

論文の内容の要旨

生産・環境生物学 専攻
平成 21 年度博士課程 進学
氏 名 千秋 博子
指導教員名 難波 成任

論文題目 *Flexivirus* 科ウイルスの RNA サイレンシングサプレッサーの生物学的研究

植物ウイルスが作物に感染すると、葉や花器、果実などの器官に様々な病徴を呈し、品質低下や収量減少等、農業生産上甚大な被害をもたらす。しかし、植物ウイルスは増殖・感染過程の大半を宿主の機構に依存するという特性から、薬剤による化学的防除が困難である。したがって、植物ウイルス病の防除には、植物自身が備えているウイルス防御機構の利用が有効と考えられる。

真核生物には、RNA サイレンシングと呼ばれる小分子 RNA を介した遺伝子発現調節機構が広く保存されている。RNA サイレンシングは植物において重要なウイルス防御機構として働く。ウイルスが植物細胞内に侵入すると、RNA サイレンシング機構によってウイルスの複製中間体やゲノム RNA の高次構造部から小分子 RNA (siRNA) が生成され、相補的な配列をもつウイルス RNA が切断される。また、RNA サイレンシングが誘導された初期細胞からはウイルスに先立って siRNA がシグナルとして移行し、植物体全身に RNA サイレンシングを伝達して非感染細胞をウイルスから守る。

一方で、ウイルスは、宿主植物の RNA サイレンシングに対抗する手段として RNA サイレンシング抑制タンパク質 (サプレッサー) をゲノムにコードしている。サプレッサーの配列に変異を導入すると、ウイルス蓄積量の減少や病徴の低減、感染性の喪失が起きることが報告されているため、サプレッサーによる RNA サイレンシング抑制はウイルスが感染を成立させるにあたって重要なプロセスだと考えられる。また、サプレッサーは植物の遺伝子発現を制御する RNA サイレンシング経路も阻害し、形態異常などの生育不良を引き起こす。したがって、植物ウイルスの感染機構や病徴発現のメカニズムの解明、ひいてはウイルス防除法の開発において、サプレッサーの解析が重要となる。

そこで、本研究では、植物ウイルスの 70%以上を占めるプラス 1 本鎖 RNA ウイルスの一群である

Flexivirus 科のウイルスについて、サブプレッサーの同定と機能解析を行った。

1. *Potexvirus* 属ウイルスの RNA サイレンシング抑制能の比較解析

これまで、ウイルスは感染を成立させるために一様に宿主の RNA サイレンシングを抑制すると考えられており、ウイルス間の RNA サイレンシング抑制能の違いに着目した解析は無かった。しかし、ウイルスの病原性や宿主範囲は多様であることを考慮すると、RNA サイレンシング抑制能の強さもウイルスによって異なる可能性がある。そこで、草本、木本の幅広い植物種を宿主とする多様なウイルスを含む *Flexivirus* 科 *Potexvirus* 属の複数種のウイルスを用いて、RNA サイレンシング抑制能の比較解析を行った。まず、各ウイルス感染時の RNA サイレンシング抑制能を解析した。GFP 遺伝子形質転換 *Nicotiana benthamiana* に GFP 遺伝子の逆位反復配列を導入し、GFP 遺伝子に対する RNA サイレンシングを植物体全身に誘導した。そこに、各ウイルス (ジャガイモ X ウイルス; PVX、オオバコモザイクウイルス; PIAMV、アスパラガスウイルス 3; AV3、シロクロバモザイクウイルス; WCIMV) を接種し、ウイルス感染によって RNA サイレンシングが抑制されるかを GFP 蛍光の回復を指標として解析した。その結果、PIAMV と WCIMV は RNA サイレンシングを高レベルで抑制したが、PVX は抑制の程度が低かった。一方、AV3 は顕著な抑制能を示さなかった。

次に、ウイルス感染時に RNA サイレンシングの抑制能の差異を引き起こしているウイルス因子の解析を行った。PVX ではトリプルジーンブロックタンパク質 1 (TGBp1) がサブプレッサーとして機能するという報告があるため、他の *Potexvirus* 属ウイルスの TGBp1 についても RNA サイレンシング抑制能を調べた。解析は、*N. benthamiana* 展開葉上で GFP 遺伝子と TGBp1 遺伝子を一過的に共発現させ、GFP 蛍光強度によって RNA サイレンシング抑制能を評価する“一過的発現アッセイ”によって行った。解析の結果、PIAMV の TGBp1 が最も強く、次いで WCIMV の TGBp1 が強い抑制能を示した。PVX の TGBp1 は抑制能は確認されたが、PIAMV、WCIMV と比較すると極めて弱かった。AV3 の TGBp1 は、抑制能はほとんどみられなかった。さらに、RNA サイレンシング誘導の指標である siRNA のノーザンブロット解析を行った結果、RNA サイレンシング抑制能の強い TGBp1 ほど siRNA の蓄積量が減少していた。以上の結果から、TGBp1 は複数の *Potexvirus* 属ウイルスにおいてサブプレッサーとして機能するが、その抑制能には顕著な差があることが示された。さらに、TGBp1 単独発現時とウイルス感染時の抑制能の差異に相関があることから、*Potexvirus* 属ウイルスが感染時に示した RNA サイレンシング抑制能の差異は、TGBp1 に起因するものであることが明らかになった。これまで近縁なウイルスにコードされる相同タンパク質がサブプレッサーとして機能する報告は多数あったが、本研究から同属ウイルスにコードされるサブプレッサーであってもその RNA サイレンシング抑制能の強さは多様であることが示唆された。

2. PIAMV の TGBp1 の RNA サイレンシング抑制メカニズムの解析

Potexvirus 属ウイルスの TGBp1 は *Tombusvirus* 属ウイルスの p19 や *Potyvirus* 属ウイルスの helper-component proteinase (HC-Pro) と同様に主要なサブ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、その詳細な作用機作は解明されていない。前項の結果から PIAMV の TGBp1 がこれまで主に解析に用いられてきた PVX の TGBp1 よりも強い RNA サイレンシング抑制能を示したため、

PIAMV の TGBp1 を用いて RNA サイレンシング抑制メカニズムを解析した。

植物の RNA サイレンシングに関する解析は主にシロイヌナズナで進められていることから、TGBp1 形質転換シロイヌナズナを作出した。その結果、TGBp1 形質転換体は植物の RNA サイレンシング経路の 1 つである trans-acting siRNA (tasiRNA) 経路に関与する因子の欠損変異体に類似した、ロゼット葉の葉縁が下側 (背軸側) に巻く表現型を示した。したがって、TGBp1 は tasiRNA 経路を阻害していると考えられた。tasiRNA 経路は、(1) ゲノムから転写された前駆体 RNA が miRNA (microRNA) / AGO (Argonaute) タンパク質複合体によって切断される、(2) 切断断片を鋳型として、2 本鎖 RNA が合成される、(3) 2 本鎖 RNA から tasiRNA が切り出される、(4) tasiRNA と相補的な配列をもつターゲット mRNA が切断される、の 4 つのステップから成る。ノーザンブロット、5' RACE PCR、およびリアルタイム RT-PCR による解析の結果、TGBp1 形質転換体では miRNA 蓄積量に大きな変動はなく、前駆体 RNA の切断も正常に起こっているが、tasiRNA 蓄積量が大幅に減少しており、さらに、tasiRNA のターゲット mRNA 蓄積量が増加していた。以上の結果から、TGBp1 は tasiRNA 経路のうち、(2) もしくは (3) の段階を阻害していると考えられた。そこで、TGBp1 形質転換体において 2 本鎖 RNA が合成されているかを解析したところ、tasiRNA 生成の由来となる 2 本鎖 RNA が検出されなかった。したがって、TGBp1 は (2) tasiRNA 経路中の 2 本鎖 RNA 合成の段階を阻害していることが明らかになった。

tasiRNA 経路における 2 本鎖 RNA の合成には SGS3、RDR6 の 2 つの因子が関与することが明らかにされている。そこで、TGBp1 とこれらの因子との相互作用を免疫沈降法および bi-molecular fluorescent complementation (BiFC) 法によって解析した。これらの解析の結果、TGBp1 は SGS3、RDR6 の両者と相互作用することが明らかになった。また、YFP を付加した SGS3 (SGS3-YFP) と CFP を付加した TGBp1 (TGBp1-CFP) を *N. benthamiana* 展開葉上で発現させ、局在を観察した。その結果、SGS3-YFP 単独発現時には細胞質に点在する顆粒状の構造が観察されたが、TGBp1-CFP との共発現時には SGS3-YFP の顆粒構造が凝集し、TGBp1-CFP が SGS3-YFP を包み込むように共局在していた。RDR6 についても同様の局在解析を試みたが、蛍光を検出することができなかった。

さらに、PVX では TGBp1 同士が結合し、多量体を形成することが報告されていることから、PIAMV の TGBp1 が多量体を形成するかを調べた。ウェスタンブロット解析の結果、細胞質の可溶性タンパク質が含まれる可溶性画分から TGBp1 の 2 量体、3 量体が検出された。

以上の結果から、TGBp1 は、SGS3 および RDR6 と相互作用すること、SGS3 を凝集させること、ホモ多量体を形成することが明らかになった。これらの特徴は、RNA サイレンシング抑制能を欠失した TGBp1 変異体ではみられなかった。したがって、TGBp1 による RNA サイレンシング抑制のメカニズムとして、TGBp1 は細胞質内に顆粒構造をとって点在する SGS3 および RDR6 と相互作用し、さらに TGBp1 同士の結合力によって引き合うことで凝集体を形成することが示唆された。植物プラス 1 本鎖 RNA ウイルスでは、SGS3 または RDR6 をターゲットとするサプレッサーは報告されていないため、本研究が初の知見となる。

3. PVM のサプレッサーの同定および機能解析

Carlavirus 属は *Flexivirus* 科に分類されるウイルス属であり、本属では未だサプレッサーが同定されていない。しかし興味深いことに、*Carlavirus* 属のウイルスは、同じく *Flexivirus* 科に分類される

Potexvirus 属のウイルスのサブプレッサー TGBp1 と *Vitivirus* 属のウイルスのサブプレッサー cysteine rich protein (CRP) に相同なタンパク質の両方をゲノムにコードしている。そこで、*Flexivirus* 科ウイルスがコードするサブプレッサーの機能とその進化を解析することを目的として、本邦で単離されたジャガイモ M ウイルス (PVM、*Carlavirus* 属) のサブプレッサーの同定を試みた。まず、PVM の TGBp1 と CRP について一過的発現アッセイを行った結果、TGBp1 発現部位では RNA サイレンシングが抑制されなかったが、CRP 発現部位では RNA サイレンシングが抑制された。さらにこれらのタンパク質が、RNA サイレンシングが初期細胞から全身に拡がる段階を阻害するかを解析するため、GFP 遺伝子形質転換 *N. benthamiana* に GFP 遺伝子と TGBp1 または CRP 遺伝子を共導入し、上葉で RNA サイレンシングが誘導されるかを調べた。その結果、TGBp1、CRP のいずれを導入した植物体でも、上葉に RNA サイレンシングは誘導されなかったことから、両タンパク質が RNA サイレンシングの全身拡大を阻害することが示された。したがって、PVM の TGBp1 は RNA サイレンシングの拡大の段階のみを抑制するのに対して、CRP はトリガー (GFP 遺伝子) が導入された初期細胞での RNA サイレンシングとその拡大の段階の両方を抑制することが明らかになった。

次に、実際のウイルス感染における TGBp1 と CRP の影響を調べた。まず、ウイルス複製への影響を調べるために、TGBp1 または CRP を挿入したウイルスベクターを作製し、タバコプロトプラストに接種した。その結果、CRP を挿入した場合はウイルス蓄積量の増加がみられたが、TGBp1 を挿入した場合はウイルス蓄積量に変化はみられなかった。次に、TGBp1 と CRP のウイルス細胞間移行への影響を調べた。サブプレッサーを欠失したために細胞間移行能も欠失した変異ウイルスに、TGBp1 または CRP をトランスに共発現させると、いずれを発現させた場合も変異ウイルスの細胞間移行能が回復した。したがって、TGBp1 はウイルスの細胞間移行のみを促進するのに対して、CRP は単一細胞レベルでウイルス RNA の蓄積量を増加させ、細胞間移行も促進することが明らかになった。

以上の結果から、PVM は機能の異なる 2 つのサブプレッサー (TGBp1、CRP) をコードしており、感染過程の 2 つの段階 (複製、細胞間移行) で宿主の RNA サイレンシングを阻止するように使い分けられていることが示唆された。

以上を要するに、本研究では *Flexivirus* 科ウイルスを用いて植物の主要なウイルス防御機構である RNA サイレンシングに着目した詳細な解析を行い、植物ウイルスは多様な機能をもつサブプレッサーによってウイルス感染の様々な段階において宿主の RNA サイレンシングを抑制し、感染を成立させていることを明らかにした。このようなサブプレッサーの多様性はウイルスが宿主の防御機構に対抗するために、多元的な抑制機構を発達させてきたことを示唆しており、RNA サイレンシングを介したウイルス-植物間相互作用の一端を解明する成果である。また、新たな機能を持つサブプレッサーの同定により、RNA サイレンシングの基礎的研究への貢献が期待されるとともに、RNA サイレンシングを利用したウイルス防除戦略への貢献が期待される。