学位論文題名

Tobacco mosaic virus の複製に関与する宿主およびウイルス
タンパク質の細胞内局在性に関する研究

学位論文内容の要旨

ウイルスは、限られた遺伝情報のみをコードする核酸 (DNA あるいは RNA) とそれを保護する外殻としてのタンパク質、一部のものはさらにエンベロープをもつ感染因子である。ウイルスは、自らがコードするタンパク質に加え、宿主細胞内の様々な因子を利用し、細胞の機能に依存して巧みに自己増殖する。宿主因子に関する詳細な情報は、ウイルスの感染・増殖機構を知り、それに対抗する手段を見出す上で非常に重要である。現在宿主因子の解析は徐々に進んでいるが、ウイルス増殖機構の解明には、その情報量はまだ十分というにはほど遠い。

多数あるウイルス種をそのゲノムの特徴により分類すると、大半を占めるのは、メッセンジャー RNA として機能する極性の RNA をゲノムとしてもつプラス鎖 RNA ウイルスである。プラス鎖 RNA ウイルスは、自身のゲノムを複製する際に、ゲノム RNA の相補鎖となるマイナス鎖 RNA を合成し、それを鋳型にゲノム RNA を合成する。この過程には宿主細胞内の膜構造が関わっていることが知られている。

タバコモザイクウイルス (TMV) は、プラス鎖 RNA ウイルスの一種であり、ウイルス粒子は一種類の外被タンパク質と一本鎖ゲノム RNA からなる。TMV の RNA ゲノムは、130K タンパク質とその終止コドンのリードスルーにより合成される 180K タンパク質、ウイルス細胞間移行に関与する 30K タンパク質、そして外被タンパク質の 4 つのタンパク質をコードする。TMV RNA の複製も他のプラス鎖 RNA ウイルス同様、細胞内膜上で行なわれると考えられる。しかしながら、複製に関わる 2 つのウイルスタンパク質 (130K/180K 複製タンパク質) は、そのアミノ酸配列から膜タンパク質ではないと推定され、したがって TMV RNA 複製複合体がどのように膜へ結合しているのかは明らかでなかった。

本研究室では、TMV の増殖が低く抑えられるシロイヌナズナ突然変異株を用いた遺伝学的手法によりこれまでに、TMV RNA の複製に関与すると考えられる 3 つの膜タンパク質 (TOM1, TOM2A, TOM3) が同定された。これらはいずれも、細胞内において TMV RNA の複製を助けるような機能をもつ宿主因子であると考えられる。また、タバコやトマトにも、TOM1, TOM2A, TOM3 のホモログが存在することが明らかになり、それぞれクローニングされている。予測されるアミノ酸配列から、TOM1 と TOM3 は非常に類似性が高く、どちらも 7 回膜貫通型、そして TOM2A は 4 回膜貫通型のタンパク質であると考えられる。これまでに、酵母を用いた解析により、TOM1 および TOM3 は、TMV がコードする 130K/180K 複製タンパク質の RNA ヘリケース様ドメインと相互作用すること、そして TOM1 と TOM2A

が相互作用することが示唆されている。以上のことを踏まえると、TOM1, TOM2A, TOM3 宿主因子は、TMV の増殖過程において、TMV RNA 複製複合体構成因子を複製の場である膜上につなぎ止めるアンカーとして機能している可能性が考えられる。

本研究は、宿主因子 TOM1, TOM2A, TOM3 の細胞内局在性、そして TMV 130K/180K 複製タンパク質の局在との関連性を解明することにより、TOM タンパク質の機能を探ることを目的とする。そのためにまず、オワンクラゲ由来の green fluorescent protein あるいはその変異体をレポーターとして用いることにより、植物細胞内での TOM タンパク質の局在を解析した。これは生細胞を用いた方法であるため、細胞が本来の膜構造を保持した状態で局在を解析できるという利点をもつ一方で、TOM タンパク質とレポーターとを融合させることによる局在への影響を否定できない。この問題をのり越えるために、イオディキサノールを媒体として細胞内の膜を浮遊密度の違いにより分画し、抗 TOM1, 抗 TOM2A 抗体などの各種抗体を用いて、TOM タンパク質や TMV にコードされる 130K/180K 複製タンパク質の分画パターンを解析した。さらに、それぞれの画分が含む TMV RNA 合成活性を解析した。これにより、タンパク質が本来の構造を保ったままで細胞内のどの膜に局在するのか、そして TMV RNA 複製複合体の局在と TOM タンパク質の関係を明らかにできる。

TOM とレポーターの融合タンパク質を植物細胞内で一過的に発現させ、共焦点レーザー顕微鏡により解析した結果、TOM1 および TOM2A は液胞膜と思われる膜構造体に、そして TOM3 はゴルジ体に局在した。また、タバコ BY-2 培養細胞を形質転換することにより、これら融合タンパク質を BY-2 細胞内で恒常的に発現させた結果、TOM1, TOM2A, TOM3 はいずれも液胞膜と思われる膜構造体に局在した。TOM1 および TOM2A は、液胞膜を染色する蛍光マーカーと共局在したことから、どちらも液胞膜に局在する膜タンパク質であることが示された。すなわち、一過的発現系および形質転換 BY-2 細胞を用いた解析のどちらにおいても、TOM1 と TOM2A が液胞膜タンパク質である可能性が示された。

イオディキサノール密度勾配遠心法を用いて植物細胞内の膜を分画し、各種抗体を用いて解析した結果、TOM1, TOM2A, そしてタバコ TOM ホモログ (NtTOM1, NtTOM2A) はいずれも液胞膜に富む画分に多く存在した。さらに TOM1 および NtTOM1 は、小胞体やゴルジ体を多く含む画分にも比較的多く検出された。また、TMV 感染 BY-2 細胞を同様に解析した結果、TMV の 130K/180K 複製タンパク質は、可溶性タンパク質に富む画分に最も多く検出されたものの、膜画分内に存在するものに関しては、液胞膜画分と小胞体などを含む画分に多く検出された。つまり、膜画分内における 130K/180K 複製タンパク質の分画パターンは、NtTOM1 のパターンと似ていた。さらに、各画分に含まれる TMV の RNA 依存 RNA ポリメラーゼ活性を調べた結果、活性の分布パターンは NtTOM1 のものと似ていた。130K/180K 複製タンパク質が最も多く含まれた可溶性タンパク質画分には、RNA ポリメラーゼ活性は検出されなかった。

レポーターとの融合タンパク質を用いた顕微鏡解析、そして細胞分画法を用いた解析により、1) TOM1 および TOM2A は主に液胞膜に局在するタンパク質であり、また TOM1 は液胞膜とは異なる膜にも局在すること、2) 少なくとも TOM1 が存在する画分に、活性を有する TMV RNA 複製複合体も存在すること、の二点が示された。これは、少なくとも TOM1 が、TMV RNA 複製複合体を膜につなぎ止めるアンカーとしての役割をもつ、という可能性を強く示唆するものである。

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 伴 戸 久 徳

学 位 論 文 題 名

Tobacco mosaic virus の複製に關与する宿主およびウイルス タンパク質の細胞内局在性に関する研究

Tobacco mosaic virus (TMV) はプラス鎖 RNA ウイルスの一種であり、ゲノム上には複製に關与する2つの非構造蛋白質、130K, 180K タンパク質(複製タンパク質)をコードする。TMV RNA の複製は他のプラス鎖 RNA ウイルス同様、細胞内膜上で行なわれると考えられる。しかしながら、TMV の複製タンパク質は、そのアミノ酸配列から膜タンパク質ではないと推定された。一方、シロイヌナズナを用いた遺伝学的手法により、TMV RNA の複製をサポートすると考えられる宿主膜タンパク質、TOM1, TOM2A が同定された。これまでの解析により、TOM1 は TMV 複製タンパク質と相互作用すること、そして TOM1 と TOM2A が相互作用することが示唆されている。以上のことを踏まえると、TOM1, TOM2A 宿主因子は、TMV の増殖過程において TMV RNA 複製複合体構成因子を複製の場である膜上につなぎ止めるアンカーとして機能している可能性が考えられた。本研究は、宿主因子 TOM1, TOM2 の細胞内局在性、そして TMV 複製タンパク質の局在との関連性を解明することにより、TOM タンパク質の機能を探ることを目的とした。本論文の内容は以下のように要約される。

1、Green fluorescent protein (GFP) を用いた細胞内局在解析：GFP を用いて植物細胞内での TOM タンパク質の局在を解析した。これは生細胞を用いた方法であるため、細胞が本来の膜構造を保持した状態で局在を解析できるという利点をもつ。共焦点レーザー顕微鏡により解析した結果、TOM と GFP の融合タンパク質は、植物細胞内で一過的に発現させた場合も、タバコ BY-2 培養細胞を形質転換することにより恒常的に発現させた場合も、液胞膜と思われる膜構造体に局在することが明らかになった。さらに、TOM1-GFP

および GFP-TOM2A は、液胞膜を染色する蛍光マーカーと共局在したことから、どちらも液胞膜に局在する膜タンパク質であることが示唆された。

2、細胞分画法を用いた解析： TOM タンパク質に GFP を融合させると局在が変化する可能性は否定できない。この問題を解決するために、細胞内の膜を浮遊密度の違いにより分画し、TOM タンパク質ならびに TMV 複製タンパク質の分画パターンを解析した。その結果、TOM1-GFP、GFP-TOM2A、そしてタバコ TOM ホモログ (NtTOM1, NtTOM2A) はいずれも液胞膜に富む画分に多く存在することが明らかになった。さらに TOM1-GFP および NtTOM1 は、小胞体やゴルジ体を多く含む画分にも比較的多く検出された。また、TMV 感染 BY-2 細胞を同様に解析した結果、TMV 複製タンパク質は、膜画分内に存在するものに関しては NtTOM1 と同様の分画パターンを示した。さらに、TMV の RNA 依存 RNA ポリメラーゼ活性の分布パターンも NtTOM1 のものと似ていた。一方、TMV 複製タンパク質が最も多く含まれた可溶性タンパク質画分には RNA ポリメラーゼ活性は検出されなかった。このことから、TMV 複製タンパク質は TOM1 を介して膜に結合することによりはじめて活性をもつようになる可能性が示唆された。

以上、本論文により TOM1 が TMV RNA 複製複合体を膜につなぎ止めるアンカーとしての役割をもつ可能性が強く示唆された。また、TMV が液胞膜上で複製することは以前には知られておらず、TMV の複製機構を知る上で重要な進展がもたらされた。TOM 蛋白質の細胞内局在性が明らかになったことにより、これら蛋白質の宿主機構解明の手がかりも得られた。よって審査員一同は、萩原優香が博士（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。