学会賞受賞者講演

ブロムモザイクウイルスの分子生物学的研究*

古 澤 巖**

Iwao FURUSAWA**: Molecular Biological Studies on Brome Mosaic Virus

1. はじめに

ブロムモザイクウイルス (BMV) は植物ウイルスの中でも最もよく増殖し、また、分節ゲノムであることから生化学的・分子生物学的研究に適しているため、多くの研究者がウイルス研究の材料として用いてきた。プロモウイルスに属する BMV は約 8000 塩基からなるプラス鎖の RNA をゲノムとし、3 本のゲノム RNA からなる植物ウイルスであるが、わずか 4 つの遺伝子しかもっていない。しかし、本ウイルスは宿主細胞内で約百万個の子孫粒子を合成し、宿主植物であるオオムギにモザイク症状を引き起こす。1984 年 Ahlquist によって世界で最初に、ゲノム RNA の cDNA から *in vitro* で感染性のある BMV RNA が合成された。その後の本ウイルスの研究は大いに進展し、他のウイルスの研究の発展にも大きく貢献した。我々の研究室においても、1991 年に *in vitro* RNA 合成系を確立し、BMV の増殖能力を利用した物質生産系の確立、ウイルス遺伝子を用いたウイルス耐性植物、ウイルスの遺伝子解析および宿主適応機構について研究を行った。以下にこれらの結果について述べる。

2. プロトプラスト系の確立

1968 年に建部によって世界で初めてタバコモザイクウイルス-タバコプロトプラストの系が確立されて以来、この一段増殖系は植物ウイルスの複製等に関する研究の発展に大きく貢献した。その後、種々のプロトプラスト系が確立されたが、イネ科植物のプロトプラスト系は色々な理由でなかなか確立されず、1977 年、筆者らは、BMV のオオムギプロトプラストでの一段増殖系を初めて確立し、BMV 粒子や RNA がオオムギプロトプラストに pino-cytotic に取り込まれるための条件を定め、浸透圧ショックや Ca イオンの重要性を論議した。このプロトプラスト系は細胞レベルと植物個体レベルでの BMV での増殖の

比較や、変異体の増殖能を調べる tool としてその後の研究に大きく貢献した。プロトプラスト系を用いた BMV の遺伝子発現に関する研究では経時的に合成される BMV 特異的タンパク質について解析し、RNA 複製酵素活性と BMV RNA 合成について分析した。

3. 非宿主植物プロトプラストにおける BMV の増殖

筆者らは、BMV-非宿主 (ダイコン、コマツナ) プロトプラストにおいてウイルスが増殖することを発見し、その後、種々の植物 RNA ウイルス-プロトプラスト系においてウイルスは植物を選ばないことが明らかとなり、RNA ウイルスにおいて細胞レベルでは非宿主は存在しないことがわかった。当時は細胞間移行に関与する遺伝子の存在が知られていなかった時代であり、研究はずっと後になって進展することになる。そして、種々のウイルスでこの移行に関する重要性が明らかにされ、研究は大いに発展した。このような非宿主細胞におけるウイルスの増殖は、本来の宿主であるプロトプラスト中での増殖よりも少なく、何らかの抵抗反応が働いていることが予測された。そこでアクチノマイシン D および紫外線によるウイルスの増殖に及ぼす影響を調べたところ、非宿主であるコマツナやダイコンプロトプラストにおいては、アクチノマイシン D および紫外線処理によって、BMV の増殖は明らかに促進され、また、逆にオオムギプロトプラストにおいては BMV の合成が阻害された。そのことは非宿主においては能動的な抵抗反応が、また、宿主細胞内ではウイルスの増殖に促進的なあるいは相補的な代謝系が働いていることが想像された。

4. *In vitro* における BMV RNA の合成

上述したように、Ahlquist によってすでに BMV のロシア株の全塩基配列が決定され、*in vitro* における BMV RNA 合成系が確立されていたが、我々の研究室において

* 平成 11 年 4 月 2 日 平成 11 年度大会で行われた学会賞受賞者講演の要旨

** 京都大学農学部 Faculty of Agriculture, Kyoto University, Kyoto 606-8502, Japan

も独自に合成系の構築に取りかかった。まず初めに、BMV ATCC66 株の全塩基配列を決定した。その結果、本株とロシア株とは約 98% のアミノ酸配列に対するホモロジーを示した。得られた cDNA クローンに生物学的活性があるかどうかを調べるため、カリフラワーモザイクウイルス 35 S RNA プロモーターの下流に接続し、プラスミドにクローニングした後、プラスミド DNA として植物に直接接種した結果、感染性があることを発見した。その後、この系は世界中で種々のウイルス系で利用された。cDNA が生物学的な活性をもっていることが明らかとなったので、この cDNA クローンを KU1 と名付けその後の実験に用いた。*In vitro* における BMV RNA の合成については Ahlquist が行った実験に従い、T7 プロモーターの下流に cDNA を結合し、キャップアナログ存在下で T7 ポリメラーゼを用いて感染性のある RNA を合成することに成功した。

5. BMV レプリコンを用いた外来遺伝子の発現

BMV のゲノム RNA1 および 2 の cDNA を、35S プロモーターの下流に結合し、Ti-プラスミドに組み込み、*Agrobacterium* を介してタバコ植物に導入した。この形質転換タバコは BMV のレプリコンをもつことになり、合成されたタンパク質は BMV のレプリカーゼを構成することができる。このような細胞にシス配列をもつ mRNA が導入されるとその mRNA は自律的に複製され、最終的に大量のタンパク質が合成されることが期待される。一方、BMV の外被タンパク質の発現機構を詳しく研究している過程で、ATCC66 株は 2 種類の外被タンパク質を合成することがわかった。すなわち、N 末端に存在する Met から 7 アミノ酸下流にさらにもう一つの Met があり、その 2 か所からタンパク質が合成されているため 2 種類のタンパク質が合成されることがわかった。また、その合成量は 2 か所とも同程度であることが明らかとなり、下流の Met を用いて正確に外来遺伝子と置換することによって、タンパク質合成効率を落とすことなく外来遺伝子産物を合成できることが明らかとなった。我々は外被タンパク質遺伝子とヒト γ -インターフェロン (γ -HIF) 遺伝子を正確に置換し、BMV レプリコンをもつタバコ植物に形質転換した結果、 γ -HIF の合成が認められた。糖鎖の違いはあるものの、その比活性はヒトのものとかかわらなかった。しかし、合成量は期待した量の 50 から 100 分の 1 であった。その後の実験から、RNA1 あるいは RNA2 がそれぞれ単独で発現しているような植物あるいはそれぞれの遺伝子産物である 1a および 2a だけが発現しているような植物、(RNA1 および 2 からレプリカーゼのシス配列を取り除いたものが mRNA として発現しているような形質転換植物) では“gene silencing”はそれほど強く認められないが、RNA1 と 2 が同時に発現し、自らコードしているレプリカーゼに

よって自己複製できるような系では強い発現制御が働いていることが明らかとなった。このような系では新たに BMV を接種しても全くその増殖を許さなかった。しかし、この制御は特異性が高く、キュウリモザイクウイルスの増殖に対して全く影響を与えなかった。すなわち、BMV のレプリコンが組み込まれたときのみ強い抑制が働いていることがわかり、物質生産の利用に際してはさらなる工夫が必要であることがわかった。

6. プロモウイルスによる宿主適応

上述したように、RNA ウイルスでは cDNA レベルで自由に組み換えが可能であるので、筆者は、同じ属に所属するウイルス間で遺伝子間置換が可能であるのか、また、置換されたキメラウイルスが植物体内でどのような挙動を示すのかについて、宿主植物が異なる 2 種のプロモウイルス BMV と Cowpea Chlorotic Mottle Virus (CCMV), 間で 3a 移行タンパク質 (MP) 遺伝子を正確に置き換えた CCMV (B3a), すなわち骨格は CCMV であるが 3a 遺伝子だけが BMV の 3a 遺伝子をもつものを作製した。このキメラウイルスをササゲに接種したところ、本来オオムギにしか対応できない MP 遺伝子 (B3a) をもっているため、ササゲに全身感染できない。しかし、接種後 2 週間も放置しておくと、約 10% の植物で全身感染が起きていることがわかった。

CCMV (B3a) がササゲに全身感染して上位葉で病徴が見られた葉からウイルス RNA の cDNA をクローニングし、塩基配列を調べたところ、MP 遺伝子のほぼ中央部に 1 アミノ酸変異 (Ser180Arg) を伴う変異体が見つかった。そこで人工的にこの変異だけをもつ変異体を合成し、ササゲに接種したところ 100% 感染が起こり、全身感染が見られた。また、この変異をもつ 3a 遺伝子を本来の BMV に戻したところ、オオムギに対する感染性を保持していることが確認された。すなわち、本来単子葉のオオムギに適応していた MP 遺伝子が、双子葉植物のササゲにも適応できるようになったことを意味する。さて、このような適応変異がどのような意味をもっているのかを明らかにするため、CCMV (B3a) のササゲにおける挙動を抗 BMV 抗体を用いた免疫組織化学的手法で調べた結果、このキメラウイルスは葉肉組織における細胞間移行が見られたが、維管束細胞への移行が阻止されており、全身感染できないことが明らかとなった。したがって、1 アミノ酸変異は維管束細胞への移行に関する適応であることがわかった。このような研究の過程で、様々な適応変異の獲得が期待されたので、実験のスケールを大きくし、適応変異が生まれる機構についてさらに詳細に検討した。その結果、これら変異株は全て 3a 遺伝子の中央部に獲得変異が集中していること、全ての変異が、Ser.Gln.Glu $\rightarrow$ Lys.Arg であること、そしてその

変異は塩基性側鎖をもつ Lys.Arg のどちらであっても良いことがわかった。また、その中央部の領域中に存在し、変異が認められなかった他の Ser.Gln.Glu を人工的に Lys.Arg に変異させ場合には、本来もっていた葉肉組織での細胞間移行能すらもなくなった。これらのことから、維管束細胞への移行は特定のアミノ酸が Lys および Arg に変異することが必要であること、この変異獲得は RNA 合成酵素の読み違いによるランダムな変異の導入で十分その獲得が可能であることが示唆された。

7. ウイルス遺伝子産物と直接相互作用する宿主因子

上述したように、多くの植物ウイルスはその増殖の過程で、宿主細胞に致命的な損傷を与えることなく多くの子孫を作ることが可能である。すなわち、BMV はオオムギ細胞中に約数百万個の粒子を合成し、その量は可溶性タンパク質の 50% にもなる。したがって、BMV は宿主細胞とさまざまな相互作用を通してウイルスの増殖を許容する条件設定を行っていることが容易に想像される。一方、BMV は 4 つの遺伝子しかもっておらず、これらの遺伝子産物がかなり複雑な機能をもっていると考えられる。そこでウイルスの遺伝子産物と直接相互作用する宿主因子を検索すべく、West-Western 法、Two-hybrid System 等を駆使して実験を行った。予備実験の結果から、3a タンパク質が細胞間連絡に存在することが観察されているので、細胞壁画分からタンパク質を抽出し、3a タンパク質との West-Western 分析を行ったところ、3a タンパク質と直接結合する宿主因子が細胞壁画分に存在することが明らかになった。また、これまでいわゆる RNA 複製酵素画分に宿主タンパク質である eIF3 が存在するという報告があり、これらの現象を基礎に、Two-hybrid System 法により、ウイルス遺伝子タンパク質と直接結合する宿主因子の検索を行った。これまで 1a, 2a, 3a, cp を Bait に数多くの検索を行ったが、現在のところ、皮肉にも cp と結合する宿主因子のみがクローニングされた。便宜上これらの遺伝子を Hcp1, Hcp2, Hcp3 と名づけた。これら 3 つの遺伝子はいずれも新規の遺伝子であり、その機能については明らかでない。これら遺伝子は Two-hybrid System で、cp 遺伝子の C 末端 10 数アミノ酸を Bait に用いて Hcp1, Hcp2 が、全長を用いて Hcp3 がつり上げられている。そこで、この C 末端 10 数

アミノ酸を順次アラニンに置き換え、Two-hybrid System での結合能とウイルスの病原性を比較したところ、Hcp1 については結合能と病原性の間に相関関係があること、すなわち結合能が失われると病原性が消失することがわかり、cp と Hcp1 の結合がウイルス増殖に必要であることが明らかとなった。Hcp2, Hcp3 については病原性に直接影響を与えないようであったが、今後詳しい解析が必要である。4 つのウイルス遺伝子についての解析が進行中であるが、これまでの結果から、それぞれの遺伝子が何らかの形で宿主遺伝子と相互作用をもち、1 細胞中で大量のウイルス粒子を合成する場の条件を整備しているものと思われる。まさにそのような条件設定が整った組合せが、ウイルス-宿主間の成立であると考えられる。

8. おわりに

ウイルスが宿主植物に感染し発病に至るまでには、種々の過程を経なければならない。それらは、細胞への侵入、ゲノムの複製、粒子化、細胞間移行、維管束細胞への移行であり、その結果としての発病である。これらの現象を BMV はわずか 4 つの遺伝子で成立させていることになり、本来遺伝子もっている機能に加えて、さまざまな機能を保持していることが想像される。cp 遺伝子と宿主因子である Hcp1 との直接的な結合がウイルスの全身感染を可能にしているような結果が得られたことは、このような仮説を肯定する 1 つの現象であるといえよう。今後、他の遺伝子についても詳細な研究が進めば、ウイルスの宿主適応機構が明らかとなり、新たなウイルス病防除戦略の道が開かれるものと信じる。

本研究を行うに当たりご指導を賜ったカナダ国アルバータ大学比留木忠治、東京大学岡田吉美両名誉教授、合衆国ウィスコンシン大学 Ahlquist 教授に感謝の意を表します。また、一連の研究は、現高知大学奥野哲郎教授、現北海道大学山岡直人助教授、京都大学三瀬和之講師をはじめとし、前川啓二、堀越 守、小林括平、中屋敷均、森 正之、海道真典、藤田泰成、沖中 泰各博士ならびに研究室関係者、学生諸氏の協力の下に行われたものであり、深く感謝いたします。