant organelles and auxin. *Cell Motil. Cytoskel.* 64: 69–81.
- Hommi, Y., Kimura, N., Sakakibara, M., Senda, T. 1994. Training method, tree vigor control and upkeep methods for figs in container culture (in Japanese with English summary). *Res. Bull. Aichi Agric. Res. Ctr.* 26: 275–280.
- Hussey, P.J., Yuan, M., Calder, G., Khan, S., Lloyd, C.W. 1998. Microinjection of pollen-specific actin-depolymerizing factor, ZmADF1, reorients F-actin strands in *Tradescantia* stamen hair cells. *Plant J.* 14: 353–357.
- Johansen, L.K., Carrington, J.C. 2001. Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the Agrobacterium-mediated transient expression system. *Plant Physiol.* 126: 930–938.
- 株本輝久. 1996. 新特産シリーズ イチジク 栽培から加工・売り方まで. pp 28, 117–127. 農山漁村文化協会, 東京.
- 上遠野富士夫. 2007. 日本植物防疫協会編, 植物ダニ類の見分け方. pp 49. 日本植物防疫協会, 東京.

- Kalderon, D., Roberts, B.L., Richardson, W.D., Smith, A.E. 1984. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 39: 499–509.
- Kaukinen, P., Vaheri, A., Plyusnin, A. 2005. Hantavirus nucleocapsid protein: a multifunctional molecule with both housekeeping and ambassadorial duties. *Arch. Virol.* 150: 1693–1713.
- Kikkert, M., Poelwijk, F., Storms, M., Kassies, W., Bloksma, H., Lent, J., Kormelink, R., Goldbach, R. 1999. A protoplast system for studying tomato spotted wilt virus infection. *J. Gen. Virol.* 78: 1755–1763.
- Kim, D.H., Hwang, I. 2013. Direct targeting of proteins from the cytosol to organelles: the ER versus endosymbiotic organelles. *Traffic* 14: 613–621.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111–120.
- King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. 2011. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 771–776. London: Elsevier Academic Press.
- Kislev, M.E., Hartmann, A., Bar-Yosef, O. 2006. Early domesticated fig in the Jordan Valley. *Science* 312: 1372–1374.
- Kohl, A., Dunn, E.F., Lowen, A.C., Elliott, R.M. 2004. Complementarity, sequence and structural elements within the 39 and 59 non-coding regions of the Bunyamwera orthobunyavirus S segment determine promoter strength. *J. Gen. Virol.* 85: 3269–3278.
- Komuro, Y. 1962. Viruses infecting fruit trees (in Japanese). *Res. Bull. Plant Prot. Jpn.* 16: 255–257.
- Kormelink, R., Garcia, M.L., Goodin, M., Sasaya, T., Haennie, A.L. 2011. Negative-strand RNA viruses: The plant-infecting counterparts. *Virus Res.* 162: 184–202.
- Kumar, P.L., Jones, A.T., Reddy, D.V.R. 2003. A novel mite-transmitted virus with a divided RNA genome closely associated with pigeonpea sterility mosaic disease. *Phytopathology* 93: 71–81.
- Kumar, R., Kumar, D., Hyun, T.K., Kim, J.-Y. 2015. Players at plasmodesmal

- nano-channels. *J. Plant Biol.* 58: 75–86.
- Laliberte, J.F., Sanfaçon, H. 2010. Cellular remodeling during plant virus infection. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48: 69–91.
- Laney, A.G., Keller, K.E., Martin, R.R., Tzanetakis, I.E. 2011. A discovery 70 years in the making: characterization of the rose rosette virus. *J. Gen. Virol.* 92: 1727–1732.
- Laporte, C., Vetter, G., Loudes, A.M., Robinson, D.G., Hillmer, S., Stussi-Garaud, C., Ritzenthaler, C. 2003. Involvement of the secretory pathway and the cytoskeleton in intracellular targeting and tubule assembly of Grapevine fanleaf virus movement protein in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell* 15: 2058–2075.
- Lazarowitz, S.G., Beachy, R.N. 1999. Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants. *Plant Cell* 11: 535–548.
- Lewandowski, D.J., Adkins, S. 2005. The tubule-forming NSm protein from Tomato spotted wilt virus complements cell-to-cell and long-distance movement of Tobacco mosaic virus hybrids. *Virology* 342: 26–37.
- Liu, J.Z., Blancaflor, E.B., Nelson, R.S. 2005. The tobacco mosaic virus 126-kilodalton protein, a constituent of the virus replication complex, alone or within the complex aligns with and traffics along microfilaments. *Plant Physiol.* 138: 1853–1865.
- Lu, Y., McGavin, W., Cock, P.J.A., Schnettler, E., Yan, F., Chen, J., MacFarlane, S. 2015. Newly identified RNAs of Raspberry leaf blotch virus encoding a related group of proteins. *J. Gen. Virol.* 96: 3432–3439.
- Marchler-Bauer, A., Bryant, S.H. 2004. CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res.* 32: 327–331.
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J.B., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., DeWeese-Scott, C., Fong, J.H., Geer, L.Y., Geer, R.C., Gonzales, N.R., Gwadz, M., He, S., Hurwitz, D.I., Jackson, J.D., Ke, Z., Lanczycki, C.J., Liebert, C.A., Liu, C., Lu, F., Lu, S., Marchler, G.H., Mullokandov, M., Song, J.S., Tasneem, A., Thanki, N., Yamashita, R.A., Zhang, D., Zhang, N., Bryant, S.H. 2009. CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Res.* 37: 205–210.

- Margaria, P., Ciuffo, M., Pacifico, D., Turina, M. 2007. Evidence that the nonstructural protein of *Tomato spotted wilt virus* is the avirulence determinant in the interaction with resistant pepper carrying the *Tsw* gene. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20: 547–558.
- Martelli, G.P., Castellano, M.A., Laforteza, R. 1993. An ultrastructural study of fig mosaic. *Phytopathol. Mediterr.* 32: 33–43.
- Martínez-Turiño, S., Hernández, C. 2010. Identification and characterization of RNA-binding activity in the ORF1-encoded replicase protein of *Pelargonium* flower break virus. *J. Gen. Virol.* 91: 3075–3084.
- Maule, A. J. 2008. Plasmodesmata: structure, function and biogenesis. *Plant Biol.* 11: 680–686.
- McGavin, W.J., Mitchell, C., Cock, P.J.A., Wright, K.M., MacFarlane, S.A. 2012. Raspberry leaf blotch virus, a putative new member of the genus *Emaravirus*, encodes a novel genomic RNA. *J. Gen. Virol.* 93: 430–437.
- Mielke, N., Muehlbach, H.P. 2007. A novel, multipartite, negative-strand RNA virus is associated with the ringspot disease of European mountain ash (*Sorbus aucuparia* L.). *J. Gen. Virol.* 88: 1337–1346.
- Mielke, N., Mühlbach, H.P. 2012. Emaravirus: a novel genus of multipartite, negative strand RNA plant viruses. *Viruses* 4: 1515–1536.
- Minafra, A., Chiumenti, M., Martelli, G.P. 2012. Fig tree viruses in New Zealand. *J. Plant Pathol.* 94: 104.
- Müller, R., Poch, O., Delarue, M., Bishop, D.H.L. and Bouloy, M. 1994. Rift Valley fever virus L segment: correction of the sequence and possible functional role of newly identified regions conserved in RNA-dependent polymerases. *J. Gen. Virol.* 75: 1345–1352.
- Namba, S., Yamashita, S., Doi, Y., Yora, K. 1979. A virus member of the genus carlavirus found in fig leaves showing mosaic symptoms (abstract in Japanese). *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 45: 85.
- Nebenführ, A., Gallagher, L.A., Dunahay, T.G., Frohlick, J.A., Mazurkiewicz, A.M., Meehl, J.B., Staehelin, L.A. 1999. Stop-and-go movements of plant Golgi stacks are mediated by the acto-myosin system. *Plant Physiol.* 121: 1127–

1141.

- Nelson, B.K., Cai, X., Nebenführ, A. 2007. Multicolored set of *in vivo* organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants. *Plant J.* 51: 1126–1136.
- Niehl, A., Heinlein, M. 2011. Cellular pathways for viral transport through plasmodesmata. *Protoplasma* 248: 75–99.
- Nitta, H., Imada, J., Kano, T., Nakamoto, K., Ogasawara, S. 1995. Occurrence and cause of fig mosaic symptoms in Hiroshima Prefecture (in Japanese with English summary). *Bull. Hiroshima Pref. Agric. Res. Cent.* 62: 53–65.
- 新田浩通. 2001. 農山漁村文化協会編, 農業総覧 原色病虫害診断防除編. 第7巻 (追録 第35号 2005年発行分). pp 7–9. 農山漁村文化協会, 東京.
- 農林水産省. 2015. 平成24年産特産果樹生産動態等調査. http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/tokusan_kazyu/
- Oerke, E.C. 2006. Crop losses to pests. *J. Agric. Sci.* 144: 31–43.
- Oomen, R.J., Svèno-Carpentier, E., Ricodeau, N., Bournaud, C., Conèjèro, G., Paris, N., Berthomieu, P., Marquès, L. 2011. Plant defensin AhPDF1.1 is not secreted in leaves but it accumulates in intracellular compartments. *New Phytol.* 192: 140–150.
- Oparka, K.J., Prior, D.A.M., Crawford, J.W. 1994. Behaviour of plasma membrane, cortical ER and plasmodesmata during plasmolysis of onion epidermal cells. *Plant Cell Environ.* 17: 163–171.
- Otulak, K., Garbaczewska, G. 2011. Cell-to-cell movement of three genera (+) ss RNA plant virus. *Acta. Physiol. Plant* 33: 249–260.
- Patil, B.L., Kumar, P.L. 2015. Pigeonpea sterility mosaic virus: a legume-infecting Emaravirus from South Asia. *Mol. Plant Pathol.* 16: 775–786.
- Peremyslov, V.V., Morgun, E.A., Kurth, E.G., Makarova, K.S., Koonin, E.V., Dolja, V.V. 2013. Identification of myosin XI receptors in *Arabidopsis* defines a distinct class of transport vesicles. *Plant Cell* 25: 3022–3038.
- Peremyslov, V.V., Cole, R.A., Fowler, J.E., Dolja, V.V. 2015. Myosin-powered membrane compartment drives cytoplasmic streaming, cell expansion and

- plant development. PLoS One 10: e0139331.
- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. Nat. Methods 8: 785–786.
- Qiu, X.B., Shao, Y.M., Miao, S., Wang, L. 2006. The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. Cell Mol. Life Sci. 63: 2560–2570.
- Rajendran, K.S., Nagy, P.D. 2003. Characterization of the RNA-binding domains in the replicase proteins of tomato bushy stunt virus. J. Virol. 77: 9244–9258.
- Reisen, D., Hanson, M.R. 2007. Association of six YFP-myosin XI-tail fusions with mobile plant cell organelles. BMC Plant Biol. 7: 6.
- Ribeiro, D., Goldbach, R., Kormelink, R. 2009. Requirements for ER-arrest and sequential exit to the Golgi of tomato spotted wilt virus glycoproteins. Traffic 10: 664 – 672.
- Ribeiro, D., Jung, M., Moling, S., Borst, J.W., Goldbach, R., Kormelink, R. 2013. The cytosolic nucleoprotein of the plant-infecting bunyavirus tomato spotted wilt recruits endoplasmic reticulum-resident proteins to endoplasmic reticulum export sites. Plant Cell 25: 3602–3614.
- Roggero, P., Ciuffo, M., Vaira, A.M., Accotto, G.P., Masenga, V., Milne, R.G. 2000. An *Ophiovirus* isolated from lettuce with big-vein symptoms. Arch. Virol. 145: 2629–2642.
- Ruigrok, R.W., Crêpin, T., Kolakofsky, D. 2011. Nucleoproteins and nucleocapsids of negative-strand RNA viruses. Curr. Opin. Microbiol. 14: 504–510.
- Schoelz, J.E., Harries, P.A., Nelson, R.S. 2011. Intracellular transport of plant viruses: finding the door out of the cell. Mol. Plant 5: 813–831.
- 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.
- Senshu, H., Yamaji, Y., Minato, N., Shiraishi, T., Maejima, K., Hashimoto, M., Miura, C., Neriya, Y., Namba, S. 2011. A dual strategy for the suppression of

- host antiviral silencing: two distinct suppressors for viral replication and viral movement encoded by potato virus M. *J. Virol.* 85: 10269–10278.
- Serrano, L., Ramon, J., Segarra, J., Medina, V., Achón, M.A. 2004. New approach in the identification of the causal agent of fig mosaic disease. *Acta. Hort.* 657: 559–566.
- Shahmirzaie, M. Rakhshandehroo, F., Zamanizadeh, H.R., Elbeaino, T. 2012. Current status of fig mosaic disease in Iran. *J. Phytopathol.* 160: 324–330.
- Shibao, M., Tanaka, H. 1998. Effects of acaricide and fungicide application and optimum timing for control of the ficus mottle mite, *Aceria ficus Cotte* (in Japanese with English summary). *J. Acarol. Soc. Jpn.* 7: 107–113.
- Shimmen, T., Hamatani, M., Saito, S., Yokota, E., Mimura, T., Fusetani, N., Karaki, H. 1995. Roles of actin filaments in cytoplasmic streaming and organization of transvacuolar strands in root hair cells of *Hydrocharis*. *Protoplasma* 185: 188–193.
- Simon, A.E., Roossinck, M.J., Havelda, Z. 2004. Plant virus satellite and defective interfering RNAs: new paradigms for a new century. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42: 415–437.
- Skare, J.M., Wijkamp, I., Denham, I., Rezende, J.A., Kitajima, E.W., Park, J.W., Desvoyes, B., Rush, C.M., Michels, G., Scholthof, K.G., Scholthof, H.G. 2006. A new eriophyid mite-borne membrane-enveloped virus-like complex isolated from plants. *Virology* 347: 343–353.
- Soellick, T.R., Uhrig, J.F., Bucher, G.L., Kellmann, J.W., Schreier, P.H. 2000. The movement protein NSm of tomato spotted wilt tospovirus (TSWV): RNA binding, interaction with the TSWV N protein, and identification of interacting plant proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 2373–2378.
- Sparkes, I.A., Teanby, N.A., Hawes, C. 2008. Truncated myosin XI tail fusions inhibit peroxisome, Golgi, and mitochondrial movement in tobacco leaf epidermal cells: a genetic tool for the next generation. *J. Exp. Bot.* 59: 2499–2512.
- Sparkes, I., Runions, J., Hawes, C., Griffing, L. 2009. Movement and remodeling of the endoplasmic reticulum in nondividing cells of tobacco leaves. *Plant Cell* 21: 3937–3949.

- Sparkes, I. 2011. Recent advances in understanding plant myosin function: life in the fast lane. *Mol. Plant* 4:805–812.
- Staiger, C.J., Yuan, M., Valenta, R., Shaw, P.J., Warn, R.M., Lloyd, C.W. 1994. Microinjected profilin affects cytoplasmic streaming in plant cells by rapidly depolymerizing actin microfilaments. *Curr. Biol.* 4: 215–219.
- Sung, D.Y., Kaplan, F., Guy, C.L. 2001. Plant Hsp70 molecular chaperons: protein structure, gene family, expression and function. *Physiol. Plantarum* 113: 443–451.
- Takahashi, K., Nei, M. 2000. Efficiencies of fast algorithms of phylogenetic inference under the criteria of maximum parsimony, minimum evolution, and maximum likelihood when a large number of sequences are used. *Mol. Biol. Evol.* 17: 1251–1258.
- Takeuchi, M., Tada, M., Saito, C., Yashiroda, H., Nakano, A. 1998. Isolation of a tobacco cDNA encoding Sar1 GTPase and analysis of its dominant negative mutations in vesicular traffic using a yeast complementation system. *Plant Cell Physiol.* 39: 590–599.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731–2739.
- Tamura, K., Iwabuchi, K., Fukao, Y., Kondo, M., Okamoto, K., Ueda, H., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I. 2013. Myosin XI-i links the nuclear membrane to the cytoskeleton to control nuclear movement and shape in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 23:1 776–1781.
- Tatineni, S., McMechan, A.J., Wosula, E.N., Wegulo, S.N., Graybosch, R.A., French, R., Hein, G.L. 2014. An eriophyid mite-transmitted plant virus contains eight genomic RNA segments with unusual heterogeneity in the nucleocapsid protein. *J. Virol.* 88: 11834–11845.
- Tentchev, D., Verdin, E., Marchal, C., Jacquet, M., Aguilar, J.M., Moury, B. 2011. Evolution and structure of tomato spotted wilt virus populations: evidence of extensive reassortment and insights into emergence processes. *J. Gen. Virol.* 92: 961–973.

- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673–4680.
- Toriyama, S., Kimishima, T., Takahashi, M. 1997. The proteins encoded by rice grassy stunt virus RNA5 and RNA6 are only distantly related to the corresponding proteins of other members of the genus *Tenuivirus*. *J. Gen. Virol.* 78: 2355–2363.
- Ueda, H., Yokota, E., Kutsuna, N., Shimada, T., Tamura, K., Shimmen, T., Hasezawa, S., Dolja, V.V., Hara-Nishimura, I. 2010. Myosin-dependent endoplasmic reticulum motility and F-actin organization in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107: 6894–6899.
- Ueki, S., Citovsky, V. 2011. To gate, or not to gate: regulatory mechanisms for intercellular protein transport and virus movement in plants. *Mol. Plant* 4: 782–793.
- Vale, R.D. 2003. The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* 112: 467–480.
- Verchot-Lubicz, J., Goldstein, R.E. 2010. Cytoplasmic streaming enables the distribution of molecules and vesicles in large plant cells. *Protoplasma* 240: 99–107.
- Voigt, B., Timmers, A.C.J., Samaj, J., Müller, J., Baluska, F., Menzela, D. 2004. GFP-FABD2 fusion construct allows in vivo visualization of the dynamic actin cytoskeleton in all cells of *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiol.* 84: 595–608.
- Walia, J.J., Salem, N.M., Falk, B.W. 2009. Partial sequence and survey analysis identify a multipartite, negative-sense RNA virus associated with fig mosaic. *Plant Dis.* 93: 4–10.
- Wang, Q., Ma, X., Qian, S., Zhou, X., Sun, K., Chen, X., Zhou, X., Jackson, A.O., Li, Z. 2015. Rescue of a plant negative-strand RNA virus from cloned cDNA: insights into enveloped plant virus movement and morphogenesis. *PLoS Pathog.* 11: e1005223.
- 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 126K/183K protein heterodimer. *J. Virol.* 73: 2633–2640.
- Wei, T., Huang, T., McNeil, J., Laliberte, J.F., Hong, J., Nelson, R.S., Wang, A. 2010. Sequential recruitment of the endoplasmic reticulum and chloroplasts for plant potyvirus replication. *J. Virol.* 84: 799–809.
- Wei, T., Wang, A. 2008. Biogenesis of cytoplasmic membranous vesicles for plant potyvirus replication occurs at endoplasmic reticulum exit sites in a COPI- and COPII-dependent manner. *J. Virol.* 82:12252–12264.
- Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol Rev.* 51:221–271.
- Wolf, S., Deom, C.M., Beachy, R.N., Lucas, W.J. 1989. Movement protein of tobacco mosaic virus modifies plasmodesmatal size exclusion limit. *Science* 246: 377–379.
- Xiong, R., Wu, J., Zhou, Y., Zhou, X. 2008. Identification of a movement protein of the *Tenuivirus* rice stripe virus. *J. Virol.* 82: 12304–12311.
- Xiong, R., Wu, J., Zhou, Y., Zhou, X. 2009. Characterization and subcellular localization of an RNA silencing suppressor encoded by *Rice stripe tenuivirus*. *Virology* 387: 29–40.
- Yu, C., Karlin, D.G., Lu, Y., Wright, K., Chen, J., MacFarlane, S. 2013. Experimental and bioinformatic evidence that raspberry leaf blotch emaravirus P4 is a movement protein of the 30K superfamily. *J. Gen. Virol.* 94: 2117–2128.
- Yuan, Z., Chen, H., Chen, Q., Omura, T., Xie, L., Wu, Z., Wei, T. 2011. The early secretory pathway and an actin-myosin VIII motility system are required for plasmodesmatal localization of the NSvc4 protein of *Rice stripe virus*. *Virus Res.* 159: 62–68.
- Zhu, X., Zhao, Z., Burkholder, W.F., Gragerov, A., Ogata, C.M., Gottesman, M.E., Hendrickson, W.A. 1996. Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science* 272: 1606–1614.