

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「植物の機能と制御」

研究課題
「タバコモザイクウイルスの増殖機構」

研究終了報告書

研究期間 平成 14 年 11 月～平成 20 年 3 月

研究代表者：石川 雅之
(独立行政法人農業生物資源研究所・
植物科学研究領域 上級研究員)

1 研究実施の概要

ウイルスは、ウイルスゲノムにコードされた因子のみならず細胞内の既存の分子にも依存して増殖する。従って、ウイルスの増殖機構を解明し、ウイルス増殖の人為的コントロール、あるいは物質生産や遺伝子導入手段などとしてのウイルスの有効利用の基礎を構築するには、ウイルスにコードされた因子のみならず宿主因子も含めた機能解析が必要である。本研究は、試験管内タバコモザイクウイルス (TMV) RNA 翻訳・複製系を用いて、生化学的にウイルス増殖に関与する宿主因子を同定し、その増殖機構を分子レベルで理解することを目的とした。

TMV はウイルス粒子中に mRNA として機能しうる一本鎖 RNA ゲノムをもち、相補鎖 RNA を介して複製する。ウイルスゲノム上には RNA 複製に関与する 130K タンパク質およびその

のリードスルー産物である 180K タンパク質 (これらは複製タンパク質と呼ばれる) ; プラスモデスマータを通してウイルスの実体が細胞間移行する際に必要な移行タンパク質 (MP) ; および外被タンパク質 (CP) をコードする (図1)。TMV を含むプラス鎖 RNA ウイルスが宿主に感染すると、まずゲノム RNA が翻訳され、複製タンパク質が生成する。複製タンパク質は相補鎖合成の鋳型となるゲノム RNA を特定のオルガネラ膜の細胞質側表面にリクルートし、複製複合体を形成する。その後、相補鎖 RNA が合成され、これを介してゲノム RNA が複製される。複製されたゲノム RNA は細胞質に放出され、子孫粒子の形成あるいは隣接細胞への移行に寄与する (図2)。このように、プラス鎖 RNA ウイルスの複製過程の大まかな道筋は理解されていたが、そこに関与する宿主因子はごく一部が同定されていたにすぎず、複製鋳型の膜へのリクルートメント機構あるいは複製複合体の構造と機能は謎にまつまれている。これら機構の解明は当時も、また今日でもウイルス学における最も重要な課題の一つとなっている。

本研究では、TMV をモデルとして、RNA 複製に関わる宿主因子を同定し、複製機構の詳細を明らかにすることを目的として、第1の研究項目「TMV の複製タンパク質翻訳から複製複合体形成に至る分子機構の解析」および第2の研究項目「TMV 複製複

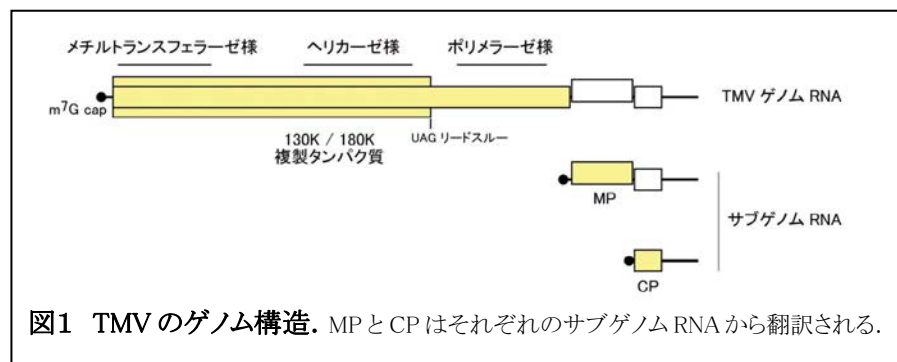


図1 TMV のゲノム構造. MP と CP はそれぞれのサブゲノム RNA から翻訳される.

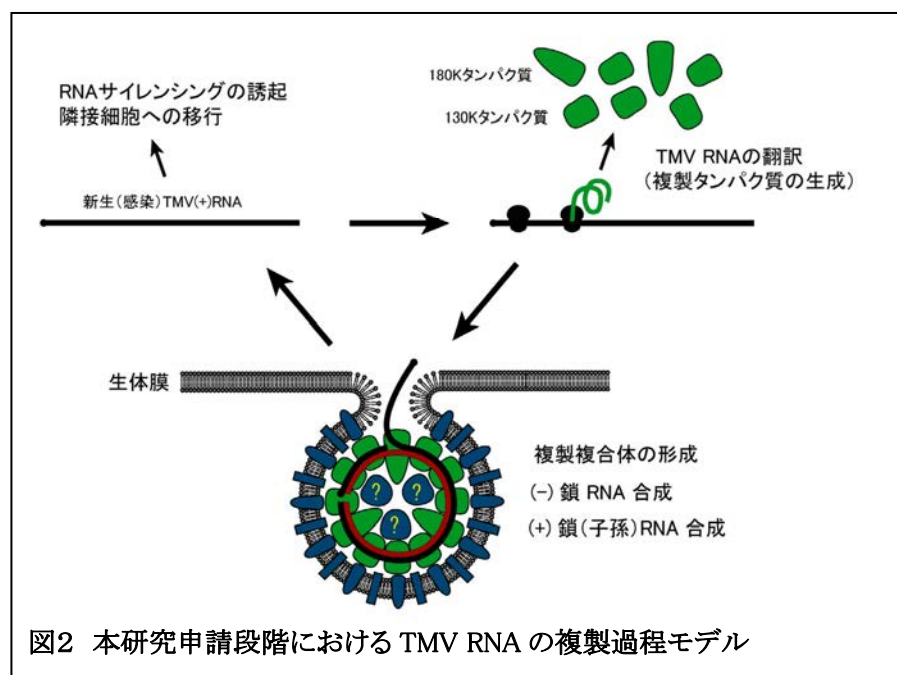


図2 本研究申請段階における TMV RNA の複製過程モデル

合体の構成要素の同定と各因子の機能解析」を設定した。また、ウイルスが植物体で増殖するためには、複製に加えて感染域の拡大あるいは宿主抵抗性からの回避が必要である。TMV の複製タンパク質は、ウイルス RNA 複製のみならず、MP によるプラスモデスマータを介した隣接細胞への移行、および RNA サイレンシングの抑制に関与することが示唆されていた。そこで本研究では、複製タンパク質がいかにしてこれらの多機能性を発揮するのかを理解することを目的として、第3の研究項目「TMV RNA 複製と細胞間移行の連携機構の解析」および第4の研究項目「TMV 複製タンパク質による RNA サイレンシング抑制機構の解析」を設定した。さらに、これらの研究を効率よく進めるため、第5の研究項目「タバコ BY-2 培養細胞における TMV 誘導感染系の構築と利用」を設定した。以下に各項目の成果の概要を記す。

(I) TMV の複製タンパク質翻訳から複製複合体形成に至る分子機構の解析

本研究全体の基礎となる実験系として、タバコ BY-2 細胞由来脱液胞化プロトプラスト抽出液 (BYL) を用いた試験管内 TMV RNA 翻訳・複製系を完成させた。この系を用いて、TMV RNA が翻訳されて複製タンパク質が合成され、膜上に複製複合体が形成されるまでの過程がどのような中間的状态を経て進行するかを明らかにするために、超遠心で生体膜を除去した BYL (membrane-depleted BYL: mdBYL) を用いた。mdBYL で TMV RNA を翻訳すると 130K, 180K 複製タンパク質と TMV RNA を含む複合体 (pre-membrane-targeting complex: PMTC) が形成された。この段階では、相補鎖 RNA の合成は観察されなかった。精製した PMTC を生体膜 (P30 BYL) と混合すると、相補鎖 RNA が合成され、複製が観察された。このことから、複製複合体が PMTC を経て形成されることが明らかになった。さらに、PMTC の形成が TMV RNA の翻訳と共役しており、一旦フリーになった複製タンパク質は PMTC を形成できないこと; 翻訳と共役して 130K タンパク質が TMV RNA と結合して複合体 (core PMTC) を形成すれば、その後フリーの 180K タンパク質がエンタリーして PMTC を形成しうることを明らかにした。また、PMTC と共精製される宿主因子を同定し、現在それらの機能解析を進めている。

複製複合体形成に関わる宿主因子同定の試みの一環として、TMV RNA の 5'あるいは3'末端近傍領域に特異的に結合する宿主因子を、ストレプトマイシン結合性 RNA アプタマーを付加した標的 RNA を用いて脱液胞化プロトプラスト抽出液から精製し、同定した。そのうちのひとつ BTR1 が TMV RNA の 5'末端領域に特異的に結合し、TMV の増殖に阻害的に働くことを明らかにした。これまでのウイルス研究は専ら、ウイルスの増殖を正に制御する因子に焦点を当ててきたが、本知見は、ウイルス増殖を負に制御する因子の存在とその重要性を示している。

(II) TMV 複製複合体の構成要素の同定と各因子の機能解析

TMV を含む真核生物プラス鎖 RNA ウイルスは知られる限り例外なくオルガネラ膜の細胞質側表面に複製複合体を形成し、その中で RNA 複製反応を行う。我々は、脱液胞化の手法を用いて RNase 活性の混入を避けることにより、生体内と同様のパターンで RNA を合成する TMV RNA 複製複合体を得、これを用いて解析を行った。生化学的解析に必要な大量の TMV 感染タバコ BY-2 培養細胞は TMV 誘導感染系 [研究項目 (V) 参照] を用いて調製した。TMV RNA 複製複合体は膜の表面に強く結合していた。複製複合体を形成する膜に結合した複製タンパク質を界面活性剤 Triton X-100 で処理すると非常に速く沈降するアグリゲートを形成する一方、膜に結合していない複製タンパク質は、Triton X-100 処理しても密度勾配遠心においてほとんど沈降せず、可溶性の状態を保った。これらの結果は、膜が複製複合体の活性発現そして恐らくは構造維持に非常に重要であること、膜に結合した複製タンパク質は、膜に結合していない複製タンパク質とは大きく異なるコンフォメーションをとっている可能性を示唆する。

我々はさらに、界面活性剤リソフィスファチジルコリン (LPC) が TMV の複製タンパク質を、RNA 合成活性を保ったまま可溶化できる (RNA 合成パターン等の性質は変化するものの) ことを見いだした。膜画分を LPC で可溶化し、180K タンパク質を精製すると、NtTOM1, NtTOM2A, 翻訳伸長因子 eEF1A, 熱ショックタンパク質 HSP70 および新規宿主因子 (低分子量 GTP 結合タンパク質) を含む複数の宿主因子と 130K タンパク質が共精製された。精製画分には、TMV RNA-依存 RNA ポリメラーゼ (RdRp: TMV RNA を鋳型として相補鎖 RNA を合成する) 活性が検出された。

NtTOM1, NtTOM2A はすでに遺伝学的に TMV RNA 複製に関与することが示されている。同定された低分子量 GTP 結合タンパク質は4個の相同な遺伝子にコードされていた。それぞれ単独の遺伝子欠損は TMV の増殖に影響を与えなかったが、そのうちの特定の2個を欠損させると、植物の生育は正常であるにもかかわらず、TMV RNA の複製が強く抑制された。この結果は、本低分子量 GTP 結合タンパク質が TMV RNA の複製に必須であること;この遺伝子は、通常の遺伝学的方法では同定できなかったであろうことを意味する。一方、可溶性画分の 180K タンパク質とは少量の 130K タンパク質および eEF1A, HSP70 しか共精製されなかった。(I)の結果とあわせてこれらの結果は、複製タンパク質が RNA 合成能を獲得するためには、翻訳後、PMTC の形成、膜および複数の宿主タンパク質との逐次的な結合という複数のステップを踏んで、複製複合体中の複製タンパク質にみられるコンフォメーションに至る必要があることを示唆する。

(III) TMV RNA 複製と細胞間移行の連携機構の解析

TMV の MP が感染 BY-2 細胞で膜結合および可溶性の2つの様態をとることを明らかにした。それぞれをアフィニティー精製したところ、どちらも HSP70 が共精製された。また、膜画分の MP と共精製される宿主因子も同定したが、対応する遺伝子に T-DNA 挿入をもつシロイヌナズナにおいても TMV は野生株においてと同様の効率で増殖した。したがって、この宿主因子と MP の相互作用は生物学的に意味がないと考えられた。残念ながら TMV RNA 複製と細胞間移行の連携機構は未解明のままである。

(IV) TMV 複製タンパク質による RNA サイレンシング抑制機構の解析

RNA サイレンシングは、ウイルスに対する抵抗性の一種と考えられるが、これに対し、多くの植物ウイルスは RNA サイレンシングを抑制する機能をもっている。我々は、TMV の 130K 複製タンパク質が RNA サイレンシングを抑制することを見いだした。本項では 130K 複製タンパク質による RNA サイレンシング抑制機構の解明を目的とした。

TMV の弱毒株 L11 の 130K タンパク質は野生型(強毒株)の 130K タンパク質より低い RNA サイレンシング抑制能をもつ。BY-2 プロトプラストに L11 あるいは野生株 TMV RNA を感染させ、複製タンパク質の様態を細胞分画法により詳細に調べたところ、L11 感染細胞中では非膜結合状態にある 130K タンパク質の蓄積レベルが低いことがわかった。このことから、非膜結合状態にある(可溶性)130K タンパク質が RNA サイレンシング抑制に関わる可能性が考えられた。

可溶性 130K タンパク質の量的低下のみで RNA サイレンシング抑制不全を説明できるか検討するために、TMV の複製タンパク質の膜結合に関与する宿主膜タンパク質 TOM1 を利用した。GFP を発現する *N. benthamiana* の葉にカリフラワーモザイクウイルスの 35S RNA プロモーターでドライブされる GFP 遺伝子をもつ遺伝子カセットをアグロインフィルトレーションにより導入する実験で、野生型 130K タンパク質を共発現させると、RNA サイレンシングの抑制により GFP の過剰発現が起きる。さらにここに TOM1 を共発現させると、GFP の過剰発現は抑制された。このとき、130K タンパク質の非膜結合/膜結合量比は、TOM1 の共発現により低下した。この結果は、過剰発現した TOM1 により 130K タンパク質が生体膜表面にトラップされ、非膜結合状態の 130K タンパク質の濃度が減少したことにより RNA サイレンシング抑制機能が十分に発揮されなかったためであると解釈される。

植物における RNA サイレンシング誘起機構を解明し、植物ウイルスがコードする RNA サイレンシングサプレッサーの作用機作を正確に理解するには、植物細胞抽出液を用いて RNA サイレンシング関連反応を再現する実験系を確立する必要がある。そこで、BYL を用いた RNA サイレンシングの生化学的解析手法の基盤確立を目指した。BY-2 細胞において野生株 TMV-GFP ウイルスおよび RNA サイレンシング抑制機能が低い L11-GFP ウイルスを感染誘導すると、前者が感染誘導後5日目まで GFP 蛍光を維持したのに対し、L11-GFP 感染誘導細胞では誘導2日目以降 GFP 蛍光の急激な低下が観察され、RNA サイレンシングが誘起されていることが示唆された。感染誘導後2日目に脱液胞化プロトプラスト抽出液を調製し、GFP あるいは TMV 配列をもつ RNA とインキュベートしたところ、L11-GFP 誘導細胞抽出液に TMV(L11)-GFP 配列特異的な切断活性(RISC 活性)が検出された。Small interfering RNA (siRNA) 蓄積の経時変化を調べたところ、L11-GFP、野生型

TMV-GFP間で質的には大きな違いは見られないものの、野生型 TMV-GFP では siRNA の蓄積が L11-GFP に比して遅れた。蓄積した siRNA の 3' 末端リボースの 2'-O メチル化の程度を調べたところ、L11-GFP を複製する細胞の siRNA はほぼ完全にメチル化されていたのに対し、野生型 TMV-GFP を複製する細胞の siRNA にはかなりの割合でメチル化されていないものが検出された。また、L11-GFP あるいは野生型 TMV-GFP を複製する細胞由来の BYL における Dicer 様活性は、非感染細胞由来の BYL と同様であった。以上の結果から、130K タンパク質は Dicer 様活性を阻害することなく siRNA の蓄積を遅延させ、RISC 形成を強く抑制することがわかった。

(V) タバコ BY-2 培養細胞における TMV 誘導感染系の構築と利用

研究項目(Ⅱ)と(Ⅳ)を遂行するためには、多量の TMV 感染 BY-2 細胞が必要であった。我々は、タバコ BY-2 細胞を、ステロイドホルモン誘導性プロモーター下流にリボザイム配列を付加した完全長 TMV cDNA を挿入した遺伝子カセットで形質転換した。ここでは、感染誘導が容易にモニターできるよう、外被タンパク質遺伝子を GFP に置換したキメラ TMV を用いた。結果として、最大で 95% 以上の細胞でホルモン添加による TMV の感染の誘導が起こる形質転換 BY-2 を作出できた。また、この実験系を、有用タンパク質あるいは構造解析用の標識タンパク質の生産に応用した。

2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

ウイルスはゲノム上に限られた遺伝情報しかコードしていない。このため、ウイルスの増殖を司るマシナリーは、ウイルスゲノムにコードされた因子とともに細胞内の既存の分子が巧みに用いられ、構築される。従って、ウイルスの増殖機構を理解するためには、ウイルスにコードされた因子のみならず宿主因子も含めた機能解析が必要である。本研究は、農業上重要な植物ウイルスの大多数と、医学・獣医学上重要な多くのウイルスを含むプラス鎖 RNA ウイルスのモデルとして TMV に着目し、その増殖に必須な宿主因子を同定し、増殖機構の詳細を解明することを目的とした。

本研究申請以前、我々は、TMV の増殖に関与する宿主因子を、シロイヌナズナを用いた順向きの遺伝学的手法で同定した。具体的には、TMV の効率のよい増殖を許容するシロイヌナズナ野生株を突然変異誘起処理し、TMV の増殖効率が低下した突然変異株を単離し、原因遺伝子を同定した。これにより、欠損によりトバモウイルスの増殖が阻害されるような遺伝子、*TOM1* と *TOM2A* を同定することができた。我々は、さらに多くの宿主因子を同定すべく、変異株のスクリーニングを展開したが、単離されたのは *tom1* のアレルばかりであった。シロイヌナズナのゲノムが解読されてわかったことの一つは、多くの遺伝子が重複しているということである。ウイルスの増殖に必要な遺伝子であってもそれがファミリーを形成していた場合、そのうちのひとつが欠損してもウイルスの増殖効率の低下という表現型を現さないことが予想される。また、当該遺伝子に重複がなかったとしても、その遺伝子の欠損が致死的であった場合、遺伝学的に同定することは難しい。このようなことを考えると、植物を用いた順向きの遺伝学のアプローチでウイルスの増殖をサポートする遺伝子を同定できたことは、多くの幸運な条件に恵まれた、むしろ例外的な事例といえるのかもしれない。

そこで本研究は、我々が確立した試験管内 TMV RNA 翻訳・複製系を用いて、生化学的にウイルス増殖に関与する宿主因子を同定し、その増殖機構を分子レベルで理解することを目的として計画された。本研究では、TMV の RNA 複製、宿主の防御反応からの回避、そして細胞間移行複合体形成が一連の動作として起きることを想定し、それらの過程に関与する新規宿主因子の同定を通して TMV 増殖の分子機構の解明を目指した。以下に、研究項目として設定した5項目とその概要・役割分担を記す。

(Ⅰ) TMV の複製タンパク質翻訳から複製複合体形成に至る分子機構の解析

試験管内 TMV RNA 翻訳・複製系から、必須成分を除去した上で反応を行い、TMV RNA 複製複合体形成の中間体を形成させ、構成因子と性状を明らかにする。例えば、RNAi 法により TMV RNA の複製に必須な宿主遺伝子 *TOM1* をノックダウンした BY-2 由来の脱液胞化プロトプラスト抽出液、あるいは非感染 BY-2 由来の脱液胞化プロトプラスト抽出液 (BYL) から膜成分を除去した溶液を用いる。最終的には BYL を分画・再構成し、複製複合体形成に必要な因子およびそれらが働く順番と作用機作を明らかにする。また、脱液胞化プロトプラスト抽出液から TMV RNA の末端近傍領域に特異的に結合する宿主因子を精製同定し、ウイルス増殖への関与を調べる。本項は、石川グループが中心となって推進する。尾之内グループはシロイヌナズナ培養細胞の脱液胞化条件の至適化を、鈴木グループは同定されたタンパク質に対応する遺伝子の塩基配列解析を行う。

(Ⅱ) TMV 複製複合体の構成要素の同定と各因子の機能解析

TMV 感染 BY-2 細胞から脱液胞化プロトプラスト抽出液を調製し、TMV の RNA 複製複合体を無傷の状態を得ることを試みる。これを分画し、複製複合体の諸性質を把握するとともに、種々の物理的処理、界面活性剤による可溶化等を加えることにより複製複合体を高度に精製する。そこに存在するタンパク質を網羅的に同定する。本項は、石川グループが中心となって推進する。鈴木グループは同定されたタンパク質に対応する遺伝子の塩基配列解析を行う。

(Ⅲ) TMV RNA 複製と細胞間移行の連携機構の解析

MP は複製複合体を高純度を含む膜画分にも含まれるという予備的実験結果を得ていた。この結果は複製と細胞間移行の連携を反映するものと考えられた。そこで、MP を含む膜画分を精製し、MP と結合しているタンパク質を同定する。特に、TMV の複製タンパク質が MP と共精製されるか否かに注目する。本項は、飯グループと石川グループが中心となって推進する。鈴木グループは同定されたタンパク質に対応する遺伝子の塩基配列解析を行う。

研究項目 (Ⅰ)、(Ⅱ)、(Ⅲ) の結果、TMV RNA 複製あるいは細胞間移行に関与する可能性が示唆された宿主因子については、生体内で TMV 増殖に関与することを確認するために、これらの因子を植物体内で過剰発現あるいは発現抑制したときに TMV の増殖が影響を受けるかを検討する。特に、当該因子が細胞間移行に関与するか否かの判定には植物体を用いた解析が必要である。この際、ゲノムの解読が完了したシロイヌナズナを用い、当該遺伝子がファミリーを形成していることが判明した場合は発現抑制方法あるいは結果の評価に特別の考慮を盛り込む。

(Ⅳ) TMV 複製タンパク質による RNA サイレンシング抑制機構の解析

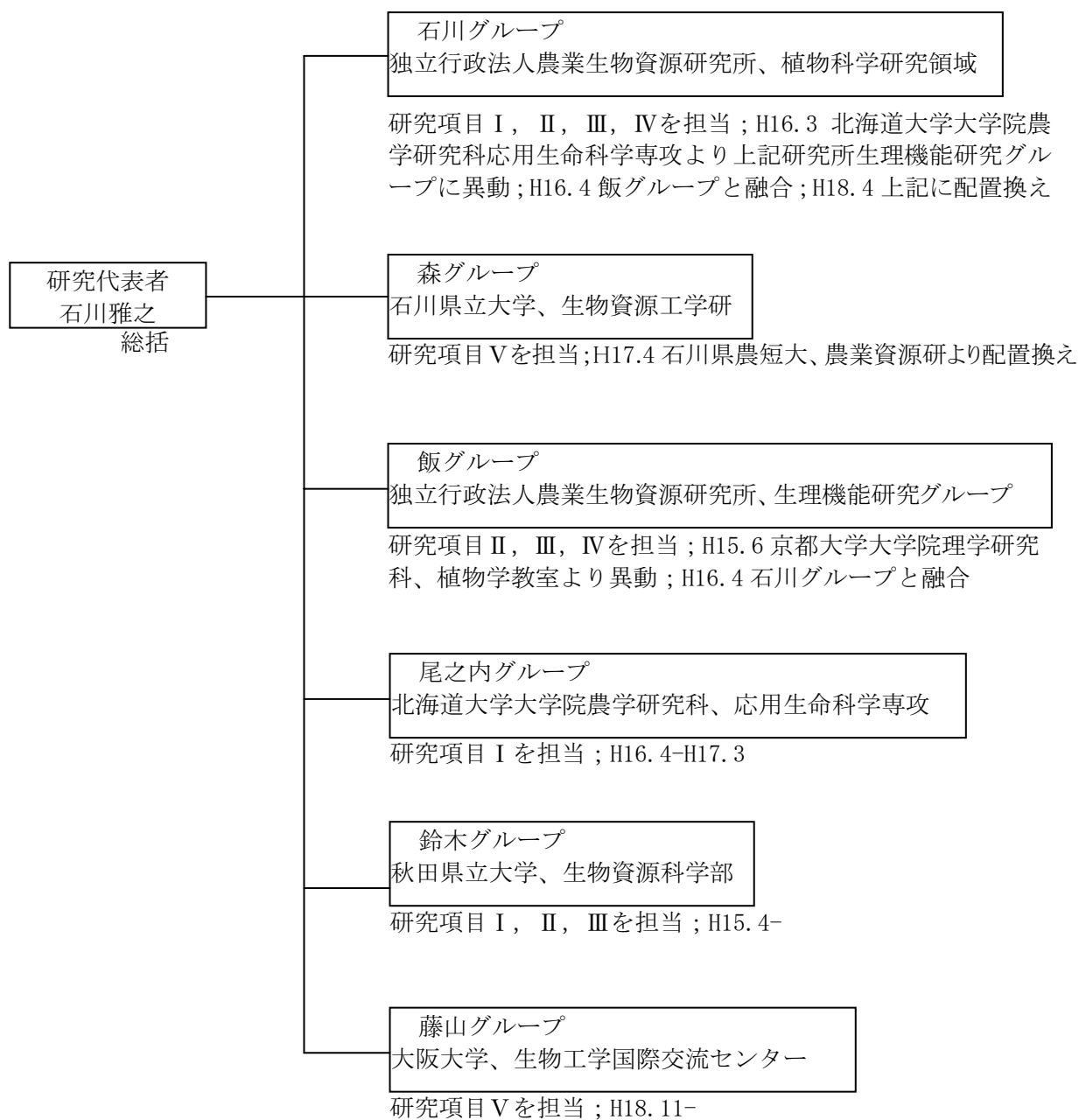
RNA サイレンシング抑制機能に異常のある TMV-L11 株と野生株 (抑制能をもつ) について、複製複合体あるいは複製タンパク質の様態を比較する。さらにサイレンシングに伴う短い二本鎖 RNA の生成および RNA 分解酵素活性などを比較し、TMV-L11 株と野生株の差異から RNA サイレンシング抑制機構を推測する。本項は、飯グループと石川グループが推進する。

(Ⅴ) タバコ BY-2 培養細胞における TMV 誘導感染系の構築と利用

研究項目 (Ⅱ)、(Ⅲ)、(Ⅳ) を遂行するためには、TMV に同調感染した大量のプロトプラストを必要とする。そこで、ステロイドホルモン誘導性プロモーター下流に TMV cDNA をもつ遺伝子カセットを BY-2 培養細胞に導入し、同調的に TMV 感染を誘起できる系を構築し、実験に供する。本項は、森グループと藤山グループが推進する。

確立した植物培養細胞における TMV 誘導感染系は、外来タンパク質の発現系として優れた性質をもち、高純度の有用タンパク質を多量に生産しうることが判明し、実用化を念頭に、応用的研究も展開した。

(2) 実施体制



3 研究実施内容及び成果

3. I TMV の複製タンパク質翻訳から複製複合体形成に至る分子機構の解析(独立行政法人農業生物資源研究所 石川グループ; 北海道大学 尾之内グループ; 秋田県立大学 鈴木グループ)

3. I . 1 試験管内 TMV RNA 翻訳複製系の確立

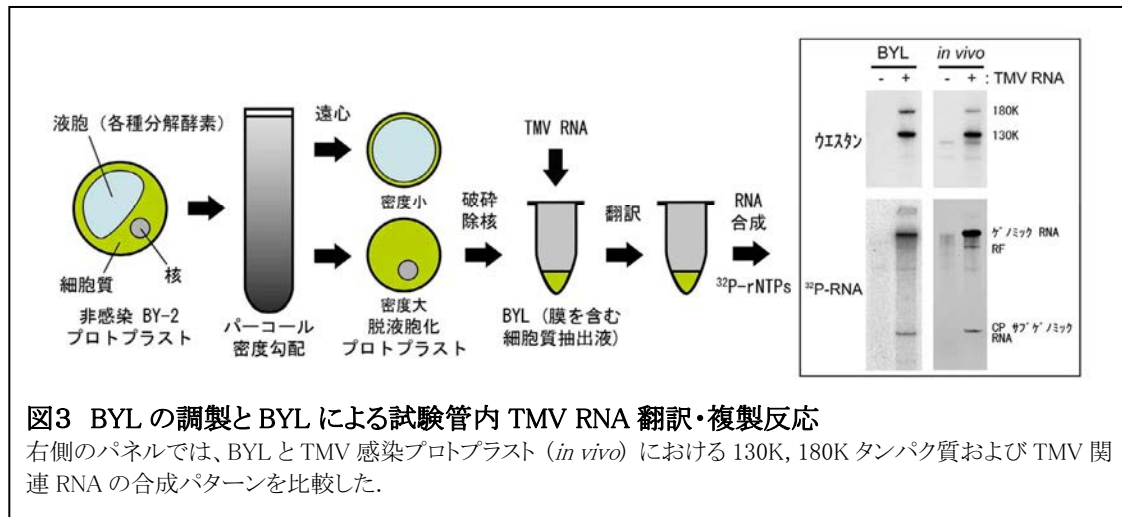
(1) 研究実施内容及び成果

TMV 複製タンパク質が複製鋳型としてゲノム RNA を認識し、生体膜上に RNA 複製複合体を形成するまでの過程を解析する実験系は皆無であった。このため、この過程がどのように進むかはほとんど理解されていなかった。この過程を明らかにするためには、試験管内ウイルス RNA 複製系の利用が望ましい。1991 年、Molla らは、Hela 細胞をホモゲナイズし、低速遠心で非破碎細胞と核を除いただけの粗抽出液を用いてポリオウイルス RNA を翻訳し、RNA 合成基質を添加することにより、ゲノム RNA の複製はもとより、新しくウイルス粒子まで作らせることに成功した(Molla *et al.* 1991. Cell-free, *de novo* synthesis of poliovirus. *Science* 254: 1647-1651.)。さらに、低濃度のグアニジンを用いて翻訳を阻害することなく一連の反応をマイナス鎖 RNA 合成の前で一時的に停止させることができること、グアニジンを除去すればその後の反応を再開することができることなどを利用して、ポリオウイルスのライフサイクルの詳細が次々と明らかにされている。ところが、同様な系の確立は、2003 年に *Encephalomyocarditis virus* について報告されたのみであった(Svitkin and Sonenberg. 2003. Cell-free synthesis of encephalomyocarditis virus. *J. Virol.* 77: 6551-6555.) (その後、2005 年に *Aichi virus* についても報告された [Nagashima *et al.* 2005. The 5'-terminal region of the Aichi virus genome encodes *cis*-acting replication elements required for positive- and negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.* 79: 6918-6931])。これらのウイルスは、ポリオと同じピコルナウイルスに分類され、TMV が属すアルファ様ウイルスにおける成功例はなかった。我々は、植物細胞抽出液を用いた植物 RNA ウイルスゲノムの翻訳・複製系の開発を目指した。その予備段階として、TMV RNA を市販の小麦胚芽抽出液あるいはウサギ網状赤血球ライセートを用いて翻訳し、放射性標識した RNA 合成基質を添加してみた。しかし、これらの系では、複製タンパク質は合成されたが、TMV 特異的 RNA 合成は検出されなかった。複製が膜に依存することを考えると、膜を含まないこれらの翻訳系で複製が起きないことは予想された結果であった。そこで我々は、膜を含んだ翻訳系を自前で作ろうと考えた。

多くの植物細胞は、細胞内容積の大部分を占める液胞をもつ。一般に植物体を構成する体細胞では、液胞内腔は酸性に保たれ、タンパク質あるいは核酸等を分解する酵素を含んでいる。植物細胞をそのまま破壊すると液胞も壊れ、これらの内容物が混入してしまう。従って、その抽出液においては一本鎖 RNA はたちまち分解され、ほとんど翻訳活性は検出されない。我々は、TMV RNA の試験管内翻訳・複製系を構築するにあたり、トバモウイルスが効率よく増殖することが知られているタバコ BY-2 培養細胞を材料として使用しようと考えた。この細胞は液胞が比較的未発達で、脱液胞化の技術も園部らにより確立されていた。BY-2 プロトプラストを、パーコール密度勾配中で遠心すると、浮遊密度の小さな液胞は上方に、核を含む細胞質は重いので下方に引っ張られ、二つに引きちぎられる。結果として、液胞を失った「脱液胞化プロトプラスト」は、浮遊密度の大きな領域にバンディングしてくる(図3)。これを回収し、ダウンスホモゲナイザーで破碎し、低速遠心で未破碎細胞と核を除去した細胞質抽出液(BYL)を得た。BYL は、プラス鎖 RNA ウイルスが複製複合体を形成するために必要なオルガネラ膜を含んでいる。BYL を用いて TMV RNA を翻訳して複製タンパク質を合成し、次いで RNA 合成基質を添加すると、TMV RNA の複製がみられた。標識ヌクレオチドは、ゲノミック (+) RNA、複製型(二本鎖) RNA、サブゲノミック (+) RNA にとりこまれ、その合成パターンは、TMV 感染 BY-2 プロトプラストにおいて見られるものと酷似していた(図3)。このことか

ら、この試験管内系で、生体内と同様の複製複合体が形成されたと考えられた。また、BYL を用いた同様の反応により、ブロムモザイクウイルス、キュウリモザイクウイルス、カブクリンクルウイルス RNA も翻訳・複製させることができた。この実験系は、幅広く植物プラス鎖 RNA ウイルスの複製複合体形成過程の有効な解析手段になると期待される。

本課題の申請時点で、BYL を用いた TMV RNA 翻訳・複製系の下地はできていたが、本研究において脱液胞化の方法や翻訳および複製反応条件を詳細に検討し、至適化を行った。これらの成果は Komoda *et al.* (2004) および Ishibashi *et al.* (2006) に発表した(6章「成果発表」参照)。



(2) 研究成果の今後期待される効果

ここで開発された実験系は、これまでのところ、植物細胞抽出液を用いた唯一の試験管内ウイルス RNA 翻訳・複製系である。本課題の以下の成果は、主として脱液胞化プロトプラスト抽出液を用いて得たものである。また、ウイルス RNA の翻訳あるいは複製機構の研究に BYL を用いることは、国内外のいくつかの研究グループにより採用され、新たな知見をうみだしている。本試験管内ウイルス RNA 翻訳・複製系は、ウイルス研究のみならず、メンブレントラフィックあるいはタンパク質の細胞内輸送等の分野の進展にも幅広く貢献しうると考えられる。最近我々はトマトの TMV 抵抗性遺伝子 *Tm-1* 遺伝子産物を、*Tm-1* をもつトマトの細胞抽出液から、試験管内 TMV RNA 複製を阻害する因子として精製し、LC-MS/MS 法で同定した。さらに、*Tm-1* が複製タンパク質に結合し、膜上に複製複合体が形成する前の段階を阻害することを明らかにした (Ishibashi *et al.* 2007. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104: 13833-13838:6章「成果発表」参照)。これまでに同定された植物のウイルス抵抗性遺伝子は、ヌクレオチド結合部位とロイシンリッチ反復をもつタンパク質をコードしていたが、*Tm-1* 遺伝子はこれらと全く異なるものであった。ウイルス抵抗性遺伝子が生化学的に同定されたのも、これが一例目である。この成果も試験管内ウイルス RNA 翻訳・複製系を含む本 CREST 研究成果に由来するものである。この実験系は、ウイルス増殖を阻害する宿主タンパク質あるいは化学物質のスクリーニングに広く利用できるのではないかと予想される。

3. I. 2 複製複合体形成過程の解析: pre-membrane-targeting complex (PMTC)の同定

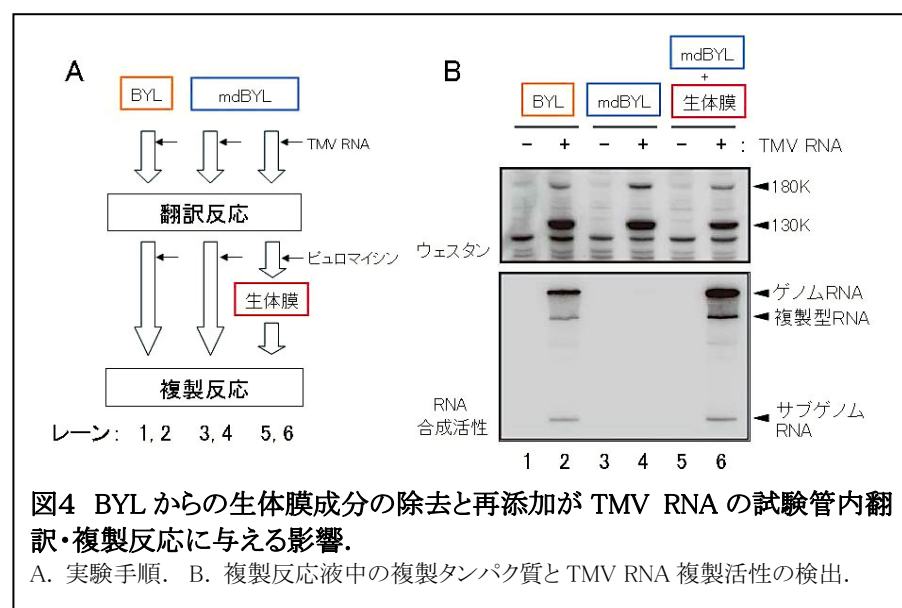
(1) 研究実施内容及び成果

BYL (生体膜を含む) で TMV RNA を翻訳し複製タンパク質を合成したあと、RNA 合成の基質となるリボヌクレオシド三リン酸を添加すると、生体内と同様のパターンの TMV RNA 複製が起きる(図 3)。本項では、生体膜上に複製複合体が形成されるまでの過程をより詳細に記述する第一歩として、翻訳後、複製複合体形成完了以前の段階で反応を一旦停止させることを目指した。そのために、まず、TMV の増殖に必須な宿主膜タンパク質 TOM1 およびそのホモログである TOM3 の発現を、逆向き反復配列 RNA を発現させること(RNA interference: RNAi)により抑制した BY-2 細胞から調製した BYL を用いることを計画した。

シロイヌナズナの *TOM1* 遺伝子は、TMV の効率のよい増殖に必須な 7 回貫通型膜タンパク質をコードする。*TOM1* は TMV の複製タンパク質と相互作用するので、膜に結合した複製複合体の形成あるいは活性発現に重要な機能を果たすのではないかと推測されてきた(Yamanaka *et al.* 2000. *TOM1*, an *Arabidopsis* gene required for efficient multiplication of a tobamovirus, encodes a putative transmembrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (18): 10107-10112.)。本項ではタバコ BY-2 細胞を使用するため、タバコにおける *TOM1* ホモログの構造と機能を調べた。タバコにはシロイヌナズナ *TOM1* の機能的ホモログが少なくとも3種(*NtTOM1*, *NtTOM3*, *NtTOMa1*)存在した。タバコ植物体では、*NtTOM1* と *NtTOM3* を RNAi によりノックダウンすると、TMV の増殖が強く抑制された(Asano *et al.* [2005] に発表:6章「成果発表」参照)。タバコにおいても *TOM1* ホモログが TMV の増殖に必要であることが確認されたので、*TOM1* ホモログが関与するステップの前で BYL における TMV RNA 複製反応を一旦停止させることを目的として、BY-2 細胞で *NtTOM1*, *NtTOM3*, *NtTOMa1* を RNAi で同時にノックダウンすることを試みた。その結果、TMV の増殖がある程度抑制される形質転換ラインを得ることができたが、TMV の増殖が強く抑制される株を得ることはできなかった(*in vivo* でも *in vitro* でも)。このため、*TOM1* のノックダウンを用いたアプローチは断念した。

TMV の複製タンパク質は、小麦胚芽抽出液あるいはウサギ網状赤血球ライセート等生体膜を含まない翻訳系においても合成される。一方、RNA 複製複合体は生体膜上に形成される。そこで、生体膜を除去した BYL を用いれば、複製タンパク質の合成後、RNA 複製複合体形成反応を途中で停止させられ

るのではないかと考えた。超遠心で生体膜を除去した BYL (S30; membrane-depleted BYL: mdBYL) 中で TMV RNA を翻訳すると複製タンパク質が合成された。しかし、そこにリボヌクレオシド三リン酸を加えても、TMV RNA の複製は(マイナス鎖 RNA 合成も)起こらな

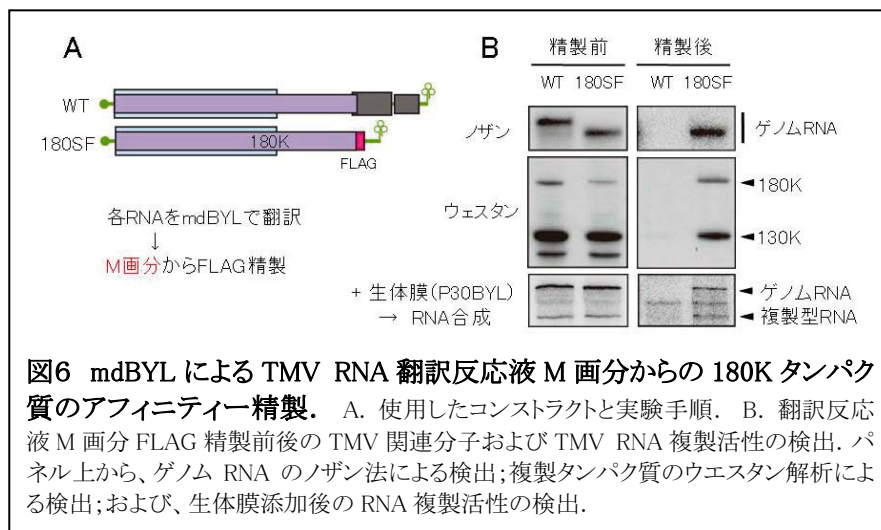
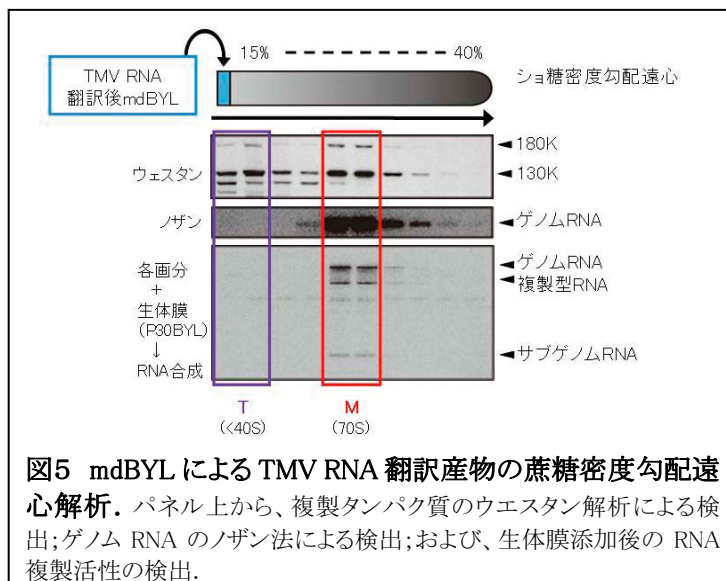


かった。そこで、S30 BYL 翻訳反応液に翻訳阻害剤ピュロマイシンを添加した後、リボヌクレオシド三リン酸とBYL由来の生体膜 (P30 BYL) を加えたところ、TMV RNA の複製が起きた(図 4)。これらの結果から、mdBYL 反応液中の TMV 複製タンパク質の少なくとも一部は、マイナス鎖 RNA を合成する能力を獲得しうること、マイナス鎖 RNA 合成能を獲得するには生体膜と結合することが必要であることが示唆された。

この mdBYL 反応液中では TMV 複製複合体の膜に結合する直前の前駆複合体が形成されている可能性が考えられたため、その実体が何かを明らかにすることを目的として、TMV RNA を翻訳した mdBYL 反応液を遠心分離に供した。その結果、複製タンパク質は沈降係数の異なる2つの形態(沈降係数 40S 以下と約 70S)で存在しており、約 70S の画分には 130K、180K 複製タンパク質と ToMV ゲノム RNA が含まれること、BYL 由来の生体膜 (P30 BYL) とリボヌクレオシド三リン酸を添加すると、約 70S の画分のみが TMV RNA 複製活性を示すことが明らかになった(図 5)。この画分に存在する 130K、180K タンパク質が TMV RNA と複合体を形成しているかを明らかにするため、180K タンパク質の C 末端にアフィニティー精製用タグ (FLAG-StrepII) をもつ TMV 誘導体(複製能を維持していることを確認) RNA を構築して、mdBYL で翻訳し、約 70S の画分から 180K タンパク質をアフィニティー精製した。すると、180K タンパク質とともに、130K タンパク質および TMV RNA が共精製された。さらに、精製物に BYL 由来の生体膜 (P30 BYL) とリボヌクレオシド三リン酸を添加すると、TMV 誘導体 RNA の複製が観察された。このことから、少なくとも

TMV RNA、130K タンパク質および 180K タンパク質を含む複合体が複製複合体の前駆体であることがわかった(図 6)。我々は、これを

pre-membrane targeting complex (PMTC) と命名した。この結果は、複製複合体の形成過程において、膜に結合した複製タンパク質が膜上でゲノム RNA を複製複合体に引き込むというよりむしろ、細胞質中でまず複製タンパク質とゲノム RNA が複合体を形成してから膜上に標的化される可能性を支持するものである。

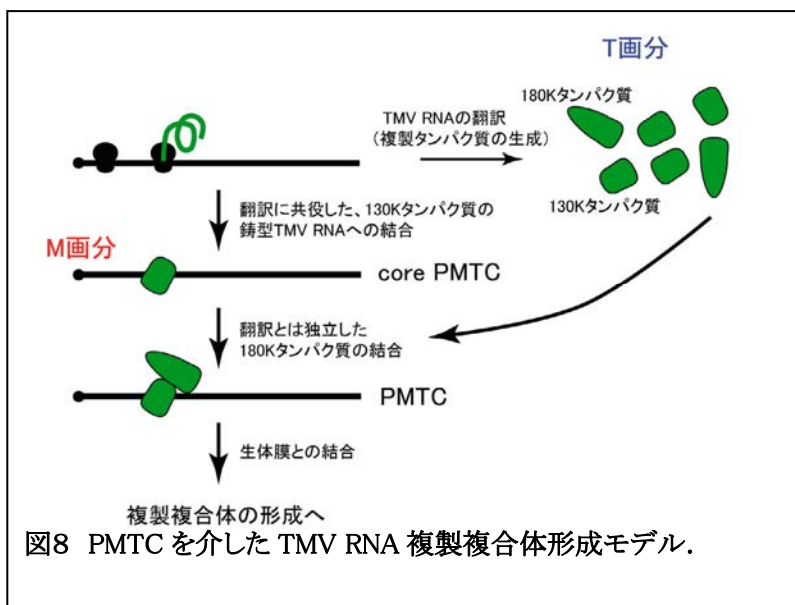
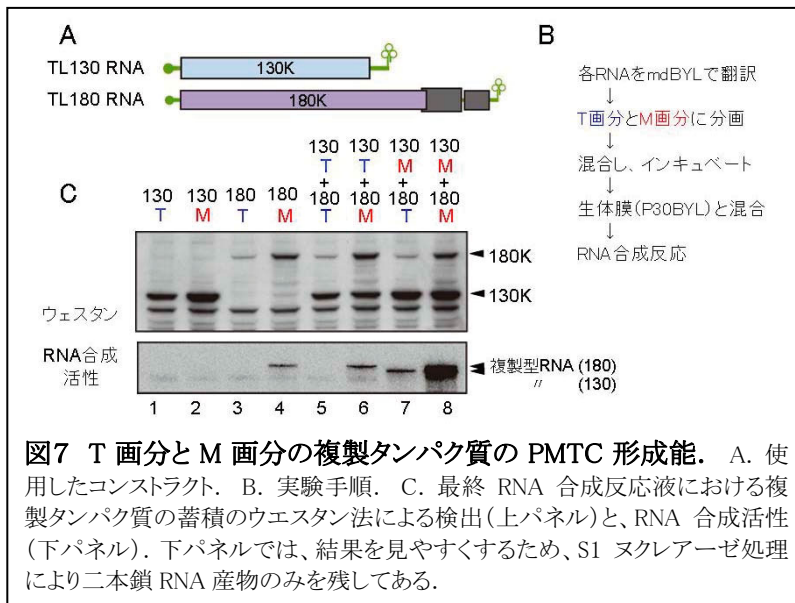


一方、沈降係数 40S 以下の画分中の複製タンパク質に、生体膜、ゲノム RNA、および BYL 反応液成分など複製複合体形成に必要なすべての因子を添加しても、ウイルス RNA 合成活性は検出されなかった。この結果から、ウイルス複製複合体構成因子を単に試験管内で混合しても、PMTC や複製複合体は形成されず、PMTC の形成過程が翻訳と共役している可能性が示唆された。

PMTC の形成過程をより詳しく調べるため、130K あるいは 180K タンパク質のみを発現する TMV RNA 誘導体を作製し、それぞれを別に mdBYL で翻訳し、沈降係数 40S 以下と約 70S の画分に分画した。これらの画分を単独あるいは混合して膜と混ぜ、RNA 合成を行った。まず、180K タンパク質のみを発現する TMV RNA 誘導体は低効率ながら単独で複製可能なので、この誘導体の約 70S の画分を BYL 由来の生体膜と混合すると当該 RNA の複製が観察された。一方、130K タンパク質のみを発現する TMV RNA 誘導体(単独では複製できない)の約 70S の画分と、180K タンパク質のみを発現する TMV RNA 誘導体の 40S 以下の画分は単独では RNA 合成活性を示さなかったが、これらを混合すると 130K タンパク質のみを発現する ToMV RNA 誘導体が複製された(図 7)。以上の結果を総合して、我々は、TMV

RNA の翻訳と共役して 130K タンパク質が翻訳鋳型(つまり TMV RNA)と結合して複合体(core PMTC と仮称)を形成し、これを核として 180K タンパク質を含む複製タンパク質が分子集合し、PMTC を形成するというモデルを考えている(図 8)。本項の以上の結果は Komoda *et al.* (2007) に発表した(6章「成果発表」参照)。

Lewandowski と Dawson は 130K タンパク質と 180K タンパク質を個別にコードする変異トバモウイルス RNA を合成し、植物細胞に共感染させ、鋳型選択における各複製タンパク質の役割を解析した。植物細胞内において、130K タンパク質のみをコードする RNA は 180K タンパク質をコードする



RNA(ヘルパーウイルス)と共感染させた場合にのみ複製された。しかし、130K タンパク質の ORF にフレームシフト変異を導入した RNA では、ヘルパーウイルスと共感染させても複製されなかった (Lewandowski and Dawson, 2000. Functions of the 126- and 183-kDa proteins of *Tobacco mosaic virus*. *Virology* 271: 90-98.)。生体内でのこの結果も、試験管内系から得られた図8のモデルを支持するものである。他のプラス鎖 RNA ウイルスのいくつかでは、特定の RNA 領域が鋳型認識の過程で重要な役割を果たすことがわかっているが、130K タンパク質が翻訳鋳型と結合して PMTC を形成する際、特定の RNA 配列を要求するかなどは今後解明すべき問題点である。トバモウイルスを含め、非分節ゲノムをもつプラス鎖 RNA ウイルスの複製タンパク質の鋳型選択の *cis* 嗜好性は広く知られた事実であるが、試験管内系で見られた翻訳と PMTC 形成の共役はこれをよく説明するものである。

我々は、さらに、PMTC に宿主因子が含まれるかを検討するために、PMTC を精製し、共精製された宿主タンパク質をいくつか同定した。この部分についての成果は論文未発表のため、データを含む結果の詳細は補足資料に記載する。

(2) 研究成果の今後期待される効果

真核生物を宿主とするプラス鎖 RNA ウイルスにおいて、複製複合体が RNA 合成能を獲得する前の中間体(PMTC)が捉えられたのはこれが初めてである。この結果が、どれだけ広く他のウイルスに拡張できるかは、今後の研究を待たねばならない。ただし、ピコルナウイルス(ポリオウイルス等)、フラビウイルス(C型肝炎ウイルス等)では、複製に関与するタンパク質が膜貫通領域を含むポリプロテインとして合成されるので、複製タンパク質が合成される段階で、膜との結合が保証されており、複製複合体形成機構において TMV とは異なった側面をもつと思われる。

PMTC に含まれると考えられる宿主因子をいくつか同定したが(補足資料)、これらが実際に PMTC 形成あるいは TMV RNA 複製に関与するかは、今後の研究を待たねばならない。また、PMTC に複製タンパク質あるいは宿主因子が何分子ずつ含まれ、どういう順序で分子集合が起こるか等の問題については、今後、別課題により解析を継続する予定である。

3. I. 3 TMV RNA に結合し、増殖を抑制する宿主因子 BTR1 の同定

(1) 研究実施内容及び成果

プラス鎖 RNA ウイルスのゲノム RNA の 5'および 3'末端近傍領域はウイルス RNA の翻訳、複製に重要な役割を果たすことが知られている。本項では TMV 増殖制御に関わる宿主因子を同定するため、これら末端近傍領域と結合する植物細胞由来因子の同定を試みた。

TMV RNA の 5'末端から 277 塩基もしくは 3'末端から 218 塩基の領域(図9A)にストレプトマイシン結合性の RNA

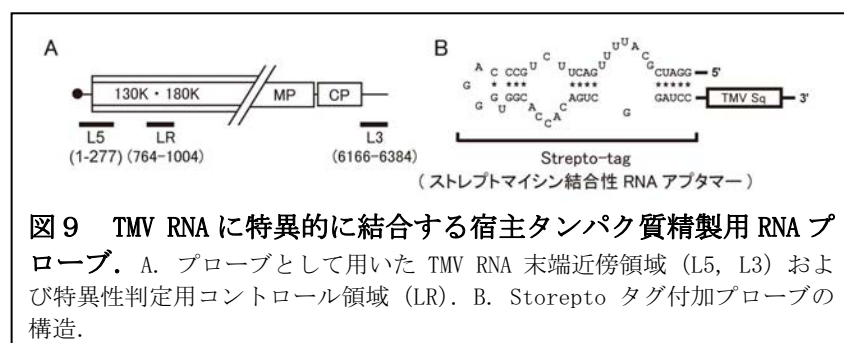


図9 TMV RNA に特異的に結合する宿主タンパク質精製用 RNA プローブ。A. プローブとして用いた TMV RNA 末端近傍領域 (L5, L3) および特異性判定用コントロール領域 (LR)。B. Storepto タグ付加プローブの構造。

モチーフ(ストレプトタグ: Bachler *et al.*, 1999. StreptoTag: a novel method for the isolation of RNA-binding proteins. *RNA* 5: 1509-1516: 図9B)を付加したRNAをシロイヌナズナの脱液胞化プロトプラスト抽出液(膜を除去した可溶性画分: S30)と混合し、RNA-タンパク質複合体を形成させ、ストレプトマイシンを結合したセファロースビーズを用いてアフィニティー精製した。その結果、いくつかのタンパク質バンドが特異的に共精製された。これらをLC-MS/MS法により解析し、約30種類の候補タンパク質を同定した。5'末端領域を用いて精製したサンプルに見いだされたタンパク質バンドの一つはRNA結合能をもつタンパク質に広くみられるheterogeneous nuclear ribonucleoprotein K homology domain (KHドメイン)を3個有し、シロイヌナズナにおける機能は知られていなかった。我々はこれをBTR1(Binding to TMV RNA1)と名づけた。動物ではポリC結合タンパク質の一種でKHドメインをもつPCBP2(α CP2)が、ポリオウイルスRNAの5'末端領域に結合して、ウイルスRNAからの翻訳効率を高めることが報告されている(Blyn *et al.* 1997. Requirement of poly(C) binding protein 2 for translation of poliovirus RNA. *J. Virol.* 71: 6243-6246.)。

BTR1タンパク質は、TMV RNAの130Kタンパク質開始コドン近傍に特異的に結合した。さらに、BTR1の生体内でのウイルス増殖への関与を検討するために、当該因子のノックアウト株におけるTMV増殖を調べたところ、TMVの増殖は野生型Col-0に比べて昂進していた。逆にBTR1を過剰発現させると、TMVの増殖効率の低下が認められた。これらのBTR1の発現攪乱は植物の生育に目立った影響を及ぼさなかった。以上のことから、BTR1はTMV RNAの5'末端領域に結合し、TMVの増殖を特異的に阻害することが示唆された。以上の成果は論文未発表のため、データを含む結果の詳細は補足資料に記載する。

(2) 研究成果の今後期待される効果

本項の結果は、ウイルスRNAあるいはウイルスがコードするタンパク質に結合する宿主因子が、必ずしもウイルスの増殖に正に働くわけではなく、阻害的に働く場合もあることを実際に示したものである。我々は、他の研究課題においてトマトのTMV抵抗性遺伝子 *Tm-1* を同定し、これがTMVの複製タンパク質に結合して複製を阻害することを示した(Ishibashi *et al.* 2007. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 13833-13838.)。また、動物ウイルスでも、ウイルス側因子の機能阻害を起こす宿主因子の存在が明らかにされている。例えば、アカゲザルの細胞に存在するTRIM5 α は、*Human immunodeficiency virus*の増殖を抑制することが知られている。これらの知見は、あるウイルスがある宿主(非宿主)において増殖できない原因が、ウイルス側因子が自らの増殖のために宿主因子を利用できないことにある場合とともに、宿主がウイルス増殖を阻害する因子をもっていることにある場合もあることを示している。これまでのウイルス研究は専ら、ウイルスの増殖を許容する宿主を用いて、ウイルスの増殖を正に制御する因子に焦点を当ててきた。しかし、上記の知見は、ウイルス増殖を負に制御する因子の存在とウイルス増殖を考える上での重要性を示唆している。ウイルスの増殖を許容する宿主において、ウイルスは既に阻害的な宿主因子の作用から逃れるように進化を遂げていると考えられる。非宿主にも目を向ければ、ウイルス増殖の阻害に有効に利用できるウイルス抵抗性遺伝子を発掘できる可能性がある。

3. II TMV 複製複合体の構成要素の同定と各因子の機能解析(独立行政法人農業生物資源研究所 石川グループ; 秋田県立大学 鈴木グループ)

3. II. 1 TMV 複製複合体に含まれる複製タンパク質の性質

(1) 研究実施内容及び成果

真核生物を宿主とするプラス鎖 RNA ウイルスの複製複合体は知られる限り例外なくオルガネラ膜の細胞質側表面に形成される。いくつかのウイルスでは電子顕微鏡観察により複製複合体の形態が記述されているものの、複製複合体がどのような因子を含むか等、生化学的な知見はどのウイルスに関しても皆無に近い。過去にもウイルス感染植物細胞を破碎して得た膜画分にウイルス特異的 RNA 合成活性が検出され、それらに関して多くの研究が行われた。しかしながら、恐らく細胞破碎時に液胞から漏出した各種分解酵素のコンタミネーションにより、生体内を反映した RNA 合成活性に基づく精密な生化学的解析は不可能に近かった。我々は、脱液胞化の手法を用いて RNase 活性の混入を避けることにより、生体内と同様のパターンで RNA 合成を行う TMV RNA 複製複合体を得、その性質を明らかにすると同時に、複製複合体の構成因子を同定しようと考えた。

生化学的解析に必要な大量の TMV 感染タバコ BY-2 培養細胞を TMV 誘導感染系[研究実施内容 (V) 参照]を用いて調製した。得られた感染細胞から脱液胞化プロトプラストを調製し、破碎することにより、生体内で形成された複製複合体を含む膜画分を得た。その膜画分は、生体内と同様のパターンで TMV 関連 RNA を合成する活性を有していた。この標品を材料として複製複合体の性質を解析した。

TMV 感染誘導 BY-2 細胞由来の脱液胞化プロトプラスト抽出液は TMV 感染プロトプラストと同様のパターンで 1 本鎖および 2 本鎖 TMV RNA を合成する活性を有していた。この活性は、膜に結合しており(図10)、1 M NaCl で処理しても膜に結合したまま活性を維持した。しかし、この活性は 0.1 M Na_2CO_3 処理により失活し、複製タンパク質および複製の鋳型であるマイナス鎖 RNA は膜から解離した。これらの結果は、複製複合体が膜の表面に強く結合していることを示唆している。複製複合体の TMV RNA 合成活性は調べた限りほとんどの界面活性剤による処理で極度に低下した。膜に結合した複製タンパク質を界面活性剤 Triton X-100 で処理して密度勾配遠心法により解析したところ、複製タンパク質は TritonX-100 処理により非常に速く沈降するアグリゲートを形成する

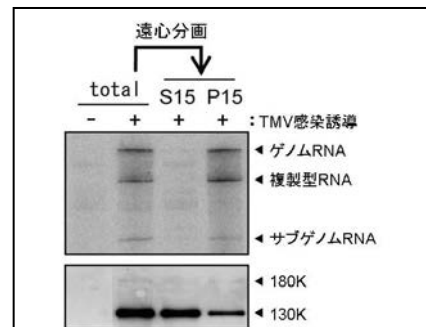


図10 TMV 感染誘導 BY-2 細胞由来の脱液胞化プロトプラスト抽出液による TMV 関連 RNA 合成. TMV 感染誘導(+)あるいは非誘導(-) BY-2 プロトプラストを脱液胞化しライセートを調製した. さらに、そのライセートを 15000g の遠心により膜を含む沈殿 (P15) と膜を含まない上清 (S15) に分画した。それぞれに ^{32}P 標識したリボヌクレオシド三リン酸を加えて RNA を合成した後、産物を PAGE とオートラジオグラフィにより解析した (上パネル)。また、ウェスタン解析により 130K, 180K タンパク質を検出した (下パネル)。

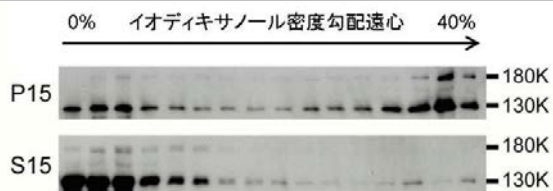
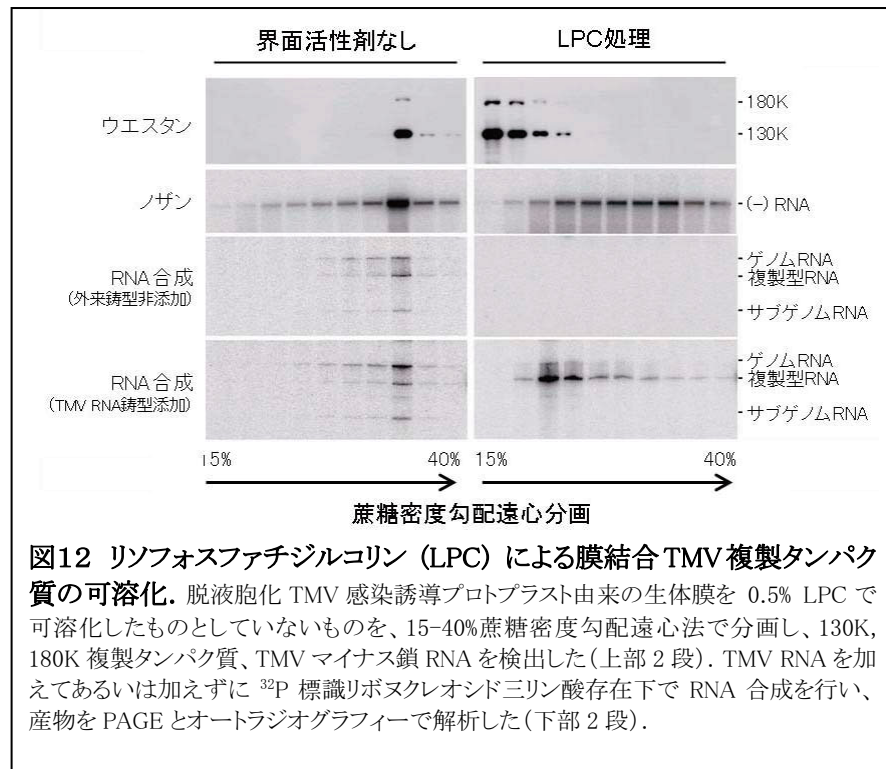
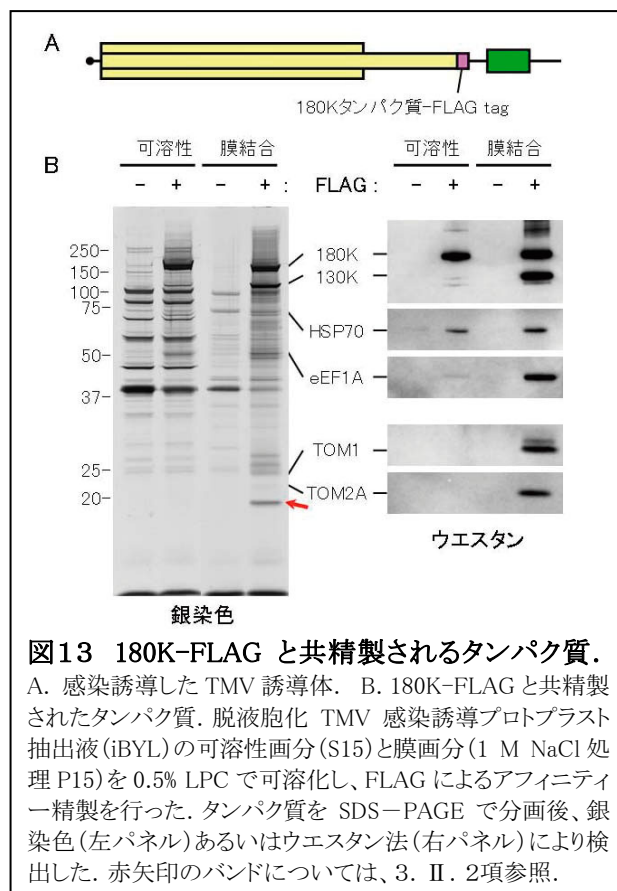


図11 膜結合 130K, 180K タンパク質の Triton X-100 添加によるアグリゲート形成. TMV 感染誘導 BY-2 細胞を脱液胞化したプロトプラストよりライセートを調製し、それを遠心 (15,000g) して得た生体膜を 1% Triton X-100 で処理した (P15; 上パネル). また、ライセートの遠心上清 (S15) も 1% Triton X-100 で処理した (下パネル). これらのサンプルを 0-40%イオディキサノール密度勾配遠心により分画し、ウェスタン解析により複製タンパク質を検出した。

ことが明らかになった。一方、膜に結合していない複製タンパク質は、Triton X-100 処理しても密度勾配遠心においてほとんど沈降せず、可溶性の状態を保った(図11)。これらの知見から、膜が複製複合体の活性発現そして恐らくは構造維持に非常に重要であること、膜に結合した複製タンパク質は、膜に結合していない複製タンパク質とは大きく異なるコンフォメーションをとっている可能性が示唆された。



複製複合体の可溶化を目指して試した約 20 種の界面活性剤のうち、唯一リソフィスファチジルコリン (LPC) が TMV の複製タンパク質を、RNA 合成活性を保ったまま可溶化できる(RNA 合成パターン等の性質は変化するものの)ことを見いだした(図12)。さらに、LPC で可溶化した TMV RNA-依存 RNA ポリメラーゼ (RdRp) を精製し、構成因子の解明をめざした。そのために、180K タンパク質の C 末端にアフィニティー精製用タグ (FLAG-StrepII) をもつ TMV 誘導体を誘導感染できる BY-2 細胞を作製した。その感染誘導細胞から脱液胞化プロトプラスト抽出液を得、そこから 1M NaCl 処理と分画遠心法を用いて、複製複合体を含む膜画分を得た。さらに LPC で可溶化後、FLAG-StrepII を用いたアフィニティー精製により、TMV RNA を鋳型として相補鎖 RNA を合成する活性を含む精製画分を得た。この画分を SDS-PAGE で分離後、ウェスタン法および LC-MS/MS 法により解析したところ、NtTOM1, NtTOM2A, 翻訳伸長因子 eEF1A, HSP70 を含む複数の宿主因子と 130K タンパク質が共精製されていることが明らかになっ



た。興味深いことに、可溶性画分の 180K-FLAG-strepII とは少量の 130K タンパク質および eEF1A, HSP70 しか共精製されなかった(図13)。以上の結果は、Nishikiori *et al.* (2006) に発表した(6章「成果発表」参照)。

(2) 研究成果の今後期待される効果

研究実施内容(Ⅰ)の結果とあわせて本項の結果は、複製タンパク質が RNA 合成能を獲得するためには、翻訳後 PMTC を形成したうえで膜に結合し、いくつかの宿主タンパク質と結合する、という複数のステップを踏んで複製複合体中の複製タンパク質にみられるコンフォメーションを獲得する必要があると推定される。ウイルスが RNA サイレncing を回避するためには、マイナス鎖 RNA を複製複合体内部に封じ込めると同時に、細胞質での不用意なマイナス鎖 RNA 合成を厳しく制限することが必要であると考えられる。従って、膜表面に複製複合体を形成し、細胞質から隔離された環境を作り出して、その中でのみマイナス鎖合成が起きるように複数の関門が設けられていることは合理的と考えられる。膜貫通領域をもたない複製タンパク質をコードする他の真核生物プラス鎖 RNA ウイルスにおいても、TMV にみられたような巧みな RNA 合成能獲得制御機構が存在するのか、今後の解析が待たれる。

3. II. 2 TMV RNA の複製に必須な新規宿主因子の同定

(1) 研究実施内容及び成果

前項で述べたように、180K タンパク質の C 末端にアフィニティー精製用タグ (FLAG-StrepII) をもつ TMV 誘導体を感染誘導した BY-2 細胞から得た、複製複合体を含む膜画分を LPC で可溶化後、FLAG-StrepII を用いたアフィニティー精製すると、NtTOM1, NtTOM2A, eEF1A, HSP70 および 130K タンパク質が共精製された。さらに、図13の赤矢印のバンドを LC-MS/MS 法により解析したところ、低分子量 GTP 結合タンパク質、ADP リボシル化因子様タンパク質のひとつと同定された。シロイヌナズナゲノムには当該遺伝子を含め、酷似したアミノ酸配列をコードする遺伝子が 4 つコードされている。そこでそれぞれの遺伝子についてシロイヌナズナ T-DNA 挿入変異株を入手し、トバモウイルス増殖への影響を調べた。当該各遺伝子の単独変異はトバモウイルス増殖に影響を及ぼさなかったが、特定の組み合わせの二重変異は TMV の接種葉における増殖を抑制した。このことから、この遺伝子の野生型産物はトバモウイルスの増殖に必要であることが強く示唆された。以上の成果は論文未発表のため、データを含む結果の詳細は補足資料に記載する。

当該遺伝子のウイルス増殖への関与あるいは宿主における機能については、トバモウイルスの複製への関与も含めこれまでに報告がない。ポリオウイルスの感染によって ADP リボシル化因子ファミリータンパク質のいくつかは膜にリクルートされることが報告され、これらのタンパク質が RNA 複製に関与する可能性が示唆されているが (Belov *et al.* 2005. Poliovirus proteins induce membrane association of GTPase ADP-ribosylation factor. *J. Virol.* 79: 7207-7216.)、ポリオウイルス RNA 複製への関与を直接支持する証拠は得られていない。

(2) 研究成果の今後期待される効果

本 CREST 課題申請時、ウイルスの増殖にかかわる宿主因子検索のフォワードジェネティクスアプローチに限界がある理由のひとつに、遺伝子機能の重複を挙げ、これを乗り越えるために生化学的アプローチが必要であることを指摘した。本項では、この予想通り、遺伝子の重複により、単独

の欠損では形質の見えない遺伝子を生化学的に同定することができた。これまでも、TMV を含むプラス鎖 RNA ウイルスの RNA 複製にかかわる宿主因子を、複製タンパク質との共精製により同定しようという試みは多数なされてきたが、成功例はほとんどなかった。今回の成功は、脱液胞化によるプロテアーゼ等の排除と、最適界面活性剤の徹底した吟味によると思われる。この成果は、他のプラス鎖 RNA ウイルスの複製関連因子検索の道標となると思われる。当該因子の TMV RNA 複製における機能の詳細については、今後別課題にて解析してゆく予定である。

3. III TMV RNA 複製と細胞間移行の連携機構の解析(独立行政法人農業生物資源研究所 飯グループ、石川グループ; 秋田県立大学 鈴木グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

ウイルスが植物体で増殖するためには、1 細胞内での複製に加え感染域の拡大が必要である。我々は、MP によるプラスモデスマータを介した隣接細胞への物質の移行が、TMV の複製と同時に起こることにより促進されることを見いだした (Tamai *et al.* 2001. Tobamoviral movement protein transiently expressed in a single epidermal cell functions beyond multiple plasmodesmata and spreads multicellularly in an infection-coupled manner. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14:126-134.)。また、複製タンパク質コード領域の変異が隣接細胞への移行に影響を与える事例も発見された。これらの知見は従来 RNA 複製後に複製とは独立に起こると考えられてきた細胞間移行が、複製と緊密に連携していることを示唆する。さらに想像をたくましくすれば、新生 TMV RNA の選別と細胞間移行経路への導入を司るマシナリーが複製複合体に物理的に近接して存在する可能性が考えられた。そこで、本項では MP と相互作用する因子を同定し、シロイヌナズナ等の植物における当該遺伝子の発現の攪乱が TMV の複製と細胞間移行に与える影響を調べることでそれらの機能を明らかにしようと考えた。

アフィニティー精製用タグ (FLAG-StrepII) を C 末端に付加した移行タンパク質 (MP) をコードする TMV を作製した。このウイルスは植物に感染し、野生型 TMV と同様の病徴を現したことから、細胞間移行能を保持していると考えられた。このウイルスを BY-2 細胞に感染させ、感染細胞抽出液をいくつかの方法で分画したところ、MP は可溶性画分と膜画分の両方に検出された (図14)。この挙動はタグを付加していない MP と同様であった。

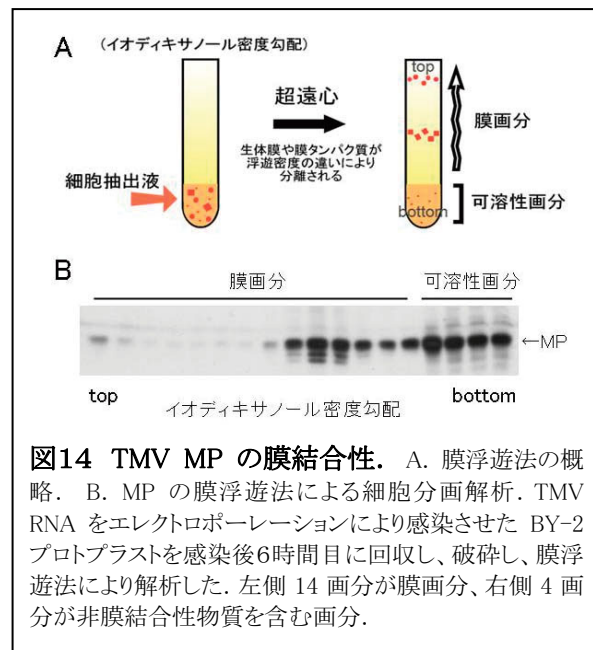


図14 TMV MP の膜結合性. A. 膜浮遊法の概略. B. MP の膜浮遊法による細胞分画解析. TMV RNA をエレクトロポレーションにより感染させた BY-2 プロトプラストを感染後6時間目に回収し、破碎し、膜浮遊法により解析した. 左側 14 画分が膜画分、右側 4 画分が非膜結合性物質を含む画分.

まず可溶性画分から FLAG, StrepII 各タグによるアフィニティー精製を行ったところ、共通して宿主由来の熱ショックタンパク質 HSP70 が共精製された (図15)。植物プラス鎖 RNA ウイルスであるクロステロウイルスが HSP70 ホモログをゲノム上にコードし、しかもそれが細胞間移行に必要であることから、MP と HSP70 の共精製も興味深い結果である。今後、HSP70 と MP の共精製の生物学的意味を解明する必要がある。

一方、膜結合性の MP を、LPC(前述:複製タンパク質を RNA 合成活性を保ったまま可溶化できる界面活性剤)で可溶化し、アフィニティー精製すると、HSP70 の他に約 75 kDa, 55 kDa の宿主由来と思われるタンパク質が共精製された(図15)。共精製された宿主タンパク質を LC-MS/MS 法により同定したところ、Methylcrotonyl-coenzyme A Carboxylase の A サブユニット(55 kDa)と B サブユニット(75 kDa)であることが判明した。この酵素は、ミトコンドリアに局在し、ロイシンの代謝に関与する。このタンパク質が TMV 細胞間移行に関与するか否かを検討するため、当該遺伝子のいずれかに T-DNA 挿入をもつシロイヌナズナに TMV を接種して接種葉におけるウイルス外被タンパク質の蓄積を調べたところ、いずれの株においても野生株と同様の蓄積が観察された。当該遺伝子はシングルコピーと考えられ、これらの結果は、残念ながら当該遺伝子が TMV の細胞間移行に関与することを否定するものであった。MP 共精製物をウエスタン法で解析すると、少量の TMV 複製タンパク質が検出されたが、シグナルが微弱で、意味があるものか否かは現在のところ不明である。

(2) 研究成果の今後期待される効果

前述の BTR1、Tm-1 と同様、ウイルスの増殖を正に制御するわけではないにもかかわらずウイルス側因子と特異的に結合する宿主因子を同定した。Methylcrotonyl-coenzyme A Carboxylase の場合、ミトコンドリア内に局在するので、その存在がウイルスの細胞間移行に影響することは考えにくい。しかし、このようなタンパク質の存在は、ウイルスが増殖の場として経験をしたことのないコンパートメントあるいは非宿主細胞には、期せずしてウイルス側因子と強く結合する因子が存在しうることを示唆する。このような相互作用は、多くの場合ウイルス増殖に対して負に働くであろう。ウイルスは、宿主への適応の過程で、このような負の相互作用から逃れるように進化して、効率のよい増殖効率を獲得すると想像される。このような宿主因子をウイルス増殖の場となるコンパートメントで発現させれば、当該ウイルスへの抵抗性が導入できる可能性がある。

3. IV TMV 複製タンパク質による RNA サイレンシング抑制機構の解析(独立行政法人農業生物資源研究所 飯グループ、石川グループ)

3. IV. 1 可溶性複製タンパク質の RNA サイレンシング抑制への関与

(1) 研究実施内容及び成果

ウイルスが増殖するためには、複製、感染域の拡大に加えて宿主抵抗性からの回避が必要であ

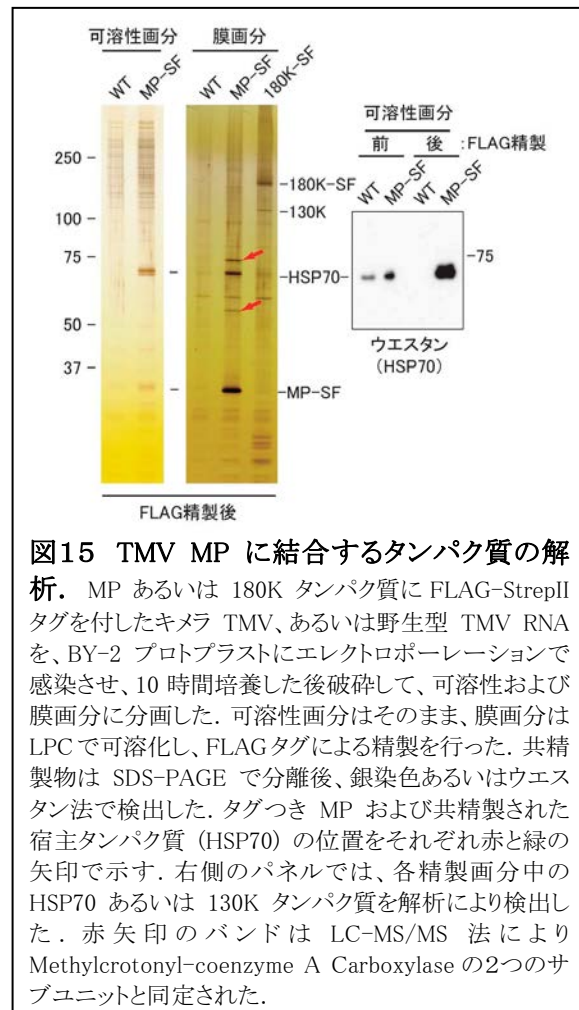


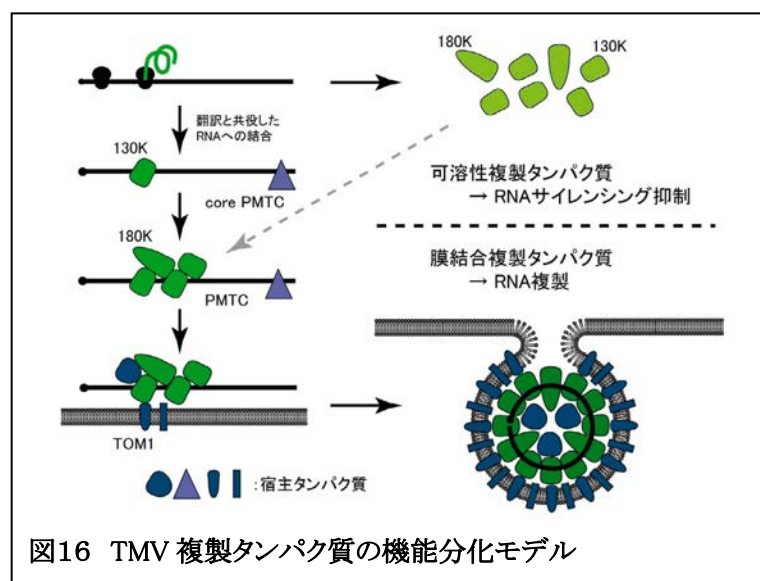
図15 TMV MP に結合するタンパク質の解析. MP あるいは 180K タンパク質に FLAG-StrepII タグを付したキメラ TMV、あるいは野生型 TMV RNA を、BY-2 プロトプラストにエレクトロポレーションで感染させ、10 時間培養した後破碎して、可溶性および膜画分に分画した. 可溶性画分はそのまま、膜画分は LPC で可溶化し、FLAG タグによる精製を行った. 共精製物は SDS-PAGE で分離後、銀染色あるいはウエスタン法で検出した. タグ付き MP および共精製された宿主タンパク質 (HSP70) の位置をそれぞれ赤と緑の矢印で示す. 右側のパネルでは、各精製画分中の HSP70 あるいは 130K タンパク質を解析により検出した. 赤矢印のバンドは LC-MS/MS 法により Methylcrotonyl-coenzyme A Carboxylase の2つのサブユニットと同定された.

る。植物がもつ RNA サイレンシングは、ウイルスに対する抵抗性の一種と考えられるが、これに対し、多くの植物ウイルスは RNA サイレンシングを抑制する機能をもっている。我々は、TMV の 130K 複製タンパク質が RNA サイレンシングを抑制することを見いだした。本項では 130K 複製タンパク質による RNA サイレンシング抑制機構の解明を目的とした。

導入した GFP 遺伝子が RNA サイレンシングを起こしたタバコ植物 (Sm2 株) に TMV を接種すると、モザイク症状を現した葉の黄色部 (TMV が高濃度で蓄積している部分) で GFP 発現が回復した。このとき、GFP mRNA 蓄積レベルは非接種植物に比して顕著に上昇していた。GFP 発現の回復 (RNA サイレンシングの抑制) は 130K タンパク質コード領域に変異をもつ弱毒変異株 L11 の感染によっては起こらなかったことから、これが TMV 130K タンパク質によって起こることが示唆された。RNA サイレンシングの抑制が 130K タンパク質により起こることは、アグロインフィльтраーション実験によっても示唆された。これらの結果は、Kubota *et al.* (2003) に発表した (6 章「成果発表」参照)。

TMV の弱毒株 L11 の 130K タンパク質は野生型 (強毒株) の 130K タンパク質より低い RNA サイレンシング抑制能をもつ。そこで、L11 と野生株の 130K タンパク質の性質の比較を通して RNA サイレンシング抑制機構を明らかにしようと考えた。BY-2 プロトプラストに L11 あるいは野生株 TMV RNA をエレクトロポレーション法により感染させ、ウイルス関連 RNA の蓄積と合成活性を調べたところ、少なくとも感染後 24 時間後までは、両株間で大きな違いは見出されなかった。一方、ウイルスがコードするタンパク質の蓄積と様態を細胞分画法により詳細に調べたところ、L11 感染細胞中では非膜結合状態にある 130K タンパク質の蓄積レベルが低いことがわかった。非膜結合状態にある 130K タンパク質の量的低下が RNA サイレンシング抑制不全を説明しうるかを問うために、我々は TOM1 を用いて別角度から検討を加えた。前述のように、宿主膜タンパク質 TOM1 は、TMV の複製タンパク質の膜結合に関与していると考えられている。そこで、130K タンパク質を過剰に膜に結合させ、非膜結合状態にある 130K タンパク質の量を低下させる目的で、TOM1 を過剰発現させた。TOM1 過剰発現株では、実際に、非膜結合 130K タンパク質の量が低下するとともに、RNA サイレンシング抑制能も同時に低下した。これらの結果から、可溶性の 130K タンパク質が RNA サイレンシング抑制にかかわる可能性が考えられた。これらの成果は論文未発表のため、データを含む結果の詳細は補足資料に記載する。

以上と研究実施内容 (I)、(II) の結果とあわせて、TMV 複製タンパク質が合成後 (あるいは合成途上から)、以下のような機能分岐を遂げている可能性が考えられる。すなわち、(i) TMV の複製タンパク質は合成された後 (あるいは合成途上から)、相互変換が容易には起こらない二つの様態をとる; (ii) そのうちのひとつの様態 (PMTC) は、リボソームにも匹敵する大きな沈降係数を示し、生体膜と混合すると活性のある複製複合体を形成する。複製複合体中の複製タンパク質は生体膜および宿主因子との相互作用の結果、RNA 合成能をもつ特別なコンフォメーションを獲得していると考えられる; (iii) もうひとつの様態はより小さな沈降係数を示し、複製複合体を形成することはできないが、RNA サイレンシング抑制に関与する。この可溶性の複製タンパク質は、TOM1 の過剰発現あるいは L11 変異により効率よく膜表面に捕捉される。膜上に捕



捉された複製タンパク質は RNA サイレンシング抑制能力を失う;というモデルである(図16)。

(2) 研究成果の今後期待される効果

複製タンパク質の多機能性について、翻訳後限られた複製タンパク質分子が、RNA、タンパク質、生体膜との逐次的相互作用を経て RNA 合成能をもつコンフォメーションを獲得する一方、可溶性複製タンパク質は別のコンフォメーションをとり、RNA サイレンシングの抑制因子として機能するという作業モデルが構築できた。今後、このモデルの鍵を握る「コンフォメーションの違い」がいかなるものか、構造生物学的研究の展開が望まれる。

3. IV. 2 植物における RNA サイレンシングの生化学的解析のための基盤構築

(1) 研究実施内容及び成果

二本鎖 RNA 切断酵素 Dicer による small interfering RNA (siRNA) の生成から標的特異的エンドヌクレアーゼ RNA-induced silencing complex (RISC) の形成に至る分子機構は、主としてショウジョウバエの胚の細胞抽出液を用いた生化学的解析により明らかにされた。植物にも、ショウジョウバエで明らかにされた経路上で機能する因子の多くについてホモログがあり、いくつかの遺伝学的解析結果は、ショウジョウバエと植物における RISC 形成機構の相同性を示唆している。実際、植物ウイルスがコードするいくつかの RNA サイレンシングサプレッサーがショウジョウバエの胚の細胞抽出液を用いた RISC 形成反応を阻害することが知られている。しかし、植物は多数の Dicer-like (DCL) タンパク質、および、siRNA を結合し、RISC のエンドヌクレアーゼ活性を担う Argonaute (AGO) タンパク質をコードし、これらが互いに機能分化を遂げていること、siRNA の 3' 末端リボースの 2' 水酸基が RNA メチル化酵素 HEN1 によりメチル化を受けることが siRNA の安定性と RISC 形成に重要であることなど、独自性をもつことも知られている。従って、植物における RNA サイレンシング誘起機構を解明し、植物ウイルスがコードする RNA サイレンシングサプレッサーの作用機作を正確に理解するには、植物細胞抽出液を用いて RNA サイレンシング関連反応を再現する実験系を確立する必要がある。本項では、BYL を用いた RNA サイレンシングの生化学的解析手法の基盤確立を目指した。

まず、非形質転換・非感染 BY-2 より調製した BYL に二本鎖 RNA を添加して RISC 形成に至る過程の試験管内での再現を試みた。その結果、二本鎖 RNA を約 25 ヌクレオチドの断片と約 21 ヌクレオチドの断片に切断する Dicer 様活性が検出された。残念ながら、現在までのところ、BYL に長鎖二本鎖 RNA を添加することにより、対応する RISC 活性を誘導するには至っていない。

次に、そもそも BY-2 細胞において TMV 感染によって TMV RNA を標的とした RNA サイレンシングが誘導されるのかを調べた。TMV の弱毒株 L11 の 130K タンパク質は野生型(強毒株)の 130K タンパク質より低い RNA サイレンシング抑制能をもつ。そこで、L11-GFP ウイルス感染誘導 BY-2 細胞を作製し、野生型 TMV-GFP ウイルス感染誘導 BY-2 細胞と感染誘導後の GFP 蛍光強度およびウイルス RNA の蓄積レベルを比較した。この実験結果から、L11-GFP 感染誘導細胞では、ウイルス(GFP を含む) RNA に対するサイレンシングが起きること、野生型 TMV-GFP は RNA サイレンシングを抑制していることが示唆された。

そこで、L11-GFP あるいは野生型 TMV-GFP 感染誘導後2日目に脱液胞化プロトプラスト抽出液を調製し、GFP あるいは TMV 配列をもつ RNA とインキュベートしたところ、L11-GFP 誘導細胞抽出液にいくつかの配列に特異的な切断活性(RISC 活性)が検出された。抽出液には、これらの相補配列をもつ 20-25 ヌクレオチドの siRNA が検出された。siRNA 蓄積の経時変化を調べたところ、L11-GFP、野生型 TMV-GFP 間でパターンに大きな違いは見られないものの、L11-GFP に比して

野生型 TMV-GFP では siRNA の蓄積が遅れることが明らかになった。TMV の部分配列のいくつかについては、RISC 活性、siRNA のいずれもが検出されなかった。このことから、siRNA はウイルスゲノム全長にわたって均一に分布するのではなく、いくつかの限定された領域に由来することがわかった。植物における内在性 RISC 活性は、コムギ胚芽抽出液 (Tang *et al.* 2003. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev.* 17: 49-63.) あるいはシロイヌナズナの花芽の破碎液中 (Qi *et al.* 2005. Biochemical specialization within *Arabidopsis* RNA silencing pathways. *Mol. Cell* 19: 421-428.) に検出されることが本研究の途上で他のグループから発表された。

先に述べたとおり、植物において siRNA のメチル化は RISC 形成に必須である。いくつかの植物ウイルス RNA サイレンシングサプレッサーは、siRNA のメチル化を阻害することが知られている。そこで、L11-GFP、野生型 TMV-GFP を複製する BY-2 細胞に蓄積した siRNA のメチル化の程度を調べた。L11-GFP を複製する細胞の siRNA はほぼ完全にメチル化されていたのに対し、野生型 TMV-GFP を複製する細胞の siRNA にはかなりの割合でメチル化されていないものが検出された。以上の結果から、130K タンパク質は siRNA のメチル化阻害を介してその蓄積を抑制するとともに、RISC 形成を強く抑制することがわかった。最近、Csorba らは、TMV の 130K タンパク質が、2ヌクレオチドの 3' 末端突出をもつ 21 ヌクレオチドの二本鎖 siRNA 様 RNA に結合する能力をもち、siRNA のメチル化と RISC 形成を阻害することを報告した (Csorba *et al.* 2007. The p122 subunit of tobacco mosaic virus replicase is a potent silencing suppressor and compromises both small interfering RNA- and microRNA-mediated pathways. *J. Virol.* 81: 11768-11780.)。我々の結果も彼らの結論を支持するものである。

これらの成果は論文未発表のため、データを含む結果の詳細は補足資料に記載する。

(2) 研究成果の今後期待される効果

これまで、植物における RNA サイレンシング関連酵素の生化学的解析はほとんど行われてこなかったが、本研究で Dicer-like 酵素活性および RISC 酵素活性を試験管内で捉えることができた。この系を用いれば、これまでレポーター遺伝子の発現等を指標にした間接的な方法でしか調べることができなかった植物における RNA サイレンシング現象を生化学的に解析することが可能になると期待される。また、これまでウイルス感染に伴って誘起される RNA サイレンシング現象は、植物体あるいは葉を用いて行われてきたが、このような実験系ではウイルスの感染・増殖が同調しておらず、宿主の抵抗性反応も加わって、起きている事象の解釈が困難になる場合が多かった。これに対し、培養細胞の同調感染系を用いれば多くの複雑性を排した結果が得られると期待される。実際、植物体を用いた実験からは、TMV の複製タンパク質は siRNA の蓄積を阻害しないと結論されていたが、培養細胞を用いた実験で、L11 株に比して野生株 TMV 感染細胞におけるウイルスに対する siRNA の蓄積が遅れることが明らかになった。

3. V タバコ BY-2 培養細胞における TMV 誘導感染系の構築と利用(石川県立大学 森グループ; 大阪大学 藤山グループ)

3. V. 1 植物培養細胞における TMV 誘導感染系の構築

(1) 研究実施内容及び成果

RNA ウイルスの複製機構を生化学的に解析するにあたり、ウイルスに感染した植物培養細胞を簡便かつ大量に調製することが可能な系は、非常に有効と考えられる。しかし、従来植物培養細胞にウイルスを感染させるためには、煩雑な接種操作を必要とし、感染細胞を大量に得ることは困難であった。そこで、宿主因子の同定に充分量のウイルス感染培養細胞を得るために新規システムを構築した(図

17)。本システムは

RNA ウイルスを細胞外から接種する代わりに、RNA ウイルスの cDNA を植物細胞の染色体に導入し、細胞内で宿主の転写機構により導入した cDNA からウイルスゲノム RNA を合成させ、ウイルスに感染させる。その際に、ウイルス RNA の転写をエストロジェンで制御可能なプロモーターでコントロールすることで、任意の時期に培養細胞でウイルス RNA を転写し、感染させることを可能とする(図17)。われわれは、改変 ToMV cDNA を導入した形質転換タバコ BY-2 培養細胞および改変 TMV-Cg cDNA を導入した形質転換シロイヌナズナ mm2d 培養細胞を作出し、エストロジェンによりウイルス RNA の転写を誘導した。その結果、これらの細胞をエストロジェン処理特異的に高効率でウイルスを感染させることに成功した(図18)。またその際、(i) ウイルス cDNA の 3' 末端にリボザイム配列を付加すること (ii) 最適量の誘導転写因子を発現する細胞株を選抜したう

えて、その株に誘導プロモーターと連結したウイルス cDNA を導入すること(2段階法)が重要であることがわかった。本システムを用いることで、複製酵素や移行タンパク質にタグを付加された変異ウイルス、さらにサイレンシング能力を喪失した変異ウイルス等に誘導的に感染した大量の植物細胞を得ることに成功した。以上の結果は、Dohi *et al.* (2006) に発表した(6章「成果発表」参照)。

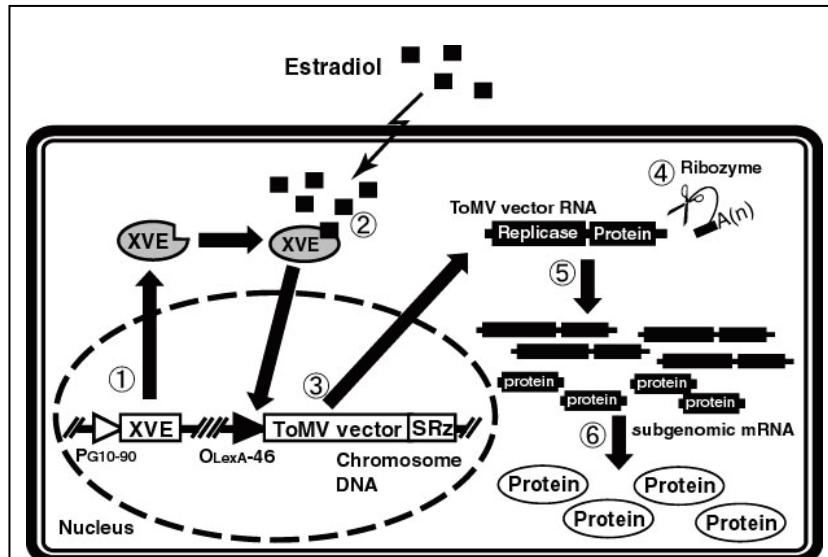


図17 TMV誘導感染システムの概念図

①転写活性化因子XVEの恒常的発現、②エストロジェンによるXVEの活性化、③ToMV ゲノム RNA の誘導特異的転写、④3' 末端非ウイルス由来配列のリボザイムによる切断、⑤ウイルス RNA の複製、⑥導入した外来タンパク質の翻訳

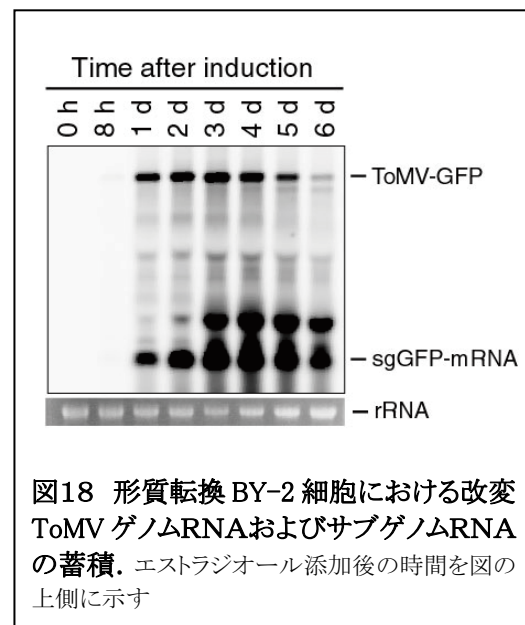


図18 形質転換 BY-2 細胞における改変 ToMV ゲノムRNAおよびサブゲノムRNAの蓄積。エストロジオール添加後の時間を図の上側に示す

3. V. 2 TMV 誘導感染系を用いた外来タンパク質の発現

(1) 研究実施内容及び成果

植物培養細胞は動物の病原体の混入がないこと、培養コストが低いこと、高度な翻訳後修飾が可能であることなど、有用タンパク質生産に適した性質を有している。しかしながら、植物培養細胞においては目的タンパク質を高効率に発現できる系がなく、その開発が求められていた。そこで、植物ウイルスで最も増殖量の高いウイルスの一つである TMV をベクターとしたウイルス誘導感染系を用いることで、植物培養細胞において外来タンパク質を大量発現させることを試みた。外被タンパク質遺伝子を緑色蛍光タンパク質(GFP)またはジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)遺伝子と置換した TMV を BY-2 細胞に誘導感染させることで、細胞の全可溶性タンパク質の 10–20% 量にのぼる大量の GFP および DHFR を得ることができた(図19)。以上の結果は、Dohi and Mori (2007) に発表した(6章「成果発表」参照)。

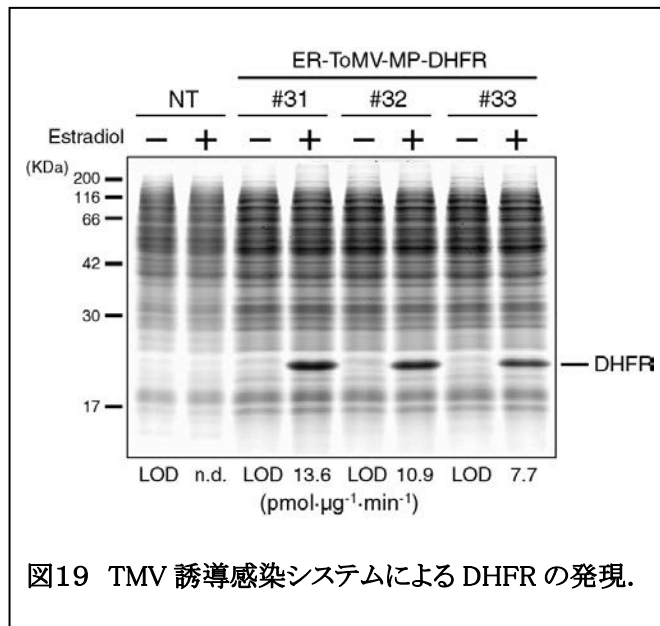


図19 TMV 誘導感染システムによる DHFR の発現.

3. V. 3 大腸菌におけるウイルスcDNA の安定化

(1) 研究実施内容及び成果

RNA ウイルスのcDNA 配列を持つプラスミドはしばしば大腸菌の中で大腸菌の成長を阻害するなど安定して保持することが難しい。外被タンパク質遺伝子を種々の外来タンパク質遺伝子で置換した TMV ベクターを構築する過程において、ウイルスcDNAを持つプラスミドの大腸菌内における安定性は挿入する外来遺伝子の塩基配列に依存し、大腸菌内で保持できないウイルスcDNA プラスミドがあることがわかった。そこで、生育阻害を起こすウイルスcDNAを大腸菌に導入し生育阻害を示さない大腸菌をスクリーニングし大腸菌において安定なウイルスベクターcDNA の探索を行った。その結果、ウイルスcDNA 中の特定の領域を改変することで大腸菌内においてウイルスcDNA が安定化することを明らかにした。複製能力と安定性を持ち合わせた改良型 TMV ベクターを用いることで、従来型では構築できなかったガンマインターフェロン、モノクローナル抗体、抗原等の遺伝子を持つ TMV ベクターを構築し、さらにウイルス誘導感染系を用いて植物培養細胞でこれらのタンパク質を発現させることに成功した。

3. V. 4 TMV 誘導感染系の NMR によるタンパク質の構造解析への応用

(1) 研究実施内容及び成果

NMR はタンパク質の構造解析においてサンプルの結晶化の必要がなく、また構造の変化を動的

に解析することができる非常に有効な手法である。タンパク質の NMR 解析には安定同位体で標識した数ミリグラムのタンパク質が必要であり、これまで多くの場合大腸菌で発現したタンパク質が用いられてきた。しかしながら大腸菌には真核細胞の持つ高度なタンパク質の翻訳後修飾機構が存在せず、このような修飾を受けたタンパク質の構造を調べるためには利用できなかった。そこで高度な翻訳後修飾系を持つ植物培養細胞においてウイルス誘導感染系を用いて標識したタンパク質を大量に発現し、NMR 解析を行うことを試みた。DHFR、カルモジュリン(CaM)または CPI17 遺伝子を導入した TMV ベクターを導入した形質転換 BY-2 細胞を ^{15}N 存在下で培養し、ウイルスを誘導感染させることで、NMR 解析に十分な量のタンパク質を発現させることに成功した。得られたタンパク質の NMR スペクトル(図20)は、従来の方法で得られたタンパク質のスペクトルと一致したことから、植物培養細胞でウイルス誘導感染システムにより発現したタンパク質は NMR 解析に利用できることが明らかとなった。

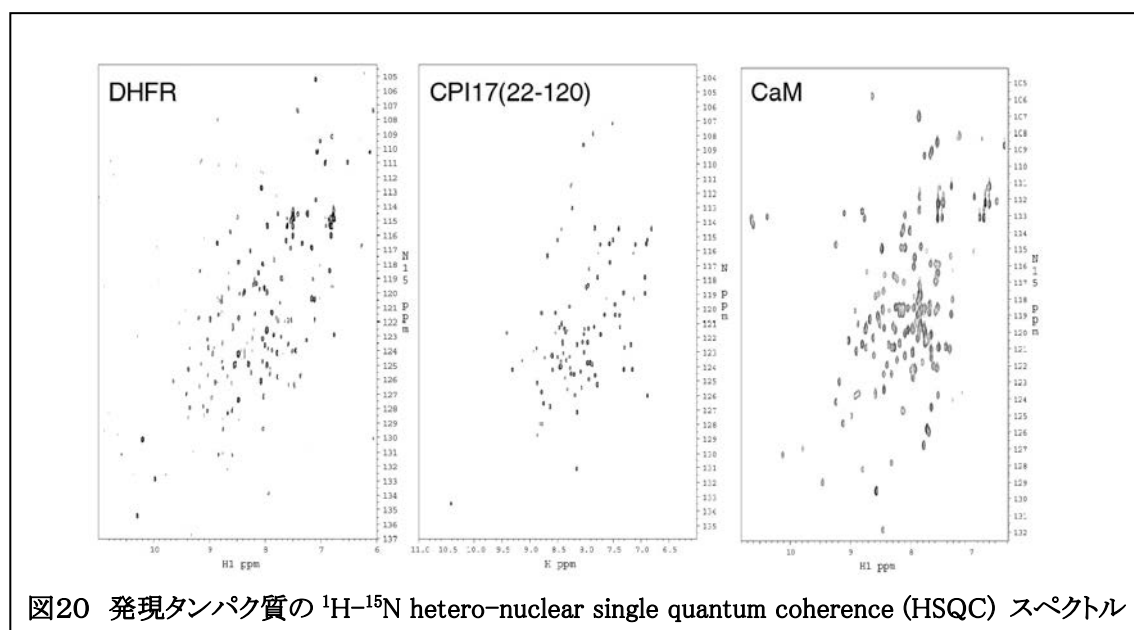


図20 発現タンパク質の ^1H - ^{15}N hetero-nuclear single quantum coherence (HSQC) スペクトル

(2) 研究成果の今後期待される効果 (V. 1-4)

今回開発したウイルス誘導感染システムは、本研究において、タバコモザイクウイルスの宿主因子の同定をはじめとしたウイルス複製機構の解明に多大な貢献をした。今後、本システムは、タバコモザイクウイルスのみならず多くのウイルスの基礎研究の進展に寄与すると期待される。特にシロイヌナズナの培養細胞にも、本システムが適用できたことから、シロイヌナズナのゲノム情報および種々の変異体由来の培養細胞を利用することにより、植物ウイルス感染機構の解明がさらに進むものと期待される。

本研究により植物培養細胞において構造を保持した外来タンパク質を誘導的かつ大量に発現することが可能となった。今後、本システムは、さまざまなタンパク質の基礎研究に広く利用されることが期待される。また、本システムは植物細胞における有用タンパク質生産の実用化へと道を拓いた。今後、宿主植物細胞への変異導入や遺伝子操作などの手法によって翻訳後修飾を制御することにより、有用タンパク質の生産システムをより洗練されたものにすることが可能である。さらに本システムは植物工場や圃場で栽培することが可能な植物体における有用外来タンパク質の生産にも適用できると考えられる。本研究の成果は、植物を利用して有用タンパク質を大量に生産することを可能にするものであり、これにより、近い将来、高品質な医薬タンパク質などが、低コストで供給されるようになることが期待される。

3. V. 5 TMV ベクターを用いた糖タンパク質大量発現系の構築

(1) 研究実施内容及び成果

ヒト由来糖タンパク質に特有に見られる糖鎖付加機能を、植物細胞に付与することを試みた。ヒト組織より糖鎖修飾酵素遺伝子をクローン化後、植物発現ベクターに挿入し、タバコ BY2 培養細胞を形質転換した。得られた形質転換細胞から、mRNA を調製し、導入したヒト由来糖鎖修飾酵素遺伝子の発現をノザン法により確認した。この中から、最も mRNA 量が高かった TX11 株を選抜し、改変 Murashige-Skoog 培地で懸濁培養した。集めた細胞をホモジナイズ後、遠心分離 (12,000 rpm, 15 分、4℃) により、上澄液を回収し、細胞抽出液を回収した。同様に、非形質転換 BY2 細胞から細胞抽出液を調製した。糖鎖構造を認識するレクチンを用い、ヒト型糖鎖を持ったタンパク質を新たに創造できたことを確認した。このタンパク質から、糖鎖部分を回収後、還元末端を 2-アミノピリジン (PA) で蛍光標識した。HPLC を用いて、該当する糖鎖の溶出画分を、分離精製を行った。この溶出位置は、別途調製した標準糖鎖と同じだった。さらに、精製した糖鎖について、MALDI-TOF MS により得られた PA 化糖鎖の分子量は、標準糖鎖と同じで、構造から推測されるものと一致した。以上の結果より、タバコ BY2 細胞に導入したヒト由来糖鎖修飾酵素遺伝子が機能し、植物タンパク質にヒト型糖鎖を付加できることが明らかとなった。

(2) 研究成果の今後期待される効果

哺乳類と同等の糖鎖を付加する能力を植物細胞に付与することでできた。このことから、植物において種々の有用物質或いはタンパク質の生産が可能となった。植物のもつ、糖タンパク質生産工場としての高いポテンシャルが示された。

4 研究参加者

① 石川グループ (研究項目 I - IV)

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
石川 雅之	独) 農業生物資源研究所	上級研究員	総括	平成18年4月～平成20年3月
同上	同上	チーム長	同上	平成16年3月～平成18年3月
同上	北海道大学大学院農学研究科	助教授	同上	平成14年11月～平成16年3月
飯 哲夫	独) 農業生物資源研究所	領域長	Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ	平成18年4月～平成20年3月
同上	同上	グループ長	同上	平成16年4月～平成18年3月
薦田 優香	独) 農業生物資源研究所	特別研究員	Ⅲ、Ⅳ	平成19年4月～平成20年3月

同上	同上	CREST 研究員	同上	平成16年4月～ 平成19年3月
同上	北海道大学大学院農学研究科	同上	同上	平成15年4月～ 平成16年3月
同上	北海道大学大学院農学研究科	学生(D3)	同上	平成14年11月～ 平成15年3月
玉井 淳史	独)農業生物資源研究所	特別研究員	Ⅳ	平成19年4月～ 平成19年8月
同上	同上	CREST 研究員	同上	平成16年4月～ 平成19年3月
藤崎 恒喜	独)農業生物資源研究所	特別研究員	Ⅰ	平成18年4月～ 平成20年3月
錦織 雅樹	独)農業生物資源研究所	特別研究員	Ⅱ	平成19年4月～ 平成20年3月
同上	北海道大学大学院農学研究科・独)農業生物資源研究所	学生(D3～D1)	同上	平成16年5月～ 平成19年3月
同上	北海道大学大学院農学研究科	学生(M1～D1)	同上	平成14年11月～ 平成16年5月
平井 克之	京都大学大学院理学研究科・独)農業生物資源研究所	研究補助員	Ⅳ	平成16年4月～ 平成20年3月
石橋 和大	北海道大学大学院農学研究科・独)農業生物資源研究所	学生(D3)	Ⅰ	平成19年4月～ 平成20年3月
同上	同上	研究補助員	同上	平成17年11月～ 平成19年4月
菊池 明美	独)農業生物資源研究所	チーム事務員		平成17年5月～ 平成20年3月
馬渡 なつき	東京大学大学院理学系研究科・独)農業生物資源研究所	学生(M1～M2)	Ⅰ	平成18年1月～ 平成19年3月
薦田 圭介	北海道大学大学院農学研究科・独)農業生物資源研究所	学生(D3～D1)	Ⅰ	平成14年11月～ 平成16年5月
同上	北海道大学大学院農学研究科	学生(M1～D1)	同上	平成16年5月～ 平成19年3月

浅野 桃子	北海道大学大学院農学研究科・独)農業生物資源研究所	学生(M2)	II	平成15年4月～平成16年5月
同上	北海道大学大学院農学研究科	学生(M1～M2)	同上	平成16年5月～平成17年3月
泰中 智史	北海道大学大学院農学研究科・独)農業生物資源研究所	学生(M2)	II	平成15年4月～平成16年5月
同上	北海道大学大学院農学研究科	学生(M1～M2)	同上	平成16年5月～平成17年3月
久保田 健嗣	京都大学大学院理学研究科・独)農業生物資源研究所	研究補助員	III、IV	平成16年4月～平成17年3月
八十川 さえ子	北海道大学大学院農学研究科	CREST 技術員	I	平成15年4月～平成16年3月

②森グループ(研究項目V)

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
森 正之	石川県立大学・生物資源工学研究所	准教授	V	平成14年11月～平成20年3月
土肥 浩二	同上	CREST 技術員	V	平成15年4月～平成17年3月
同上	同上	CREST 研究員	同上	平成17年4月～平成19年9月
滝 晶子	同上	研究補助員	V	平成16年4月～平成19年3月
水野 亜希子	同上	研究補助員	V	平成16年4月～平成18年5月

③飯グループ(研究項目III、IV)

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
飯 哲夫	独)農業生物資源研究所	グループ長	II、III、IV	平成15年7月～平成16年3月

同上	京都大学大学院理学研究科	助教授	同上	平成14年11月～平成15年7月
玉井 淳史	独)農業生物資源研究所	CREST 研究員	Ⅳ	平成15年9月～平成16年3月
同上	京都大学大学院理学研究科	CREST 研究員	同上	平成15年4月～平成15年9月
同上	京都大学大学院理学研究科	特別研究員	同上	平成14年11月～平成15年3月
久保田 健嗣	独)農業生物資源研究所・京都大学大学院理学研究科	研究補助員	Ⅳ	平成15年11月～平成16年3月
同上	独)農業生物資源研究所・京都大学大学院理学研究科	学生(D2)	同上	平成15年9月～平成15年11月
同上	京都大学大学院理学研究科	学生(D1～D2)	同上	平成14年11月～平成15年9月
平井 克之	独)農業生物資源研究所・京都大学大学院理学研究科	研究補助員	Ⅳ	平成15年11月～平成16年3月

④尾之内グループ(研究項目Ⅰ)

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
尾之内 均	北海道大学大学院農学研究科	助教授	Ⅰ	平成16年3月～平成17年3月
八十川 さえ子	北海道大学大学院農学研究科	CREST 技術員	Ⅰ	平成16年3月～平成17年3月

⑤鈴木グループ(研究項目Ⅰ－Ⅲ)

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
鈴木 英治	秋田県立大学、生物資源学部	助教授	Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ	平成15年4月～平成18年3月

⑥藤山グループ(研究項目Ⅴ)

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
藤山和仁	大阪大学 生物工学国際交流センター	助教授	V	平成18年11月～平成20年3月
梶浦裕之	同上	学生 (D2～D3)	V	平成18年11月～平成20年3月

5 招聘した研究者等

該当なし

6 成果発表等

(1) 原著論文発表（国内誌 0 件、国際誌 18 件）

<CREST の成果>

Atsushi Tamai, Kenji Kubota, Hideaki Nagano, Motoyasu Yoshii, Masayuki Ishikawa, Kazuyuki Mise, and Tetsuo Meshi (2003). Cucumovirus- and bromovirus-encoded movement functions potentiate cell-to-cell movement of tobamo- and potexviruses. **Virology** 315 (1), 56–67.

Kenji Kubota, Shinya Tsuda, Atsushi Tamai, and Tetsuo Meshi (2003). Tomato Mosaic Virus Replication Protein Suppresses Virus-Targeted Posttranscriptional Gene Silencing. **J. Virol.** 77 (20), 11016–11026.

Keisuke Komoda, Satoshi Naito, and Masayuki Ishikawa (2004). Replication of plant RNA virus genomes in a cell-free extract of evacuated plant protoplasts. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 101 (7), 1863–1867.

Momoko Asano, Rena Satoh, Atsuko Mochizuki, Shinya Tsuda, Takuya Yamanaka, Masamichi Nishiguchi, Katsuyuki Hirai, Tetsuo Meshi, Satoshi Naito, and Masayuki Ishikawa. (2005) Tobamovirus-resistant tobacco generated by RNA interference directed against host genes. **FEBS Lett.** 579 (20), 4479–4484.

Masashi Mori and Koji Dohi (2005) The “resurrection method” for modification of specific proteins in higher plants. **FEBS Lett.** 579, 6210–6216.

Koji Dohi, Masaki Nishikiori, Atsushi Tamai, Masayuki Ishikawa, Tetsuo Meshi, Masashi Mori. (2006) Inducible virus-mediated expression of foreign protein in suspension-cultured plant calls. **Arch. Virol.** 151, 1075–1084.

Koki Fujisaki, Gerald B. Ravelo, Satoshi Naito and Masayuki Ishikawa. (2006) Involvement of *THH1*, an *Arabidopsis thaliana* homolog of the *TOM1* gene, in tobamovirus multiplication. **J. Gen. Virol.** 87

(8), 2397–2401.

Masaki Nishikiori, Koji Dohi, Masashi Mori, Tetsuo Meshi, Satoshi Naito, and Masayuki Ishikawa. (2006) Membrane-bound tomato mosaic virus replication proteins participate in rna synthesis and are associated with host proteins in a pattern distinct from those that are not membrane bound. **J. Virol.** 80 (17), 8459–8468.

Keisuke Komoda, Natsuki Mawatari, Yuka Hagiwara-Komoda, Satoshi Naito, and Masayuki Ishikawa. (2007) Identification of a ribonucleoprotein intermediate of tomato mosaic virus RNA replication complex formation. **J. Virol.** 81 (6), 2584–2591.

Koji Dohi and Masashi Mori. (2007) Expression of active enzymes from an inducible tomato-mosaic-virus-based vector in cultured transgenic tobacco BY-2 cells. **Plant Biotechnology** 24, 367–373.

<関連成果>

Yayoi Tsujimoto, Takuro Numaga, Kiyoshi Ohshima, Masa-aki Yano, Ryuji Ohsawa, Derek B. Goto, Satoshi Naito and Masayuki Ishikawa. (2003) *Arabidopsis TOBAMOVIRUS MULTIPLICATION (TOM) 2* locus encodes a transmembrane protein that interacts with TOM1. **EMBO J.** 22: 335–343.

Yuka Hagiwara, Keisuke Komoda, Takuya Yamanaka, Atsushi Tamai, Tetsuo Meshi, Ryo Funada, Tomohiro Tsuchiya, Satoshi Naito and Masayuki Ishikawa. (2003) Subcellular localization of host and viral proteins associated with tobamovirus RNA replication. **EMBO J.** 22: 344–353.

Yuriko Tomita, Tomomitsu Mizuno, Juana Díez, Satoshi Naito, Paul Ahlquist and Masayuki Ishikawa. (2003) Mutation of host *dnaJ* homolog inhibits negative-strand RNA synthesis of brome mosaic virus. **J. Virol.** 77: 2990–2997.

Noriyuki Hatsugai, Miwa Kuroyanagi, Kenji Yamada, Tetsuo Meshi, Shinya Tsuda, Maki Kondo, Mikio Nishimura and Ikuko Hara-Nishimura. (2004) A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. **Science** 305: 855–858.

Motoyasu Yoshii, Masaki Nishikiori, Kayo Tomita, Norimichi Yoshioka, Reiko Kozuka, Satoshi Naito and Masayuki Ishikawa. (2004) The *Arabidopsis CUCUMOVIRUS MULTIPLICATION 1* and *2* loci encode translation initiation factors 4E and 4G. **J. Virol.** 78: 6102–6111.

Masanao Sato, Kenji Nakahara, Motoyasu Yoshii, Masayuki Ishikawa and Ichiro Uyeda. (2005) Selective involvement of members of the eukaryotic initiation factor 4E family in the infection of *Arabidopsis thaliana* by potyviruses. **FEBS Lett.** 579: 1167–1171.

Masanori Kaido, Yosuke Inoue, Yoshika Takeda, Kazuhiko Sugiyama, Atsushi Takeda, Masashi Mori, Atsushi Tamai, Tetsuo Meshi, Tetsuro Okuno and Kazuyuki Mise. (2007) Downregulation of the NbNACa1 gene encoding a movement- protein-interacting protein reduces cell-to-cell movement of Brome mosaic virus in *Nicotiana benthamiana*. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 20, 671–681.

Kazuhiro Ishibashi, Kiyoshi Masuda, Satoshi Naito, Tetsuo Meshi and Masayuki Ishikawa. (2007) An inhibitor of viral RNA replication is encoded by a plant resistance gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 104 (34): 13833-13838.

(2) その他の著作物(総説、書籍など) (13 件)

飯哲夫 (2003). 「ジーンサイレンシングとサプレッサー」**化学と生物** 41: 390-397.

萩原優香、石川雅之 (2004). 「植物ウイルスの複製」細胞工学別冊、**植物細胞工学シリーズ 19** 「新版 分子レベルからみた植物の耐病性—ポストゲノム時代の植物免疫研究」島本功、渡辺雄一郎、柘植尚志監修、pp. 156-161.

久保田健嗣、飯哲夫 (2004). 「転写後型ジーンサイレンシング」細胞工学別冊、**植物細胞工学シリーズ 19** 「新版 分子レベルからみた植物の耐病性—ポストゲノム時代の植物免疫研究」島本功、渡辺雄一郎、柘植尚志監修、pp. 194-197.

Masayuki Ishikawa and Yoshimi Okada (2004). Replication of tobamovirus RNA. **Proc. Jpn. Acad., Ser. B** 80 (5): 215-224.

石川雅之、萩原優香、藤崎恒喜 (2005). 「トバモウイルスの増殖をサポートする宿主因子の探索」日本植物病理学会、**植物感染生理談話会論文集** (ISSN 1345-8086) No. 41 (植物・病原体相互反応における特異性決定機構): 49-56.

石川雅之 (2005). 「プラス鎖 RNA ウィルスゲノムの複製に関わる宿主細胞分子」『特集ウイルス増殖に関わる宿主細胞分子』**細胞工学** 24 (2): 138-140.

石川雅之 (2006). 「トバモウイルス RNA 複製機構の解析」**ウイルス** 56 (1): pp 35-40.

Kazuhiro Ishibashi, Keisuke Komoda, Masayuki Ishikawa (2006). Translation and replication of plant viral RNA in a cell-free extract of evacuated BY-2 protoplasts. In Biotechnology in Agriculture and Forestry **“Tobacco BY-2 Cells: A New Treatise”** Eds. Toshiyuki Nagata, Ken Matsuoka, Dirk Inze. Springer, Heidelberg, Germany, pp. 183-194.

石川雅之、吉井基泰、錦織雅樹 (2007). 「キュウリモザイクウイルスの RNA の翻訳と宿主因子」**微生物の病原性と植物の防御応答** (第7章 ウィルスの複製・移行と宿主因子、第2項) 上田一郎 (編) 北海道大学出版会 (札幌) pp. 180-186.

石橋和大、錦織雅樹、馬渡なつき、石川雅之 (2007). 「ウイルスに対する静的な抵抗性」**蛋白質核酸酵素** 52 (6): 686-691.

平井克之、玉井淳史、薦田(萩原)優香、飯哲夫、石川雅之 (2007). 「植物ウイルスの全身感染と RNA サイレncing」**蛋白質核酸酵素** 52 (10): 1248-1253.

藤崎恒喜、薦田圭介、石川雅之 (2007). 「トバモウイルスのゲノム複製機構」**蛋白質核酸酵素** 52 (10): 1149-1154.

石橋和大、飯哲夫、内藤哲、石川雅之 (2007). 「トマト *Tm-1* 遺伝子によるトマトモザイクウイルス増殖抑制機構の解析」日本植物病理学会、**植物感染生理談話会論文集** (ISSN 1345-8086) No.

43(植物-病原微生物の相互作用のダイナミズム): 105-110.

(3) 学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

① 招待講演 (国内会議 8 件、国際会議 5 件)

石川雅之(北大院農)「トバモウウイルスの増殖に関与する宿主膜蛋白質」**科学研究費特定領域研究 (A) 成果公開シンポジウム「見えてきた耐病性植物作出の戦略」**(2002年12月6日、神戸).

飯哲夫¹、久保田健嗣²、玉井淳史²、津田新哉³、萩原優香⁴、石川雅之⁴(¹生物研、²京大院理、³中央農研、⁴北大院農)「トマトモザイクウイルスL₁₁Aの示す弱毒性と干渉効果の分子機構」**第51回 日本ウイルス学会学術集会** (2003年10月27-29日、京都).

Masayuki Ishikawa (Hokkaido Univ.). TOM PROTEINS: HOST FACTORS INVOLVED IN TOBAMOVIRUS MULTIPLICATION. **NIAS-COE/PROBRAIN/TOKUTEI Joint International Symposium “Plant Immunity – Signaling to acquired resistance”** (March 2-3, 2004, Tsukuba).

萩原優香¹、薦田圭介¹、石川雅之²(¹北大院農、²生物研). 「タバコモザイクウイルスの複製機構の解析」**RNA ウィルス研究の新展開 III** (2004 年 3 月 22-23 日、津).

Masayuki Ishikawa (National Institute of Agrobiological Sciences). Replication of plant RNA virus genomes in a cell-free extract of evacuated BY-2 protoplasts and possible utilization of the system for the study of tomato *Tm-1* gene action. **かずさ DNA 研究所ワークショップ “Tomato: a new model plant in the Genomics Era”** (2004 年 3 月 22-23 日、木更津).

Masayuki Ishikawa (National Institute of Agrobiological Sciences). Host genes involved in tobamovirus replication. **23rd Annual Meeting of American Society for Virology, Plant Virology Club Sattellite Symposium ‘Current Trends in Plant Virology’** (July 10, 2004; Montreal, Canada).

Masayuki Ishikawa (National Institute of Agrobiological Sciences). Replication of plant RNA virus genomes in a cell-free extract of evacuated BY-2 protoplasts. **International symposium on Cell & Molecular Biology of Tobacco BY-2 Cells** (September 14-16, 2004; Yokohama).

飯哲夫(生物研)「弱毒ウイルスの作用機構及び弱毒ウイルス研究の新展開方向 —トマトモザイクウイルス L₁₁A に学ぶこと—」**平成 16 年度弱毒ウイルス研究会**(2004 年 9 月、浜松).

飯哲夫(生物研)「タバコモザイク病のモザイクパターン形成におけるサイレンシングの関与」**第46回日本植物生理学会年会** (2005 年 3 月 24-26 日、新潟).

Masayuki Ishikawa (National Institute of Agrobiological Sciences). Dissecting the tobamovirus RNA replication process. **2005 Annual Noble Foundation Virology Retreat** (April 1-3, 2005; Ardmore, Oklahoma, USA).

石川雅之(生物研)「トバモウウイルスの増殖をサポートする宿主因子の探索」**日本植物病理学会平成17年度植物感染生理談話会** (2005 年 8 月 18-20 日、高松).

石川雅之(生物研)「トマトモザイクウイルス複製抑制宿主因子Tm-1の同定」**シンポジウムII. 植物と寄生者との相互作用 —理論と機能から育種学へ— 日本育種学会第110回講演会** (2006年9月

22－23日、松山)

石橋和大、飯哲夫(生物研).「トマト *Tm-1* 遺伝子によるトマトモザイクウイルス増殖抑制機構の解析」**日本植物病理学会平成19年度植物感染生理談話会** (2007年8月9-11日、京都).

② 口頭発表 (国内会議 19 件、国際会議 1 件)

浅野桃子¹、佐藤玲奈¹、望月淳子²、西口正通²、内藤哲¹、石川雅之^{1,3}(¹北大院農、²生物研、³CREST)「RNAi を利用した増殖関連宿主因子遺伝子の抑制によるタバコモザイクウイルス抵抗性タバコの作製」**平成 15 年度日本植物病理学会大会** (2003 年 3 月、東京)

久保田健嗣¹、津田新哉²、玉井淳史¹、飯哲夫³(¹京大院理、²中央農研、³生物研)「タバコモザイク症状の形成における RNA サイレンシングの役割」**平成 15 年度日本植物病理学会大会** (2003 年 3 月、東京)

土肥浩二^{1,2}、錦織雅樹³、石川雅之^{1,4}、飯哲夫^{1,4}、森正之^{1,2}(¹JST CREST、²石川農短 農業資源研、³北大院農、⁴生物研)培養細胞における誘導植物ウイルスベクターを用いた外来タンパク質生産、**第22回植物細胞分子生物学会**、平成 16 年 8 月、秋田県立大学

森正之^{1,2}、玉井淳史^{2,3}、石川雅之^{2,3}、飯哲夫^{2,3}、土肥浩二^{1,2}(¹石川農短 農業資源研、²JST CREST、³生物研)誘導植物ウイルスベクターを用いた外来タンパク質生産、**第22回植物細胞分子生物学会**、平成 16 年 8 月、秋田県立大学

萩原優香¹、久保田健嗣²、津田新哉³、石川雅之^{1,4}、飯哲夫^{1,4}(¹CREST、²京大院理、³中央農研、⁴生物研)「転写後型ジーンサイレンシング抑制能が低下した Tomato mosaic virus 弱毒株 L11 複製タンパク質の感染細胞内における局在と蓄積の解析」**平成17年度日本植物病理学会大会**、演題番号 448(2005年3月29-31日、静岡).

薦田圭介¹、内藤哲¹、石川雅之^{2,3}(¹北大院農、²生物研、³CREST)「脱液胞化タバコ BY-2 プロトプラスト抽出液を用いたトバモウイルス複製複合体形成過程の解析」**平成17年度日本植物病理学会大会**、演題番号 449(2005年3月29-31日、静岡).

平井克之¹、久保田健嗣¹、津田新哉²、飯哲夫³(¹京大院理、²中央農研、³生物研)「葉脈分化過程におけるタバコモザイクウイルスの組織内局在とモザイクパターンの関係」**平成17年度日本植物病理学会大会**、演題番号 450(2005年3月29-31日、静岡).

藤崎恒喜¹、Gerald B. Ravelo²、内藤哲²、石川雅之^{1,3}(¹生物研、²北大院農、³CREST)「シロイヌナズナの *TOM1* 遺伝子ホモログ、*THH1* 遺伝子の *Tobacco mosaic virus* (TMV) 増殖への関与」**平成17年度日本植物病理学会大会**、演題番号 485(2005年3月29-31日、静岡).

藤崎恒喜・石川雅之(生物研). トマトモザイクウイルス RNA と結合する植物因子のシロイヌナズナ脱液胞化プロトプラスト抽出液からの単離. 口演番号 434. **平成18年度日本植物病理学会大会** (2006年6月3日－5日、札幌)

薦田圭介¹・馬渡なつき¹・内藤哲²・石川雅之¹(¹生物研、²北大院生命科学). 生体膜非存在下でトマトモザイクウイルス RNA を試験管内翻訳したときに形成され、生体膜画分と混合することにより RNA 複製を引き起こすことのできる複製複合体前駆体の性状解析. 口演番号 435. **平成18年度日本植物病理学会大会** (2006年6月3日－5日、札幌)

錦織雅樹¹・土肥浩二²・森正之²・飯哲夫¹・内藤哲³・石川雅之¹(¹生物研、²石川県立大、³北大院生命科学). 膜に結合したトマトモザイクウイルス複製タンパク質は RNA 合成に関与し、宿主膜タンパク質 TOM1, TOM2A と結合している. 口演番号 436. **平成18年度日本植物病理学会大会**(2006年6月3日－5日、札幌)

石橋和大¹・内藤哲²・石川雅之¹(¹生物研、²北大院生命科学). トマトモザイクウイルス抵抗性遺伝子 *Tm-1* の同定. 口演番号 437. **平成18年度日本植物病理学会大会**(2006年6月3日－5日、札幌)

Yuka Hagiwara¹, Katsuyuki Hirai¹, Shinya Tsuda², Tetsuo Meshi¹ and Masayuki Ishikawa¹ (¹ 生物研、² 中央農研). Subcellular distribution of RNA silencing suppressors encoded by *Tomato mosaic virus* (ToMV) and a suppressor-defective strain ToMV-L₁₁ W10-1 (oral presentation) **American Society for Virology 25th Annual Meeting** (July 15-19, 2006. Madison, USA).

薦田(萩原)優香、平井克之、飯哲夫、石川雅之(生物研). 非膜結合型のトマトモザイクウイルス複製タンパク質は RNA サイレンシングの抑制に関与する. 口演番号 363. **平成19年度日本植物病理学会大会**(2007年3月28日－30日、宇都宮)

錦織雅樹¹・土肥浩二²・森正之²・飯哲夫¹・内藤哲³・石川雅之¹(¹生物研、²石川県立大、³北大院生命科学). トマトモザイクウイルス RNA 複製に関与する ADP リボシル化因子様タンパク質の同定. 口演番号 383. **平成19年度日本植物病理学会大会**(2007年3月28日－30日、宇都宮)

藤崎恒喜、石川雅之(生物研). トマトモザイクウイルスの増殖を抑制するシロイヌナズナの RNA 結合タンパク質、BTR1 の同定と解析. 口演番号 384. **平成19年度日本植物病理学会大会**(2007年3月28日－30日、宇都宮)

土肥浩二¹・飯哲夫²・石川雅之²・森正之¹(¹石川県立大、²生物研). トマトモザイクウイルス誘導感染系を用いたタバコ BY-2 培養細胞におけるヒトガンマイインターフェロンの発現. 口演番号 391. **平成19年度日本植物病理学会大会**(2007年3月28日－30日、宇都宮)

大木進野¹・土肥浩二^{2,3}・森正之^{2,3}(¹北陸先端大学院大、²JST CREST、³石川県立大). ウイルスベクターと植物細胞を利用した試料調製法、**第46回NMR 討論会**、平成19年9月、札幌コンベンションセンター

石橋和大^{1,2}・飯哲夫^{1,3}・石川雅之^{1,3}(¹生物研、²北大院農、³JST CREST). トマトモザイクウイルス RNA 複製阻害因子 Tm-1 の同定とその作用機構の解析. 口演番号 2D07. **第55回日本ウイルス学会学術集会**(2007年10月21日－23日、札幌)

石川雅之^{1,2}・薦田(萩原)優香^{1,2}・平井克之^{1,2}・津田新哉³・飯哲夫^{1,2}(¹生物研、²JST CREST、³農研センター). トマトモザイクウイルスの病原性と弱毒化の分子機構. 口演番号 2WSD5. **第55回日本ウイルス学会学術集会**(2007年10月21日－23日、札幌)

③ ポスター発表 (国内会議 11 件、国際会議 10 件)

玉井淳史¹・久保田健嗣¹・永野秀昭²・三瀬和之²・吉井基泰³・石川雅之^{3,4}・飯哲夫^{1,4}(¹京大院理、²京大院農、³北大院農、⁴CREST)「クモウイルス及びブロモウイルスの移行機能における CP 要求性」**第25回日本分子生物学会年会**(2002年12月、横浜)

久保田健嗣¹、津田新哉²、玉井淳史¹、飯哲夫^{1,3}(¹京大院理、²中央農研、³CREST)「TMV による RNA サイレンシングの抑制」第 25 回日本分子生物学会年会 (2002 年 12 月、横浜)

Masashi Mori^{1,2}, Koji Dohi^{1,2}, Atsushi Tamai,^{2,3} and Tetsuo Meshi^{2,3} (¹Ishikawa Agricultural College, ²CREST, ³National Institute of Agrobiological Sciences). A STEROID HORMONE-INDUCED REPLICATION OF RECOMBINANT *Tomato mosaic virus* (ToMV) IN TRANSGENIC *Nicotiana benthamiana* PLANTS. NIAS-COE/PROBRAIN/TOKUTEI Joint International Symposium “Plant Immunity – Signaling to acquired resistance” (March 2–3, 2004, Tsukuba).

Koji Dohi^{1,2}, Masaki Nishikiori^{1,3}, Masayuki Ishikawa^{1,3}, Tetsuo Meshi^{1,4}, and Masashi Mori^{1,2} (¹CREST, ²Ishikawa Agricultural College, ³Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, ⁴National Institute of Agrobiological Sciences). ESTABLISHMENT OF AN INDUCIBLE TOMATO MOSAIC VIRUS (ToMV) INFECTION SYSTEM IN TOBACCO BY-2 SUSPENSION-CULTURED CELLS. NIAS-COE/PROBRAIN/TOKUTEI Joint International Symposium “Plant Immunity – Signaling to acquired resistance” (March 2–3, 2004, Tsukuba).

Masaki Nishikiori^{1,3}, Koji Dohi^{2,3}, Masashi Mori^{2,3}, Tetsuo Meshi^{3,4}, Satoshi Naito¹, and Masayuki Ishikawa^{1,3} (¹Graduate School of Agriculture, Hokkaido University; ²Ishikawa Agricultural College; ³CREST, ⁴National Institute of Agrobiological Sciences). ISOLATION OF TOMATO MOSAIC VIRUS (ToMV) REPLICATION COMPLEXES FROM AN INDUCIBLE ToMV INFECTION SYSTEM IN TOBACCO BY-2 SUSPENSION-CULTURED CELLS. NIAS-COE/PROBRAIN/TOKUTEI Joint International Symposium “Plant Immunity – Signaling to acquired resistance” (March 2–3, 2004, Tsukuba).

Keisuke Komoda¹, Satoshi Naito¹, and Masayuki Ishikawa^{1,2} (¹Graduate School of Agriculture, Hokkaido University; ²CREST). REPLICATION OF PLANT RNA VIRUS GENOMES IN A CELL-FREE EXTRACT OF EVACUOLATED PLANT PROTOPLASTS. NIAS-COE/PROBRAIN/TOKUTEI Joint International Symposium “Plant Immunity – Signaling to acquired resistance” (March 2–3, 2004, Tsukuba).

Kazuhiro Ishibashi¹, Kiyoshi Masuda¹, Morie Nishiwaki², Satoshi Naito¹, and Masayuki Ishikawa^{1,3} (¹Graduate School of Agriculture, Hokkaido University; ²Graduate school of Medicine, Hokkaido University, ³CREST, JST, Japan). *Tm-1* TOMATO CELL EXTRACT INHIBITS ToMV RNA REPLICATION *IN VITRO*. NIAS-COE/PROBRAIN/TOKUTEI Joint International Symposium “Plant Immunity – Signaling to acquired resistance” (March 2–3, 2004, Tsukuba).

Yuka Hagiwara,^{1,4} Kenji Kubota,² Shinya Tsuda,³ Atsushi Tamai,² Satoshi Naito,¹ Masayuki Ishikawa,^{1,4} and Tetsuo Meshi^{2,4} (¹Graduate School of Agriculture, Hokkaido University; ²National Institute of Agrobiological Sciences; ³National Agricultural Research Center; ⁴CREST, JST, JAPAN). The 130K protein of ToMV-L₁₁, an attenuated strain of ToMV, shows a subcellular fractionation pattern distinct from that of wild-type ToMV. NIAS-COE/PROBRAIN/TOKUTEI Joint International Symposium “Plant Immunity – Signaling to acquired resistance” (March 2–3, 2004, Tsukuba).

森正之^{1,2}、玉井淳史^{2,3}、石川雅之^{2,3}、飯哲夫^{2,3}、土肥浩二^{1,2} (¹石川農短、²CREST、³生物研)「誘導植物ウイルスベクターを用いた外来タンパク質生産」第22回植物細胞分子生物学会 (2004年8月9日、秋田)

土肥浩二^{1,2}、錦織雅樹³、石川雅之^{1,4}、飯哲夫^{1,4}、森正之^{1,2}(¹CREST、²石川農短、³北大院農、⁴生物研)「培養細胞における誘導植物ウイルスベクターを用いた外来タンパク質生産」**第22回植物細胞分子生物学会**(2004年8月9日、秋田)

石橋和大^{1,2}、内藤哲¹、石川雅之^{2,3}(¹北大院農、²生物研、³CREST)「試験管内トマトモザイクウイルスRNA複製系を用いたトマトTm-1活性の検出」**第46回日本植物生理学会年会** PA069 (396)(2005年3月24-26日、新潟)

Koji Dohi^{1,2}, Masaki Nishikiori^{3,4}, Atsushi Tamai^{2,4}, Masayuki Ishikawa^{2,4}, Tetsuo Meshi^{2,4} and Masashi Mori^{1,2} (¹Research Institute for Bioresources and Biotechnology, Ishikawa Prefectural University; ²CREST, Japan Science and Technology Agency; ³Division of Applied Bioscience, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University; ⁴National Institute of Agrobiological Sciences) Inducible Virus-mediated Expression of Foreign Protein in Suspension-Cultured Plant Cells. **3rd Japanese-German Joint Symposium: "New Development of Post Genome Research in Plant"** (2005 年 9 月、石川)

土肥浩二^{1,2}、錦織雅樹^{2,4}、玉井淳史^{1,4}、石川雅之^{1,4}、飯哲夫^{1,4}、森正之^{1,2}(¹CREST、²石川県立大・生物資源工学研、³北大院農、⁴生物研)トマトモザイクウイルス誘導感染系を用いたタバコBY-2 培養細胞における外来タンパク質発現. **第 28 回日本分子生物学会年会**(2005 年 12 月、福岡)

玉井淳史^{1,4}、土肥浩二^{2,4}、森正之^{2,4}、薦田圭介^{1,3}、石川雅之^{1,4}、飯哲夫^{1,4}(¹生物研、²石川県立大、³北大院農、⁴CREST)タバコ培養細胞抽出液を用いた PTGS に関与する配列特異的 RNA 分解反応系. **第 28 回日本分子生物学会年会**(2005 年 12 月、福岡)

錦織雅樹¹、土肥浩二^{2,3}、森正之^{2,3}、飯哲夫^{3,4}、内藤哲¹、石川雅之^{3,4}(¹北海道大 院農、²石川県立大、³CREST、⁴生物研)トマトモザイクウイルス RNA 複製複合体の性状の解析. **第28回日本分子生物学会年会**(2005 年 12 月、福岡)

平井克之¹、玉井淳史²、津田新哉³、薦田圭介⁴、石川雅之^{2,5}、飯哲夫^{2,5}(¹京大院理、²生物研、³中央農研、⁴北大院農、⁵CREST)タバコの Dicer-like 遺伝子 NtDCL2 のウイルス抵抗性への関与. **第28回日本分子生物学会年会**(2005 年 12 月、福岡)

Keisuke Komoda¹, Natsuki Mawatari¹, Satoshi Naito², and Masayuki Ishikawa¹(¹生物研、²北大院生命科学). *Tomato mosaic virus* negative-strand RNA synthesis occurs after the membrane binding of a complex containing the replication proteins and the viral RNA. P18-3 (poster presentation) **American Society for Virology 25th Annual Meeting** (July 15-19, 2006. Madison, USA).

Masaki Nishikiori¹, Koji Dohi², Masashi Mori², Tetsuo Meshi¹, Satoshi Naito³, Masayuki Ishikawa¹(¹生物研、²石川県立大、³北大院生命科学). Membrane-bound tomato mosaic virus replication proteins participate in RNA synthesis and are associated with host membrane proteins TOM1 and TOM2A. P18-4 (poster presentation) **American Society for Virology 25th Annual Meeting** (July 15-19, 2006. Madison, USA).

Kazuhiro Ishibashi¹, Satoshi Naito², and Masayuki Ishikawa¹(¹生物研、²北大院生命科学). Identification of a *Tm-1* tomato protein that inhibits tomato mosaic virus RNA replication *in vitro*. P39-5 (poster presentation) **American Society for Virology 25th Annual Meeting** (July 15-19, 2006.

Madison, USA).

石橋和大、飯哲夫(生物研).「トマトモザイクウイルスの増殖を抑制するシロイヌナズナの RNA 結合タンパク質、BTR1 の同定と解析」ポスター番号 26. **日本植物病理学会平成19年度植物感染生理談話会** (2007 年 8 月 9-11 日、京都).

平井克之^{1,2}、津田新哉³、飯哲夫^{2,4}(¹京大院理、²生物研、³農研センター、⁴JST CREST). トバモウイルス感染によるタバコモザイク病の病徴発現過程における RNA サイレンシングの役割. ポスター番号 2P151. **第55回日本ウイルス学会学術集会**(2007年10月21日-23日、札幌)

(4) 特許出願

① 国内出願 (12件)

1. 発明の名称:「ウイルス抵抗性植物生産方法、およびウイルス抵抗性植物」
発明者:石川雅之、内藤哲、浅野桃子、望月淳子、西口正通
出願人:独立行政法人科学技術振興機構
出願日:2003年2月27日
出願番号:特願 2003-051915
2. 発明の名称:「植物ウイルスの複製タンパク質およびその遺伝子の利用法」
発明者:飯哲夫、石川雅之、久保田健嗣
出願人:独立行政法人科学技術振興機構
出願日:2003年5月23日
出願番号:特願 2003-146854
3. 発明の名称:「無細胞タンパク質合成液およびその製造方法、並びにその利用」
発明者:石川雅之、内藤哲、薦田圭介、石橋和大
出願人:独立行政法人科学技術振興機構
出願日:2003年8月27日
出願番号:特願 2003-303617
4. 発明の名称:「形質転換細胞、および該細胞を用いたタンパク質の生産方法、並びにタンパク質生産キット」
発明者:森正之、土肥浩二、錦織雅樹、玉井淳史、飯哲夫、石川雅之
出願人:独立行政法人科学技術振興機構
出願日:2003年10月1日
出願番号:特願 2003-343747
5. 発明の名称:「ウイルスベクター発現用 DNA 断片およびその利用」
発明者:森正之、土肥浩二、錦織雅樹、飯哲夫、石川雅之
出願人:独立行政法人科学技術振興機構
出願日:2003年10月8日
出願番号:特願 2003-350091
6. 発明の名称:「トバモウイルスRNA複製液、その生産方法、並びにその利用」
発明者:石川雅之、錦織雅樹、森正之、土肥浩二、内藤哲
出願人:独立行政法人科学技術振興機構

出願日:2004年2月26日
出願番号:特願 2004-052499

7. 発明の名称:「ウイルスベクターの誘導発現効率を高めた植物形質転換細胞とその利用」
発明者:森正之、土肥浩二、石川雅之
出願人:独立行政法人科学技術振興機構
出願日:2004年3月1日
出願番号:特願 2004-056912
8. 発明の名称:「新規遺伝子発現方法およびその利用」
発明者:森正之、土肥浩二
出願人:独立行政法人科学技術振興機構
出願日:2005年1月27日
出願番号:特願 2005-20455
9. 発明の名称:「トバモウイルス抵抗性植物の製造方法およびその利用」
発明者:石川雅之、飯哲夫、錦織雅樹
出願人:独立行政法人農業生物資源研究所
出願日:2007年1月25日
出願番号:特願 2007-014197
10. 発明の名称:「植物ウイルス抵抗性植物の製造方法及びその利用」
発明者:石川雅之、藤崎恒喜
出願人:独立行政法人農業生物資源研究所
出願日:2007年3月5日
出願番号:特願 2007-054719
11. 発明の名称:「形質転換植物、形質転換細胞、タンパク質生産キットおよびタンパク質の生産方法」
発明者:森正之、土肥浩二
出願人:独立行政法人科学技術振興機構
出願日:2007年3月27日
出願番号:特願2007-082289
12. 発明の名称:「ウイルスベクターおよびその利用」
発明者:森正之、土肥浩二
出願人:独立行政法人科学技術振興機構
出願日:2007年4月27日
出願番号:特願2007-120181

② 海外出願 (1件)

1. 発明の名称:「TRANSFORMED CELL, PROCESS FOR PRODUCING PROTEIN USING THE CELL, PROTEIN PRODUCTION KIT, DNA FRAGMENT FOR EXPRESSING VIRUS VECTOR, USE OF THE SAME, PROCESS FOR PRODUCING TRANSFORMANT FOR PROTEIN PRODUCTION, TRANSFORMANT FOR PROTEIN PRODUCTION OBTAINED BY THE METHOD AND UTILIZATION THEREOF」
発明者:森正之、土肥浩二、石川雅之、飯哲夫、錦織雅樹、玉井淳史

出願人:独立行政法人科学技術振興機構
出願日:2004年10月1日
出願番号:PCT/JP2004/014487

(5)受賞等

① 受賞

1) 錦織雅樹:2007年度 日本植物病理学会学生優秀発表賞
「トマトモザイクウイルスRNA複製に関与するADPリボシル化因子様タンパク質の同定」
(社)日本植物病理学会

② 新聞報道

「植物感染ウイルス 試験管の中で複製」平成16年2月12日、日経産業新聞
「植物 RNA ウイルスゲノム 試験管内で複製」平成16年2月12日、日刊工業新聞
「植物遺伝子置き換え自在」平成17年12月29日、北國新聞
「植物細胞が葉の“工場”に」平成18年7月3日、北陸中日新聞

③ その他 該当なし

(6) その他特記事項

森グループが国内の企業3社と、それぞれ医薬タンパク質などの大量発現を目的とした共同研究を開始した。また、国内の複数の研究機関の研究者とワクチンタンパク質をはじめとする外来タンパク質の大量発現に関する共同研究を開始した。さらに民間企業1社から、植物培養細胞における外来タンパク質の大量発現に関する研究を受託した。

7 研究期間中の主な活動

ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
H14.11.08	チーム内研究打ち合わせ	京都大学理学研究科	3名	研究計画打ち合わせ
H15.9.5-6	チーム内研究打ち合わせ	農業生物資源研究所	7名	研究進捗状況を把握するため、各グループの最新の実験結果を発表し、今後の研究の方向を議論した。
H16.3.6	チーム内研究打ち合わせ	農業生物資源研究所	13名	研究進捗状況を把握するため、各グループの最新の実験結果を発表し、今後の研究の方向を議論した。
H16.10.26	チーム内打ち合わせ	コクヨホール(品川)	5名	研究進捗状況の把握と研究方針の相談

この他に、石川・飯グループ内では隔週(平成14-17年度)あるいは毎週(平成18, 19年度)、研究の進捗状況の報告と、それを踏まえた実験計画の検討を行った。森グループ、鈴木グループ、尾之内グループ、藤山グループとはメール等で緊密な連絡を取りつつ研究を進めた。ワークショッ

ブ、シンポジウムは開催しなかった。

8 結び

先ず、この課題を採択していただき、常に大局を見据えてご指導くださった鈴木昭憲研究総括とアドバイザーの先生方、そして、研究の円滑な進行のために献身的にご援助くださった井上悟技術参事と領域事務の方々に心からお礼申し上げます。

<得られた成果と今後の研究の展開>

本研究課題は、研究の焦点を TMV の複製に関連した現象に絞り、小ぶりの研究グループを組織して計画されました。この中で、我々は、まだ解析のメスが入られていない研究領域に踏み込むために、研究開始段階でほぼ確立されていた試験管内 TMV RNA 翻訳・複製系に加え、いくつかの新たな実験系を構築するところから始めました。結果として、植物培養細胞における TMV 同調感染系、インタクトな TMV RNA 複製複合体の精製法、TMV RNA 結合因子の精製法、試験管内 RISC 活性測定法などを確立することができました。これらの系を用いて、PMTC の同定、TMV の増殖を抑制する TMV RNA 結合性宿主因子の同定、TMV RNA の複製に必須な新規 ADP リボシル化因子様タンパク質の同定、可溶性と膜結合 TMV 複製タンパク質の機能と様態の違い、TMV の複製タンパク質により siRNA のメチル化および蓄積が阻害阻害されることなどを明らかにすることができました。これらの知見は、ウイルス増殖の人為的制御方法開拓の礎になると私は信じます。

我々は、本課題の研究を通してたくさんのことを学びましたが、特に私は、複製タンパク質が RNA サイレンシングの引き金となるマイナス鎖 RNA を細胞質で合成しないよう、いかに精密にコントロールされているかを垣間見て、TMV が恐らく長い進化の末に獲得した、効率よく増殖するための技の巧みに大きな感動を覚えました。そこには、複製タンパク質が翻訳によって合成される途上あるいは直後に起きる二者択一の運命づけのあとに起こる、特定分子との逐次的相互作用を介したコンフォメーション変化の末に、ひとつは膜結合性のウイルス RNA 複製装置構成因子に、もう一つは可溶性の RNA サイレンシング抑制因子に分化してゆく過程があると予想されます。今後、この仮説においてまだ想像の域を出ない、「複製タンパク質の特定分子との逐次的相互作用を介したコンフォメーション変化」に関し、構造的側面を含めた実体の解明を目指したいと思います。

<研究の達成度>

課題申請時に、これまでプラス鎖 RNA ウイルスの複製研究ではあまり功を奏してこなかった生化学的アプローチをあえて採用する理由として、順向きの遺伝学的手法によるウイルス増殖関連宿主因子同定の限界(重複遺伝子あるいは生育に必須な遺伝子の見逃し)を挙げました。この見通しは的中し、遺伝子が重複しているため、対応する遺伝子群の多重欠損変異体においてはじめて TMV の増殖阻害が観察される新規 ADP リボシル化因子様タンパク質を同定することができました。また、これまでほとんど何も知られていなかった複製複合体形成過程について、当該過程上にある中間体(PMTC)を同定することもできました。残念ながら、複製複合体の構成要素からの再構築、複製と細胞間移行の連携機構の理解は達成できませんでした。また、複製タンパク質が二本鎖 siRNA に結合し、メチル化を阻害することにより RNA サイレンシングを抑制するというのを、一部明らかにしながら、他の研究グループに発表されてしまったことも残念です。未解明あるいは未達成の事項については、方法論の見直し等を加えた上で、今後の研究で解決を図りたいと思います。

<プロジェクト運営>

それぞれのグループが明確なミッションをもち、その多くを達成することができたため、概ね成功であったと考えております。研究期間中に研究代表および飯グループの異動がありましたが、鈴木統括、井上参事の柔軟かつ細やかなお心遣いにより、備品整備等のご援助を得、研究の遅滞を

最小限に抑えることができました。また、研究の進展にあわせ、いくつかの研究グループの途中参加を臨機応変にお認めいただいたことも、研究の展開に大きくプラスに働いたと思います。

新たな実験系を構築した上で成果を生み出すには、長い時間が必要です。2－3年の研究プロジェクトが多い中で、CREST 研究の5年間という期間は、じっくりと腰を据えて自前の実験系の構築から研究を行うことを可能にしてくれました。また資金的にも、LC-MS/MS 法によるタンパク質同定の受託等、高額を要する研究も必要とあらば柔軟に

サポートしてくださり、希望通りに研究が進められました。研究員も他の制度より長く雇用されることが想定されたため、腰を落ち着けて大きなテーマに取り組むことができたと思います。改めて、お世話になりました関係各位に感謝申し上げます。(研究代表者:石川雅之)



農業生物資源研究所、石川グループ(平成 17 年 11 月)

植物培養細胞において誘導ウイルス感染系を開発し、種々のウイルス感染細胞を簡便かつ大量調整しタバコモザイクウイルスの複製機構の解明に貢献したことで、当初目標は達成できたと考ええる。今後、ウイルス誘導感染系はさらに多くのウイルスで用いられウイルス学の発展に貢献するものと考えられる。応用面においては本システムを用いて、外来タンパク質の高発現に成功し、大腸菌、酵母等での合成が困難な医療用タンパク質を植物培養細胞で合成することに成功した。さらに、BY-2 細胞におけるタンパク質受託合成事業を開始できたことで、実用化へ向けた応用研究における当初目標は果たせたと考える。今後、植物培養細胞での医薬品生産を近年中に実現するために、ウイルスベクターおよび植物培養細胞の最適化を行う。本システムをさらに植物体に応用し、植物工場や圃場でのタンパク質生産に向けて本研究を発展させていく。さらなる研究は新たな産業を創出すると考えられる。

鈴木昭憲 領域研究総括、井上悟 領域技術参事をはじめ戦略的創造研究推進事業部の皆様の激励、支援に心より感謝しております。(森正之)