

42. ウイルスを利用したミトコンドリアの形質転換

鈴木 信弘

岡山大学 資源植物科学研究所 生物ストレスユニット

Key words : ミトコンドリア, ミトウイルス, 菌類ウイルス, *Helicobasidium mompa mitovirus 1*, *Cryphonectria parasitica mitovirus 1*

緒言

ミトコンドリア病は、その名の通り、体内のミトコンドリアに異常をきたす病である。その病因が同定されている例は、少ない。例えば、赤色ぼろ線維・ミオクロヌステんかん症候群 (MERF) は、ミトコンドリア DNA のリジン tRNA 内の点変異により惹起される。しかし、このオルガネラの再現性が高い形質転換法は確立されておらず、本病の治療法が無いのが現状である。

下等真核生物のカビは自然界に 150 万にも上る種が存在すると言われている。それらの自然分離株には数%から高いもので 90% に RNA ウイルスが単独あるいは混合感染している。その中で宿主菌のミトコンドリアに感染する一群のウイルス、ミトウイルス (属名) が存在する。最初のミトウイルス (*Cryphonectria parasitica mitovirus 1*, CpMV1) は Hillman 博士ら¹⁾によりクリ胴枯病の病原糸状菌 (子のう菌) から発見発見された。類似のウイルスは他の酵母を除く子のう菌、担子菌 (例えば, *Heterobasidium mompa mitovirus 1*, HmMV1) から広く見つかる²⁾。一方、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* からは、宿主細胞の細胞質で複製する類似のナルナウイルス属 (ミトウイルス属と同一の科に属する) が見つかる³⁾。

ミトウイルスは、ウイルスの中で最も小さいゲノム (2~3kb の一本鎖 (ss) (+) RNA) を持ち、単一の ORF には RNA 複製酵素 (RdRp) をコードするが、コート蛋白質遺伝子は持たない (図 1A)。粒子を作らずに、RNA 合成酵素とゲノム RNA が結合した状態 (RNP) で存在する (図 1B)。ORF はミトコンドリア型のコドンを使用し、複製部位もミトコンドリアである。しかし、ミトウイルスはベールに包まれた部分が多く、その感染機構は不明である (図 1C)。例えば、1) 単個体 (コロニー) ミトコンドリアの感染率、2) ミトコンドリア間の水平伝搬能、3) 宿主範囲、4) ミトコンドリア内複製部位、5) 宿主防御機構とのせめぎあい、等不明である。これらの生物学にとって極めて興味深い疑問が解明されない大きな理由の一つに、他の動物ウイルスあるいは植物ウイルスとは異なり、研究者が接種できないことがあげられる。著者の研究室では、細胞融合技術を用いて、ミトウイルス (CpMV1) が異種菌で複製することを確認した⁴⁾。

本研究では、遺伝子治療法開発の第一歩としてウイルスを利用した真核細胞ミトコンドリアの形質転換系の確立を目指す。具体的には、紫紋羽病菌から分離されたミトウイルス (*Helicobasidium mompa mitovirus 1*, HmMV1) を材料に著者らが開発した糸状菌類プロトプラスト作製技術、RNA 導入技術、感染性 cDNA 構築技術⁵⁻⁷⁾を駆使し、真核細胞オルガネラに感染する唯一無二のミトウイルスの逆遺伝学・ミトコンドリア形質転換の確立に向け感染性クローンの構築を目指す。

方法および結果

1. ミトウイルスの逆遺伝学的解析にむけた感染性クローンの構築を目指す

1) ミトウイルス (HmMV1) 完全長 cDNA クローンの構築

Saccharomyces cerevisiae の細胞質で複製するナルナウイルス (同属のウイルス) の感染性クローンは既に整備されているが³⁾、ミトウイルスでの報告は無い。

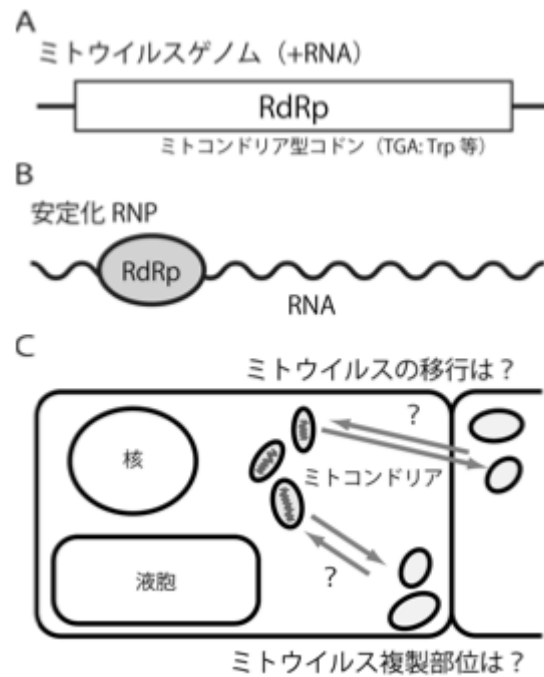


図1. ミトコンドリア感染性ミトウイルス

(A) 一般的なミトウイルス (プラス RNA ウィルス) ゲノム構造 唯一 RNA 依存 RNA 合成酵素 (RdRp) をコードする。(B) 感染細胞中での存在様式 粒子は形成せずに RdRp との複合体複合体として存在。(C) ミトウイルスの推定感染様態と不明な点。

そこで、ミトウイルス (HmMV1) 感染糸状菌からウイルス由来の dsRNA をセルロースカラムを用いる手法により、精製した (図2)。

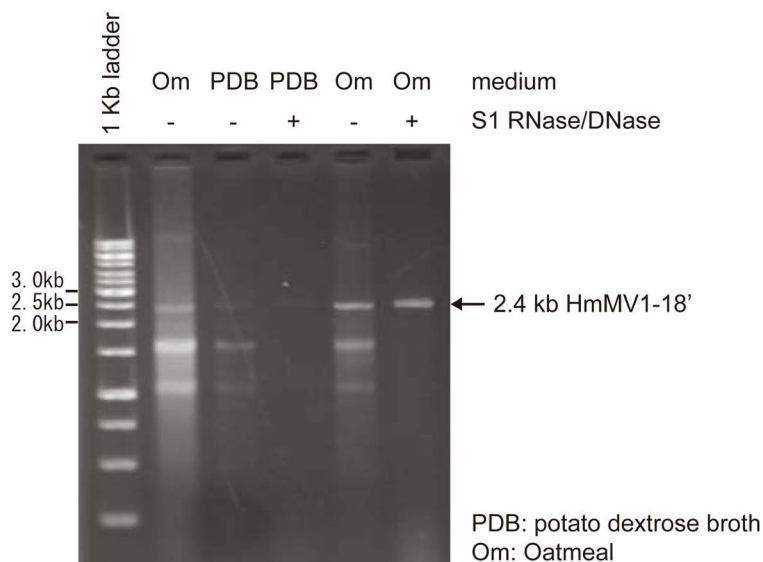


図2. 紫紋羽病菌からのミトウイルス (HmMV1) の検出

2種の培地 (オートミール培地とジャガイモ寒天培地) で生育した紫紋羽病菌からの HmMV1 dsRNA の抽出 S1 nuclease と DNase 処理後は HmDV1 複製型 dsRNA と一部の rRNA が検出される。

この dsRNA は (+) RNA ゲノムを持つ HmMV1 ウイルスの複製型 RNA で、1 本鎖核酸特異的分解酵素 (S1 nuclease)、2 本鎖 DNA 分解酵素に対して耐性を示した (図 2)。大崎ら⁸⁾の既報の配列データを基に、プライマーを設計し、RT-PCR 法により完全長 cDNA を合成した。得られた cDNA をサンガー法により配列を決定した。その結果、大崎らの配列 (図 3 HmMV1-18) に比較して 8 箇所塩基置換 (その内 4 箇所アミノ酸置換をもたらす) が認められた。

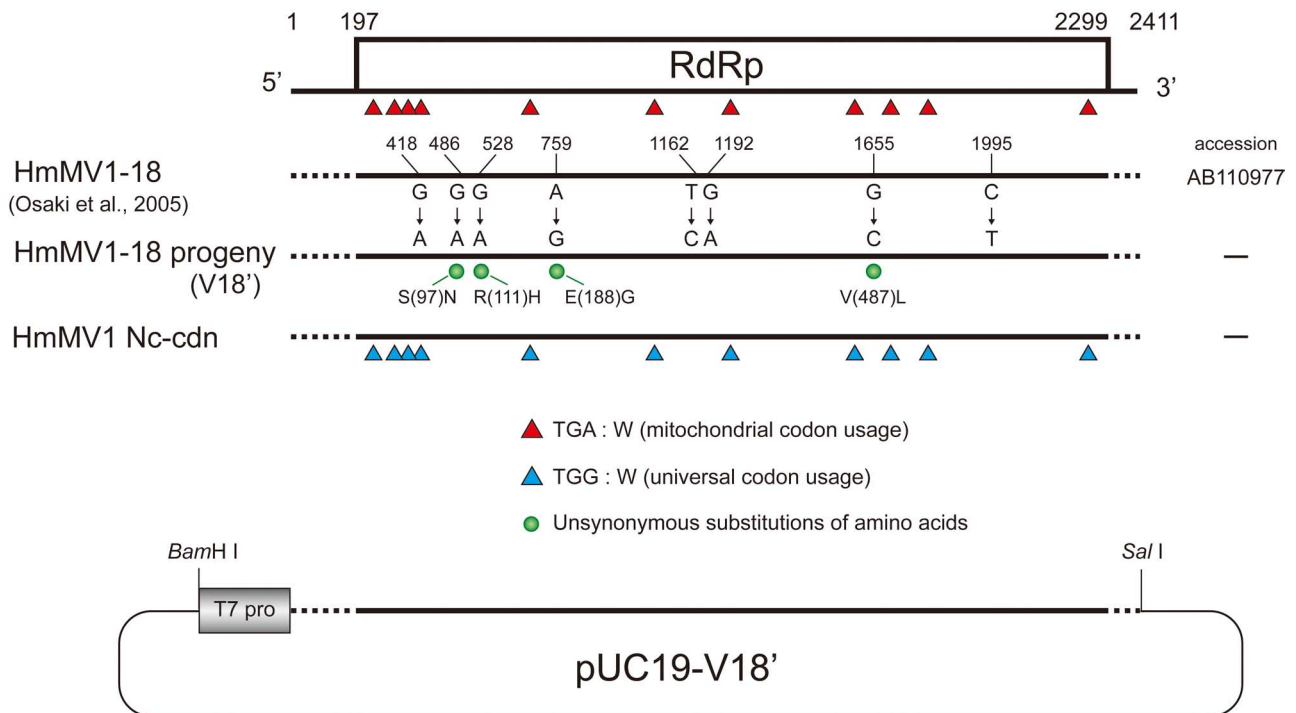


図 3. ミトウイルスの完全長 cDNA

HmMV1 のゲノムは 2411 塩基からなり、RNA 依存 RNA 合成酵素 (RdRp) をコード可能な単一の ORF を持つ。しかし、この RdRp は UGA コドンがトリプトファン指定するミトコンドリア型コドンとして働くことを仮定した時のみ翻訳可能となる。HmMV1 ORF 上にはこのような UGA コドンが 11 (赤印) 存在する。HmMV1 Nc-cdn では UGA コドンを核型のトリプトファンコドン (UGG) に置換した。

一方、11 個のミトコンドリア型のトリプトファンコドン (UGA) (核型では停止コドンとして機能する) は保存されていた (図 3 HmMV1-18 progeny)。従って、まずこれらの UGA コドンを核型トリプトファンコドン (UGG) に変更した cDNA も同時に合成した (図 3)。尚、試験管内でウイルスゲノムと同一の配列を有する RNA の合成を可能とするため、5'末端に T7 プロモーター、3'末端に *Sal I* を付加した。2 種の cDNA コンストラクトを *Sal I* で切断後、試験管内 RNA 合成に回した。

上記の感染性 RNA 合成用コンストラクト 2 つの他に、形質転換用コンストラクト 2 つも作製した。用いたベクターは pCPEXHY で、恒常的に働くプロモーター (GPD) の下流に、HmMV1 cDNA を連結した。

2) ミトウイルス (HmMV1) 完全長 cDNA の感染性アッセイ

宿主細胞として、モデル糸状菌宿主であるクリ胴枯病菌 (*Cryphonectria parasitica*) RNAi 欠損株 (免疫不全株) を用いた。*C. parasitica* から常法によりプロトプラストを作製し、ウイルス RNA は電気穿孔法により、一方ウイルス cDNA は PEG 法により導入した。プロトプラストから菌糸体を再生し、ウイルス感染の有無を確認した。尚、当研究室では、RNA、DNA のプロトプラストへの導入はルーティンワークとして行っている。

しかし、残念ながら試した 4 つのコンストラクト (単独と混合処理合わせて計 6 つ) 全て陰性であった。

考 察

今回の陰性の結果を受け、今後の対策として当初予定した下記の項目を実施する予定である。最も重要な鍵となるのはミトコンドリアへのウイルス因子の輸送であるが、本研究ではミトコンドリアで使われる核コードの tRNA (RNA 用) と核コードの ATPase (RdRp 蛋白質用) の輸送系に牽引させる手法をとる。まず、tRNA・リボザイム配列をミトウイルス (HmMV1)cDNA へ付加する。リボザイムにより輸送後に tRNA 領域が分離されることを期待する。導入ウイルス核酸として DNA (核ゲノムからウイルス RNA 供給) あるいは RNA (電気穿孔法により直接供給) ベースの試料を用いる。また、ミトウイルス (HmMV1)RdRp に ATPase の輸送シグナルを付加、細胞質内でミトウイルス RNA (核ゲノムから供給) -RdRp の特異的結合の後、ミトコンドリアへの輸送・放出を期待する。核型コドンに改変した RdRp 遺伝子を合成後、輸送シグナルとの融合タンパク質遺伝子を構築し、宿主の核染色体へ導入する。供給ウイルス核酸として DNA、RNA ベースの両手法を検討する。予備試験として、既に *Neurospora crassa* 由来の NTPase Subunit 9 のシグナルペプチドが、効率的に融合された GFP (Su9: GFP) をミトコンドリアへ局在させることを確認している⁴⁾。感染性クローンが確立された場合、逆遺伝学を用い、ウイルス複製、病徴発現に必要な領域の同定を進める。また、ウイルス感染性 cDNA に外来遺伝子としてコドンをミトコンドリア型に改変した蛍光蛋白質遺伝子を挿入し、ベクター化を試みる必要がある。

共同研究者

千葉壮太郎博士 (名古屋大学アジアサテライトキャンパス) 及び兼松聡子博士 (農業研究機構果樹研究所) から材料、助言を頂戴した。ここに深謝する。

文 献

- 1) Polashock J, J, Hillman B, I. A small mitochondrial double-stranded (ds) RNA element associated with a hypovirulent strain of the chestnut blight fungus and ancestrally related to yeast cytoplasmic T and W dsRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:8680-84.
- 2) Ghabrial S, Suzuki N. Viruses of plant pathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol* 2009;47:353-384. doi:10.1146/annurev-phyto-080508-081932.
- 3) Wickner, R. B., Fujimura, T. & Esteban, R. Viruses and prions of *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv Virus Res* 2013;86:1-36. doi:B978-0-12-394315-6.00001-5.
- 4) Eusebio-Cope A, Sun L, Tanaka T, Chiba S, Kasahara S, Suzuki N. The chestnut blight fungus for studies on virus/host and virus/virus interactions: From a natural to a model host. *Virology* 2015;477:164-175. doi: 10.1016/j.virol.2014.09.024.
- 5) Chiba S, Suzuki N. Highly activated RNA silencing via strong induction of dicer by one virus can interfere with the replication of an unrelated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112:E4911-E4918. doi:10.1073/pnas.1509151112.
- 6) Kondo H, Kanematsu S, Suzuki, N. Viruses of the white root rot fungus, *Rosellinia necatrix*. *Adv Virus Res* 2013;86:177-214.
- 7) Zhang R, Hisano S, Tani A, Kondo H, Kanematsu S, Suzuki N. A capsidless ssRNA virus hosted by an unrelated dsRNA virus. *Nat Microbiol* 2016. doi:10.1038/NMICROBIOL.2015.1031.
- 8) Osaki H, Nakamura H, Nomura K, Matsumoto N, Yoshida K. Nucleotide sequence of a mitochondrial RNA virus from the plant pathogenic fungus, *Helicobasidium mompa* Tanaka. *Virus Res* 2005;107:39-46, doi:S0168-1702(04)00263-1.