

氏 名	ど 土 肥 こう じ
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2557 号
学位授与の日付	平 成 17 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Studies on the RNA-Dependent RNA Polymerase Complex of Brome Mosaic Virus (ブロムモザイクウイルス RNA 依存 RNA 合成酵素複合体に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 奥 野 哲 郎 教 授 遠 藤 隆 教 授 西 岡 孝 明

論 文 内 容 の 要 旨

RNA 依存 RNA 合成酵素 (RdRp) は RNA ウイルスのゲノム RNA の複製あるいはサブゲノム RNA の転写に中心的な役割を果たしている。RNA ウイルスのモデルとして研究に用いられているブロムモザイクウイルス (BMV) の RdRp は、ウイルスにコードされた 1a タンパク質と 2a タンパク質、およびいくつかの宿主タンパク質からなる複合体であると考えられており、宿主細胞内では小胞体膜に結合していることが明らかになっている。1a タンパク質にはメチルトランスフェラーゼドメインとヘリカーゼドメインが、2a タンパク質には RNA ポリメラーゼドメインが存在する。また、酵母ツーハイブリッド法などにより、1a タンパク質と 2a タンパク質の特定の領域がこれらのタンパク質の分子間、または分子内相互作用に関与することが明らかとなっている。しかしながら、活性のある BMV RdRp 複合体の全体的な構造は、まったく明らかにされていない。

本論文では、活性のある BMV RdRp 複合体の構造を解明することを目的として、モノクローナル抗体を用いた生化学的・免疫学的手法により RdRp 複合体の構造を解析した。さらに、免疫電子顕微鏡法により、感染宿主葉細胞内における RdRp 複合体の局在について調べた。

第 1 章では、まず大腸菌で発現させたタンパク質を抗原として 1a タンパク質および 2a タンパク質に対するモノクローナル抗体のシリーズを作製した。次に C 末端側を欠失させた 1a タンパク質および 2a タンパク質を用いた ELISA およびウェスタンブロッティングにより、得られたモノクローナル抗体のエピトープマッピングを行った。さらに、これらの抗体を用いて界面活性剤で可溶化した RdRp 画分の免疫沈降実験を行い、1a タンパク質のメチルトランスフェラーゼドメインとヘリカーゼドメインの中間領域である a. a. 544-548 および a. a. 553-557 の部分と、2a タンパク質の N 末端領域の a. a. 8-12 および a. a. 18-23 の部分が活性のある可溶化 RdRp 複合体の表面に存在することを明らかにした。一方、1a タンパク質の a. a. 1-143, a. a. 586-619, および a. a. 852-919 の領域と、2a タンパク質の a. a. 50-95, a. a. 270-310, および a. a. 341-376 の領域は、活性のある可溶化 RdRp 複合体において、複合体の内部に埋没していることが明らかになった。

第 2 章では、抗 1a モノクローナル抗体のうち 1a タンパク質中央のメチルトランスフェラーゼドメインとヘリカーゼドメインの中間領域を認識する 2 種類の抗体がエピトープ特異的な結合によって可溶化 RdRp の活性を阻害することを明らかにした。さらに、それらの抗体を用いた活性阻害実験により、1a タンパク質のドメイン間領域の a. a. 544-552 の部分が、活性があり膜に結合している RdRp 複合体において膜構造に埋没した領域と表面に露出した部分のちょうど境界に位置することを明らかにした。

第 3 章では、1a タンパク質と 2a タンパク質、さらにウイルスの細胞間移行に関与する 3a タンパク質について、BMV 感染オオムギ葉細胞内での分布を金コロイド免疫電子顕微鏡法により調べた。その結果、1a タンパク質および 2a タンパク質は感染特異的に観察される電子密度の高い不定形のインクルージョンに局在していることが明らかとなった。さらに電子顕微鏡オートラジオグラフィーによって、このインクルージョンはウイルス RNA 合成の場であることが示され、この場所に RdRp 複合体が存在することが確かめられた。さらに、連続切片を用いた免疫電顕法により、このインクルージョンには、

ウイルスの RNA 複製に関与する RdRp 複合体に加えて、ウイルスの細胞間移行に関与する 3a タンパク質も存在することが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

RNA ウイルスの RNA 依存 RNA 合成酵素 (RdRp) は、ゲノム RNA の複製およびサブゲノム RNA の転写に中心的な役割を果たしている酵素である。ブロムモザイクウイルス (BMV) の RdRp は、ゲノム RNA にコードされた 1a タンパク質と 2a タンパク質、およびいくつかの宿主タンパク質からなる複合体であると考えられており、宿主細胞内では小胞体膜に結合していることが明らかになっている。しかしながら、活性のある状態の BMV RdRp 複合体の全体的な構造は、まったく明らかにされていない。

本論文では、活性のあるウイルス RdRp 複合体の構造を解明することを目的として、モノクローナル抗体を用いた生化学的・免疫学的手法により BMV RdRp 複合体の構造を解析し、さらに免疫電子顕微鏡法により、感染宿主葉細胞内における RdRp 複合体の局在についての解析を行ったものである。評価すべき点は以下の通りである。

1. モノクローナル抗体を用いた生化学的・免疫学的手法により、界面活性剤で可溶化された活性のある BMV RdRp 複合体において、複合体表面に存在するエピトープと、内部に存在するエピトープを明らかにした。

2. 可溶化 RdRp の活性を阻害するモノクローナル抗体を用いた解析により、1a タンパク質のドメイン間領域が、活性がある状態の膜結合 RdRp 複合体において膜構造に埋没した領域と表面に露出した部分のちょうど境界部分に位置することを明らかにした。

3. BMV 感染オオムギ葉細胞において 1a タンパク質および 2a タンパク質を含む RdRp 複合体がウイルス感染特異的に観察される電子密度の高い不定形のインクルージョンに局在することを明らかにした。さらにこのインクルージョンには、ウイルスの細胞間移行に関与する 3a タンパク質も共局在することを明らかにした。

以上のように、本論文は重要モデル RNA ウイルスの一つである BMV の RdRp 複合体の構造および感染細胞における局在について新たな知見を与えるものである。得られた結果は、BMV のみならず植物 RNA ウイルスの複製・感染機構の解明に向けて有用なものであり、植物病理学およびウイルス学の分野に寄与するところが大い。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成17年1月20日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。