

学 位 論 文 題 名

酵母を用いたブロムモザイクウイルスの
複製に関する因子の研究

学位論文内容の要旨

ウイルスの増殖機構を理解するためには、増殖に関与するウイルス側の因子のみならず、宿主側の因子についても知ることが必要である。ブロムモザイクウイルス（BMV）は出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）においても複製可能であることが示された唯一の植物プラス鎖 RNA ウイルスである。出芽酵母の完備した分子遺伝学的手法を用いれば、BMV の増殖に関与する宿主因子の同定が可能であろうと考えられる。最近、実際に BMV 複製が低下する酵母突然変異株が単離され、得られた突然変異株では大腸菌 DnaJ タンパク質の酵母ホモログ Ydj1 タンパク質をコードする遺伝子に変異が生じていることが明らかとなった。本研究では *ydj1* 変異が BMV 複製に与える影響を遺伝学的・生化学的手法を用いて解析した。

オリジナルの *ydj1* 変異株が突然変異誘起処理により得られた株であることから、当該変異以外の潜在的な変異の影響を排除するため、*ydj1* 変異以外は野生型株と同一の遺伝的背景を持つ株 *ydj1i* を作製した。ついで、*ydj1i* 株で BMV 複製タンパク質 1a および 2a を発現させ、BMV RNA3 を複製・保持させたところ、RNA3 および RNA4 の蓄積はそれぞれ野生型株の 19% および 11% に抑制されていた。

BMV 複製過程は（1）1a タンパク質により 2a タンパク質が複製の場である小胞体（endoplasmic reticulum : ER）膜上へ誘導される過程、（2）1a タンパク質により複製の鋳型 BMV RNA が ER 膜上に誘導される過程、（3）鋳型 BMV RNA からマイナス鎖が合成される過程、（4）マイナス鎖を鋳型としてプラス鎖が合成される過程（複製の成立）の 4 段階に分けることができる。*ydj1i* 株における 1a タンパク質による 2a タンパク質および RNA3 の膜への誘導を調べたところ、どちらも野生型株と同程度に起きていることが明らかとなった。しかし、*ydj1i* 株において単独で発現させた 2a タンパク質は 10,000 xg の遠心分離により膜を含む不溶性画分に回収されたことから、*ydj1* 変異は 2a タンパク質の一部を凝集させている可能性が示唆された。

つぎに（3）以降の過程に対する *ydj1* 変異の影響を調べるために、プラス鎖

RNA 合成に必要なシスエレメントを欠失した変異鋳型 RNA3 から合成されるマイナス鎖の蓄積を調べたところ、*ydj1* 株におけるマイナス鎖 RNA3 および RNA4 の蓄積はそれぞれ野生型株の 11% および 13% であった。このことから *ydj1* 変異は鋳型 RNA3 からマイナス鎖が合成される過程に関与すると考えられた。

BMV 複製を行わせた酵母の膜画分を可溶化すると BMV RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) 活性を得ることができる。野生型株に由来する BMV RdRp を粗精製し、そこに Ydj1 タンパク質を添加あるいは除去したところ活性に変化は見られなかったことから、Ydj1 タンパク質は *in vitro* に取り出した BMV RdRp 活性には関与しないと考えられた。

以上の結果と Ydj1 タンパク質が Hsp70 や Hsp90 の活性制御に携わり、分子シャペロンとしての機能を持つことから、Ydj1 タンパク質を含む分子シャペロンは *in vivo* で BMV 複製複合体をマイナス鎖合成開始可能な状態に転換する、という仮説を提示した。さらに *ydj1* 株では一部の 2a タンパク質が不溶性画分に回収されたことから、Ydj1 タンパク質は 2a タンパク質の高次構造の変化にも関与する可能性が示唆され、Ydj1 タンパク質は BMV 複製に対して多面的な役割を果たすものと考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 助 教 授 石 川 雅 之
副 査 教 授 内 藤 哲
副 査 教 授 富 田 房 男

学 位 論 文 題 名

酵母を用いたブロムモザイクウイルスの 複製に関与する因子の研究

ウイルスゲノムの複製は、ウイルスにコードされた因子とともに多くの宿主因子に依存する。しかし、ウイルス増殖に関与する宿主因子に関する知見は未だ少なく、その増殖機構を理解する上で大きな障害となっている。本研究は、出芽酵母で増殖可能な植物 RNA ウイルス、ブロムモザイクウイルス (BMV) RNA の複製に宿主分子シャペロン系がいかに関与するかを解析したものである。本論文の内容は以下のように要約される。

1、**MAB3 遺伝子の同定**：BMV の複製に関与する宿主因子の同定を目的として BMV の複製を介したレポーター遺伝子の発現が低下する酵母突然変異株 *mab3* が単離された。本研究では先ず、原因遺伝子を同定するために変異株を野生型ゲノミックライブラリーで形質転換し、変異形質を相補するゲノミック DNA 断片を得た。さらに相補 DNA 断片上の遺伝子が実際に変異を起こしていることも確認した。その結果、MAB3 遺伝子は大腸菌の *dnaJ* 遺伝子のホモログで分子シャペロンとして機能する YDJ1 遺伝子であることが明らかになった。

2、***ydj1i* 株の作製**：オリジナルの *mab3* 変異株が突然変異誘起処理により得られた株であるため、*ydj1* (*mab3*) 変異以外は野生型株と同一の遺伝的背景をもつ株 *ydj1i* を作製し、その株を用いて *ydj1* 変異が BMV 複製に及ぼす

影響を解析した。まず、*ydj1i* 株で BMV 複製タンパク質 1a, 2a を発現させ、BMV RNA3 を複製保持させ RNA レベルでの解析を行なったところ、RNA 3 および RNA4 の蓄積はそれぞれ野生型株の 19% および 11% に抑制されていた。このことから、*mab3* 株の形質は *ydj1* 変異のみによることが明らかになった。

3、*ydj1i* 株における BMV 1a, 2a, RNA3 の膜表面へのリクルートメント：BMV RNA 複製の場合は小胞体（ER）膜上であり、複製タンパク質 1a が 2a タンパク質と鋳型 BMV RNA3 を ER 膜上に誘導することが知られている。*ydj1i* 株では 1a タンパク質による 2a タンパク質および BMV RNA3 の膜への誘導は野生型株と同程度に起きていることを明らかにした。一方、*ydj1i* 株において単独で発現させた 2a タンパク質は 10,000 xg の遠心分離により膜を含む不溶性画分に回収されたことから、*ydj1* 変異は 2a タンパク質の一部を凝集させている可能性が示唆された。

4、*ydj1i* 株におけるマイナス鎖 RNA 合成：*ydj1i* 株においては BMV RNA3 から合成されるマイナス鎖の蓄積が野生型株と比較して低下していることを明らかにした。

以上、本論文により分子シャペロン Ydj1 タンパク質が 2a タンパク質に働きかけて *in vivo* で BMV 複製複合体をマイナス鎖合成開始可能な状態に転換する可能性が示された。論文では、この結果をさらに発展させ、RNA ウイルスのゲノム複製開始が、宿主の DNA 合成開始、あるいはヘパドナウイルスの逆転写開始といったこれまで全く別と考えられてきた生命現象と類似した分子基盤をもつという非常に興味深い可能性を指摘した。よって審査員一同は、富田有里子が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。