

ウメ綸紋ウイルスの外被タンパク質のアミノ酸の違いによるウイルスの性状に関する研究

NATSUME, Yuki / 夏目, 祐樹

(出版者 / Publisher)

法政大学大学院理工学・工学研究科

(雑誌名 / Journal or Publication Title)

法政大学大学院紀要. 理工学・工学研究科編

(巻 / Volume)

56

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

3

(発行年 / Year)

2015-03-24

(URL)

<https://doi.org/10.15002/00011444>

ウメ輪紋ウイルスの外被タンパク質のアミノ酸の違いとウイルスの性状に関する研究

AN AMINO ACID SUBSTITUTION OF THE COAT PROTEIN OF *PLUM POX VIRUS*
ALTERS ITS MOBILITY ON SDS-PAGE

夏目祐樹

Yuki NATSUME

指導教員 濱本 宏

法政大学大学院理工学研究科生命機能学専攻植物医科学領域修士課程

Plum pox virus (genus *Potyvirus*, family *Potyviridae*, PPV) is one of the most devastating plant viruses in the world. In 2009, PPV was first detected in Japanese apricot trees in Tokyo. We obtained four sample trees, Ak19-8, Ak19-9, Ak19-11, and Ak19-14, from a single field in Akiruno city, Tokyo. The symptoms of these trees were almost the same, however, by a Western-blot analysis, viral coat protein (CP) of Ak19-8 is apparently smaller than those of other three trees. We analyzed the sequences of their genomic RNAs and compared the deduced amino acid sequences of the CPs. We found difference in 66th amino acids, which was glycine in Ak19-8, while they were glutamic acid in Ak19-9, 11 and 14. This position is known to affect the manner of the modification of CP. It is also reported that CP was modified by *O*-linked *N*-acetylglucosamine (*O*-GlcNAc), which was suggested to work for host fitness. We separated the CPs of purified Ak19-8 and Ak19-14 particles by SDS-PAGE, and the CP bands were subjected to the MALDI-TOF MS analysis. The CP of Ak19-14 has two peaks correspond to the peptide of 40-93 amino acids carrying two and five *O*-GlcNAc, suggesting that the CP of the Japanese PPV are also modified by *O*-GlcNAc, and the manner of the modification could be different according to the 66th amino acid.

Key Words: *Plum pox virus* (PPV), *Coat protein*, *modification*, *Western-blot*, *MALDI-TOF MS*

1. 緒言

ウメ輪紋ウイルス(*Plum pox virus*; PPV)は *Prunus* 属の果樹に甚大な被害をもたらす *Potyvirus* 属のウイルスである。当大学で保有している 4 本の PPV 感染ウメ樹 Ak19-8, -9, -11, -14(図 1)は、病徴には大きな差異は認められない(図 2)。しかし、それらの罹病葉から全タンパク質を抽出し、ウエスタンブロット解析を行った結果、Ak19-8 に感染する PPV 株(Ak19-8 株)の外被タンパク質(CP)の分子量が他の 3 株よりも小さいことを見出した。DNA シークエンスデータを用いて CP のアミノ酸配列を比較したところ、66 番目のアミノ酸において、Ak19-8 株がグリシンであるのに対して、他の 3 株ではグルタミン酸であることだけが異なり、アミノ酸長や他のアミノ酸配列は差がなかった(図 3)。CP の 66 番目のアミノ酸は CP の修飾に関与しているとの報告があり、修飾はウイルスの感染性に関与していると言われている。よって、保有している PPV の CP にも同様の修飾が起こっているのか、またこの現象が修飾によるものなのか、さらには修飾が感染に影響を与えているかを解明することを目的とした。



図 1 4 本の PPV 感染ウメ樹



図 2 PPV 感染ウメ樹の罹病葉
(左)Ak19-8 (右)Ak19-14

-8	1	ADEREDEEEVDAGKPIVVITAPAAATSPMLQPPPVIQAPART	40
-9	1	40
-11	1	40
-14	1	40
66			
-8	41	TAPMLNPIFTPATTQPAKPFVSQVSGFQLQTFGTGYNEDA	80
-9	41E.....	80
-11	41E.....	80
-14	41E.....	80
81			
-8	81	SPSNSNALVNTNRDRDVGSIQFTVPRKAMTSKLSLP	120
-9	81	120
-11	81	120
-14	81	120
121			
-8	121	KVKGKAIMNLNHLAHYSPAQVDLSNTRAPQSCFQTWYEGV	160
-9	121	160
-11	121	160
-14	121	160
161			
-8	161	KRDYDVTDDSESIILNGLMVWCIENTSPNINGMWVMDG	200
-9	161	200
-11	161	200
-14	161	200
201			
-8	201	ETQVEYPIKPLLDHAKPTFRQIMAHFSNVAEAYIEKRNYE	240
-9	201	240
-11	201	240
-14	201	240
241			
-8	241	KAYMPRYGIQRNLTDYSLARYAFDFYEMTSTTPVRAREAH	280
-9	241	280
-11	241	280
-14	241	280
281			
-8	281	IQMKAALRNVRNLFGLDGNVGTQEEDTERHTAGDVNRN	320
-9	281	320
-11	281	320
-14	281	320
321			
-8	321	MHNLGVRGV	330
-9	321	330
-11	321	330
-14	321	330

図3 Ak19-8, 9, 11, 14 株の外被タンパク質の
アミノ酸配列比較

2. 材料及び方法

2010 年 3 月に東京都あきる野市内の同一圃場で採取された 4 樹の PPV 感染ウメ樹のうち、Ak19-8 と Ak19-14 をサンプルとして使用した。Ak18-8 と Ak19-14 の葉粗汁液を接種源とし、エンドウに汁液接種を行ってウイルス粒子精製のウイルス源とした。そして、粒子精製を行ったサンプルは限外濾過を行った後、SDS-PAGE (ATTO WSE-1100) とウエスタンブロット(ATTO WSE-4110)を行って CP のバンドを得た。このバンドを切り出し、MALDI TOF-MS 解析(Genomine 社受託)を行った。さらに、PPV の CP 遺伝子をタンパク質発現プラスミド pColdI (TaKaRa)に導入し、大腸菌に形質転換して大腸菌内で CP を発現させた。

3. 結果

(1) CP の分子量の差異は N 末端に由来する

Ak19-8 と Ak19-14 の罹病葉から全タンパク質を抽出し、ウエスタンブロット解析を行ってバンド比較を行うと、約 30kDa 程にバンドが認められることがわかった(図 4)。粒子精製を行ったサンプルから同様に SDS-PAGE を行い、その位置のバンドを切り出して MALDI-TOF MS 解析とマ

スコット分析を行った結果、このバンドは CP の分解産物であることがわかった。また、マスコット分析において CP のコア領域から C 末端側に一致するピークを得ることができた。よってこれらの CP のバンドの位置の差異は、CP の N 末端側が関与していると思われる。

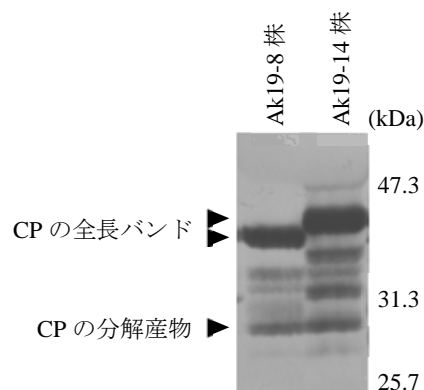


図 4 CP の分解産物の電気泳動度

(2) N 末端を保持するウイルス粒子の精製

粒子精製を行う過程で、CP が分解されてしまうことで約 30kDa のバンドが強く現れ、CP の全長である約 42kDa のバンドが現れないことがあった。そこで、精製の過程における罹病葉破碎時と超遠心後のペレット磨砕時のそれぞれに植物用 Protease Inhibitor を添加した。その結果、Protease Inhibitor を罹病葉磨砕時に添加することで全長バンドの回収量が上がり、ペレット磨砕時に添加することで分解産物のバンドを低減させることができた(図 5)。

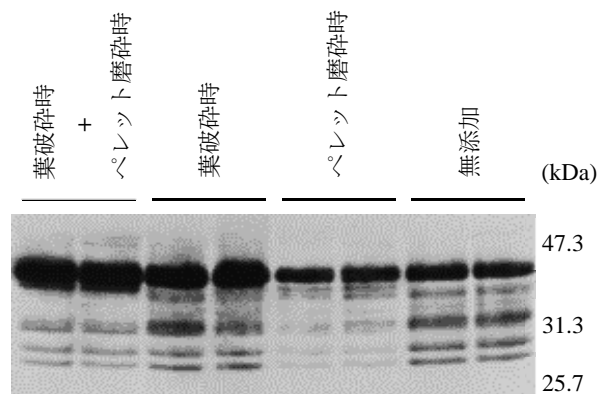


図 5 Protease Inhibitor の添加の効果

(3) MALDI-TOF MS によるピークの違い

粒子精製で得られたバンドを切り出し、MALDI-TOF MS を行った結果、Ak19-8 株及び Ak19-14 株の全長 CP 由来するバンドのうち、Ak19-14 株では N 末端側の 40~93 番目のアミノ酸のペプチドに、O-GlcNAc が 2 分子、あるいは 5 分子結合していると思われるピークが認められた(図 6)。しかし、高分子両側のピークは十分な精度が得られておらず、サンプルの純度や量、あるいは MALDI-TOF MS の分析法等をより改良する必要があると考えられる。

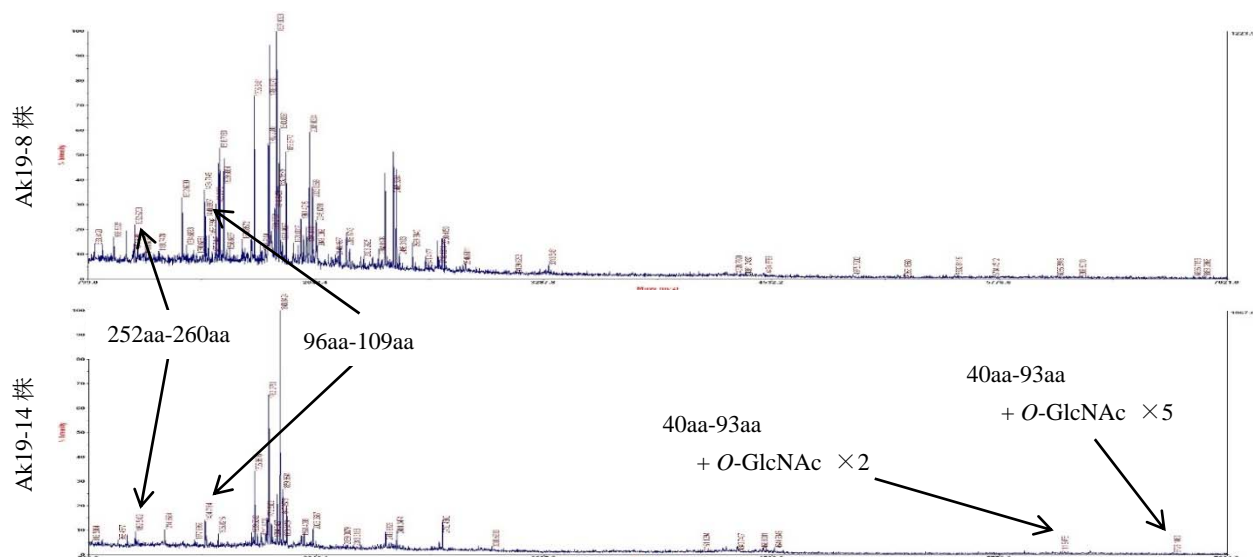


図6 Ak19-8株及び19-14株のCPのMALDI-TOF MS解析

は

(4) 大腸菌内でのCPの生産

Ak19-8株, Ak19-14株それぞれのCP遺伝子をRT-PCR法によって(表1)増幅し, In-Fusion クローニング法を用いてpColdIに導入し, His-tagとFactor Xaとの融合タンパク質として大腸菌内で生産した。His-tagに対するアフィニティークロマトグラフィーによって精製したタンパク質をSDS-PAGE, ウェスタンブロット解析を行った結果(図7), 最も強く現れているバンドにおいては, 大腸菌内で得られたタンパク質にも計算分子量から推定される以上の電気泳動度の差が見られた。しかし, His-tagを用いて精製したバンドの中で最も分子量の大きいバンドを比較すると, 位置に差はほとんど見受けられなかった。また, 当初用いたJM109株でなく, タンパク質発現に適している大腸菌株であるBL21を使用すると, 一番高い分子量のバンドが明瞭となり, 系統間での差は同様に見受けられなかった。

表1 In-Fusion cloning に用いたプライマー

Name	Sequence(5' to 3')
InFNdeI_PPV cpF	TCGAAGGTAGGCATAACGCTGACGA AAGAGAAGA
InFNdeI_PPV cpR	GTACCGAGCTCCATACTACTCTCCC CTCACACC

4. 考察

今回の研究によって, 日本産 PPV も糖鎖等による修飾を受けている可能性が示された。AK19-8株と他の3つの株のCPの見かけの分子量の違いは, 66番目のアミノ酸の違いによってこの修飾様式が変わることによると考えられる。前島らの報告した株の配列データを調べると, 東京都内で採取されたPPV罹病樹から検出されたPPVのアミノ酸配列では, 37株中の33株の66番目のアミノ酸がグリシンであった。そのため, 東京都内で蔓延しているPPV

Ak19-8株に近い系統が多いと思われる。66番目のアミノ酸はCPの修飾に関与していると言われていることから, これら2種類の系統に病原性の差異が存在するかどうか現在実験中であり, 病害抵抗性との関連が明らかになることが期待される。

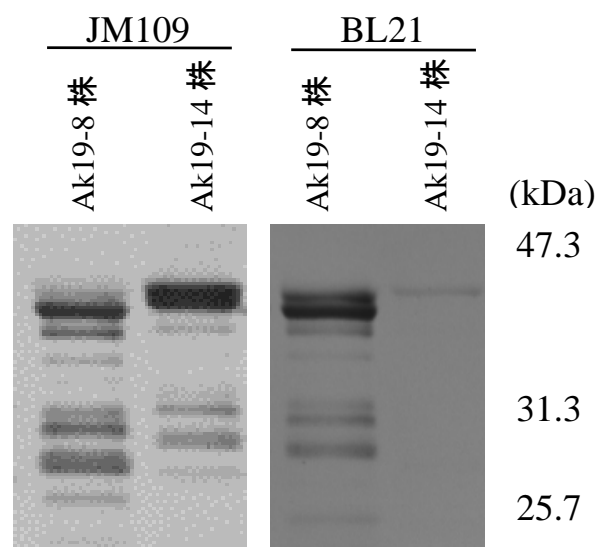


図7 大腸菌内で生産したCPの分子量解析

参考文献

- 1)Chen, D. et al. : Identification of secret agent as the *O*-GlcNAc transferase that participates in Plum pox virus infection., Journal of Virology, Vol. 79, pp.9381-9387, 2005
- 2)Maejima, K. et al. : Molecular epidemiology of Plum pox virus in Japan., Phytopathology, Vol.101, pp.567-574, 2011
- 3)Subr, Z. et al. : Unfolding the secrets of plum pox virus: from epidemiology to genomics., Acta Virologica, Vol.57, pp.217-228, 2013