



Title	Assembly Mechanism of a Double Shelled Virus, Rice Dwarf Virus
Author(s)	宮崎, 直幸
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45599
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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	宮 崎 直 幸
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 19235 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 17 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科高分子科学専攻
学 位 論 文 名	Assembly Mechanism of a Double Shelled Virus, <i>Rice Dwarf Virus</i> (二重殻構造を持つイネ萎縮ウイルスの自己組織化機構)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 中川 敦史 (副査) 教 授 月原 富武 教 授 福山 恵一 助教授 楠木 正巳

論 文 内 容 の 要 旨

イネ萎縮ウイルス (RDV) は、粒子質量が約 7500 万 Da、直径約 700 Å の二重殻構造を持つレオウイルス科に属すウイルスであり、7 種類のタンパク質と 12 本に分節した 2 本鎖 RNA から構成されている。RDV は、ツマグロヨコバイという昆虫により媒介されイネ科植物に感染し、増殖する。感染した株は生育が阻害され、収量が激減する。RDV の二重殻キャプシドの内殻は P3 タンパク質、外殻は P8 タンパク質により形成されている。X 線結晶構造解析により RDV 全体の原子構造を明らかにし、900 ものタンパク質から構成されている RDV キャプシドが構造形成する際に利用する構造構築の機構を解明することを目的として研究を行った。

RDV の結晶は、空間群 $I 222$ で、単位格子 ($a=770\text{Å}$ 、 $b=795\text{Å}$ 、 $c=814\text{Å}$) 中に 2 個の RDV 粒子を含んでいた。データ収集は放射光施設 Photon Factory において合計 86 個の結晶から行い、 3.5Å 分解能までの完全性 97.7%、 $R_{\text{merge}}=0.186$ を収集した。位相は 26Å 分解能のクライオ電顕の電子密度図を初期位相として用い、その位相を RDV が持っている正二十面体対称を利用した非結晶学的平均化と溶媒平滑化による位相改良/位相拡張を 3.5Å 分解能まで行うことにより決定した。最終的に得られた 3.5Å 分解能の電子密度図は非常に明瞭であり、正二十面体の非対称単位に存在する 2 分子の P3 タンパク質、13 分子の P8 タンパク質、P7 タンパク質の一部の構造を決定することに成功した。その構造を精密化した結果、 $R=0.303$ 、 $R_{\text{free}}=0.306$ になった。

内殻を構成する P3 タンパク質は、非常に薄い板状の構造をしていた。P3 タンパク質は内殻内で 2 通りの異なったコンフォメーション (P3A、B) を取っていた。P3B サブユニットの N 末端は、隣の P3A サブユニットのキャプシド内部表面に長く伸びながら相互作用しており、他の P3 サブユニット間に比べ強固に結合していた。生化学的な解析においても P3 の 2 量体は観測されており、この強固に結合している P3 の 2 量体が内殻の構造構築の際に最初に形成され、これを基本単位として内殻構造全体が構築されていくと考えられた。さらに、N 末端欠失変異体を作成することで N 末端領域の内殻粒子形成の際の重要性を確認した。内殻の各 5 回軸内側には転写複合体の電子密度が観測されることから、次に P3 の 2 量体は 5 回軸周りで転写複合体と相互作用しながら 10 量体に会合した後、それがさらに集まり、球殻構造を構築することが明らかとなった。

外殻を構成する P8 タンパク質は互いにきつく巻きついた 3 量体を形成し、5 箇所 (P、Q、R、S、T) の異なった内殻粒子表面に結合し、外殻を形成している。この内、3 回軸で結合している T-trimer が最も強固に内殻粒子と結

合していることが判明し、外殻の構造形成に際し、最初に結合するということが示唆された。この T-trimer の結合は、主に静電的な相互作用により行われており、それは生化学的にも確かめられた。また、P8 の 3 量体はそれのみで 2 次元結晶を形成する能力があり、外殻の他の P8-trimer は、先に結合した T-trimer をアンカーにして横同士の主に静電的な相互作用により会合し、最終的にウイルス粒子全体が構築されるということが解明された。

論文審査の結果の要旨

イネ萎縮ウイルス (RDV) は、粒子質量が約 7500 万 Da、直径約 700 Å の二重殻構造を持つレオウイルス科に属すウイルスであり、7 種類のタンパク質と 12 本に分節した 2 本鎖 RNA から構成されている。

RDV は、これまでに原子レベルで構造解析された最も大きな生体超分子複合体である。この構造解析には、慎重なデータ処理と膨大な計算が必要であったが、申請者は、3.5 Å 分解能での原子構造の解明に成功し、正二十面体の非対称単位に存在する 2 分子の P3 タンパク質、13 分子の P8 タンパク質、P7 タンパク質の一部の精密な原子構造を決定することに成功した。

さらに、この原子構造に基づいて、各タンパク質間相互作用を詳細に検討することにより 2 種類 900 個の分子が、階層的に構造構築を行うモデルを提案し、生化学的実験により、そのモデルを支持する結果を得た。

これらの結果は、巨大なウイルスの原子レベルでの構造解析に新たな道筋をつけただけでなく、複雑なウイルスの構造構築機構に重要な知見を与え、構造生物学およびウイルス学の分野に大きく貢献するものであり、博士（理学）の学位に値するものであると認める。