

学 位 論 文 題 名

イネ萎縮ウイルス構造タンパク質の RNA 転写

および粒子形態形成に関する解析

学位論文内容の要旨

本研究は、生物活性を保持したイネ萎縮ウイルスを試験管内で再構成する目的で、ウイルス粒子を構成する構造蛋白質とゲノムRNA間の結合様式を明らかにし、ウイルス粒子の分子構造を提唱したものである。イネ萎縮ウイルス（RDV）は12本のdsRNA分節ゲノムを持ち、直径約70nmの球状ウイルスである。RDVの構造蛋白質は、P1（RNA依存RNAポリメラーゼ）、P3（コアキャプシド）、P5（内殻蛋白質）P7（内殻蛋白質）およびP8（外殻蛋白質）の4つから構成されており、純化粒子は試験管内で高い転写活性を保持している。

1. RNAポリメラーゼ活性の異なるウイルス株の探索

ウイルスが保持するRNAポリメラーゼの活性にどの構造蛋白質が関与するか遺伝的に解析・同定する目的で、全国各地及びフィリッピン、韓国の分離株の試験管内転写反応の最適条件を検討した。しかし分離株間で至適pHと温度条件に顕著な差は認められず、遺伝的な解析が困難な事を明らかにした。

2. ウイルス粒子の解離とRNAポリメラーゼ活性

純化ウイルス粒子から外殻蛋白質P8を塩化マグネシウム存在下の塩化セシウム密度勾配遠心で解離して精製したコア粒子、さらにセシウムトリフルオロ酢酸（CsTFA）密度勾配遠心法によってゲノムdsRNAやP7とゲノムdsRNAが強く結合しているP7-dsRNA複合体、およびdsRNAを解離したオープンコア粒子を分画した。それらを用いて転写活性を測定したところ、コア粒子には活性が保持されていたが、P7-dsRNA複合体には活性は無かった。コア粒子は主にP1、P3、P7で構成されていた。

3. P7の核酸結合能の解析

CsTFA密度勾配遠心法による結果からP7が核酸と強く結合していることが示唆されたので、ノースウェスタンブロッティング法を用いて検討した。その結果、P7は

RDVのssRNA、dsRNAのみならず、他のウイルスのssRNA、dsRNA、およびdsDNAとも非特異的に核酸と結合する能力を持つ、既知のレオウイルスには類似した蛋白質が見つからない、新しいタイプの核酸結合性蛋白質であることを証明した。

4. ウイルス構造蛋白質間の結合能解析

粒子を形成する構造蛋白質間の相互作用を分析するために、酵母two-hybridシステムとファウエスタンプロットティング法を用いて検討した。その結果、内殻を構成するP3を中心にこれにP8が外側からP3とP7に結合する。P7が内殻内側からP3とP8に結合し、さらにP7にはP1が結合している事を明らかにした。詳細は以下のようなになる。最初に、酵母 two-hybridシステム用シャトルベクターpAS2-1およびpACT2に、酵母内で各タンパク質全長が発現するようにP1、P3、P7、P8遺伝子を挿入した。X-Galを基質とする β -ガラクトシダーゼ分析をした結果、相互作用は $4 \times 4 = 16$ 通り中、P3-P3間にだけ強い発色反応が認められた。しかし、他の15通りでは有効な発色反応が確認できなかった。そこで、マルトース結合蛋白質(MBP)と融合蛋白質として大腸菌内で発現し、精製可能なベクターpMAL-c2に各蛋白質遺伝子の全長(P3、P7、P8)またはGDDモチーフ(RNAポリメラーゼ共通アミノ酸配列)を含むP1のC末端側半長を挿入し、蛋白質を発現、精製したプローブ蛋白質と抗MBP抗体を用いて、ファウエスタンプロットティング法により分析した。その結果、P1プローブに対してはP7だけが、P3プローブに対してはP3、P7、P8が、P7プローブに対してはP1、P3、P8が、P8プローブに対してはP3、P7が、それぞれ反応した。したがって、構造蛋白質間では、P3-P3のみならず、P1-P7、P3-P7、P3-P8、P7-P8の相互作用が確認された。各構造蛋白質間では、P3-P3間だけが両方法において相互に作用することが確認された。また、P1-P7、P3-P7、P3-P8、P7-P8との間で相互に作用していることが、ファウエスタンプロットティング法によって示された。

5. イネ萎縮ウイルス粒子の分子モデルの提唱

純化粒子のSDS-PAGE像より、粒子に含まれる各構造蛋白質のモル比を推定した。RDVは粒子の外殻タンパク質(P8)がトライマーからなる180形態学的単位から構成された球状構造をとっていることを踏まえた結果、1粒子当たりの各蛋白質の単位数はP1:P3:P7:P8トライマー = 36:180:180:180と推定した。

これらの結果を総合して、RDVのウイルス粒子構造仮説を提案した。また、P7と他の構造蛋白質との相互作用や核酸結合性、粒子構造仮説における粒子内位置を考慮した結果、P7はゲノムRNAや構造蛋白質間を結びつける"hinge"の機能を持ち、パッ

ケーシングに中心的役割を果たしているのみならず、RNAの転写、複製機構にも複製酵素複合体の1つの因子として関与している可能性があることを提唱した。RDV粒子は、核酸結合蛋白質であるP7をコア内面にもち、ゲノムdsRNAを内殻に結合させている。P7-P8間に相互作用が認められたことから、P3が作る内殻の網目構造の穴を通じてP7とP8トライマーとがP3が構成する内殻をはさみ込むように直接相互作用を維持していると推測した。この理由の1つとして、ウイルス粒子をセシウムトリフルオロ酢酸密度勾配遠心を行うとP1とP3を解離したP7-dsRNAとP8の複合体が回収できている。また、P1の存在位置についての可能性の1つとして、正20面体構造の中で、P8トライマーの構成する12ヶ所のペンタマーの中央の溝に沿って2ないし3分子ずつ計24ないし36分子が、あるいは20ヶ所のヘキサマー中央の溝を含め計32ヶ所に1分子ずつがP7と相互作用を維持しながら位置していると推定した。ウイルス粒子中でP7はゲノムdsRNAと強く結合しており、非特異的核酸結合性蛋白質であることを、P7は、単にゲノムdsRNAを集合させる核酸結合蛋白質としての役割のみならず、P1、P3、P8とも相互作用を示したことから、ウイルス粒子形成の際のパッケージングや粒子構造の安定化、また、複製酵素P1の補助因子としても機能している可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 田 一 郎

副 査 教 授 生 越 明

副 査 教 授 喜久田 嘉 郎

学 位 論 文 題 名

イネ萎縮ウイルス構造タンパク質の RNA 転写

および粒子形態形成に関する解析

本論文は、6章で構成され、図22、表6、引用文献114、総頁数110の和論文で、他に参考論文2編が添えられている。

本研究は、生物活性を保持したイネ萎縮ウイルスを試験管内で再構成する目的で、ウイルス粒子を構成する構造蛋白質とゲノムRNA間の結合様式を明らかにし、ウイルス粒子の分子構造を提唱したものである。主な研究成果は以下のようにまとめられる。

1. RNAポリメラーゼ活性の異なるウイルス株の探索

ウイルスが保持するRNAポリメラーゼの活性にどの構造蛋白質が関与するか遺伝的に解析・同定する目的で、全国各地及びフィリッピン、韓国の分離株の試験管内転写反応の最適条件を検討した。しかし分離株間で至適pHと温度条件に顕著な差は認められず、遺伝的な解析が困難な事を明らかにした。

2. ウイルス粒子の解離とRNAポリメラーゼ活性

純化ウイルス粒子から構造蛋白質を種々の密度勾配遠心法で解離してコア粒子、ゲノムdsRNAやP7とゲノムdsRNAが強く結合しているP7-dsRNA複合体、およびdsRNAを解離したオープンコア粒子を分画した。これらの転写活性はコア粒子には保持されていたが、P7-dsRNA複合体には無かった。コア粒子は主にP1、P3、P7で構成されていた。

3. P7の核酸結合能の解析

P7-dsRNA複合体が密度勾配遠心法で分画出来たので、ノースウェスタンブロットティング法を用いてP7がウイルスゲノム核酸に特異的に結合するか否か調べた。その結果、P7はRDVのssRNA、dsRNAのみならず、他のウイルスのssRNAやdsRNA、およびdsDNAとも非特異的に結合する能力を持つ、新しいタイプの核酸結合性蛋白質であることを明らかにした。この性質は、既知の植物レオウイルスだけでなく動物や昆虫のレオウイルス蛋白質でも報告されていないので、全く新しい蛋白質であることが明らかに出来た。

4. ウイルス構造蛋白質間の結合能解析

粒子を形成する構造蛋白質間の相互作用を分析して、P 3同士が結合して内殻を構成し、これにP 8が外側から、P 7が内殻内側からP 3と結合していること、さらにP 7はP 1とP 8が結合している事を明らかにした。詳細は以下ようになる。最初に、酵母 two-hybridシステム用シャトルベクターpAS2-1およびpACT2に、酵母内で各タンパク質全長が発現するようにP 1、P 3、P 7、P 8遺伝子を挿入した。結合検定の結果、相互作用はP 3-P 3間にだけ認められた。他の蛋白間でも相互作用が予想されたので、各蛋白質（P 1、P 3、P 7、P 8）をマルトース結合蛋白質（MBP）との融合蛋白質として大腸菌内で発現し、これらをプローブ蛋白質とし、ウイルス粒子をSDS-PAGEにかけて分離した構造蛋白質との結合能を、ファーウエスタンプロットティング法で分析した。その結果、P 3-P 3のみならず、P 1-P 7、P 3-P 7、P 3-P 8、P 7-P 8の相互作用が確認された。

5. イネ萎縮ウイルス粒子の分子モデルの提唱

純化粒子のSDS-PAGE像より、粒子に含まれる各構造蛋白質のモル比を、1粒子当たりP 1:P 3:P 7:P 8トライマー = 36:180:180:180と推定した。

これらの結果を総合して、RDVウイルス粒子構造仮説を提案した。RDV粒子は、核酸結合蛋白質であるP 7を内殻の内面にもち、ゲノムdsRNAを内殻に結合させている。P 7-P 8間に相互作用が認められたことから、P 3が作る内殻の網目構造の穴を通じてP 7とP 8トライマーとがP 3が構成する内殻をはさみ込むように直接相互作用を維持していると推測した。また、P 1は粒子の正20面体構造の中で、P 8トライマーの構成する12ヶ所のペンタマーの中央の溝に沿って2ないし3分子ずつ計24ないし36分子が、あるいは20ヶ所のヘキサマー中央の溝を含め計32ヶ所に1分子ずつがP 7と相互作用を維持しながら位置していると推定した。P 7は、単にゲノムdsRNAを集合させる核酸結合蛋白質としての役割のみならず、P 1、P 3、P 8とも相互作用を示したことから、ウイルス粒子形成の際のパッケージングや粒子構造の安定化、また、複製酵素P 1の補助因子としても機能している可能性が示唆された。

以上のように本研究は、RDV粒子の分子構造モデルを蛋白相互作用をもとに新しく示したものであり、学術上の貢献が大きく、学会においても高く評価されるものである。よって審査員一同は、本論文の提出者上田 重文は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格があるものと認めた。