

氏 名	藤 田 美 紀
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1091 号
学位授与の日付	平 成 12 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	農 学 研 究 科 応 用 生 物 学 専 攻
学位論文題目	FUNCTIONAL ANALYSIS OF GENE PRODUCTS OF PLANT VIRUSES BY USING PROTEIN EXPRESSION SYSTEMS (タンパク質発現系を用いた植物ウイルス遺伝子産物の機能解析)

論文調査委員 (主 査) 教 授 古 澤 巖 教 授 久 野 英 二 教 授 津 田 盛 也

論 文 内 容 の 要 旨

植物ウイルスの感染過程における重要なステップとして、ウイルスゲノムの複製と、細胞間移行の二つがあげられる。本研究では、これらのメカニズムの解明を目的として、大腸菌および酵母を用いたタンパク質大量発現系を利用し、各過程に関与するウイルスタンパク質の機能解析を行った。はじめに、プラスの一本鎖 RNA ウイルスである bromovirus の細胞間移行のメカニズムを解明するために、移行タンパク質である 3a タンパク質の機能解析を行った。

1. 大腸菌を用いた 3a タンパク質の大量発現系を確立した。これまで、bromovirus の 3a タンパク質の研究は主に分子遺伝学的手法によって行われてきたが、この大量発現系の確立によって生化学的手法による機能解析が可能となった。

2. 精製した 3a タンパク質を用いて gel retardation assay および UV cross-linking assay を行い、3a タンパク質が一本鎖 RNA と cooperative に結合することを明らかにした。また、この結合反応は RNA の塩基配列に依存しないことを示した。さらに、競合実験の結果から 3a タンパク質は RNA、DNA に関わらず一本鎖、二本鎖の核酸に結合する能力を持つが、二本鎖に比べて一本鎖核酸により強く結合することを明らかにした。これらの結果から、bromovirus は「移行タンパク質とウイルスゲノム RNA が複合体を形成して細胞間を移行する」という、植物ウイルスの基本的な移行モデルに即した移行形態をとると推察した。

3. 3a タンパク質中の核酸結合ドメインを明らかにするために、3a タンパク質の一部を欠損させた 8 つの欠失変異体シリーズを作製し、核酸結合アッセイを行った。その結果、3a タンパク質中の 189 番目から 242 番目までの 54 アミノ酸の領域が核酸結合ドメインであることを明らかにした。この領域はタンパク質表面に露出しており、塩基性アミノ酸残基によってプラスに強く荷電していることから、マイナスに荷電している核酸と直接相互作用していると推察した。

4. 遠心分画法および電子顕微鏡観察法を用いて BMV 感染オオムギ葉細胞における 3a タンパク質の局在性を調べた結果、3a タンパク質は感染組織中のプラズモデスマータおよびその周辺に局在していることを明らかにした。さらに、3a タンパク質はウイルス RNA の複製の場であるビロプラズムに局在していることから、ここで合成された BMV RNA に 3a タンパク質が結合しプラズモデスマータの通過に適した複合体を形成した後、細胞間を移行するというモデルを考察した。このことから、3a タンパク質は核酸結合の際に配列特異性を持たないがビロプラズムという限られた構造物の中で複合体を形成することにより、ゲノム RNA のみを効率的に輸送できると推察した。

5. つぎに、マイナスの一本鎖 RNA ウイルスとして最も研究の進んでいる sonchus yellow net virus (SYNV) の複製機構を解明するために、複製酵素の構成要素である P タンパク質の機能解析を行った。酵母内で glutathione-S-transferase (GST) と P との融合タンパク質を発現させ放射性ラベルした後にアフィニティ精製するシステムを利用して、P タンパク質がリン酸化を受けることを明らかにし、リン酸化を介した複製制御機構の存在を示した。

6. GST-P 融合タンパク質と転写を制御する N タンパク質を同時に発現させ、グルタチオンビーズを用いた pull down

assayを行った結果、Pタンパク質がNタンパク質と複合体を形成することを示した。また、同様の実験から、Pタンパク質同士でも相互作用することを明らかにした。他のラブドウイルスとの比較から、これらの現象は転写と複製の切り換え制御に深く関わっていると推察した。さらに、酵母内におけるこれらの結果は、酵母の発現システムが感染性ウイルス再構成系の確立されていない植物ラブドウイルスの研究において有効な手段であることを示した。

論文審査の結果の要旨

植物ウイルスの感染性を決定する重要な要素として、ウイルスゲノムの複製と、細胞間移行の二つがあげられる。本研究は、これらのメカニズムの解明を目的として、各過程に関与するウイルスタンパク質の機能解析を行ったもので、評価すべき主な点は次のとおりである。

1. プロモウイルスの細胞間移行のメカニズムを解明するため、3a移行タンパク質の機能解析を行った。まず、大腸菌を用いた3aタンパク質の大量発現系を確立し、精製した3aタンパク質を用いて核酸結合アッセイを行った。その結果、3aタンパク質がRNAと結合することを明らかにして、「移行タンパク質とウイルスゲノムRNAが複合体を形成して細胞間を移行する」という、植物ウイルスの基本的な移行形態に関するモデルを支持する結果を得た。

2. 3aタンパク質中の189番目から242番目までの54アミノ酸の領域が核酸結合ドメインであることを明らかにした。この領域は、タンパク質表面に露出している可能性が高く、塩基性アミノ酸残基によってプラスに強く荷電していることから、マイナスに荷電している核酸と直接相互作用しているという結合メカニズムを示した。

3. 遠心分画法および電子顕微鏡観察法によって、3aタンパク質がプロモウイルス感染組織中のプラズモデスマータおよびその周辺の細胞質、さらにウイルス複製の場であるビロプラズムに局在していることを明らかにした。この結果から、複製されたウイルスRNAがビロプラズム内で移行タンパク質と結合し、隣接細胞への通路である原形質連絡に輸送されるという移行モデルを導いた。このことから、3aタンパク質は核酸結合の際に配列特異性を持たないが、ビロプラズムという限られた構造物の中で複合体を形成することにより、ゲノムRNAのみを効率的に輸送できると推察した。

4. マイナスの一本鎖RNAウイルスであるsonchus yellow net virus (SYNV)の複製機構を解明するために、複製酵素の構成要素であるPタンパク質の機能解析を行った。その結果、Pタンパク質が転写を制御するヌクレオキャプシドタンパク質と複合体を形成すること、また、Pタンパク質同士でも相互作用することを明らかにした。

5. 酵母の発現システムを利用して、Pタンパク質がリン酸化を受けることを明らかにし、SYNVにおけるリン酸化を介した複製制御機構の存在を示唆した。さらに、酵母を用いた研究によって得られたこれらの結果から、酵母の発現システムが感染性ウイルス再構成系の確立されていない植物ラブドウイルスの研究において有効な手段であることを示した。

以上のように本論文は、プロモウイルスの移行タンパク質の機能を分析し、ウイルスの細胞間移行様式を解明し、さらに、植物ラブドウイルスの複製機構解明のための重要な知見を与えるもので、植物ウイルス学および植物病理学に寄与するところが大きい。

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12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。