

ウメ輪紋ウイルスと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

夏目, 祐樹 / NATSUME, Yuki

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

44

(発行年 / Year)

2015-03-24

(学位授与年月日 / Date of Granted)

2015-03-24

(学位名 / Degree Name)

修士(生命科学)

(学位授与機関 / Degree Grantor)

法政大学 (Hosei University)

2014 年度 修士論文

ウメ輪紋ウイルスと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

指導教員 濱本 宏

大学院理工学研究科
生命機能学専攻修士課程

13R7202

ナツメユウキ
夏目祐樹

目次

第 1 章: 緒 言	1p
第 2 章: 材料及び方法.....	4p
2-1 研究材料	
2-2 SDS-PAGE、CBB 染色、ウエスタンブロット	
2-2-1 サンプル作製	
2-2-2 SDS-PAGE	
2-2-3 CBB 染色	
2-2-4 ウエスタンブロット	
2-3 PPV 粒子の精製	
2-4 大腸菌内での PPV-CP 発現	
2-4-1 PPV の全長 RNA の抽出	
2-4-2 CP インサートの作製	
2-4-3 In-Fusion クローニングによるプラスミドへのライゲーション	
2-4-4 大腸菌への形質転換及びプレーティング	
2-4-5 コロニーPCR によるインサートチェック	
2-4-6 大腸菌のタンパク質発現	
2-4-7 大腸菌内発現タンパク質の His タグアフィニティークロマトグラフィー精製	
第 3 章: 結 果	26p
3-1 ウイルス粒子精製におけるプロテアーゼ阻害剤の効果比較	
3-2 精製粒子の MALDI-TOF MS 解析	
3-3 CP 分解産物のフィンガープリンティング解析	
3-4 大腸菌内発現タンパク質の SDS-PAGE	
第 4 章: 考 察	35p
摘 要.....	39p
引用文献.....	42p

第 1 章 諸 言

ウメ輪紋ウイルス(*Plum pox virus*: PPV)は、モモやアンズなどの *Prunus* 属の植物に感染する世界的にも重要な植物ウイルスである。PPV は 1915 年にブルガリアで初めて発見され、現在は欧州、北米や南米、アジア等でも確認されている。PPV はアブラムシによって媒介されるほか、穂木や苗を経由しても感染することが知られている。植物が PPV に感染すると、葉に退緑斑紋や輪紋が生じるほか、果実にも輪紋症状が現れるとの報告がある (Cambra et al., 2006; Schneider et al, 2011)。

日本国内では、2009 年に東京都青梅市内のウメ樹に感染していることが確認され(前島ら, 2009)、現在では東京都と兵庫県を中心として感染が確認されている。農林水産省では現在、植物防疫法に基づいた PPV の緊急防除を、東京都内の防除区域で行っている(農林水産省 HP)。

法政大学では 2010 年 3 月に東京都あきる野市内で 4 本の PPV 感染ウメ樹を採取し、それぞれ Ak19-8、Ak19-9、Ak19-11、Ak19-14 として保管している。それらの罹病葉から全タンパク質を抽出し、ウェスタンブロット解析を行った結果、Ak19-8 株の PPV の外被タンパク質(Coat Protein: CP)の分子量が他の 3 株よりも小さいことを見出した。また鍵和田研有波による DNA 全長配列のシーケ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、アミノ酸長に違いは認められなかった。しかし、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った。過去の知見によると、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る(Subr and Glasa, 2013)。また、修飾はウイルスの感染性に関与しているとの報告も存在する(Chen et al., 2005)。

以上のことから、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。

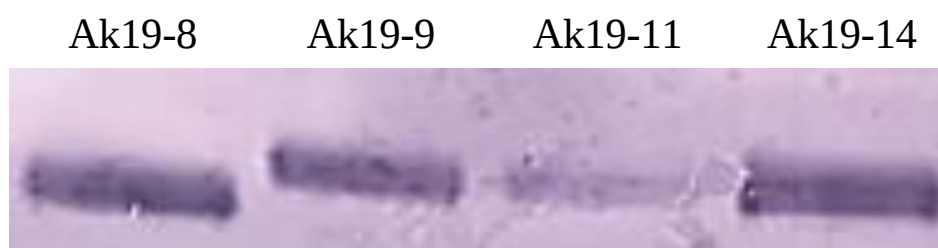


図1 株ごとのバンドの位置の差異

```

-8  1  ADEREDEEEVDAGKPIVVTA PAATSPMLQPPFVIQ PAPRTTAPMLNPIFTPATTTQATKPVSVQVSGPQLQTFGTGNE DASPSNSNALVN 90
-9  1  .....E..... 90
-11 1  .....E..... 90
-14 1  .....E..... 90

-8  91  TNRDRDWDAGSIGTFTVPRLKAMTSKLSLPKVKGAIMNLNHLAHYSPAQVDLSNTRAPQSCFQWYEGVKRDYDVTDDDEMSIILNGLMV 180
-9  91  ..... 180
-11 91  ..... 180
-14 91  ..... 180

-8  181  WCIENGTS PNINGMWVMMDGETQVEYPIKPLLDHAKPTFRQIMAHFSNVAEAYIEKRNVEKAYMPRYGIQRNLTDYSLARYAFDFYEMTS 270
-9  181  ..... 270
-11 181  ..... 270
-14 181  ..... 270

-8  271  TTPVRAREAHIQMKAALRNWQNRLFGLDGNVGTQEEDTERHTAGDVNRNMHNL LGVRGV 330
-9  271  ..... 330
-11 271  ..... 330
-14 271  ..... 330

```

図 2 4 株の CP のアミノ酸配列の比較

第 2 章 材料及び方法

2-1 研究材料

Ak19-8 及び Ak19-14 の PPV 感染ウメ葉を接種源とし、罹病葉 0.25g に対して接種バッファー(0.1M Na-K リン酸バッファーpH8.0 0.1%Na₂SO₃ 添加)1ml を加えて磨砕し、播種後 7 日後のエンドウに接種してサンプルとした。また、罹病エンドウ葉を接種源とする際には、罹病葉 0.5g に対して接種バッファーを 1ml 加えて磨砕した。

2-2 SDS-PAGE、CBB 染色、ウエスタンブロット

2-2-1 サンプル作製

PPV 罹病葉を 1.5ml チューブに入れ、ATTO 社の AE-1430 イージーアプライ(以下 2x Sample buffer と表記)に DDW を等量加えて希釈した 1x Sample buffer をチューブに加えてペッスルで磨砕した。そして TAITEC 社の DTU-Neo を用いて 95℃で 5 分間ヒートブロックをし、SDS 化させた。その後氷上で冷却し、スピンドウンした。

また、精製粒子液をサンプルとして用いる場合には、サンプルに対して等量の 2x Sample buffer を加えて SDS 化させた。

2-2-2 SDS-PAGE

SDS-PAGE は、ATTO 社の PageRun(以下泳動装置と表記)を用いて行った。ポリアクリルアミドゲルは、ATTO 社の既製のゲルである e-PAGEL E-T15L を使用した。手順は下記の通りである。

1. サニメント手袋を着用し、e-PAGEL を取り出し、e-PAGEL に挿入されているサンプルコームを抜き取る。
ウェル壁のゲルが歪んでいたら、針金等を用いて調整する。その後、泳動バッファーを用いてウェルを洗浄する。
2. 泳動装置のプレートホルダーに、e-PAGEL を設置し、上部槽に装着する。
e-PAGEL が 1 枚の場合には、反対側のプレートホルダーにはダミープレートを装着する。
3. 下部槽に、泳動バッファーを泡立たないように 400ml 注ぎ、上部槽を下部槽に沈める。その後、上部槽に装着された 2 枚の泳動プレート間に泳動バッファーを 70 ~80ml 注ぐ。
4. ウェルに、2-2-1 で作製したサンプルをアプライする。分子量マーカーには、ATTO 社の EzStandard PrestainBlue を用いた。
5. サンプルをアプライした後、電源装置を泳動槽にセットし、スタートボタンを押して泳動を開始する。

6. 泳動終了後、電源装置を泳動槽から外す。サニメント手袋を装着し、下部槽につけたまま、プレートホルダーを上部槽からロック解除し、プレートホルダーを下部槽から取り出す。プレートホルダーから e-PAGEL を取り外す。
7. スパチュラ等の扁平なものを、e-PAGEL の 2 枚の泳動プレート(ガラス)の間に
入れ、スパチュラを上下に動かして、ゲルから泳動プレートを取り去る。外したあと、
ゲルのウェル壁などの余分な部分を除去しておく。

2-2-3 CBB 染色

CBB 染色は和光純薬工業株式会社の Quick-CBB PLUS を用いて行った。手順は下記の通りである。

1. SDS-PAGE を行ったポリアクリルアミドゲルを容器に入れた milliQ 水に浸漬し、
5 分間振盪洗浄をする。これを 3 回行う。
2. 洗浄した milliQ 水を除去し、Quick-CBB PLUS を 25ml 加え、30 分間振盪する。
3. 振盪後、試薬を回収し、milliQ 水を加え、容器にキムワイプを入れて脱色する。

2-2-4 ウェスタンブロット

ATTO 社の powered BLOT mini (以下ブロッターと表記) を使用して行った。手順は下記の通りである。

1. メンブレンを 100%メタノールに約 20 秒間浸漬する。浸漬後、メンブレンをブロッキング用バッファーの B 溶液に 30 分以上浸漬する。
2. ブロッキングに使用する角型濾紙を、A 溶液に 2 枚、B 溶液に 1 枚、C 溶液に 3 枚それぞれ浸漬し、5 分以上静置する。
3. ブロッターから電源部本体を外し、を開く。上部カバーをブロッキング台から取り外す。
4. サニメント手袋を着用後、ブロッターの陽極プレート(下側)上に A 溶液を 4ml 程度滴下し、A 溶液に浸漬しておいた濾紙を 1 枚取って陽極プレートの中央に気泡を入れないよう載せる。A 溶液に浸しておいたもう 1 枚の濾紙をとり、1 枚目の濾紙と 4 辺を合わせて重ねる。
5. 2 枚目の濾紙の上に B 溶液を 4ml 程度滴下し、B 溶液に浸しておいた濾紙を重ねる。
6. SDS-PAGE を行ったポリアクリルアミドゲルを B 溶液に浸漬する。浸漬時間は 5 分以内までとする。
7. B 溶液に浸漬した濾紙の上に、B 溶液に浸しておいたメンブレンを重ねる。

8. メンブレンの上に B 溶液を 4ml 程度滴下し、B 溶液に浸漬したゲルを重ねる。
9. ゲルの上に C 溶液を 4ml 程度滴下し、C 溶液に浸しておいた濾紙 3 枚を 1 枚ずつ重ねる。すべての濾紙を重ねたら、一番上の濾紙に静かに掌を置き、強く押し付けてメンブレンを密着させる。
10. C 溶液を一番上に滴下し、上部カバーを取りつける。この際、C 溶液の滴下量が少ないとブロッキングが途中で停止してしまうので、以前までの滴下量よりも多量に滴下した方がよい。
11. 電源部を取り付け、モードセレクトボタンを Protein モードの Mini-60min に合わせ、スタートボタンを押して通電を開始する。
12. 終了後、濾紙、ゲルを取り除き、メンブレンを取り出す。
ここで実験を中断する場合、メンブレンを風乾し、ラップで丁寧に包んでから-80～4℃で保存する。メンブレンは、実験を再度開始する際に 100%メタノールに 30 秒間浸漬してから使用する。
13. メンブレンを容器に入れたブロッキング液 25ml に浸漬し、30～60 分間振盪する。その後、ブロッキング液を除去し、TTBS を加えて 5～10 分間振盪してメンブレンを洗浄する。

14. TTBS を除去し、メンブレンをハイブリバッグに入れる。そこに、ニッポンジーン社の Anti PPV IgG を Antibody buffer で 3000 倍に希釈した一次抗体液をハイブリバッグに 5ml 入れ、バッグ内の気泡を除去した後に密封する。その後、一晚振盪して一次抗体を結合させる。
15. ハイブリバッグを切ってメンブレンを取り出し、容器に入れた TTBS で 5 分間振盪洗浄をする。その後、TTBS を除去し、新しい TTBS を加えて再度 5 分間振盪洗浄する。
16. TTBS を除去し、ハイブリバッグにメンブレンを入れ、BIO-RAD 社の Immuno-Blot Assay Kit Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Alkaline Phosphatase Kit の Goat Anti-Rabbit IgG-Alkaline Phosphatase Conjugate を Antibody buffer で 3000 倍に希釈した二次抗体液をハイブリバッグに 5ml 加え、バッグ内の気泡を除去した後に密封する。その後、60 分間振盪して二次抗体を結合させる。
17. ハイブリバッグを切ってメンブレンを取り出し、容器に入れた TTBS で 5 分間振盪洗浄をする。その後、TTBS を除去し、新しい TTBS で再度 5 分間振盪洗浄する。さらに、TTBS を除去して TBS を加え、5 分間振盪洗浄する。
18. TBS を除去し、BIO-RAD 社の AP Conjugate Substrate Kit の AP 発色用バッファー 25ml に NBT 溶液 250 μ l と BCIP 溶液 250 μ l を添加した発色試薬中にメンブレンを浸漬し、30 分間静置して発色反応を行う。

19. 発色反応後、発色試薬を除去し、milliQ水を用いて洗浄を10分間×2回行い、
発色停止をする。停止後、メンブレンを風乾させる。

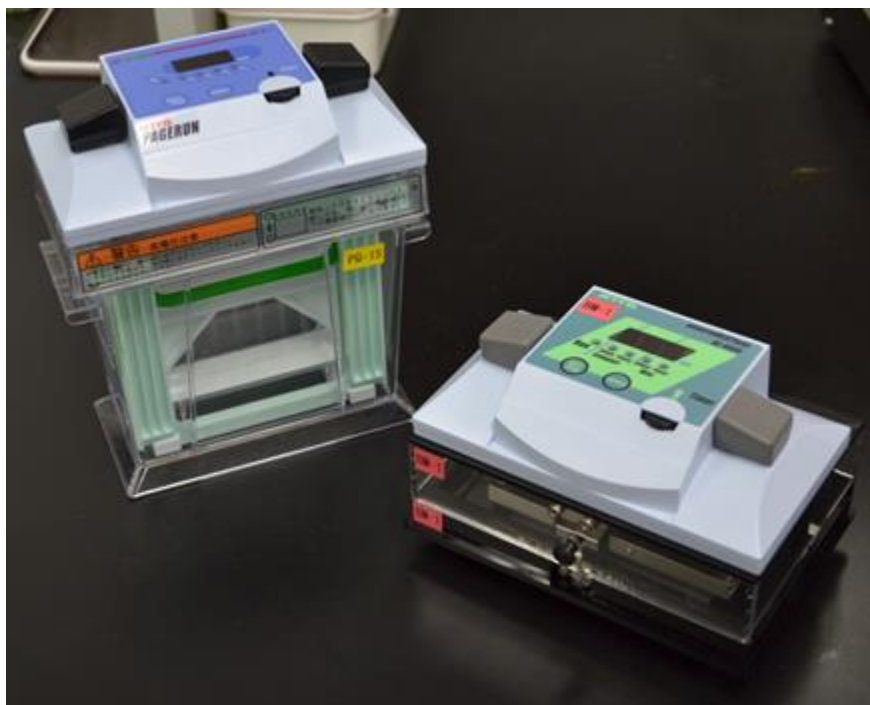


図3 ポリアクリルアミド電気泳動槽 PageRun (左)
セミドライブロッターpowered BLOT mini (右)

表1 SDS-PAGE 用泳動バッファの組成

Tris	1.5g
Glycine	7.2g
milliQ 水	Up to 500mL
Total	500mL
SDS	0.5g (メスアップ後)

表2 ウェスタンブロット溶液 A 溶液の組成

Tris	36.3g
methanol	50mL
milliQ 水	Up to 1.0L
Total	1.0L

表3 ウェスタンブロット溶液 B 溶液の組成

Tris	3.0g
methanol	50mL
milliQ 水	Up to 1.0L
Total	1.0L

表4 ウェスタンブロット溶液 C 溶液の組成

Tris	3.0g
6-aminohexanoic acid	5.2g
methanol	50mL
milliQ 水	Up to 1.0L
Total	1.0L

表5 抗体染色用溶液 1×TBS の組成

10×TBS	100mL
milliQ 水	900mL

表6 抗体染色用溶液 1×TTBS の組成

1×TBS	500mL
Tween-20	250μL

表7 抗体染色用溶液 Blocking Buffer(ブロッキング液)の組成

1×TBS	500mL
gelatin	15g

表8 抗体染色用溶液 Antibody Buffer(抗体液)の組成

1×TTBS	500mL
gelatin	5.0g

2-3 PPV 粒子の精製

サンプルとして、PPV に感染したエンドウの葉を使用した。また、バッファー類は 4℃ で保存してあるものを使用した。

1. PPV 罹病葉に液体窒素を加え、乳鉢で磨砕をする。
2. 葉の重量 1.0g に対して、0.1M sodium citrate buffer pH 6.7(0.01M DIECA-Na、0.5M urea 添加)とクロロホルムを 3:1 の割合で混合した溶液を 1ml 加え、さらに混合液の 1/100 の量の和光純薬工業株式会社のプロテアーゼ阻害剤カクテルセットIV・DMSO 溶液(植物用)(×100)を添加する。
3. 10,000×g、20min、4℃で遠心分離をし、上清を回収する。
4. 57,500×g、90min、4℃で超遠心分離を行い、上清を除去してペレットを得る。
5. 4 での超遠心の際に分注した上清の半分量の 0.01M citric acid-phosphate buffer pH7(0.2M 2-mercaptoethanol、1M urea 添加)をペレットに加え、そしてそのバッファー量の 1/100 の量のプロテアーゼ阻害剤カクテルセットIVを添加してペレットを溶解する。
6. 10,000×g、20min、4℃で遠心分離をし、上清を回収する。
7. 57,500×g、90min、4℃で超遠心分離を行い、上清を除去してペレットを得る。

8. 7での超遠心の際に分注した上清の0.02倍の量の borate-EDTA buffer をペレットに加え、ペレットを溶解する。その後、4℃で保存する。



図4 低速遠心機(HITACHI CF16RXII)



図5 超遠心機(HITACHI CS150GXII)

表9 0.1M sodium citrate buffer pH 6.7

+ 0.01M DIECA-Na & 0.5M urea の組成

DIECA-Na	0.22531g
urea	3.003g
0.1M sodium citrate buffer pH 6.7	Up to 100mL
Total	100mL

表10 0.01M citric acid-phosphate buffer pH 7.0

+0.2% 2-mercaptoethanol & 1M urea の組成

0.2% 2-mercaptoethanol	200μL
urea	6.006g
0.01M citric acid-phosphate buffer pH 7	Up to 100mL
Total	100mL

表11 0.01M citric acid-phosphate buffer pH 7.0 の組成

0.2M Na ₂ HPO ₄	16.47mL
0.1M citric acid	3.53mL
milliQ 水	Up to 360mL
Total	100mL

表12 borate-EDTA buffer の組成

boric acid	3.09g
EDTA	1.86g
Total	500mL
NaOHaq	pH8.2

2-4 大腸菌内での PPV-CP 発現

2-4-1 PPV の全長 RNA の抽出

Ak19-8 と Ak19-14 の罹病エンドウ葉から、チヨダサイエンス株式会社の FAVORGEN Plant Total RNA Extraction Mini Kit を使用して全 RNA を抽出した。

2-4-2 CP インサートの作製

2-4-1 で抽出した RNA をテンプレートとして、RT-PCR を行った。そして、PCR 産物をテンプレートとしてタカラバイオ株式会社の PrimeSTAR® HS DNA Polymerase を使用して PCR を行い、インサートを作成した。プライマーは、タカラバイオ株式会社の pColdI に In-Fusion クローニングを行うために設計した。

表13 In-Fusion クローニング用プライマー配列

プライマー名	配列(5' to 3')
InFNdeI_PPVcpF	TCGAAGGTAGGCATAACGCTGACGAAAGAGAAGA
InFNdeI_PPVcpR	GTACCGAGCTCCATACTACACTCCCCTCACACC

表14 RT-PCR(RT)の Premix 組成

RNase free water	1.875μl
10× RT buffer	0.5μl
dNTP mix	0.5μl
MgCl ₂	1.0μl
20μM Reverse primer	0.25μl
RNase inhibitor	0.125μl
Reverse transcriptase	0.25μl
Total	4.5μl

Template RNA 0.5μl + Premix 4.5μl = 5.0μl

表15 RT-PCR(RT)のサーマルサイクラー設定

42°C	25min
95°C	5min
4°C	∞

表16 RT-PCR(PCR)の Premix 組成

DDW	14.375 μ l
5 $\times$ PCR buffer	5.0 μ l
20 μ M Forward primer	0.25 μ l
20 μ M Reverse primer	0.25 μ l
ExTaq HS	0.125 μ l
Total	20 μ l

RT 反応液 5.0 μ l + Premix 20 μ l = 25 μ l

表17 RT-PCR(PCR)のサーマルサイクラー設定

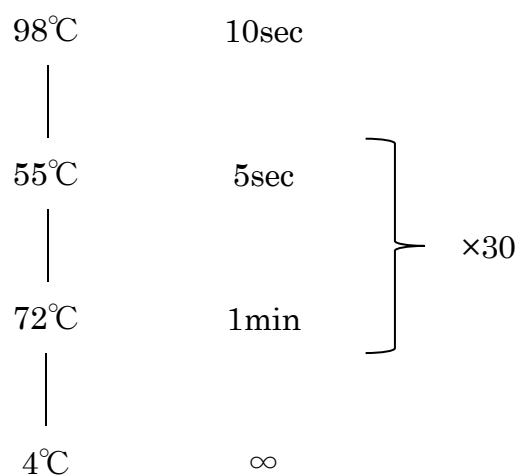
94°C	4min		
94°C	30sec	}	×30
55°C	30sec		
72°C	1min	}	
72°C	7min		
4°C	∞		

表18 PrimeSTAR® HS DNA Polymerase PCR の Premix 組成

DDW	6.4μl
5× PrimeSTAR buffer	2.0μl
dNTP mix	0.8μl
20μM Forward primer	0.1μl
20μM Reverse primer	0.1μl
PrimeSTAR® HS DNA Polymerase	0.1μl
Total	9.5μl

Template DNA(100 倍希釈) 0.5μl + Premix 9.5μl = 10μl

表19 PrimeSTAR® HS DNA Polymerase PCR のサーマルサイクラー設定



2-4-3 In-Fusion クローニングによるプラスミドへのライゲーション

最初にタカラバイオ株式会社のコールドショック発現系プラスミドである pColdI を *Nde*I で制限酵素処理を行った。そして、チヨダサイエンス株式会社の FAVORGEN FavorPrep GEL/PCR Purification Mini Kit の PCR 産物精製用プロトコルを使用し、制限酵素処理ベクターの精製を行った。その後、精製を行った pColdI と 2-4-2 で作製したインサートをライゲーションするために、タカラバイオ株式会社の In-Fusion® HD Cloning Kit を使用した。

表20 pColdI の制限酵素処理時の溶液組成

DDW	7.0µl
NEBuffer4	2.0µl
pColdI(127.7µg/µl)	10µl
<i>Nde</i> I	1.0µl
Total	20µl

表21 pColdI の制限酵素処理時のサーマルサイクラー設定

37°C	60min	×2
↓		
65°C	20min	
↓		
4°C	∞	

表22 In-Fusion クローニング時の溶液組成

DDW	3.0μl
pColdI(30~50ng/μl <i>Nde</i> I 処理)	0.5μl
CP インサート(50μg/μl Ak19-8 or Ak19-14)	0.5μl
5× In-Fusion HD Enzyme Premix	1.0μl
Total	5.0μl

50℃で 15 分間処理後、直ちに氷上で急冷

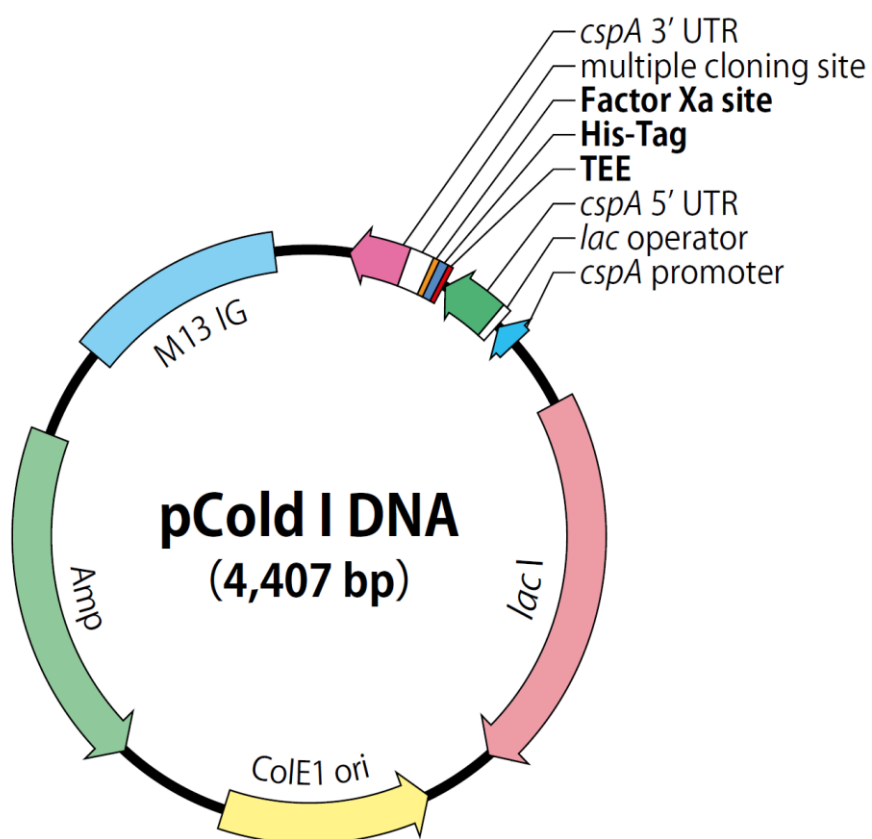


図6 pColdI の DNA マップ

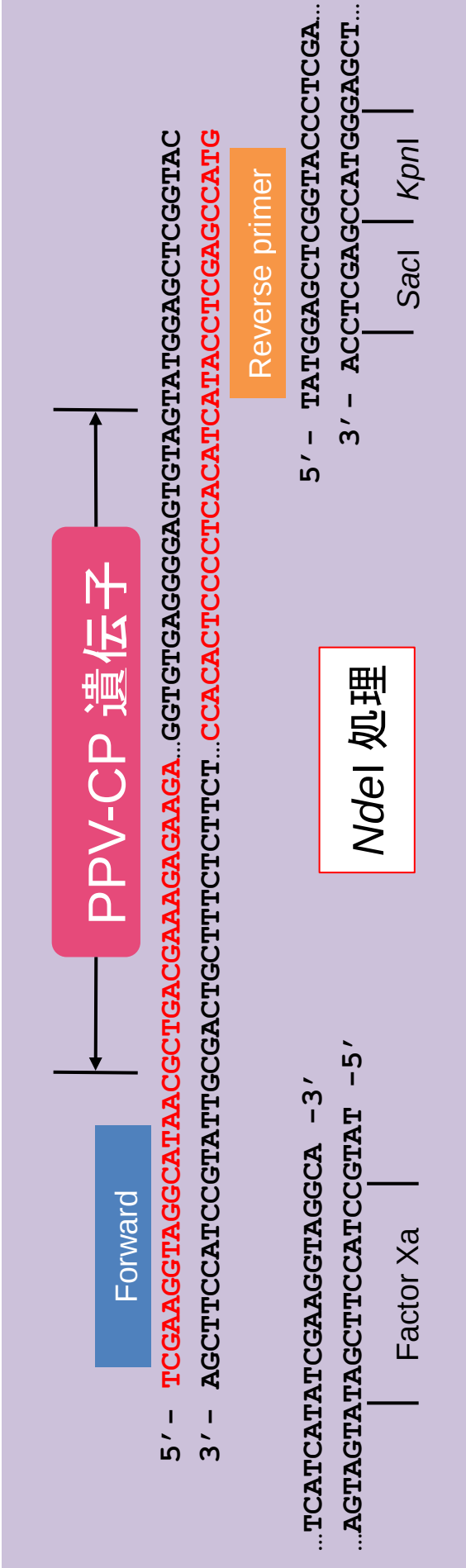


図7 In-Fusion クローニング模式図

2-4-4 大腸菌への形質転換及びプレーティング

2-4-3 で作製したプラスミドをコンピテントセルの JM109 または BL21 に形質転換を行った。手順は以下の通りである。

〔大腸菌の形質転換プロトコル〕

1. コンピテントセルを氷上で融解し、50 μ g 程度のプラスミドに対して 40 μ l のコンピテントセルに加え、ピペッティングをして混合する。その後、氷上で 30 分間静置する。
2. 42 $^{\circ}$ C のヒートブロックで 45 秒間処理し、即座にチューブをヒートブロックから取り出して氷上に挿して 5 分間冷却する。
3. 37 $^{\circ}$ C で保温した SOC 培地 400 μ l を加え、37 $^{\circ}$ C のインキュベーター内で 1 時間振盪培養する。
4. 培養後の大腸菌を LB 平板培地(100 μ g/ml アンピシリン添加)にプレーティングし、37 $^{\circ}$ C のインキュベーターで培養する。LB 平板培地の組成は下記の通りである。

表23 LB 平板培地(100 μ g/ml アンピシリン添加)の組成

Trypton	2.0g
Yeast Extract	1.0g
NaCl	2.0g
Agar	3.0g
DDW	Up to 200ml
Total	200ml

121 $^{\circ}$ C・20 分間オートクレーブで溶解した後、100mg/ml アンピシリンを 200 μ l 添加する。

2-4-5 コロニーPCR によるインサートチェック

平板培地上で生育しているコロニーにインサートが挿入されているか確認するために、コロニーPCRを行った。つまようじを用いてコロニーを挿し、その先端を Premix を分注した PCR チューブに挿入した。その後、サーマルサイクラーで PCR を行った。

表24 コロニーPCR の Premix 組成

DDW	7.5μl
10× Ex Taq buffer	1.0μl
dNTP mix	1.0μl
20μM Forward primer	0.2μl
20μM Reverse primer	0.2μl
Ex Taq	0.1μl
Total	10μl

表25 コロニーPCR のサーマルサイクラー設定

98°C	30sec	
98°C	10sec	} ×30
55°C	30sec	
72°C	1min	}
72°C	7min	
4°C	∞	

2-4-6 大腸菌のタンパク質発現

形質転換を行った大腸菌を LB 液体培地(100 μ g/ml アンピシリン添加)で培養し、タンパク質の発現を行った。37℃での振盪培養には TAITEC 社のバイオシェーカー BR-300LF を使用し、15℃での振盪培養には TAITEC 社のパーソナル Lt-10F・SX セットを使用した。

表26 LB 液体培地(100 μ g/ml アンピシリン添加)の組成

Trypton	2.0g
Yeast Extract	1.0g
NaCl	2.0g
DDW	Up to 200ml
Total	200ml

121℃、20 分間オートクレーブで溶解した後、100mg/ml アンピシリンを 200 μ l 添加する。

2-4-7 大腸菌内発現タンパク質の His タグアフィニティークロマトグラフィー精製

集菌した大腸菌ペレットをもとに、タカラバイオ株式会社の TALON® Spin Columns 及び HisTALON® Buffer Set を使用し、発現タンパク質の精製を行った。また、Elute buffer でタンパク質を溶出後、100mM EDTA を用いてカラムのレジンからタンパク質を結合しているコバルトイオンと共に溶出した。

第 3 章 結 果

3-1 ウイルス粒子精製におけるプロテアーゼ阻害剤の効果比較

まず、解析のために純粋な外被タンパク質を得るため、ウイルス粒子の精製から行うこととした。当初はウメから精製を試みたが、ウメからの粒子精製は著しく困難であった。そこで、PPV 感染ウメ葉を接種源としてエンドウに接種し、遠心分離を用いる常法 (Glaser and Candresse, 2005 など) によってウイルス精製を試みることにした。

しかし、目的の 40kDa 程 CP の全長バンドが CBB 染色によって強く現れず、外被タンパク質が粒子精製の過程において分解されていると考えられた。よって、その分解を抑えるために、罹病エンドウを磨砕するときの混合液と、1 回目の超遠心後のペレットを溶解するときの混合液にプロテアーゼ阻害剤を添加するか否かで計 4 つの実験区を作成し、効果を比較した。

その結果、粒子精製液をサンプルとしてウエスタンブロット解析を行った際に、罹病エンドウ葉磨砕時にプロテアーゼ阻害剤を添加することで、図7のレーン 1、2、3、4 のように約 40kDa の全長バンドが強く現れた。また、ペレット溶解時に加えることで、レーン 1、2、5、6 のように全長バンドより下に存在する CP 分解産物と思われるバンドが弱くなることから、精製過程における分解が抑制されたと考えられた。

以上のことから、レーン 1、2 のように罹病葉磨砕時とペレット溶解時の計 2 回にプロテアーゼ阻害剤を入れる方法を、ウイルス粒子精製において採用することとした。

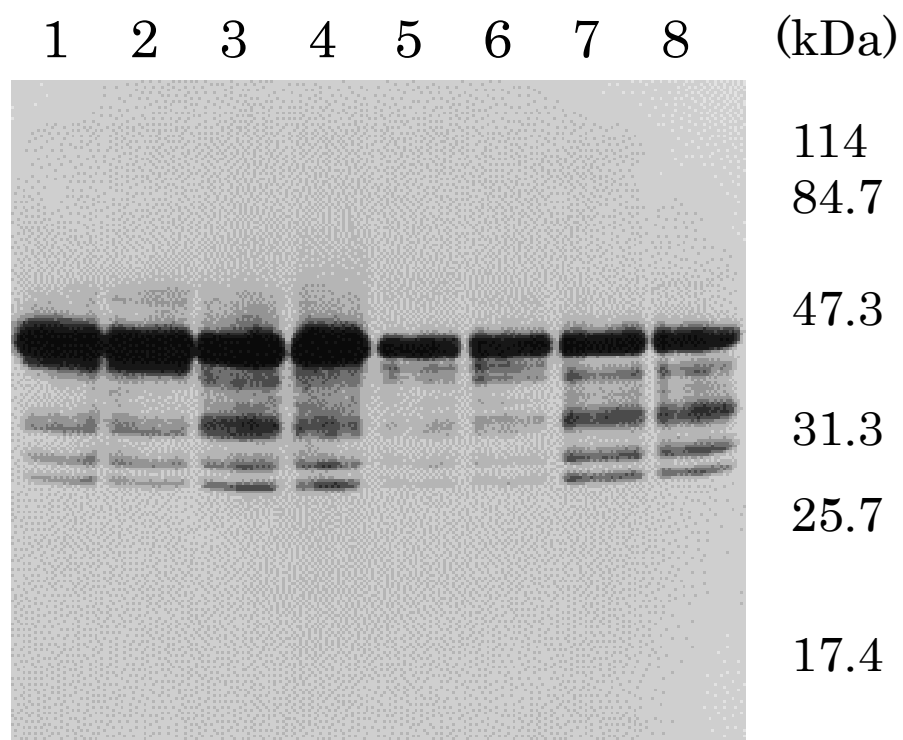


図8 プロテアーゼ阻害剤添加による粒子精製への効果の比較

表27 プロテアーゼ阻害剤の添加パターン

Lane	磨砕時	溶解時
1	+	+
2		
3	+	—
4		
5	—	+
6		
7	—	—
8		

3-2 精製粒子の MALDI-TOF MS 解析

3-1 で記載されている方法等で精製した Ak19-8 と Ak19-14 粒子などのタンパク質を泳動し、ウェスタンブロットを行って得られたメンブレンと対比して、CBB 染色を行ったポリアクリルアミドゲルの PPV の CP と思われるバンドをカミソリで切り出し、株式会社リバネスのバイオ系受託サービス「BioGARAGE」を介して、Genomine 社にタンパク質量分析を委託した。

MALDI-TOF MS の結果をもとに、1,500～3,000Da の間に認められるペプチドピークのフィンガープリンティングを行った結果、委託したバンドはどちらも PPV の CP であることがわかった。

また、タンパク質は *O*-GlcNAc 修飾を受けた際に GlcNAc が 1 分子結合することで分子量が 203Da 増加することがわかっている。それをもとにペプチドピークを観察すると、Ak19-14 では N 末端側の 40～93 アミノ酸のペプチドに *O*-GlcNAc が 2 個、あるいは 5 個結合していると思われるピークが認められた。このことから、PPV の CP は *O*-GlcNAc 修飾を受けている可能性があると考えられる。

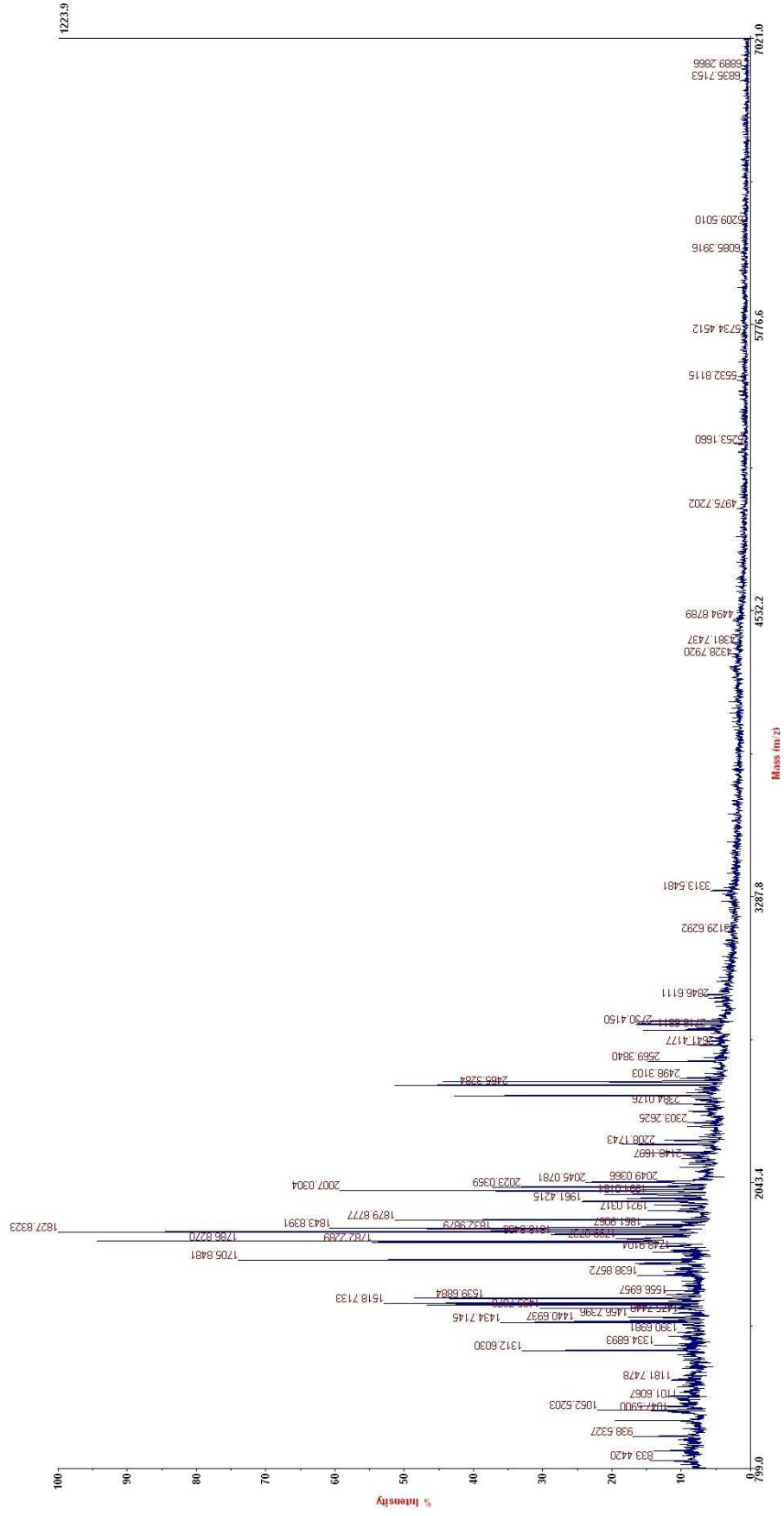


図6 MALDI-TOF MS によるペプチドピーク(Ak19-8)

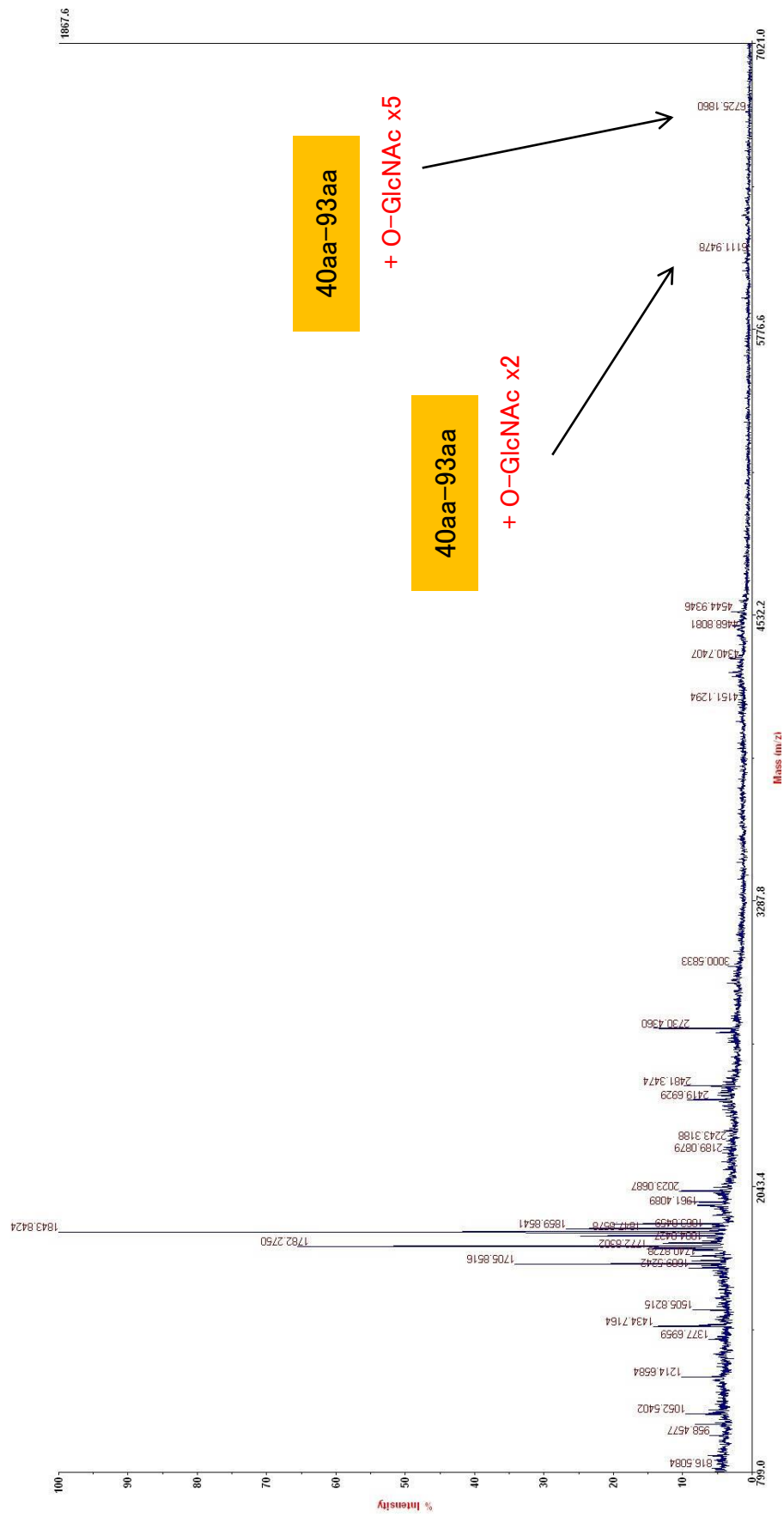


図10 MALDI-TOF MS によるペプチドピーク(Ak19-14)

3-3 CP 分解産物のフィンガープリンティング解析

Ak19-8 と Ak19-14 のウエスタンブロットにおけるバンドの位置を比較した際に、約 40kDa の全長バンドの位置には差が発生しているのに対して、約 30kDa の位置に表れるバンドの位置は、双方の株において変わらないことが見受けられた。このバンドはウイルス粒子精製においてプロテアーゼ阻害剤を使用しない場合に分解産物として強く現れるので、CBB 染色においてこのバンドを切り出し、MALDI-TOF MS を受託してフィンガープリンティングを行った。

その結果、既報の PPV の CP におけるアミノ酸配列と比較して、コア領域や C 末端側の領域とマッチングするペプチドは確認できたが、N 末端側の配列が見受けられなかった。O-GlcNAc 修飾が行われるアミノ酸のスレオニンとセリンは、CP の N 末端側に多く分布している。そのため、N 末端側の領域が分解されているこのタンパク質においては、66 番目のアミノ酸による構造の差異による修飾の差が生まれなかったものと思われる。よって、バンドの位置の違いを発生させる要因のなるのは、N 末端側の 78 番目までのアミノ酸配列に由来すると考えられる。

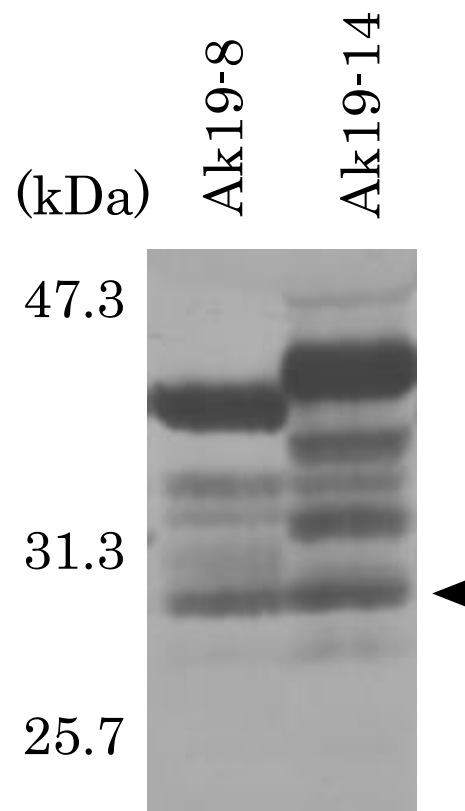


図11 Ak19-8、Ak19-14 の泳動度の比較と CP 分解産物と思われるバンド(矢頭)

1	ADEREDEEEV	DALQPPFVIQ	PAPRTTAPML	NPIFTATTQ	PATKEVSQVS
51	GPQLQTFGTY	GNEDASPSNS	NALVNTNRDR	DVDAGSIGTF	TVPRLKAMTS
101	KLSLPKVKGK	AIMNLNHLAH	YSPAQVDLSN	TRAPQSCFQT	WYEGVKRDYD
151	VTDDMSIIL	NGLMVWCIEI	GTSPNINGMW	VMMDGETQVE	YPIKPLLDHA
201	KPTFRQIMAH	FSNVAEAYIE	KRNYEKAYMP	RYGIQRNLTD	YSLARYAFDF
251	YEMTSTTFVR	AREAHIQMKA	AALRNVQNRL	FGLDGNVGTQ	EEDTERHTAG
301	DVNRNMHNLL	GVRGV			

図12 CP 分解産物のフィンガープリンティング結果

3-4 大腸菌内発現タンパク質の SDS-PAGE

一般的にタンパク質が修飾されないと知られている大腸菌内で His タグ等を含めた融合タンパク質として CP を発現し、カラム精製を行うことで大腸菌由来のタンパク質を除去した後、SDS-PAGE を行った。

その結果、大腸菌内で発現した融合タンパク質における最も強く現れているバンドの差は、計算分子量から推定される以上の電気泳動度が見られた。また、全体的に分解産物と考えられるバンドが数本見受けられ、Ak19-8 の最も強いバンドよりも分子量の大きいバンドも確認された。この融合タンパク質は N 末端側に His タグが付加されていることから、これらの分解産物は融合タンパク質の C 末端側から分解されたものと思われる。

この図におけるプラスミドを導入したコンピテントセルは JM109 であり、本来タンパク質の発現に使用される菌株ではないため、プロテアーゼ欠損株ではない。そのため、融合タンパク質の分解が発生してしまった可能性がある。そこで、新たにタンパク質発現に用いられる菌株である BL21 をコンピテントセルとして使用し、さらにタンパク質発現後の大腸菌からタンパク質を抽出する際のバッファーに、ロシュ・ダイアグノティクス株式会社の cOmplete, Mini, EDTA-free をプロテアーゼ阻害剤として添加した。

その結果、最も分子量が高いバンドは JM109 で発現させた場合よりも明瞭に現れた。また、このバンドの分子量は、AK19-8 と Ak19-14 の両株においてもほぼ差が見受けられなかった。

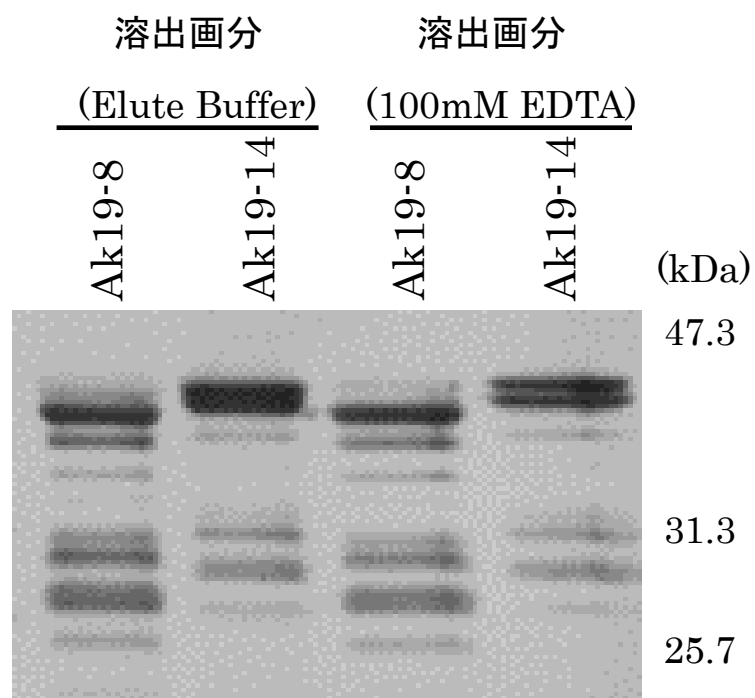


図13 His タグ精製タンパク質の泳動度の比較

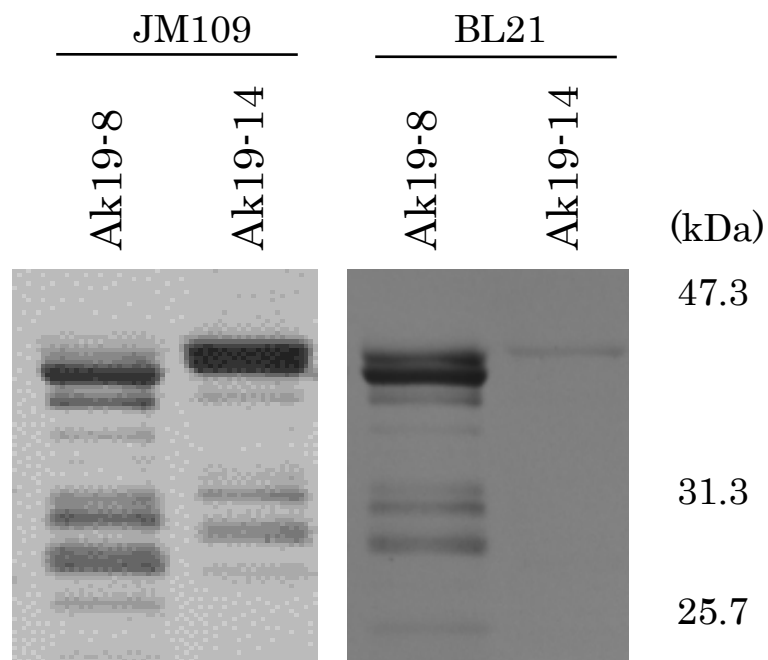


図14 大腸菌内で生産 CP の分子量解析

第 4 章 考 察

ウイルス粒子を精製し、MALDI-TOF MS 解析を受託して行ったが、Ak19-14 においてはある程度結果が得られたことに対して、Ak19-8 では計算分子量と実際のバンドの位置から修飾がなされていると思われるにも関わらず、修飾を受けていると考えられるピークが観察されなかった。これにおいては改善すべき点が 2 つ存在している。

1 つ目は、ウイルス粒子精製液の純度、及び約 40kDa のバンドの濃度を向上させる必要がある。受託サービスで行っている MALDI-TOF MS は、解析前のタンパク質分解にトリプシンが使用されているが、今回のサンプルではデータが必要な N 末端側にトリプシンの切断サイトが少なく、40～93 番目のペプチドの分子量が 5,600～5,700Da と非常に大きく、分子量の小さいものと比べてペプチドピークが微弱になってしまい、検出が困難であるという問題がある。また、精製液において CP 以外の夾雑物が多く、CP のバンドの濃度が小さいとバンドを視認しにくいという問題があるため、精製液の純度向上、並びにピークを増強するためにゲル中の CP の含有量を向上させることは必要である。そのためには、粒子精製のステップにおける条件の再確認、及び使用試薬の追加等が考えられる。

2 つ目は、MALDI-TOF MS に使用されるタンパク質分解に使用する試薬をトリプシン以外のものを使用する、あるいはトリプシンに加えて別の試薬を併用するということである。後者の例では、トリプシンとリシルエンドペプチダーゼを併用するということが挙げられる。トリプシンはアミノ酸配列におけるアルギニンとリジンの C 末端側を切断するが、それらの C 末端側にプロリンが連続していた場合、切断ができなくなるという性質が存在する。そこで、プロリンが存在していてもリジンの C 末端側を切断するリシルエンドペプチダーゼをトリプシンと併用することで、40～93 番目のペプチドを 2,010Da と約 3,600Da の 2 分子に分解することができる。そのため分子量が小さくなり、現状の方法

でもピークを検出することができるかもしれないと考えられるタンパク質分解用の試薬を指定できるサービスを探して受託することを考えている。

また、今回の CP のアミノ酸配列を Maejima et al. (2011) が発表した論文に記載されている東京都内で採取された 29 株の PPV の配列データと比較すると、Ak19-9、Ak19-11、Ak19-14 のように 66 番目のアミノ酸がグルタミン酸であったものは、全 29 株中の Ak3、Ha2、Ha3、Ha4 の計 4 株のみであることがわかった。これらは地図上の南東に分布しており、法政大学で保有している 4 株の採取地もその地域に該当した。

さらに、この論文に記載されている全塩基配列データと鍵和田研有波から提供された法政大学所有の 4 株の全塩基配列データから系統樹を作成した結果、法政大学所有株は 4 株とも Ak3、Ha2、Ha3、Ha4 の 4 株と近縁であることがわかった。また、濱本研千賀の研究結果によると、66 番目のアミノ酸がグルタミン酸である Ak19-14 は、66 番目のアミノ酸がグリシンである Ak19-8 よりもエンドウ内での増殖性が高い可能性が示されている。

以上のことから、日本国内に PPV が侵入後、感染範囲を広げて南下していく間に、青梅市とあきる野市の市境付近でこの 66 番目のアミノ酸がグルタミン酸である株が出現したこと考えられる。そして、66 番目のアミノ酸がグリシンである Ak19-8 が、66 番目がグルタミン酸である株と同一のクレードに属していることから、Ak19-8 の 66 番目のアミノ酸は、グリシンからグルタミン酸に変異が起こった後に、再度グリシンに変異したと考えられる。これらのことから 66 番目のアミノ酸は何らかの環境変化に対応して変異する可能性が考えられ、ウイルスの性状を決定する一つの要因であると考えられる。

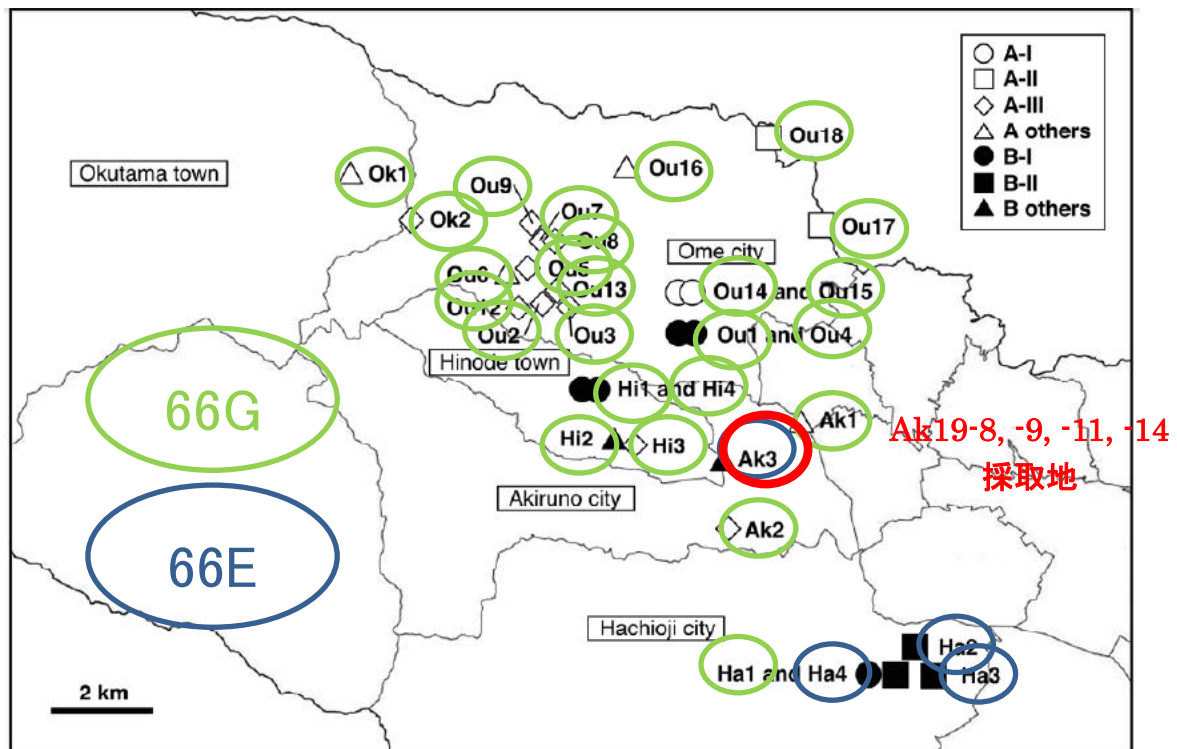


図15 東京都における PPV の 66 番目のアミノ酸の違いによる分類
地図は Maejima et al. (2011)の論文から引用

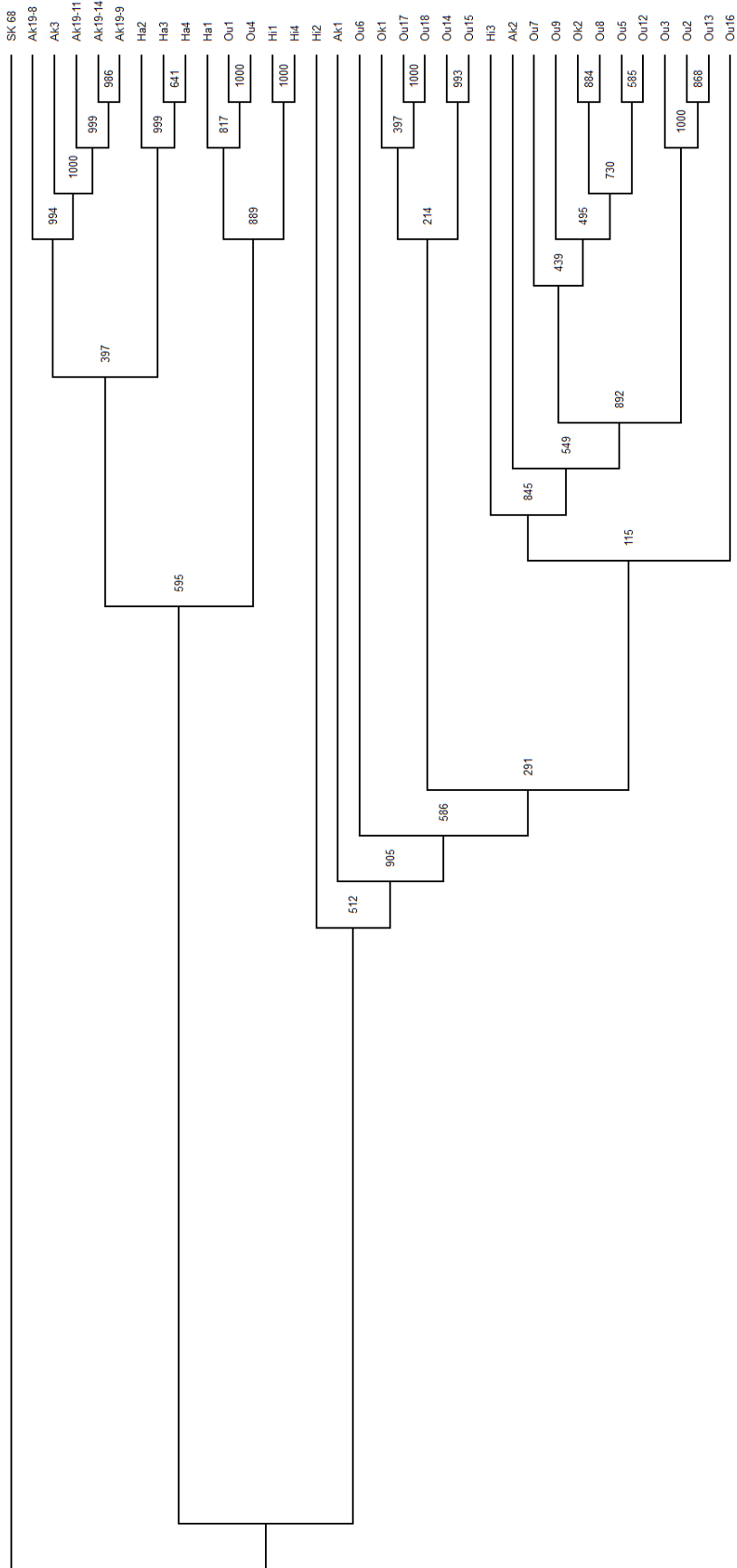


図16 東京都内で採取された PPV 株と大学で保有している 4 株の塩基配列に基づく系統樹

摘要

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 は、病徴には大きな差異は認められない。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 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。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。

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。また、Ak18-8 と Ak19-14 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。

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。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。

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強度が上がり、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。

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 及び Ak19-14 の全長 CP 由来するバンドのうち、Ak19-14 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。しかし、高分子両側のピークは十分な制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。

Ak19-8、Ak19-14 それぞれの CP 遺伝子を RT-PCR 法によって増幅し、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、ウエスタンブロット解析を行った結果、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。この現象については、現在検討を行っている。

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。また、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 は Ak19-8 に近い株が多いと思われる。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 種類の株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。

参 考 文 献

Cambra, M., Capote, N., Myrta, A., Llacer, G.(2006): *Plum pox virus* and the estimated costs associated with sharka disease., Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 36, 200-204.

Chen, D., Juarez, S., Hartweck, L., Alamillo, JM., Simon-Mateo, C., Perez, JJ., Fernandez-Fernandez, MR., Olszewski, NE., Galcia, JA. (2005): Identification of secret agent as the *O*-GlcNAc transferase that participates in *Plum pox virus* infection. Journal of Virology, 79, 9381-9387

Glasa, M., Candresse, T. (2005): Plum pox virus Discription of Plant Viruses<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=410>

Maejima, K., Himeno, M., Komatsu, K., Takinami, Y., Hashimoto, M., Takahashi, S., Yamaji, Y., Oshima, K., Namba, S. (2011): Molecular epidemiology of *Plum pox virus* in Japan., Phytopathology, 101, 567-574

前島 健作, 萱野 佑典, 姫野 未紗子, 濱本 宏, 山次 康幸, 難波 成任(2009): plum pox virus (プラムボックスウイルス)の国内における発生 植物防疫, 63, 578-582

農林水産省 HP (2014): ウメ輪紋ウイルス (プラムボックスウイルス) の防除について http://www.maff.go.jp/j/syouan/syokubo/keneki/k_kokunai/ppv/ppv.html

Schneider, W., Damsteegt, V., Gildow, F., Stone, A., Sherman, D., Levy, L., Mavrodieva, V., Richwine, N., Welliver, R. Luster, DG. (2011): Molecular, ultrastructural, and biological characterization of Pennsylvania isolates of *Plum pox virus*. *Phytopathology*, 101, 627-636

Subr, Z., Glasa, M(2013): Unfolding the secrets of plum pox virus: from epidemiology to genomics. *Acta Virologica*, 57, 217-228

謝 辞

本研究に際し、終始ご理解をいただき、自由な研究の機会とともに暖かいご指導をいただきました、法政大学生命科学部濱本 宏教授に心より感謝いたします。さらに、本研究に助言を下された法政大学生命科学部延原 愛氏、並びに遠藤三千雄氏に感謝します。また、研究の手法を教えて下さった法政大学生命科学部植物医科学専修植物病抵抗性学研究室の1期生の先輩方、共に研究をした2～5期生のメンバー各位に対しても感謝します。