

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 20 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22880001

研究課題名（和文） 構造生物学および生化学的解析による TSWV 粒子構成因子間の相互作用様式の解明

研究課題名（英文） Structural and biochemical analyses of interactions among TSWV structural proteins

研究代表者

薦田 圭介 (KOMODA KEISUKE)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・特任助教

研究者番号：40581640

研究成果の概要（和文）：トマト黄化えそウイルス (TSWV) のヌクレオキャプシド蛋白質 (NP) は、ウイルスゲノム RNA 複製に関与する重要なタンパク質である。本研究において、我々は TSWV NP の結晶を得ることに成功し、X 線を照射したところ、分解能 2.7Å の回折データを得ることに成功した。構造解析により、非対称単位中には 3 分子の NP 分子が含まれており、リング状構造を形成することが判明した。また、NP 3 量体リングの内側は、正電荷を帯びており、この領域でゲノム RNA と結合していると推測された。

研究成果の概要（英文）：The nucleocapsid proteins (NP) of *Tomato Spotted Wilt Virus* (TSWV) are key proteins in the replication of viral RNA. In this study, we obtained crystals of recombinant TSWV NPs diffracting to 2.7 Å resolution. The asymmetric unit contains three NP molecules forming trimeric ring-like structure. Moreover, the inside of TSWV NP trimeric ring shows the positive charge rich surface, suggesting that these regions are expected to be genomic RNA binding site.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：植物病理学

キーワード：ウイルス・蛋白質・X線結晶構造解析・TSWV・N蛋白質

1. 研究開始当初の背景

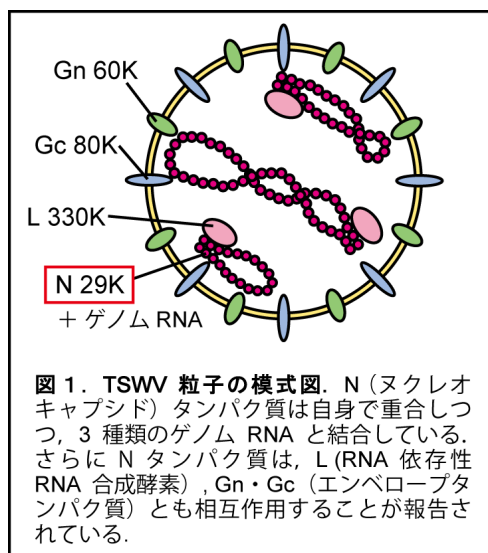
(1) トマト黄化えそウイルス (*Tomato spotted wilt virus*: TSWV) は、ブニヤウイ

ルス科に属するマイナス鎖 RNA ウイルスである。単子葉・双子葉植物を問わず 1,000 種類近くもの広範囲の植物に感染し、特にナス

科、マメ科などの主要農作物に甚大な被害を及ぼしている。1915年にオーストラリアで初めて発見されて以来、感染範囲を拡大しており、新たな防除法の開発が喫緊の課題となっている。

(2) TSWVの粒子は、4種類の構造タンパク質と3分節の1本鎖RNAゲノム(S, M, L RNA)により構成される(図1)。構造タンパク質の内、ヌクレオキャプシドタンパク質(NP)は、ウイルスゲノムRNAと直接結合しており、さらにLタンパク質(RNA依存性RNA合成酵素)と相互作用することによって、ゲノム複製を司る「ビリオンRNP」複合体を形成する。さらにNPは、Gn・Gcタンパク質とも相互作用することが近年報告された(*Virology* 383: pp121-130, 2009)。すなわち、ビリオンRNPがウイルスエンベロープに取り込まれる際にもNPが重要な役割を果たしていると示唆された。

(3) このように、NPは258残基(分子量: 約29K)と比較的小さいタンパク質であるにも関わらず、4種類のウイルス因子(ゲノムRNA・L・Gn・Gcタンパク質)と相互作用する「ハブ(結節点)」的な役割を担うタンパク質であると推測される。そのため、NPの立体構造を決定し、他のウイルス因子との相互作用様式を明らかにすることで、TSWVのゲノム複製および粒子形成過程における重要な知見が得られると期待される。



2. 研究の目的

(1) ウイルス増殖を始めとする全ての生命現象は、固有の立体構造を持つ各々の生体分子が相互作用することによって成り立って

いる。構造生物学的解析手法を用いて、各ウイルス因子の立体構造、相互作用領域を詳細に記述することにより、はじめて原子レベルでの現象の理解が可能となる。しかしながら、「結晶」状態の分子を取り扱う以上、対象分子の実際の活性については、別の方策で検証する必要がある。本研究では、構造生物学的解析と、生化学的解析とを組み合わせることにより、総合的見地からウイルスタンパク質の構造・機能解析に迫るものである。

(2) TSWVの属するブニヤウイルス科には、ヒトや家畜に重篤な症状を引き起こすハンタウイルス、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス、アカバネウイルスなどの動物ウイルスも数多く含まれている。そのため、本研究を通じてウイルス因子間の相互作用様式を解明することにより、農学のみならず医学・獣医学分野においても、ウイルス増殖機構に関する重要な知見が得られると考えられる。さらに、当該相互作用を阻害する薬剤(農薬)の開発など、応用研究に向けた基盤的情報を提供できるものとする。

3. 研究の方法

TSWV NPのN末端にHisタグを融合させた蛋白質を大腸菌で発現後、タグによるアフィニティー精製およびゲル濾過クロマトグラフィーによる精製を行った。精製後のNPが正常な立体構造を保持しているかについては、RNAとの結合実験を行い、確認した。

その後、市販のタンパク質結晶化スクリーニングキットを用いてNPの初期結晶を得た。さらに、NP濃度、沈殿剤濃度、pHなどを段階的に変化させた自作の組成液を調製し、十分な大きさ(0.1mm程度)・純度の結晶を得た。得られた結晶について、兵庫県「SPring-8」、もしくは茨城県の高エネルギー加速器研究機構「放射光科学研究施設」を利用してX線の照射を行った後、回折データを得た。

また構造解析は、Se-Met誘導体結晶を用いた単波長異常散乱法(SAD)法を用いて行った。位相決定・モデル構築はプログラムAutoSolとAutoBuildを利用した。さらに、Refmacを用いて、精密化を行って立体構造を決定した。

4. 研究成果

(1) 研究開始初年度は、N 末端に His タグを融合させた TSWV NP を大腸菌で大量に発現させ、His タグ精製・イオン交換クロマトグラフィー精製・ゲル濾過クロマトグラフィー精製を行って、大量の精製標品を得ることに成功した。ゲル濾過クロマトグラフィーの結果によると、NP は溶液中で 3 量体になっていると推測された。

精製 NP について、市販の結晶化スクリーニングキットを用いて、スクリーニングを行った結果、いくつかの条件で初期結晶を得ることに成功した (図 2)。放射光施設にて、その初期結晶に X 線を照射したが、約 7 Å 程度の分解能しか得られなかった。

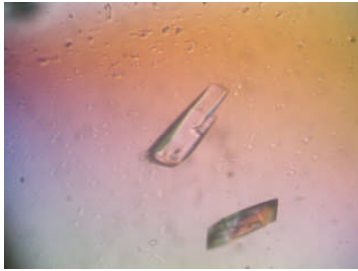


図 2. TSWV NP の初期結晶

(2) 研究次年度に、NP の精製バッファの塩濃度について、条件検討を行った結果、良質の結晶を調製することができたため、放射光施設にて測定したところ、分解能約 2.8 Å の回折データを得ることに成功した。また、合わせて NP 中のメチオニンをセレノメチオニンに置換した TSWV NP 置換体についても、結晶を調製し、同程度の分解能の回折データが得られたため、S-SAD 法により位相を決定することが出来た。

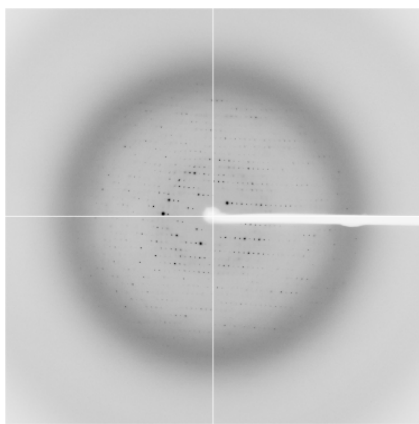


図 3. TSWV NP 結晶の X 線回折像

(3) 現在、構造データの精密化がほぼ終了している段階である。得られた構造情報から、非対称単位中には、3 分子の NP 分子がリ

ング状のホモ三量体を形成していることが判明した。

(4) また、NP の N 末端、C 末端のアーム領域がそれぞれ隣接する NP 分子と相互作用していること、NP 三量体リングの内部領域が高い正電荷を有していることなどが明らかとなった。そのため、NP 三量体リングの内部領域にウイルスゲノム RNA が結合することが強く示唆された。

(5) 今回得られた TSWV NP 三量体の構造は、近縁の Rift Valley Fever Virus の NP が六量体を形成する例とは異なり、新規の構造と言える。また、NP 三量体内部で RNA に結合していると推測することができたので、当該領域中のアミノ酸を変異させ、NP 多量体化能、および RNA 結合能が失われるか、確認している。以上の結果について、現在、海外学術雑誌へ投稿準備中である。

(6) 現在、TSWV NP とウイルス RNA との複合体について、構造解析を目指し、共結晶化を行っている。NP 単体の結晶化条件とほぼ同じ条件で結晶が出現したが、分解能は低く、約 7 Å 程度であった。そのため、現在は結晶化スクリーニングからの条件検討、結合させるウイルス RNA の塩基長の検討などを行っている。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件、内 1 件発表予定)

- ① 成田 聖実, Structure analysis of the nucleocapsid protein of Tomato spotted wilt virus, Sapporo Symposium on Advanced Protein Crystallography, 2012 年 3 月 17 日, 北海道大学 (北海道札幌市)
- ② 薦田 圭介, Structure analysis of Tomato spotted wilt virus nucleocapsid proteins, XV International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions, 2012 年 7 月 29 日-8 月 2 日発表予定, 国立京都国際会館 (京都府京都市)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

薦田 圭介 (KOMODA KEISUKE)
北海道大学・大学院先端生命科学研究院・
特任助教
研究者番号：40581640

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし