

論文の内容の要旨

農学生命科学研究科 生産・環境生物学専攻
平成23年度博士課程進学
氏名 岡野 夕香里
指導教員名 東京大学大学院教授 難波 成任

論文題目 植物ウイルスの増殖制御機構とその病原性に関する研究

植物ウイルスは、植物にモザイク、壊死等の様々な病徴を伴う病気を引き起こし、農業生産に被害を及ぼしている。ウイルスが植物に病気を引き起こす能力、すなわち病原性は、感染に伴う植物の代謝系の変化や、防御応答反応等、ウイルスと植物のせめぎあいの結果として現れるものと考えられるが、そのメカニズムはほとんど分かっていない。これを解明することは、ウイルス—植物の複雑な相互作用を理解するだけでなく、ウイルスの防除にも繋がるものである。

本研究では、ウイルスの病原性にウイルス複製酵素 (**RdRp**) が関わることを明らかにし、ウイルスの増殖が病原性を決定する要因であることを示した。また、植物によるウイルスの増殖抑制機構 (**RNA サイレンシング**) に対抗するウイルス因子 (サプレッサー) が **RNA サイレンシング** を抑止することにより、ウイルスの増殖を促進し、病原性を強化していることを明らかにした。さらに、サプレッサーの **RNA サイレンシング** 抑制活性を利用して、植物における高効率なタンパク質発現系を構築した。

1. ウイルスの病原性に関わる複製酵素に関する解析

植物ウイルスの病原性に関わるウイルス因子については近年様々な知見が得られているが、複製酵素が重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。そこで、ポインセチアモザイクウイルス (PnMV) をモデルに、その複製酵素の病原性に関わる因子を解析した。PnMV は、*Tymovirus* 科の未帰属種に分類されるプラス一本鎖 RNA をゲノムに持つウイルスで、ポインセチアの葉に奇形やモザイクを生じる。

本研究ではポインセチアに病徴を呈する 2 株、無病徴の 2 株、計 4 株の PnMV 分離株 (JO1, JO2, JO4, JO5) を用いて実験を行った。これら JO 分離株の全塩基配列を決定した結果、いずれも、3'末端にポリ A 配列を持ち、このポリ A 配列を除くゲノム配列の全長は 6106 塩基であった。ゲノム上には、一つの長い ORF が存在し、約 220 kDa の単一のタンパク質をコードしていた。このタンパク質には、4 つの保存ドメイン [メチルトランスフェラーゼドメイン、パピイン様プロテアーゼドメイン (PRO)、ヘリカーゼドメイン (HEL)、レプリカーゼドメイン (REP)] から成る RdRp および外被タンパク質 (CP) の保存配列が存在し、同一フレーム上に RdRp と CP が融合タンパク質としてコードされていた。

病原性に関わる因子を解析するため、これら JO 株のゲノムにコードされる単一タンパク質のアミノ酸配列について比較解析を行ったところ、RdRp の HEL-REP ドメイン間の 1216 番目のアミノ酸に、病徴型と相関性のある多型が見出された。このドメイン間領域は *Tymovirus* 科 *Tymovirus* 属ウイルスにおいて自己切断が生じる共通領域であり、9 アミノ酸の配列を PRO が認識することで切断が生じる。4 分離株の全てにおいて切断に重要なアミノ酸が保存されていたことから、PnMV でもこの部位で自己切断するものと考えられた。病徴型と相関のある 1216 番目のアミノ酸は、この推定切断部位より 2 アミノ酸下流に位置していた。このことは、1216 番目のアミノ酸が HEL-REP 間における切断効率、もしくは、切断によって生じる REP タンパク質の性質に影響を与え、ウイルス複製効率に影響を与え、病原性に関わっているものと考えられた。

2. 植物によるウイルスの増殖抑制機構を抑制するサプレッサーの解析

植物では、遺伝子発現調節機構である RNA サイレンシングがウイルス抵抗性にも関わる。ウイルスが植物細胞内に侵入すると、ウイルス RNA から小分子 RNA が生成され、相補的なウイルス RNA を切断することにより、ウイルスの増殖抑制機構として働く。ウイルスはその対抗手段として、自身のゲノムに RNA サイレンシング抑制タンパク質 (サプレッサー) をコードしている。サプレッサーに

変異を入れると、ウイルス蓄積量の減少や感染性の喪失が起きるため、サプレッサーによる RNA サイレンシングの抑止は、植物によるウイルス増殖抑制機構を抑止する重要な機能であると考えられる。また、サプレッサーは植物内在性の RNA サイレンシング経路を攪乱し、形態異常などの生育不良を誘導する。従って、サプレッサーはウイルスの病原性を制御する因子でもあると考えられ、植物ウイルスの病原性発現機構の解明においてサプレッサーの機能解析は重要である。

Plantago asiatica mosaic virus (PIAMV) は、*Alphaflexivirus* 科 *Potexvirus* 属に属し、ゲノムは約 6.1 kb のプラス一本鎖 RNA である。ゲノム上には 5 つの ORF が存在し、5'側から順に、RdRp、triple gene block protein と呼ばれる 3 つの移行タンパク質 (TGBp1, -2, -3)、CP をコードする。このうち TGBp1 がサプレッサー活性を持つ。RdRp はゲノム RNA から翻訳されるが、他のタンパク質は、各 ORF の上流のプロモーターによって転写調節されるサブゲノム RNA を介して翻訳される。*Potexvirus* 属の TGBp1 はサプレッサーとして様々な解析に用いられているにも関わらず、詳細な機能メカニズムは不明である。本研究では、PIAMV の TGBp1 を用いて病原性の制御に関わる機能解析を行った。

まず、TGBp1 形質転換シロイヌナズナを作出したところ、植物の内在性の RNA サイレンシング経路の 1 つである *trans-acting* siRNA (tasiRNA) 経路に関わる因子の欠損変異体に類似した形態異常が観察されたため、tasiRNA 合成経路の解析を行った。tasiRNA は以下のような経路を経て合成される。すなわち、ノンコーディングな TAS 遺伝子領域から転写された前駆体 RNA が miRNA/AGO 複合体によって切断され、切断断片を鋳型に二本鎖 RNA が合成される。次いで、二本鎖 RNA から tasiRNA が切り出され、tasiRNA と相補的な配列を有するターゲット mRNA が切断される。ノーザンブロット解析、大規模シーケンス解析等により TGBp1 形質転換体では tasiRNA 蓄積量が大幅に減少しており、tasiRNA のターゲット mRNA 蓄積量が増加していることを示した。一方で、5' RACE PCR 等により TAS 前駆体 RNA の切断は正常に起こっていることを明らかにした。また、RNase protection assay 等により二本鎖 RNA は検出されないことを示した。以上より、TGBp1 は tasiRNA 経路中の二本鎖 RNA 合成の段階を阻害することが示された。

二本鎖 RNA の合成には SGS3、RDR6 が関与するため、免疫沈降法を行ったところ、TGBp1 は両者と相互作用することが示された。さらに、ウイルス感染における TGBp1 の機能を解析するため、ウイルス接種試験を行ったところ、TGBp1 形質転換体では野生型植物に比べてウイルス蓄積量が大きく増加した。このことから、TGBp1 はウイルスに対する RNA サイレンシングを抑止することにより、ウイルスの増殖を促進することが示唆された。

以上より、PIAMV の TGBp1 は、そのサプレッサー能により、植物内在性の

tasiRNA 経路を攪乱し形態異常を誘導するとともに、ウイルスに対する RNA サイレncing を抑止することによりウイルス増殖を促進し、PIAMV の病原性に関与していることが示唆された。

3. 植物のウイルス増殖抑制機構のサプレッサーを利用したタンパク質高発現系の構築

植物ウイルスベクターは、植物の遺伝子を過剰発現し、機能を解析するツールとして有用である。potato virus X (PVX) ベクターが植物ウイルスベクターとして有名であるが、導入遺伝子の発現量や安定性に課題がある。本研究では、PVX と比べて強いサプレッサーを持つ PIAMV を用いて、効率的なタンパク質発現ウイルスベクターの構築を試みた。

まず、PIAMV の CP のサブゲノム RNA のプロモーター領域を重複させ、下流に GFP 遺伝子を挿入する方法を試みた。しかし、接種の結果、GFP 蛍光は見られず、ベクターから GFP 遺伝子の脱落が確認された。GFP が発現しなかった原因として、GFP 遺伝子の開始コドン近傍の塩基配列がタンパク質発現に適さない配列であること、および重複させた配列が相同組み換えを引き起こし、GFP 遺伝子の脱落を誘導していることが考えられた。そこで、CP 遺伝子の開始コドンを利用して GFP 遺伝子を発現する改変を施し、さらに配列重複を避けるため、口蹄疫ウイルスが持つ自己切断配列である 2A 配列を挟んで、GFP と CP を融合タンパク質として翻訳させ、CP の N 末端領域には同義置換変異を導入した。その結果、植物体において安定的に目的タンパク質を発現させることができた。続いて、既報の PVX ベクターと GFP 発現パターンを比較したところ、PIAMV ベクターの方が長期間 GFP を発現した。さらに、GFP 形質転換植物への接種の結果、PIAMV ベクターの方が RNA サイレncing の誘導能が低いことが示された。従って、PIAMV ベクターによる目的タンパク質の安定的な発現は、PIAMV の TGBp1 の持つ強いサプレッサー活性に起因しており、これによりウイルス増殖が促進されていることが示唆された。

以上から、ウイルスの病原性は、各ウイルスタンパク質が植物内在性の代謝経路に阻害的な影響を与え、それが積み重なることによって決定されると考えられる。さらに、ウイルス増殖量も、ウイルスタンパク質の発現量を制御することにより、病原性発現の二次的な要因となっていると考えられる。