

## 論文の内容の要旨

題目 TMV 複製酵素の新規な機能の発見と解析

氏名 平島 匡太郎

### 【タバコモザイクウイルスとは】

タバコモザイクウイルス(TMV)はプラス鎖の一本鎖 RNA をゲノムとするウイルスで、126kDa およびそのリードスルー産物である 183kDa の2つの複製酵素、移行タンパク質(Movement Protein, MP)、コートタンパク質(Coat Protein, CP)の4つのタンパク質をコードしている。TMV の植物体への感染過程は、①侵入した細胞内におけるウイルスRNAの細胞内複製、②感染細胞から隣接する細胞へと移行し、感染葉全体へと広がる細胞間移行、③感染葉から維管束系を通じて上葉に移行する遠距離移行、という3つのステップを経て植物体の全身に広がってゆく。このうち細胞間移行には MP が深く関与しており、CP は不要であることがわかってきた。しかし複製酵素は、細胞間移行の前提である複製を担うタンパク質であるため解析が非常に困難であり、複製酵素が細胞間移行に関与するかどうかは明らかでなかった。

### 【本論文の背景】

TMV にはタバコを宿主とする普通系、TMV-U1 をはじめ、さまざまな植物を宿主とする系統があり、その宿主のほとんどは双子葉植物である。しかし近年、単子葉植物であるラッキョウから新たな系統の TMV-R が発見され、その塩基配列は TMV-U1 に対し 94%という高い相同性をもつことがわかった。そこで宿主を決定している領域を明らかにすることを目的として両者のキメラウイルスを作成し解析を行ったところ、興味深い性質をもつキメラウイルス、UR-hel を見いだした。タバコにおいて TMV-U1、TMV-R は両者とも細胞間移行できるにもかかわらず、意外にも UR-hel は細胞間移行能力を失っている、ということが示唆されたのである。

UR-hel は TMV-U1 を母体とし、複製酵素のヘリカーゼドメインのみが TMV-R 由来という配列をもつ。それにもかかわらず、UR-hel は細胞間移行能力を失っている。この今までに見られなかった奇妙な現象を説明するため、“TMV の複製酵素は複製だけでなく、細胞間移行能という新規な機能をもつ”という仮説を立てた。そして“UR-hel の複製酵素はこの新規な機能が欠損しているため、細胞間移行できない”という予想のもと、TMV-U1 と比較しながら UR-hel を詳細に解析した。

### 【TMV複製酵素の新規な機能の発見】

まず、UR-hel をプロトプラストに感染させたところ、TMV-U1 と同程度の CP が検出され、UR-hel は複製能力を失っていないことが確認された。次に、TMV に抵抗性であるタバコ、Xanthi-ncによって細胞間移行能力を確認した。Xanthi-nc に野性型のTMV が感染すると、局所壊死斑が形成されウイルスは封じこめられるが、細胞間移行能力を失った TMV の感染では局所壊死斑が認められないことがわかっている。UR-hel を Xanthi-nc に感染させたところ、TMV-U1 を感染させた葉では感染後3日目に局所壊死斑が生じ始めたのに対し、UR-hel を感染させた葉では7日目でも局所壊死斑が形成されなかった。この結果から、UR-hel は細胞間移行能力を失っていることが示唆された。

局所壊死斑を利用する解析は間接的なため、CP を蛍光タンパク質 (green fluorescent protein, GFP) に置換し、直接ウイルスの挙動を検出した。感染4日後、TMV-U1 を感染させた葉において GFP の蛍光が観察されたのに対し、UR-hel の感染葉では感染7日後も肉眼では蛍光が見られなかったが、蛍光顕微鏡下で観察したところ、一細胞(もしくはせいぜい数細胞)において GFP の蛍光が観察された。この結果から UR-hel は、細胞間移行能力を失っていることが明らかとなった。

UR-hel は複製酵素に TMV-U1 との相違アミノ酸を持つため、細胞間移行の前提である複製能力が低くなり、そのため細胞間移行できない可能性が考えられる。そこで TMV-U1 と UR-hel をプロトプラストに感染し、ノーザンハイブリダイゼーションおよび<sup>35</sup>S]メチオニン/システインにより、ウイルス RNA の蓄積・ウイルスタンパク質の合成を検出した。この結果、UR-hel のゲノム RNA の蓄積量、および MP・CP の合成量はともに TMV-U1 とほぼ同様に検出され、両者の複製能力には差がないことが確かめられた。これらの結果から、複製能力の低下および MP の合成が少ないため UR-hel が細胞間移行できない、という可能性は排除された。

さらに、MP を構成的に発現するよう Xanthi-nc を形質転換したトランスジェニックタバコ、2005において局所壊死斑の解析を行った。2005 は MP を発現しトランスに相補するため、MP に欠損がある変異体、TAD mutant が Xanthi-nc では局所壊死斑を形成しないのに対し、2005 において TMV-U1 と同様の大きさの局所壊死斑を形成した。しかし UR-hel の感染葉では Xanthi-nc、2005 ともに局所壊死斑の形成が認められなかった。この結果から、UR-hel の細胞間移行能力欠損は、MP をトランスに供給してもなお相補されないことが示された。

以上の結果から UR-hel は、複製能力はほぼ TMV-U1 と同様であるにもかかわらず、細胞間移行能力を失っていることが明らかになった。そしてその原因は MP ではなく、“TMV の細胞間移行には、MP だけでなく複製酵素も関与している”ということが強く示唆された。

### 【TMV複製酵素の新規な機能の解析】

UR-he は TMV-U1 と RNA ヘリカーゼドメインの領域のみが異なり、この領域が細胞間移行に関与していると考えられる。しかしいっぽう、この領域を含め 183K 複製酵素のほぼ全領域を TMV-R 由来

来の配列としたキメラウイルスは細胞間移行能力を持つことがわかっている。ここから、UR-hel 複製酵素のある領域を TMV-R 由来とすれば、細胞間移行能力が復帰することが考えられた。そこでさまざまなキメラウイルスを作成し解析を行ったところ、RNA ヘリカーゼドメインに加えてその上流も TMV-R 由来としたキメラウイルス、UR-hel/V が細胞間移行能力を有していた。RNA ヘリカーゼドメインの上流は比較的保存性の低い領域で、機能は明らかとなっていない。この結果から、複製酵素が細胞間移行に関与している領域は、RNA ヘリカーゼドメインとその上流の非保存領域であることが示唆された。

UR-hel は強毒復帰変異体を一定の確率で生じる。これらの変異体 10クローンの RNA ヘリカーゼドメインおよび非保存領域を、変異をもたない UR-hel の配列を持つプラスミドに組み込み解析した結果、全てこの領域の組み込みにより細胞間移行できるようになった。この結果から複製酵素の RNA ヘリカーゼドメインと非保存領域が細胞間移行に関与していることがより補強された。

UR-hel 変異体のうちのいくつかは、非保存領域のみの変異により細胞間移行能力が復帰しており、RNA ヘリカーゼドメインとの相互作用が示唆された。そこで、酵母 two-hybrid system を用いて、TMV-U1 と UR-hel それぞれの非保存領域 - RNA ヘリカーゼドメインの相互作用に違いはあるかどうかを解析したが、TMV-U1 由来と UR-hel 由来の配列による有意な差は見られなかった。

次に、GFP の蛍光によりウイルスタンパク質の局在を解析した。まず、複製酵素が MP と共に細胞間移行に関与しているという可能性を考え、MP に GFP を融合させたウイルスを作成しプロトプラストにおける MP の挙動・局在を時間をおって詳細に観察した。しかし、TMV-U1、UR-hel の MP 局在に明確な差は見られず、TMV-U1 と UR-hel の MP は合成量・合成パターンだけでなく一細胞での挙動も同様であることがわかった。次に、複製酵素に GFP を融合したタンパク質を 35S プロモーターにより発現させ、プロトプラスト内での局在を解析した。この結果、TMV-U1 と UR-hel の複製酵素はともに核周辺への局在が観察され、両者の複製酵素の局在に大きな違いは見いだされなかった。

#### 【本論文のまとめと展望】

以上の UR-hel についての実験結果から、TMV の複製酵素は複製のみならず細胞間移行にも関与していることが明らかとなった。そしてその領域は RNA ヘリカーゼドメインとその上流の非保存領域であり、タンパク質の立体構造が原因であることが示唆された。また、複製酵素および MP の局在は TMV-U1 と UR-hel の間で大きな変化はなかったこと、TMV-U1 のみならず UR-hel の複製酵素についても核局在だけでなく原形質連絡と思われる細胞膜に局在が見られたから、複製酵素が細胞間移行に関与するのは原形質連絡を介して隣接細胞に移る過程である可能性が高いことが示唆された。今後は複製酵素の抗体を用いて非保存領域と RNA ヘリカーゼドメインの相互作用や免疫染色による複製酵素の局在、*in situ* ハイブリダイゼーションによるウイルスゲノムの局在解析などにより、TMV 複製酵素の新規な機能の機構を明らかにしてゆきたいと考えている。