

2022/07/19

植物病原体の病原性因子の構造解析

東京大学

大島研郎

1. 成果の概要 (1~2 ページ)

実施内容

植物 RNA ウイルスであるオオバコモザイクウイルス (plantago asiatica mosaic virus; PIAMV) の増殖に必須のタンパク質、複製酵素の膜局在ドメイン (MET ペプチド) の構造を解析した。

<試料調製>

無細胞合成系を用いて ^{13}C , ^{15}N 標識された MET ペプチドの配列 FEDILSGNLLQRMLRPLRSGLTQLLDFF を調製した。試料が目的の物質であることは、鋳型 DNA の配列確認、と最終ペプチド標品の質量分析により確認した。試料の純度は逆相カラム Jupiter® 5 μm C18 300 Å, LC Column 150 x 4.6 mm (Phenomenex)) により単ピークであることと NMR 測定により問題ないことを確認した。測定用試料は濃度 0.4 mM、容量 300 μL であった。溶媒は 20 mM d3-NaOAc (pH5.6), 100 mM d₂₅-SDS, 10% D₂O を用いた。

<NMR スペクトルの解析>

MET ペプチドの各原子における化学シフト帰属は、一般的な三重共鳴法を用いて行った。主鎖の化学シフトは、Phe1 の HN および N を除き、帰属を得た。側鎖の化学シフトも Phe1 の C δ /H δ と C ζ /H ζ 、Leu10 の C δ 2、Leu24 と Leu25 の H γ を除き、帰属を得た。また、Pro16 の C β 、C γ の化学シフト差から Arg15 と Pro16 はトランスペプチド結合で結合していることが分かった。

^1H , ^{15}N -HSQC スペクトル上でほぼ全てのシグナルで強度の大きい主ピークと小さな副ピークの組が見られた。副ピークの強度は、主ピークの 1 割未満で、低頻度に存在するマイナーな構造由来と思われるが、NOESY スペクトルならびに ZZ exchange スペクトルの結果、両シグナルの間の化学交換は存在しないものと考えられる。このため、メジャーな構造の決定にこれらの副シグナルは関与しないものと考え、主シグナルのみを用いて構造決定を行った。

本課題により得られた成果、当初目標と結果との比較

得られた MET ペプチドの構造は主鎖原子座標の root mean square deviations (RMSD) が 0.24 ± 0.07 Å と収束がよく、バイオリゼーションもないことから全般的に十分な精度で得られた。一方で Leu の化学シフトはかなり重なりがはげしく、一部の Leu (9,10,17) 以外の Leu 側鎖の χ_1, χ_2 を決められる情報がなく、測定から角度を決めるのは困難であった。MET ペプチドはミセル存在下において、Pro16 で約 36.7° 曲がったヘリックス (Asn8-Phe27) からなる構造であることが分かった。また、疎水性残基はヘリックスの片側に偏って存在することから、この疎水面をミセル側、逆側を溶媒に露出させたような形でミセルに結合するものと考えられる。また、DOSY スペクトルから得られたミセル存在下での MET ペプチドの拡散係数は 1.26×10^{-10} ($\log_{10}(-9.9)$) m^2/sec であり、

これは分子量で 16,000 Da 程度に相当する。一方、SDS の aggregation number を 50 とするとミセルと MET ペプチド(1分子)をあわせた分子量は 18,000 Da 程度であることから、MET ペプチドは SDS ミセルと挙動を共にしていると考えられる。

得られた構造は、ヘリックスの片側に疎水性、反対側に親水性のアミノ酸が集まった両親媒性の特徴を示しており、MET ペプチドが植物の細胞内膜系に結合することと合致していた。その後、これら両親媒性に関わるアミノ酸とヘリックスの湾曲に関わるプロリンへの変異導入、およびそれら変異体の細胞内局在解析とウイルス接種実験を行い、このヘリックスのウイルス複製における重要性を明確に示すことができた。PIAMV を含むひも状ウイルスの複製酵素の膜局在性ドメインの発見、およびそれが湾曲した両親媒性ヘリックスであったことは新規な発見であり、以上の NMR 解析を含めた結果は、Journal of Virology 誌に受理された(Komatsu et al., 2021; <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.01906-20>)。本論文にはスタッフの方々も共著者として加わっていただいております、解明された構造についても詳細に記載している。

今後の展開、課題

本課題の結果から植物 RNA ウイルスの複製酵素の膜局在性ドメインの構造が明らかにできた。今後、ウイルス複製や膜結合性に影響を与えたこのドメインへの変異が実際に構造にどのように反映するかについて明らかにすることには価値があると考えられる。

また、このドメインを含む複製酵素全体がどのように膜と結合しているのかについても未解明である。この課題は複製酵素のタンパク質のサイズ(150kDa 以上)を考えると現状かなり難しいが、タンパク質構造解析の進展が著しい現在、今回解明された構造は、それを含めた複製酵素全体の構造について解明していく手がかりとなると考えられる。

2. 利用における感想(改善要望等を含む)

ペプチドの発現から解析まで、非常に粘り強く取り組んでいただき、予想以上の結果を得ることができたことは望外であり、スタッフの皆様には心から感謝申し上げます。論文投稿の際も PDB への構造の登録含めお手伝いいただくなど、最後まで親切丁寧にお付き合いいただいたことには感謝の言葉もない。こうした研究基盤の外部解放と共同研究の仕組みを今後とも維持していただけると、日本の科学研究の進展に大きく寄与することを信じて疑わない。

3. 利用周辺環境に関する希望

特にありません。

4. 今後の利用予定

今のところ予定はありませんが、同様の研究がある際は真っ先に利用を考えたいです。

5. 今後期待するその他のサービス

特にありません。

6. その他

本課題につきお世話になった、渡部博士、栃尾博士、木川博士に心から御礼申し上げます。

7. 利用実施時期及び期間

2013 年 1 月 28 日 ~ 2013 年 4 月 25 日

当初計画どおり

8. 利用研究基盤

| | | |
|-----------|---|---------|
| 溶液 600MHz | 2013 年 01 月 28 日 9 時~2013 年 02 月 02 日 9 時 | (5 日間) |
| 溶液 600MHz | 2013 年 02 月 25 日 9 時~2013 年 03 月 04 日 9 時 | (7 日間) |
| 溶液 600MHz | 2013 年 04 月 01 日 9 時~2013 年 04 月 08 日 9 時 | (7 日間) |
| 溶液 600MHz | 2013 年 04 月 15 日 9 時~2013 年 04 月 25 日 9 時 | (10 日間) |