

## 論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻  
平成 25 年度博士課程進学

氏名 石川一也  
指導教員名 難波成任

論文題目 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

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

アクト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出した。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。