

トバモウイルス RNA 複製複合体形成機構の生化学的研究

学位論文内容の要旨

プラス鎖 RNA ウイルスに属するトバモウイルスは、植物細胞内に侵入すると、脱外被して細胞質中にゲノム RNA を放出する。ゲノム RNA は細胞内で mRNA として機能し、ウイルスゲノム RNA の複製に必須な 130 kDa, 180 kDa のタンパク質(以下、複製タンパク質と呼ぶ)が翻訳される。翻訳された複製タンパク質はゲノム RNA とともに、生体膜上に複製複合体と呼ばれる構造体を形成し、その内部においてゲノム RNA から相補的なマイナス鎖 RNA を合成して、さらにマイナス鎖 RNA を鋳型として子孫ゲノム RNA を多量に複製する。これらの過程は一見単純なようだが、鋳型選択のメカニズムや RNA 複製に関与する宿主因子の実体など未解明な部分が多い。

これまでに、ウイルス感染細胞内で既に形成された複製複合体の単離・精製、およびその性状に関する報告が数多くなされてきた。しかし、感染細胞を用いた実験では、ウイルス複製サイクルが繰り返されなければ解析可能な量の複製複合体が蓄積されないため、ウイルス複製サイクルの中の一過程に焦点を絞った解析は困難であった。そこで本研究では、トバモウイルスに属するトマトモザイクウイルス (*Tomato mosaic virus: ToMV*) のゲノム RNA を試験管内で翻訳・複製させる系の確立を目指した。材料としては、ToMV の宿主である BY-2 タバコ培養細胞を用いた。植物細胞の体積の大部分は液胞によって占められており、単に細胞を破碎しただけでは液胞内に含まれる RNase やプロテアーゼが抽出液中に混入してしまう。そこで、BY-2 プロトプラストをパーコールと呼ばれるシリカゾル溶液中で遠心することで、液胞を除去する技術を利用した。得られた脱液胞化プロトプラストを破碎し、低速遠心により核や未破碎細胞を除去して、目的の脱液胞化 BY-2 プロトプラスト抽出液 (BYL) を調製した。BYL を用いて ToMV ゲノム RNA を翻訳したところ、市販の試験管内翻訳用小麦胚芽抽出液を用いた場合と同程度に、130-kDa, 180-kDa タンパク質が翻訳された。さらに、翻訳後の反応液に RNA 合成基質を添加したところ、生体内と非常によく似たパターンでウイルス RNA が合成された。以上より、ToMV 複製複合体が試験管内で新規に形成されたことが示された。

次に、この試験管内系を用いて、ToMV 複製複合体が生体膜上に形成される過程について解析した。遠心操作により BYL から生体膜を除去した抽出液 (membrane-depleted BYL: mdBYL) を用いて ToMV RNA を翻訳したところ、130-kDa, 180-kDa タンパク質が BYL 反応液を用いた場合と同程度に合成された。しかし、RNA 合成基質を添加してもマイナス鎖 RNA の合成は起こらなかった。ところが、翻訳後反応液を生体膜成分とインキュベートすると、

RNA 合成基質の添加により ToMV のマイナス鎖、プラス鎖 RNA が合成された。つまり生体膜の除去と再添加により、ToMV ゲノム RNA の翻訳過程と複製過程を実験的に分離することが可能となった。また、ToMV 複製タンパク質が生体膜と結合していない条件下では、マイナス鎖 RNA が合成されないように非常に厳密に制御されていることが示唆された。二本鎖 RNA は、RNA サイレンシングなどのウイルス防御機構の引き金となることが知られており、生体膜上により細胞質から隔離された複製複合体の内部でのみマイナス鎖 RNA が合成されると推測される。

ToMV RNA を翻訳した mdBYL 反応液中には、複製複合体が生体膜に形成される前段階の複合体が蓄積していると推測されたため、ToMV RNA 翻訳後の mdBYL 反応液をショ糖密度勾配遠心解析に供した。遠心後、複製タンパク質は 40 S 以下と、約 70 S の少なくとも 2 種類の沈降係数を示した。各画分に生体膜成分を添加したところ、約 70 S の画分にはのみ RNA 合成活性が検出された。よってこの画分には、複製複合体の構成因子が生体膜以外すべて含まれていると示唆された。次に、同一画分に分画された複製タンパク質とゲノム RNA が一つの複合体を形成しているのか解析するため、FLAG タグ融合 180-kDa タンパク質をコードする ToMV RNA を mdBYL 反応液で翻訳し、当該画分からアフィニティー精製を行った。その結果、FLAG タグ融合 180-kDa タンパク質と共に、もう一方の複製タンパク質である 130-kDa タンパク質と ToMV ゲノム RNA が共精製された。したがって、少なくとも 130-kDa, 180-kDa 複製タンパク質とゲノム RNA が一つの複合体に含まれていることが明らかとなり、以後この複合体を複製複合体の前駆体 (pre-membrane targeting complex: PMTC) と呼ぶことにした。

一方、40 S 以下の沈降係数を示した複製タンパク質は PMTC を形成していないと思われた。この複製タンパク質に、複製複合体形成に必要と思われる ToMV ゲノム RNA および生体膜などの BYL 成分などを、翻訳阻害剤であるピューロマイシン存在下で添加しても、ウイルス RNA 合成活性が検出されなかった。つまり、ToMV 複製複合体の構成因子を単に試験管内で混合しただけでは複製複合体が形成されず、PMTC の形成過程において翻訳反応と共役して起こる段階があると推測された。次に、PMTC 形成における各複製タンパク質の役割を解析するため、130-kDa, 180-kDa タンパク質を個別に発現するような ToMV RNA を用いて解析をおこなった結果、まずゲノム RNA と 130-kDa タンパク質が翻訳反応依存的に結合して複合体を形成し、その後から 180K タンパク質が翻訳反応と共役せずに相互作用することで、PMTC が形成されることが示唆された。130-kDa, 180-kDa タンパク質が同一のゲノム RNA から翻訳される野生型 ToMV でも同様の形成過程を経ていると考えられ、まず合成量の多い 130K タンパク質が翻訳反応依存的にゲノム RNA と結合し、次いで 180-kDa タンパク質が結合して PMTC が形成されると予想された。宿主の mRNA など細胞に多量に存在する RNA 分子の中から、ウイルス自身のゲノム RNA を選択するためには、複製タンパク質が翻訳されながら直近のゲノム RNA と結合する様式が最も合理的であると推測される。

以上のように本研究を通じて、BYL を用いた新規ウイルス RNA 試験管内翻訳・複製系により、ToMV 複製複合体形成機構の一端を解明することができた。

学位論文審査の要旨

主査 教授 内藤 哲
副査 教授 伴戸 久徳
副査 教授 上田 一郎
副査 上級研究員 石川 雅之

((独) 農業生物資源研究所・植物科学研究領域)

学位論文題名

トバモウイルス RNA 複製複合体形成機構の生化学的研究

本論文は、和文 33 頁、13 図からなり、参考論文 3 編が添付されている。

プラス鎖 RNA ウイルスに属するトバモウイルスは、植物細胞内に侵入すると、外被タンパク質が外れ、ゲノム RNA を細胞質に放出する。ゲノム RNA は細胞内で mRNA として機能し、ウイルスゲノム RNA の複製に必須な 130 kDa, 180 kDa のタンパク質 (以下、「複製タンパク質」) が翻訳される。翻訳された複製タンパク質はゲノム RNA とともに、生体膜上に複製複合体と呼ばれる構造体を形成し、ゲノム RNA から相補的なマイナス鎖 RNA を合成して、さらにマイナス鎖 RNA を鋳型として子孫ゲノム RNA を多量に複製する。これらの過程に関しては、鋳型選択のメカニズムや RNA 複製に関与する宿主因子の実体など未解明な部分が多い。従来、複製複合体に関する研究は、ウイルス感染細胞内で既に形成された複製複合体の単離・精製によるものであった。しかしながら、感染細胞を用いた実験では、ウイルス複製サイクルが繰り返されなければ解析可能な量の複製複合体が蓄積されないため、ウイルス複製サイクルの中の一過程に焦点を絞った解析は困難であった。

本論文は、トバモウイルスに属するトマトモザイクウイルス (ToMV) のゲノム RNA を試験管内で翻訳・複製させる系を確立し、生体膜上に複製複合体が形成される過程の分子的解剖を行ったものである。論文の内容は以下のように要約される。

試験管内翻訳・複製系を構築する材料として、ToMV の宿主である BY-2 タバコ培養細胞を用いた。植物細胞の体積の大部分は液胞によって占められており、単に細胞を破碎しただけでは液胞内に含まれる各種の分解酵素が抽出液に混入する。そこで、BY-2 プロトプラストをパーコール溶液中で遠心することで、液胞を除去する技術を利用した。得られた脱液胞化プロトプラストを破碎し、核およびその他の夾雑物を除去して、脱液胞化 BY-2 プロトプラスト抽出液 (BYL) を調製した。BYL を用いて ToMV ゲノム RNA を翻訳したところ、市販の小麦胚芽抽出液と同程度に複製タンパク質が翻訳された。さらに、翻訳後の反応液に RNA 合成基質を添加したところ、感染細胞内と非常によ

く似たパターンでウイルス RNA が合成された。以上により、ToMV 複製複合体を試験管内で新規に形成させる実験系が構築された。

この試験管内翻訳・複製系を用いて、ToMV 複製複合体が生体膜上に形成される過程を解析した。遠心操作により BYL から生体膜を除去した抽出液 (membrane-depleted BYL: mdBYL) では複製タンパク質は翻訳されるが、マイナス鎖 RNA の合成活性は認められなかった。ところが、翻訳後の反応液を生体膜成分とインキュベートすることにより ToMV のマイナス鎖、プラス鎖 RNA 合成活性が回復した。つまり生体膜の除去と再添加により、ToMV ゲノム RNA の翻訳過程と複製過程を実験的に分離することが可能となった。

ToMV RNA を翻訳した mdBYL 反応液中には、複製複合体が生体膜に形成される前段階の複合体が蓄積していると推測された。そこで、ToMV RNA 翻訳後の mdBYL 反応液をショ糖密度勾配遠心解析に供したところ、複製タンパク質は沈降計数 40S 以下と、約 70S の少なくとも2つの画分に分離された。各画分に生体膜成分を添加したところ、約 70S の画分のみ RNA 合成活性が検出されたことから、この画分には生体膜以外の複製複合体の構成因子がすべて含まれていると示唆された。タグ付き 180-kDa タンパク質を用いたアフィニティー精製実験により、この画分では 180-kDa、130-kDa の両複製タンパク質と ToMV ゲノム RNA が一つの複合体を形成していることが示された。この複合体を複製複合体前駆体 (pre-membrane targeting complex: PMTC) と名付けた。一方、40S 以下の沈降係数を示した複製タンパク質は PMTC を形成していないと考えられ、ToMV ゲノム RNA および生体膜などの BYL 成分を添加しても、ウイルス RNA 合成活性は検出されなかった。つまり、ToMV 複製複合体の構成因子を単に試験管内で混合しただけでは複製複合体は形成されず、PMTC の形成過程において翻訳反応と共役して起こる段階があることが示唆された。

次に、130-kDa、180-kDa タンパク質を個別に発現するような ToMV RNA を用いて解析をおこなった結果、まずゲノム RNA と 130-kDa タンパク質が翻訳反応依存的に結合して複合体を形成し、その後から 180-kDa タンパク質が翻訳反応と共役せずに相互作用することで、PMTC が形成されることが示唆された。野生型 ToMV でも同様の形成過程を経ていると考えられ、まず合成量の多い 130-kDa タンパク質が翻訳反応依存的にゲノム RNA と結合し、次いで 180-kDa タンパク質が結合して PMTC が形成されると予想された。宿主の mRNA など細胞に多量に存在する RNA 分子の中から、ウイルス自身のゲノム RNA を選択するためには、複製タンパク質が翻訳と共役してゲノム RNA と結合する様式は合理的である。

本研究により確立された BYL を用いたウイルス RNA 試験管内翻訳・複製系は、RNA ウイルスの複製機構の研究に新たな方法論を導入するものであり、学術的に高く評価できる。よって審査員一同は、薦田圭介が博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。