学術奨励賞研究要旨

キュウリモザイクウイルス遺伝子の機能に関する研究*

鈴木 匡**

Masashi SUZUKI**: Studies on Functions of Cucumber Mosaic Virus Genes

キュウリモザイクウイルス (CMV) はゲノムとして3本の (+) 1本鎖 RNA を持つ。そのうち RNA1 は 1a タンパク質を、RNA2 は 2a タンパク質をそれぞれコードし、それらは両方とも RNA 複製酵素の構成成分である。RNA3 は 3a タンパク質 (3a) およびコートタンパク質 (CP) の2種をコードしている。本研究では、CMV RNA1, 2 および 3 の完全長 cDNA クローンを構築し、*in vitro* 感染性トランスクリプトの作製を行い、それを基に CMV 黄斑系統 (CMV-Y) の RNA3 のコードする2種のタンパク質の機能を解析した。さらに、CMV 複製酵素遺伝子を導入した CMV 抵抗性形質転換タバコを作製し、興味深い知見が得られた。

1. 3a タンパク質およびコートタンパク質遺伝子の細胞間移行機能

RNA3 cDNA クローンの 3a あるいは CP の遺伝子内に欠失変異を導入し、これらの RNA3 部分欠失クローンのトランスクリプトを、RNA1 および 2 のトランスクリプトとともにタバコプロトプラスト、タバコおよびササゲ植物体に接種した。感染プロトプラストにおけるノーザン解析を行った結果、すべての RNA3 部分欠失クローンは複製したが、植物体ではいずれの欠失クローンも全身感染しなかった。CP の N 末端側 26 アミノ酸のみを欠失したクローンは、タバコ、ササゲで局部病斑を形成した。電顕観察の結果、この欠失クローンのウイルス粒子はかなり不安定であった。以上の結果、細胞間移行には 3a が必須であるが、全身移行には 3a とともに CP が必須で、その際、特に CP による完全なウイルス粒子の形成が重要であることが示唆された。

2. コートタンパク質の病徴発現に関与する領域

CMV-Y および M はタバコに黄色モザイク症状、CMV-O (普通系) は緑色モザイク症状を起こす。CMV-Y, CMV-O それぞれの RNA3 の CP 遺伝子について、アミノ酸置換クローンを作製し、それらのトランスクリプトを RNA1, 2 とともにタバコに接種したところ、N 末端から 129 番目のアミノ酸が Pro (O 型) の場合は緑色モザイク、Ser (Y 型) の場合は黄色モザイク、Leu (M 型) の場合は葉脈えそ症状を生じたが、野生型 CMV にはない Phe に置換すると接種葉にえそ斑を、Gly に置換すると緑色モザイクを生じた。以上の結果から、CP の N 末端から 129 番目のアミノ酸が黄色モザイク、緑色モザイクのみならずえそ病徴発現にも関わっていることが明らかになった。これらアミノ酸置換クローンの接種葉およびプロトプラストについてノーザンならびにウェスタン解析を行ったところ、RNA 量、CP 量

ともに野生型と大きな差は見られなかったが、えそ誘導型である Leu あるいは Phe 置換クローンでは電顕観察でウイルス粒子がほとんど検出されず、プロトプラストの蛍光抗体染色で抗原の凝集塊が認められた。また、Phe 置換クローンを接種したタバコ上葉から得られた全身感染復帰変異クローンを解析したところ、129 番目の Phe は保存されているが、他の部位に置換が認められる例があった。これらの結果から、CP 129 番目のアミノ酸とその近傍のアミノ酸とで形成される高次構造が変化し、ウイルス粒子の形成能が著しく低下した結果、えそ症状が誘導されると推定された。

3. RNA1 および 2 の cDNA を導入した形質転換タバコの作製とその CMV 抵抗性

近年、多くの植物ウイルスについてウイルス遺伝子の導入による抵抗性植物の作製が行われている。本研究では CMV の複製酵素をコードする RNA1 および RNA2 の cDNA をタバコに導入し、この形質転換タバコにおける導入遺伝子の発現と CMV に対する抵抗性について検討した。CMV RNA1 および RNA2 の完全長 cDNA をバイナリーベクター pBI121 の 35S プロモーターの転写開始点直下に連結し、タバコ (品種: BY-4) に形質転換を行った。得られた形質転換タバコからそれぞれ1系統を選抜し、両者を交配して RNA1 と RNA2 をともに発現する形質転換タバコ (V1V2) を作製した。RNase protection assay の結果、交配親ではそれぞれ RNA1, RNA2 が導入されているにもかかわらず、RNA1 あるいは RNA2 の転写量はきわめて低く、V1V2 では RNA1 および RNA2 の転写量が交配親の 10~20 倍と高くなっていた。このことから、V1V2 では RNA1 および RNA2 が転写後に自己複製しているものと推定された。V1V2 のプロトプラストは、CMV 粒子あるいは CMV RNA の接種に対してともに強い抵抗性を示したが、V1V2 植物体では CMV 粒子を接種した場合よりも CMV RNA を接種した場合のほうが特に強い抵抗性を示した。以上の結果は、ウイルス遺伝子導入形質転換植物の抵抗性の機構としてあげられている gene silencing, protein-mediated resistance のいずれの説でも十分説明できない現象であり、新たな抵抗性機構が存在する可能性が示唆された。

本研究を行うにあたり、九州大学農学部教授高浪洋一博士、日本たばこ遺伝育種研究所桑田 茂博士、北海道大学農学部助教授増田 税博士をはじめ多くの方々のご指導とご協力をいただいた。ここに心から深謝の意を表する。

* 平成 11 年 4 月 2 日 平成 11 年度大会で受賞した学術奨励賞研究の要旨

** 東京大学大学院農学生命科学研究科 Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan