助成番号　210399	５－２

研 究 成 果 報 告 書

研究テーマ（和文）	植物 RNA ウイルスの複製装置形成機構の RNA･タンパク質デュアルイメージング解析		
研究テーマ（英文）	Dual imaging of plant viral RNA and replicase to reveal mechanism of the formation of virus replication complex		
研究期間	2021年 ～ 2022年	研究機関名　東京農工大学	
研究代表者	氏名（漢字）	小松　健	
	氏名（カタカナ）	コマツ　ケン	
	氏名（英文）	KOMATSU Ken	
	所属機関･職名	東京農工大学･准教授	
共同研究者 ＊２名をこえる場合は、【別紙追加用紙】(P3)に３人目以降を追記してください。	氏名（漢字）	佐々木　信光	
	氏名（カタカナ）	ササキ　ノブミツ	
	氏名（英文）	SASAKI Nobumitsu	
	所属機関･職名	東京農工大学･准教授	
	氏名（漢字）		
	氏名（カタカナ）		
	氏名（英文）		
	所属機関･職名		

概要（600 字～800 字程度にまとめてください。）

植物 RNA ウイルスであるオオバコモザイクウイルス(PlAMV)の複製酵素の可視化を目指し、複製酵素の C 末端側に HA タグを付加した replicon（最小複製単位）、PlAMV-replicon-HA を作製した。アグロインフィルトレーション法により *Nicotiana benthamiana* で発現させたところ、PlAMV-replicon-HA はタグ付加がされていない元の replicon と同様に複製し、HA 抗体によるイムノブロッティングで複製酵素の発現が確認できた。これを、HA エピトープに対する一本鎖抗体と赤色蛍光タンパク質を融合させた 15F11-HA-mCh を恒常発現プロモーターから発現させるベクターと同時に植物に導入し、共焦点レーザー顕微鏡で観察を行った。その結果、赤色蛍光は小胞体周辺部だけでなく核や細胞質でも観察され、抗体プローブの非特異的な発現により複製酵素本来の局在の観察が難しいことがわかった。そこで、HA タグ付加複製酵素をもち、さらに複製時特異的に発現するサブゲノム RNA に人工転写因子 XV を保持させた PlAMV-RdRpHA-XV を作出し、これを、XV 存在下で下流の遺伝子発現を誘導するベクター(pMDC221; Brand et al., 2006)に 15F11-HA-mCh を組み込んだものと共発現させ、複製時に誘導的に 15F11-HA-mCh が発現するシステムを構築した。この系を用いて接種 24 時間、36 時間後に共焦点顕微鏡観察を行ったところ、赤色蛍光は 24 時間後には細胞内部の小胞体に隣接した顆粒を形成し、36 時間後には細胞周縁部の細胞間連絡付近に凝集体が見られた。この局在は既報の植物ウイルスの複製酵素の局在変化のモデルと矛盾しなかった。また、2 種類の 2 本鎖 RNA 結合タンパク質を用いたウイルスゲノム RNA の可視化イメージングにも取り組んだ結果、ゲノム RNA と思われる蛍光も細胞間連絡付近に観察された。本研究で確立した活性を持った状態の複製酵素とゲノム RNA の生細胞イメージング系を用いて、ウイルス複製における複合体形成の分子機構をさらに詳細に明らかにできると考えられる。

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）

雑誌	論文課題					
	著者名		雑誌名			
	ページ	～	発行年		巻号	
雑誌	論文課題					
	著者名		雑誌名			
	ページ	～	発行年		巻号	
雑誌	論文課題					
	著者名		雑誌名			
	ページ	～	発行年		巻号	
図書	書名					
	著者名					
	出版社		発行年		総ﾍﾟｰｼﾞ	
図書	書名					
	著者名					
	出版社		発行年		総ﾍﾟｰｼﾞ	

英文抄録（100 語～200 語程度にまとめてください。）
To visualize a replicase of an RNA virus, plantago asiatica mosaic virus (PlAMV), we established a system to track HA epitope-tagged protein by a fusion of a single-chain antibody against the HA (frankenbody; FB) and a red fluorescent protein (mCherry). To reduce the non-specific signal of FB-mCherry, we used a two-component inducible expression system to express FB-mCherry only when a virus replicates. When a replicase of PlAMV was tagged with HA and its subcellular localization was analyzed by replication-induced FB-mCherry, we can detect a red fluorescence (indicating a replicase of PlAMV) at endoplasmic reticulum-associated spherules at 24 hours after replication. At 36 hours after replication, red fluorescence was found near the plasmodesmata, forming large complex. These observations are consistent with the previous model of the replication complex formation. We also successfully detected viral dsRNA using dsRNA-binding proteins fused to fluorescent proteins. These results will pave the way for elucidating the detailed processes involved in the formation of the viral replication complex.