

# 1. タバコモザイクウイルスの複製タンパク質による複製鋳型認識機構

石橋 和 大, 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 植物・微生物間相互作用研究ユニット

プラス鎖 RNA ウイルスの複製タンパク質は、複製の鋳型を特異的に認識して細胞内の特定の膜上にリクルートし、複製複合体を形成する。筆者らは最近、試験管内ウイルス RNA 翻訳・複製系を用いて、翻訳中のタバコモザイクウイルス (TMV) 複製タンパク質新生ポリペプチドが、ゲノム RNA の 5' 非翻訳領域 (UTR) に結合し、TMV RNA を複製に導くことを見いだした。複製タンパク質は、一旦完成すると、ゲノム RNA にトランスに結合することはできなかった。TMV の複製タンパク質は、自身の翻訳鋳型となった RNA 分子を優先的に複製鋳型として選択する (シスに働く) ことが以前から知られていたが、この結果は、複製鋳型がどのようにしてシスに選択されるのかを合理的に説明するものである。また、5' UTR に複製タンパク質が結合すると TMV RNA の被翻訳効率が低下した。TMV 複製タンパク質は 5' UTR に結合することにより複製鋳型を選択すると同時に新たな翻訳を抑制し、TMV RNA 上を 5' 末端から移動するリボソームと、3' 末端から移動する RNA ポリメラーゼの衝突を事前に防止していると考えられる。

## 1. はじめに

真核生物を宿主とするプラス鎖 RNA ウイルスが宿主細胞に侵入すると、まずゲノム RNA が翻訳を受け、複製にかかわるタンパク質 (本稿では「複製タンパク質」と総称する) を含む一群のタンパク質が合成される。複製タンパク質は、ゲノム RNA を生体膜上にリクルートして複製複合体を形成し、その中でゲノム RNA を鋳型とする相補鎖 (マイナス鎖) RNA の合成を経て、プラス鎖 RNA を複製する。複製複合体は膜構造により細胞質から隔離されており、マイナス鎖 RNA はこの中に保持される。一方、合成されたプラス鎖 RNA は細胞質に放出される。複製タンパク質による複製鋳型の選択は非常に厳密である。その厳密さは、複製タンパク質によるゲノム RNA 分子上の特定の

領域 (いわゆるシスエレメント) の特異的な認識によると考えられている。最近我々は、プラス鎖 RNA ウイルスのメンバーである TMV (*Virgaviridae*, *Tobamovirus*) の鋳型認識の分子機構に関する新たな知見を得たので紹介したい。

## 2. TMV について

TMV のゲノム RNA は、5' 末端にキャップ構造を、3' 末端近傍に tRNA 様構造をもつ約 6.4 kb の 1 本鎖 RNA である<sup>1)</sup>。TMV ゲノムには、少なくとも 4 個のタンパク質がコードされている。そのうち 126-kDa タンパク質と、その終止コドンが約 1 割の確率でチロシンとして読み過ぎされて合成される 183-kDa タンパク質は、ゲノム RNA から直接翻訳される。これらのタンパク質は RNA の複製を司る (他の 2 個のタンパク質: 細胞間移行タンパク質と外被タンパク質は複製には不要である)<sup>2)</sup>。126-kDa タンパク質は、N 末端側に RNA のキャッピングを司るメチルトランスフェラーゼ様ドメイン (MT) を、C 末端側にヘリカーゼ様ドメイン (Hel) をもつ。両ドメイン間には中間領域 (IR) と呼ばれている (図 1A)。また、183-kDa タンパク質の読み過ぎし部分にはポリメラーゼ様ドメイン (Pol) が存在する。MT, Hel, Pol ドメインは、動物あるいは植物を宿主とするプラス鎖 RNA ウイルスの一群であるアルファ様ウ

### 連絡先

〒 305-8602

茨城県つくば市観音台 2-1-2

独立行政法人農業生物資源研究所

植物科学研究領域 植物・微生物間相互作用研究ユニット

TEL, FAX: 029-838-7009

E-mail: ishika32@affrc.go.jp

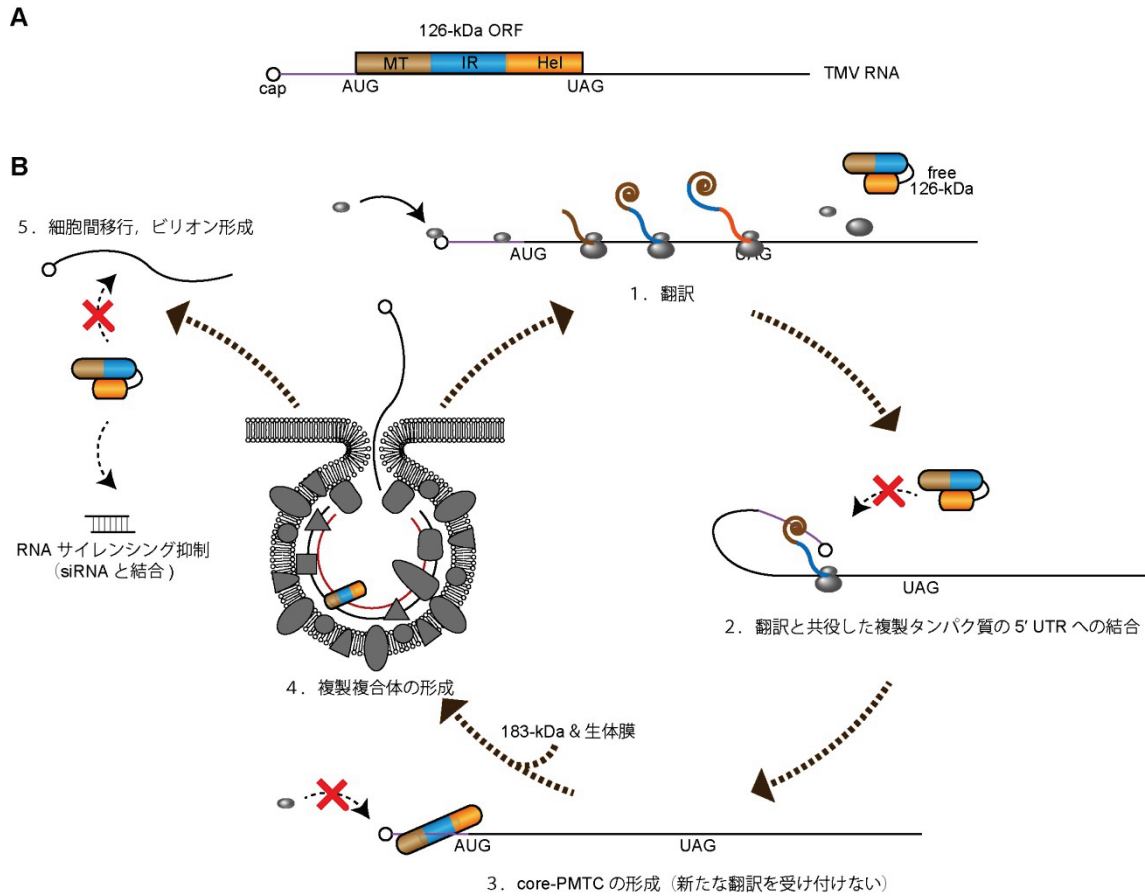


図1. TMV ゲノム RNA の構造 (A) と複製サイクルモデル (B).

イルススーパーグループのメンバーの複製タンパク質に共通してみられ<sup>3)</sup>, これらのウイルスは似た機構で複製すると考えられている。ゲノム RNA の 5' 非翻訳領域 (UTR) は約 70 ヌクレオチドで, 翻訳のエンハンサーとして働くと考えられている<sup>4,5)</sup>。

TMV の 126-kDa, 183-kDa 複製タンパク質には膜貫通領域は予測されず, TMV 感染細胞破砕液を分画すると, これら複製タンパク質は膜画分と可溶性画分の両方に検出される<sup>6)</sup>。しかし, ウイルス関連 RNA 合成活性は膜画分からのみ検出される等の諸生化学的性質から, TMV も他の真核プラス鎖 RNA ウイルスと同様, 膜上に形成された複製複合体の中で RNA 複製を行っていると考えられる<sup>6-9)</sup>。これまでの研究で, 複製タンパク質と相互作用する宿主の膜タンパク質 TOM1 および ARL8 が, TMV の効率のよい複製に必須であることがわかっており, 複製タンパク質が RNA 合成能を獲得するためにはこれらのタンパク質と結合することが重要なであろうと推測されている<sup>10,11)</sup>。一方, いくつかの実験により, 可溶性の複製タンパク質は, 二本鎖小分子 RNA に結合する活性をもち, RNA サイレncing サプレッサーとして機能することが示されている<sup>12-17)</sup>。

### 3. 試験管内ウイルス RNA 翻訳・複製系

一般に, 細胞へのプラス鎖 RNA ウイルス感染実験系では, 侵入したゲノム RNA の翻訳, マイナス鎖合成, プラス鎖合成のサイクルが複数回行われてはじめてウイルスの増殖が検出可能となる。従って, 複製サイクルのどこかに致命的な不具合があれば, 「増殖が検知できない」という結果が得られるのみである。例えば, TMV の 5' UTR に数塩基の欠失をもつ人工変異株 RNA は, 試験管内翻訳の鋳型にはなるもののプロトプラストへの感染性はもたないことがわかっていたが, この変異がマイナス鎖合成に影響を与えているのか, プラス鎖合成に影響を与えているのかは不明であった<sup>18)</sup>。

この問題を解決できるのが, 試験管内ウイルス複製系である。1991年, Molla らは, HeLa 細胞の抽出液中でポリオウイルス RNA を翻訳すると, ウイルス RNA の翻訳のみならず RNA 複製とウイルス粒子形成までもが起きることを示した<sup>19)</sup>。この系では, 添加したウイルス RNA を鋳型にした翻訳とマイナス鎖合成が, 複数回の複製サイクルを経ることなく, 直接検出できるので, 変異ウイルスの複

製サイクルのどこに異常があるのかを知ることができる。その後、この実験系の威力は遺憾なく発揮され、ポリオウイウイルスの複製機構の理解の著しい深化がもたらされた。

一方、植物細胞は一般に、細胞内容積のほとんどを占める巨大な液胞をもつ。液胞の内部は酸性に保たれ、そこには RNA あるいはタンパク質を分解する酵素が多量に含まれる。このため、多くの場合、植物細胞をそのまま破碎して得た細胞抽出液を用いても、ウイルス RNA の翻訳や複製を起こさせることはできない。そこで筆者らは、液胞内部と細胞質の比重の違いを利用して、植物プロトプラストを密度勾配遠心により液胞を含む小胞と細胞質と核を含む小胞に「引きちぎって」分離する、園部らが開発した脱液胞化技術<sup>20)</sup>を用いて、植物細胞を破碎する前に液胞を除去しようと考えた。脱液胞化植物プロトプラストを破碎して得た、膜を含む細胞質抽出液 (BYL) 中で TMV RNA を翻訳し、さらに RNA 合成基質を添加すると、感染細胞内で観察されるのと同様のパターンで TMV 関連 RNA の合成が起きた<sup>21)</sup>。この系では brome mosaic virus (*Bromoviridae*, *Bromovirus*), turnip crinkle virus (*Tombusviridae*, *Carmovirus*), red clover necrotic mosaic virus (*Tombusviridae*, *Dianthovirus*), tomato bushy stunt virus (*Tombusviridae*, *Tombusvirus*) の RNA を複製させることもできる<sup>21-23)</sup>。

#### 4. TMV 複製タンパク質による鋳型認識に必要な RNA シスエレメントの同定

筆者らは、この実験系を利用して、どのような過程を経て TMV の複製複合体が生体膜上に形成されるのかを解析した。まず、TMV RNA の複製への膜の関与を調べるために、遠心により膜を除去した BYL (membrane-depleted BYL: mdBYL) を用いた。mdBYL 中で TMV RNA は効率よく翻訳されたが、予想通り複製は観察されなかった<sup>24)</sup>。一方、翻訳後に翻訳阻害剤を添加し、さらに除去してあった BYL 由来の膜を加え戻したところ、RNA 複製が起きた<sup>24)</sup>。TMV RNA を翻訳した mdBYL を分析したところ、TMV RNA と複製タンパク質を含む複合体が形成されていること、この複合体自体には RNA 合成活性がないが、BYL 由来の膜と混合すると RNA 複製が起きることが判明した<sup>24)</sup>。TMV RNA を翻訳した mdBYL には TMV RNA と結合していない (フリーの) 複製タンパク質も含まれていた。そこで、複合体の再構築を目的として、フリーの複製タンパク質と TMV RNA を混合し、BYL 由来の膜を添加したが、RNA 複製は観察されなかった。このことから、複製タンパク質は、翻訳と共役して TMV RNA に結合し、複製複合体の前駆複合体を形成すると考えられた。筆者らは、この複合体を pre-membrane-targeting complex (PMTC) と命名した。同様の複合体は、183-kDa タンパク質を欠損した TMV RNA 誘導体 (TMV-126: 126-kDa タンパク質はコードする) を mdBYL で翻訳したときにも形成され (core

PMTC)、これをフリーの 183-kDa タンパク質と翻訳阻害条件下で混合し、さらに BYL 由来の膜と混合すると RNA 複製が観察された<sup>24)</sup>。

PMTC が形成される時、複製タンパク質が TMV RNA の特定の領域に結合しているならば、その領域はヌクレアーゼに対して耐性を示すかもしれない。そのような考えに基づき、筆者らは PMTC をマイクロコッカールヌクレアーゼで処理し、分解を受けなかった RNA 断片を解析した。これと他の実験結果とを合わせて、TMV RNA の 5' UTR を含む約 70 ヌクレオチドの領域に複製タンパク質が結合し、この領域をヌクレアーゼによる消化から保護していることが判明した<sup>25)</sup>。TMV RNA 5' UTR への結合は、126-kDa タンパク質だけでも (183-kDa タンパク質がなくても) 起きた。さらにこの結合は、Hel を欠く MT-IR 領域断片でもみられたが、MT のみにすると失われた。TMV RNA の 5' UTR の配列を他のウイルスの 5' UTR と置き換えると、RNA の被翻訳能は保持されたが、複製タンパク質の RNA への結合 (PMTC 形成) とマイナス鎖 RNA の合成は、いずれも起こらなかった<sup>25)</sup>。これらの結果から、TMV RNA が翻訳されると、合成された複製タンパク質が翻訳と共役して 5' UTR に結合し、形成された PMTC が膜に結合して複製複合体を形成すると推測された (図 1B)。

#### 5. 鋳型認識のシス嗜好性の分子基盤: 翻訳途上の複製タンパク質による鋳型認識

TMV-126 は、細胞感染実験においても、183-kDa タンパク質を発現して自己複製能をもつヘルパーウイルスと共感染すると複製できる<sup>26)</sup>。しかし、126-kDa タンパク質のコード領域内にナンセンスあるいはフレームシフト変異を導入した TMV-126 誘導体は、ヘルパーウイルスと共感染させても複製しない<sup>26)</sup>。この観察等に基づいて、126-kDa タンパク質はシスに複製鋳型を選択する (自身の翻訳鋳型を複製鋳型として認識する) とされてきた。ヘルパーウイルスから供給されたタンパク質が、複製タンパク質を欠損するウイルスの複製をサポートできない現象は、多くのプラス鎖 RNA ウィルスで観察されている<sup>27-35)</sup>。ポリオウイウイルスの defective interfering RNA が構造タンパク質のコード領域を欠失しているものの、非構造タンパク質のコード領域は翻訳可能な形で維持していること背景にもこの性質があると考えられる<sup>36,37)</sup>。TMV で観察された、翻訳と共役した複製鋳型への結合 (PMTC 形成) は、複製タンパク質による複製鋳型選択のシス嗜好性をうまく説明するものである。しかし、潜在的に RNA 結合能を有するはずである複製タンパク質が、なぜ翻訳終了後トランスに鋳型を認識し得ないのだろうか?

Hel を欠く MT-IR 領域が TMV RNA の 5' UTR に結合する能力があることを踏まえ、筆者らは一つの可能性として、TMV 複製タンパク質の C 末端側に存在する Hel 領域が 5'

UTR 結合の自己阻害ドメインとして働き、翻訳途上のポリペプチド (Hel がまだできていない MT-IR 部分) には 5' UTR 結合能があるが、翻訳終了後には (Hel ができてしまうと) 結合能が失われるのではないかと考えた (図 1B)。そこで、一旦フリーの MT-IR 領域断片を調製し、TMV RNA と混合したところ、全長 126-kDa タンパク質にはない、トランスに 5' UTR に結合する活性が検出された<sup>25)</sup>。この結果は、上記モデルを支持する。

感染後期になると、ゲノム RNA には隣接細胞への移行や、外被タンパク質による粒子化など、複製以外の経路での役割が求められてくる。一方、この時期の細胞内には複製タンパク質が高濃度で蓄積してくることが想定される。したがって、複製タンパク質がむやみにウイルス RNA に結合することは、ウイルスにとって好ましいことではない。カブ黄化モザイクウイルス (*Tymoviridae*, *Tymovirus*) の複製タンパク質はユビキチン-プロテアソーム系による分解を受けることによって<sup>38)</sup>、tobacco etch virus (*Potyvirus*, *Potyvirus*) の複製タンパク質は核に移行して封入体を形成することによって<sup>39)</sup> この問題を回避していると考えられる。一方 TMV の 126-kDa タンパク質は複製だけでなく、RNA サイレンシングの抑制も司る多機能タンパク質である。したがって、新規マイナス鎖合成が必要なくなった感染後期においても、RNA サイレンシングを抑制するために 126-kDa タンパク質を蓄積する必要がある。自己阻害により複製鑄型認識能をもたない形でタンパク質を蓄積させるシステムは、この点においても優れていると考えられる。

## 6. ゲノム RNA 上でのリボソームと RNA ポリメラーゼの衝突の回避：PMTC 形成に伴う翻訳抑制

プラス鎖 RNA ウイルスのゲノムは翻訳の鑄型であり、複製の鑄型でもある。翻訳時にリボソームは RNA 上を 5' 末端から 3' 末端の方向に進むのに対して、マイナス鎖合成時に RNA ポリメラーゼは鑄型上を 3' 末端から 5' 末端の方向に進む。このため、これらの反応が同時に起こると、両反応とも破綻してしまう。したがって、マイナス鎖合成開始に先だってリボソームはゲノム RNA 上から排除されている必要がある。このことは、ポリオウイルスを用いたエレガントな実験により実際に示された。試験管内複製系においてポリオウイルスのマイナス鎖 RNA の合成は、リボソームを mRNA から解離させる翻訳阻害剤ピューロマイシンの添加によって促進されたが、翻訳中のリボソームを mRNA 上で停止させるシクロヘキシミド等の添加によって阻害されたのである<sup>40)</sup>。5' 末端に VPg をもつポリオウイルス RNA の翻訳は、5' UTR に存在する internal ribosome entry site (IRES) に依存する<sup>41)</sup>。一方、5' UTR にはウイルス 3CD 複製タンパク質が複製鑄型を認識する際に結合する配列もあり、3CD が 5' UTR に結合すると、ポリオウイルス RNA の翻訳が阻害されるとともに、複製

(マイナス鎖合成) への舵が切られることが示された<sup>42)</sup>。5' 末端にキャップ構造をもたない barley yellow dwarf virus および turnip crinkle virus の場合には、複製タンパク質がマイナス鎖を合成しながらゲノム RNA 上を移動するときに、翻訳に必要な RNA 二次構造 (cap-independent translation element) を壊すことにより新たな翻訳を阻害しているのではないかと考えられている<sup>43,44)</sup>。

TMV は 7-メチルグアノシンの 5' キャップ構造をもつ点で上述のウイルスと翻訳開始の仕組みを異にするが、マイナス鎖 RNA の合成に先立って 5' UTR に複製タンパク質が結合することが翻訳開始の障害となりうることが予想された。そこで、<sup>35</sup>S-メチオニンを用いた標識実験によって被翻訳活性を調べたところ、精製した PMTC の被翻訳効率は著しく低かったのに対し、PMTC をフェノール処理することにより複製タンパク質を除いた RNA は高い被翻訳効率を示すことがわかった<sup>25)</sup>。さらに、TMV の 5' UTR 配列を融合したレポーター mRNA の翻訳がトランスに作用させた MT-IR 断片により阻害されたことなどから、PMTC 形成には翻訳から複製への切り替えスイッチとしての役割もあることが示唆された<sup>25)</sup>。

## 7. おわりに

TMV は、最初にウイルスとして認識され、結晶化、RNA が感染性をもつことの証明、ゲノム RNA と外被タンパク質からのウイルス粒子の再構築がいずれも最初に行われたウイルスである<sup>45)</sup>。Watson が TMV の結晶構造解析を通してらせん構造に接していたことが DNA 二重らせんの発見につながったことなど、歴史的なエピソードにも事欠かず、ウイルス学・分子生物学の発展に重要な役割を果たしてきた。ゲノム塩基配列の決定やリバースジェネティクス系の確立も比較的早期に達成され<sup>1,46,47)</sup>、また、6.4 kb のゲノムにたった 4 個のタンパク質しかコードしていないという単純さをもち、増殖効率が非常に高いことなどから集中的な解析が行われてきた。しかし、ウイルスの複製鑄型選択にかかわるシスエレメントはこれまで完全に見逃されてきた。これは、(i) 細胞内では PMTC は膜に結合して複製複合体へと移行してしまうため、ほとんど蓄積しないであろうこと、(ii) 5' UTR を欠失すると複製が起きなくなることがわかって、細胞への感染系で解析する限り、複製サイクルのどこで破綻したのかを知ることはできないこと、(iii) 完成した複製タンパク質はもはや 5' UTR への結合能を喪失しており、トランスに RNA を複製することができないことなどによると考えられる。

本稿では、TMV の鑄型認識機構について我々の最近の成果を中心に紹介した。他の真核プラス鎖 RNA ウイルスを見渡すと、複製タンパク質が直接ゲノム RNA 上の複製のシスエレメントに結合することが知られているものもあるが<sup>48-51)</sup>、鑄型 RNA のリクルートメントに必要なシスエ

メントは同定されていてもそこに結合する因子が同定されていないものや、未だそのようなシスエレメントが見つかっていないものもある。後二者のようなウイルスは、TMVと類似の機構で鋳型選択を行っている可能性があり、それらの複製鋳型選択機構を明らかにするためには試験管内系を用いた解析が有効かもしれない。

また、マイナス鎖合成のためのシスエレメントが5' UTRに存在し、これに複製タンパク質が結合することにより翻訳を阻害するシステムは、TMVとは遠縁のポリオウイルスにも共通してみられ、それがいかに合理的であるかを暗示しているように見える。さらに、鋳型をシスに選択するシステムは、多くのウイルスに備わっていることから、ウイルスの生存に有利であると推測できる。今回明らかになった翻訳途上の複製タンパク質による鋳型認識機構が、他のプラス鎖RNAウイルスにどれだけ広く当てはまるのか今後の研究が待たれる。

## 文 献

- Goelet P, Lomonosoff GP, Butler PJG, Akam ME, Gait MJ, Karn J. Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 5818-5822, 1982.
- Ishikawa M, Okada Y. Replication of tobamovirus RNA. *P Jpn Acad B-Phys* 80: 215-224, 2004.
- Koonin EV, Dolja VV, Morris TJ. Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Crit Rev Biochem Mol* 28: 375-430, 1993.
- Gallie DR, Sleat DE, Watts JW, Turner PC, Wilson TMA. The 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA enhances the expression of foreign gene transcripts in vitro and in vivo. *Nucleic Acids Res* 15: 3257-3273, 1987.
- Sleat DE, Gallic DR, Jefferson RA, Bevan MW, Turner PC, Wilson TMA. Characterisation of the 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA as a general enhancer of translation in vitro. *Gene* 60: 217-225, 1987.
- Hagiwara Y, Komoda K, Yamanaka T, Tamai A, Meshi T, Funada R, Tsuchiya T, Naito S, Ishikawa M. Subcellular localization of host and viral proteins associated with tobamovirus RNA replication. *EMBO J* 22: 344-353, 2003.
- Osman TA, Buck KW. Complete replication in vitro of tobacco mosaic virus RNA by a template-dependent, membrane-bound RNA polymerase. *J Virol* 70: 6227-6234, 1996.
- Watanabe T, Honda A, Iwata A, Ueda S, Hibi T, Ishihama A. Isolation from tobacco mosaic virus-infected tobacco of a solubilized template-specific RNA-dependent RNA polymerase containing a 126K/183K protein heterodimer. *J Virol* 73: 2633-2640, 1999.
- Nishikiori M, Dohi K, Mori M, Meshi T, Naito S, Ishikawa M. 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: 8459-8468, 2006.
- Yamanaka T, Ohta T, Takahashi M, Meshi T, Schmidt R, Dean C, Naito S, Ishikawa M. *TOM1*, an *Arabidopsis* gene required for efficient multiplication of a tobamovirus, encodes a putative transmembrane protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 10107-10112, 2000.
- Nishikiori M, Mori M, Dohi K, Okamura H, Katoh E, Naito S, Meshi T, Ishikawa M. A host small GTP-binding protein ARL8 plays crucial roles in tobamovirus RNA replication. *PLoS Pathog* 7: e1002409, 2011.
- Kubota K, Tsuda S, Tamai A, Meshi T. Tomato mosaic virus replication protein suppresses virus-targeted posttranscriptional gene silencing. *J Virol* 77: 11016-11026, 2003.
- Ding XS, Liu J, Cheng NH, Folimonov A, Hou YM, Bao Y, Katagi C, Carter SA, Nelson RS. The *Tobacco mosaic virus* 126-kDa protein associated with virus replication and movement suppresses RNA silencing. *Mol Plant-Microbe Interact* 17: 583-592, 2004.
- Mérai Z, Kerényi Z, Kertész S, Magna M, Lakatos L, Silhavy D. Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *J Virol* 80: 5747-5756, 2006.
- Kurihara Y, Inaba N, Kutsuna N, Takeda A, Tagami Y, Watanabe Y. Binding of tobamovirus replication protein with small RNA duplexes. *J Gen Virol* 88: 2347-2352, 2007.
- Csorba T, Bovi A, Dalmay T, Burgyán J. 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, 2007.
- Hagiwara-Komoda Y, Hirai K, Mochizuki A, Nishiguchi M, Meshi T, Ishikawa M. Overexpression of a host factor TOM1 inhibits tomato mosaic virus propagation and suppression of RNA silencing. *Virology* 376: 132-139, 2008.
- Takamatsu N, Watanabe Y, Iwasaki T, Shiba T, Meshi T, Okada Y. Deletion analysis of the 5' untranslated leader sequence of tobacco mosaic virus RNA. *J Virol* 65: 1619-1622, 1991.
- Molla A, Paul AV, Wimmer E. Cell-free, de novo synthesis of poliovirus. *Science* 254: 1647-1651, 1991.
- Chang-Jie J, Sonobe S, Shibaoka H. Assembly of microtubules in a cytoplasmic extract of tobacco BY-2 miniprotoplasts in the absence of microtubule-stabilizing agents. *Plant Cell Physiol* 33: 497-501, 1992.
- Komoda K, Naito S, Ishikawa M. Replication of plant RNA virus genomes in a cell-free extract of evacuated plant protoplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 1863-1867, 2004.
- Iwakawa H-o, Kaido M, Mise K, Okuno T. *cis*-Acting core RNA elements required for negative-strand RNA synthesis and cap-independent translation are separated in the 3'-untranslated region of *Red clover necrotic mosaic virus* RNA1. *Virology* 369: 168-181, 2007.
- Gursinsky T, Schulz B, Behrens S-E. Replication of

- Tomato bushy stunt virus* RNA in a plant in vitro system. *Virology* 390: 250-260, 2009.
- 24) Komoda K, Mawatari N, Hagiwara-Komoda Y, Naito S, Ishikawa M. Identification of a ribonucleoprotein intermediate of tomato mosaic virus RNA replication complex formation. *J Virol* 81: 2584-2591, 2007.
  - 25) Kawamura-Nagaya K, Ishibashi K, Huang Y-P, Miyashita S, Ishikawa M. Replication protein of tobacco mosaic virus cotranslationally binds the 5' untranslated region of genomic RNA to enable viral replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: E1620-E1628, 2014.
  - 26) Lewandowski DJ, Dawson WO. Functions of the 126- and 183-kDa proteins of tobacco mosaic virus. *Virology* 271: 90-98, 2000.
  - 27) Weiland JJ, Dreher TW. Cis-preferential replication of the turnip yellow mosaic virus RNA genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 6095-6099, 1993.
  - 28) van Bokhoven H, Le Gall O, Kasteel D, Verver J, Wellink J, van Kammen AB. *cis*- and *trans*-acting elements in cowpea mosaic virus RNA replication. *Virology* 195: 377-386, 1993.
  - 29) Novak JE, Kirkegaard K. Coupling between genome translation and replication in an RNA virus. *Genes Dev* 8: 1726-1737, 1994.
  - 30) van Rossum CM, Garcia ML, Bol JF. Accumulation of alfalfa mosaic virus RNAs 1 and 2 requires the encoded proteins in cis. *J Virol* 70: 5100-5105, 1996.
  - 31) Liang Y, Gillam S. Rubella virus RNA replication is *cis*-preferential and synthesis of negative- and positive-strand RNAs is regulated by the processing of nonstructural protein. *Virology* 282: 307-319, 2001.
  - 32) Okamoto K, Nagano H, Iwakawa H, Mizumoto H, Takeda A, Kaido M, Mise K, Okuno T. *cis*-Preferential requirement of a -1 frameshift product p88 for the replication of Red clover necrotic mosaic virus RNA1. *Virology* 375: 205-212, 2008.
  - 33) Yi G, Kao C. *cis*- and *trans*-acting functions of brome mosaic virus protein 1a in genomic RNA1 replication. *J Virol* 82: 3045-3053, 2008.
  - 34) Wang J, Yeh H-H, Falk BW. *cis* preferential replication of *Lettuce infectious yellows virus* (LIYV) RNA 1: The initial step in the asynchronous replication of the LIYV genomic RNAs. *Virology* 386: 217-223, 2009.
  - 35) Choi SK, Yoon J-Y, Canto T, Palukaitis P. Replication of cucumber mosaic virus RNA 1 in *cis* requires functional helicase-like motifs of the 1a protein. *Virus Res* 158: 271-276, 2011.
  - 36) Kuge S, Saito I, Nomoto A. Primary structure of poliovirus defective-interfering particle genomes and possible generation mechanisms of the particles. *J Mol Biol* 192: 473-487, 1986.
  - 37) Hagino-Yamagishi K, Nomoto A. In vitro construction of poliovirus defective interfering particles. *J Virol* 63: 5386-5392, 1989.
  - 38) Camborde L, Planchais S, Tournier V, Jakubiec A, Druegeon G, Lacassagne E, Pfeiffer S, Chenon M, Jupin I. The ubiquitin-proteasome system regulates the accumulation of *Turnip yellow mosaic virus* RNA-dependent RNA polymerase during viral infection. *Plant Cell* 22: 3142-3152, 2010.
  - 39) Li XH, Carrington JC. Complementation of tobacco etch potyvirus mutants by active RNA polymerase expressed in transgenic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 457-461, 1995.
  - 40) Barton DJ, Morasco BJ, Flanagan JB. Translating ribosomes inhibit poliovirus negative-strand RNA synthesis. *J Virol* 73: 10104-10112, 1999.
  - 41) Pelletier J, Sonenberg N. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334: 320-325, 1988.
  - 42) Gamarnik AV, Andino R. Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Dev* 12: 2293-2304, 1998.
  - 43) Barry JK, Miller WA. A -1 ribosomal frameshift element that requires base pairing across four kilobases suggests a mechanism of regulating ribosome and replicase traffic on a viral RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 11133-11138, 2002.
  - 44) Yuan X, Shi K, Meskauskas A, Simon AE. The 3' end of Turnip crinkle virus contains a highly interactive structure including a translational enhancer that is disrupted by binding to the RNA-dependent RNA polymerase. *RNA* 15: 1849-1864, 2009.
  - 45) 岡田吉美. タバコモザイクウイルス研究の100年: 東京大学出版会, 2004.
  - 46) Meshi T, Ishikawa M, Motoyoshi F, Semba K, Okada Y. *In vitro* transcription of infectious RNAs from full-length cDNAs of tobacco mosaic virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 5043-5047, 1986.
  - 47) Dawson WO, Beck DL, Knorr DA, Grantham GL. cDNA cloning of the complete genome of tobacco mosaic virus and production of infectious transcripts. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 1832-1836, 1986.
  - 48) Liu Y, Wimmer E, Paul AV. *Cis*-acting RNA elements in human and animal plus-strand RNA viruses. *BBA-Gene Regul Mech* 1789: 495-517, 2009.
  - 49) Xiang W, Harris KS, Alexander L, Wimmer E. Interaction between the 5'-terminal cloverleaf and 3AB/3CDpro of poliovirus is essential for RNA replication. *J Virol* 69: 3658-3667, 1995.
  - 50) Pogany J, White KA, Nagy PD. Specific binding of tombusvirus replication protein p33 to an internal replication element in the viral RNA is essential for replication. *J Virol* 79: 4859-4869, 2005.
  - 51) Filomatori CV, Lodeiro MF, Alvarez DE, Samsa MM, Pietrasanta L, Gamarnik AV. A 5' RNA element promotes dengue virus RNA synthesis on a circular genome. *Genes Dev* 20: 2238-2249, 2006.

# Template selection by replication protein of tobacco mosaic virus

**Kazuhiro ISHIBASHI and Masayuki ISHIKAWA**

Plant-Microbe Interactions Research Unit, Division of Plant Sciences, National Institute of Agrobiological Sciences,  
2-1-2 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan

Replication proteins of eukaryotic positive-strand RNA viruses specifically recognize the genomic RNA as replication template, recruit them to the surfaces of intracellular membranes, and form replication complexes. We recently revealed that tobacco mosaic virus (TMV) replication protein cotranslationally binds 5' untranslated region (UTR) of the genomic RNA, and that a full-length replication protein cannot posttranslationally bind TMV RNA *in trans*. This result provides a mechanistic explanation for the previously reported property of TMV replication protein that it selects replication template preferentially *in cis*. We also found that the binding of the replication protein to the 5' UTR prevents further translation of the genomic RNA. Fatal collision between translating ribosomes and negative-strand RNA-synthesizing polymerases on the genomic RNA is thus avoided.

