

Title	Functional Dissection of the Major Structural Protein of Bluetongue Virus : Identification of Key Residues within VP7 Essential for Capsid Assembly
Author(s)	林, 昌宏
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43224
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"＞ 大阪大学の博士論文について ＜/a＞ をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	いむ ちゃん がん 林 昌 宏
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 6 4 6 4 号
学位授与年月日	平成13年7月4日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Functional Dissection of the Major Structural Protein of Bluetongue Virus : Identification of Key Residues within VP7 Essential for Capsid Assembly. (ブルータングウイルス主要タンパク質の機能解析：キャプシド形成に必須な VP7 のアミノ酸残基の同定)
論文審査委員	(主査) 教授 松浦 善治 (副査) 教授 松田 道行 教授 生田 和良

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

ブルータングウイルス（以下 BTV）はレオウイルス科オルビウイルス属、直径86nm のエンベロープを持たない二本鎖 RNA ウイルスである。BTV は7つのタンパク質（VP1 から VP7）と10本の RNA セグメントにより複雑に構成されており、タンパク質-タンパク質間およびタンパク質-RNA 間相互作用の両観点からも重要な研究対象となっている。BTV 粒子は正二十面体で、内外二層のキャプシドから構成されている。外側のキャプシドは VP2 と VP5 により、内側のキャプシドは VP3 と VP7 により構成されている。キャプシドの内側には VP1、VP4、VP6 とウイルス RNA が包含されている。VP7 分子は2つのドメイン、上部と下部ドメインに区別できる。上部ドメインは主に β サンドイッチ構造からなり、下部ドメインは9つの α ヘリックスにより構成される。VP7 は三量体を形成するために広範囲に渡って相互作用し、三量体形成には他の分子を必要としないことから、三量体形成はキャプシド構築過程において重要な役割を演じていることが推測される。しかしながら、VP7 のキャプシド構築における三量体形成の役割に関する研究はこれまでに行われていない。本研究は BTV VP7 のキャプシド構築に重要なアミノ酸残基を同定し、その役割を明らかにすることを目的とする。

【方法ならびに成績】

VP7 の X 線結晶回折像をもとに、VP7 のフォールディングには影響しないと予想される7種の点変異を下部領域に導入し変異体を構築した。VP3 と VP7 三量体との相互作用は、組換えバキュロウイルスを用いて昆虫細胞内で VP3 と VP7 を同時発現することにより形成される BTV のコア様粒子（Core like particle、以下 CLP）の産生を指標に解析した。また、電子顕微鏡により VP3 と VP7 の CLP 内での相互作用の観察を行った。VP7 の三量体形成は電気泳動法およびグルコース密度勾配遠心法を用いて解析した。作製した7種の変異体の内、3つは CLP の安定性に重大な影響が認められ、2つはわずかな影響が観察された。1つの変異体では全く影響は見られなかったが、残りの1つの変異体は非可溶性となり凝集塊を形成したことから、VP7 のフォールディングを妨げたと考えられた。可溶性の6つの VP7 変異体を精製し三量体形成能を調べたところ、全て三量体を形成することが確認された。以上の結果から、VP7 分子内の1アミノ酸残基の置換は複雑な三量体内の相互作用を阻害するには十分ではないことが、VP7 三量体内のわずかな変化は CLP を不安定化しうることが明らかとなった。

【総括】

本研究は、BTV VP7の三量体形成に重要で、しかもキャプシド形成に必須なVP7とVP3の相互作用に影響を及ぼす一連のアミノ酸残基を明らかにした。これまでのX線結晶回折の結果から、VP7は構造的な配置転換に柔軟に対応出来ると考えられていたが、今回の成績からVP7は予想したほどの可塑性がないことが明らかになった。このことは、VP7の原子構造解析では明らかに出来なかったことである。本研究におけるCLPの不安定化はおそらく変異体の三量体-三量体間の相互作用の不安定化によるものと考えられる。なぜなら、その接触表面は限られており、変異体による三量体内での結合角度やコンフォメーションへの微妙な変化が、三量体-三量体間の接触に物理的変化を起し、その相互作用に大きく影響すると考えられるからである。加えて、変異はVP3と直接相互作用する三量体底面のコンフォメーションにも間接的に変化を与え、VP7三量体とVP3間の相互作用に影響していると考えられる。本研究は、VP7の原子構造を補足し、VP7分子の正確な多量体形成がBTVのキャプシド構築上重要であることを生物学的および生化学的に示すものである。

論文審査の結果の要旨

ブルータングウイルスは、小児に下痢を引き起こすロタウイルスに近縁な2本鎖RNAウイルスである。本ウイルスは比較的容易に活性を保持したウイルス蛋白質を大量に発現できるため、キャプシドの形成機構の解析の重要なモデルとなっている。X線構造解析の結果から、キャプシドの構成蛋白質の一つであるVP7が三量体を形成することがキャプシド形成に重要であることが推測されているものの、詳細な解析はこれまで行われていなかった。申請者はVP7の各種変異体を作製しキャプシド形成に必須な一連のアミノ酸残基を同定した。X線解析の成績からVP7はアミノ酸の変異に柔軟に対応出来ると推測されたが、今回の成績はVP7は予想したほどFlexibilityがないことを明らかにした。

本研究は、これまでのX線解析の成績を補足し、VP7の正確な多量体形成がブルータングウイルスのキャプシド形成に重要であることを生物学的および生化学的に示すものである。したがって、学位の授与に十分値するものと考えられる。