

# 論文内容の要旨

## 論文題目 ラッカセイわい化ウイルスの RNA サイレンシング サブレッサータンパク質に関する研究

氏名 根津 修

植物ウイルスは、感染した植物にわい化症状等の様々な病気を起こし、しばしば農業上深刻な被害をもたらす。多くの植物ウイルスは数千～数万塩基の RNA をゲノムに持ち、コードする遺伝子も少ないが、自身の遺伝子産物と植物の遺伝子産物を利用して感染細胞で増殖し、細胞間移行の後、篩部を経由して植物体全身へ広がる。一方、植物はウイルス感染に対し種々の防御応答を示して抵抗する。その一種である RNA サイレンシングは、1 本鎖 RNA ウィルスゲノムの複製中間体である 2 本鎖 RNA を引き金として 21-24 塩基の短い RNA (siRNA) を生成し、その RNA と相補配列を持つ RNA を分解する機構である。多くの植物ウイルスは、サイレンシングを抑制するサブレッサータンパク質を進化の過程で獲得してきたことが近年明らかになってきた。

本研究で用いたラッカセイわい化ウイルス (*Peanut stunt virus*; PSV) はマメ科植物を中心に 70 種以上の植物に感染する重要病原ウイルスである。PSV はプロモウイルス科ククモウイルス属に属し、RNA 1, 2, および 3 の 3 本の 1 本鎖 RNA をゲノムに持つ(図 1)。同属のキュウリモザイクウイルス (*Cucumber mosaic virus*; CMV) と同様に、RNA 1, 2 には複製に参与する 1a タンパク質(1a)と 2a タンパク質(2a)が、RNA 3 には細胞間移行および全身移行に参与する 3a タンパク質(3a)がコードされる。サブゲノム RNA 4 からは粒子形成、全身移行および病徴発現に参与する外被タンパク質 (coat

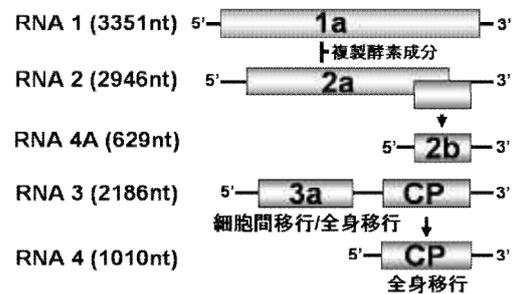


図 1 PSV のゲノム構造

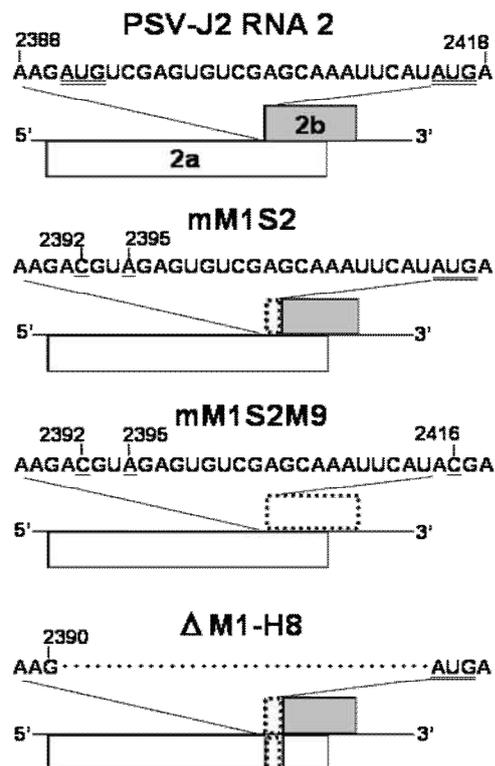
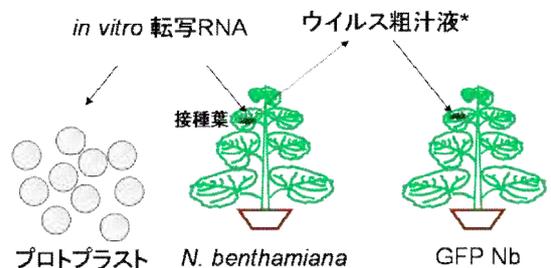


図 2 2b 欠失変異 RNA 2 の構造

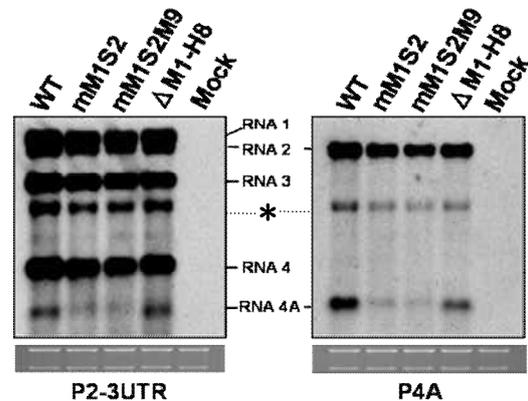
protein; CP)が翻訳される。また、サブゲノム RNA 4A に 2b タンパク質(2b)をコードする。CMV の 2b はウイルスの全身移行や病徴発現に関与し、RNA サイレンシングを抑制するサプレッサー能を持つ。しかし、PSV の 2b は、読み枠(ORF)は存在するものの、発現解析、機能解析の報告は皆無であった。

そこで本研究では、PSV の日本系統(PSV-J2)のゲノム RNA の完全長 cDNA からの *in vitro* 転写系を用いて 2b 欠失変異ウイルスを作製しプロトプラストおよび植物での感染実験を行い、さらに 2b の一過的発現系を用いて、PSV 2b のウイルス感染における役割とサプレッサー能を明らかにすることを試みた。

PSV-J2 のゲノム RNA の 2b ORF に、PSV-J2 の RNA 2 の完全長 cDNA を改変して 3 種類の欠失変異を導入した。すなわち、2b ORF の開始メチオニンコドン(Met)がスレオニンコドン(Thr)になるように塩基置換(すなわち AUG を ACG に)、その直下流のセリンコドンが終止コドンになるように塩基置換(すなわち UCG を UAG に)した mM1S2、および mM1S2 の変異に加えて 9 番目の Met を Thr にした mM1S2M9 を作製した(図 2)。さらに、開始コドンから第 8 番目のアミノ酸までの配列を欠失させた M1-H8 を作製した。これら cDNA の *in vitro* 転写 RNA をそれぞれ、野生型 PSV-J2 RNA 1 および 3 の完全長 cDNA の *in vitro* 転写 RNA と共に、タバコ培養細胞 BY-2 のプロトプラストに接種した(図 3)。接種 24 時間後に全 RNA を抽出し、PSV ゲノムおよびサブゲノムの共通配列の相補鎖である P2-3UTR リボプローブと、RNA 2 と



\* : *in vitro* 転写 RNA を接種した葉をすりつぶして作製する  
**図 3 接種物の種類とその接種先**



\* =非特異反応もしくは分解されたウイルス RNA

**図 4 プロトプラストにおけるウイルス RNA の検出**

RNA 4A の共通配列の相補鎖である P4A リボプローブをそれぞれ用いてノーザン解析を行った。その結果、いずれの 2b 欠失変異ウイルスの RNA 1~4 も野生型 PSV-J2 (WT)の RNA 1~4 と同等の蓄積を示した(図 4 左)。また、2b 欠失変異ウイルスでは少ないながらも RNA 4A が検出された(図 4 右)。さらに、ウェスタン解析により 2b の検出を行った結果、WT 接種プロトプラストからのみ 2b の蓄積が認められた。これらの結果から、PSV-J2 の 2b は、単一細胞におけるウイルスの複製には必須でないことが示された。

次に WT および 2b 欠失変異完全長 cDNA の *in vitro* 転写 RNA を *in vitro* 転写 RNA 1 および 3 と共にタバコ野生種 *Nicotiana benthamiana* (Nb)に接種した(図 3)。接種後 14 日には、WT を接種した個体はわい化やモザイク症状を示したのに対し、2b 欠失変異 RNA を接種した個体は無病徴だった。そこで、接種葉とその上葉におけるウイルス

RNA の蓄積を調べるため、接種葉から第4上葉(接種葉から4枚上の葉)までの全ての葉から RNA を抽出してドットプロットし、P2-3UTR プローブにより検出した。その結果、WT は接種葉から第4上葉までの全ての葉で蓄積していたのに対し、mM1S2 と M1-H8

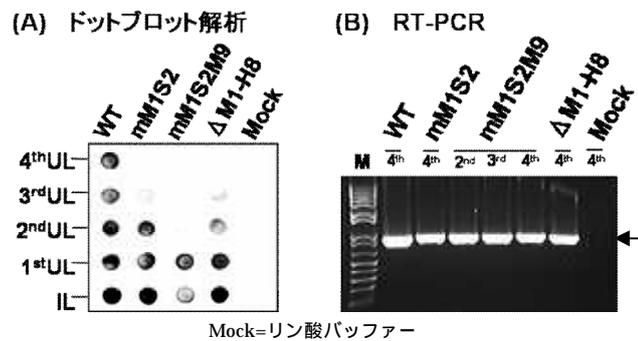
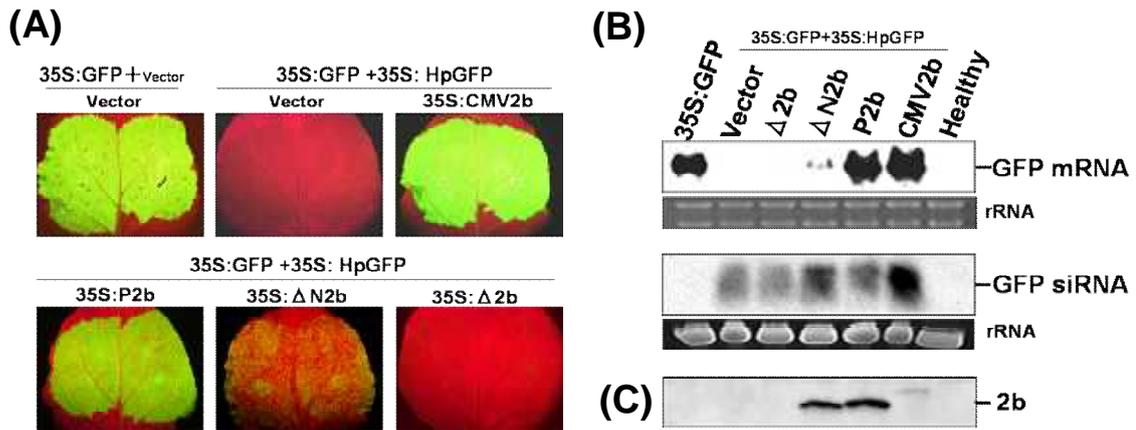


図5 感染葉におけるウイルスゲノムの検出

は接種葉から第3上葉まで、mM1S2M9 は接種葉と第1上葉でのみ検出された(図5A)。次に、より感度の高いRT-PCRでウイルスRNAの検出を行った結果、2b欠失変異ウイルスRNAは全ての葉で検出された(図5B)。よって、2b欠失変異ウイルスは植物の全身に広がるがその蓄積量はWTより少ないことが示された。また、接種葉と第2上葉のサンプルからウェスタン解析で2bを検出した結果、WT感染葉でのみ2bの蓄積が確認された。さらに、ウイルスRNAに対するサイレンシング誘導を調べるため、接種葉と第2上葉から抽出した低分子RNAを用いてsiRNAの検出を行った結果、全ての感染葉から検出された。よって、WTや2b欠失変異ウイルスが感染した植物では接種葉でも上葉でもサイレンシングが誘導されたことが示唆された。以上より、PSV-J2の2bはウイルスの全身移行には必須ではないが、接種葉や上葉におけるウイルス蓄積に関与することが示された。また、WTや2b欠失変異ウイルス感染によりサイレンシングが誘導されたことから、WTが植物体内で蓄積できるのは、2bがサプレッサーとして機能しているためであると推察された。

そこで、35Sプロモーター下でGFP、ヘアピンGFP、2bのmRNAをそれぞれ植物で一過的に発現するプラスミド35S:GFP、35S:HpGFP、35S:P2bを形質転換したアグロバクテリウムを混合してNb展開葉に接種するアグロインフィルトレーション法によって2bのサプレッサー能を解析した。また完全長の2bに換えて、mM1S2M9タイプの35S: 2b、2bのN末端8アミノ酸配列を欠失した35S: N2bも用いた。接種後3日目にUV下で観察した結果、35S:GFP+35S:HpGFPでは緑色蛍光は見られず、GFP siRNAが検出され、GFP mRNAの蓄積が見られなかったため、サイレンシングが誘導されたことが示された。一方、35S:GFP+35S:HpGFPと共に35S:P2bもしくは35S:CMV2bを接種したものではsiRNAが検出されたが、GFP mRNAが蓄積し顕著な緑色蛍光も見られ、サイレンシングが抑制されたことが示された。また、35S: N2bを共に接種した組織では弱い緑色蛍光が見られ、GFP mRNAも検出されたことから、2bほどではないがサイレンシングが抑制されたことが示された(図6A, B)。35S: 2bでは、35S:GFP+35S:HpGFPと同様の結果となった。また、ウェスタン解析により、35S:P2bと35S: N2bを接種した組織から2bタンパク質が検出された(図6C)。以上より、PSV 2bはサプレッサー能を持つことが証明され、さらにN末端の欠失によりサプレッサー能が低下することが示唆された。



(A) UV 下での蛍光観察結果  
 (B) ノーザン解析による GFP mRNA および GFP siRNA の検出  
 (C) ウェスタン解析による 2b の検出

図 6 2b のサブプレッサー能解析

植物では局所的にサイレンシングを誘導するとサイレンシングのシグナルが全身に伝わり、やがて全身でサイレンシングが誘導されることが知られる。CMV 2b ではサイレンシングシグナルの全身移行を阻害する機能が報告されており、PSV-J2 の 2b がシグナルの全身移行を阻害するか検討した。すなわち、GFP を発現する Nb (GFP-Nb) に 35S:HpGFP をアグロインフィルトレーションし、UV 下で緑色蛍光が見られなくなった GFP-Nb に、WT および 2b の N 末端欠失変異ウイルス (PSV-ΔN2b) を接種した。接種後 21 日目に UV 下で観察した結果、WT を接種した個体の新葉でのみ緑色蛍光の回復が見られ、ノーザン解析により GFP mRNA の蓄積が認められた (表 1)。新葉での緑色蛍光の回復は新葉へのシグナル移行が阻害された結果であり、PSV の 2b はサイレンシングシグナルの全身移行を阻害したことが示唆された。また、N 末端 8 アミノ酸の欠失した 2b はこの阻害機能を持たないことが示唆された。

表 1 GFP Nb での解析結果

接種ウイルス	GFP mRNA の検出 (括弧内は緑色蛍光の有無)	
	接種葉	新葉
WT	— (—)	+ (+)
PSV-ΔN2b	— (—)	— (—)

以上、本研究では PSV 2b の発現および機能解析を初めて行い、PSV の 2b はサイレンシングのサブプレッサー能を持ち、N 末端 8 アミノ酸欠失によりサブプレッサー能が低下することが示唆された。この 2b が欠失すると単一細胞での複製には影響しないが、感染葉でのウイルス蓄積が減少するため、2b はサブプレッサー能によってウイルス蓄積を促進すると考えられた。また、ウイルス蓄積が低下した植物では病徴が現れなかったことから、ウイルス蓄積の低下が病原性の低下に繋がったことが推測された。本研究の成果は、植物ウイルスのサブプレッサーの研究への重要な知見であるとともに、PSV の防除へとつながることが期待される。