会 長 講 演

植物 RNA ウイルスの複製機構
—現状と展望—[†]

奥野 哲郎*

OKUNO, T.*: Replication mechanisms of plant RNA viruses —Current understanding and perspective—

ウイルスは、ヒトや家畜、作物に様々な病気を引き起こす重要な病原体である。しかし、動物ウイルス病の一部を除き、ウイルス感染を効率良く防ぐ手段を我々は持ち合わせていない。重要な作物の減収を少しでも抑えるために、育種学的な手法によりウイルス抵抗性遺伝子を導入した作物が作出され利用されているが、その数は限られている。ウイルス病を効率良く防除する手段の開発が遅れている原因の一つとして、ウイルス複製の分子機構、特にウイルスが利用する宿主因子に関する知見が乏しいことが挙げられる。

プラス鎖 RNA ウイルスは、メッセンジャーセンスの一本鎖 RNA をゲノムとして持つウイルスである。全てのウイルスをゲノムの種類により分類すると 7 種に分けられるが、プラス鎖 RNA ウイルスは最大のグループを構成する。プラス鎖 RNA ウイルスのゲノム RNA は宿主細胞に侵入後、まず、mRNA として機能し、ウイルスの複製に必要な RNA 依存 RNA ポリメラーゼ (RdRP) や複製補助タンパク質を翻訳する。その後、これらのウイルス複製タンパク質は、ウイルス RNA をオルガネラ膜へリクルートし、宿主タンパク質とともに RNA 複製複合体を形成して RNA 合成を行う (den Boon *et al.*, 2010; Nagy and Pogany, 2012)。近年の研究から、ウイルス複製タンパク質は、RNA 複製の場であるオルガネラ膜を改変、再構成するなど、様々な役割を担っていることが明らかになってきた。ここでは、我々がモデルウイルスとして用いている *Red clover necrotic mosaic virus* (RCNMV) の研究結果を参照しながら、ウイルス RNA の翻訳・複製の分子機構について概説する。

1. *Red clover necrotic mosaic virus*

RCNMV はトムブスウイルス科ダイアンソウイルス属に分類されるプラス鎖 RNA ウイルスである。本属には RCNMV の他に、タイプ種である *Carnation ringspot virus* および *Sweet clover necrotic mosaic virus* が分類される (Hiruki, 1987)。トムブスウイルス科の他属のウイルスは一分子の RNA をゲノムとして持つが、RCNMV をはじめとするダイアンソウイルスは RNA1 と RNA2 の二分子をゲノムとして持つ。RCNMV RNA1 は RdRP モチーフを持つ分子量 88 kDa の RNA 複製酵素タンパク質 (p88) と分子量 27 kDa の複製補助タンパク質 (p27) をコードしている。また、RNA1 はサブゲノム RNA (CPsgRNA) から翻訳される分子量 35 kDa の外被タンパク質 (CP) をコードしている。CPsgRNA の転写には RNA1 と RNA2 の分子間相互作用が必要である (Sit *et al.*, 1998)。RNA2 はウイルスの細胞間移行に必要な移行タンパク質 (MP) をコードしている (Xiong *et al.*, 1993)。

2. RCNMV 複製酵素タンパク質の翻訳

トムブスウイルス科ヤルテオウイルス科に含まれる多くの植物 RNA ウイルスのゲノム RNA には、真核生物の翻訳に必須な 5' 端のキャップ構造と 3' 端のポリ A 配列が存在しない。その代わり、これらのウイルスは、ゲノム RNA の 3' 端非翻訳領域 (UTR) に存在する RNA 因子 (cap-independent translation elements; 3' CITE) を用いてキャップ非依存的に翻訳を行う (Nicholson and White, 2011)。

RCNMV RNA1 のキャップ非依存的翻訳には 2 つの RNA 因子が重要である。一つは 5 つのステムループ構造からなる 3' CITE で (Mizumoto *et al.*, 2003)、もう一つは 3' CITE 上流に存在するアデニン塩基に富む A-rich sequence (ARS) と名付

[†] 平成 24 年 3 月 28 日 平成 24 年度大会で行われた会長講演の要旨

* 京都大学大学院農学研究科 Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto 606-8502, Japan

けた塩基配列である (Iwakawa *et al.*, 2012). ARS は, RCNMV RNA の様々な領域に特異的に結合する宿主因子の探索中に同定された RNA 因子である. すなわち, RNA アプタマー配列を付加した様々な RCNMV RNA 断片を用いてタンパク質のアフィニティー精製を行った結果, ポリ A 結合タンパク質 (PABP) をはじめ多くのタンパク質が RNA1 の 3' UTR と相互作用することが分かった (Iwakawa *et al.*, 2012). PABP は ARS に直接結合し, この結合は eIF4F, eIF(iso)4F, 40S リボソームサブユニットの 3' UTR へのリクルートメントに必要で, RNA1 の 3' CITE 依存的翻訳を促進した (Iwakawa *et al.*, 2012). ダイアンソウイルスは進化の過程で, 真核細胞 mRNA における 5' キャップ構造と 3' 端ポリ A 配列の代わりに 3' CITE と ARS をそれぞれ獲得し, 宿主 mRNA と競合できるキャップ非依存的翻訳機構を発達させてきたのかもしれない. 興味深いことに, RNA2 のキャップ非依存的翻訳は RNA 複製とリンクして起こるが, その機構はいまだ解明されていない (Mizumoto *et al.*, 2006).

p88 は -1 フレームシフト翻訳 (-1PRF) により翻訳され, p27 と同一の N 末端領域を持つが C 末端領域が異なるタンパク質である (Kim and Lommel, 1994). p88 の -1PRF 翻訳には, フレームシフト部位近傍に存在する RNA 因子が ARS と 3' CITE の間に存在する RNA 因子と長距離相互作用する必要がある (Tajima *et al.*, 2011). 興味深いことに, p88 は p27 とは異なり, RNA1 の複製には *cis* に要求される. すなわち, p88 は自らが翻訳されてきた RNA1 分子のみ複製の鋳型として利用できる (Okamoto *et al.*, 2008). p88 の複製における *cis* 要求性と p88 の翻訳に必要な 2 つの RNA 因子がともに RNA 合成の開始点を含む 3' UTR に存在することは, 翻訳の鋳型から複製の鋳型への切り替えにおいて重要なかもしれない.

3. 複製酵素タンパク質の役割

プラス鎖 RNA ウイルスの多くは直接 RNA 合成を担う RdRP に加えて, 複製補助タンパク質をコードしている. 近年の研究から, 複製補助タンパク質は多様な機能を持つことが分かってきた. 例えば, トムズウイルスの複製補助タンパク質である p33 はウイルス RNA に存在する RNA 因子や RdRP である p92 (p92^{pol}) と直接結合し, ウイルス RNA と p92^{pol} をペルオキシソーム膜にリクルートする (Nagy, 2008; Nagy and Pogany, 2012). *Brome mosaic virus* (BMV) の複製補助タンパク質である 1a タンパク質はウイルス RNA 因子を認識し, ウイルス RNA と 2a^{pol} を BMV の複製の場である小胞体膜ヘリクルートして, 複製複合体を形成する (den Boon *et al.*, 2010).

RCNMV の複製補助タンパク質である p27 は, RNA2 の 3' UTR に存在する Y 字型 RNA 構造 (Y-shaped RNA element; YRE)

を特異的に認識し, RNA2 を小胞体膜ヘリクルートする (Iwakawa *et al.*, 2011; Hyodo *et al.*, 2011). YRE と p88 それぞれとの結合に重要な p27 の領域と必須アミノ酸が同定されている (Hyodo *et al.*, 2011; Mine *et al.*, 2010b). p27 と p88 の結合は, RCNMV の複製複合体形成に必要なものである (Mine *et al.*, 2010b).

4. ウイルス RNA 複製に関与する宿主因子

ウイルス RNA 複製に関与する宿主因子を同定するために, 酵母の一遺伝子欠損ライブラリーや遺伝子発現抑制ライブラリーを利用したゲノムワイドなスクリーニングが行われてきた (Nagy, 2008; Nagy and Pogany, 2012). 酵母の系を用いることにより, *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) の複製に関与する遺伝子が約 130 個, BMV の複製に関与する遺伝子が約 100 個, それぞれ同定されている (Nagy, 2008). これらの遺伝子がコードするタンパク質には, RNA 結合タンパク質, シャペロンタンパク質, 膜形成タンパク質, 膜の再構成や脂質合成に関与するタンパク質などが含まれる (Nagy and Pogany, 2012). また, シロイヌナズナの変異体を用いた解析から, *TOM1* や *TOM3* など膜に局在し *Tomato mosaic virus* の複製に関与するタンパク質をコードする遺伝子が同定されている (Yamanaka *et al.*, 2000).

植物 RNA ウイルスの複製に必要な遺伝子は, 生化学的手法や共免疫沈降法により膜画分に局在するウイルス複製複合体を精製し, 質量分析法などを用いることによって同定されている. このような解析手法により, グリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (GAPDH), eEF1A, 熱ショックタンパク質 70 (Hsp70) などが同定されている (Nagy and Pogany, 2012).

RCNMV では, 感染植物葉から精製された複製複体のタンパク質組成と機能解析が行われた (Mine *et al.*, 2010a). 精製画分はウイルス因子と宿主因子を含み, 二種類の RdRP 活性を持つ. 一つは内在性の RNA を鋳型とする RdRP 活性であり, 鋳型 RNA を新たに加えなくてもウイルス由来の RNA を合成できる. もう一つは, 外から加えた RCNMV RNA の 3' 端に存在するマイナス鎖合成プロモーターを特異的に認識して, 相補鎖 RNA 合成を行う RdRP 活性である. RCNMV 複製複合体は膜に強固に結合した分子量 480 kDa の複合体であった (Mine *et al.*, 2010a).

RCNMV RdRP 膜画分および精製複製複合体 (480 kDa) 画分の質量分析解析により宿主因子候補が同定された. RdRP 膜画分には RCNMV 複製酵素タンパク質に加えて, Hsp70, Hsp90, ユビキチン, アクチン, hin1 様タンパク (Hin1), リボソームタンパク質, ARF1 などのタンパク質が含まれていた (Mine *et al.*, 2010a; 未発表). 一方, 精製 480 kDa 複合体には, ウイルス複製酵素タンパク質に加え, ユビキチン, ATP

合成酵素サブユニット, Hin1 などのタンパク質が含まれていた (Mine *et al.*, 2010a). これらの宿主因子候補タンパク質のうち, Hsp70, Hsp90, ARF1 の RCNMV RNA 複製における役割が調べられた. Hsp70 と Hsp90 は普遍的なシャペロンタンパク質である. ARF1 は細胞質中に広く存在する小分子 GTPase であり, ゴルジ体膜上で COP I 小胞の形成に関わるタンパク質である. これまでの研究結果は, Hsp70, Hsp90, ARF1 はいずれも p27 と直接結合し, ウイルス感染に伴い小胞体膜上に新たに形成される膜構造において p27 と共局在することを示唆している (論文準備中). また, ウイルスベクターを用いた RNA サイレncing による遺伝子抑制 (VIGS) によりこれらのタンパク質発現を抑制すると, 植物体における RCNMV RNA の蓄積が減少する. さらに, *in vitro* 翻訳複製系とプロトプラストを用いた実験において, それぞれのタンパク質の阻害剤で処理すると, 複製複合体形成と RNA 複製が阻害された. これらの結果は, Hsp70, Hsp90, ARF1 が RCNMV の複製複合体形成とウイルス RNA 合成で重要な役割を担っていることを示唆している.

GFP 融合 ARF1 を発現させて共焦点顕微鏡観察を行うと, ARF1 は通常ゴルジ体と共局在し, 小さな点状に観察されるが, p27 を共発現させると ARF1 は大きな凝集体として観察される. 興味深いことに, ARF1 の GDP/GTP 交換活性を阻害する brefeldin A 処理により, RCNMV 感染細胞における p27 の小胞体膜局在性は損なわれた. 現在のところ RCNMV の複製における ARF1 の詳細な役割は明らかではないが, p27 は ARF1 を複製の場である小胞体膜にリクルートし, 小胞体膜の修飾や RCNMV 複製複合体の形成に利用しているのかもしれない.

注目すべきことに, エンテロウイルスの 3A タンパク質は ARF1 と GDP/GTP 交換因子である GBF1 に結合することでリン酸イノシトール 4 キナーゼの膜へのリクルートを促進し, 非感染細胞では見られないホスファチジルイノシトール-4-キナーゼを豊富に含む膜環境を生み出すことが報告されている (Hsu *et al.*, 2010). このように植物ウイルスと動物ウイルスが共通の宿主因子を利用し, ウイルス複製に適した環境を生み出していることが考えられる. 一方で, ウイルスによって異なる宿主因子が用いられていることも多い. 例えば VIGS により GAPDH の発現を抑制した植物では, TBSV の複製は阻害されるが *Tobacco mosaic virus* の複製は阻害されない (Wang and Nagy, 2008).

展 望

この 10 年間で, プラス鎖 RNA ウイルスの複製で重要な役割を果たす RNA シス因子と宿主タンパク質に関する情報量

は飛躍的に増大した. その結果, ウイルスは自らがコードするウイルスタンパク質, RNA シス因子とともに宿主因子を巧みに操り, 効率良く複製を行っていることが分かってきた. しかし, ウイルス RNA の複製・翻訳の分子機構に関する現在の知見は完全とはほど遠い. 例えば, ウイルス RNA は, ウイルスや宿主のタンパク質と相互作用することで RNA 構造を時間的, 空間的に変化させ, RNA 複製において多様な機能を発揮していると考えられるが, その制御機構については未知である.

ウイルス RNA に結合する宿主因子のさらなる探索は, ウイルスの遺伝子発現制御機構の研究に大きく貢献するであろう. その一つとして, RNA アプタマー配列を用いたアフィニティー精製と質量分析法を組み合わせた手法が挙げられる (Iwakawa *et al.*, 2012). また, 酵母タンパク質のマイクロアレイを利用したハイスループットスクリーニング法も有効である. 本手法により, BMV や TBSV のゲノム RNA に結合するおよそ 50 の宿主因子が同定されている (Zhu *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009). プロテオミクスやゲノムワイドスクリーニングなどの手法を用いることによって, ウイルス複製に必要な宿主因子研究の裾野がさらに広がるであろう. また, *in vitro* 無細胞系を用いた複製複合体再構成の試みや一分子レベルでの宿主因子候補タンパク質の解析は, ウイルス複製における宿主タンパク質の役割を研究する上でますます重要になるであろう. 共焦点顕微鏡観察や電子顕微鏡観察もまた, 宿主因子候補タンパク質がウイルス複製のどの過程でどのように機能するかを研究する上で有用であろう. 今後ウイルスタンパク質, 宿主因子, 及びウイルス RNA がウイルス複製の様々な過程でどのような役割を担っているかをさらに理解することにより, ウイルス病害防除のための新たな手法の開発が可能になると考える.

謝辞: ここで紹介した私達の研究成果は, 京都大学植物病理学研究室に在籍した多くの学生諸氏及び教官の方々の多大な協力と努力に支えられて得られたものである. 皆様に心から感謝の意を表します. また, 本研究に必要な実験材料を提供して頂いた方々, および様々な実験手法を指導して頂いた国内外の多くの方々に心からお礼申し上げます. 私達の研究の多くは, 文部科学省, 日本学術振興会からの研究費により行われたものである.

引用文献

- den Boon, J.A., Diaz, A. and Ahlquist, P. (2010). Cytoplasmic viral replication complexes. *Cell Host Microbe*. 8: 77–85.
- Hiruki, C. (1987). The dianthoviruses: A distinct group of isometric plant viruses with bipartite genome. *Adv. Virus Res.* 33: 257–300.

- Hsu, N.Y., Illytska, O., Belov, G., Santiana, M., Chen, Y.H., Takvorian, P.M., Pau, C., van der Schaar, H., Kaushik-Basu, N., Balla, T., Cameron, C.E., Ehrenfeld, E., van Kuppeveld, F.J.M. and Altan-Bonnet, N. (2010). Viral reorganization of the secretory pathway generates distinct organelles for RNA replication. *Cell* 141: 799–811.
- Hyodo, K., Mine, A., Iwakawa, H.-O., Kaido, M., Mise, K. and Okuno, T. (2011). Identification of amino acids in auxiliary replicase protein p27 critical for its RNA-binding activity and the assembly of the replicase complex in *Red clover necrotic mosaic virus*. *Virology* 413: 300–309.
- Iwakawa, H.-O., Mine, A., Hyodo, K., An, M., Kaido, M., Mise, K. and Okuno, T. (2011). Template recognition mechanisms by replicase proteins differ between bipartite positive-strand genomic RNAs of a plant virus. *J. Virol.* 85: 497–509.
- Iwakawa, H.-O., Tajima, Y., Taniguchi, T., Kaido, M., Mise, K., Tomari, Y., Taniguchi, H. and Okuno, T. (2012). Poly(A)-binding protein facilitates translation of an uncapped/nonpolyadenylated viral RNA by binding to the 3' untranslated region. *J. Virol.* (in press).
- Kim, K.H. and Lommel, S.A. (1994). Identification and analysis of the site of –1 ribosomal frameshifting in red clover necrotic mosaic virus. *Virology* 200: 574–582.
- Mine, A., Takeda, A., Taniguchi, T., Taniguchi, H., Kaido, M., Mise, K. and Okuno, T. (2010a). Identification and characterization of the 480-kilodalton template-specific RNA-dependent RNA polymerase complex of *Red clover necrotic mosaic virus*. *J. Virol.* 84: 6070–6081.
- Mine, A., Hyodo, K., Takeda, A., Kaido, M., Mise, K. and Okuno, T. (2010b). Interactions between p27 and p88 replicase proteins of *Red clover necrotic mosaic virus* play an essential role in viral RNA replication and suppression of RNA silencing via the 480-kDa viral replicase complex assembly. *Virology* 407: 213–224.
- Mizumoto, H., Tatsuta, M., Kaido, M., Mise, K. and Okuno, T. (2003). Cap-independent translational enhancement by the 3' untranslated region of red clover necrotic mosaic virus RNA1. *J. Virol.* 77: 12113–12121.
- Mizumoto, H., Iwakawa, H.-O., Kaido, M., Mise, K. and Okuno, T. (2006). Cap-independent translation mechanism of Red clover necrotic mosaic virus RNA2 differs from that of RNA1 and is linked to RNA replication. *J. Virol.* 80: 3781–3791.
- Nagy, P.D. (2008). Yeast as a model host to explore plant virus-host interactions. *Ann. Rev. Phytopathol.* 46: 217–242.
- Nagy, P.D. and Pogany, J. (2012). The dependence of viral RNA replication on co-opted host factors. *Nat. Rev. Microbiol.* 10: 137–149.
- Nicholson, B.L. and White, K.A. (2011). 3' cap-independent translation enhancers of positive-strand RNA plant viruses. *Curr. Opin. Virol.* 1: 373–380.
- Okamoto, K., Nagano, H., Iwakawa, H.-O., Mizumoto, H., Takeda, A., Kaido, M., Mise, K. and Okuno, T. (2008). *cis*-Preferential requirement of a-1 frameshift product p88 for the replication of *Red clover necrotic mosaic virus* RNA1. *Virology* 375: 205–212.
- Sit, T.L., Vaewhongs, A.A. and Lommel, S.A. (1998). RNA-mediated trans-activation of transcription from a viral RNA. *Science* 281: 829–832.
- Tajima, Y., Iwakawa, H.-O., Kaido, M., Mise, K. and Okuno, T. (2011). A long-distance RNA-RNA interaction plays an important role in programmed-1 ribosomal frameshifting in the translation of p88 replicase protein of *Red clover necrotic mosaic virus*. *Virology* 417: 169–178.
- Wang, R.Y.-L. and Nagy, P.D. (2008). *Tomato bushy stunt virus* co-opts the RNA-binding function of a host metabolic enzyme for viral genomic RNA synthesis. *Cell Host Microbe* 3: 178–187.
- Xiong, Z., Kim, K.H., Giesman-Cookmeyer, D. and Lommel, S.A. (1993). The roles of the red clover necrotic mosaic virus capsid and cell-to-cell movement proteins in systemic infection. *Virology* 192: 27–32.
- Yamanaka, T., Ohta, T., Takahashi, M., Meshi, T., Schmidt, R., Dean, C., Naito, S. and Ishikawa, M. (2000). *TOM1*, an *Arabidopsis* gene required for efficient multiplication of a tobamovirus, encodes a putative transmembrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 10107–10112.