

氏名	たま い あつ し 玉 井 淳 史
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 2346 号
学位授与の日付	平 成 13 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 生 物 科 学 専 攻
学位論文題目	植 物 ウ イ ル ス の 細 胞 間 移 行 に 関 す る 分 子 生 物 学 的 研 究

論文調査委員 (主査) 飯 哲 夫 教 授 西 村 いく こ 教 授 長 谷 あ き ら  
助教 飯 哲 夫

### 論 文 内 容 の 要 旨

植物ウイルスは宿主植物の細胞に侵入すると原形質連絡を通過して細胞間移行し、感染域を拡げていく。植物ウイルスの多くは細胞間移行に必要な移行タンパク (MP) をコードしている。本研究は、植物ウイルスの細胞間移行の分子機構を解明することを目的とし、トマトモザイクウイルス (ToMV) とジャガイモXウイルス (PVX) の DNA 感染系を利用した相補実験系を構築し、ウイルス感染細胞におけるそれぞれの MP の機能を厳密に解析したものである。

一本鎖 RNA ウイルスであるタバコモザイクウイルス (TMV) の MP は最も研究の進んでいる MP で、原形質連絡を介した巨大分子の細胞間拡散を促進する活性を持ち、MP 自身も細胞間移行すると考えられている。しかし、細胞における MP の挙動に関しては、互いに矛盾する報告例があり、またいくつかの実験結果については、実験手法そのものに疑義が生じている。申請者は、ウイルスの細胞間移行における MP の機能を詳細に解析するには、ある一細胞にウイルスを感染させ、そこからウイルスが細胞間移行していく様子を 1 細胞レベルで追跡できる系が有用であると考え、まず TMV と同属のウイルスである ToMV をプラスミド DNA のままで感染させることのできる系を構築した。MP 遺伝子を欠く ToMV の感染性プラスミドを *N. benthamiana* の葉の細胞にパーティクルガン法で導入した場合、ToMV の感染は 1 細胞にとどまっていたが、MP を発現するプラスミドと共に導入すると、MP 欠損 ToMV が複数の細胞境界を越えて移行することが分かった。この相補実験の結果から、MP はウイルスの移行に伴い細胞間を移行することが明らかになった。また、MP-GFP 融合タンパクの局在性の解析により、MP の原形質連絡への局在及び細胞間移行はウイルス感染により大きく促進されること、MP 単独の発現では主として細胞内に凝集体を形成することを明らかにした。このことは、ウイルスの移行と複製の間には何らかの相互作用があることを意味する。また、研究の過程で原形質連絡の透過性の変化を検出する簡便な手法を開発した。

次に、申請者は、ToMV とは分類上異なるウイルスの細胞間移行を解析することが、ウイルス全般の細胞間移行の理解につながることを考え、PVX の細胞間移行に関する解析を行った。PVX は 4 種類のタンパクを移行に必要とする。PVX の DNA 感染系を用いた相補実験の結果から、25K タンパク、12K タンパク、及び外被タンパク (CP) がウイルスの移行に伴い細胞間を移行すること、8K タンパクは移行せず、発現した細胞内でのみ機能すること、また、8K タンパクの役割は 12K タンパクの機能補助であることを明らかにした。さらに、12K タンパクが原形質連絡の透過性を上昇させる機能を持つことを見いだした。これらの知見に基づき、申請者は、PVX の細胞間移行の分子機構に関する従来のモデルを大きく修正する新たなモデルを提唱した。

あるウイルスの移行能欠損が、他のウイルスの MP によって相補される場合がある。このような現象の分子基盤を明らかにすることは、植物ウイルスの移行の分子機構を理解する上での重要な知見を与える。そこで、申請者は ToMV と PVX の DNA 感染系を応用し、異種ウイルス間での移行の相補実験を行った。その結果、ToMV と PVX の MP は互いの移行能欠損を相補できないこと、さらに、両者の移行能欠損がキュウリモザイクウイルス (CMV) の細胞間移行に必要な

3a タンパクと CP の共発現によって相補されることを明らかにした。さらに、変異 3a タンパクを用いた解析から、3a 及び CP による細胞間移行のメカニズムは ToMV と PVX の間で異なっていることが示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

植物ウイルスが宿主植物に全身感染する過程は、個々の細胞内での複製、原形質連絡を介した細胞間移行、維管束系を介した遠隔距離の移行の3つに分けられる。多くの植物ウイルスはそのゲノムに細胞間移行に必要な移行タンパク (MP) をコードしている。細胞間移行の分子機構に関しては、トバモウイルス属のウイルスのコードする MP の機能解析に基づくモデルが提唱されているが、最近、モデルの根幹をなす実験に疑義が生じている。申請者は、植物ウイルスの細胞間移行の機構を明らかにすることを目的として、まず移行に関する厳密な議論を可能にする新たな実験系を構築した。ついでその系を応用し、多くの新規の知見を提出した。

申請者は、最初に、RNA ウィルスである ToMV を DNA により感染させ、かつ一次感染細胞を生細胞のまま可視的に同定できる系を構築した。この系の開発により種々の因子を一次感染細胞内でのみウィルスと同時に発現させることが可能になった。移行能を欠損した ToMV を発現するプラスミドと MP を発現するプラスミドの同時導入により、移行能欠損がトランスに相補されること、その際、MP はウィルスとともに細胞間を移行することを明らかにした。また、MP 単独では極めて低頻度でしか細胞間を移行せず、発現した MP の大部分は細胞質内に凝集体を形成すること、ウィルス感染に伴うこの MP の凝集体は消失し、MP は効率よく細胞間移行するとともに原形質連絡へ局在することを明らかにした。これにより、MP 自身の細胞間移行に関する議論に決着が付けられた。また、複製と細胞間移行は従来分けて考えられてきたが、本研究の結果は両者の間の機能的関連性を明らかにしており、今後の研究に与える影響は大きい。また、研究過程で開発した原形質連絡の透過性の上昇を検出する系も、簡便かつ応用性に富み高く評価できるものである。

MP の数、一次構造、発現様式はウィルス属により大きく異なる。申請者は、分類上異なるウィルスの細胞間移行を解析することが、ウィルス全般の細胞間移行の理解につながると考え、PVX の細胞間移行に関する解析を行った。PVX は細胞間移行に3種の MP (25K, 12K, 8K タンパク) と外被タンパク (CP) を必要とする。ToMV の場合と同様の相補実験により、PVX の 25K タンパク、12K タンパク、CP はウィルスの移行とともに細胞間を移行すること、8K タンパクは発現した細胞内でのみ機能し移行しないこと、8K タンパクの機能は12K タンパクの機能の補助であることを明らかにした。さらに、上記4種のタンパクの中で、原形質連絡の透過性を上昇させる能力を持つのが、12K タンパクであることを示した。申請者は、これらの知見に基づき、従来の考えを覆す新たな移行のモデルを提唱している。これは細胞間移行を厳密に検知する系の開発によって初めて可能になったことである。

異種ウイルス間での細胞間移行の相補に関する情報を集め、移行機能の共通性と特異性を調べることは、植物ウイルスの細胞間移行のメカニズムを知る上で重要な手がかりを与える。申請者は ToMV と PVX の DNA 感染系を用いて、両ウイルス属の移行機能は互いに相補不能であることを明らかにした。さらに、別のウイルス属に分類される CMV の移行機能についても解析し、ToMV と PVX の移行における相違を明確にした。CMV のコードする移行機能発現の分子機構については今後の研究課題を提示するにとどまっているが、得られた結果は DNA 感染系を用いた相補実験の有用性を明確に示している。

このように本申請論文は独自性の高い内容をもつ優れた論文であり、博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成13年1月17日主論文に報告されている業績を中心にして関連研究分野について口頭試問した結果、十分優れた学識を有することを確認し、合格と認めた。