

学位論文題名

トバモウイルス RNA 複製複合体の性状に関する
生化学的研究

学位論文内容の要旨

タバコモザイクウイルス (TMV), トマトモザイクウイルス (ToMV) は、ウイルス粒子内に mRNA として機能する 1 本鎖 RNA ゲノムをもつプラス鎖 RNA [(+)RNA] ウイルスで、トバモウイルス属に分類される。植物ウイルスの大多数と、動物ウイルスの多くもこのグループに属する。プラス鎖 RNA ウイルスが宿主細胞内に侵入すると、宿主の翻訳装置によりゲノム RNA が翻訳され、複製に関与するタンパク質 (複製タンパク質) が合成される。複製タンパク質は宿主細胞内のオルガネラ膜の細胞質側表面に RNA 複製複合体を形成する。複製複合体内部では、ゲノムと相補的なマイナス鎖 RNA [(-)RNA] が合成され、この (-)RNA を鋳型として子孫プラス鎖 RNA が大量に合成されることがわかっている。しかしながら、現在のところ、ウイルス毎に決まったオルガネラ膜上に RNA 複製複合体が形成される分子機構や、RNA 複製複合体がどのような性状で、どのような宿主因子を含むかについてはいずれのウイルスにおいても十分には理解されていない。

これまで、植物プラス鎖 RNA ウイルスの RNA 複製複合体の性状を解析するために、感染葉を破碎し、生体膜を精製して、ウイルス RNA 合成酵素の特性を調べる実験が数多く行われてきた。しかしながら、このように単離された RNA 合成酵素は、生体内で観察されるウイルス RNA 合成パターンを再現しなかった。従って、このような RNA 合成酵素が、生細胞中の RNA 複製複合体のもつ性質を反映するか、あるいは構造的に原形をとどめているかは不明であった。抽出された RNA 複製複合体が生体内の RNA 合成パターンを再現しない原因としては、細胞破碎時に液胞に含まれるタンパク質分解酵素および核酸分解酵素が抽出液に混入し、複製複合体構成因子を分解または変性した可能性が考えられた。そこで、本研究では、タバコ (*Nicotiana tabacum*, *Nt*) BY-2 培養細胞のプロトプラストより液胞を除去する技法を用いて、ToMV RNA 複製複合体を感染細胞より単離することを試みた。先ず、ToMV 感染 BY-2 細胞を大量に調製するため、ステロイドホルモン転写誘導プロモーターの下流に ToMV cDNA もつ遺伝子カセットを BY-2 細胞の染色体に組み込んだ。この形質転換 BY-2 細胞にステロイドホルモンを添加すると、最大で 90% の細胞において ToMV RNA の複製が誘起された。次に、ToMV 誘導感染 BY-2 細胞のプロトプラストより、パーコール密度勾配遠心法を用いて液胞を除去した。この脱液胞化プロトプラストを破碎して得た抽出液 (ToMV-infected tobacco BY-2 lysate, iBYL) は、ToMV ゲノム RNA がコードする

130K, 180K 複製タンパク質と (-)RNA を含み, ToMV プラス鎖 RNA を生体内と同様のパターンで合成する活性を有していた. 細胞分画法による解析から, ToMV 複製タンパク質の大部分は可溶性タンパク質に富む画分 (可溶性画分) に存在し, 一部が膜画分に存在することが示された. 一方, ToMV RNA 合成活性および複製鋳型である (-)RNA は膜画分のみ検出された. また, (-)RNA は界面活性剤により可溶化しない限り RNase 耐性を示した. 以上より, ToMV RNA 複製複合体は膜上に形成され, その中で (-)RNA は細胞質の高分子から隔離, 保護されて存在すると考えられた.

ToMV RNA 複製複合体に含まれる宿主因子を同定するため, 界面活性剤による ToMV 複製タンパク質の可溶化を試みた. iBYL の膜画分を 1% Triton X-100 で処理した場合は, 膜結合の ToMV 複製タンパク質は可溶化されず, 巨大な沈降係数をもつ凝集体または多量体を形成した. 一方, 可溶性画分に含まれる複製タンパク質は 1% Triton X-100 処理により凝集体または多量体を形成しなかった. 従って, 可溶性の複製タンパク質と膜結合の複製タンパク質では性状が異なると考えられた. 20 種類以上の界面活性剤をスクリーニングし, 唯一, リソフォスファチジルコリン (LPC) が膜結合の複製タンパク質を効率よく可溶化することを見出した. LPC 処理により内在鋳型依存的な RNA 合成活性は喪失したが, 外来 ToMV RNA 依存的な RNA 合成活性が検出された. 膜結合の ToMV 複製タンパク質を LPC で可溶化して精製したところ, 上記 ToMV RNA 合成活性に加え, ToMV 増殖に関与することが遺伝学的に示されていた宿主膜貫通タンパク質 NtTOM1, NtTOM2A が共精製された. また, 翻訳伸長因子 NtEF1A, 熱ショックタンパク質の NtHSP70 も共精製された. 一方, 可溶性の 180K 複製タンパク質は, NtHSP70 と共精製されたが, RNA 合成活性は示さなかった. また, 共精製された NtEF1A や 130K 複製タンパク質の量は, 膜結合の 180K 複製タンパク質の場合に比べ少なかった. 以上より, ToMV 複製複合体は TOM1, TOM2A を含む膜上に形成されること, 複製タンパク質は, ウイルスタンパク質および宿主タンパク質, 膜との相互作用を経て, RNA 合成活性を獲得することが示唆された.

ToMV RNA の複製に関与する新規宿主タンパク質を同定することを目指して, ToMV 180K 複製タンパク質と共精製された宿主タンパク質を LC-MS/MS 法により同定した. その結果, 低分子 GTPase の一種で機能未知の ADP リボシル化因子様タンパク質 (ARL) が共精製されていることが明らかになった. シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*, *At*) ゲノムには, 上記 NtARL と相同性の高いタンパク質 AtARL が4つの遺伝子にコードされている. シロイヌナズナにおいて各 *arl* の単独変異はトバモウウイルスの増殖に影響を与えなかったが, いくつかの二重変異株ではトバモウウイルスの増殖が抑制された. 試験管内 ToMV RNA 翻訳・複製系を用いた解析から, 野生型 NtARL の添加は ToMV 複製タンパク質の翻訳には影響を及ぼさないが, ToMV RNA の複製を亢進することが明らかになった. また, GTP 結合固定型 (膜局在型) 変異をもつ NtARL の添加は ToMV RNA 複製を亢進したが, GDP 結合固定型 (細胞質局在型) 変異をもつ NtARL の添加は複製には影響しなかった. 従って, 膜に結合した ARL がトバモウウイルス RNA の複製をサポートする機能をもつと考えられた. 以上より, 複製タンパク質は ARL, TOM1, TOM2A を含む生体膜との相互作用を経て, RNA 複製複合体を形成し, RNA 合成を行うと考えられた.

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 複製複合体の性状に関する 生化学的研究

本論文は、和文 42 頁、15 図、1 表からなり、参考論文 3 編が添付されている。

トマトモザイクウイルス (ToMV) は、ウイルス粒子内に mRNA として機能する 1 本鎖 RNA ゲノムをもつプラス鎖 RNA ウイルスで、トバモウイルス属に分類される。プラス鎖 RNA ウイルスが宿主細胞内に侵入すると、宿主の翻訳装置によりゲノム RNA が翻訳され、複製に関与するタンパク質 (複製タンパク質) が合成される。複製タンパク質は宿主細胞内のオルガネラ膜の細胞質側表面に RNA 複製複合体を形成する。複製複合体内部では、ゲノムと相補的なマイナス鎖 RNA が合成され、このマイナス鎖 RNA を鋳型として子孫プラス鎖 RNA が大量に合成される。しかしながら、膜上に RNA 複製複合体が形成される分子機構や、RNA 複製複合体の性状およびその構成因子については、いずれのウイルスにおいても十分には理解されていない。従来、RNA 複製複合体の性状を解析するために、感染葉を破碎し、生体膜を精製して、ウイルス RNA 合成酵素の特性を調べる実験が数多く行われてきた。しかしながら、こうした実験系は、生体内で観察されるウイルス RNA 合成パターンを再現しなかった。

本論文は、ToMV の宿主であるタバコに由来する BY-2 培養細胞を用いて ToMV RNA の人為的感染誘導系を構築し、ToMV RNA 複製複合体の性状ならびにその構成成分の解析結果を報告したものである。論文の内容は以下のように要約される。

ToMV 感染 BY-2 細胞を大量に調製するため、ステロイドホルモン転写誘導プロモーターの下流に ToMV cDNA と自己切断型リボザイムをもつ遺伝子カセットを BY-2 細胞の染色体に組み込んだ。この形質転換 BY-2 細胞は、ステロイドホルモンを添加することで、最大 90% の細胞において ToMV RNA の複製が誘起された。次いで、ToMV 誘導感染 BY-2 細胞

のプロトプラストより、パーコール密度勾配遠心法を用いて液胞を除去した。この脱液胞化プロトプラストを破碎して得た抽出液は、ToMV ゲノム RNA がコードする 130K, 180K 複製タンパク質とマイナス鎖 RNA を含み、ToMV プラス鎖 RNA を生体内と同様のパターンで合成する活性を有していた。遠心による細胞分画において、ToMV 複製タンパク質の大部分は可溶性画分に存在し、一部が膜画分に存在した。一方、ToMV RNA 合成活性および複製鋳型であるマイナス鎖 RNA は膜画分にもみ検出された。また、マイナス鎖 RNA は界面活性剤により可溶化しない限り RNase 耐性を示した。以上より、膜上に形成された ToMV RNA 複製複合体の中でマイナス鎖 RNA は細胞質の高分子から保護されて存在すると考えられた。

ToMV RNA 複製複合体に含まれる宿主因子を同定するため、界面活性剤による ToMV 複製タンパク質の可溶化を行った。20 種類以上の界面活性剤をスクリーニングした結果、唯一、リソフォスファチジルコリン (LPC) が膜結合の複製タンパク質を効率よく可溶化することを見出した。LPC 処理により内在鋳型依存的な RNA 合成活性は喪失していたが、外来 ToMV RNA 依存的な RNA 合成活性が検出された。膜結合の ToMV 複製タンパク質を LPC で可溶化して精製したところ、ToMV 増殖に関与することが遺伝学的に示されていた宿主タンパク質である TOM1, TOM2A の他、翻訳伸長因子の EF1A, 熱ショックタンパク質の HSP70 が共精製された。一方、可溶性の 180K 複製タンパク質は、HSP70 と共精製されたが、RNA 合成活性は示さなかった。以上より、ToMV 複製複合体は TOM1, TOM2A を含む膜上に形成されること、複製タンパク質はウイルスタンパク質および宿主タンパク質、膜との相互作用を経て、RNA 合成活性を獲得することが示唆された。

ToMV RNA の複製に関与する新規宿主タンパク質を同定する目的で、ToMV 180K 複製タンパク質と共精製された宿主タンパク質を LC-MS/MS 法により同定した。その結果、低分子 GTPase のひとつで機能未知の ADP リボシル化因子様タンパク質 (ARL) が同定された。試験管内 ToMV RNA 翻訳・複製系を用いた解析から、野生型 ARL の添加は ToMV 複製タンパク質の翻訳には影響を及ぼさないが、ToMV RNA の複製を亢進することが示された。また、GTP 結合固定型 (膜局在型) 変異をもつ ARL の添加は ToMV RNA 複製を亢進したが、GDP 結合固定型 (細胞質局在型) 変異をもつ ARL は効果がなかった。従って、膜に結合した ARL がタバモウイルス RNA の複製をサポートする機能をもつと考えられた。

シロイヌナズナで ARL は 4 つの遺伝子にコードされている。シロイヌナズナにおいて各遺伝子の単独変異はタバモウイルスの増殖に影響を与えなかったが、いくつかの 2 重変異株および 3 重変異株ではタバモウイルスの増殖が抑制され、ToMV の増殖における ARL の重要性が遺伝学的にも示された。

本研究は、ToMV の複製複合体を生化学的に解析する新たな実験系を構築し、新規宿主因子を同定したものであり、学術的に高く評価できる。よって審査員一同は、錦織雅樹が博士 (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。