

平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究終了報告書

◆記入に当たっては、「平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究終了報告書記入要領」を参照してください。

ローマ字		HIBI TADAAKI				
①研究代表者氏名		日比 忠明			②所属研究機関・部局・職	玉川大学・学術研究所・教授
③研究課題名	和文	植物ウイルスのゲノム複製装置の分子解剖と無細胞ウイルス複製系の開発に関する研究				
	英文	Molecular anatomy of plant viral genome replication machinery for the development of cell-free viral replication system.				
④研究経費 金額単位：千円	平成13年度	平成14年度	平成15年度	平成16年度	平成17年度	総合計
	30,100	22,800	19,000	15,200	11,400	98,500
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者） *平成18年3月31日現在						
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担（研究実施計画に対する分担事項）			
日比 忠明	玉川大学・学術研究所・教授	植物病理学	TMV ならびに SbCMV のゲノム複製装置の分子解剖；総括			
難波 成任	東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授	植物病理学	ASGV ならびに TVX のゲノム複製装置の分子解剖			
白子 幸男	東京大学・アジア生物資源環境研究センター・教授	植物病理学	SBWMV のゲノム複製装置の分子解剖ならびに無細胞 SBWMV 複製系の開発			
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）						
<p>植物ウイルスには RNA をゲノムとするウイルスと DNA をゲノムとするウイルスとがあり、それらの複製様式は多種多様である。ウイルスのゲノム複製に関与するタンパク質成分にはウイルス遺伝子由来と宿主遺伝子由来のものがある。ウイルスのゲノム複製機構を解明するためには、ゲノム複製装置の構成成分の構造と機能を解析するとともに、これらの分子内の機能ドメインや結合ドメインを詳細に解析し、最終的には各分子による複製装置複合体の試験管内再構成にまで発展させ、さらには、完全な無細胞ウイルス複製系の樹立まで試みる必要がある。本研究は、ウイルスゲノムの構造がそれぞれ互いに大きく異なる5種の植物ウイルスについて、それらのゲノム複製装置に関する分子解剖学的研究を展開し、上記の最終目標の達成を図るものである。</p>						

⑦ 研究成果の概要 (研究目的に対する研究成果を必要に応じて図表等を用いながら、簡潔に記入してください。)

1. TMV のゲノム複製装置の分子解剖：タバコモザイクウイルス (TMV) RNA 複製酵素 (RdRp) のアポ酵素は TMV ゲノム由来の 126K タンパク質と 183K タンパク質とのヘテロダイマーで構成されており、これにさらに数種の宿主タンパク質が結合することによって活性のあるホロ酵素が形成されると推定される。そこで、酵母 two-hybrid 法、酵母 three-hybrid 法、ファーウェスタン法、免疫沈降法、RT-PCR、Virus-induced gene silencing (VIGS) などを用いて、TMV RdRp の各ドメインと結合する宿主タンパク質をタバコから探索・同定し、それらの構造とウイルス複製における機能を解析した。その結果、ヘリカーゼ (H) ドメインにはプロテインキナーゼ (NtPERK1)、プロテインホスファターゼ 2C (NtPP2C-2) およびアルギニンデカルボキシラーゼ (ADC)、ポリメラーゼ (P) ドメインにはリングフィンガータンパク質 (PHF15) が、それぞれ特異的に結合することが示された。また、タバコの翻訳伸長因子 eEF1A が TMV RNA の 3' 非翻訳領域 (3' -UTR) ならびに TMV RdRp のメチルトランスフェラーゼ (M) ドメインに直接結合して、ウイルスゲノム複製複合体 (VRC) に局在すること、その発現抑制によって TMV の増殖が阻害され、逆にその過剰発現によって TMV の増殖が促進されることから、eEF1A が TMV VRC の必須の構成成分であることが示された。一方、ADC と PHF15 はともに TMV RdRp の 126K タンパク質と 183K タンパク質とのヘテロダイマー形成を阻害する因子であり、また、NtPERK1 と NtPP2C-2 はタンパク質のリン酸化/脱リン酸化によって TMV 複製を制御している可能性が示唆された。なお、TMV の細胞間移行に関与する因子として単離された転写因子 NtKN1 が VRC の形成に関与している可能性も示された。

2. SbCMV のゲノム複製装置の分子解剖：ダイズ退緑斑紋ウイルス (SbCMV) のゲノム構造の中に、ウイルスの複製に必須ではあるがまだその具体的機能が不明な遺伝子 (ORFII, III) が残されている。そこで、まず、それらの機能を解明するため、ORF I-VI の各翻訳産物間の相互作用を酵母 two-hybrid 法によって解析したところ、このうち ORF II 産物はその C 端側に存在するロイシンジッパーで相互に自己結合しており、この結合がウイルスの病原性に必須であることが示された。一方、ピチア酵母で大量発現させた逆転写酵素 (ORFV 産物) について、現在、その活性検定を進めている。

3. ASGV のゲノム複製装置の分子解剖：Capillovirus 属のタイプ種であるアップルステムグルーピングウイルス (ASGV) のゲノムは、RdRp と外被タンパク質 (CP) を含む約 240 kDa のタンパク質をコードするほぼ全長にわたる ORF1 と、3' 末端側にそれと重複して約 36 kDa のタンパク質をコードする短い ORF2 を含む。RdRp と CP の領域の間には、分離株間で多数の変異の認められる機能未知の variable region が in-frame で存在する。そこで、これらの遺伝子発現機構について解析した。ORF1 に 1 塩基のサイレント変異を導入すると病原性が低下したが、これは変異導入部位近傍の RNA 構造の変化により、ORF1 内部で起こる翻訳フレームシフトの効率が低下したためと考えられ、実際に *in vitro* 翻訳実験により ORF1 内部でフレームシフトが起きることを明らかにした。また、variable region 内に終止コドンを導入した変異株を作製し、病原性の解析を行ったところ、フレームシフトしない ORF1 の全長ポリプロテインは感染に必須ではないことが明らかとなり、一方、variable region の発現は ASGV の感染に必須ではないものの、その病原性とウイルス蓄積量に関与することが示された。

4. TVX のゲノム複製装置の分子解剖：Potexvirus 属ウイルスのゲノムには、ORF1 と 5 にそれぞれ RdRp と CP が、ORF2, 3, 4 に TGB スーパーグループの細胞間移行タンパク質がそれぞれコードされている。Tulip virus X (TVX) を含む Potexvirus 属のタイプ種であるジャガイモ X ウイルス (PVX) について、ウイルスの病徴発現に関わるウイルス因子を同定するため、タバコにおける病徴の異なる 3 系統、PVX-BS (無病徴)、PVX-OS (輪状斑) および PVX-BH (モザイク) を用いて、キメラウイルスを作製するとともに、部位特異的変異を導入して解析した結果、5' 非翻訳領域内の 1 塩基が輪状斑とモザイクの病徴を決定していること、および RdRp の C 末端領域内の 1 アミノ酸がいずれの病徴に対しても病徴発現と病徴抑制 (無病徴) を決定していることが示された。

5. SBWMV のゲノム複製装置の分子解剖ならびに無細胞 SBWMV 複製系の開発：ムギ類萎縮ウイルス (SBWMV) について、酵母 two-hybrid 法を用いて、ウイルスゲノムにコードされる全てのタンパク質間および複製酵素タンパク質の機能ドメイン間の相互作用を調べたが、有意な相互作用は検出されなかった。次に、オオムギ葉肉プロトプラストへの完全長 cDNA クローン由来 *in vitro* 転写産物による感染系を確立した後、この系を用いて、本ウイルスの RNA 複製適温が 17°C であり 20°C 以上では複製しないこと、日本産、米国産、英国産の 3 分離株間で RNA1 と RNA2 のリアソートメントが可能であることを証明した。SBWMV の RNA1 は 2 種類の複製酵素タンパク質 p152 と p211 をコードし、前者の終止コドンの読み過しにより後者が発現される。そこで、2 種の変異型 RNA1 を用いて両タンパク質の相互作用と酵素活性との関係を調べたところ、p152 と p211 がシスに発現することで活性の高い複製酵素複合体が形成されるという翻訳共役型複合体形成モデルが示唆された。また、SBWMV RNA 複製におけるサイレンシング抑制機構について解析したところ、p152/p211 内の未同定サイレンシング抑制領域が感染初期の RNA 複製を成立させ、感染後期の隣接細胞への移行には p19 がサイレンシング抑制因子として機能している可能性が示唆された。一方、コムギ胚芽抽出液を母体とする無細胞 SBWMV 複製系の開発に向けて、現在、25°C でも複製可能な変異型ウイルスの作出と p152 遺伝子の終止コドンに対するサブプレッサー tRNA 画分と膜画分等を加えた高効率の無細胞ウイルス複製系の構築に関する実験を展開中である。

⑧特記事項 (この研究において得られた独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、当該研究分野及び関連研究分野への影響等、特記すべき事項があれば記入してください。)

1. 植物 RNA ウイルスのゲノム複製装置はウイルス遺伝子由来のタンパク質成分と宿主遺伝子由来のタンパク質成分とによって構成されている。しかし、ウイルスタンパク質成分の性状は比較的よく解析されているにもかかわらず、複製装置の単離・精製ならびに宿主タンパク質成分の解析に関しては、ようやく最近、数種ウイルスで報告がなされはじめた状況である。TMV の無細胞ウイルス複製系についてはすでに我々が開発しており (Watanabe *et al.*, 1999)、その後、無細胞ウイルス複製・翻訳系も開発されているが (Komoda *et al.*, 2004)、それらを構成する宿主成分については、従来、ほとんど未解明であった。本研究では、TMV RdRp と結合する 5 種の宿主タンパク質成分を同定・単離することに成功した。これらは、翻訳伸長因子 eEF1A を除いて、いずれもこれまでにウイルス複製との関連について報告例のない宿主タンパク質である。一方、eEF1A は TMV RNA の 3' -UTR ならびに TMV RdRp の M ドメインに直接結合して、VRC に局在し、その発現抑制によって TMV の増殖が阻害され、逆にその過剰発現によって TMV の増殖が促進されることから、TMV VRC の必須の構成成分であることが今回初めて明らかにされた。現在では、TMV の複製と移行が VRC を介して連動していることが推定されており (Kawakami *et al.*, 2004)、eEF1A は TMV はもとより他のウイルスにおいてもその複製・移行における重要性が注目されることになろう。他の 4 種の宿主タンパク質のうち、ADC と PHF 15 は TMV 複製の阻害因子であり、NtPERK1 と NtPP2C-2 はタンパク質のリン酸化/脱リン酸化によって TMV 複製を制御している可能性が示唆された。さらに、TMV の細胞間移行に関与する因子として単離された転写因子 NtKN1 が VRC の形成に関与している可能性も示された。これらの宿主タンパク質は eEF1A とは異なり、VRC の直接的な構成成分とは考えにくい、TMV の複製を間接的に制御しており、TMV の複製には予想以上に多種の宿主タンパク質が関与していることを示すものである。

2. SbCMV の ORFII 産物とその C 端側に存在するロイシンジッパーで相互に自己結合しており、この結合がウイルスの病原性に必須であることが示された。植物 2 本鎖 DNA ウイルスにおいてはカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の ORFIII 産物の自己結合の報告以外にはこのような報告例はない。CaMV の ORFIII はウイルスの複製に必須で核酸結合能を有しており、SbCMV の ORFII 産物との機能の類似性が推定されるが、両者間にはアミノ酸配列上の相同性はまったくない。ORFII 産物の核酸結合能や細胞内あるいはウイルス粒子内の所在などを解析することによって、その機能を明らかにできるものと考えられる。

3. *Capillovirus* 属ウイルスの ASGV の variable region に終止コドンを導入した変異株が感染性を維持したことから、ASGV の感染には ORF1 全長のポリプロテインの発現が必須ではないことが明らかになったが、この変異株の遺伝子構成は近縁な *Trichovirus* 属ウイルスと類似しており、この 2 つのウイルス属の進化的な関連が強く示唆された。また、同時に自然界にはそのような変異を持つ *capillovirus* が存在しないことから、従来何の機能もないと考えられてきた *capilloviruse* の variable region に何らかの機能があることが示唆された。このことは variable region の長さを変えた ASGV 変異体において病徴が異なることから確認された。今後、variable region と相互作用する宿主因子を探索することにより、ウイルスの病徴発現の機構へとつながることが期待される。

4. タバコにおける病徴の異なる PVX の 3 系統の病徴決定因子が複製酵素である RdRp の C 末端領域および 5' 非翻訳領域にあったことから、これら因子が病徴型の決定に何らかのメカニズムにより関与していることが明らかになった。そこで、さらにこの領域に相互作用する宿主因子を探索することにより、従来全く知られていない植物ウイルスの病徴決定機構解明の糸口が得られる可能性がある。

5. 植物 RNA ウイルスゲノムの翻訳終止コドンの部分的読み過ごし頻度は一般に 5-10% と推定され、下流域を含むタンパク質の合成量は上流域のみのタンパク質の 1/10-1/20 程度に減少する。SBWMV 複製酵素では p152 が前者に、p211 が後者に相当する。この場合、p211 に比べて過剰に発現される p152 はどんな機能を持っているのか、そして、転写レベルではなく、翻訳レベルで合成量を調整する部分的読み過ごし機構はどんな意味を持っているのであろうか。本研究で得られた結果から、p152 タンパク質と p211 タンパク質が同一 RNA 分子からシス発現されることが RNA 複製複合体形成に必要であることが示唆されたが、部分的読み過ごし機構の持つ重要な意味の一つとして、さらにこの新規な仮説を実証する実験が必要である。

6. SBWMV の日本・米国・英国産 3 分離株の感染性 cDNA クローンを用いたプロトプラストに対する RNA1 と RNA2 の組換え接種試験の結果、全ての組み合わせで細胞レベルでは RNA が複製されることが明らかとなった。従って、アミノ酸レベルでは遠縁の 3 分離株の複製酵素が互いに異なる分離株の RNA のシス配列を認識していると推察されるが、これは複製複合体の高次構造形成における鋳型 RNA の重要性を新たに示すものである。一方、無細胞ウイルス複製系に宿主植物由来の細胞抽出液を用いる場合、宿主植物の RNA サイレncing 経路の制御を考慮する必要がある。本研究では SBWMV の RNA サイレncing 抑制機構について解析した。RNA サイレncing 抑制活性の標準的な検出法として、*Nicotiana benthamiana* を用いたアグロ注入検定法が利用されているが、これまでに単子葉植物を用いた検定法は確立していない。今後、コムギやオオムギなどの単子葉植物由来の細胞抽出液を用いたウイルス複製系を確立すれば、単子葉植物における RNA サイレncing 抑制活性の検定も容易になるものと推察される。

⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

論文:

- 1) Takemoto, Y. and Hibi, T.: Genes Ia, II, III, IV and V of *Soybean chlorotic mottle virus* are essential but Ib product is nonessential for the systemic infection. *J. Gen. Virol.* 82, 1481-1489, 2001.
- 2) Yamaji, Y., Kagiwada, S., Nakabayashi, H., Ugaki, M. and Namba, S.: Complete nucleotide sequence of *Tulip virus X* (TVX-J): borderline between species and strains within the genus *Potexvirus*. *Arch. Virol.* 146, 2309-2320, 2001.
- 3) Lu, X., Hirata, H., Yamaji, Y., Ugaki, M. and Namba, S.: Random mutagenesis in a plant viral genome using a DNA repair-deficient mutator *Escherichia coli* strain. *J. Virol. Methods* 94, 37-43, 2001.
- 4) Yamaji, Y., Lu, X., Kagiwada, S., Oshima, K. and Namba, S.: Molecular evidence that a lily-infecting strain of *Tulip breaking virus* from Japan is a strain of *Lily mottle virus*. *European J. Plant Pathol.* 146, 2309-2320, 2001.
- 5) Hibi, T.: SbCMV-like viruses. *The Springer Index of Viruses* p. 217-221, 2002.
- 6) Kagiwada, S., Yamaji, Y., Nakabayashi, H., Ugaki, M. and Namba, S.: The complete nucleotide sequence of *Potato virus X* strain OS: the first complete sequence of a Japanese isolate. *J. Gen. Plant Pathol.* 68, 94-98, 2002.
- 7) Nakabayashi, H., Yamaji, Y., Kagiwada, S., Ugaki, M. and Namba, S.: The complete nucleotide sequence of a Japanese isolate of *White clover mosaic virus* strain RC. *J. Gen. Plant Pathol.* 68, 173-176, 2002.
- 8) Miyanishi, M., Roh, S. H., Yamamiya, A., Ohsato, S., and Shirako, Y.: Reassortment between genetically distinct Japanese and US strains of *Soil-borne wheat mosaic virus*: RNA1 from a Japanese strain and RNA2 from a US strain make a pseudorecombinant virus. *Arch. Virol.* 147, 1141-1153, 2002.
- 9) Suzuki, M., Hibi, T., Masuta, C.: RNA recombination between cucumoviruses: possible role of predicted stem-loop structures and an internal subgenomic promoter-like motif. *Virology* 306, 77-86, 2003.
- 10) Suzuki, M., Yoshida, M., Yoshinuma, T., Hibi, T.: Interaction of replicase components between *Cucumber mosaic virus* and *Peanut stunt virus*. *J. Gen. Virol.* 84, 1931-1939, 2003.
- 11) Hirata, H., Lu, X., Yamaji, Y., Kagiwada, S., Ugaki, M. and Namba, S.: A single silent substitution in the *Apple stem grooving virus* genome causes symptom attenuation. *J. Gen. Virol.* 84, 2579-2583, 2003.
- 12) Ohsato, S., Miyanishi, M., Shirako, Y.: The optimal temperature for RNA replication in cells infected by *Soil-borne wheat mosaic virus* is 17 °C. *J. Gen. Virol.* 84, 995-1000, 2003.
- 13) Shimizu, T., Yamaji, Y., Ogasawara, Y., Hamada, K., Sakurai, K., Kobayashi, T., Watanabe, T., Hibi, T.: Interaction between the helicase domain of *Tobacco mosaic virus* replicase and a tobacco arginine decarboxylase. *J. Gen. Plant Pathol.* 70, 353-358, 2004.
- ⑭ Takemoto, Y., Hibi, T.: Self-interaction of ORF II protein through the leucine zipper is essential for *Soybean chlorotic mottle virus* infectivity. *Virology* 332, 199-205, 2005.
- 15) Komatsu, K., Kagiwada, S., Takahashi, S., Mori, T., Yamaji, Y., Hirata, H., Ozeki, J., Yoshida, A., Suzuki, M., Ugaki, M. and Namba, S.: Phylogenetic characteristics, genomic heterogeneity and symptomatic variation of five closely related Japanese strains of *Potato virus X*. *Virus Genes* 31, 99-105, 2005.
- ⑮ Kagiwada, S., Yamaji, Y., Komatsu, K., Takahashi, S., Mori, T., Hirata, H., Suzuki, M., Ugaki, M. and Namba, S.: A single amino acid residue of RNA-dependent RNA polymerase in the *Potato virus X* genome determines the symptoms in *Nicotiana* plants. *Virus Res.* 110, 177-182, 2005.
- 17) Yamamiya, A., Miyashini, M., Shirako, Y.: Stable deletions arising in the readthrough region of *Soil-borne wheat mosaic virus* RNA2 define the 5' limit of the functional promoter for the p19 subgenomic RNA. *Arch. Virol.* 150, 1871-1884, 2005.
- ⑯ Yamaji, Y., Kobayashi, T., Hamada, K., Sakurai, K., Yoshii, A., Suzuki, M., Namba, S., Hibi, T.: *In vivo* interaction between *Tobacco mosaic virus* RNA-dependent RNA polymerase and host translation elongation factor 1A. *Virology* 347, 100-108, 2006.
- 19) Takahashi, S., Komatsu, K., Kagiwada, S., Ozeki, J., Mori, T., Hirata, H., Yamaji, Y., Ugaki, M., Namba, S.: The efficiency of interference of *Potato virus X* infection depends on the target gene. *Virus Res.* 116, 214-217, 2006.
- 20) Ozeki, J., Takahashi, S., Komatsu, K., Kagiwada, S., Yamashita, K., Mori, T., Hirata, H., Yamaji, Y., Ugaki, M., Namba, S.: A single amino acid in the RNA-dependent RNA polymerase of *Plantago asiatica mosaic virus* contributes to systemic necrosis. *Arch. Virol.* in press.

- ⑨研究成果の発表状況（続き）（この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（掲載が確定しているものを含む。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。）

国際会議発表：

- 1) Hibi, T., Ogasawara, Y., Yoshinuma, T., Kobayashi, T., Shimizu, T., Watanabe, T., Suzuki, M.: Screening for host factors interacting with TMV RNA polymerase by yeast two-hybrid system. 10th International Congress, Molecular Plant-Microbe Interactions, 2001.
- 2) Shirako, Y., Roh, S. H., Miyanishi, M.: How far can positive strand RNA virus species be diverged? : the case of *Soil-borne wheat mosaic virus* in the genus *Furovirus*. The 6th International Symposium on Positive-Strand RNA Viruses, 2001.
- 3) Miyanishi, M., Shirako, Y.: Infectious in vitro transcripts of a US strain of *Soil-borne wheat mosaic virus* and reassortment experiments with a Japanese strain. American Society for Virology Meeting, 2001.
- 4) Hibi, T., Shimizu, T., Ogasawara, Y., Kobayashi, T., Yoshinuma, T., Watanabe, T., Suzuki, M., Yamaji, Y. : Tobacco arginine decarboxylase, a possible host factor blocking 126K/183K heterodimer formation of TMV RNA polymerase as indicated by the yeast three-hybrid system. 12th International Congress of Virology, 2002.
- 5) Kagiwada, S., Yamaji, Y., Takahashi, S., Komatsu, K., Hirata, H., Hosoi, M., Ugaki, M., Namba, S.: The border between species and strains within the genus *Potexvirus*. 12th International Congress of Virology, 2002.
- 6) Namba, S., Hirata, H., Hosoi, M., Kagiwada, S., Ugaki, M.: Unique gene expression of the *Capillovirus* genome containing a long open reading frame coding a pseudo-polyprotein. 12th International Congress of Virology, 2002.
- 7) Miyanishi, M., Shirako, Y.: Conserved nucleotide sequence elements in the 5'- and 3'-terminal regions of RNA1 and RNA2 of *Furoviruses*. American Society for Virology, 2002.
- 8) Hibi, T., Shimizu, T.: Interaction of a novel tobacco DnaJ-like protein with the movement protein of *Tobacco mosaic virus* in yeast and in vitro. 11th International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, 2003.
- 9) Miyanishi, M., Shirako, Y.: Roles of p37, CP and p19 of *Soil-borne wheat mosaic virus* in virus movement. American Society for Virology Meeting, 2003.
- 10) Shirako, Y., Miyanishi, M.: Proposal for taxonomy of *Soil-borne wheat mosaic virus* in the genus *Furovirus*. American Society for Virology Meeting, 2003.
- 11) Shirako, Y.: Studies on *Soil-borne wheat mosaic virus* : viral proteins required for systemic infection of wheat plants and development of this virus as a high-level expression vector for monocot plants. International Symposium on Positive-Strand RNA Viruses, 2004.
- 12) Shirako, Y., Miyanishi, M.: A plant RNA virus-based expression vector for wheat plants. American Society for Virology Meeting, 2004.
- 13) Miyanishi, M., Shirako, Y.: The capsid protein of *Soil-borne wheat mosaic virus* is not required for cell-to-cell movement and systemic infection in wheat plants. American Society for Virology Meeting, 2004.
- 14) Hibi, T., Yamaji, Y., Sakurai, K., Hamada, K., Yoshii, A., Namba, S.: *In vivo* interaction between *Tobacco mosaic virus* RNA-dependent RNA polymerase and host translation elongation factor 1A. 2nd Asian Conference on Plant Pathology, 2005.
- 15) Hibi, T., Shimizu, T., Yoshii, A., Hamada, K., Sakurai, K., Yamaji, Y., Namba, S.: Tobacco DnaJ protein mediates the accumulation of stable TMV MPs to facilitate the viral cell-to-cell movement. 13th International Congress of Virology, 2005.
- 16) Shirako, Y., Miyanishi, M.: Emergence of a *Soil-borne wheat mosaic virus* mutant that systemically infects wheat plants at 25 ° C. American Society for Virology Meeting, 2005.
- 17) Shirako, Y., Miyanishi, M.: Functional and taxonomic analyses of *Soil-borne wheat mosaic virus* genome. American Phytopathological Society Meeting, 2005.

- ⑨研究成果の発表状況(続き) (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

国内学会発表:

- 1) 吉沼俊男・清水 巧・小林俊彦・小笠原義剛・渡辺貴斗・鈴木 匡・日比忠明: 酵母two-hybrid法によるTMV RNA 複製酵素のポリメラーゼドメインと結合する宿主タンパク質の探索。日本植物病理学会関東部会, 2001.
- 2) 平田久笑・寺本充伯・宇垣正志・難波成任: アップルステムグルーピングウイルス(ASGV)の複製酵素と外被タンパク質はポリプロテインを介して発現されない? 日本植物病理学会関東部会, 2001.
- 3) 山次康幸・鍵和田 聡・中林仁美・宇垣正志・難波成任: *Potato virus X* の3' 非翻訳領域末端の poly(A) signal 様配列を含むステムループ構造は poly(A)修復に関与しない。日本植物病理学会関東部会, 2001.
- 4) 清水 巧・小笠原義剛・小林俊彦・吉沼俊男・渡辺貴斗・鈴木 匡・山次康幸・日比忠明: タバコアルギニンデカルボキシラーゼのTMV RNA 複製酵素 126K/183Kヘテロダイマ形成に対する阻害作用。日本植物病理学会大会, 2002.
- 5) 平田久笑・深川尊子・大島研郎・宇垣正志・難波成任: In vitro 翻訳系によるリンゴステムグルーピングウイルス(ASGV) ORF1 の発現様式の解析。日本植物病理学会関東部会, 2002.
- 6) 小松 健・高橋修一郎・鍵和田聡・宇垣正志・難波成任: 本邦産ジャガイモXウイルス3分離株のゲノムRNAの全塩基配列。日本植物病理学会大会, 2002.
- 7) 平田久笑・寺本充伯・細井三弘・宇垣正志・難波成任: リンゴステムグルーピングウイルスのORF1はフレームシフトによって発現している? 日本植物病理学会大会, 2002.
- 8) 細井三弘・寺本充伯・平田久笑・宇垣正志・難波成任: リンゴステムグルーピングウイルスの病原性に関与するORF1の可変領域。日本植物病理学会大会, 2002.
- 9) 鍵和田聡・山次康幸・中林仁美・細井三弘・小松 健・高橋修一郎・宇垣正志・難波成任: Potexvirus 属の種と系統のボーダーライン。日本植物病理学会大会, 2002.
- 10) 高橋修一郎・小松 健・鍵和田聡・澤柳利実・宇垣正志・難波成任: シロクロバモザイクウイルス CA株の全塩基配列とRC株の感染性全長cDNAクローンの構築。日本植物病理学会大会, 2002.
- 11) 白子幸男・宮西征揮: ムギ類萎縮ウイルス英国株RNA2は日本株および米国株RNA1と共にコムギに全身感染しモザイク症状を示す。日本植物病理学会関東部会, 2002.
- 12) 宮西征揮・白子幸男: *Furovirus* 属RNA1とRNA2の5'および3'非翻訳領域に存在する共通保存配列とウイルスRNA複製における役割。日本植物病理学会関東部会, 2002.
- 13) 大里修一・白子幸男: ムギ類萎縮ウイルス152Kタンパク質のUGA終止コドンのUAG及びUAA終止コドンへの改変とウイルス増殖に対する影響。日本植物病理学会大会, 2002.
- 14) 白子幸男: ムギ類萎縮ウイルスRNA1およびRNA2の5'末端および3'末端非翻訳領域に存在する保存塩基配列。日本植物病理学会大会, 2002.
- 15) 宮西征揮・白子幸男: ムギ類萎縮ウイルス感染性試験管内転写RNA1およびRNA2のオオムギ葉肉プロトプラストへの接種。日本植物病理学会大会, 2002.
- 16) 清水 巧・日比忠明: TMV 移行タンパク質とタバコDnaJ様タンパク質との相互作用。日本植物病理学会大会, 2003.
- 17) 小林俊彦・清水 巧・山次康幸・日比忠明: TMV RNA 3'末端非翻訳領域と翻訳伸長因子eEF-1Aとの相互作用。日本植物病理学会大会, 2003.
- 18) 竹本 浩・日比忠明: ダイズ退緑斑紋ウイルスのORF IIタンパク質の分子間相互作用と感染性。平成15年度日本植物病理学会関東部会, 2003.
- 19) 吉田明希子・小松 健・高橋修一郎・鍵和田聡・平田久笑・宇垣正志・難波成任: 本邦産スイセンモザイクウイルス(*Narcissus mosaic virus*)ゲノムRNAの塩基配列。日本植物病理学会関東部会, 2003.
- 20) 小松 健・高橋修一郎・細井三弘・鍵和田聡・宇垣正志・難波成任: ジャガイモXウイルスBH分離株のモザイク決定因子。日本植物病理学会大会, 2003.
- 21) 平田久笑・深川尊子・宇垣正志・難波成任: リンゴステムグルーピングウイルス(ASGV)の病原性に影響するORF1の発現様式。日本植物病理学会大会, 2003.
- 22) 鍵和田聡・小松 健・高橋修一郎・細井三弘・宇垣正志・難波成任: PVX-OS, -BSの病徴は複製酵素のC末端領域の1アミノ酸によって決定される。日本植物病理学会大会, 2003.

⑨研究成果の発表状況(続き) (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

- 23) 高橋修一郎・山下一夫・福井要子・小松 健・鍵和田聡・菅野善明・宇垣正志・難波成任：オオバコモザイクウイルス(新称) (*Plantago asiatica mosaic virus*, PLAMV) 7分離株の全塩基配列。日本植物病理学会大会, 2003.
- 24) 宮西征揮・白子幸男：ムギ類萎縮ウイルスのRNA2のサブゲノムRNA5'末端の決定。日本植物病理学会関東部会, 2003.
- 25) 大里修一・宮西征揮・白子幸男：ムギ類萎縮ウイルスRNAの複製適温は17°CでありRNA1により決定される。日本植物病理学会大会, 2003.
- 26) 宮西征揮・白子幸男：ムギ類萎縮ウイルスのp37, 外被タンパク質およびp19のウイルス移行における役割。日本植物病理学会大会, 2003.
- 27) 山宮 彩・宮西征揮・白子幸男：ムギ類萎縮ウイルスRNA2の欠失変異の特徴とp19高システイン含タンパク質の感染性における役割。日本植物病理学会大会, 2003.
- 28) 山次康幸・小林俊彦・黒田啓介・濱田孝二・桜井慶太郎・日比忠明：TMV RNA複製酵素と翻訳伸長因子eEF1Aの相互作用。日本植物病理学会大会, 2004.
- 29) 桜井慶太郎・小笠原義剛・小林俊彦・尾関丈二・清水 巧・山次康幸・日比忠明：TMV RNA複製酵素のヘリカーゼドメインと結合するプロテインキナーゼおよびプロテインホスファターゼの構造とそのウイルス増殖に関わる機能。日本植物病理学会大会, 2004.
- 30) 根津 修・吉田めぐみ・日比忠明・桑田 茂・鈴木 匡：ラッカセイわい化ウイルス(PSV) 2bタンパク質のタバコとササゲにおける機能。日本植物病理学会大会, 2004.
- 31) 根津 修・吉田めぐみ・日比忠明・桑田 茂・鈴木 匡：ラッカセイわい化ウイルス(PSV) 2bタンパク質欠失クローンからの復帰変異株の解析。日本植物病理学会大会, 2004.
- 32) 小松 健・高橋修一郎・森 拓馬・宇垣正志・難波成任：オオバコモザイクウイルス(PLAMV)の枯死決定因子について。日本植物病理学会大会, 2004.
- 33) 森 拓馬・宇垣正志・難波成任：アスパラガスウイルス3 (*Asparagus virus 3*)ゲノムRNAの塩基配列。日本植物病理学会大会, 2004.
- 34) 鍵和田聡・森 拓馬・宇垣正志・難波成任：ジャガイモXウイルス3分離株の病徴決定因子。日本植物病理学会大会, 2004.
- 35) 高橋修一郎・小松 健・森 拓馬・宇垣正志・難波成任：ヘアピンRNA配列の一過的発現によるジャガイモXウイルスの感染阻害。日本植物病理学会大会, 2004.
- 36) 白子幸男：25°Cで全身感染するムギ類萎縮ウイルス変異体の出現。日本植物病理学会関東部会, 2004.
- 37) 宮西征揮・白子幸男：ムギ類萎縮ウイルス感染植物細胞からのウイルス由来siRNAの検出。日本植物病理学会関東部会, 2004.
- 38) 白子幸男・宮西征揮：ムギ類萎縮ウイルスのRNA組替え接種実験に基づく分類学的提案。日本植物病理学会大会, 2004.
- 39) 桜井慶太郎・濱田孝二・芳井 篤・小林俊彦・山次康幸・難波成任・日比忠明：タバコモザイクウイルスのRNA複製に関わる翻訳伸長因子eEF1Aの機能。日本植物病理学会大会, 2005.
- 40) 濱田孝二・桜井慶太郎・芳井 篤・吉沼俊男・山次康幸・難波成任・日比忠明：*Tobacco mosaic virus*の増殖を阻害する宿主因子PHF15の解析。日本植物病理学会大会, 2005.
- 41) 清水 巧・芳井 篤・桜井慶太郎・濱田孝二・山次康幸・難波成任・日比忠明：タバコDnaJタンパク質によるTMV MPの蓄積と細胞間移行の促進。日本植物病理学会大会, 2005.
- 42) 芳井 篤・清水 巧・濱田孝二・桜井慶太郎・山次康幸・難波成任・日比忠明：タバコKNOTTED1様タンパク質によるTMV MPの蓄積と細胞間移行の促進。日本植物病理学会大会, 2005.
- 43) 根津 修・桑田 茂・日比忠明・平塚和之・鈴木 匡：ラッカセイわい化ウイルス(PSV) 2bタンパク質のN末端領域と移行能の関係。日本植物病理学会大会, 2005.
- 44) 根津 修・増田 税・桑田 茂・日比忠明・平塚和之・鈴木 匡：トマトアスパーマイウイルス(TAV) 2bタンパク質を挿入置換したラッカセイわい化ウイルス(PSV) 変異株の*Nicotiana benthamiana*における病原性。日本植物病理学会大会, 2005.
- 45) 鍵和田聡・小松 健・尾関丈二・平田久笑・宇垣正志・山次康幸・難波成任：病徴の異なるジャガイモXウイルス-OSおよび-B5のタバコにおけるウイルス蓄積量。日本植物病理学会関東部会, 2005.

⑨研究成果の発表状況（続き）（この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（掲載が確定しているものを含む。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。）

- 46) 小松 健・高橋修一郎・鍵和田聡・森拓馬・平田久笑・山次康幸・難波成任：ポテックスウイルスの *Nicotiana benthamiana* におけるウイルス蓄積量と枯死反応。日本植物病理学会関東部会, 2005.
- 47) 平田久笑・深川尊子・鍵和田聡・吉田明希子・尾関丈二・山次康幸・宇垣正志・難波成任：リンゴステムグルーピングウイルスのサブゲノム RNA 転写開始点の解析。日本植物病理学会大会, 2005.
- 48) 尾関丈二・小松 健・高橋修一郎・吉田明希子・平田久笑・山次康幸・難波成任：オオバコモザイクウイルスの外被タンパク質の翻訳開始点と病原性との関係。日本植物病理学会大会, 2005.
- 49) 黒田啓介・小松 健・高橋修一郎・森 拓馬・尾関丈二・吉田明希子・平田久笑・山次康幸・難波成任：ポインセチアモザイクウイルス(*Poinsettia mosaic virus*)の分類について。日本植物病理学会大会, 2005.
- 50) 小松 健・高橋修一郎・尾関丈二・吉田明希子・山次康幸・宇垣正志・難波成任：オオバコモザイクウイルスの *Nicotiana benthamiana* における枯死決定因子について。日本植物病理学会大会, 2005.
- 51) 吉田明希子・小松 健・高橋修一郎・尾関丈二・平田久笑・山次康幸・難波成任：ジャガイモ X ウイルスをもとに構築した GFP 発現ベクターにおける RNA silencing の関与。日本植物病理学会大会, 2005.
- 52) 高橋修一郎・小松 健・吉田明希子・尾関丈二・山次康幸・宇垣正志・難波成任：TGBp1 および CP 遺伝子のヘアピン配列によるジャガイモ X ウイルス感染阻害の比較。日本植物病理学会大会, 2005.
- 53) You, Y.・Sharma-Poudyal, D.・白子幸男：25°Cで全身感染し続けるムギ類萎縮ウイルス変異株のプロトプラスト内複製と細胞間移行。日本ウイルス学会総会, 2005.
- 54) 白子幸男・田村 克：ムギ類萎縮ウイルス米国株 RNA1 に対する感染性 cDNA クロンの構築：プラスミドと大腸菌株の検討。日本植物病理学会関東部会, 2005.
- 55) Sharma-Poudyal, D.・Yuan, Y.・白子幸男：ムギ類萎縮ウイルスの p37 移行タンパク質変異株の細胞間移行とプロトプラスト内複製について。日本植物病理学会関東部会, 2005.
- 56) 宮西征揮・白子幸男：ムギ類萎縮ウイルスの全身感染性における異種ウイルス RNA サイレncing サプレッサーの役割。日本植物病理学会大会, 2005.
- 57) 山次康幸・吉田明希子・芳井 篤・清水 巧・日比忠明・難波成任：TMVの細胞間移行を促進するタバコ KNOTTED1 様タンパク質による他種ウイルス蓄積への影響。日本植物病理学会大会, 2006.
- 58) 根津 修・平塚和之・桑田 茂・日比忠明・宇垣正志・鈴木 匡：ラッカセイわい化ウイルス(PSV) の RNA silencing サプレッサー能解析。日本植物病理学会大会, 2006.