

キュウリモザイクウイルス 2b 変異タンパク質の大腸菌及び 植物での発現解析

植物育種科学講座 細胞工学

末田 香恵

【背景と目的】

RNA サイレンシングは、宿主となる植物が自身に感染するウイルスに対して起こす防衛機構の一つであり、配列特異的に RNA を分解する。この防衛機構を阻害するため、植物ウイルスは RNA サイレンシングサプレッサータンパク質 (RSS) をコードしている。RSS によるサイレンシング抑制機構の詳細はタンパク質の結晶構造解析などにより知ることができる。しかし、そのためにはタンパク質の大量合成が必要である。本研究では RSS の機能解析のため、CMV の subgroup I の 2b タンパク質の大腸菌発現を試みた。

【方法】

2b タンパク質の大腸菌発現のため pMAL c2x vector に様々な 2b ORF 全長をクローニングし、マルトース結合タンパク質 (MBP) との融合タンパク質として発現させた。2b タンパク質の発現は 2b 抗体を用いた Western blotting により確認した。さらに大腸菌の生育曲線をもとに、これらのタンパク質の大腸菌に対する毒性を比較した。また 2b ORF へ導入した変異が CMV の植物への感染性に影響するかを調べるため、2b ORF を欠失したウイルスベクター (H1 vector) に導入し、植物での発現解析を行った。

【結果と考察】

ユリから分離された HL-CMV 由来の 2b (HL2b) は大腸菌で発現したが、CMV-Y 由来の 2b (Y2b) には毒性があり大腸菌の生育を阻害した。Y2b と HL2b のキメラ 2b 変異タンパク質の発現解析の結果、104 番目のアミノ酸が HL 型のときに大腸菌毒性は緩和されてよく発現するようになった。Y2b と HL2b の 104 番目のアミノ酸は、それぞれグルタミン酸 (酸性アミノ酸) とリジン (塩基性アミノ酸) である。104 番目のアミノ酸のみが異なる変異タンパク質の大腸菌毒性を比較したところ、104 番目のアミノ酸が酸性アミノ酸であるときに大腸菌毒性を誘発した。Y2b が大腸菌毒性を示す原因として、Y2b の持つ転写因子活性が考えられる。すなわち Y2b は大腸菌の DNA と結合し、大腸菌の生存に必須な転写を阻害するために毒性を持ったのではないかと推測される。大腸菌毒性のない HL2b や Y2b の 104 番目のアミノ酸のみを HL 型に変えた変異体は転写活性を持たず、大腸菌の転写をかく乱しないために毒性を示さないと考えられる。30 種類の 2b タンパク質のアミノ酸配列を比較したが、104 番目のアミノ酸が酸性アミノ酸でないものは他にはなかった。しかし、C 末端に存在する他の酸性アミノ酸も考慮すると、酸性アミノ酸以外への変異を持つ CMV が 4 種類存在し、そのうち 3 種類がユリ科植物から分離された CMV であった。これより、このような C 末端側のアミノ酸変異はユリ科植物への適応の際に獲得したと考えられる。また、これらの変異は植物に対する感染性には影響しなかったが、感染葉中での 2b タンパク質は大腸菌毒性の低いものほど多く検出された。