タバコモザイクウイルス蛋白質の化学構造に関する研究*

船 津 軍 喜

(九州大学農学部農芸化学科)

タバコモザイクウイルス (TMV) は 130 回転したラセン形のリボ核酸 (RNA) 鎖を、2,200 個の蛋白質 (被包蛋白質) が取り囲んだ棒状のウイルスで、最もよく研究されたウイルスである。TMV には 1935 年 Stanley によって発見された野生株 (vulgare) をはじめ、環境変化によって生じた変異株、異なった植物からの自然変異株、人工的に作られた変異株など数多くのものが分離されている。これら TMV の蛋白質の化学構造の研究は、主として米国カリフォルニア大学のウイルス研究所およびドイツのマックス・プランク研究所において行なわれ、ウイルス学は勿論、蛋白質化学、生化学、遺伝学、免疫学などの分野において多くの有意義な知見が得られている。著者の研究の大部分もカリフォルニア大学ウイルス研究所で行なわれたもので、野生株、人工変異株および自然変異株蛋白質の化学構造に関するものである。TMV について論ずる場合、なんとと言っても野生株のものがその根底となることはいうまでもないが、その根底となる野生株の化学構造については、RNA は勿論のことながら、その被包蛋白質の一次構造さえ確立されていなかった。すなわち、その蛋白質の一次構造が 1960 年マックス・プランク研究所の Anderer ら⁽¹⁾およびカリフォルニア大学ウイルス研究所の次田ら⁽²⁾によって、それぞれ独立に発表されたが、両者の構造に二、三不一致の点があったので、それらについて再検討を行なう必要があった。

トリプシン分解ペプチドの分離

蛋白質の一次構造研究で最も困難な仕事

* Studies on Chemical Structure of Tobacco Mosaic Virus-Protein.
By Gunki FUNATSU Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Kyushu University

の 1 つは、蛋白質を切断して得られるペプチドの分離精製である。TMV-蛋白質をトリプシンで消化すると 12 個のペプチドが得られるが、これらのペプチドの分離には、従来、向流分配法や Dowex 1×2 カラムが使われていた。しかし、これまでの方法では 1 回の操作で完全にペプチドを分離することができず、また長時間を要するなどの不利の点があった。したがって著者は、後述のごとく、多くの人工変異株蛋白質中の変換アミノ酸の位置を決定する目的もあって、これらのペプチドを完全に、しかも短時間で分離できるクロマトシステムを確立することを試みた。12 個のトリプシン分解ペプチドのうち、41 個のアミノ酸からなる N-末端のペプチド-1 を、まず pH 4.5 での等電沈澱を 3 回繰返すことにより純粋にしたのち、残りの 11 個のペプチドを Dowex 1×2 カラム (0.9×150 cm) にかへ、次のような溶媒系を用いて分離した。すなわち、pH 8.5 のピリジン-コリジン-酢酸緩衝液で平衡にしたカラムに試料をかけ、同緩衝液を

第 1 図 Dowex 1×2 カラム (0.9×150 cm) クロマトグラフィーによる TMV-蛋白質のトリプシン分解ペプチドの分離
それぞれのピークのペプチド番号は第 1 表に示す。w, x, y, z は不完全分解により生じたもの。1 fraction は 3.3 ml でペプチドは Folin-Lowry 法により検出した。

第 1 表 TMV-蛋白質のトリプシン分解ペプチド中の酸性, 塩基性および芳香族アミノ酸の数

ピーク	ペプチド番号*	アミノ酸残基数	酸性アミノ酸数	塩基性アミノ酸数	全荷電 (pH 7)	チロシン, フェニルアラニン数**
a	2	5	0	1	+1	0
b	7	2	0	1	+1	0
c	3	15	0	2(1 Lys)	+2	2
d	11	7	0	1	+1	1
e	5	3	0	1	+1	1
f	9	10	2	2	0	0
g	10	12	1	1	0	0
h	4	7	2	1(Lys)	-1	2
i	8	20	4	1	-3	0
j	12	17	1	0	-1	2
k	6	19	2	1	-1	2

* ペプチドの番号は N-末端からの順序で表わす。

** ペプチド 3 および 12 (ピーク c と j) はそれぞれ 1 個のトリプトファンをふくむ。

約 270 ml 流したのち, pH 7.3 のピリジン-コリジン-酢酸緩衝液, 0.02 N, 0.2 N, 0.35 N, 0.50 N, 0.65 N の酢酸をそれぞれ 135 ml 含む 9 つの容器をもつ polygrad を使って溶出し, 最後に 0.65 N, 10%, 30% の酢酸で残りのペプチドを溶出するシステムで, 第 1 図のごとく 11 個のペプチドを僅か 40 時間ではほぼ完全に分離できた⁽³⁾。

このクロマトにおいて溶出されるペプチドの位置は第 1 表に示すごとく, それぞれのペプチドのもつ全荷電とそれに含まれる芳香族アミノ酸の数によって支配され, しかもその位置は, クロマトの前半においては特に酸性アミノ酸の数に, 後半は芳香族アミノ酸の数に大きく左右されることがわかった。このことはさらに, 人工変異株や自然変異株蛋白質から得られるいろいろな種類のアミノ酸の変換をふくむペプチドの溶出位置の変化によって (第 2 図) 一層確実にされ, 人工変異株蛋白質における変換アミノ酸の位置決定に非常に有効な手段となった。このようにペプチドの溶出位置が, 酸性アミノ酸の数により決まるので, 逆にペプチドの溶出位置から, その中に含まれるアスパラギン酸およびグルタミン酸の β -および γ -カルボキシル基が, 遊離であるかアミドであるかを知ることができ, 従来アミドの決定に用いられていた電気泳動を行わなくても, ペプチドの分離とアミドの決定とを同時に行なうことができた。

また第 2 図に示すように, ペプチド中のチロシン残基がヨード化されると, その溶出位置が著しく遅れることから, TMV-蛋白質のヨード化の機構の研究が容易になり, ウイルス, または未変性の被包蛋白質では, 含まれる 4 個のチロシン中 138 番目のチロシンのみがヨード化され, 2 番目, 70 番目, 72 番目の 3 個のチロシンはヨード化を受けないことが証明され, 138 番目のチロシンはウイルス粒子の外部に, 他の 3 個は内部に位置することが明らかになった⁽⁴⁾。

また今まで分離が非常に困難であったペプチド-10 の大部分が, このカラムの上部に沈澱していることを見出し, これを定量

的に純粋に得ることに成功した。

野生株蛋白質の一次構造の訂正

上述のようにして分離された 12 個のペプチドのうち, ペプチド-1⁽⁵⁾ (41 個のアミノ酸からなる), ペプチド-2⁽⁶⁾ (5 個), ペプチド-6⁽⁷⁾ (19 個), ペプチド-8⁽⁵⁾ (20 個), およびペプチド-10⁽⁵⁾ (12 個) について, その構造の再検討を行なった。ペプチド-1 の切断には, ナガーゼによる限定水解を, 他のペプチドの切断にはキモトリプシン, ペプシン, ナガーゼなどを用い, 得られたペプチドについて, そのアミノ酸配列およびアミドの決定を行な

第 2 図 Dowex 1×2 カラムクロマトグラフィーにおける野生株-蛋白質のトリプシン分解ペプチドと人工変異株-蛋白質からのアミノ酸変換ペプチド, ヨード化ペプチドの溶出位置の比較

1 5 10 15 20
 Acetyl-SerTyrSerIleThrThrProSerGlnPheValPheLeuSerSerAlaTryAlaAspPro
 25 30 35 40
 IleGluLeuIleAsnLeuCysThrAsnAlaLeuGlyAsnGlnPheGlnThrGlnGlnAla
 45 50 55 60
 (Arg)ThrValValGln(Arg)GlnPheSerGlnValTryLysProSerProGlnValThrVal
 65 70 75 80
 (Arg)PheProAspSerAspPheLysValTyr(Arg)TyrAsnAlaValLeuAspProLeuVal
 85 90 95 100
 ThrAlaLeuLeuGlyAlaPheAspThr(Arg)Asn(Arg)IleIleGluValGluAsnGlnAla
 105 110 115 120
 AsnProThrThrAlaGluThrLeuAspAlaThr(Arg)ArgValAspAspAlaThrValAla
 125 130 135 140
 Ile(Arg)SerAlaIleAsnAsnLeuIleValGluLeuIle(Arg)GlyThrGlySerTyrAsn
 145 150 155
 (Arg)SerSerPheGluSerSerSerGlyLeuValTryThrSerGlyProAlaThr

第 3 図 野生株 TMV-蛋白質の全アミノ酸配列

○はトリプシンで切断される場所。N-末端よりペプチド-1, ペプチド-2, ……ペプチド-12 と番号をつけて呼んでいる。

第 2 表 TMV の人工変異株における変換アミノ酸の位置決定⁽¹¹⁾

変異株*	変異剤反応	アミノ酸変換	ペプチド	位置決定法**	変換の位置
218	Bromination	Pro → Leu	1	Nag.	20
235(p)	Bromination	Pro → Leu	1	Nag.	20
342(p, 330)	Bromination	Ileu → Thr	1	Nag. Cp.	21
344(p)	Methylation	Thr → Ala	6	Nag.	81
		Ser → Phe	12	Chy. Cp.	148
346	Deamination	Pro → Leu	1	Nag.	20
357	Deamination	Asp(NH ₂) → Ser	1	Nag. Ac.	25
359(p, 284)	Deamination	Arg → Lys	2		46
		Glu → Gly	8	Nag. Cp.	97
369(p)	Deamination	Arg → Gly	2		46
		Ileu → Val	10	Pep.	129
371(p, 329)	Deamination	Ser → Phe	11		138
		Ser → Phe	12	Chy. Hyd.	148
378(p, 326)	Bromination	Asp(NH ₂) → Ser	1	Nag. Cp. Ac.	25
		Asp(NH ₂) → Ser	1	Nag.	33
		Asp(NH ₂) → Ser	10	Pep. Ac.	126
383(p, 171)	Deamination	Asp(NH ₂) → Ser	1	Nag. Ac.	25
		Thr → Ala	6	Ac.	81
		Pro → Leu	12	Cp.	156
384(p, 282)	Deamination	Asp(NH ₂) → Ser	1	Nag. Cp. Ac.	25
		Thr → Ala	6	Nag.	81
403(p, 178)	Methylation	Arg → Gly	2		46
414	Bromination	Ser → Gly	4	Ac.	65
415	Deamination	Ileu → Val	1	Nag. Cp.	21
419	Deamination	Ser → Phe	12	Chy. Hyd.	148
421	Deamination	Val → Met	1		11
427	Deamination	Glu(NH ₂) → Arg	8		99
430	Spontaneous	Pro → Thr	1	Nag. Cp. Ac.	20

* (p) は progeny を表わす。

** トリプシン消化後, さらに Nag. (ナガーゼ); Cp. (カルボキシペプチダーゼ); Chy. (キモトリプシン); Pep. (ペプシン); Ac. (希酸部分水解); Hyd. (ヒドラジン分解) によって変換位置が決定された。

った。また、ペプチド-10 では 0.03 N 塩酸による部分水解法が、構造の誤りを発見するきっかけとなった。このようにして、両研究所で発表された構造の不一致の点を再検討した結果、次田らの構造で Gln^{22} を Glu^{22} に、 $\text{-Leu-Asp-}^{26,27}$ を $\text{-Asn-Leu-}^{26,27}$ に、 $\text{-Gln-Val-}^{44,45}$ を $\text{-Val-Gln-}^{44,45}$ に、 Gln^{95} を Glu^{95} に、 $\text{-Asp-Ileu-Asn-}^{125,126,127}$ を $\text{-Ileu-Asn-Asn-}^{125,126,127}$ に訂正し、また Anderer らの構造についても Gln^{95} , Gln^{96} , Asp^{98} , Gln^{106} , $\text{-Asp-Ile-Asn-}^{125,126,127}$ が間違っていることを指摘した。この点に関し Anderer からも再検討を行ない、その誤りを認め⁽⁸⁾、ここに両者における構造は全く一致し、最終的な野生株-蛋白質の全アミノ酸配列が決定されるに至った (第 3 図)。

この研究中、ヒドラジン分解による C-末端アミノ酸の決定法として従来行なわれていたベンズアルデヒド処理を省略し、ヒドラジンを除去後直ちにアミノ酸分析機にて C-末端アミノ酸を分析する簡易法を考案した⁽⁶⁾。

人工変異株蛋白質の化学構造

TMV-RNA を亜硝酸で処理すると、非常に頻度は少ないが変異が起こることが見出され、遺伝情報の解明のために、この人工変異株蛋白質の化学構造の研究が Wittmann⁽⁹⁾および次田⁽¹⁰⁾により行なわれていた。著者も次田氏のあとを引き継いで、この研究を行なった⁽¹¹⁾。分離された変異株の 2/3 はその被包蛋白質のアミノ酸組成に変化はなく、残りの 1/3 に 1 ないし 3 個のアミノ酸の変換が見出されたに過ぎない。同定された変換アミノ酸の位置を第 2 表に示すが、これらのアミノ酸の変換は不可逆的で、しかも隣接した位置で起こっておらず、2 個あるいは 3 個変換している変異株においても、異なったペプチドで起こっている場合が多かった。これらのことは、ここで観察されたアミノ酸の変換が TMV-RNA 中の塩基におけるシトシン (C)→ウラシル (U) および アデニン (A)→グアニン (G) への変化の結果起こったことを示すと同時に、triplet code が overlapping でないことの有力な証拠となった。変換したアミノ酸に大腸菌の無細胞系で得られた codon をあてはめてみると、第 3 表に示すように、変換アミノ酸間で C→U および A→G の関係がよく成立することがわかり、生体外で得られた codon が生体内においても適用できることを実証した。これらの詳細については、著者が「化学と生物」の 4 巻 3 号に解説しているので、誌面の都合で省略させていただく。

第 3 表 TMV の人工変異株におけるアミノ酸の変換の頻度と codon の変化⁽¹¹⁾

変換の種類	変換の頻度			Codon の変化
	HNO ₂	NBS	DMS	
Asp → Gly	(2)*			<u>GAU</u> → <u>GGU</u>
Asp → Ala	(4)			
Asn → Ser	4(2)	3		
Thr → Ala	2			<u>ACU</u> → <u>GCU</u>
Thr → Ileu	(8)			<u>ACU</u> → <u>AUU</u>
Thr → Met	(3)			<u>ACG</u> → <u>AUG</u>
Ser → Phe	4(4)	2	2	<u>UCU</u> → <u>UUU</u>
Ser → Gly		1		
Ser → Leu	(2)			<u>UCG</u> → <u>UUG</u>
Glu → Gly	1(1)			<u>GAG</u> → <u>GGG</u>
Gln → Arg	1			<u>CAG</u> → <u>CGG</u>
Gln → Val	(2)			
Pro → Leu	3(1)	4	4	<u>CCC</u> → <u>CGC</u>
Pro → Ser	(3)			<u>CCC</u> → <u>UCC</u>
Val → Met	1			
Ileu → Val	2(3)			<u>AUU</u> → <u>GUU</u>
Ileu → Thr		1		
Ileu → Met	(1)			
Leu → Phe	(1)			<u>CUU</u> → <u>UUU</u>
Arg → Gly	3	3	1	<u>AGG</u> → <u>GGG</u>
Arg → Lys	1	1		

* () 内は、Wittmann により報告された変換の頻度。

自然変異株蛋白質の化学構造

TMV の自然変異株はタバコの葉での症状の違いによって分離されるのみでなく、タバコ以外の植物からも分離されている。いずれの変異株も、そのウイルスの形態は野生株と全く同一で、その蛋白質は野生株の場合と同様、67% 冷酢酸法にて分離することができる。著者はトマトから分離されたトマト黄色非定型モザイクウイルス (Y-TAMV)、トマト緑色非定型モザイクウイルス (G-TAMV)、オオバコから分離されたホームズ・リブグラスウイルス (HR) およびキュウリから分離されたキュウリ緑斑モザイクウイルス (CGMMV) について、その蛋白質の化学構造の研究を行なった。これらの蛋白質のアミノ酸組成を第 4 表に示す。

Y-TAMV : このウイルスはイリノイ州で Miller (1953) が栽培トマトから分離したもので、トルコ種タバコで全身感染を起こし、上部の葉で緑色モザイク、中部の葉に葉緑体の黄化を起こす。その蛋白質のアミノ酸

第 4 表 自然変異株-蛋白質のアミノ酸組成

	TMV	Y-TAMV ⁽¹²⁾	G-TAMV ⁽¹²⁾	HR ⁽¹⁸⁾	CGMMV ⁽¹⁸⁾
Asp	18	18	22 +4	17 -1	20 +2
Thr	16	17 +1	19 +3	13 -3	10 -6
Ser	16	15 -1	10 -6	13 -3	24 +8
Glu	16	19 +3	16	22 +6	10 -6
Pro	8	8	10 +2	8	6 -2
Gly	6	6	4 -2	4 -2	9 +3
Ala	14	11 -3	18 +4	18 +4	21 +7
Cys	1	1	1	1	0 -1
Val	14	15 +1	12 -2	10 -4	7 -7
Met	0	1 +1	2 +2	3 +3	0
Ile	9	7 -2	8 -1	8 -1	7 -2
Leu	12	13 +1	11 -1	11 -1	18 +6
Tyr	4	5 +1	6 +2	7 +3	4
Phe	8	8	8	6 -2	9 +1
Lys	2	2	1 -1	2	4 +2
His	0	0	0	1 +1	1 +1
Arg	11	9 -2	8 -3	10 -1	8 -3
Try	3	3	2 -1	2 -1	2 -1
合 計	158	158	158	156	160
変化数*		±8	±17	+17 -19	+30 -28

* 変化数は、各アミノ酸について TMV 野生株の数より多いのは+、少ないのは-で表わし、その合計を表わす。

第 4 図 Dowex 1×2 カラム (0.9×150 cm) クロマトグラフィーによる Y-TAMV-蛋白質のトリプシン分解ペプチドの分離

組成は第 4 表に示すごとく、野生株と ±8 個の変化があった。pH 4.5 で可溶のトリプシン分解ペプチドは、前述の Dowex 1×2 カラムクロマトにて第 4 図のごとく、ほとんど純粋に分離された⁽⁸⁾。

各ペプチドのアミノ酸組成は、a : Asp₁Arg₁, b : Thr₃Ser₂Glu₆Pro₂Val₃Phe₂Try₁Lys₁Arg₁, c : Val₁Tyr₁Arg₁, d : Asp₂Thr₁Ala₂Val₂Ile₁Leu₂Arg₂, e : Asp₃Ser₁Glu₁

Ala₁Val₂Ile₁Leu₂Arg₁, f : Asp₁Pro₁Gly₁Val₁Tyr₁Phe₁Lys₁, g : Asp₂Thr₄Ser₁Glu₅Pro₁Ala₂Val₁Ile₂Leu₁Arg₁, h : Asp₃Thr₃Pro₁Gly₁Ala₂Val₁Ile₁Leu₄Tyr₁Phe₁Arg₁, i : Asp₂Thr₃Ser₄Glu₂Pro₁Gly₃Ala₂Val₁Met₁Leu₂Tyr₁Phe₁Arg₁, ペプチド-1 : Asp₄Thr₃Ser₇Glu₆Pro₂Gly₁Ala₂Val₃Ile₂Leu₄Tyr₁Phe₃Try₁Arg₁CySH₁ で、ドイツで Melchers (1942) がトマトから分離し、すでに Wittmann らによって一次構造が決定された変異株 dahlemense⁽¹⁴⁾ のそれと、ペプチド-1 で 1 個のアミノ酸が異なる以外 (Ser→Asp) は、全く一致していることが明らかになった。

G-TAMV : このウイルスはトルコ種タバコに増殖した Y-TAMV より分離されたもので、タバコの中部の葉に葉緑体の黄化がみられない点で、Y-TAMV と区別することができる。その蛋白質のアミノ酸組成は野生株と ±17 個の変化があり (第 4 表)、N-末端アミノ酸としてアセチル-アミノ酸は得られなかった。トリプシン分解ペプチドのクロマト図を第 5 図に示しているが、いくつかのピークは必ずしも単一ではなく、さらにペーパークロマトで精製したのち、アミノ酸組成を分析した⁽⁹⁾。

そのアミノ酸組成は、a : Thr₁Glu₃Ala₁Arg₁, b : Asp₁Arg₁, c : Asp₁Thr₃Ser₁Glu₃Pro₂Ala₂Val₃Met₁Phe₁Lys₁Arg₁, d : Val₁Tyr₁Arg₁, e : Asp₃Ser₁Glu₁Ala₂Val₁Ile₁Leu₂Arg₁, f : Asp₁Thr₁Ser₂Glu₁Pro₂Ile₁Tyr₁Phe₁, h : Asp₂Thr₁Ala₂Val₂Ile₁Arg₁, i : Asp₃Thr₂Pro₁Ala₂Val₁Ile₂Arg₁, m : Asp₁Ser₁Pro₁Ala₁Tyr₁Phe₂ でピーク g, j, h, l については、はっきりしたアミノ

酸組成が得られなかった。しかしながら、これらのペプチドは、Wittmann によって一次構造の決定がなされている⁽¹⁵⁾変異株 U-2 のそれに極めて類似していることが、Wittmann により指摘された。この U-2 株は dahlemense 株より分離されたもので、アメリカで分離された Y-TAMV と G-TAMV とが、ドイツで分離された dahlemense と U-2 とに期せずして一致していたわけ

第5図 Dowex 1×2 カラム (0.9×150 cm) クロマトグラフィーによる G-TAMV-蛋白質のトリプシン分解ペプチドの分離
使用したトリプシンにキモトリプシンがふくまれるので、キモトリプシンで分解したペプチドも含まれる。

で、両ウイルス間に何か密接な関係があるものと推察されるが、これらの関係については未だわかっていない。ただ両者の間に大きな蛋白質の構造のちがいがあるので、G-TAMV あるいは U-2 が単に Y-TAMV あるいは dahlemense の変異によって生じたものとは考えられない。

HR 株：このウイルスは路傍のオオバコから Holmes (1941) によって分離されたもので、トルコ種タバコの接種葉に壊死性輪状病斑とレース状の侵蝕を呈し、直接感染を受けていない上部の葉に弱いモザイク病斑がみられる。また *N. sylvestris* で局所病斑を作り、古くから

第6図 Dowex 1×2 カラム (1.1×50 cm) クロマトグラフィーによる HR-蛋白質のトリプシン分解ペプチドの分離

I ; 2% ピリジン-酢酸緩衝液 (pH 8.5), II ; 2% ピリジン-酢酸緩衝液 (pH 7) 100 ml → 0.01 N 酢酸 100 ml, III ; 0.01 N 酢酸 150 ml → 0.02 N 酢酸 150 ml, IV ; 0.02 N 酢酸 150 ml → 0.1 N 酢酸 150 ml, V ; 0.02 N 酢酸 150 ml → 0.1 N 酢酸 150 ml, VI ; 1 N 酢酸, VII ; 1 N 酢酸 100 ml → 30% 酢酸 100 ml.

TMV に対して最も遠い変異株であると考えられていた。67% 冷酢酸による蛋白質の分離は、他の変異株より困難で長時間を要する。そのアミノ酸残基数は 156 個で、野生株のそれより 2 個少ないことがわかった。変化しているアミノ酸の数は +17, -19 で、ヒスチジンが含まれている。蛋白質をトリプシンで消化すると、ペプチド-1 は幾つかの他のペプチドを伴って沈澱、不溶化するため、その精製が非常に困難であったが、pH 2.2 の 8 M 尿素溶液で洗浄した残渣が比較的に純粋なペプチド-1 であることがわかった。

そのアミノ酸組成は、 $\text{Asp}_4\text{Thr}_3\text{Ser}_5\text{Glu}_7\text{Pro}_2\text{Gly}_1\text{Ala}_5\text{Val}_2\text{Met}_1\text{Ile}_1\text{Leu}_2\text{Tyr}_4\text{Phe}_1\text{Arg}_1\text{CySH}_1\text{Try}_1$ で、野生株の場合同様 41

個のアミノ酸からなっている。可溶性ペプチドの Dowex 1×2 カラムクロマト図を第 6 図に示すが、この場合の溶出は polygrad を用いず、酢酸濃度を段階的に上げてペプチドを溶出した⁽¹⁶⁾。ペプチドはさらにペーパークロマトで精製したのち、小さいペプチドについてはそのまま phenylisothiocyanate を用いた Edman 分解法にて N-末端アミノ酸を消去し、残存したペプチドのアミノ酸を分析する方法によってそのアミノ酸配列を決定し、大きいペプチドは一旦キモトリプシン、ペプシン、ナガゼなどで分解して小さくしたのち、Edman 分解法を適用してそのアミノ酸配列を決定した。

このようにして得られたトリプシン分解ペプチドの順列を決めるため、蛋白質を直接キモトリプシンで消化し、Dowex 1×2 カラムクロマトにて分離し(第 7 図)、アルギニンを含むペプチドのアミノ酸組成および野生株蛋白質の一次構造との対比から、トリプシン分解ペプチドの順列を決め、第 8 図のような HR 株蛋白質の一次構造を決定した⁽¹³⁾。

対応する領域におけるアミノ酸配列を比較すると第 11 図のように、N-末端と C-末端の構造は野生株のそれと全くひとしく、146 番目と 147 番目の Ser の部分で 2 個のアミノ酸残基の欠損を仮定すると非常に多くの残基が一致する。このようなアミ

第 7 図 Dowex 1×2 カラムクロマトグラフィーによる HR-蛋白質のキモトリプシン分解ペプチドの分離

— Folin color Arginine

Acetyl-Ser Tyr Asn Ile Thr Asx Ser **Asn Gln Tyr** Glx Tyr Phe Ala Ala Val Try Ala Glu Pro
 Thr Pro Met Leu **Asn** Gln Cys Val Ser Ala Leu **Ser Gln Ser Tyr** Gln Thr Gln Ala Gly
 Arg Asp Thr Val Arg Gln Gln Phe Ala **Asn** Leu Leu Ser Thr Ile Val Ala Pro Asn Gln
 Arg Phe Pro Asp Thr Gly Phe Arg Val Tyr Val Asn Ser Ala Val Ile **Lys Pro Leu Tyr**
 Glu Ala Leu Met Lys Ser Phe Asp Thr Arg Asn Arg Ile Ile Glx Thr Glx Glx Glu Ser
 Arg Pro Ser Ala Ser Glx Val Ala Asp Ala Thr Gln Arg Val Asp Ala Thr Val Ala
 Ile Arg Ser Glx Ile Glx Leu Leu Leu **Asx Glx Leu Ser Asx His Gly Gly Tyr Met Asp**
 Arg Ala Gln Phe Glu Ala Ile **Leu Pro Try** Thr Thr Ala Pro Ala Thr

第 8 図 HR-蛋白質のアミノ酸配列 (太字は証明が不十分な箇所を示す)

ノ酸の欠損は、ウイルスのゲノム中、ウイルスの被包蛋白質に関連した部分の塩基の欠損を示すもので、ウイルスの突然変異が、ただ単に塩基の交換によって起こるばかりではなく、脊椎動物のヘモグロビン鎖において観察されているような進化の過程を辿っていることを示唆するものである⁽¹⁷⁾。

CGMMV⁽¹⁸⁾： このウイルスは 1935 年、すでにイギリスで Ainsworth が報告しているが、昨年以来西日本地区の促成栽培キュウリに大発生したものである。症状としては葉に vein banding や緑斑の明瞭なモザイク症状をあらわし、果実は黄色斑点や緑色円形のコブ状隆起

を生じる。ウイルス粒子の形態およびその物理性などの点で非常に TMV に類似しているが、その寄主範囲がほぼウリ科に限られ、TMV との間で明瞭な血清学的反応および交叉防禦反応が認められないことなどから、TMV と同系統かどうかについて論議がなされていた。その蛋白質は TMV 同様 67% 冷酢酸により簡単に分離できる。その構成アミノ酸は第 4 表のごとく 160 個で野生株のそれより 2 個多く、+30, -28 個のアミノ酸の変化がみられる。構成アミノ酸で特に注目すべきことは他のすべての TMV 株に存在するシステインが存在しないことである。DNP-法により N-末端アミノ酸を検べた結果、

第9図 Dowex 1×2 カラム (0.9×150 cm) クロマトグラフィーによる CGMMV-蛋白質のトリプシン分解ペプチドの分離

I ; 2% ピリジン-酢酸緩衝液 (pH 8.2)

II ; 2% ピリジン-酢酸緩衝液 (pH 7.2) 200 ml → 0.01 N 酢酸 200 ml

III ; 0.01 N 酢酸 200 ml → 0.02 N 酢酸 200 ml

IV ; 0.02 N 酢酸 200 ml → 0.10 N 酢酸 200 ml

V ; 0.10 N 酢酸 200 ml → 2 N 酢酸 200 ml

VI ; 30% 酢酸

DNP-アミノ酸は得られず、おそらく野生株同様アセチル化されているものと推測される。一方、蛋白質にカルボキシペプチダーゼAを作用させると、Ser_{0.78}, Ala_{0.47}, Thr_{0.32}, Phe_{0.21}, Gly_{0.19}, Leu_{0.15}が遊離されることから、そのC-末端構造は -Leu-Gly-Phe-Thr-Ala-Ser であろうと推定され、野生株の -Pro-Ala-Thr とかなり異なっている。

pH 4.5 で可溶のトリプシン分解ペプチドを Dowex 1×2 カラムクロマトで分離すると第9図のようであるが、得られたペプチドのアミノ酸残基数の合計が未だ蛋白質のそれと一致せず、現在なお検索中である。これらペプチドのアミノ酸残基数およびアミノ酸組成の類似性から、野生株のペプチドに対応するものを拾いあげて第10図に示したが、全く同一構造のペプチドは Asn-Arg のみに過ぎない。また他の TMV 株に共通に存在し、その重要性が示唆されていたペプチド-9 (Val-Asp-Asp-Ala-Thr-Val-Ala-Ile-Arg) が存在しないことも特徴的である。これらの結果から、CGMMV は TMV の一変異株であろうと考えられる。しかしながら TMV との間で血清学的反応がみられないのは、TMV の抗原活性発現ペプチドとされているペプチド-8 (Ile-Ile-Glu-Val-Glu-Asn-Gln-Ala-Asn-Pro-Thr-Thr-Ala-Glu-Thr-

第10図 CGMMV-蛋白質からのトリプシン分解ペプチドと野生株 TMV-蛋白質からのトリプシン分解ペプチドとの比較

Leu-Asp-Ala-Thr-Arg)¹¹², あるいは C-末端ペプチド (-Thr-Ser-Gly-Pro-Ala-Thr)¹⁵⁸ の構造が異なるためと考えられるが, CGMMV の抗原活性発現ペプチドが野生株同様, 果たしてペプチド-8 や C-末端であるかどうかは不明である. CGMMV-蛋白質のアミノ酸配列について現在研究中である.

変異株蛋白質の化学構造研究の意義

変異株蛋白質の化学構造の研究は, ただ単にそのウイルスの本体を明らかにするにとどまらず, 分子生物学におけるいくつかの興味ある問題の解明に大きな貢献をなしている. たとえば人工変異株におけるアミノ酸の交換の研究が, 遺伝情報の解明に役立ったことは前述のとおりである.

TMV の被包蛋白質のアミノ酸残基数は 158 で, 1 個のアミノ酸を code する塩基は 3 個であるから, 被包蛋白質を code するのに必要な塩基の数は 474 に過ぎない. TMV-RNA が 6,400 個の塩基よりなることを考えると, これは全ヌクレオチド鎖の 7% に過ぎず, 残る RNA の大部分は, 他の機能を営む蛋白質あるいは酵素を code しているものと思われる. したがって, われわれがもし被包蛋白質の coding に関与するヌクレオチドを取り出すことができ, その塩基配列が決定されるとすれば, 核酸の塩基配列と蛋白質のアミノ酸配列との関係すなわち遺伝の情報の本質と, その現われ方の双方が解明されるであろう.

遺伝子の変化に伴うアミノ酸の変換の大部分は, 生物にとって有害であるが, ときには, ある特別な環境での生存にとって有益で, 変化を受けた遺伝子は子孫に伝達されて(自然淘汰)現在に至っている. すなわち, 現存する生物の有するペプチド鎖は, 過去に存在したペプチド鎖から遺伝的分岐によって生じたものであると考えられるので, 2つの鎖の残基の間に著しい相異がみられるという事実は, 2つの鎖が共通の祖先から分岐して以来, 長い年代が経過した証拠であるとみなすことができよう. したがってその変換アミノ酸の数によって, その類縁関係を示すこともできるわけで, TMV の場合, 人工変異株, dahlemense (または Y-TAMV), U-2 (または G-TAMV), HR, CGMMV の順に野生株から遠ざかり, CGMMV では, もはやタバコに感染して増殖することはできないまでに変化している. これらの蛋白質のアミノ酸配列において, 変換アミノ酸間でその codon を比較

してみると, 人工変異株の場合は勿論であるが, dahlemense および U-2 では triplet のうち 1 個が他の塩基で置換されている場合がほとんどであるが, HR-株の場合には triplet の 2 個とも置換している場合がしばしばみられる. このこともまた, HR-株が野生株より類縁関係が遠いことを示すものであろう. 類縁関係を検べるのに重用されている血清学的反応において, たとえば他の部分のアミノ酸にはほとんど変化がないが, 抗原活性発現部位にアミノ酸の変換があるウイルスでは, おそらく血清学的な反応をしないと予想されるので, 血清学的反応のみにて類縁関係を論じることは危険で, 他の手段として, その化学構造を比較する必要があるように思われる.

リボゾーム上で合成されたポリペプチド鎖は, 生体内のある環境のもとで, それぞれ特有の立体構造を形成することによって, その蛋白質に特異的な機能を発揮するのであるが, この一定の立体構造は, そのポリペプチド鎖におけるアミノ酸の配列によって決まることが知られている. T-ファージの場合, その宿主域を決めるのは, その蛋白成分であることが判明しているが, TMV の場合にはウイルスの呈する症状や宿主域を決めるのは, おそらく被包蛋白質ではないと考えられている. 被包蛋白質の唯一の機能は RNA と結合してウイルス粒子を作ることにあるが, その構造と機能との関係についてはわかっていない. しかし自然変異株-蛋白質におけるように, 異なったアミノ酸の配列をもつポリペプチド鎖が, 同一の立体構造と同一の機能とを有する場合, 進化の間にアミノ酸の入れ替えが起こらなかった位置は, おそらくポリペプチドの構造と機能に関して重要な役割を果たしていると考えられ, すでにヘモグロビンにおいて認められている⁽¹⁹⁾. 現在まで得られた変異株蛋白質のアミノ酸配列を比較して第 11 図に掲げたが, すべてに共通なアミノ酸残基数は 53 である. しかし CGMMV でシステインおよびペプチド-9 (113~122) が得られていないことから, CGMMV-蛋白質のアミノ酸配列が決定すれば, 共通部分のアミノ酸残基数は著しく減少するものと期待できる. 不幸にして X-線回折による TMV-蛋白質の立体構造が解明されていないので, これら共通部分のアミノ酸が, 蛋白質の立体構造およびウイルス粒子形成にどのような役割を果たしているか全く不明であるが, TMV 粒子の立体構造とウイルス形成の機構が解明される日もそう遠くはないであろう.

この研究を行なうにあたり、終始御懇篤な御指導と御鞭撻を賜りました九州大学農学部教授船津 勝博士をはじめ、カリフォルニア大学ウイルス研究所長 W. M. Stanley 博士および同教授 H. Fraenkel-Conrat 博士に厚くお礼申し上げます。また TMV をいただいたウイルス研究所教授 C. Knight 博士および CGMMV をいただいた九州大学農学部教授日高 醇博士に厚くお礼申し上げます。

- (1) F. A. Anderer, H. Uhlig, E. Weber, G. Schramm : *Nature* (London), **186**, 922 (1960).
- (2) A. Tsugita, D. T. Gish, J. Young, H. Fraenkel-Conrat, C. A. Knight, W. M. Stanley : *Proc. Nat. Acad. Sci., U. S.*, **46**, 1463 (1960).
- (3) G. Funatsu : *Biochemistry*, **3**, 1351 (1964).
- (4) H. Fraenkel-Conrat : 私信.
- (5) G. Funatsu, A. Tsugita, H. Fraenkel-Conrat : *Arch. Biochem. Biophys.*, **105**, 25 (1964).
- (6) G. Funatsu : 未発表.
- (7) C. M. Tsung, G. Funatsu, J. D. Young : *Arch. Biochem. Biophys.*, **105**, 42 (1964).
- (8) F. A. Anderer, B. Wittmann-Liebold, H. G. Wittmann : *Z. Naturforsch.*, **20 b**, 1203 (1965).
- (9) H. G. Wittmann : *Z. Vererbungslehre*, **90**, 463 (1959) ; *Naturwiss.*, **48**, 729 (1961).
- (10) A. Tsugita, H. Fraenkel-Conrat : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **46**, 636 (1960) ; **48**, 441 (1962) : *J. Mol. Biol.*, **4**, 73 (1962).
- (11) G. Funatsu, H. Fraenkel-Conrat : *Biochemistry*, **3**, 1356 (1964).
- (12) A. Tsugita : *J. Mol. Biol.*, **5**, 293 (1962).
- (13) G. Funatsu : International Symposium on Plant Biochemical Regulation in Viral and other Diseases or Injury (Tokyo), August (1967).
- (14) B. Wittmann-Liebold, H. G. Wittmann : *Z. Naturforsch.*, **18 b**, 1032 (1963).
- (15) H. G. Wittmann : *ibid.*, **20 b**, 1213 (1965).
- (16) G. Funatsu, M. Funatsu : *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 50 (1967).
- (17) E. Zuckerkandle : *Scientific American*, **212**, 110 (1965).
- (18) 船津軍喜, 倉地幸徳, 船津 勝, 副島泰彦, 日高 醇 : 化学関連 7 支部合同福岡大会, 昭和 42 年 7 月 15 日.
- (19) M. F. Perutz, J. C. Kendrew, H. C. Watson : *J. Mol. Biol.*, **13**, 669 (1965).