2. 植物 RNA ウイルスの複製機構に関する研究 ——タバコモザイクウイルスの研究例を中心に——

石川 雅之

(北海道大学農学部・ウイソコンシン大学マディソン校)

要 旨

タバコモザイクウイルス (TMV) RNA は、対応する相補鎖 RNA を介して複製する。TMV ゲノム上にコードされた RNA 複製に関与する因子の機能については、完全長 cDNA から感染性のあるウイルス RNA を合成する系の確立により、ウイルスゲノムの人工改変が可能になったため、解析が進展してきた。しかし、マイナス鎖 RNA の蓄積の特異的停止の機構や、ウイルス RNA 複製過程にはどのような宿主因子がどのように関与するのかなど、未だ知られていない諸相もある。本章では、TMV の RNA 複製の未知な部分に焦点をあて、いくつかの研究例を紹介する。

はじめに

タバコモザイクウイルス (TMV) は、棒状のウイルス粒子内に約6,400ヌクレオチドの一本鎖 RNA ゲノムを持つ。ゲノミック RNA は、5'末端にキャップ構造、3'末端に tRNA 様構造を持つ、プラス鎖(メッセンジャー RNA として機能しうる極性の) RNA である⁴⁸⁾。TMV ゲノム上には、少なくとも、5'末端側より130K、180K (180Kタンパクは、130Kタンパクのアンバー終止コドンでチロシンとしてリード・スルーすることにより合成される)、30K、外被タンパクの四

種のタンパク質がコードされている(図1)^{8,32)}。これら四つのタンパク質のうちウイルス粒子に含まれるのは外被タンパクのみである。

TMV が宿主植物に侵入するとゲノミック RNA が脱外被し、そこから130K/180Kタンパクが翻訳される。次いでゲノミック RNA を鋳型としてゲノミック RNA に対応する相補鎖(マイナス鎖) RNA が合成され、さらにこのマイナス鎖 RNA を鋳型としてゲノミック RNA 及び30K、外被タンパクに対応するサブゲノミック mRNAs が合成される(図1)^{16,50)}。このウイルス RNA の増幅には、130K/180Kタンパクが関与しており、30K 及び外被タンパクは必要でないことがわかっている^{18,29,45)}。また、ゲノミック RNA が130K/180Kタンパクに依存した RNA 増幅反応を受けるためには、少なくとも3'非翻訳領域に存在する tRNA 様構造^{17,20)}、シュード・ノット構造⁴⁷⁾、及び5'非翻訳領域の構造⁴⁶⁾が必要であることが示されている。これらの知見が得られたのは、TMV-RNA に対する cDNA から感染性のある RNA を *in vitro* で合成する手法^{5,27)}が確立され、TMV ゲノムの人工改変が可能になったことに負うところが大きい(詳しくは総説28参照)。

TMV の RNA 複製に関与する130K/180Kタンパクは、そのアミノ酸配列において、動物及び植物を宿主とする多数のプラス鎖 RNA ウイルスにコードされた複製に関与するタンパク質と類似性を持つことが知られている(図2)^{1,9,13)}。これらのウイルスは総称してアルファ様ウイルスと呼ばれる。アルファ様ウイルスに属するウイルスの例としては、シンドビスウイルス (SIN)、セムリキフォレストウイルス (SFV) (以上動物アルファウイルス)、TMV、ブロムモザイクウイルス (BMV)、キュウリモザイクウイルス (CMV)、

Studies on the replication mechanisms of plant RNA viruses

Masayuki ISHIKAWA

Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Kita9-Nishi9, Kita-ku, Sapporo 060

〒060 札幌市北区北9条西9丁目

Institute for Molecular Virology, University of Wisconsin-Madison, 1525 Linden Drive, Madison, Wisconsin 53706-1596, U.S.A.

(A) TMV

(B) BMV

図1 タバコモザイクウイルス (TMV; A) とプロモザイクウイルス (BMV; B) の遺伝子発現及び RNA 複製の様式。丸印は RNA の 5' 末端, 縦の短い線は RNA の 3' 末端, 四角はウイルスゲノム上にコードされたタンパク質に対応するオープンリーディングフレーム (ORF) を示す。影づけされた四角は, 翻訳される ORF を示す。

図2 シンドビスウイルス (SIN), タバコモザイクウイルス (TMV), プロモザイクウイルス (BMV) ゲノムにコードされた RNA 複製に関与する非構成タンパクの間で, アミノ酸配列に類似性のみられる領域。縦矢印は前駆体タンパクのプロテアーゼによる切断部位を, 横矢印は部分的に読み越される終始コドンの位置を示す。領域 I, II, III については本文参照。

カブ黄班モザイクウイルス (TYMV) などが挙げられる。これらのウイルスは, 粒子形態, ゲノム構成 (分節, 非分節), ウイルスタンパクの合成様式などにおいて互いに異なった性質を持つにもかかわらず, 類似のストラテジーでウイルス RNA の複製を行っているであろうと推測されている。従って TMV の RNA 複製を考える際, 他のアルファ様ウイルスにおける RNA 複製に関する知見を参考にすることができ, また TMV の RNA 複製に関する知見が, 他のアルファ様ウイルスに拡張される可能性があると考えられる。アルファウイルスの突然変異体の解析から, 図2に示した領域 I はウイルス RNA のキャッピング反応³¹⁾及びマイナス鎖 RNA 合成開始に¹²⁾, 領域 II はサブゲノミック RNA 合成開始に¹²⁾, 領域 III はウイルス RNA 合成全般に関与することが示唆されている¹¹⁾。さらに, アミノ酸配列において, 領域 II, III にはそれぞれ, RNA ヘリカーゼ^{10,15)}, RNA ポリメラーゼ²⁵⁾に共通にみられるモチーフが含まれる。

以上より, TMV の複製に関しては, 130K/180K タンパクが鋳型となるゲノミック RNA あるいはマイナス鎖 RNA 上の構造を認識して相補鎖を合成する, という単純な図式が浮かんでくる。しかし, それを以て TMV の複製について十分理解したと考えてよいのだろうか。

TMV マイナス鎖 RNA の感染初期における蓄積停止

TMV-RNA をタバコ培養細胞由来のプロトプラストにエレクトロポレーション法により導入し, 同調的に感染を起こさせ, ウイルス RNA の蓄積のタイムコースを調べてみると意外なことがわかった¹⁹⁾。すなわち, マイナス鎖 RNA の蓄積が感染初期に止まってしまうのである。図3に示す通り, プラス鎖 RNA (ゲノミック RNA 及び外被タンパク mRNA) の蓄積は, 感染後約2時間に検出可能となり, 以後18時間まではほぼ直線的に増加してゆく¹⁹⁾。これに対し, マイナス鎖 RNA の蓄積は, プラス鎖 RNA が盛んに蓄積を続けている感染後6時間で停止してしまう¹⁹⁾。130K/180K タンパクの合成は, マイナス鎖 RNA の蓄積が止まった後も合成されつづけていることがわかっている⁵⁰⁾。また, このマイナス鎖 RNA の蓄積停止は, 外被タンパク欠損株でも起こるので, マイナス鎖 RNA 合成の鋳型となるべきゲノミック RNA が, 外被タンパクでコートされてしまうためにマイナス鎖合成が阻害されるという可能性は否定される¹⁹⁾。では, なぜマイナス鎖蓄積のみが特異的に停止するのか。

同様の現象は, SIN, SFV, BMV でも観察されている^{39,36,26)}。SIN では, 主に突然変異株の解析から, この現象に関して, 以下のようなことがわかっている。(i) SIN では感染初期に非構成タンパク (nsPs) の合成停止が起こるが (TMV, BMV では起こらない), 少なくともこれのみがマイナス鎖 RNA の合成停止の原因ではないと思われる。つまり, nsPs の合成停止が起こらなくなった突然変異株においても, マイナス鎖 RNA の合成停止は起こる⁴¹⁾。(ii) ゲノミック RNA のエンカプシデーションも, マイナス鎖 RNA の合成停止の原因ではない³⁷⁾。(iii) nsP4あるいは nsP2に原因変異を持つ SIN の突然変異株 ts24(R), ts17, ts133では, 非許容温度下でマイナス鎖 RNA の合成停止が起こらなくなる^{35,38,40)}。野生株 SIN のマイナス鎖 RNA 合成は, タンパク質合成阻害剤の添加により阻害される (プラス鎖 RNA 合成はほとんど阻害されない) が, これらの変異株においては, タンパク質合成阻害剤を添加しても, 非許容温度下ではマイナス鎖 RNA 合成が起こる⁴⁰⁾。

(A) plus-strands

(B) minus-strand

図3 タバコプロトプラストにおけるタバコモザイクウイルス (TMV) ゲノミック RNA (パネルA, 丸印), 外被タンパク (CP) サブゲノミック mRNA (パネルA, 三角印), 及びマイナス鎖 RNA (パネルB) の蓄積の経時変化。トマト系 TMV-L 株 RNA (5 μ g) をタバコ培養細胞由来のプロトプラスト (1×10^6 個) にエレクトロポレーション法で導入し, 培養後, 各時間に, プロトプラストから RNA を抽出し, リボヌクレアーゼプロテクション法で TMV ゲノミック RNA, CP サブゲノミック mRNA 及びマイナス鎖 RNA を定量し, 相対蓄積量を算出し, グラフ化した。

図4 *Arabidopsis* 野生株 Col-0 (A, B) 及び変異株 PD114 (C, D) 由来のプロトプラストにおけるタバコモザイクウイルス (TMV) Cg RNA (A, C) 及びキュウリモザイクウイルス (CMV) RNA (B, D) の蓄積。図中に示したウイルス (TCV = カブクリンクルウイルス) RNA をエレクトロポレーション法によりプロトプラストに導入し、培養後、図中に示した各時間にプロトプラストから RNA を抽出し、ノザンブロット解析を行った。プローブとしては TMV-Cg ゲノミック RNA の 3' 末端 (A, C) あるいは、CMV ゲノミック RNA の 3' 末端 (B, D) に相補的な ^{32}P -RNA を使用した。G は TMV ゲノミック RNA, 30K, CP は、それぞれ TMV 30K, 外被タンパクサブゲノミック mRNA, 1, 2, 3, 4 は、それぞれ CMV RNA 1, 2, 3, 4 の泳動位置を示す。各パネルの右側 2 レーンには、いずれも TMV+CMV RNA を感染させた Col-0 プロトプラストの感染後 25 時間の RNA サンプルを 10 倍、あるいは 100 倍に希釈したものをアプライした。パネル B は、パネル A に比べ、約 10 倍の長時間露出であることに注意していただきたい。

マイナス鎖蓄積の特異的停止の機構は、未だ明らかではないが、以上の状況をふまえて、一つの可能な仮説として、例えば以下のようなものが考えられる：マイナス鎖合成は、繰り返し使用されない宿主因子を使って合成される。従ってその因子の量が、マイナス鎖の最終的な蓄積量を規定する。ts24(R), ts17, ts133 では、nsP2 あるいは nsP4 の変異により宿主因子を繰り返し使用できるようになったと考えればよい。マイナス鎖 RNA の合成停止の機構については、他の仮説も立てられており^{38,42)}、ここに示した可能性を含めてどれが正しいか

(無論、ウイルスごとに機構が異なる可能性もある) は、今後の研究を待たねばならないが、以上は、ウイルス RNA の複製機構について、我々の理解が未だ不十分であることを示唆している。

TMV の複製に関与する宿主因子の検索

ウイルスは小さなゲノムの中にできる限り無駄なく自己保存のための遺伝情報をつめこんでいるように見える。従って、自己保存のために必要な因子のうちいくつかを、自分でコードせず、宿主因子を流用してい

る、という可能性も大いに考える。実際、バクテリアアフォージ Q β の複製酵素の四つのサブユニットのうち三つが宿主タンパクであり^{3,4,49}、また効率のよいマイナス鎖合成にはもう一つの宿主タンパクが必要である²⁴ことがわかっている。最近、種々の RNA ウィルスについて、ウィルスタンパクの合成（翻訳及びプロセシング）以外のプロセスで、ウィルス RNA 複製に宿主因子が関与する例が、続々と挙げられつつある^{2,14,22,33,34,43}。前項で述べた結果も、間接的ながらウィルス RNA 複製に宿主因子が関与していることを示唆しているのかもしれない。しかしながら、現時点において、ウィルス RNA の増幅に関与する宿主因子についての情報は乏しい。本項では、宿主の遺伝学を用いた TMV の増殖に関与する宿主因子同定の試みについて述べる。

Arabidopsis thaliana (シロイヌナズナ) は、植物体及び種子が小さいこと、世代時間が短い（約 5 週間）こと、基本的には自家受粉をするが人工交配も容易であること、ゲノムサイズが小さく（約 10⁸bp/ハプロイド）反復配列が少ないことなどから、分子遺伝学的研究に好適なモデル植物として注目されている^{4,6,30}。実際、遺伝形質のみが知られた突然変異体の原因変異を担う遺伝子がいくつもクローン化され^{7,44,52}、*Arabidopsis* の有用性が実証されつつある。我々はこの *Arabidopsis* を用い、遺伝学的にウィルスの増殖に関与する宿主因子を同定しようと考えた。いくつかのウィルスを検討した結果、十字花植物系 TMV-Cg 株が、*Arabidopsis* 植物体において、接種後比較的短時間のうちに高濃度のウィルスを蓄積することがわかった²²。そこで、TMV-Cg を感染させた *Arabidopsis* における外被タンパクの蓄積を指標にしたスクリーニングを行ったところ、植物体における TMV-Cg の蓄積が低レベルに抑制される突然変異株 PD114 が得られた²²。遺伝解析の結果、原因変異は、核ゲノム第 4 染色体上の劣性 1 因子 (*tom1*) により支配されていることが示唆された^{22,51}。*tom1* 変異は、調べた限り TMV 特異的で、カプクリンウイルス (TCV)、TYMV、CMV の増殖には影響を与えなかった²²。なお、PD114 は、外見では親株（野性株）の Col-0 と区別できない。

この TMV 増殖阻害が一細胞内での増殖においても起こるか否かを知るために、PD114 及び野性株 (Col-0) より調製したプロトプラストに、ウィルス RNA を、エレクトロポレーション法により導入したところ、TMV の増殖はプロトプラストにおいても阻害をうけることがわかった (図 4)²¹。この際、同時に感染

させた TCV は、PD114、Col-0 両プロトプラストにおいて同様に増殖した²¹。TMV の場合、最終的に感染が成立し、外被タンパクの蓄積がみられたプロトプラストの、全体に対する割合が、PD114 では野性株 (Col-0) の 1/5 ~ 1/10 と低く、また、ウィルス RNA (図 4)、外被タンパクの産生が遅れた²¹。PD114 プロトプラストにおけるウィルス RNA 及び外被タンパクの最終蓄積量は、感染が成立した細胞当りに換算すると、野性株と同じレベルか、やや低い程度であった²¹。外被タンパクと、その mRNA の蓄積パターンの比較より、外被タンパクの翻訳は正常に起きていると思われた²¹。従って PD114 における TMV 増殖阻害は、ゲノミック RNA の脱外被以後、サブゲノミック RNA が蓄積する以前のプロセス (130K/180K タンパク合成、マイナス鎖 RNA 合成、ゲノミック及びサブゲノミック RNA 合成、あるいはこれらの分子の安定性) で、恐らくはウィルス RNA の侵入後ごく初期の、感染が成立するかアポトーシスに終わるかを決するステップで効いている可能性が高い。しかも変異が劣性なので、野性型 *TOM1* 遺伝子産物は、TMV の増殖を助けるような働きをしていると思われる。

もし *TOM1* 因子が TMV-RNA の複製に関与するならば、なぜ *tom1* 変異は TMV 特異的で、似た機構で複製すると考えられるアルファ様ウイルス、例えば CMV の増殖には影響を与えないのだろうか。これについて、我々は以下のような現象を見出した。前述の通り、CMV は、単独で感染させた時、PD114 及び野性株プロトプラストにおいて、ほぼ同様に増殖する (図 4)²¹。この CMV-RNA を、TMV-CgRNA と混合感染させた場合、野性株 (Col-0) プロトプラストにおいては、両者はそれぞれを単独感染させた時と同様に増殖した (図 4)²¹。これに対し、PD114 プロトプラストに混合感染させた時、CMV は単独感染時と同様に増殖したが、TMV-Cg の増殖は PD114 への単独感染時のさらに 1/5 ~ 1/10 に低下した (図 4)²¹。この現象について、我々は以下のようなモデルをたてている。すなわち CMV は *TOM1* 因子とは似て非なる仮想の因子 *TOMX* を“使って”増殖している。TMV は主に *TOM1* 因子を“使って”増殖するが、*TOMX* 因子も低効率ながら“使う”ことができる。PD114 において、TMV は *TOMX* 因子の働きによって低効率で増殖するが、CMV を混合感染させると、*TOMX* 因子が CMV に“奪われて”TMV は増殖阻害をうける、というモデルである。今後このモデルが正しいか否か検討が必要だが、もし正しければ、他のアルファ様ウイル

スも *TOM1* 様の宿主因子を増殖に“使って”いる可能性が考えられよう。

おわりに

以上のように、*TOM1* 遺伝子は、TMV の増殖に何らかの形でからむと考えられ、我々はこの遺伝子のクローン化を目指して最も近い DNA マーカーからクロモソーム・ウォーキングを開始した。*Arabidopsis* において、染色体上の遺伝学的位置のみを指標に、目的遺伝子のクローン化を果たすことは十分に可能ではあるが、まだ多大な労力と時間を必要とするように思われる。

昨年、Janda と Ahlquist は、BMV-RNA が、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において複製可能であるという画期的な報告をした²³⁾。BMV は、3 分節プラス鎖 RNA (RNA 1, 2 及び 3) をゲノムとして持つアルファ様ウイルスのひとつである。RNA 1 と 2 には、それぞれ、RNA 複製に必要な 1 a 及び 2 a タンパクがコードされている。RNA 3 には 3 a タンパクと外被タンパクがコードされており、外被タンパクは、複製に際して合成されるサブゲノミック RNA (RNA 4) より翻訳される (図 1)。外被タンパクコード領域を外来遺伝子で置換しても複製及びサブゲノミック RNA 生成が起こることは、すでに植物プロトプラストを使った実験において実証済みである。彼らはまず、外被タンパクのコード領域をクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子のコード領域で置換した RNA 3 誘導体 (B3CAT) RNA を、単独で酵母に導入しても、3 a タンパクの下流にコードされる CAT は翻訳されないことを確認した²³⁾。次いで、プラスミドベクターから 1 a 及び 2 a タンパクを発現させた酵母に B3CAT RNA を導入すると、CAT が発現することを示した。この CAT の発現は、1 a, 2 a タンパク及び B3CAT 上の 3' 非翻訳領域及びサブゲノミック RNA 合成に必要なシスエレメントを要求した²³⁾。これは、B3CAT RNA より 1 a, 2 a タンパクに依存してマイナス鎖 RNA が合成され、サブゲノミック RNA が生成したことを強く示唆した。さらに、彼らは、レポーター遺伝子として酵母の *URA3* 遺伝子を持つ B3Ura RNA を、1 a 及び 2 a タンパクを発現させた *ura3⁻* 形質の酵母に導入すると、*URA⁺* 形質のトランスフォーマントが得られることを示した²³⁾。この *URA⁺* トランスフォーマントにおいて、B3Ura RNA は、RNA として複製保持されていた。ゲノミック RNA : サブゲノミック RNA : マイナス鎖

RNA の量比は、植物プロトプラストにおける比と大きな違いがなかった。以上のデータは、BMV が酵母の中で複製可能である (それも恐らく植物細胞内と同様の様式で) ことを示す。

BMV が植物でも酵母でも複製可能ということは、複製に特別な宿主因子を必要としないことを示唆するのか。あるいは、宿主因子が、植物と酵母という遠縁の生物種間で高度に保存されていることを示唆するのか。我々は前述の理由により、後者の可能性を支持する。もしそうなら、酵母の強力な、遺伝学的、分子生物学的手法を駆使して、高等動物を宿主として用いるよりははるかに容易に、宿主因子の同定が可能であろう。今後の進展を期待したい。

文 献

- 1) Ahlquist, P., Strauss, E. G., Rice, C. M., Strauss, J. H., Haseloff, J. and Zimmern, D. (1985). Sindbis virus proteins nsP1 and nsP2 contain homology to nonstructural proteins from several RNA plant viruses. *J. Virol.*, **53**, 536-542.
- 2) Andino, R., Rieckhof, G. E., Achacoso, P. L. and Baltimore, D. (1993). Poliovirus RNA synthesis utilizes an RNP complex formed around the 5'-end of viral RNA. *EMBO J.*, **12**, 3587-3598.
- 3) Blumenthal, T., Landers, T. A. and Weber, K. (1972). Bacteriophage Q β replicase contains the protein bisynthesis elongation factors EFTu and EFTs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 1313-1317.
- 4) Bowman, J. L., Yanofsky, M. F. and Meyerowitz, E. M. (1988). *Arabidopsis thaliana*: a review. *Oxf. Surv. Plant Mol. Cell Biol.*, **5**, 57-87.
- 5) Dawson, W., O., Beck, D. L., Knorr, D. A. and Grantham, G. L. (1986). cDNA cloning of the complete genome of tobacco mosaic virus and production of infectious transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 1832-1836.
- 6) Estelle, M. A. and Somerville, C. R. (1986). The mutant of *Arabidopsis*. *Trends Genet.*, **2**, 89-93.
- 7) Giraudat, J., Hauge, B. M., Valou, C., Smalle, J., Parcy, F. and Goodman, H. M. (1992). Isolation of the *Arabidopsis ABI3* gene by positional cloning. *Plant Cell*, **4**, 1251-1261.
- 8) Goelet, P., Lomonossoff, G. P., Butler, P. J. G., Akam, M. E., Gait, M. J. and Karn, J. (1982). Nucleotide sequence of tobacco mosaic

- virus RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**, 5818-5822.
- 9) Goldbach, R., Le Gall, O. and Wellink, J. (1991). Alpha-like viruses in plants. Seminars in Virology, **2**, 19-25.
 - 10) Gorbalenya, A. E., Koonin, E. V., Donchenko, A. P. and Blinov, V. M. (1988). A conserved NTP-motif in putative helicases. Nature (London), **333**, 22.
 - 11) Hahn, Y. S., Grakoui, A., Rice, C. M., Strauss, E. G. and Strauss, J. H. (1989). Mapping of RNA-temperature-sensitive mutants of Sindbis virus: Complementation group F mutants have lesions in nsP4. J. virol., **63**, 1194-1202.
 - 12) Hahn, Y. S., Strauss, E. G. and Strauss, J. H. (1989). Mapping of RNA-temperature-sensitive mutants of Sindbis virus: Assignment of complementation groups A, B, and G to nonstructural proteins. J. Virol., **63**, 3142-3150.
 - 13) Haseloff J., Goelet, P., Zimmern, D., Ahlquist, P., Dasgupta, R. and Kaesberg, P. (1984). Striking similarities in amino acid sequence among nonstructural proteins encoded by RNA viruses that have dissimilar genomic organization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **81**, 4358-4362.
 - 14) Hayes, R. J. and Buck, K. W. (1990). Complete replication of a eukaryotic virus RNA *in vitro* by a purified RNA-dependent RNA polymerase. Cell, **63**, 363-368.
 - 15) Hodgman, T. C. (1988). A new superfamily of replicative proteins. Nature (London), **333**, 22-23.
 - 16) Hunter, T. R., Hunt, T., Knowland, J. and Zimmern, D. (1976). Messenger RNA for the coat protein of tobacco mosaic virus. Nature (London), **260**, 759-764.
 - 17) Ishikawa, M., Kroner, P., Ahlquist, P. and Meshi, T. (1991). Biological activities of hybrid RNAs generated by 3'-end exchanges between tobacco mosaic and brome mosaic viruses. J. Virol., **65**, 3451-3459.
 - 18) Ishikawa, M., Meshi, T., Motoyoshi, F., Takamata, N. and Okada, Y. (1986). *In vitro* mutagenesis of the putative replicase genes of tobacco mosaic virus. Nucl. Acids Res., **14**, 8291-8305.
 - 19) Ishikawa, M., Meshi, T., Ohno, T. and Okada, Y. (1991). Specific cessation of minus-strand RNA accumulation at an early stage of tobacco mosaic virus infection. J. Virol., **65**, 861-868.
 - 20) Ishikawa, M., Meshi, T., Watanabe, Y. and Okada, Y. (1988). Replication of chimeric tobacco mosaic viruses which carry heterologous combinations of replicase genes and 3' noncoding regions. Virology, **164**, 290-293.
 - 21) Ishikawa, M., Naito, S. and Ohno, T. (1993). Effects of the *tom1* mutation of *Arabidopsis thaliana* on the multiplication of tobacco mosaic virus RNA in protoplasts. J. Virol., **67**, 5328-5338.
 - 22) Ishikawa, M., Obata, F., Kumagai, T. and Ohno, T. (1991). Isolation of mutants of *Arabidopsis thaliana* in which accumulation of tobacco mosaic virus coat protein is reduced to low levels. Mol. Gen. Genet., **230**, 33-38.
 - 23) Janda, M. and Ahlquist, P. (1993). RNA-dependent replication, transcription, and persistence of brome mosaic virus RNA replicons in *S. cerevisiae*. Cell, **72**, 961-970.
 - 24) Kajitani, M. and Ishihama, A. (1991). Identification and sequence determination of the host factor gene for bacteriophage Q β . Nucl. Acids Res., **19**, 1063-1066.
 - 25) Kamer, G. and Argos, P. (1984). Primary structural comparison of RNA-dependent RNA polymerases from plant, animal and bacterial viruses. Nucl. Acids Res., **12**, 7269-7282.
 - 26) Kroner, P. A., Young, B. M. and Ahlquist, P. (1990). Analysis of the role of brome mosaic virus 1a protein domains in RNA replication, using linker insertion mutagenesis. J. Virol., **64**, 6110-6120.
 - 27) Meshi, T., Ishikawa, M., Motoyoshi, F., Semba, K. and Okada, Y. (1986). *In vitro* transcription of infectious RNAs from full-length cDNAs of tobacco mosaic virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**, 5043-5047.
 - 28) Meshi, T., Watanabe, Y. and Okada, Y. (1992). Molecular pathology of tobacco mosaic virus revealed by biologically active cDNAs. P.149-186. In T. M. A. Wilson and J. W. Davies (ed.), Genetic engineering with plant viruses. CRC Press, Boca Raton.
 - 29) Meshi, T., Watanabe, Y., Saito, T., Sugimoto, A., Maeda, T. and Okada, Y. (1987). Function of the 30kd protein of tobacco mosaic virus: involvement in cell-to-cell movement and dispensability for replication. EMBO J., **9**, 2557-2563.
 - 30) Meyerowitz, E. M. and Pruitt, R. E. (1985). *Arabidopsis thaliana* and plant molecular genetics. Science, **229**, 1214-1218.

- 31) Mi, S., Durbin, R., Huang H. V., Rice, C. M. and Stollar, V. (1989). Association of the Sindbis virus RNA methyltransferase activity with the nonstructural protein nsP1. *Virology*, **170**, 385-391.
- 32) Ohno, T., Aoyagi, M., Yamanashi, Y., Saito, H., Ikawa, S., Meshi, T. and Okada, Y. (1984). Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus (tomato strain) genome and comparison with the common strain genome. *J. Biochem.*, **96**, 1915-1923.
- 33) Pardigon, N. and Strauss, J. H. (1992). Cellular proteins bind to the 3' end of Sindbis virus minus-strand RNA. *J. Virol.*, **66**, 1007-1015.
- 34) Quadt, R., Kao, C. C., Browning, K. S., Hershberger, R. P. and Ahlquist, P. (1993). Characterization of a host protein associated with brome mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 1498-1502.
- 35) Sawicki, D. L., Barkhimer, D. B., Sawicki, S. G., Rice, C. M. and Schlesinger, S. (1990). Temperature sensitive shut-off of alphavirus minus strand RNA synthesis maps to a nonstructural protein, nsP4. *Virology*, **174**, 43-52.
- 36) Sawicki, D. L. and Sawicki, S. G. (1980). Short-lived minus-strand polymerase for Semliki Forest Virus. *J. Virol.*, **34**, 108-118.
- 37) Sawicki, D. L. and Sawicki, S. G. (1987). Alphavirus plus strand and minus strand RNA synthesis, p.251-259. In M. A. Brinton and R. R. Rueckert (ed.), *Positive strand RNA viruses*. Alan R. Liss, Inc., New York.
- 38) Sawicki, D. L. and Sawicki, S. G. (1993). A second nonstructural protein functions in the regulation of alphavirus negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.*, **67**, 3605-3610.
- 39) Sawicki, D. L., Sawicki, S. G., Keränen, S. and Kääriäinen, L. (1981). Specific Sindbis virus-coded function for minus-strand RNA synthesis. *J. Virol.*, **39**, 348-358.
- 40) Sawicki, S. G. and Sawicki, D. L. (1986). The effect of loss of regulation of minus-strand RNA synthesis on Sindbis virus replication. *Virology*, **151**, 339-349.
- 41) Sawicki, S. G. and Sawicki, D. L. (1986). The effect of overproduction of nonstructural proteins on alphavirus plus-strand and minus-strand RNA synthesis. *Virology*, **152**, 507-512.
- 42) Shirako, Y. and Strauss, J. H. (1994). Regulation of Sindbis virus RNA replication: Uncleaved P123 and nsP4 function in minus-strand RNA synthesis, whereas cleaved products from P123 are required for efficient plus-strand RNA synthesis. *J. Virol.*, **68**, 1874-1885.
- 43) Shiroki, K., Kato, H., Koike, S., Odaka, T. and Nomoto, A. (1993). Temperature-sensitive mouse cell factors for strand-specific initiation of poliovirus RNA synthesis. *J. Virol.*, **67**, 3989-3996.
- 44) Sun, T.-P., Goodman, H. M. and Ausubel, F. M. (1992). Cloning the *Arabidopsis* GAI locus by genomic subtraction. *Plant Cell*, **4**, 119-128.
- 45) Takamatsu, N., Ishikawa, M., Meshi, T. and Okada, Y. (1987). Expression of bacterial chloramphenicol acetyltransferase gene in tobacco plants mediated by TMV-RNA. *EMBO J.*, **6**, 307-311.
- 46) Takamatsu, N., Watanabe, Y., Iwasaki, T., Shiba, T., Meshi, T. and Okada, Y. (1991). Deletion analysis of the 5' untranslated leader sequence of tobacco mosaic virus RNA. *J. Virol.*, **65**, 1619-1622.
- 47) Takamatsu, N., Watanabe, Y., Meshi, T. and Okada, Y. (1990). Mutational analysis of the pseudoknot region in the 3' non-coding region of tobacco mosaic virus RNA. *J. Virol.*, **64**, 3686-3693.
- 48) Van Regenmortel, M. H. V. and Fraenkel-Conrat, H. (1986) *The plant viruses 2. The rod-shaped plant viruses*. Plenum Press, New York.
- 49) Wahba, A. J., Miller, M. J., Niveleau, A., Landers, T. A., Carmichael, G. G., Weber, K., Hawley, D. A. and Slobin, L. I. (1974). Subunit I of Q β replicase and 30S ribosomal protein S1 of *Escherichia coli*. Evidence for the identity of the two proteins. *J. Biol. Chem.*, **249**, 3314-3316.
- 50) Watanabe, Y., Emori, Y., Ooshika, I., Meshi, T., Ohno, T. and Okada, Y. (1984). Synthesis of TMV-specific RNAs and proteins at the early stage of infection in tobacco protoplasts: transient expression of the 30K protein and its mRNA. *Virology*, **133**, 18-24.
- 51) Yamanaka, T., Hirose, N., Ishikawa, M., Naito, S. and Ohno, T. 未発表データ
- 52) Yanofsky, M. F., Ma, H., Bowman, J. L., Drews, G. N., Feldmann, K. A. and Meyerowitz, E. M. (1990). The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature (London)*, **346**, 35-39.