カリフラワーモザイクウイルス・ベクター

池田 穰 衛

農業生物資源研究所

(受付: 昭和62年 4 月 4 日)

I. はじめに

DNA ベクターを用いた高等植物への遺伝子導入の試みは, *A. tumefaciens* の Ti プラスミドが発見されて以来急速に進展してきた¹⁾. Ti プラスミドを用いて, すでにバクテリアや動物由来の遺伝子や光合成関連の調節遺伝子などが植物細胞に導入されている. 得られた形質転換細胞 (カルス) から再分化した植物体においても導入された遺伝子の発現が認められている. さらに, transgenic plant では種子をとうして次世代へ導入遺伝子の伝達が安定に行なわれることも確認されている²⁻¹⁵⁾. Ti プラスミドによる遺伝子導入は, 大腸菌のトランスポゾンや動物のレトロウイルスによる遺伝子導入に類似していて, 導入された遺伝子は最終的に植物のゲノムの中に組込まれる. Ti プラスミド, あるいは改変 Ti プラスミド由来のベクターは非常に広範な双子葉植物を宿主として形質転換できる利点をもっているが, 単子葉植物を形質転換できない. この欠点を補うために, 最近プロトプラスト化した単子葉及び双子葉植物細胞を用いて, 電気パルス法 (Electroporation) や動物細胞の系で用いられているリン酸カルシウム法と類似の方法で直接裸の DNA (ベクター) を導入する (Direct gene transformation) ことが可能となった^{16) 25)}. 今後この方法は有効な遺伝子導入法として利用されると思われる. しかし, Direct gene transformation や Ti プラスミドを用いて導入した遺伝子が植物細胞でほとんど発現しない例も決して少なくない. これらの方法を用いた場合, 導入される遺伝子のコピー数が少なかったり, プロモーター活性そのものが低かったり, またゲノムへの組込みの場所が特定できないために導入された遺伝子の発現が

抑制される (position effect) 場合が知られている²⁶⁾. これらの問題を解決するために, 植物細胞に導入された遺伝子の存在状態 (ゲノム中, あるいはゲノムに組込まれず独立に存在する) に関係なく効率よく発現させるための発現ベクターが必要となってきた. したがって, 単子葉及び双子葉植物への遺伝子導入と発現あるいは形質転換を目的として植物ウイルス由来のベクターの利用が考えられる. つまり, 動物細胞の形質転換に用いられている SV 40 由来のベクターに類似したベクター, 即ち植物細胞で機能する複製起点とプロモーター, さらに有効な選択マーカーを持った植物ウイルス (由来) ベクターの利用が考えられる. また, 解析したい遺伝子産物や有用物質を植物で大量に生産させる場合にも組込みを伴わないウイルスベクターを利用する遺伝子導入法が必要である.

植物には DNA ウイルスの種類が非常に少なく, その分子生物学的研究も遅れているためにウイルスベクターの開発も遅れている. 現在までに 26 グループ, 約 200 種の植物ウイルスが分類されているが, その大部分は RNA ウイルスで, DNA ウイルスはわずか 2 グループ (Caulimovirus, Geminivirus), 約 10 種しか見つからない²⁷⁻²⁹⁾. カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) は, 植物ウイルスの中で最初に DNA ウイルスとして同定された Caulimovirus の代表的なウイルスである. CaMV のゲノムは小さく, また取扱いが容易であることからベクターの候補として注目され, 数多くの研究が行なわれている. Geminivirus のゲノムが一本鎖 DNA であるのに対して, CaMV は二本鎖 DNA をゲノムとすることからも植物のベクターとして注目されている. 最近になって, CaMV をベクターに用いて細菌由来の遺伝子を植物で発現させた例が報告されている (後述). また, CaMV は通常の DNA ウイルスの複製様式と異なり, 複製中間体として RNA を経由することから複製の問題でも注目を集めている. 本項では, CaMV をベクターとして利用する上で重要と思われる

Cauliflower Mosaic Virus : a prospective virus vector for higher plants

Ikeda Joh-E

National Institute of Agrobiological Resources

〒305 茨城県筑波郡谷田部町観音台 2-1-2

ウイルスの諸性質について述べ、後半ではベクターとして利用した実験例を紹介したい。

Ⅱ. カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の性質

CaMV は, Caulimovirus グループに属し, このグループに属するウイルスとして他に Carnation etched ring virus, Dahlia mosaic virus, Mirabilis mosaic virus, Strawberry vein banding virus などが知られている²⁷⁾。CaMV はアブラナ科の植物を宿主とし, 感染は葉を機械的に傷つけて接種するか, または昆虫 (アリマキ) の媒介によって成立する。感染 2 週間後ぐらいから systemic なモザイク病斑が現われ, 植物体は矮小化する。

1. 遺伝子構造

CaMV は環状二本鎖 DNA (～8 Kbp) をゲノムとする。ウイルス粒子 (成熟ウイルス粒子は封入体タンパクに包埋された状態で感染細胞質内に存在する) 中の環状二本鎖 DNA は α (－) 鎖の 1 か所 ($\Delta 1$), β (+) 鎖の 2 か所 ($\Delta 2$, $\Delta 3$) に不連続構造をもっている (図 1)。不連続部位の 5' 末端は一定しているが, 3' 末端は不定で, あたかも伸長過程にある DNA 鎖が 5' 末端の一部 (8～19ヌクレオチド) を置換した構造をとっている³⁰⁾。したがって, 不連続部位はニックやギャップではなく三重鎖構造と考えられる。現在, 3 株について全塩基配列が決定されており (8024³¹⁾, 8032³²⁾, 8016 bp³³⁾), これらの株に共通した 8 つの open reading frame (ORF) が α 鎖上の一方向に同定されている (図 1)。現在までに, ORF I はウイルスの増殖に必須の遺伝子で, 細胞から細胞へのウイルス DNA の伝搬に関与するタンパクをコードすると推測されている³⁴⁾, ORF II は昆虫による媒介性に関与する遺伝子³⁵⁾, ORF III は DNA 結合タンパクをコードする遺伝子³⁶⁾, ORF IV はコートタンパクの遺伝子³⁷⁾, ORF VI は封入体構成タンパクをコードし, ウイルス感染の宿主域決定に関与する遺伝子³⁸⁾ としてそれぞれ同定されている。最近 ORF V がウイルス DNA ポリメラーゼとして逆転写酵素をコードすることが明らかとなった^{39) 40)}。

2. 遺伝子の転写と発現

図 1 に示したように, 2 種類のウイルス RNA (19S, 35S) が α 鎖 DNA から転写される。ウイルス感染細胞の核中に, 不連続構造をもたない閉環状ウイルス DNA が検出されたことから, この DNA 分子が鋳型となって RNA ポリメラーゼ II により, これらのウイルス RNA は転写されるものと考えられる^{41) 42)}。また, それぞれの RNA の転写開始に対応するプロモーター領域 (P19s, P35s) も同定されている^{43) 44)}。両プロモーターとも, 転写開始部位 (+1) の上流 30 スクレオ

図 1 CaMV DNA (8024 bp) の物理地図 $\Delta 1$, $\Delta 2$, $\Delta 3$ は三重鎖構造不連続部位を示す α は (－) 鎖 DNA, β は (+) 鎖 DNA を示す。➡はオープンリーディングフレーム (ORF) の位置 (I～VIII) と方向を示す。内側の矢印は主ウイルス RNA (35S, 19S) の転写方向と位置を示す。P35s, P19s は 35S RNA および 19S RNA のプロモーター領域を, pA はポリ A シグナルの部位を示す。⇨はプライマー (tRNA^{met}) の推定結合部位

チド領域に TATA box が見い出される。さらに, P35s プロモーターでは -70 領域に CAAT box, -105 と -140 領域に SV 40 のエンハンサー Core 配列に類似した配列 (GTGGATTG, GTGGAAAA) が見られるなど, 動物細胞系で明らかにされている真核細胞のプロモーター構造の特徴をもっている。

19S RNA は封入体構成タンパクの mRNA である⁴⁵⁾。19S RNA は P19s プロモーターを利用して転写され (+1; 5,776 番目ヌクレオチド), 35S RNA と同一の部位で終結している (coterminal; 7,615 番目ヌクレオチド)。PolyA シグナル (AATAAA) は 35S RNA 転写開始部位 (7,435 番目ヌクレオチド) から 164 スクレオチド下流にあって, 19S RNA と 35S RNA の polyA シグナルとして機能している。35S RNA の転写は, 閉環状 DNA 分子を鋳型とし, $\Delta 1$ に相当する部位 (8,024/0) から 590 スクレオチド上流から開始する^{41) 46)}。転写開始後, ただちに現われてくる polyA シグナルを無視して転写を続ける。一周したのち, 転写開始部位を 180 スクレオチド越した部位で, polyA シグナルに従って転写終結し, ポリアデニル化されている。そのために, 35S RNA はすべての ORF をコードし, 両末端に 180

ヌクレオチド長の反復配列をもっている。35S RNA は、*in vitro* タンパク合成系では鋳型活性をまったく示さず⁴³⁾、ORF VI以外の他の遺伝子がどのようにして翻訳されるのか不明である。後述するように、35S RNA がポリシストロニック mRNA として働く可能も考えられる。

3. 複製

35S RNA と動物レトロウイルス RNA との類似性から、逆転写による複製モデルが提唱された^{47) 48)}。35S RNA の構造解析、実際には β (+)鎖の塩基配列(α (-)鎖を鋳型として転写された全ゲノムサイズの35SRNAの塩基配列に対応する)の解析から、 $\Delta 1$ 、 $\Delta 2$ 、 $\Delta 3$ の不連続部位に隣接した領域に、レトロウイルスのcDNA 合成開始のためのプライマー結合部位の特徴をもった構造が見出された。とくに、 $\Delta 1$ 不連続点から下流の14ヌクレオチドの塩基配列(35S RNA の5'末端から590—603ヌクレオチドの領域に対応する)が、tRNA^{met}の3'末端塩基配列と相補していた(この相補性は、大麦と酵母の細胞質 tRNA^{met}との比較により得られたもので、CaMV の宿主細胞質 tRNA については未定である)。 $\Delta 2$ と $\Delta 3$ の不連続領域にもレトロウイルスの(+)鎖合成のプライミング部位に特徴的なポリプリン配列が見出されている^{47) 49)}。

レトロウイルスでは、(一)鎖 DNA 合成のプライマー(tRNA)結合部位が鋳型 RNA の5'末端反復配列から数百ヌクレオチド内にあることが知られている。CaMV の35SRNA を逆転写の鋳型と想定してみると、35S RNA の5'末端反復配列から590—603ヌクレオチドに、仮想プライマー tRNA^{met}の3'末端と相補する配列が出現することになり、逆転写を考えるのに好都合の構造といえる。さらに、CaMV 感染細胞から、レトロウイルスの(一)鎖 DNA 複製時にみられる minus strand strong stop に対応すると思われる一本鎖 DNA が分離された。この一本鎖 DNA の5'末端には約75ヌクレオチドの RNA が共有結合しており、その塩基配列は、先に述べた大麦や酵母の tRNA^{met}にほぼ等しいものであった⁵⁰⁾。次いで、逆転写による複製中間体と考えられる CaMV DNA 複製中間体が検出されたことなどからも⁵¹⁾、CaMV DNA の複製過程にレトロウイルス様の複製、即ち逆転写の関与が強く示唆された。

その後、ウイルス DNA 複製中間体やウイルス粒子に結合した逆転写酵素様活性の同定⁵²⁾、さらに ORFV のアミノ酸配列が Mu-MLV 逆転写酵素の N 末端領域と非常に高い相同性をもっている³⁹⁾、などにより上記複製モデル(図2)はより確かなものとなった。また筆者らは、酵母で ORFV を発現させることにより ORFV

図2 CaMVDNA の逆転写による複製モデル

遺伝子産物が逆転写酵素であることを証明した⁴⁰⁾。また後半で述べるように、CaMV DNA にイントロンを挿入すると、ウイルス増殖に伴ってウイルス DNA からイントロンが除去されることを見出した⁵³⁻⁵⁵⁾。この結果は、RNA の情報が DNA に流れていること、即ち逆転写が起きていることを明確に示している。

Ⅲ. ベクターとしての性質

1. CaMV DNA のクローニングと感染

CaMV はアリマキによって伝搬されるが、カーボランダムで葉に傷をつけることによっても感染可能である。また、DNA でも感染可能なので、遺伝子操作したウイルス DNA の感染実験も極めて容易である。ウイルスおよびウイルス DNA の調製も容易で、1枚の感染葉から数十 μ g の CaMV DNA が調製可能である。CaMV DNA は大腸菌の種々のベクターでクローニングされている。通常、ウイルス DNA 上に1箇所存在する制限酵素 Sal I または Xho I の切断部位を利用してクローニングされている。制限酵素処理により、クローニング部位で大腸菌ベクターと切離し、カーボランダムとともに葉にぬりつけることにより感染が成立する⁵⁶⁾。この場合、切離した大腸菌ベクター DNA を取除く必要はない。また、切離されたウイルス DNA も線状構造のままでよい。タンデムに2コピー以上連結してクローニングしたものは、大腸菌ベクターと切離さなくても感染が可能である⁵⁷⁾。これらのことから、CaMV でも *in vitro* Genetics (reverse genetics) が可能である。この方法を用いて、挿入、欠失変異株や塩基置換変異株が作製されている⁵⁸⁾。

2. 遺伝子の挿入可能な領域とサイズ

CaMV のある変異株は、ORF II をほぼ完全に欠失しているにもかかわらず増殖することから、ORF II (アリマキに媒介されたウイルス感染に必須の因子、480 bp) はウイルスの増殖に不要と思われる⁵⁹⁾。また ORF II の Xho I 部位に種々の長さの DNA 断片を挿入し、ウイルス増殖の有無を調べたところ、256 bp までの挿入が可能であった⁶⁰⁾。256 bp 以上挿入すると、ウイルス DNA のパッケージングに不都合が生じるようで、ウイルスの増殖は完全に阻害される。ゲノム全体にわたって種々の挿入変異株が作製され、ウイルスの増殖能への影響が調べられた⁶¹⁻⁶³⁾。その結果、図3に示されるように、ORF II、ORF VII、ORF VI および ORF VI と ORF VII の間のノンコーディング領域への挿入が可能であった。ORF VI については大きな断片の挿入は不可能で、また欠失変異株では全く感染性が見られないことから²³⁾、ORF VI はウイルスの増殖に必須と思われる。一方、O

図3 CaMV の挿入変異株の感染性

矢印の位置に、示された長さの DNA が挿入されている。各組換え体ウイルスの感染性は→(有)、→(無)で示してある。41~3は不連部位を、➡はORF (I~VIII) の位置と方向を示す。

RF VII (約290 bp) と、ORF VII と ORF I の間のノンコーディング領域 (約60 bp) は完全に除去してもウイルスの増殖に影響しない。したがって、この領域と ORF II の領域を欠失させ、かつパッケージングの可能限界まで挿入するとすれば約1,000 bp の DNA まで挿入できると思われる。ORF VI と ORF VII の間には、35 SRNA の転写のためのプロモーターと polyA シグナル、(一)鎖 DNA 合成のためのプライマー結合部位などのウイルス DNA 複製に重要な領域ではあるが、この領域にも除去可能な領域があるのでさらに大きな DNA の挿入が可能になると思われる。

3. 非感染性ベクターの複製

ウイルス DNA の複製に必須の遺伝子が同定できれば、CaMV をプラスミドベクターとして利用できる。前述の実験から、ORF VII と ORF II は DNA 複製に不要である。ORF VI はウイルスの増殖に必須であるが、DNA の複製には不要と思われる。Paszkowskiらは²³⁾、ORF VI のイニシエーション コドン ATG から N 末端の23アミノ酸部分を残し、ターミネーションコドン TGA にいたるまでの領域を Tn 5 のホストトランスフェラーゼ type II (APH(3') II) 遺伝子で置換した (APH(3') II 遺伝子は *in frame* で挿入されている)。この組換え体ウイルス DNA は、単独では感染性を示さず、複製もしなかった。しかし、野性型の CaMV DNA と

共に接種した場合に、接種葉においてのみ複製する可能性が得られた。この実験から、ヘルパーウイルス共存下で非感染性組換え体 CaMV DNA をプラスミドベクターとして利用することも可能と思われる。筆者らは、ORFⅣ（コートタンパク）の大部分を欠失させたウイルス DNA を用いて類似の実験を行なったが、複製を確認するに至っていない。

4. イントロンを欠く遺伝子の調製

CaMV は、逆転写による複製機構を有するので、後述するようにイントロンを含む遺伝子を CaMV に挿入しておくで増殖の過程でイントロンが除去される。バクテリアの系で真核生物の遺伝子を発現させる場合、あらかじめイントロンの除去が必要で通常 cDNA が用いられる。CaMV ベクターを用いるとゲノミック DNA からイントロンを除去することができ、この DNA を cDNA として利用することができる。しかし、ウイルスベクターには挿入できる DNA の大きさに限界があるので、CaMV のプラスミドベクター化は必須である。

Ⅳ. ベクターへの遺伝子導入と発現

T. Hohn ら⁶⁴⁾ は、バクテリア由来のジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) 遺伝子を ORFⅡ領域に挿入し、植物での形質発現に成功している。Bal 31 処理により ORFⅡを除去し、dhfr 遺伝子 (234 bp) で置換したベクターを構築した。その過程で、彼らは 2 種類の組換え体 (A, B) を作製し、dhfr 遺伝子の安定性と発現の程度を比較した。組換え体 (A) では ORFⅡは完全に除去されているが、組換え体 (B) では dhfr 遺伝子の 5' 末端に ORFⅡの 5' 末端の配列が一部分残されている。組換え体 (A) の dhfr 遺伝子は、植物での増殖過程で安定に保持されるが、組換え体 (B) では非常に不安定であった。この不安定性は、CaMV の mRNA の翻訳機構の特異性に起因すると考えられている。CaMV のゲノミック 35S RNA は、逆転写の鋳型であり、またポリシストロニック mRNA としても働くと考えられる。35S RNA では、一つの遺伝子の翻訳終止コドンと次の遺伝子の翻訳開始コドンとが近接しているために翻訳終止後もリボソームは RNA から離れず、そのまま次の遺伝子の翻訳に移行すると考えられる。組換え体 (B) の場合は、dhfr 遺伝子の上流の残在 ORFⅡ5' 末端配列中に新たにできた終止コドンと dhfr 遺伝子の翻訳開始コドンの間に 31 bp はさまれているために (組換え体 (A) では 9 bp)、下流の遺伝子の翻訳が抑制されて、dhfr 遺伝子を欠失したものが選択的に増殖するものと考えられる。組換え体 (A) ウイルス DNA を感染させた植物では、植物組織 1 g 当り 8 µg の DHF

R の産生が認められた。植物本来の dhfr 遺伝子はメソトレキセートに感受性であるが、用いたバクテリア由来の dhfr は耐性である。この結果のとうり、組換え体 (A) ウイルス感染植物はメソトレキセート耐性になっていた。

V. イントロンをもつウイルスベクターの増殖過程におけるイントロンの除去

CaMV DNA の複製の項で述べたように、CaMV DNA は、いったん RNA に転写されたのち逆転写により複製すると考えられる。したがって、CaMV DNA にイントロンを挿入した場合、転写されたゲノミック RNA からイントロンがスプライシングにより除去され、このスプライスト・ゲノミック RNA が逆転写さ

図 4 ファゼオリン遺伝子のイントロン 2 を挿入した CaMV ベクター

□ は CaMV DNA, — は pBR 322 と M13 mp 8 由来の DNA を示す。■ はファゼオリン遺伝子のイントロン 2, ▨ はファゼオリン遺伝子のエクソン 2 の 3' 未部分とエクソン 3 の 5' 未部分を示す。(a) 大腸菌ベクターにクローニングした組換え体 CaMV。(b) ファゼオリン遺伝子のイントロン 2 の挿入部位を示す。Δ1 は不連続部位 1 の位置を示す。制限酵素切断部位の数字は Δ1 からのヌクレオチド数を示す。イントロン 2 を含む DNA 断片は、ORFⅦ中の BalⅡと ScaⅠ切断部位に挿入されている。□→ は ORFⅦと ORFⅠの位置と方向性を示す。

れるとイントロンを欠失した子 CaMV DNA が蓄積してくると予測される。筆者らは、この可能性について以下の実験を行った⁵³⁻⁵⁵⁾。

CaMV はアリマキによって媒介されるので、安全性確保のために、虫媒性を欠く CaMV-S 株⁶⁵⁾と CaMV-M-NV-1 株を用いた。両株とも日本で分離された株である。感染は、ウイルス粒子、DNA または感染葉粗抽出液をカーボランダムを塗布した葉にガラスのヘラでぬりつけて行なっている。宿主は大型山東菜 (*Brassica rapa* L. var *amplexicalis*) を用いている。

1. ファゼオリン遺伝子のイントロン 2 を運ぶ組換え体 CaMV

ソラ豆の貯蔵タンパク、ファゼオリンの遺伝子は 5 つのイントロンをもっている⁶⁶⁾。ファゼオリン遺伝子のゲノミッククローンから、HincII-StuI 処理でイン

トロン 2 を含む 173 bp の断片を得ることができる。173 bp の断片は、CaMV の感染性を損うことなく、ORF II あるいは ORF VII に挿入できる大きさである。しかし、この断片を ORF II に in frame で挿入した組換え体を構築したが、感染性はまったく見られなかった。その原因は明らかでないが、先に述べた CaMV の翻訳機構の特殊性に因ると思われる。つまり、DNA 断片の挿入により、挿入断片内あるいは下流に終止コドンができて、下流の遺伝子の翻訳を抑制されると考えられる。つぎに、ORF VII の領域に 173 bp 断片が挿入された組換え体 pBRCaMV-S/M/ph-1 を構築した (図 4 a, b)。イントロン 2 を含む断片は CaMV の転写と同じ方向に挿入してある。逆向きに挿入したクローンも得られたが、前者のクローンのみに感染性が見られた。他にも、挿入される塩基配列によって感染性が失われる例も報告されている (図 3 参照)。なぜ感染性が損われるのか、

図 5 ファゼオリン遺伝子のイントロン 2 除去の経時的変化

組換え体 CaMV DNA を接種した感染植物から回収したウイルス DNA を BglII で切断し、図中 (a) に示したプローブを用いてサザン法ハイブリダイゼーションを行った。

lane 1 は DNA サイズマーカーを示す。lane 2, 3, 4, 5, 6 は接種後 0, 18, 24, 30, 37 日目に回収したウイルス DNA を用いた。

(a) プローブ用に使った DNA 断片の位置を示す。(b) プローブ B (ファゼオリン遺伝子のイントロン 2 とエクソン部分を含む HincII-StuI 断片) を用いたハイブリダイゼーション。(c) プローブ A (イントロン 2 特異断片) を用いたハイブリダイゼーション。

まったく不明である。今後 CaMV をベクターとして利用する場合に解決しなければならない大きな問題である。

大腸菌で増強した pBRCaMV-S/M/ph-1 を Sal I 処理してベクターと CaMV DNA に切離し、大型山東菜に接種した。接種に用いる大型山東菜は播種後10~14日目のものを用いる(栽培温度; 25℃)。DNA 接種後2~3週間で病徴が現れる。

2. 複製したウイルス DNA の構造

組換え体ウイルス DNA の接種後37日目に感染葉からウイルス DNA を調製して解析したところ、イントロン2を組込んだ Bgl II 切断断片は、接種前1,200 bp の長さであったが、接種後約100 bp 短くなっていた。つぎに、この領域の欠損の経時的変化をサザン法ハイブリダイゼーションで調べた(図5)。図5(a)に示した2種類の DNA 断片を³²Pで標識してプローブとして用いた。プローブBを用いた結果、接種後16日で欠損が起きることがわかった。つぎに、この欠損がイントロンの除去によるものかどうかをプローブA(イントロン特異的プローブ)を用いて調べた。図5(c)に示されるように、接種後16日目ですべてのウイルスがイントロンを欠失することがわかった。さらに、イントロンを欠失した DNA 断片をM13 mp 8にクローニングし、塩基配列を調べた結果、イントロン部分のみが完全に除去されていることが明らかとなった(図6)。つまり、転写されたイントロン2をもつ RNA (ゲノミック35S RNA) が、スプライシングを受けてイントロンが除去された後に逆転写されたために、子ウイルス DNA はイントロンを欠失していると考えられる。CaMV DNA に挿入したイントロンの除去について最近、B. Hohn ら⁵⁴⁾も同様の結果を得ている。彼らは、CaMV の ORF II に挿入しておいた大豆のレグヘモグロビン遺伝子のイントロン2が、ウイルスの増殖にともなって除去されることを報告している。

VI. おわりに

CaMV は、当初の予想に反し、DNA ウィルスでありながら、いったん RNA に転写された後に逆転写によって複製することが明らかとなった^{40) 58)}。その結果、さきに述べた複製、転写や翻訳の特殊性から、CaMV をベクターとするにはさらに操作する必要がある。ウィルスの性質を利用して、従来と異なったベクターとしての利用も充分可能と思われる。本文で述べたように、今までに細菌由来の小さな遺伝子の発現例しかないが、増殖に不要な領域を除くことにより、約1000 bp 近くの遺伝子の導入も可能と思われる。さらに大きな遺伝子を導入するために、ヘルパーウイルスとともにベクターを感

図6 ファゼオリン遺伝子のイントロン2欠失領域の塩基配列

染させる方法(プラスミド化)も充分可能である。また、筆者らが見出したように、CaMV がレトロウィルスであるという性質を利用して、ゲノミック DNA からイントロンを除去することも可能である。この方法は、イントロンを有する真核生物の遺伝子を原核生物で発現させるときにイントロンを除去するために利用できる。この場合、遺伝子本来のプロモーター領域も同時に回収できる利点をもっている。CaMV の宿主はアブラナ科の植物に限られるが、CaMV 以外の Caulimovirus に属するウィルスを利用して宿主域を広げることができる。宿主域決定に関与する遺伝子も明らかにされつつあるので³⁸⁾、CaMV の宿主域を広げることにも可能になると思われる。

CaMV のプロモーターは、培養細胞、transgenic plant の相方で constitutive promoter として非常に高い活性を示すことが知られている⁶⁷⁾。このプロモーター(ゲノミック35S RNA の転写に使われている P 35 s プロモーターと ORF VI の P 19 s プロモーター)を利用した発現ベクターを用いて、Direct gene transformation の際の選択マーカーの作製や発現に利用されている^{16) 24)}。CaMV は本来双子様植物だけを宿主として増殖するが、ウィルスのプロモーターは単子葉植物でも機能する^{17) 20-22)}。筆者らもすでに、P 19 s、P 35 s プロモーターを Tn 5 のカナマイシン抵抗性遺伝子と

Tn 9 のクロラムフェニコールアセチラーゼ遺伝子に接続し、単子葉植物 (イネ) の培養細胞への導入と発現に成功している (若狭, 池田, 未発表)

CaMV は、転写の項で述べたように、35S RNA と 19S RNA の転写終結の特異性 (run and stop, cotermination) に着目して、真核細胞の転写終結の機構を解明するうえでも格好のウイルスでもある。

文 献

- 1) Fraley, R. T., Rogers, S. G., and Horsch, R. B. (1986) *Critical Reviews in plant Sciences* **4**, 1-46.
- 2) Broglie, R., Coruzzi, G., Fraley, R. T., Rogers, S. G., Horsch, R. B., Niedermeyer, J. G., Fink, C. L., Flick, J. S., and Chua, N.-H. (1984) *Science* **224**, 838-843.
- 3) Morelli, G., Nagy, F., Fraley, R., Rogers, S., and Chua N.-H. (1985) *Nature (London)* **315**, 200-204.
- 4) Herrera-Estrella, L., Van den Broeck, G., Maenhaut, R., Van Montagu, M., Schell, J., Timko, M., and Cashmore, A. (1984) *Nature (London)* **310**, 115-120.
- 5) Simpson, J., Timko, M. P., Cashmore, A. R., Schell, J., Van Montagu, M., and Herrera-Estrella, L. (1985) *EMBO J.* **4**, 2723-2729.
- 6) Schreier, P., Seftor, E., Schell, J., and Bohnert, H. (1985) *Embo J.* **4**, 25-32.
- 7) Van den Broeck, G., Timko, M., Kausch, P., Cashmore, A., Van Montagu, M., and Herrera-Estrella, L. (1985) *Nature (London)* **313**, 358-363.
- 8) Nagy, F., Morelli, G., Fraley, R. T., Rogers, S. G., and Chua, N.-H. (1985) *EMBO J.* **4**, 3063-3068.
- 9) Beachy, R., Chen, Z.-L., Horsch, R. B., Rogers, S. G., Hoffmann, N. J., and Fraley, R. T. (1985) *EMBO J.* **4**, 3047-3053.
- 10) Sengupta-Gopalan, C., Reichert, N. A., Barker, R. F., Hall, T. C., and Kemp, J. C. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 3320-3324.
- 11) Comai, L., Facciotti, D., Hiatt, W., Thompson, G., Rose, R., and Stalker, D. (1985) *Nature (London)* **317**, 741-744.
- 12) Shah, D. M., Horsch, R. B., Klee, H. J., Kishore, G. M., Winter, J. A., Tumer, N. E., Hironaka, C. M., Sanders, P. R., Gasser, C. S., Aykent, S., Siegel, N. R., Rogers, S. G., and Fraley, R. T. (1986) *Science* **233**, 478-481.
- 13) Adang, M. J., DeBoer, D., Firoozabady, A., Kemp, J. D., Murray, E., Rocheleau, T. A., Rashka, K., Staffield, G., Stock, C., Sutton, D., and Merlo, D. J. (1986) *J. Cellular Biochem Supplement* **10 C**, 11.
- 14) Abel, P. P., Nelson, R. S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S. G., Fraley, R. T., and Beachy, R. N. (1986) *Science* **232**, 738-743.
- 15) Fluhr, R., Kuhlmeier, C., Nagy, F., and Chua, N.-H. (1986) *Science* **232**, 1106-1112.
- 16) Paszkowski, J., Shillito, R. D., Saul, M., Mandák, V., Hohn, T., Hohn, B., and Potrykus, I. (1984) *EMBO J.* **3**, 2717-2722.
- 17) Fromm, M., Taylok, L. P., and Walbot, V. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 5824-5828.
- 18) Hain, R., Stabel, P., Cazernilofsky, A. P., SteinbiB, H. H., Herrera-Estrella, L., and Schell, J. (1985) *Mol. Gen. Genet.* **199**, 161-168.
- 19) Potrykus, I., Paskowski, J., Saul, M. W., Petruska, J., and Shillito, R. (1985) *Mol. Gen. Genet.* **199**, 169-177.
- 20) Lörz, H., Baker, B., and Schell, J. (1985) *Mol. Gen. Genet.* **199**, 178-182.
- 21) Potrykus, I., Saul, M. W., Petruska, J., Paszkowski, J., and Shillito, R. (1985) *Mol. Gen. Genet.* **199**, 183-188.
- 22) Fromm, M. E., Taylor, L. P., and Walbot, V. (1986) *Nature (London)* **319**, 791-793.
- 23) Paszkowski, J., Pisan, B., Shillito, R., Hohn, T., Hohn, B., and Potrykus, I. (1986) *Plant Mol. Biol.* **6**, 303-312.
- 24) Uchimiya, H., Hirochika, H., Hashimoto, H., Hara, A., Masuda, T., Kasumimoto, T., Harada, H., Ikeda, J.-E., and Yoshida, M. (1985) *Mol. Gen. Genet.* **205**, 1-8.
- 25) dela Pena, A., Loyz, H., and Schell, J. (1987) *Nature (London)* **325**, 274-276.
- 26) G. M. S. van Slogteven, P. J. J. Hooykaas, R. A. Schilperoort, *Plant Mol. Biol.*, **3**, 333(1984).
- 27) Shepherd, R. J. : *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **30**, 405(1979)
- 28) Hohn, T., Richards, K. & Lebeurier, G. : *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **93**, 194(1982)
- 29) Howell, S. H. : *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **33**, 609(1982)
- 30) Richards, K. E., Guilley, H. & Jonard, G. : *FEBS Lett.*, **134**, 67(1981)
- 31) Franck, A., Jonard, G., Richards, K., Guilley, H. & Hirth, L. : *Cell*, **21**, 285(1980)
- 32) Gardner, R. C., Howarth, A. J., Hahn, P., Brown-Leudi, M., Shepherd, R. J. & Messing, J. : *Nucleic Acids Res.*, **9**, 2871(1981)
- 33) Balazs, E., Guilley, H., Jonard, G. & Richards, K. : *Gene*, **19**, 239(1982)
- 34) Hull, R., Sadler, J., and Longstaff, M. (1986) *EMBO J.* **5**, 3083-3090
- 35) Armour, S. L., Melcher, U., Pirone, T. P., Lyttle, D. J., and Essenberg, R. C. (1983) *Virology* **129**, 25-30.
- 36) Giband, M., Mesnard, J. M., and Lebeurier,

- G. (1986) *EMBO J.* **5**, 2433-2438.
- 37) Hahn, P., and Shepherd, R. J. (1982) *Virology* **116**, 480-488.
 - 38) Schoelz, J., Shepherd, R. J., and Daubert, S. (1986) *Mol. Cellul. Biol.* **6**, 2632-2637.
 - 39) Toh, H., Hayashida, H. & Miyata, T. *Nature* **305**, 827-829(1983).
 - 40) Takatsuji, H., Hirochika, H., Fukushi, T. & Ikeda, J.-E. : *Nature (London)* **319**, 240-243 (1986).
 - 41) Menissier, J., Lebeurier, G. & Hirth, L. : *Virology*, **117**, 322(1982).
 - 42) Olszewski, N., Hagen, G. & Guiltöyl, T. J. : *Cell*, **29**, 395(1982).
 - 43) H. Guilley, R. K. Dudley, G. Jonard, E. Balazs, K. Richards, *Cell*, **30**, 763(1982).
 - 44) J. T. Odell, N. Ferenc, N.-H. Chua, *Nature (London)*, **313**, 810(1985).
 - 45) J. T. Odell, S. H. Howell, *Virology*, **102**, 349 (1980).
 - 46) Covey, S. N., Lomonosoff, G. P. & Hull, R. : *Nucleic Acids Res.*, **9**, 6735(1981).
 - 47) Pfeiffer, P. & Hohn, T. : *Cell*, **33**, 781(1983).
 - 48) Hull, R. & Covey, S. N. : *Trends Biochem. Sci.*, **8**, 119(1983).
 - 49) Guilley, H., Richards, K. & Jonard, G. : *EMBO J.* **2**, 277(1983).
 - 50) Covey, S. N., Turner, D. & Mulder, G. : *Nucleic Acids Res.*, **11**, 251(1983).
 - 51) Hull, R. & Covey, S. N. : *Nucleic Acids Res.*, **11**, 1881(1983).
 - 52) Volovitch, V., Modjtahedi, N., Vot, P. & Brun, G. : *EMBO J.* **3**, 309(1986).
 - 53) 広近洋彦, 池田穰衛(1986)「植物バイオテクノロジー」(東京化学同人) 山田康之・岡田吉美編. p 213
 - 221.
 - 54) Hohn, B., Balázs, E., Rüegg, D., and Hohn, T. (1986) *EMBO J.* **5**, 2759-2762.
 - 55) Hirochika, H., and Ikeda, J.-E. Submitted to *Genes and Development*.
 - 56) S. H. Howell, L. L. Walker, R. K. Dudley, *Science*, **208**, 1265(1980).
 - 57) G. Lebeurier, L. Hirth, B. Hohn, T. Hohn, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **79**, 2932(1982).
 - 58) H. Hirochika, H. Takatsuji, A. Ubasawa, J.-E. Ikeda, *EMBO J.* **4**, 1673(1985).
 - 59) A. J. Howarth, R. C. Gardner, J. Messing, R. J. Shepherd, *Virology*, **112**, 678(1981).
 - 60) B. Gronenborn, R. C. Gardner, S. Schaefer, R. J. Shepherd, *Nature (London)*, **294**, 773 (1981).
 - 61) L. Dixon, I. Koenig, T. Hohn, *Gene*, **25**, 189 (1983).
 - 62) S. Daubert, R. J. Shepherd, R. C. Gardner, *Gene*, **25**, 201(1983).
 - 63) R. C. Gardner, "Genetic engineering of plants", ed. by T. Kosuge, C. P. Meredith, A. Hollaender, p. 121, Plenum press, New York (1983).
 - 64) Brisson, N., Paszkowski, J., Penswick, J. R. Gronenborn, B., Potrykus, I., and Hohn, T. (1984) *Nature (London)* **310**, 511.
 - 65) 栃原比呂志, 花田薫, 酒井富久美, 日本植物病理学会報, **48**, 401(1982).
 - 66) Slightom, J. L., Sun, S. M., and Hall, T. C. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**, 1897-1901.
 - 67) Sanders, P. R., Winter, J. A., Barnason, A. R., Roogers, S. G., and Fraley, R. T. (1987) *Nucleic Acid Res.* **15**, 1543-1558.