

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 清水 巧

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。そこで本研究では、タバコモザイクウイルス (TMV) の複製・移行に關与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。

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。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) が關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タンパク質のひとつとしてタバコからアルギニンデカルボキシラーゼ (ADC) が単離された。そこで、ファーウェスタン法により ADC と H ドメイン間の特異的結合を再確認した後、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 法を用いて解析したところ、ADC はこの結合を強く阻害することが示された。

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、はじめに、接種 3.5 日後の感染タバコ葉より可溶化膜分画を抽出し、抗 MP 抗体カラムを用いて、MP およびこれと挙動をともし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。一方、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) 融合 MP を用いたファーウェスタン解析の結果、上記分画中に MP と特異的に結合する微量の 42kDa 宿主タンパク質が存在することが示された。しかし、この宿主タンパク質の精製がきわめて困難であ

ったため、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、DnaJ 様タンパク質 (NtDnaJ-t3) を含む陽性クローンが単離され、さらに、ファウウェスタン解析によって両タンパク質相互間の特異的結合が確認された。NtDnaJ-t3 の完全長 cDNA は、全長 1,866 塩基からなるひとつの ORF (推定 442 アミノ酸) をコードしており、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、MP の部分欠失クローンを作製し、NtDnaJ-t3 との結合部位を調べた結果、MP 分子内の 2 カ所 (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) で結合することが示された。

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

次いで、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結果、クローン *NtKN1* が単離された。*NtKN1* は全長 1,551 塩基からなるひとつの ORF (推定 391 アミノ酸) をコードしており、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。これは KN1 様タンパク質に特徴的な構造である。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。NtDnaJ-t3 が、MP および NtKN1 にともに結合することから、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能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、および、この NtDnaJ-t3 と結合する宿主タンパク質 NtKN1 が単離された。NtDnaJ-t3 が、細胞間移行能を有する MP および NtKN1 にともに結合することから、このタンパク質が 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た。本研究で得られた成果は学術上、応用上寄与するところが大きい。よって審査委員一同は、本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。