

論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻

平成10年度博士課程 入学

氏 名 大里 修一

指導教官名 白子 幸男

論文題目 **ムギ類萎縮ウイルスのRNA複製酵素p152およびp211の
生物学的特性に関する研究**

ムギ類萎縮ウイルス (*Soil-borne wheat mosaic virus* : SBWMV) は *Furovirus* 属のタイプ種で、土壤中に生息する *plasmodiophoraceous* 菌類の *Polymyxa graminis* によって伝搬され、植物体への感染増殖には 20 °C 以下の低温を必要とする。世界各地のコムギ生産地において、冬コムギに萎縮病およびモザイク病を引き起こし、収量の減少をもたらす農業上重要な病原ウイルスである。SBWMV は2分節のプラス鎖RNAゲノムを持ち、日本分離株のRNA1は7226塩基とRNA2は3574塩基からなる。RNA1には5'末端側から、152-kDa タンパク質 (p152) と211-kDa タンパク質 (p211) の2種類のRNA複製酵素がコードされている。p152はN末端領域にメチルトランスフェラーゼ領域とC末端側にヘリケース領域を持つ。p211はp152のUGA終止コドンのリードスルーによりポリメラーゼ領域がC末端側に付加されている。ウイルス感染細胞内のp152とp211の合成量比は約10:1と推定されている。一方、RNA2の5'末端側には19 kDaの外被タンパク質 (CP) がコードされ、そのUGA終止コドンのリードスルーにより外被タンパク質直下流の64-kDa領域 (RT) を含む合計83 kDaのタンパク質 (CP-RT) と、3'末端側には、機能不明のシステインに富むタンパク質がコードされている。

プラス鎖RNAウイルスは、分節ゲノム、サブゲノムによる発現、ポリプロテイン発現、リードスルー発現、リーキースキャンニング発現、フレームシフト発現

など、さまざまなゲノム構成と遺伝子発現様式を有するが、複製酵素には必ずゲノム複製を司る RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) をコードしており、機能ドメインが単一のタンパク質成分に全て存在している場合と、2種類のタンパク質成分に別れて存在している場合がある。

本研究は、SBWMV の RNA 複製酵素の発現様式と生物学的特性との関連を明らかにする目的で行った。すなわち (1) p152 とそのリードスルー産物である p211 発現変異型 RNA1 を数種類作出し、これらの変異体の複製能を、局部病斑宿主および全身感染宿主への感染性試験と、植物体中のウイルス増殖や子孫ウイルスの解析により明らかにし、p211 の複製における役割を調べた。(2) さらに詳細な研究を細胞レベル・分子レベルで行うために、オオムギ葉肉プロトプラスト実験系を確立し、作出した変異体の細胞レベルにおける複製能の解析を行い、p152 と p211 の関係について考察した。(3) 本ウイルスの感染成立には低温が必要であるという知見から、低温要求性とウイルス複製の関連性を明らかにするために、オオムギ葉肉プロトプラストへの感染系を利用し、温度感受性要因がウイルス RNA 複製に基づくことを証明した。(4) 複製酵素本体の分子間内相互作用を検証し、p152 と p211 のタンパク質レベルでの関係を調べた。

1. 植物個体を用いた p152 および p211 変異体の感染性の解析

RNA1 の全長 cDNA クローン pJS1 を用いて、p152 遺伝子の TGA 終止コドン をセリン(TCT, TCA)、アルギニン(AGG, CGA)、トリプトファン(TGG)、チロシン(TAT)、システイン(TGC)の各コドンに置換して、p152 を生じず p211 のみを発現する 7 種類の p211 変異体を構築した。それぞれの *in vitro* 転写産物を RNA2 感染性全長 cDNA クローン pJS2 由来の *in vitro* 転写物と共に *Chenopodium quinoa* (局部感染宿主)葉に機械的に接種を行った結果、p211 変異体では接種葉に野生型より小型の退緑斑が形成され、病斑粗汁液からウイルス外被タンパク質がウェスタンブロット法で検出された。すなわち p211 は *C. quinoa* 細胞において p152 非存在下でウイルス RNA 複製能を有し p211 変異型 RNA1 は野生型 RNA2 と共に、細胞間移行することが明らかとなった。また、トリプトファン(UGG)およびアルギニン(CGA)置換変異型 RNA1 は置換センスコドンが、UGA および UAG コドンへ復帰変異することが明らかとなった。一方、全身感染宿主であるコムギには感染は認められなかった。

野生型の UGA 終止コドン を UAG および UAA 終止コドンに置換した終止コドン変異体では、*in vitro* タンパク質合成系において p211 合成量が野生型に比べ約 10 分の 1 に減少していたが、*C. quinoa* 接種葉上において野生型ウイルスと同様

に大型の退緑斑を形成し、コムギに全身感染した。以上の結果より、p211 は単独で RNA 複製酵素活性を有するが、p152 が共発現することにより野生型の感染性を示すことが明らかとなった。

2. 植物プロトプラストを用いた p152 および p211 変異体の複製様式の解析

感染性試験で得られた結果は、(1) p211 変異型 RNA1 から翻訳される p211 複製酵素単独の活性が野生型の複製酵素活性よりも低いために生じた複製レベルの現象か、(2) 細胞間移行も関わった現象かの2つの可能性を示す。そこで、細胞レベルでのウイルス RNA 複製を解明するために、SBWMV の全長 cDNA 由来の感染性 *in vitro* 転写産物を用いたオオムギ葉肉プロトプラスト感染系を確立し、以下の実験を行った。

(i) SBWMV 感染の低温要求性

SBWMV は、20 °C 以下の低温で感染、増殖するウイルスであることが知られていたが、その原因は全く分かっていない。そこで、野生型感染性 cDNA クローンとオオムギ葉肉プロトプラストを用いて、細胞レベルにおける温度とウイルスの増殖・複製の関係について調べた。野生型を接種したプロトプラストを 15 °C、17 °C、20 °C、22 °C、25 °C の各温度で 24 時間培養し、それぞれのウイルス増殖性を検定した。ウエスタンブロット法では外被タンパク質が、ノーザンブロット法では RNA1 および RNA2 のゲノムとサブゲノムがそれぞれ検出されたことから、SBWMV RNA の複製効率は 17 °C で最も高く、複製量は高温になるにつれて減少し、25 °C では複製出来ないことが明らかとなった。また RNA1 のみでも複製し、複製最適温度は 17 °C であったことから、RNA2 コードされる各タンパク質ならびに RNA2 分子そのものが温度感受性に影響を及ぼさないことも明らかとなった。従って、RNA 複製適温の低下が SBWMV 感染性における低温要求性の主因であることが示唆された。

(ii) RNA1 変異体の RNA 複製能

植物体を用いた感染性試験の結果をうけて、各 RNA1 変異体のオオムギ葉肉プロトプラストへの感染性を調べた。まず、UAG および UAA 変異型 RNA1 と野生型 RNA2 の組み合わせで、接種 24 時間後には、CP と CP-RT が検出され、その蓄積量は野生型の CP と CP-RT 検出量と同程度であった。またウイルスゲノムおよびサブゲノムの検出量も野生型との違いは認められなかった。次に、p211 変異型 RNA1 を用いた場合には、接種後 72 時間目でも CP は検出されなかった。しかし、ノーザンブロット解析において、ウイルスゲノムが検出され、その量は野生型に比べ著しく少なかった。以上の結果から p211 単独の複製能は細胞レベルにお

いて低いことが明らかとなり、感染性試験の結果は複製レベルの現象であることが示された。

(iii) p152 の発現様式と RNA 複製酵素活性の関連

p211 のみで複製酵素活性を持つということは、一方で、感染細胞中に多量に存在すると考えられる p152 はどのような役割を有しているのだろうか。そこで、p152 のみしか発現しないように、Pol 領域を欠失させた pJS1.ΔPol と p152 遺伝子の終止コドン直下流にさらに 2 つの終止コドンを加えた pJS1.+AmOc の 2 種類の p152 変異体を構築した。p211 変異体と p152 変異体を共にプロトプラストに接種し、感染細胞から得られた全 RNA を用いたノーザンブロット解析を行ったところ、p211 変異型 RNA1 および p152 変異型 RNA1 の複製量は、野生型に比べて低く、p211 変異型 RNA1 単独接種の場合と違いは認められなかった。すなわち、p152 を供給しても複製量に違いは認められず、p211 の複製能は高まらなかったといえる。以上から、p152 をトランスに供給しても p211 の複製活性を高めないことが明らかとなった。従って、p152 と p211 は異なる RNA から翻訳された場合、活性の高い複製酵素複合体を形成せず、同一 RNA から翻訳されることで活性の高い複合体が形成させる可能性が示唆された。

3. 酵母 2 ハイブリットを用いた p152 と p211 間の相互作用

p152 と p211 がトランスに相互作用するか否かを調べるために、酵母 2 ハイブリッド実験系を用いて p152 と p211 におけるタンパク質間相互作用の有無を検討した。複製酵素の全長および各ドメインを基準に、DNA-BD と AD との融合タンパク質として発現させ、2 種類の酵母と 2 種類の酵母 two-hybrid 用のプラスミドを用いた。また、通常の two-hybrid 検定の温度は、酵母の生育適温の 30 °C であるため、SBWMV の複製適温である 17 °C でも検定を試みた。いずれの場合においても相互作用は認められず、p152 と p211 間の相互作用は検出できなかった。

以上のすべての結果を総合して、SBWMV の複製最適温度は 17 °C であった。複製酵素の p211 と p152 はトランスに翻訳されても、活性の高い複製酵素複合体を形成することはできず、複合体形成には宿主因子の関与も考えられるが、少なくとも同一 RNA 分子から両タンパク質が翻訳されながら複合体を形成する、すなわち翻訳共役的複合体形成が必要であることが示唆された。