

論文の内容の要旨

論文題目 *Beet severe curly top virus* のウイルス鎖にコードされる遺伝子の発現活性化機構の解析

氏 名 早川 豪人

【序論】

植物 DNA ウイルスであるジェミニウイルスは、マストレウイルス属、ベゴモウイルス属、クルトウイルス属、トポクウイルス属の 4 属に分類される。ウイルスゲノムは環状 1 本鎖 DNA であり、塩基長は約 3 kb で、植物の核内で 2 本鎖環状の複製中間体となる。ウイルス遺伝子の ORF は、ウイルス鎖 (V 鎖) と相同な mRNA (V-mRNA) と、V 鎖の相補鎖 (C 鎖) と相同な mRNA (C-mRNA) にそれぞれにコードされる (図 1)。すべてのジェミニウイルスは、V-mRNA に粒子形成や細胞間移行など感染後期に必要なタンパク質をコードし、C-mRNA にウイルスゲノムの複製や宿主細胞の細胞周期調節など感染初期に必要なタンパク質をコードする。ゲノム上には遺伝子をコードしていない遺伝子間領域があり、ベゴモウイルス属やマストレウイルス属では、この領域が V 鎖、C 鎖それぞれの遺伝子発現を調節している (図 1)。

ウイルスの生存戦略において、感染時期に合わせ時期特異的に必要なタンパク質を発現することは重要である。ベゴモウイルス属では、C 鎖にコードされ感染初期に発現する AC2 タンパク質が V 鎖遺伝子のプロモーターに作用し、感染後期に V-mRNA 転写を活性化させることが報告されている。マストレウイルス属では、C 鎖にコードされ感染初期に発現する RepA タンパク質が宿主の retinoblastoma related protein (RBR) と結合することで、転写因子 E2F を活性化し、E2F が遺伝子間領域の配列と結合して V-mRNA の転写を活性化させるモデルが提唱されている。

一方、*Beet severe curly top virus* (BSCTV) を含むクルトウイルス属では、V 鎖遺伝子発現の活性化機構は未解明であった。そこで本研究では、BSCTV の V 鎖遺伝子の発現を活性化するウイルスタンパク質の同定と、発現活性化に関与するシスエレメントの特定を行った。

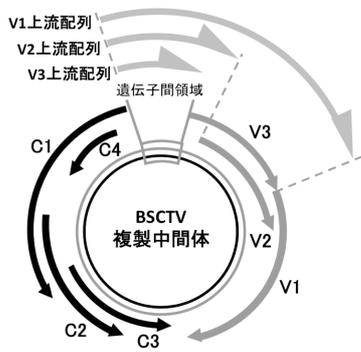


図1. BSCTV のゲノム構造、全長 2926 bp
灰色の円；V鎖，黒の円；C鎖，V1-V3；ウイルス鎖(V鎖)遺伝子，C1-C4；相補鎖(C鎖)遺伝子，円弧状の矢印は ORF とその向きを示す

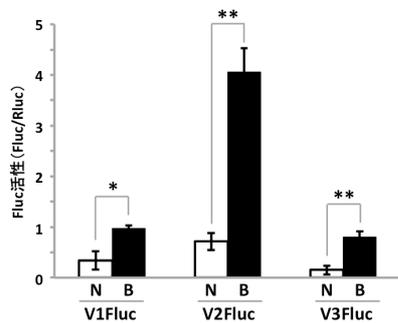


図2. 各V鎖上流配列をFlucにつないだコンストラクトのBSCTV感染性クローンによる影響。
N；ネガティブコントロール，B；BSCTV感染性クローン
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

【結果と考察】

1. V-mRNA の転写開始点の解析

BSCTV の V 鎖遺伝子の発現機構を解析するためには、各遺伝子のプロモーター配列を特定する必要があるが、各 V-mRNA の転写開始点は不明であった。5'-RACE 法を用いた解析の結果、V1, V2, V3-mRNA すべてに転写開始点が見いだされた。V2, V3-mRNA についてはそれぞれ約 30 塩基上流に TATA box が存在したが、V1-mRNA の転写開始点上流には TATA box が認められなかった。

2. V鎖遺伝子発現を活性化するウイルスタンパク質の同定

(a) BSCTV による V鎖遺伝子の活性化

V鎖遺伝子の発現を活性化するタンパク質がBSCTVに存在するかを解析した。各V鎖遺伝子上流配列(図1)にホタルルシフェラーゼ(Fluc)遺伝子を接続したコンストラクトを作製し、BSCTV感染性クローンと共にアグロバクテリウムを用いて *Nicotiana benthamiana* の葉の細胞に導入し、発現したFluc活性を3日後に測定した。その結果、BSCTV感染性クローンは、V鎖遺伝子上流配列に制御されるFluc活性を有意に上昇させた(図2)。

(b) V鎖遺伝子発現活性化に関与するウイルスタンパク質の同定

V-mRNAにはウイルス感染後期に必要なタンパク質がコードされている。感染性クローンによってV鎖遺伝子発現が上昇したため、V鎖遺伝子発現を活性化するウイルスタンパク質は、感染初期に転写されるC-mRNAにコードされることが推測された。そこで、V鎖遺伝子上流配列にFlucを接続したコンストラクトと、各C鎖遺伝子をそれぞれ発現するコンストラクト(エフェクター)を作製し、エレクトロポレーション法を用いてタバコ培養細胞(BY-2)プロトプラストへ共導入し、Fluc活性を16時間後に測定した。その結果、エフェクターとしてC1発現コンストラクトを共導入した場合のみ、ネガティブコントロールであるGUS発現コンストラクトを共導入した場合と比較してFluc活性が有意に上昇した(図3A)。一方、BSCTVとは別のウイルスである *Cauliflower mosaic virus* (CaMV)の35Sプロモーター配列をつないだFlucコンストラクトでは、C1による遺伝子発現の活性化は認められず(図3B)、C1による遺伝子発現はBSCTVのプロモーター配列特異的であることが示唆された。

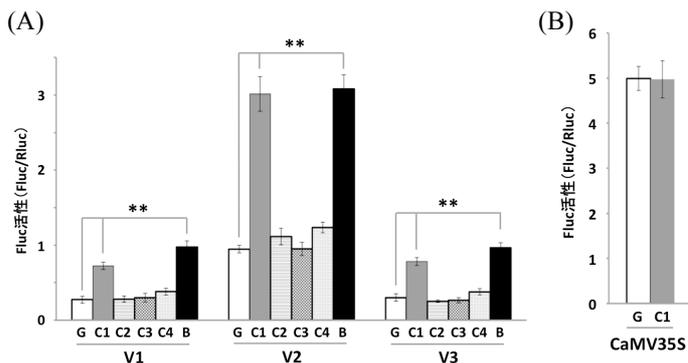


図3. (A) BY-2プロトプラストへV鎖上流配列にFlucをつないだコンストラクト(V1~3)と各C鎖遺伝子発現コンストラクト(C1~4)を共導入後のFluc活性
(B) CaMVの35Sプロモーター配列にFlucをつないだコンストラクトとC1発現コンストラクトを共導入後のFluc活性，G；GUS，B；BSCTV感染性クローン
** $p < 0.01$

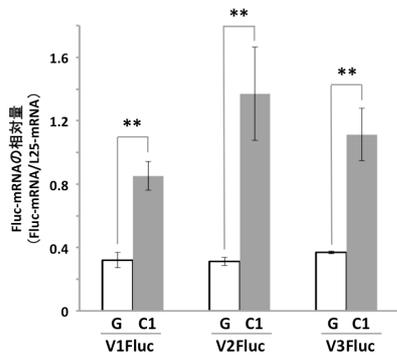


図 4. リアルタイム RT-PCR を用いた Fluc-mRNA 蓄積量の測定, L-25 ; *Nicotiana tabacum* のリボソームタンパク質, ** $p < 0.01$

(c) 転写量の解析

V 鎖遺伝子上流配列につないだ Fluc コンストラクトは C1 によって発現が活性化されたが、これが mRNA の蓄積量増加によるかを検証するため、Fluc 遺伝子の mRNA 量をリアルタイム RT-PCR を用いて解析した。その結果、いずれの V 鎖上流配列に接続した Fluc コンストラクトにおいても、ネガティブコントロールを共導入した場合と比較して、C1 を共導入した場合の方が有意に mRNA の蓄積量が高く(図 4)、遺伝子発現の活性化は mRNA 量の増加であることが示唆された。

(d) C1 の RNA サイレンシングサプレス能の有無

多くの植物ウイルスは、宿主植物の防御応答のひとつである RNA サイレンシングを阻害するサプレッサータンパク質をコードしている。C1 による mRNA 蓄積量の増加が、RNA サイレンシングサプレス能による mRNA の分解の抑制である可能性を検証するため、一過的に RNA サイレンシングを誘導する実験系を用いて、C1 の RNA サイレンシングサプレス能を検証した。その結果、C1 には RNA サイレンシングサプレス能は認められず、mRNA 蓄積量の増加は C1 による転写活性化であることが示唆された。

3. V3 上流配列のシスエレメント解析

(a) V3 上流配列の欠失変異によるシスエレメント領域の解析

V 鎖遺伝子上流配列をつなげた Fluc コンストラクトはいずれも C1 によって転写が活性化されたことから、各上流配列に転写活性化に関与する配列が存在することが予測された。そこで、各上流配列に共通する V3 の上流配列について、転写活性化に関与する塩基配列の特定を試みた。まず、5'末端側から約 50 bp 単位で欠失領域を増やした欠失 V3 上流配列に Fluc を接続し、Fluc 活性を測定した。その結果、C1 共導入による Fluc 活性の上昇は、完全な V3 上流配列コンストラクトではネガティブコントロールの約 2.74 倍であるのに対し、欠失塩基が 50~250 bp の V3 上流配列コンストラクトではいずれも約 1.30 倍であった。したがって、V3 の上流配列 5'末端側から約 50 bp 以内にシスエレメントがあることが示唆された (図 5A)。

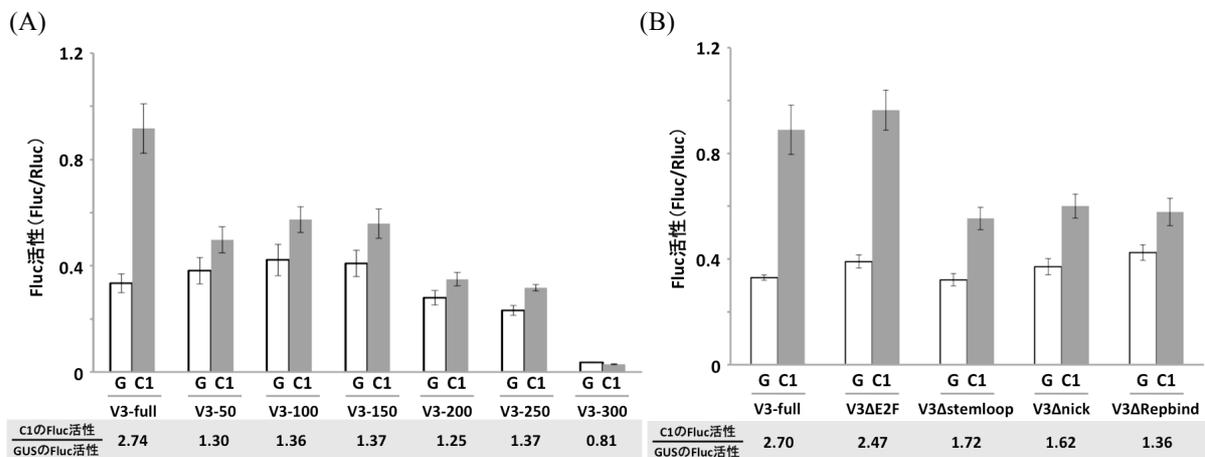


図 5. (A) V3 上流配列の 5'末端配列を約 50 bp ずつ削った配列を Fluc につないだコンストラクトでの Fluc 活性測定図, (B) V3 上流配列の特定領域を欠失した配列に Fluc をつないだコンストラクトの Fluc 活性の測定, 下の数字は GUS を共導入した Fluc 活性を 1 とした場合の C1 を共導入した Fluc 活性の割合

C1 は、複製に関与するタンパク質として同定されたが、その知見では、V3 遺伝子上流配列に含まれる遺伝子間領域には C1 が結合する塩基配列が 2 種類存在する。すなわち、ローリングサークル型のウイルスゲノム複製の起点となる nick サイトを含むステムループ構造を形成する塩基配列、そのステムループ構造の 5'末端上流近傍に存在する TTGGGTGCT タンデムリピート配列である。また、シスエレメント予測ソフトである PLACE を用いて V3 上流配列を解析した結果、マストレウイルス属で RepA を介して V 鎖遺伝子発現の活性化に関与すると推測される転写因子 E2F が結合する塩基配列が 2 つ推定された。そこで、以上 3 種類の塩基配列のうち、それぞれ 1 種類を欠失した V3 上流配列に Fluc をつないだコンストラクトを作製し、C1 共導入による Fluc 活性の活性化を測定した。その結果、TTGGGTGCT タンデムリピート配列を欠失したコンストラクトでは 1.36 倍、nick サイトを欠失したコンストラクトでは 1.62 倍、ステムループ構造全体を欠失したコンストラクトでは 1.72 倍であり、いずれも完全な V3 上流配列コンストラクトの 2.70 倍よりも低かった。なお、タンデムリピート配列は V3 上流配列の 5'末端側の 50 bp 内に存在する。一方、E2F 結合サイトを欠失したものについては約 2.47 倍であり、完全な V3 上流配列と明瞭な差がなかったため、E2F 結合サイトは C1 による転写活性化には関与しないことが示唆された (図 5B)。

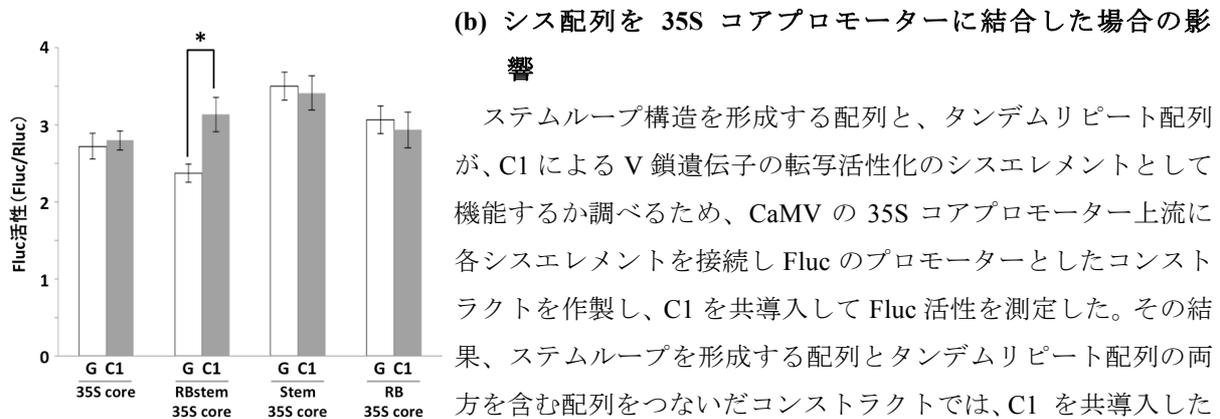


図 6. シスエレメント配列を 35S コアプロモーターにつないだ配列を Fluc につないだコンストラクトでの Fluc 活性測定図, * $p < 0.05$

(b) シス配列を 35S コアプロモーターに結合した場合の影響

ステムループ構造を形成する配列と、タンデムリピート配列が、C1 による V 鎖遺伝子の転写活性化のシスエレメントとして機能するか調べるため、CaMV の 35S コアプロモーター上流に各シスエレメントを接続し Fluc のプロモーターとしたコンストラクトを作製し、C1 を共導入して Fluc 活性を測定した。その結果、ステムループを形成する配列とタンデムリピート配列の両方を含む配列をつないだコンストラクトでは、C1 を共導入した場合 Fluc 活性が有意に上昇した (図 6)。一方、各々の配列を単独につないだ場合では C1 による活性化が認められなかったため、C1 による転写活性化にはこれら 2 つのシスエレメントが共に必要であることが示唆された。

【結論】

本研究では、クルトウイルス属の BSCTV ゲノムの V 鎖遺伝子発現を Fluc を用いたレポーターアッセイによって解析し、C 鎖にコードされる C1 タンパク質が遺伝子発現を活性化することを明らかにした。さらに、リアルタイム RT-PCR により mRNA 蓄積量の増加を示し、RNA サイレncing アッセイによってそれが mRNA 分解ではないことを示した。従って、C1 は V 鎖 mRNA の転写を活性化することが示唆された。

V3 上流配列の詳細な解析により、5'末端側の 50 bp 領域に存在し C1 が結合すると考えられている TTGGGTGCT タンデムリピート配列と、ローリングサークル型のウイルスゲノム複製時の複製開始点となる nick サイトを含むステムループを形成する配列が、共に C1 による活性化に関与することが示唆された。一方、転写因子 E2F が結合すると予測された領域を欠失した場合は、V 鎖上流配列の活性化に顕著な影響は認められなかった。以上の結果、クルトウイルス属の BSCTV は、ペゴモウイルス属やマストレウイルス属とは異なる V 鎖遺伝子発現活性化機構を有することを明らかにした。