

論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻

平成 20 年度博士課程 進学

橋本 将典

指導教員 東京大学大学院教授 難波 成任

Flexivirus 科ウイルスの細胞間移行に関わる遺伝子の機能に関する解析

植物ウイルスは遺伝子構造・感染戦略などの点で極めて多様であり、様々な植物に感染し農作物の収量や品質の著しい低下を引き起こす。植物ウイルスの分類体系を整備し、個々のタンパク質の系統関係を明らかにすることは、植物ウイルスの早期の診断を可能にするとともに基礎研究においても重要な基盤的知見となる。また、植物ウイルスは感染・増殖の過程を宿主細胞に依存するために化学農薬による防除は極めて困難である。従って、多様な植物ウイルスに共通した感染戦略を明らかにし普遍性のあるウイルス防除手段の確立が望まれている。

Flexivirus 科は長さ 470nm~1000nm のひも状のウイルス粒子を持ち、単一のプラス 1 本鎖 RNA をゲノムに持つウイルスの一群である。*Flexivirus* 科には、農業生産上被害が大きいウイルスが多数含まれているほか、近年 *Flexivirus* 科ウイルスと高い相同性を有する菌類ウイルスが複数発見されている。従って、本ウイルス群の分類体系を整備し感染戦略を解明することは、ウイルス学上の意義のみならずウイルス病の診断といった応用面でも重要である。

ウイルスは植物細胞に侵入すると、初期感染細胞においてウイルスゲノムを「複製」し、細胞間をつなぐ原形質連絡を通じて「細胞間移行」し隣接細胞へと拡がる。さらに、篩部細胞に到達したウイルスは篩管流に乗り植物体全体に「長距離移行」する。植物ウイルスの多くは、細胞間移行に必須な移行タンパク質 (movement protein; MP) をゲノムにコードしている。一方、外被タンパク質 (coat protein; CP) はウイルスゲノム RNA と共にウイルス粒子を形成する主成分であるが、複数のウイルス属においては細胞間移行にも関与する

ことが知られている。しかし、その具体的な機能についてはほとんど知られていない。

以上のような背景から本研究では、前半で *Flexivirus* 科ウイルスの遺伝子構造を明らかにし、個々のタンパク質の系統関係を明らかにした。一方、本研究の後半では *Flexivirus* 科 *Potexvirus* 属ウイルスの細胞間移行に関与する CP 遺伝子の機能について詳細な解析を行い、細胞間移行に必須なアミノ酸残基を特定した。

1. *Flexivirus* 科ウイルスの遺伝子構造に関する解析

Flexivirus 科 *Potexvirus* 属のアスパラガスウイルス 3 (asparagus virus 3; AV3) および *Carlavirus* 属のフキモザイクウイルス (butterbur mosaic virus; ButMV) は、いずれも宿根性の作物を宿主としていることから遺伝子レベルでの正確な診断技術の確立が望まれている。そこで本研究では、両ウイルスの遺伝子構造ならびに分類学的性状を明らかにした。

1.1 アスパラガスウイルス 3 (asparagus virus 3; AV3) の遺伝子構造

AV3 は、若い葉に軽微な黄化症状を呈するアスパラガス (*Asparagus officinalis*) から見出された。およそ 580 nm×13 nm のひも状の粒子を持ち、抗血清に対する反応などから、*Potexvirus* 属の暫定種とされていた。

AV3 のゲノム塩基配列を解読したところ、poly (A) tail をのぞき全長 6,937 塩基であった。ゲノムには、他の *Potexvirus* 属ウイルスと同様に 5 つの ORF が存在し、5' 末端からそれぞれ複製酵素 (RNA-dependent RNA polymerase; RdRp)、移行タンパク質 (triple gene block protein 1, -2, -3; TGBp1, 2, 3) および CP であると推定された。また、RdRp および CP のアミノ酸配列を用いて系統樹を作製したところ、いずれにおいても AV3 は scallion virus X (ScaVX) と非常に近縁であることが示唆された。

次に、AV3 と ScaVX の関係を明らかにするため、RdRp および CP の塩基配列ならびにアミノ酸配列を比較したところ、既存の *Potexvirus* 属の種と系統の分類基準では両者の関係を判断できなかった。そこで、*Potexvirus* 属内で TGB を含めたすべての ORF について塩基配列ならびにアミノ酸配列に基づくペアワイズ解析を行ったところ、細胞間移行に関与することが知られている TGBp3 および CP において同種異系統と判断される相同性の値を示した。以上のことから、AV3 は ScaVX と同種異系統であると考えられた。

1.2 フキモザイクウイルス (butterbur mosaic virus; ButMV) の遺伝子構造

ButMV はモザイク症状を呈する栽培フキ (*Petasites japonicus*) から見出された。およそ 670 nm×13 nm のひも状の粒子を持ち、*Carlavirus* 属のタイプ種である carnation latent virus (CLV) ウイルス粒子に対する抗血清に反応することなどから同属に分類されている。

ButMV のゲノム塩基配列を解読したところ、poly (A) tail を除き全長 8,662 塩基であった。他の *Carlavirus* 属ウイルスと同様に、*Potexvirus* 属ウイルスと類似したゲノム構造を有し、5' 末端から RdRp、TGBp1~3、CP のほか、最も 3' 末端には *Carlavirus* 属を含む一部の *Flexivirus* 科に特有の核酸結合タンパク質 (nucleic acid binding protein; NABP) がコードされていた。次に、RdRp および CP のアミノ酸配列を用いて系統樹を作製したところ、RdRp の系統樹において ButMV は CVNV と最も近縁であった。一方で CP の系統樹においては CLV と最も近

縁であった。以上のことから、ButMV は *Carlavirus* 属に分類されるべきウイルスであることが明らかにされた。

NABP は *Carlavirus* 属ウイルスの全身感染には必須ではないものの、RNA および DNA への結合活性を有することから宿主との相互作用において何らかの機能を有すると考えられている。NABP について系統樹を作成したところ、*Carlavirus* 属ウイルスの NABP は互いに遠縁な 3 つのグループに分かれることが見出された。さらに他属ウイルスにコードされる NABP はいずれも属内で一つのクラスターを組んだが、*Carlavirus* 属ウイルスの NABP は他属ウイルスのものと入れ子状態になることが判明した。以上のことから、*Carlavirus* 属ウイルスの NABP は、一度の水平動により獲得された後他属ウイルスへ拡散したか、系統的に離れたグループごとに独立して他属ウイルスから水平移動により獲得されたか、宿主との相互作用の結果収斂進化を遂げたものと推測された。

2. *Flexivirus* 科ウイルスの細胞間移行における外被タンパク質に関する解析

2.1 CP に存在する 2 つの AUG コドンと病原性の関係

plantago asiatica mosaic virus (PIAMV) は、約 500 nm×13nm のひも状のウイルスであり、*Potexvirus* 属に分類される。CP 遺伝子の 5'末端には同一フレーム内に 2 つの AUG コドン(5'末端側から AUG1、AUG2 とする)が存在している。

そこで、AUG1、AUG2 あるいは両方に変異導入したウイルス (それぞれ mCP1、mCP2 および mCP12) を構築し、CP の翻訳開始点とウイルスの病原性との関連について解析した。タバコ属植物 *Nicotiana benthamiana* にアグロインフィルトレーション法により各変異ウイルスを接種したところ、mCP2 は野生型の PIAMV と同程度の病原性を示したのに対して、mCP1、mCP12 は病原性が著しく低下した。また、CP 抗体を用いた Immuno-tissue blot 法により接種葉におけるウイルスの拡がりを調べたところ、mCP2 は野生型の PIAMV と同程度にウイルスが拡がったのに対して、mCP1 では拡がりが著しく抑制された。以上の結果から、mCP1 は野生型の PIAMV および mCP2 と比較してアミノ末端領域の 14 aa を欠失したことにより、ウイルスの拡がりが抑制され、その結果病原性が低下したと考えられた。

2.2 トランス相補実験を用いたウイルスの細胞間移行に関する解析

Potexvirus 属ウイルスの CP は細胞間移行に関わることが知られているため、細胞間移行における CP アミノ末端領域の 14 aa の機能について詳細な解析を試みた。まず、CP 遺伝子を欠失させ GFP 遺伝子を導入した変異ウイルス PIAMV-GFPΔCP を構築した。PIAMV-GFPΔCP は細胞間移行能を失っているため、*N. benthamiana* に接種すると GFP 蛍光が単一細胞にとどまった。PIAMV-GFPΔCP と同時に CP を一過的に発現させたところ、GFP 蛍光の拡がりが観察され、細胞間移行が相補された。このようなトランス相補実験を用い、CP アミノ末端領域の 14 aa を欠失した CP14Δ を一過的に発現させたところ、GFP 蛍光の拡がりは認められず PIAMV-GFPΔCP の細胞間移行は相補されなかった。

Potexvirus 属の CP は細胞間移行およびウイルス粒子形成において重要な機能を果たしている。そこで、CP14Δ によるウイルス粒子形成能について調べた。PIAMV-GFPΔCP ととも

に CP14Δ を一過的に発現させウイルス粒子を精製したのち電子顕微鏡を用いて観察したところ、野生型の PIAMV と同様のひも状のウイルス粒子が観察された。以上の結果より、CP アミノ末端領域の 14 aa はウイルス粒子形成に必須ではないが、細胞間移行に重要であると考えられた。

さらにトランス相補実験を用いて細胞間移行に重要な領域の特定を試みた。まず、CP アミノ末端領域の 5 aa を欠失した CP5Δ を一過的に発現したところ、細胞間移行は相補されなかった。次に、アラニンスキャニング変異導入により、細胞間移行に重要なアミノ酸残基の同定を試みた。CP5Δ において欠失させた 5 つのアミノ酸残基のそれぞれをアラニンに置換した CPL3A、CPN4A、CPQ5A、CPP7A を作製した (6 番目はアラニン)。トランス相補実験を行ったところ、CPN4A、CPQ5A、CPP7A は PIAMV-GFPΔCP の細胞間移行を相補したが、CPL3A は相補しなかった。これらのことから、CP アミノ末端領域の少なくとも 5 aa が細胞間移行に必須であり、特に 3 番目のロイシン残基が細胞間移行に重要であることが示唆された。

次に PIAMV の CP アミノ末端領域の細胞間移行における機能が、普遍性を有する可能性について検討を行った。*Potexvirus* 属ウイルスのなかで PIAMV にもっとも近縁な種である tulip virus X (TVX) およびタイプ種である potato virus X (PVX) の CP アミノ酸配列を PIAMV と比較し、PIAMV の CP アミノ末端領域 14 aa に該当する TVX の CP と PVX の CP のそれぞれのアミノ末端領域と CP14Δ を融合タンパク質として発現するキメラ CP (TV-CP、PV-CP) を作製した。TV-CP は PIAMV-GFPΔCP の細胞間移行を相補したが、PV-CP は細胞間移行を相補しなかった。このことから、*Potexvirus* 属内の近縁なウイルス種間において CP アミノ末端領域の機能は高度に保存されている可能性が考えられた。

Potexvirus 属ウイルスの CP アミノ末端領域はウイルス粒子の表面に露出することが知られており、TGB などのウイルス因子や宿主因子と相互作用する可能性が考えられる。これまでに、*Closterovirus* 属ウイルスの CP が MP と相互作用する例や、*Potyvirus* 属ウイルスの CP が宿主植物の DnaJ 様タンパク質と相互作用する例などが知られており、これらの相互作用はウイルスの細胞間移行に重要な機能を持つことが示唆されている。*Potexvirus* 属ウイルスの CP アミノ末端領域の機能は他のウイルス属で保存されている可能性が考えられ、今後さらなる詳細な機能の解明が期待される。

以上を要するに、本研究では 2 種類の *Flexivirus* 科ウイルスの遺伝子構造を明らかにし、細胞間移行を含むウイルスの感染過程において重要な機能を持つ個々のタンパク質の系統関係について議論を行った。また、*Flexivirus* 科ウイルスの細胞間移行における外被タンパク質の機能について解析を行い、細胞間移行において重要なアミノ酸残基を特定した。当該アミノ酸残基が他のウイルス因子あるいは宿主因子との相互作用に重要であると考えられたことから、本研究の成果は他のウイルスの細胞間移行にも共通した CP の機能を明らかにする端緒となる可能性があり今後の展開が期待される。