

2. トバモウイルス RNA 複製機構の解析

石川 雅之

独立行政法人農業生物資源研究所, 植物・微生物間相互作用研究ユニット; CREST, JST

真核生物を宿主とするプラス鎖 RNA ウイルスゲノムの複製は膜に結合した複製複合体の中で起こる。複製複合体の形成過程と構造に関する情報は未だ乏しく、関与する宿主因子さえ十分に明らかになっていない。そのような状況のもと、我々はトバモウイルスをモデルとして、真核生物プラス鎖 RNA ウイルスのゲノム複製機構を理解することを目指している。本稿では、現在我々が進めている研究の方向性と、そのアプローチのために確立した実験系を紹介する。

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、脱外被を経てゲノム RNA が翻訳され、複製を司るタンパク質（本稿ではこれを「複製タンパク質」と呼ぶことにする）が合成される。複製タンパク質は、オルガネラ膜の細胞質側表面にゲノム(プラス鎖)RNA をリクルートして複製複合体を形成する。この際利用される膜の種類はウイルスにより様々である。また、多くのウイルスで、複製複合体形成に伴い、膜内腔への陥入構造や多重膜構造等が形成される例が報告されている（例えば文献 19, 20）。複製複合体の中では、ゲノムに相補的なマイナス鎖 RNA が合成される。次いで、複製複合体はもっぱら子孫プラス鎖 RNA を合成して細胞質中に放出する^{1, 19)} (図 1A)。ここで、マイナス鎖 RNA は細胞質とは隔離された複製複合体の中に格納され、外に出ることはない。二本鎖 RNA は動物におけるインターフェロン応答や、高等真核生物に広く備わっている RNA サイレンシングの引き金となることから、真核プラス鎖 RNA ウイルスの複製サイクルでは、マイナス鎖 RNA を隠すことがウイルスにとって非常に重要なのではないかと考えられている。以上の過程は、プラス鎖 RNA 合成のための鋳型認識とマイナス鎖 RNA

合成のための鋳型認識と相補鎖合成開始が、可溶性の「複製酵素」により、互いに似た機構で起こり、マイナス鎖 RNA が細胞質中に提示されるプラス鎖 RNA フェージの複製過程⁵⁾ (図 1B)とは全く異なるものである。むしろ最近、真核生物プラス鎖 RNA ウイルスと、逆転写を介して複製するウイルスや二本鎖 RNA ウイルスが、複製サイクルのいろいろな局面で類似点を持ち、共通の祖先をもつ可能性が指摘されている^{1, 19)}。

1. ウイルス増殖関連宿主因子の 順向きの遺伝学的アプローチによる同定

ウイルスのゲノム複製機構を理解するためには、その過程にどのような因子が関与するかを知ることが前提となるが、そのような宿主因子についての知見は、現在でも多くのウイルスにおいて欠落が著しい。我々は、トバモウイルスの増殖に関与する宿主因子を、ゲノム全体にわたる塩基配列が決定されたモデル植物シロイヌナズナ³⁾を用いて、順向きの遺伝学的手法で同定する試みを行ってきた。具体的には、トバモウイルス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、トバモウイルスの増殖効率が低下した突然変異株を単離し^{10, 15)}、原因遺伝子を同定した^{23, 26)}。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。これらはそれぞれ7回、4回膜貫通タンパク質をコードすると予想された。さらに、酵母ツーハイブリッド解析により、*TOM1* はトバモウイルスの複製タンパク質および *TOM2A* と相互作用することが示唆された^{23, 26)}。また、感染細胞抽出液の細胞分画法による解析において、*TOM1* はトバモウイルスの RNA 合成活性と酷似した挙動をとることも明らかになった⁷⁾。こ

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・微生物間相互作用研究ユニット; CREST, JST
TEL/FAX : 029-838-7009
E-mail : ishika32@affrc.go.jp

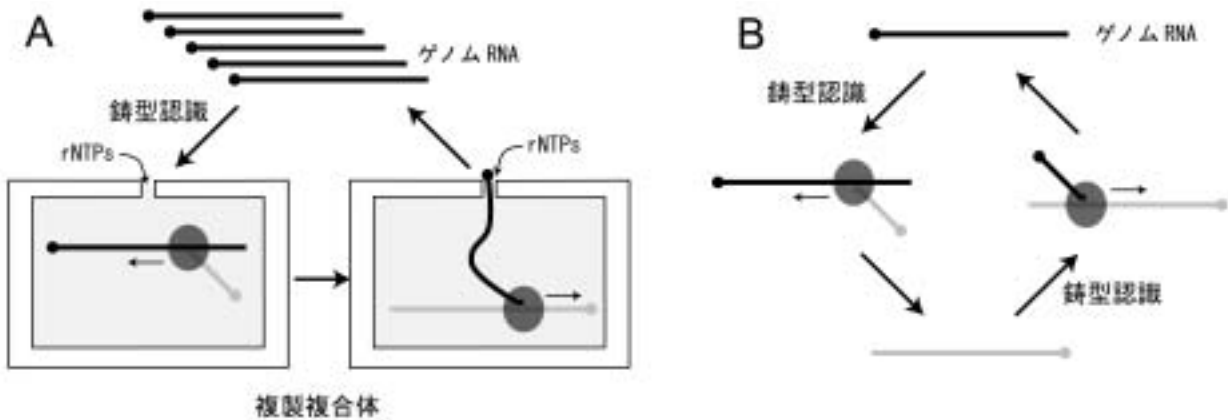


図1 プラス鎖 RNA ウイルスのゲノム複製モデル。(A) 真核生物を宿主とするプラス鎖 RNA ウイルスのゲノム複製モデル。ゲノム RNA (濃い太線) は翻訳されて複製タンパク質 (黒丸) を産生する。複製タンパク質はゲノム RNA を鋳型として認識し、膜表面にリクルートして複製複合体を形成する。複製複合体は膜により細胞質から隔てられた空間でマイナス鎖 RNA (薄い太線) を合成し、次いで多量のプラス鎖 RNA を合成して細胞質に放出する。(B) 原核生物を宿主とするプラス鎖 RNA ウイルスのゲノム複製モデル。可溶性の「複製酵素」(黒丸) により、細胞質中でマイナス鎖およびプラス鎖が合成される。RNA の 5' 末端は丸印で示した。

これらの結果と、真核生物プラス鎖 RNA ウイルスの複製複合体がオルガネラ膜上に形成されることを総合して、TOM1, TOM2A は、トバモウイルスの複製タンパク質を膜上につなぎ止め、複製複合体の形成あるいは機能維持に重要な働きをしていると予想された。

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²⁶⁾。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³⁾。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的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。最近、高等真核生物に比して遺伝子の重複が少ない出芽酵母で複製できる植物ウイルス、ブロムモザイクウイルス (BMV)、トマトブッシュシステムトウイルスの増殖に関わる宿主遺伝子のゲノムワイドな検索が行われ、ウイルスの増殖に影響を与える数多くの遺伝子が同定された^{2, 12, 17)}。これらのうちには、間接的に影響を及ぼしているものも含まれると考えられるが、今後の詳細な解析により、多くのことが明らかになることが期待される。

このように、我々は植物を用いた順向きの遺伝学的アプローチに限界を感じ、生化学的に宿主因子を同定し、遺伝学的手法で同定された因子も含めて、それらの機能を解析したいと考えた。その背景には、タンパク質のアミノ酸配列情報の充実と質量分析法を利用した微量タンパク質同定技術の進展があった。生化学的なアプローチを進めるためにどうしても必要なのは、試験管内ウイルス RNA 複製系である。我々が手本にしたのは、ポリオウイルスの試験管内複製系である。1991 年、Molla らは、Hela 細胞を破碎し、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¹³⁾。さらに、低濃度のグアニジンを用いることにより、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⁴⁾ 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 年にポリオと同じピコルナウイルスに分類される *Encephalomyocarditis virus* について報告されたのみであった²²⁾。我々は、植物細胞抽出液を用いて植物 RNA ウイルスゲノムの翻訳・複製系を開発しようと考えた。その予備段階として、トバモウイルスの一種であるトマトモザイクウイルス (ToMV) 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、ToMV 特異的 RNA 合成は検出されな

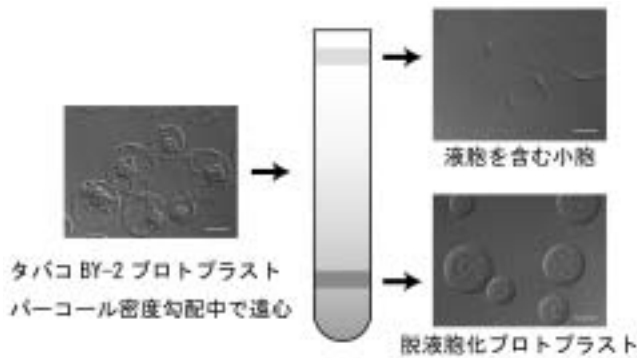


図2 タバコ BY-2 培養細胞由来プロトプラストの脱液胞化。スケールバーは 20 μ m。

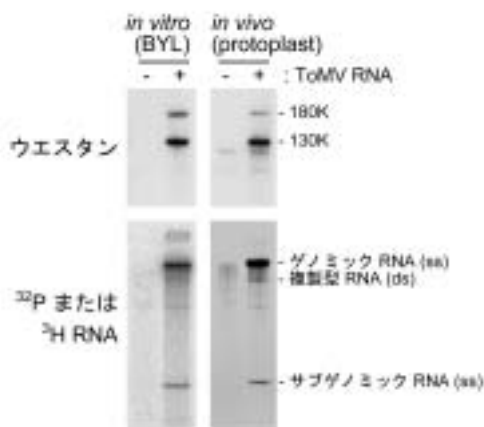


図3 BYL を用いた試験管内 ToMVRNA 翻訳・複製。左側に、BYL を用いた試験管内 ToMV RNA 翻訳・複製反応産物 (RNA は α - 32 P]CTP で標識し、ゲル電気泳動により分離後オートラジオグラフィで検出した)、右側に、ToMV 感染 BY-2 プロトプラストにおける 130K, 180K 複製タンパク質の蓄積と RNA 合成パターン (RNA は 3 H]ウリジンで標識し、ゲル電気泳動により分離後フルオログラフィーで検出した) を示す。

かった¹¹⁾。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当然とも思われた。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。

2. 植物 RNA ウイルスゲノム試験管内翻訳・複製系

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。液胞は、単膜系のオルガネラで、細胞の種類によって機能が多様に分化している。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。試験管内翻訳を行うための植物細胞抽出液を作製する材料としては、小麦胚芽がよく知られているが、この組織の細胞において液胞は未発達である。我々は、タバコウイルス RNA の試験管内翻訳・複製系を構築するにあたり、タバコ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 培養細胞を材料に使用しようと考えた。この細胞は倍加時間が 24 時間弱と植物細胞としては例外的に短く、非常に扱いやすいため、「植物の Hela 細胞」と呼ばれている、日本で樹立され、世界中で使われている懸濁培養細胞である¹⁴⁾。液胞は比較的未発達な上、脱液胞化の技術も園部らにより確立されていた²¹⁾。セルラーゼ等の酵素を用いて細胞壁を除去して作製した 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、2 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2)。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 ToMV 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、ToMV 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、合成パターンは、ToMV 感染 BY-2 プロトプラストにおいて見られるものと似ていた(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る。また、BYL を用いた同様の反応により、BMV、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¹¹⁾。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。

3. トバモウイルス感染誘導植物培養細胞からの複製複合体の単離

これまでに、複製複合体の性状を知ることを目的に、多くのプラス鎖 RNA ウイルスについて感染細胞の破碎物から生体膜を精製し、RNA 合成活性の特性を調べる実験、さらに、膜に結合した複製複合体を界面活性剤で可溶化し、RNA ポリメラーゼ活性を精製し、共精製される宿主因子を同定する試みが精力的に行われてきた。このような試みの中で、多くの場合に共通に見いだされたことは、(1) 膜を可溶化しない状態では、内在性鋳型をもとに標識ヌクレオチドを二本鎖 RNA に取り込む活性が検出される；(2) 界面活性剤を添加して膜を可溶化すると、内在性の鋳型に依存した RNA 合成活性は消失し、外から加えたウイルス

RNA に対してその相補鎖を合成する活性が現れることである。可溶化されたウイルス RNA 依存 RNA ポリメラーゼ (RdRp) が、添加した当該プラス鎖ウイルス RNA を、相補鎖を経て複製するサイクルを完遂する例も報告された^{8,25)}。しかし、可溶化酵素で完全な複製サイクルを回せたのは、むしろ例外に属する。個々のウイルスについての成果は、本誌に掲載された渡辺と日比による総説に詳述されているので、そちらを参照されたい²⁴⁾。可溶化されたウイルス RdRp は、**図 1A** に示した複製サイクルを考慮すれば、生体内で起こっている鋳型認識と複製の過程を再現するものではないことが予想される。実際、例えば、BMV 感染細胞の膜を可溶化すると、外来 BMV RNA を特異的に鋳型として認識し、マイナス鎖 RNA を合成する活性が得られる。BMV のウイルス粒子は 3 本に分節したゲノム RNA に加え、RNA4 と呼ばれるサブゲノミック RNA を含む。RNA4 は BMV RNA が複製鋳型として認識される際に必要なシス配列を欠き、生体内ではマイナス鎖合成の鋳型としては使われないにもかかわらず、この酵素は RNA4 を鋳型としてマイナス鎖を合成することができる¹⁸⁾。このように、可溶化された RdRp は生体内での過程を完全には反映しないやり方で鋳型を認識していると思われる。しかし一方で、可溶化されたウイルス RdRp が鋳型特異性のある程度残しているのも事実で、この酵素の性質や構成因子を調べることは、鋳型認識機構や複製複合体の構造の解明に向けて十分に意味があると考えられる。

前述の通り、植物細胞をそのまま破碎すると、液胞からの各種分解酵素の漏出により、多くの生化学的過程が妨害される。ウイルスの複製過程も例外ではなく、感染細胞をそのまま破碎して得た抽出液あるいは膜画分に見いだされるのは、ほとんどの場合、二本鎖 RNA 合成活性のみで、生体内で見られるような、多量の一本鎖 (+) RNA の合成は観察されない。ただ、そこから膜画分を精製したり、可溶化後クロマトグラフィー等で精製すると、一本鎖 (+) RNA の合成が検出されるケースがあることは知られていた^{8,16)}。従って、一本鎖 RNA が合成されないことの原因のひとつは、抽出液に混入した一本鎖 RNA 分解酵素にあると考えられた。このような状況下では、活性の一部しか観測されないだけでなく、RNA 合成のマシナリー自身無傷の状態で抽出されているか不明である。ToMV 感染植物葉から抽出された膜画分は、蔗糖密度勾配遠心により精製すると一本鎖ゲノム RNA を合成する活性を含んでいたが、それは、生体内では多量に合成されるサブゲノミック RNA はほとんど合成しなかった¹⁶⁾。これは、一本鎖 RNA を合成する活性は得られても、生体内のものとは質的に異なるものに変化してしまっている可能性を示唆する。これらの背景を踏まえ、我々は、既に形成された複製複合体を得るためにも、脱液胞化が有効と考えた。非感染 BY-2 細胞か

ら得た BYL を用いた試験管内翻訳・複製系では、得られる複製複合体の量が生化学的解析を行うには十分とはいえなかった。そこで、我々は従来行われてきたエレクトロポレーション法によりウイルス RNA を BY-2 プロトプラストに感染させ、培養後、脱液胞化することを先ず試みた。この方法も成功はしたが、再現性が乏しく、また、多量の感染細胞を得るためには何回もエレクトロポレーションを行わなければならない、多大な労力が必要であった。

ウイルス感染培養細胞を多量に得るには、誘導性のプロモーター下流に完全長ウイルスゲノム cDNA を挿入した遺伝子カセットで細胞を形質転換しておき、誘導をかける方法が考えられる。同様の方法は、既に他のウイルス-宿主系でも成功例があった (例えば、文献 9)。我々は、これにならない、ステロイドホルモン誘導性のプロモーター下流に、転写開始点がウイルスゲノムの 5' 末端に近くなるように完全長 ToMV cDNA を挿入した。cDNA の直後には、RNA が転写されたあとに元のウイルス RNA の 3' 末端付近で自己切断が起きようリボザイムの配列を、さらにその下流にはポリ (A) シグナルを挿入した。ウイルスゲノムとしては、感染したことが容易にモニターできるよう、外被タンパク質のコード領域を GFP のコード領域で置換した ToMV ゲノムを用いた。対応するウイルスのゲノムが複製すると、GFP をコードするサブゲノミック RNA が合成され、GFP タンパク質が発現する (**図 4**)。なお、GFP は一次転写産物からは翻訳されないので、RNA 複製の指標となる。我々はこの方法で、誘導前は感染が全く見られないが、ステロイドホルモンの添加によって 8 割以上の細胞で同調的に感染が誘導される細胞株を得た⁶⁾。この感染誘導細胞からプロトプラストを調製し、脱液胞化し、細胞抽出液を得た。この抽出液は複製型 RNA に加え、一本鎖ゲノミックおよびサブゲノミック RNA を合成することができた。標識ヌクレオチドが取り込まれた RNA の電気泳動バンドパターンは、感染細胞に放射性標識したウリジンを取り込ませた際とよく似ており、無傷の複製複合体が抽出できたと考えられた。

おわりに

我々は、現在、BYL を用いた試験管内 ToMV RNA 翻訳・複製系を用いて複製複合体の形成過程の詳細を、また、ToMV 感染誘導脱液胞化 BY-2 プロトプラスト抽出液を用いて、形成が完了した ToMV RNA 複製複合体の性状解析を進めている。これらの研究により、ToMV RNA の複製に関与する宿主因子が同定され、複製機構が明らかになることを期待する。

謝 辞

本稿で紹介した研究は、北海道大学、内藤哲教授；農業

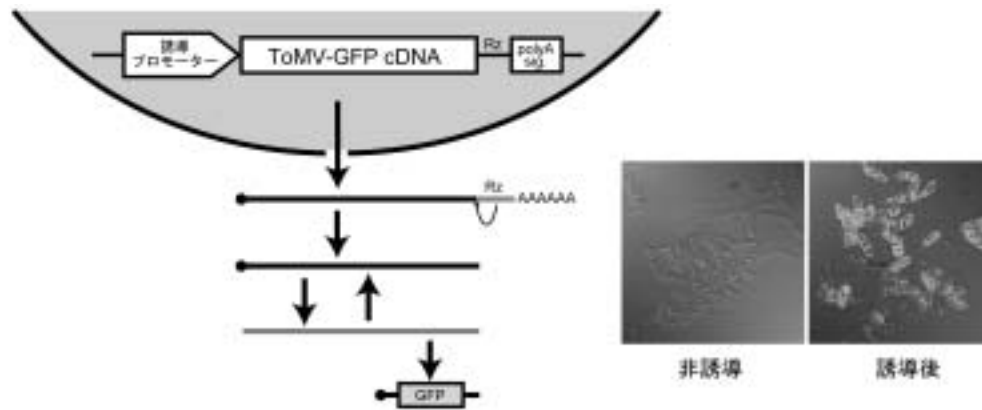


図4 タバコ BY-2 細胞における ToMV 感染誘導系. 細胞の写真はノルムスキー像に GFP 蛍光像を重ねたものである.

生物資源研究所, 飯哲夫博士; 石川県立大学, 森正之助教授と我々の研究グループとの共同研究によるものです. 一連の研究に携わった全ての方々から感謝いたします.

文 献

- 1) Ahlquist P. : Parallels among positive-strand RNA viruses, reverse-transcribing viruses and double-stranded RNA viruses. *Nat Rev Microbiol* 4: 371-382, 2006.
- 2) Ahlquist P, Noueiry AO, Lee W-M, Kushner DB, Dye BT. : Host factors in positive-strand RNA virus genome replication. *J Virol* 77: 8181-8186, 2003.
- 3) Arabidopsis Genome Initiative. : Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815, 2001.
- 4) Barton DJ, Black EP, Flanagan JB. : Complete replication of poliovirus *in vitro*: preinitiation RNA replication complexes require soluble cellular factors for the synthesis of VPg-linked RNA. *J Virol* 69: 5516-5527, 1995.
- 5) Blumenthal T, Carmichael GG. : RNA replication: function and structure of Q β replicase. *Annu Rev Biochem* 48: 525-548, 1979.
- 6) Dohi K, Nishikiori M, Tamai A, Ishikawa M, Meshi T, Mori M. : Inducible virus-mediated expression of a foreign protein in suspension-cultured plant cells. *Arch Virol* 151: 1075-1084, 2006.
- 7) Hagiwara Y, Komoda K, Yamanaka T, Tamai A, Meshi T, Funada R, Tsuchiya T, Naito S, Ishikawa M: Sub-cellular localization of host and viral proteins associated with tobamovirus RNA replication. *EMBO J* 22: 344-353, 2003.
- 8) Hayes RJ, Buck KW. : Complete replication of a eukaryotic virus RNA *in vitro* by a purified RNA-dependent RNA polymerase. *Cell* 63: 363-368, 1990.
- 9) Ishikawa M, Janda M, Krol MA, Ahlquist P. : *In vivo* DNA expression of functional brome mosaic virus RNA replicons in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Virol* 71: 7781-7790, 1997.
- 10) Ishikawa M, Obata F, Kumagai T, Ohno T. : Isolation of mutants of *Arabidopsis thaliana* in which accumulation of tobacco mosaic virus coat protein is reduced to low levels. *Mol Gen Genet* 230: 33-38, 1991.
- 11) 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.
- 12) Kushner DB, Lindenbach BD, Grdzlishvili VZ, Noueiry AO, Paul SM, Ahlquist P. : Systematic, genome-wide identification of host genes affecting replication of a positive-strand RNA virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 15764-15769, 2003.
- 13) Molla A, Paul AV, Wimmer E. : Cell-free, *de novo* synthesis of poliovirus. *Science* 254:1647-1651, 1991.
- 14) Nagata T, Nemoto Y, Hasezawa S. : Tobacco BY-2 cell-line as the HeLa-cell in the cell biology of higher plants. *Int Rev Cytol* 132: 1-30, 1992.
- 15) Ohshima K, Taniyama T, Yamanaka T, Ishikawa M, Naito S. : Isolation of a mutant of *Arabidopsis thaliana* carrying two simultaneous mutations affecting tobacco mosaic virus multiplication within a single cell. *Virology* 243: 472-481, 1998.
- 16) Osman TAM, 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.
- 17) Panavas T, Serviene E, Brasher J, Nagy PD. : Yeast genome-wide screen reveals dissimilar sets of host genes affecting replication of RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:7326-7331, 2005.
- 18) Quadt R, Ishikawa M, Janda M, Ahlquist P. : Formation of brome mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase in yeast requires coexpression of viral proteins and viral RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:4892-4896, 1995.
- 19) Schwartz M, Chen J, Janda M, Sullivan M, den Boon J, Ahlquist P. : A positive-strand RNA virus replication complex parallels form and function of retrovirus capsids. *Mol Cell* 9: 505-514, 2002.
- 20) Schwartz M, Chen J, Lee WM, Janda M, Ahlquist P. : Alternate, virus-induced membrane rearrangements

- support positive-strand RNA virus genome replication. Proc Natl Acad Sci USA 101: 11263-11268, 2004.
- 21) Sonobe S. : Studies on the plant cytoskeleton using miniprotoplasts of tobacco BY-2 cells. J Plant Res 109:437-448, 1996.
 - 22) Svitkin YV, Sonenberg N. : Cell-free synthesis of encephalomyocarditis virus. J Virol 77: 6551-6555, 2003.
 - 23) Tsujimoto Y, Numaga T, Ohshima K, Yano M, Ohsawa R, Goto DB, Naito S, Ishikawa M. : *Arabidopsis TOBAMOVIRUS MULTIPLICATION (TOM) 2* locus encodes a transmembrane protein that interacts with TOM1. EMBO J. 22: 335-343, 2003.
 - 24) 渡辺貴斗, 日比忠明: 植物プラス1本鎖RNAウイルスのRNA複製酵素. ウイルス 50, 217-232, 2000
 - 25) Wu SX, Ahlquist P, Kaesberg P. : Active complete *in vitro* replication of nodavirus RNA requires glycerophospholipid. Proc Natl Acad Sci USA 89: 11136-40, 1992.
 - 26) 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.

Analysis of the mechanisms of tobamovirus RNA replication

Masayuki ISHIKAWA

Plant-Microbe Interactions Research Unit, National Institute of Agrobiological Sciences; CREST, JST
2-1-2, Kan-non-dai, Tsukuba 305-8602, Japan. E-mail: ishika32@affrc.go.jp

The replication of eukaryotic positive-strand RNA virus genomes occurs in membrane-bound replication complexes. Currently, little is known about the process of replication complex formation and the molecular structure of the replication complexes. We are trying to understand how eukaryotic positive-strand RNA viruses replicate using tobamoviruses as models. Here, I describe our approaches to this end.