

論文内容の要旨

生産・環境生物学専攻

平成8年度博士課程入学

氏 名 清水 巧

指導教官 日比 忠明

論文題目 タバコモザイクウイルスの複製・移行に関する
宿主タンパク質の構造と機能に関する研究

植物ウイルスの研究においては、すでに1995年頃に代表的なウイルス種ほぼすべての全ゲノム配列が明らかになり、ポストゲノム時代を迎えた。これにより、ウイルスの遺伝子構造からそのコードするタンパク質の機能を予測したり、また、遺伝子工学的に種々の変異や欠失を導入したウイルス cDNA あるいはそのトランスクリプトを宿主植物に感染させることによって、ウイルスタンパク質の構造と機能との関係を詳細に解析することが可能になった。一方、ウイルスゲノムには限られた遺伝情報しかコードされておらず、ウイルスはその複製あるいは細胞間移行のために宿主の多数の因子を流用していると考えられている。従って、ウイルスタンパク質と相互作用する宿主植物のタンパク質を単離・同定して、その構造と機能を解析する研究は非常に重要である。しかしながら、宿主ゲノムがコードするタンパク質はウイルスタンパク質に比べて桁違いに多種であるために、そのような知見は、きわめて乏しい現状にある。そこで本研究では、タバコモザイクウイルス (TMV) の複製・移行に関する宿主タンパク質の構造と機能を解明することを目的として、各種の分子生物学的な解析を行った。得られた結果の概要は以下の通りである。

1. TMV RNA 複製酵素のヘテロダイマー形成に対するアルギニンデカルボキシラーゼの阻害作用

TMV RNA複製酵素のアポ酵素はTMVゲノム由来の126Kタンパク質と183Kタンパク質とのヘテロダイマーで構成されており、これにさらにいくつかの宿主タンパク質が結合することによって活性のあるホロ酵素が形成されると考えられている。このヘテロダイマーの形成には、両タンパク質のヘリカーゼ(H)ドメインとInH領域(Internal領域後半からHドメインN末端部分)が関与することが示されている。一方、本研究室において、酵母two-hybrid法によりHドメインと特異的に相互作用する宿主因子のひとつとしてアルギニンデカルボキシラーゼ(ADC)がタバコcDNAライブラリーから単離された。そこで、最初に、ファウエスタン法により*in vitro*条件下におけるADCとHドメイン間の特異的結合を再確認した。次いで、ADCとTMV RNA複製酵素との関係を明らかにするため、HドメインとInH領域間の結合に対するADCの作用について、酵母three-hybrid法を用いて解析を行った。その結果、ADCはこの結合を強く阻害することが示された。以上から、ADCは宿主の防御分子のひとつとしてTMV RNA複製酵素のヘテロダイマー形成を阻害するが、一方、感染細胞内では過剰な126Kタンパク質が生産されることから、TMVはADC分子をこれに引きつけることによって宿主の防御反応に対抗しているのではないかというひとつの仮説を導いた。

2. TMV移行タンパク質と結合する宿主タンパク質

1) アフィニティークロマトグラフィーによるTMV感染葉からの移行タンパク質の精製と

これと結合する宿主タンパク質の検出

TMVの移行タンパク質(MP)と結合する宿主タンパク質を探索するため、まずはじめに、大腸菌で大量発現させたTMV MPを精製し、これを抗原としてポリクローナル抗体を得た。次に、この抗体を用いてTMV感染タバコ葉における移行タンパク質の蓄積についてウェスタン分析を行ったところ、ウイルス接種3~5日後をピークにして、その後、時間の経過と共に減少することが示された。このことから、感染細胞におけるMPの蓄積は一過的であり、また、MPが非常に不安定なタンパク質であると推測された。そこで、この接種3~5日後の感染葉より膜成分を抽出し、これを界面活性剤CHAPSで処理してMPを可溶化させた後、上記の抗体を担体に結合させたカラムを用いて、MPおよびこれと挙動をともにする宿主タンパク質の精製を試みたが、特異的な宿主タンパク質を検出することはできなかった。しかし、大腸菌で発現・精製したグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)融合MPを用いてファウエスタン解析を行った

結果、感染葉から抽出した可溶化画分中にMPと特異的に結合する微量の宿主タンパク質が存在することが示された。そこで、二次元電気泳動法によりこの宿主タンパク質の精製を試みたが、このタンパク質が微量かつ不安定でその精製がきわめて困難であったため、結局、本法によるアプローチを断念した。

2) 酵母 two-hybrid 法による TMV MP 結合宿主タンパク質の探索と同定

そこで、酵母 two-hybrid 法を用いて MP と結合する宿主タンパク質のスクリーニングを行った。その結果、3種の DnaJ 様タンパク質 (NtDnaJ-t1、NtDnaJ-t2、NtDnaJ-t3) を含むクローンが単離された。オリジナルの bait プラスミド pBD-MP、コントロール用 bait プラスミド、および空ベクターを用いて結合の特異性を検定した結果、この3種のうち NtDnaJ-t3 のみが陽性クローンであることが示された。さらに、大腸菌で発現・精製した NtDnaJ-t3 タンパク質と MP との結合をファーウェスタン解析した結果、酵母内で示された両タンパク質相互間の結合が確認された。この NtDnaJ-t3 をコードする遺伝子はタバコでは未報告の新規遺伝子で、5'-RACE 法により完全長 cDNA の塩基配列を決定した結果、全長 1,994 塩基からなるひとつの ORF (推定 442 アミノ酸) をコードしていた。モチーフサーチの結果、NtDnaJ-t3 は典型的な DnaJ タンパク質であり、N 末端側より、J ドメイン、Gly/Phe rich ドメイン、Cys rich ドメイン、推定基質結合部位が、順に配置されていた。次いで、TMV MP について部分欠失クローンを作製し、酵母 two-hybrid 法により NtDnaJ-t3 との結合部位を調べた結果、MP 分子内の 2 カ所で結合することが明らかになり、その領域は、それぞれ、MP のフォールディングに必要な領域と、細胞間移行に関わる領域とに一致することが示された。

一般に、大腸菌の DnaJ や真核生物の DnaJ 様タンパク質 HSP40 は、通常、DnaK あるいは DnaK 様タンパク質 HSP70 のコシャペロンとして機能することが知られている。一方、HSP70 はタンパク質のフォールディング、輸送、複合体の会合と解離、変性タンパク質の修復や分解など、タンパク質の一生のあらゆる局面に関与していることが知られている。また、クロステロウイルス属のウイルスは HSP70 のホモログを自身のゲノムにコードしており、これが移行機能に深く関与していることが知られている。TMV MP はこのような HSP70 との相同領域は有していないことから、MP をフォールディングし、細胞間移行に至る過程において、本実験で得られた NtDnaJ-t3 とともに、これと結合する宿主 HSP70 分子シャペロン系が関与しているという可能性が推測された。

3) 酵母 two-hybrid 法による NtDnaJ-t3 結合宿主タンパク質の探索と同定

そこで、NtDnaJ-t3 と相互作用する HSP70 を単離する目的で、酵母 two-hybrid 法によって NtDnaJ-t3 と結合する宿主タンパク質のスクリーニングを行った。その結果、HSP70 は得られなかったものの、興味あるひとつのタンパク質遺伝子クローン *NtKN1* が単離された。*NtKN1* はタバコで未報告の新規遺伝子で、トウモロコシの KNOTTED1 (KN1) 型ホメオドメインタンパク質をはじめとする KN1 様タンパク質に特徴的な C 末端側 348 アミノ酸の配列をコードしていた。次いで、この上流の配列について *NtKN1* 特異的プライマーを用いて 5'-RACE 法により解析し、完全長 cDNA の塩基配列を決定した結果、*NtKN1* は全長 1,569 塩基からなるひとつの ORF (推定 391 アミノ酸) をコードしていることが示された。この翻訳タンパク質の構造は、トウモロコシ KN1 と同様に N 末端側より、KNOX1、KNOX2、ELK、HOX の各ドメインがこの順に配置されていた。KN1 は形態形成を制御する転写因子で、植物ウイルスの MP と同様に原形質連絡の排除分子量限界を拡大させ、自身やその mRNA を選択的に細胞間移行させる能力を有することが明らかにされている。

2) の結果と合わせて、NtDnaJ-t3 が、TMV MP およびこれと類似の機能を有すると推定される NtKN1 にも結合することが示されたことから、この DnaJ 様タンパク質が TMV MP と NtKN1 の細胞間移行において同様の機構を果たしている可能性、あるいは TMV MP が NtDnaJ-t3 を介して NtKN1 と結合し、この NtKN1 の移行能に依存して細胞間移行を行うという可能性が示唆された。

以上、本研究において、宿主タンパク質 ADC が TMV RNA 複製酵素の 126K タンパク質と 183K タンパク質とのヘテロダイマーの形成を阻害する作用を持つことを明らかにした。一方、TMV MP と特異的に結合する宿主タンパク質 NtDnaJ-t3 が単離され、さらに、この NtDnaJ-t3 と結合する他の宿主タンパク質として NtKN1 が単離された。NtDnaJ-t3 が、細胞間移行能を有する MP およびこれと類似の機能を有すると思われる NtKN1 にも結合することから、この DnaJ 様タンパク質が TMV の細胞間移行に関与する宿主タンパク質の有力候補のひとつであることが示唆され、植物ウイルスの細胞間移行ならびに植物自身の高分子の細胞間移行の分子機構を解明して行く上で、きわめて重要な知見が得られたものと考えられる。