

キュウリモザイクウイルス2bタンパク質の大量発現系の 開発および機能解析

学位論文内容の要旨

1) キュウリモザイクウイルス（CMV）2b タンパク質（2b）の大量発現系の開発

生化学的にタンパク質の機能解析を行う場合、目的タンパク質が大腸菌により可溶性の状態で大량に合成される必要がある。これは、可溶性のタンパク質が適切にフォールディングされ、正しく機能する状態にあると考えられるためである。本研究で用いる CMV の 2b は、植物とウイルスの相互作用に様々な役割をもつ多機能タンパク質である。しかしながら、サブグループ I の CMV の 2b は大腸菌に毒性を示すために大量発現が困難であり、わずかに得られる 2b も不溶性であることから生化学的解析が容易でなかった。詳細な 2b の機能解析のためには可溶性の 2b を大量に発現させる系が必要である。そこで本研究ではまず、2b が大腸菌毒性を示す要因を明らかにし、2b の大量発現系の確立を試みた。

CMV の黄斑系統である CMV-Y の 2b (Y2b) は Maltose Binding Protein (MBP) との融合タンパク質 (MBP-Y2b) として大腸菌で発現させると、大腸菌の増殖を抑制し、MBP-Y2b はほとんど発現しなかった。一方、日本の食用ユリから単離された HL-CMV の 2b (HL2b) は同様に MBP-HL2b として発現させても大腸菌の増殖を抑制せず、可溶性の状態が発現させることができた。2 つの 2b のアミノ酸配列を比較したところ、これらのアミノ酸は 94% と高い同一性を示し、異なるアミノ酸は 7 つしか存在しなかった。そこで、これらの異なるアミノ酸に基づいた様々な Y2b と HL2b のキメラ変異体を作製し、それらの大腸菌毒性や大腸菌発現レベルを比較したところ、Y2b の大腸菌毒性には 104 番目のアミノ酸が関与することが分かった。2b の 104 番目のアミノ酸は、Y2b ではグルタミン酸（酸性アミノ酸）であり、HL2b ではリジン（塩基性アミノ酸）であったため、104 番目のアミノ酸の電荷と大腸菌毒性の関係を調べた。この結果、104 番目のアミノ酸の負電荷が 2b の大腸菌毒性を決定することが分かった。また、大腸菌で大量に発現するようになった 2b の可溶性を評価したが、MBP-HL2b ほど可溶性画分の割合が高いものではなく、2b の大腸菌毒性と可溶性は直接関係しなかった。さらに、2b は CMV の病徴誘導に影響し RNAサイレンシングサプレッサー (RSS) としても働くため、CMV の病原性に対する影響を調べたところ、2b の大腸菌毒性の有無はタバコでの病徴、CP や 2b の蓄積、RSS 活性には直接は影響しなかった。

2) CMV の 2b の機能解析

【2b の DNA 結合能】

Y2b の C 末端側は転写因子に重要なアミノ酸を含むことが分かっていたが、2b と DNA が直接結合するかを示した研究はなかった。これまでの大腸菌毒性の実験から、毒性に関わる領域と転写活性部位が同じであることが分かったため、2b は大腸菌の DNA と結合して転写を阻害し、毒性を示している可能性が考えられた。大腸菌の DNA と結合するのであれば、植物細胞中でも DNA と結合するという 2b の新たな

作用点を発見できる可能性がある。そこで、Dynabeads M-280 Streptavidin を用いた DNAP assay を行い、2b が DNA と結合するか調べたところ、大腸菌毒性を示した 2b は dsDNA にも ssDNA にも結合し、さらに 104 番目のアミノ酸の電荷は 2b の DNA 結合能にも重要であることが明らかとなった。CMV の 2b は N 端側の正電荷を持つアミノ酸領域で dsRNA に結合するため、DNA とも N 端側で結合するかどうかを調べた。その結果、2b は dsRNA と同じ N 端側で DNA と結合し、dsRNA とは異なり DNA との結合には C 端側の 104 番目のアミノ酸の電荷が影響することが示された。CMV 感染時、2b は宿主細胞の核内や核上に蓄積すること、また、Y2b と *Arabidopsis thaliana* の核 DNA はゲノム規模で相互作用することが知られている。従って、2b の DNA 結合能には重要な生物学的意義があると考えられ、宿主植物細胞の核に蓄積した 2b が特定の DNA 配列を認識して遺伝子発現を制御する可能性も考えられる。そこで、DNAP assay を応用した SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) を行ったところ、2b が結合しやすい複数の配列を得たが、CMV 感染との関係が推測できるような遺伝子は特定できなかった。

【2b のリン酸化修飾】

Y2b は酵母で発現したときに転写を促進することが分かっており、植物細胞内では核に局在する。動物細胞内で働く転写因子である IRF2BP2 は、核移行シグナル (NLS) に隣接するセリン (S) のリン酸化によって核に局在することが示されている。CMV の 2b がもつ NLS の近傍にもリン酸化が予測されるアミノ酸が存在することから、2b においてもリン酸化が核移行やそれに関連する様々な機能に影響する可能性がある。そこで、大腸菌で十分量発現し、CMV 感染植物細胞内で可溶性画分に蓄積できる Y2b 変異体を用いて *in vitro* および *in vivo* のリン酸化修飾解析を行った。

In vitro リン酸化 assay の結果、大腸菌で最もよく発現した HL2b や、CMV 感染葉で可溶性になる m1 (N 端側が Y2b に由来し C 端側が HL2b に由来する 2b 変異体) は *in vitro* でリン酸化されることが明らかとなった。さらに、TALON PMAC Phosphoprotein Enrichment Kit (Clontech) を用いてリン酸化修飾解析を行ったところ、m1 は *in vivo* でもリン酸化されることが示された。2b 末端欠失変異体を用いた *in vitro* リン酸化 assay の結果、Y2b は N 端側 46 番目までのアミノ酸領域でリン酸化され、さらにアラニン置換による比較実験から 28 番目の S がリン酸化されることが明らかとなった。2b の 28 番目の S は 1 つ目の NLS と隣接して 2 つの NLS の間に存在するため、そのリン酸化は IRF2BP2 と同様に核移行に影響する可能性が高い。そこで、2b と GFP の融合タンパク質を発現させてリン酸化による核局在への影響を調べたところ、通常の NLS をもつ 2b でも、28 番目のアミノ酸がリン酸化されない場合には核移行できないことが明らかとなった。RNA サイレncing はウイルス感染に対する宿主の防御機構であり、short-interfering RNA (siRNA) の発生や AGO1、AGO4 のようなスライサータンパク質が関与している。ウイルスは RSS によってこの機構に対抗しており、CMV の 2b は siRNA や AGO と結合することで RSS として機能する。CMV 感染時に大部分の 2b は宿主細胞の核内や核上に蓄積するが、その役割はこれまで明らかになっていなかった。28 番目の S におけるリン酸化／脱リン酸化によって 2b が核へ局在したり、あるいは細胞質へ局在したりすることから、リン酸化修飾は 2b の細胞内局在 (核内や核上／細胞質) を通じて 2b の様々な役割を切り替えるスイッチの 1 つとして機能している可能性が考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 増 田 税
副 査 教 授 上 田 一 郎
副 査 助 教 志 村 華 子

学 位 論 文 題 名

キュウリモザイクウイルス2bタンパク質の大量発現系の 開発および機能解析

本研究で用いたキュウリモザイクウイルス (CMV) 2b タンパク質 (2b) は、植物とウイルスの相互作用に様々な役割をもつ多機能タンパク質であるが、サブグループ I の CMV の 2b は大腸菌に毒性を示して大量発現させることができず生化学的解析が困難であった。そこで、2b の大腸菌での大量発現系を開発し、その機能について分子レベルでの解析を行った。以下に主要な研究成果について要約する。

1) キュウリモザイクウイルス (CMV) 2b タンパク質 (2b) の大量発現系の開発

黄斑系統である CMV-Y の 2b (Y2b) は Maltose Binding Protein (MBP) との融合タンパク質 (MBP-Y2b) として大腸菌で発現を誘導すると、大腸菌の増殖を抑制してほとんど発現しなかった。一方、日本の食用ユリから単離された HL-CMV の 2b (HL2b) は MBP-HL2b として発現を誘導しても大腸菌の増殖を抑制せず、よく発現した。2 つの 2b のアミノ酸配列は 94% と高い相同性を示し、異なるアミノ酸は 7 つしか存在しなかった。そこで、Y2b と HL2b のキメラ変異体を作製し、大腸菌毒性や大腸菌発現レベルを比較したところ、Y2b の大腸菌毒性は 104 番目のアミノ酸により決定されていた。Y2b と HL2b の 104 番目のアミノ酸は大きく電荷が異なっていたため、2b の 104 番目のアミノ酸の電荷と大腸菌毒性の関係を調べた。この結果、104 番目のアミノ酸の負電荷が 2b の大腸菌毒性を決定することが分かった。2b は CMV の病徴誘導に影響し RNA サイレンシングサブプレッサー (RSS) としても働くため、CMV の病原性に対する影響を調べたが、2b の大腸菌毒性の有無はタバコでの病徴、CP や 2b の蓄積、RSS 活性には影響しなかった。

2) CMV の 2b の機能解析

【2b の DNA 結合能】

Y2b の大腸菌毒性を決定する領域と酵母での転写活性部位が同じであったため、2b が大腸菌の DNA と直接結合する可能性が考えられた。そこで、Dynabeads M-280 Streptavidin を用いた DNAP assay を行い、2b の DNA 結合能を調べた。この結果、大腸菌毒性を示した 2b は DNA 結合能を示し、104 番目のアミノ酸の電荷は 2b の DNA 結合能にも重要であること、および、この DNA 結合ドメインは N 末端領域に

存在し、C 端側の 104 番目のアミノ酸の電荷に影響されることも明らかとなった。さらに、2b が配列選択性を持って DNA に結合するのかを明らかにするため、DNAP assay を応用した SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) を行ったところ、2b が結合しやすい複数の配列を得たが、CMV 感染との関係が推測できるような遺伝子は特定されていない。

【2b のリン酸化修飾】

Y2b は酵母で転写を活性化させ、植物細胞内では核に局在するタンパク質である。動物細胞内で働く転写因子である IRF2BP2 は、核移行シグナル (NLS) に隣接するセリン (S) のリン酸化によって核に局在することが示されている。CMV の 2b でも 28 番目の S が NLS に隣接していることから、リン酸化が 2b の核移行に影響する可能性が考えられた。そこで、大腸菌で十分量発現し、CMV 感染植物細胞内で可溶性画分に蓄積できる Y2b 変異体を用いてリン酸化修飾解析を行った。

In vitro リン酸化 assay および TALON PMAC Phosphoprotein Enrichment Kit (Clontech) を用いた *in vivo* でのリン酸化修飾解析の結果、Y2b 変異体は *in vitro* でも *in vivo* でもリン酸化された。さらに、2b 末端欠失変異体やアラニン置換変異体を用いた *in vitro* リン酸化 assay の結果、Y2b の 28 番目の S がリン酸化されることが明らかとなった。IRF2BP2 同様、2b の 28 番目の S のリン酸化は核移行に影響する可能性が高いため、2b と GFP の融合タンパク質を発現させて細胞内局在を調べた。この結果、通常の NLS をもつ 2b であっても 28 番目をアラニンに置換すると核に移行できなくなった。CMV の 2b は細胞質では RSS として働き、核内では TGS を誘導すると考えられている。従って、28 番目の S におけるリン酸化修飾には、2b の細胞内局在の変化（核内や核上と細胞質）を通じて 2b の役割を切り替える機能があると考えられる。

よって、審査員一同は、末田香恵氏が博士（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。