

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580048

研究課題名(和文) ポティウイルスゲノム結合タンパク質と宿主タンパク質の相互作用プロファイリング

研究課題名(英文)

Interaction between *Potyvirus* viral protein linked to the genome and host cell protein

研究代表者

三好 洋 (MIYOSHI HIROSHI)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：80322519

研究成果の概要(和文)：カブモザイクウイルス(TuMV)のゲノム結合蛋白質(VPg)のeIF4Eアイソフォームへの選択性を評価するために、mRNAのcap構造への結合の有無の状態でのヒト、線虫およびシロイヌナズナのeIF4EアイソフォームとTuMVのVPgの反応速度論的解析を表面プラズモン共鳴(SPR)法により測定した。その結果、capが結合したシロイヌナズナeIF(iso)4Eでは、VPgがC末端領域に結合し、capが結合しない状態では広く開いたcap結合ポケットとその周辺領域に結合することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To investigate the binding specificity of TuMV VPg with eIF4E, we evaluated the kinetic parameters for the interactions of human eIF4E, *C. elegans* IFE-3 and IFE-5 and *Arabidopsis* eIFiso4E, by SPR. The results suggested that in cap-bound eIF4E orthologues, the VPg binds to the C-terminal region, which constitutes one side of the entrance to the cap-binding pocket, whereas in the cap-free state, VPg binds to the widely opened cap-binding pocket and its surrounding region.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：感染・増殖

## 1. 研究開始当初の背景

分子生物学的研究により、植物RNAウイルスの感染増殖過程が近年急速に明らかになりつつある。しかし、植物RNAウイルスが宿主細胞に侵入して感染を成立させるという、感染の初期段階の分子生物学的機構については、ウイルス・宿主植物の双方から関与する分子は完全には明らかになっていない。

研究代表者らは、モデル植物のシロイヌナズナとそれを宿主とするカブモザイクウイルス(TuMV：ポティウイルスのメンバー)との実

験系を用いて、シロイヌナズナの翻訳開始因子の一種であるeIF(iso)4EがTuMVのVPgに強固に結合してさらにeIF(iso)4Gとの三者複合体を形成し、宿主植物mRNAのキャップ構造との結合を阻害することを見出した(Miyoshi, H. *et al.*, *Biochimie*, 2006)。さらに、ウイルスゲノムRNAへの翻訳への直接的な関与を見出した(Khan, MA. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2006)。本申請課題はこれらの研究成果を発展させたものである。

VPgはTuMVゲノムRNAの5'末端に共有結合

している蛋白質で、通常のmRNAのキャップ構造とは異なり、ウイルスゲノムRNAの直接的な翻訳や宿主植物細胞のmRNAの翻訳に影響を及ぼしているとはこれまで考えられていなかった。一方、eIF(iso)4Eは通常、宿主植物細胞のmRNAのキャップ構造を認識して、リボソームを誘導し翻訳開始のまさに起点となる役割を担っている。したがって、このeIF(iso)4EとVPgとの相互作用は、シロイヌナズナの細胞に侵入したTuMVのゲノムRNAが宿主植物細胞のmRNAに優先して翻訳されることや、eIF(iso)4Eの発現が多く認められる若い葉にTuMVが感染しやすいこと、感染植物が正常に生育できないことなどを説明できる現象である。

現在、このeIF(iso)4EとVPgとの相互作用とそのウイルスの増殖及び病原性との関係については特に注目を受けている分野となっており、国内外においていくつかの研究グループがeIF(iso)4EとVPgとの相互作用やそのウイルスの増幅及び病原性との関係を推論しているが、それらの多くは植物の遺伝学および病理学を専門とするグループからであり、分子生物学、生化学また構造学的な検討を詳細に行なって、試験管内の結果と生体内の現象を比較検討したものは少ない。

## 2. 研究の目的

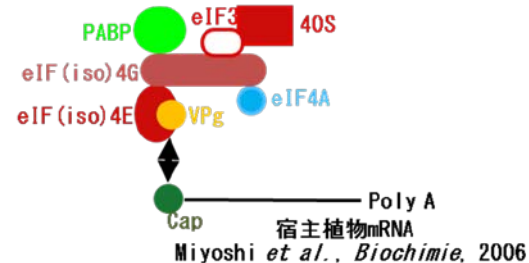
本研究課題であるVPgとeIF(iso)4Eの相互作用には、翻訳に関連する分野では右図1に示したように宿主植物細胞内で二つの可能性が考えられる。

第一の可能性としては、Aに示したようにウイルスの複製の際に余剰に生じたVPg(ウイルス1粒子には約3000分子の外殻蛋白質と1分子のVPgが必要であり、ウイルスの複製には毎回約2999分子のVPgが余剰となる)がeIF(iso)4Eと結合することにより、宿主細胞内のmRNAのキャップ構造との結合を阻害して蛋白質の生合成を停止し、病原性を発揮することが挙げられる。

第二の可能性としては、Bで示したウイルス感染初期段階でのウイルスゲノムRNAの翻訳開始機構へのVPgの直接的な関与である。ポティウイルスと近縁の動物のピコルナウイルスのように、宿主細胞内でのウイルスRNAゲノムの翻訳の際にVPgが切断されてIRES依存の翻訳が開始される機構が、ポティウイルスの翻訳開始機構として論じられている。しかし

ながら、研究代表者らはVPgとeIF(iso)4Eとの高い親和性やeIF(iso)4Gを伴った三者複合体の形成および安定化から、ウイルス粒子が細胞への感染後に脱殻した際にVPgが付加した状態でのウイルスRNAゲノムの直接的な翻訳への関与の可能性を指摘している。

### A. キャップ構造依存の翻訳開始の阻害



### B. ウイルスゲノムRNA翻訳開始

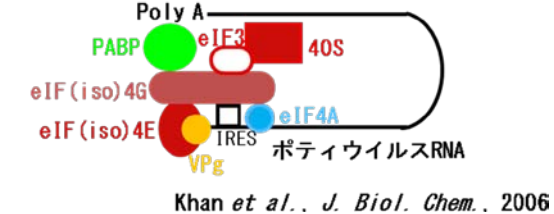


図1 VPgとeIF(iso)4Eの相互作用の宿主植物細胞内で二つの可能性

つまり、下記のようにVPgのeIF(iso)4Eとの相互作用をさらに検討することで、これらの可能性について詳細に吟味でき、VPgによる宿主細胞の翻訳制御機構やRNAウイルスの遺伝子情報発現機構及び植物ウイルス病の発症機構の解明に寄与できる。

そこで、ウイルス蛋白質VPgとポティウイルスの病原性との関係を、これまでに研究代表者および研究分担者が詳細に検討を継続して行ってきたeIF4Eアイソフォーム(ヒトeIF4E、線虫IFE-3およびIFE-5)とTuMVのVPgとの結合性を生化学的な反応速度論および構造生物学的な分析によって比較検討する。

## 3. 研究の方法

これまでに遺伝子のクローニングおよび発現系を確立したヒトeIF4E、線虫IFE-3およびIFE-5、シロイヌナズナeIF(iso)4EとTuMVのVPgを、大量に発現してeIF4Eアイソフォームに関してはcapアナログ( $m^7GTP$ )との結合状態および非結合状態で精製した。

精製したTuMVのVPgをリガンドとしてセンサーチップ上に固定化し、アナライトとしてcapアナログ結合状態および非結合状態で各eIF4Eを添加してBiacoreによるSPR測定

を行い、結合速度・解離速度に依存した結合レスポンスの変化を検出した。そのセンサグラムよりカイネティクス解析を行った。

ヒト eIF4E の結晶構造を基に、線虫 IFE-3 および IFE-5、シロイヌナズナの eIF(iso)4E の構造予測を行って m<sup>7</sup>GTP の結合状態および非結合状態での各 eIF4E の VPg への親和性の差を考察した。

#### 4. 研究成果

得られたセンサグラムより分析した VPg と m<sup>7</sup>GTP の結合状態および非結合状態での各 eIF4E のカイネティクス解析の結果を下記の表 1 に示す。

表 1 VPg との eIF4E の相互作用

Ligand	Analyte	$k_{on}$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_{off}$ ( $s^{-1}$ )	$K_D$ (M)
m <sup>7</sup> GTP-free state				
VPg	eIFiso4E	$3.25 \times 10^3$	$4.59 \times 10^{-3}$	$1.41 \times 10^{-6}$
	eIF4E	$7.29 \times 10^3$	$1.29 \times 10^{-3}$	$1.76 \times 10^{-7}$
	IFE-3	$3.84 \times 10^3$	$1.55 \times 10^{-3}$	$4.03 \times 10^{-7}$
	IFE-5	$3.08 \times 10^3$	$8.88 \times 10^{-4}$	$2.88 \times 10^{-7}$
m <sup>7</sup> GTP-bound state				
VPg	eIFiso4E	$2.08 \times 10^4$	$4.32 \times 10^{-3}$	$2.08 \times 10^{-7}$
	eIF4E	$4.33 \times 10^2$	$1.63 \times 10^{-3}$	$3.68 \times 10^{-6}$
	IFE-3	$6.78 \times 10^4$	$6.40 \times 10^{-4}$	$9.44 \times 10^{-9}$
	IFE-5	$7.03 \times 10^2$	$4.64 \times 10^{-4}$	$6.60 \times 10^{-7}$

表 1 より、m<sup>7</sup>GTP の結合状態および非結合状態での各 eIF4E と VPg との解離定数  $K_D$  を、棒グラフとして示した。

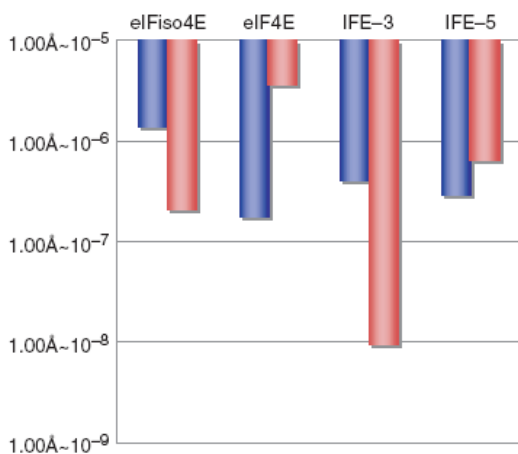


図 2 eIF4E と VPg との解離定数  $K_D$  の比較

これらの結果をまとめると、TuMV の VPg はシロイヌナズナの eIF(iso)4E に有意な選択性を示さず、m<sup>7</sup>GTP の結合によってシロイヌナズナ eIF(iso)4E と線虫 IFE-3 の  $k_{on}$  が増加したのに対して、ヒト eIF4E、線虫 IFE-5 は減少した。

ヒト eIF4E の結晶構造を基にした、線虫 IFE-3 および IFE-5、シロイヌナズナの eIF(iso)4E の構造予測から、cap が結合したシロイヌナズナ eIF(iso)4E では、VPg が C 末

端領域に結合し、cap が結合しない状態では広く開いた cap 結合ポケットとその周辺地域に結合することが推定できた。この推論は C 末端を削除した eIF4E アイソフォームの SPR 測定によって確認できた。

今後、これらの結果を基にして TuMV の VPg とシロイヌナズナ eIF(iso)4E の共結晶構造解析を行って、VPg の eIF(iso)4E への結合領域のアミノ酸残基に変異を加えた「VPg 改変 TuMV」を調製し、シロイヌナズナに対する病原性の変化を調査したい。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 4 件)

① Okade, H., Fujita, Y., Miyamoto, S., Tomoo, K., Muto, S., Miyoshi, H., Natsuaki, T., Rhoads, RE. and Ishida, T. (2009) Turnip mosaic virus genome-linked protein VPg binds C-terminal region of cap-bound initiation factor 4E ortholog without exhibiting host cellular specificity, *J. Biochem.*, Vol. 145, p299-307 (査読有)

② Miyoshi, H., Okade, H., Muto, S., Suehiro, N., Nakashima, H., Tomoo, K. and Natsuaki, T. (2008) Turnip mosaic virus VPg interacts with *Arabidopsis thaliana* eIF(iso)4E and inhibits *in vitro* translation, *Biochimie*, Vol. 90, p1427-1434 (査読有)

〔学会発表〕 (計 5 件)

① Miyoshi, H., Okade, H., Muto, S., Suehiro, N., Nakashima, H., Tomoo, K. and Natsuaki, T., TuMV VPg interacts with *A. thaliana* eIF(iso)4E and inhibits *in vitro* translation, **Proceedings of the 12th Conference on Translational Control held at Cold Spring Harbor Laboratory Meeting**, New York USA, 3-7 September 2008, p234

② Goss, D. J., Khan, M. A., Miyoshi, H. and Gallie, D. R., The role of potyvirus genome-linked protein, VPg, in cap-independent translation: Interactions with initiation factors and IRES RNA, **Proceedings of the 12th Conference on Translational Control held at Cold Spring Harbor Laboratory Meeting**, New York USA, 3-7 September 2008, p154

[その他]

ホームページ等

<http://www.marianna-u.ac.jp/houjin/staff/univ/bisei.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三好 洋 (MIYOSHI HIROSHI)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：80322519

### (2) 研究分担者

夏秋知英 (NATSUAKI TOMOHIDE)

宇都宮大学・農学部・教授

研究者番号：10134264

友尾幸司 (TOMOO KOJI)

大阪薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：70257898

西川裕之 (HISHIKAWA HIROYUKI)

聖マリアンナ医科大学・医学(系)研究科  
(研究院)・研究技術員

研究者番号：90387077

### (3) 連携研究者

なし