

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 16 日現在

機関番号：32713
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23658042
 研究課題名（和文）
 植物ウイルスの病原性決定機構の解明によるウイルスワクチンの開発
 研究課題名（英文）
 Development of the virus vaccine by the elucidation of the virulence of a plant virus
 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）：RNA の脱プリン反応のメカニズムを解明し、かつ PAP がどのように様々な RNA を認識しターゲットとするか理解するために、PAP の脱プリン反応活性および PAP とカブモザイクウイルスの VPg との相互作用を、蛍光分光法などによって定量的な検討を行った。PAP は VPg に対して高い親和性 ($K_d = 29.5 \text{ nM}$) を示した。さらに、VPg は小麦胚芽抽出液中での RNA の PAP による脱プリン反応の強力な阻害活性を示し、タバコエッチウイルス (TEV) に由来した RNA 構造と PAP への結合に関して拮抗を示した。これらの結果は、VPg が植物の防御メカニズムの 1 つを抑制し、RIP の細胞毒性に対する VPg の有用性を示唆している。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the mechanism of RNA depurination, and to understand how PAP recognizes and targets various RNAs, the interactions between PAP and Turnip mosaic virus genome linked protein (VPg) were investigated. VPg can function as a cap analog in cap-independent translation, and potentially target PAP to uncapped IRES-containing RNA. In this work, fluorescence spectroscopy and HPLC techniques were used to quantitatively describe PAP depurination activity and PAP-VPg interactions. PAP binds to VPg with high affinity (29.5 nM); the reaction is enthalpically driven and entropically favored. Further, VPg is a potent inhibitor of PAP depurination of RNA in wheat germ lysate, and competes with structured RNA derived from tobacco etch virus (TEV) for PAP binding. VPg may confer an evolutionary advantage by suppressing one of the plant defense mechanisms, and also suggests the possible use of this protein against the cytotoxic activity of RIPs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

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のゲノム結合タンパク質 (Viral Protein Genome-linked, 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*, 2008)。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.*, 2008)。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。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。

一方、アメリカヤマゴボウの抗ウイルス蛋白 (Pokeweed Antiviral Protein, PAP) は、rRNA の sarcin/ricin ループから特定のプリン残基を切断する RNA N-グリコシダーゼであり、リボソーム不活化タンパク質 (Ribosome Inactivating Protein, RIP) として知られ、translocation step でタンパク質合成を停止

する。PAP はキャップ結合タンパク質でもあり、多くの植物、動物のウイルスに対する有力な抗ウイルス物質としても知られている。また、TuMV の VPg はキャップ非依存の翻訳系において、翻訳開始因子との相互作用を介してキャップ・アナログとして翻訳開始への直接的な関与することが知られているとともに、キャップのない IRES を持った RNA に対する PAP を標的とすることができると考えられている。

2. 研究の目的

そこで本研究課題では、アメリカヤマゴボウの抗ウイルス蛋白 (PAP) と VPg との相互作用を、蛍光滴定法による反応速度論的な解析と蛋白質合成への影響で検討した。このような基礎的な検討の集積が、VPg による植物の防御機構の抑制メカニズムの理解、つまり植物ウイルスの病原性決定機構の解明へと繋がる。

3. 研究の方法

RNA の脱プリン反応のメカニズムを解明し、かつ PAP がどのように様々な RNA を認識しターゲットとするか理解するために、PAP の脱プリン反応活性および PAP とカブモザイクウイルスの VPg との相互作用を、蛍光分光法などによって定量的な検討を行った。

4. 研究成果

VPg と PAP との相互作用を蛍光滴定法により解析した結果を次頁の図 1 に示した。

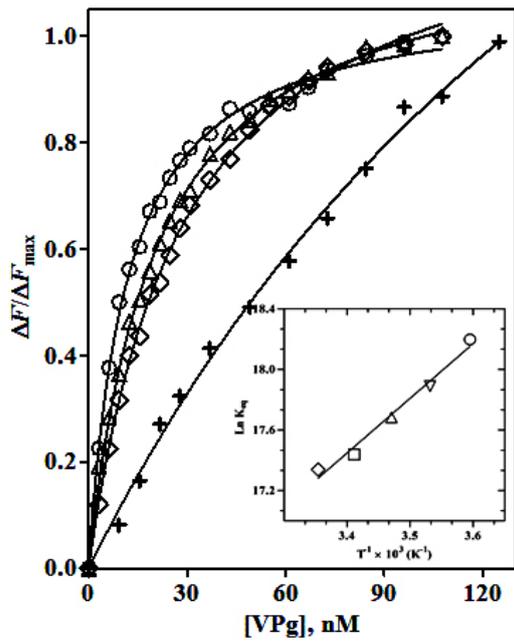


図1 VPg と PAP との相互作用

○:5°C、▽:10°C、□:15°C、◇:20°C、△:25°C、
×:25°C(-)、
内枠:van't Hoff plot

また、図1より求めた解離定数を下記の表1
に示した。

表1 VPg と PAP との相互作用

Complex	Equilibrium dissociation constant (K_d)				
	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C
PAP-VPg	12.5 ± 0.6	17.0 ± 0.7	20.9 ± 1.2	26.7 ± 1.3	29.5 ± 1.8
PAP-VPg-71	ND ^a	ND	ND	ND	37.4 ± 3.0

^a ND, not determined.

PAP は VPg に対して高い親和性 ($K_d = 29.5$ nM) を示した。

さらに、VPg は小麦胚芽抽出液中での RNA の PAP による脱プリン反応の強力な阻害活性を示し、タバコエッチウイルス (TEV) に由来した RNA 構造と PAP への結合に関して拮抗を示した。(図2)

これらの結果は、VPg が植物の防御メカニズムの一つを抑制し、RIP の細胞毒性に対する VPg の有用性を示唆している。

今後、これらの結果を基にして TuMV の VPg

共結晶構造解析を行って、VPg による植物の防御機構の抑制メカニズムの理解、つまり植物ウイルスの病原性決定機構の解明への展開を計りたい。

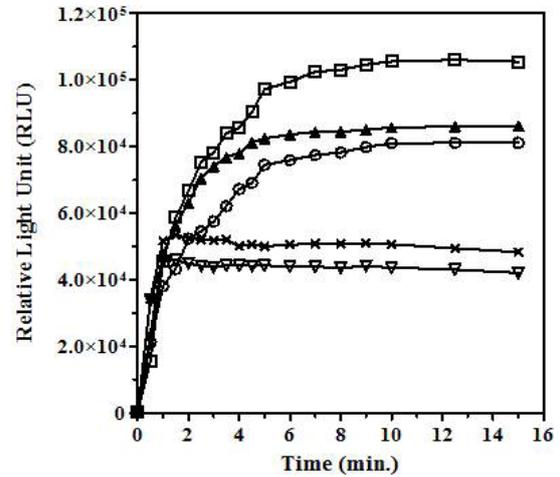


図2 TEV RNA の PAP による翻訳阻害の VPg による抑制

○: TEV1-143-*Iuc*-A50 RNA、
□: TEV1-143-*Iuc*-A50 RNA + WT VPg、
▽: TEV1-143-*Iuc*-A50 RNA + PAP after 1 min、
▲: TEV1-143-*Iuc*-A50 RNA + WT VPg + PAP after 1 min、
×: TEV1-143-*Iuc*-A50 RNA + VPg-220 + PAP after 1 min

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2件)

- ① Domashevskiy, A V., Miyoshi, H., Goss, D J. (2012) Inhibition of pokeweed antiviral protein by turnip mosaic virus genome-linked protein (VPg), *J. Biol. Chem.*, Vol. 287, pp29729-29738, DOI 10.1074/jbc.M112.367581 (査読有)

②Takahashi, K., Otomo, M., Yamaguchi, N., Nakashima, H., and *Miyoshi, H. (2008) Replacement of Arg-386 with Gly in Dynamin 1 Middle Domain Reduced GTPase Activity and Oligomer Stability in the Absence of Lipids., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Vol. 76, pp2195-2200, DOI 10.1271/bbb.120462 (査読有)

[学会発表] (計2件)

①高橋清文, 大友雅広, 長田賢一, 山口 登, 中島秀喜, 三好 洋、阻害剤と変異体を用いた Dynamin GTPase Activity の解析、第34回 日本分子生物学会年会、横浜市、パシフィコ横浜、平成23年12月16日

②三好 洋, Artem V. Domashevskiy, 中島秀喜, Dixie J. Goss、カブモザイクウィルスのゲノム結合タンパク質によるアメリカヤマゴボウ抗ウイルス蛋白の抑制、第85回 日本生化学会大会、福岡市、福岡国際会議場、2012年12月15日

[その他]

ホームページ

<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

友尾幸司 (TOMOO KOJI)
大阪薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：70257898

(3) 連携研究者

なし