学会賞受賞者講演

キュウリモザイクウイルスの感染増殖に関する分子生物学的研究*

高 浪 洋 一**

Yoichi TAKANAMI**: Molecular Biological Study on the Infection and
Multiplication of Cucumber Mosaic Virus

著者は九州大学農学部に学部学生として在籍した折にキュウリモザイクウイルス (CMV: cucumber mosaic cucumovirus) に出会い、卒業後の 1966 年、当時の日本専売公社秦野たばこ試験場に職を得て、都丸敬一郎 (前東京農業大学教授) の下で本格的に CMV に関する研究を開始することとなった。以来 26 年間、さらにその後の大学での 6 年間を経た現在に至るまで CMV を中心とした植物ウイルスに関する研究を続けてきた。大学教養部時代の生物の講義で Hershey and Chase (1952) による bacteriophage T2 の一段増殖に関する研究の話聞いたことがウイルスに興味をもつ契機となった。したがって、研究開始当時からウイルス核酸ならびにウイルスの感染・増殖機構に関心が高かった。しかしながら、当時はアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) もない時代であり、核酸のサイズによる分画はショ糖密度勾配遠心に頼らざるを得ない状況であった。組換え DNA 技術を含む現在の分子生物学的技法の進展にはまさに隔世の感があると言わざるを得ない。

CMV は温帯、亜熱帯地方を中心に発生し、その宿主範囲は双子葉植物を中心に 1000 種にも及ぶと想像されている。温帯地方に属する我が国においても、その広い宿主範囲から蔬菜、花卉、タバコなどに大きな被害を与えている重要植物病原ウイルスのひとつである。CMV はその分子生物学的性質がもっともよく研究された植物ウイルスのひとつであり、国内外の研究者に一歩先を行かれて発奮することもしばしばであったが、そのような基礎的研究に従事することができたのは、すぐには実用に結びつかない研究に深い理解を示された上司の方々のおかげである。また、ここに概説する知見の多くは、優れた共同研究者や学生達の努力によって得られたものであることを強調しておきたい。

1. ウイルスの精製

今日、CMV についてはきわめて容易に高収量で純度の

高い精製ウイルスを得ることができる。しかしながら、当時は必ずしもそうではなかったもので、種々検討している過程で CMV 粒子が 2 価の金属イオンによって可逆的に凝集沈殿する現象を見いだした。その発見が基になって、金属キレート剤を用いてウイルスの凝集を防止することにより安定的に精製 CMV を得ることが可能となった。ただし、現在でもよい出発材料すなわち高濃度のウイルスを含む罹病葉を準備することが肝要であることに変わりはない。

2. プロトプラストを用いた CMV RNA の生合成に関する研究

当時千葉市にあった農林水産省植物ウイルス研究所において建部、大槻によってタバコプロトプラストを用いた植物ウイルス実験系が開発され、世界の注目を集めた。植物ウイルス研究所に赴いて直接教を賜り、細胞レベルにおける CMV の感染増殖機構解明に関する実験を開始した。葉組織を用いた従来の実験系では接種葉の表面細胞のわずか 1% 程度の細胞が感染し、それが次第に広がっていく過程を追うことしかできなかったもので、プロトプラストに対して大きな期待をもったのである。

CMV RNA は 3 分節のプラス 1 本鎖 RNA ゲノムを持つ多粒子性ウイルスであり、その複製過程ならびに粒子内には RNA1~4 の長さの異なる 4 種の RNA が存在する。これらの CMV RNA と宿主の ribosomal RNA は PAGE において近い位置に泳動されるため、CMV RNA の生合成のみを追跡することが困難であったが、プロトプラストに紫外線照射とアクチノマイシン D 処理を併用することによって宿主の RNA 合成のみを抑制できることが明らかになった。これによって感染細胞内におけるウイルス核酸合成の選択的検出法が確立され、一段増殖系におけるウイルス RNA 合成について詳細に検討することが可能となった。まず、CMV RNA 各成分の増殖の時間的推移について

* 平成 10 年 5 月 20 日 平成 10 年度大会で行われた学会賞受賞者講演の要旨

** 九州大学農学部 Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

検討し、RNA合成が接種4時間目から12時間目にかけて指数関数的に増加し、18時間目頃頂点に達したのち、24時間目以降、核酸の崩壊と感染性の低下が起ること、RNA1、RNA2に比べてRNA3が過剰に合成されることが明らかになった。また、蛍光抗体染色によって接種6時間以内にウイルス抗原の検出が可能となること、接種24時間後では感染プロトプラスト1個当たり 3×10^6 個以上のCMV粒子が生産されることなども明らかとなった。あわせて、CMV RNAが複製した細胞内における2本鎖RNAの複製型ならびに複製中間型の存在を確認し、CMV RNAが2本鎖RNAを経て、いわゆる double-stranded メカニズムによって複製することを実験的に証明した。さらに、CMVのサテライトRNAもCMVゲノムRNAと同様に2本鎖RNAを経て複製されることも明らかになった。

3. CMV RNA 複製酵素に関する研究

1980年秋からカリフォルニア大学バークレー校ウイルス研究所のFraenkel-Conrat博士のもとに博士研究員として滞在し、CMV感染によって感染細胞内で誘導されるRNA依存RNA合成酵素についての研究を行った。タバコとキュウリでCMV感染によって誘導されるそれぞれの酵素の精製法を確立し、それらの性質について検討した。その結果、それらは細胞質に可溶性の状態で存在し、それぞれ異なる分子量ならびに酵素学的性質を示したことから、ウイルス感染の結果として誘導される宿主遺伝子由来の酵素であると結論した。当時はこの種の酵素がウイルスRNAの複製に関与しているのではないかとの見方もあり、ウイルスRNA複製酵素に関する研究に混乱をもたらしたが、その後否定されるに至った。現在でも本酵素の植物生理学的意義は明確ではないが、植物側の防御反応のひとつである可能性も考えられ、今後検討すべき課題と思われる。

帰国後さらにウイルスRNA複製酵素について検討を進めた結果、ウイルスの複製に直接関与するウイルスRNA複製酵素は上記の宿主由来の可溶性酵素とは別物であって、感染細胞内の小胞体に結合した状態で内在性鋳型ウイルスRNAを含むウイルスRNA複製酵素複合体として存在することが明らかになった。また新田らとともに、タバコプロトプラストにRNA1と2のみを同時に接種することにより細胞内膜成分に結合した形の複製酵素活性が発現し、RNA1およびRNA2の自立的複製が起ることを示した。この研究はCMV RNA複製酵素遺伝子がRNA1と2の遺伝情報に基づくことを初めて実験的に証明したものである。あわせて、後述のサテライトRNAもその情報に基づいて複製すること、RNA1とRNA2の存在下でもRNA4の自立的複製は見られないことなどが実証された。さらに、RNA1とRNA2の遺伝情報に基づくウイルス特異的非構造タンパク質、すなわちウイルスRNA複製酵素

の構成成分がCMV感染タバコプロトプラストにおいて発現していることが確認された。

4. CMV RNA の構造と機能に関する研究

CMV RNAの構造解明の手始めとして、RNA1~4の3'末端塩基を決定し、それらがすべて3の位置に水酸基をもつアデニンであることを報告した。現在、あるウイルスの全塩基配列を決めたとしてもそれだけでは学術誌の一報とすることさえ困難であるが、当時(1977)は末端塩基決定だけでも一流誌に掲載されたことを考えると、技術の進展と研究の急速な発展に深い感慨を覚えるを得ない。

その後、片岡、新田らとともに日本産CMV黄斑系(CMV-Y)のRNA1~3全遺伝子の塩基配列を決定し、すでに外国で報告されていたサブグループIIに属する系統とは塩基配列の上でも明らかに異なることを示した。これらの結果を基にして、鈴木、桑田らの努力によりCMVの各RNAゲノムについてファージT7プロモーターの下流に接続した完全鎖長cDNAクローンの作出に成功し、試験管内で感染性を有する転写RNAの合成系が確立された。この実験系を用いて3aタンパク質ならびに外被タンパク質領域に欠失部位を挿入した種々の人工突然変異RNA3を作出し、試験管内転写RNA1およびRNA2とともにタバコに接種することによって、ウイルス遺伝子の機能解析を進めた。RNA3にコードされる3aタンパク質領域に欠失をもつ変異株は細胞レベルでのみ感染が可能であることが示され、このタンパク質がウイルスの細胞間移行に関わることが実験的に証明された。さらに外被タンパク質(CP)領域に欠失をもつ変異体ではウイルス粒子が形成されず、全身感染も起こさないことから、粒子形成が感染植物におけるCMVの全身的長距離移行に必要であることも明らかになった。

5. ウイルス遺伝子と病徴発現ならびに宿主特異性に関する研究

CMVには病徴の違いや宿主域の違いから数多くの系統が存在することが知られている。ある宿主植物における病徴発現の系統間差異や系統による宿主域の相違は、それぞれの系統がもつウイルス遺伝子の情報に支配されることは明らかである。このような宿主とウイルスの相互関係に関する分子機構を解明する目的で、いくつかのCMV系統と数種の宿主植物の組み合わせを用いてウイルス遺伝子側からの検討を行った。

古くから著者らが実験に用いてきたタバコに黄色モザイクを示す黄斑系CMV-Yならびに通常の緑色モザイク症状を示す普通系CMV-Oの病徴発現の差異は、鈴木らとの検討によりCPのN末端から129番目のアミノ酸の違いに支配されることが明らかとなった。すなわちCMV-Yのそれはセリン、CMV-Oではプロリンであり、部位特異的突然変異株作出法によりそれらのアミノ酸を相互に入れ替

えた変異体の病徴は相互に変化することが明らかになった。同様に、CMV-Yによるセンニチコウならびにヒヤクニチソウ上の黄斑、えそ斑誘導もCPの129番目のアミノ酸に支配されることも竹下らとの研究により明らかとなった。CPにおけるただ1個のアミノ酸置換によるウイルスのphenotypeの劇的変化はウイルスの系統の定義について再考を迫るものであろう。

小室(1966)は多くのCMV系統を宿主域の違いによって分別可能であることを記している。ダイコンより分離したCMV-D8はダイコンに全身感染可能であり、メロンから分離したCMV-KMはウリ科植物に全身的に激しいモザイク症状を呈する。一方、CMV-Yは両植物では接種葉のみの感染にとどまるが、接種葉における増殖の程度において系統間に大差は見られなかった。これらの違いについて分子生物学的な検討を行うため、竹下らとともにこれらの系統についてもCMV-Yと同様に全ゲノムRNAの試験管内転写系を確立した。それらのcDNAクローンに由来する種々のシュードレコンビナント、キメラRNA3や部位特異的変異体を用いて検討した結果、ダイコンへの全身感染能はRNA2とRNA3の遺伝情報に、ヒョウタンにおけるウイルスの遠距離移行はRNA3にコードされる3aタンパク質ならびにCPの両遺伝子に支配されることが明らかとなった。また、これらの結果は、ウイルスの細胞間移行の機構が葉肉細胞間のそれと葉肉細胞と維管束系細胞との間のそれとはやや異なることを示唆している。

以上のようなウイルス遺伝子の構造の違いと宿主植物における最終的な病徴発現との間には複雑な生化学的過程が存在するであろうが、宿主側の遺伝子の反応も含めて今後の検討課題である。

6. キュウリモザイクウイルスのサテライトRNAに関する研究

著者らは、温室でCMVを接種したタバコが時として通常の緑色モザイク病徴ではなく特異的な鮮黄色モザイク症状を現すことを経験した。その原因は長らく不明であったが、種々のロットの精製ウイルスRNAをPAGEで比較しているうちに、この現象がある特定のサテライトRNAの存在によって生じることに気がついた。その際に、サテライトRNAが高圧蒸気滅菌処理でも完全に失活させることは困難であるほど物理的安定性が高いことから、取り扱いに慎重な注意が必要であることが知られた。また、ササゲの接種葉の単病斑分離とタバコにおける病徴観察を組み合わせることによって、サテライトRNAの可逆的な添加、除去が可能であることを示し、サテライトRNAが親ウイルスの増殖や病徴発現に与える影響を直接的に調べる方法を確認した。このサテライトRNA(Y-satRNA)はCMVに感染した大部分の*Nicotiana*属植物やトウガラシの病徴を劇的に変化させることから世界の関係者の注目を集め

た。さらに、増田らとともにいくつかのサテライトRNAの全構造を比較解析し、Y-satRNAはその他の普通のサテライトRNAには存在しない特異的な挿入配列を分子の中央部にもっていることを明らかにした。

Y-satRNAの塩基配列と鮮黄色モザイク誘導能との関係を知るため、DNA組換え技術を用いて作製した種々のキメラあるいは人工突然変異サテライトRNAがCMV感染タバコの病徴に及ぼす影響を調べた結果、中央部領域に存在する特定の部分塩基配列が鮮黄色モザイク誘導を、また、3'末端側の特定領域がトマトにおけるえそ症状の発現を支配することが明らかになった。さらに、野外圃場から、Y-satRNAときわめて類似した分子構造と中央部挿入塩基配列をもつが、鮮黄色病徴を誘導しない分離株が得られ、病徴発現を支配する領域の塩基配列をより詳細に検討することが可能となった。桑田、増田らとの研究により、鮮黄色発現を支配する領域内の塩基配列を人工置換することによって両者の表現形質を相互に変化させることに成功した。さらに、この領域は堅固な2本鎖stem構造をとらず、植物のクロロフィル色素合成経路に関わるtRNAと相補性を示すことが判明し、鮮黄色病徴発現がアンチセンスメカニズムによる色素合成経路の特異的阻害に基づく可能性が示された。

サテライトRNAが存在するとウイルスの増殖が1/20以下に抑制されることから、ウイルスRNAの複製との間に競合関係が生じると考えられ、結果的にサテライトRNAはCMVの病徴をきわめて軽微にする性質をもつ。そこでこの現象を利用したCMV耐性形質転換植物の作出に着手したが、そのころイギリスの研究者らによって一歩先に成功例が発表されてしまった。しかしながら、実用的見地から仕事を進めることにし、いくつかのサテライトRNA分離株を野外から収集した。その中からトマトにえそを起さず、病徴抑制効果の高いサテライトRNAを選抜し、その遺伝子を導入した形質転換タバコならびにトマトを得て、それらがCMVに対して実用的な耐性を示すと、タバコでは導入形質が少なくとも自殖5代目までなんら変異を起こすことなく安定に伝達されることを確認し、模擬的環境下の圃場試験を実施するに至った。

これら一連の研究の大半は著者が日本たばこの研究機関に在籍中に多くの方々の協力の下に行われたものである。研究の端緒を与えていただいた前東京農大教授都丸敬一博士、終始ご指導ご鞭撻を賜った久保進博士に深甚なる感謝の意を表します。また共同研究者として努力を惜しまれなかった今泉誠子、高林美千代の両氏、桑田茂、増田税(現北海道大学)、新田直人、片岡二郎、鈴木匡(現東京大学)の各博士ならびに元大学院学生竹下稔博士をはじめとする教室関係者、学生諸氏に深く感謝します。