

博士学位申請論文

植物ウイルスの細胞間移行に関する分子生物学的研究

玉井 淳史

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) と呼ばれるタンパクをコードしている。

一本鎖 RNA ウイルスである Tobacco mosaic virus (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。また、TMV の MP は RNA と結合し、細胞内では微小管に局在することが報告されている。これらの知見に基づき、MP は TMV ゲノム RNA と結合し、細胞骨格を利用して隣接細胞へウイルスを輸送するというモデルが提唱されている。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、それをモデルの根拠とすることについて疑義が生じている。

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。そこで、本研究ではまず TMV と同属のウイルスである Tomato mosaic virus (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した場合、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 trans-complementation 実験により、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 融合タンパクを用いた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が、ウイルス感染により大きく促進されることが分かった。このことから、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が示唆された。

さらに、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と考え、Potato virus X (PVX) の移行に必要な 4 種類のタンパクの挙動を解析した。PVX の DNA 感染系を用いた trans-complementation 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が明らかになった。さらに 12K タンパクが GFP の細胞間拡散を促進することを見いだした。これらの知見に基づき、PVX の細胞間移行の分子機構に関するモデルを提唱した。

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はずである。そこで、本研究では 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 Cucumber mosaic virus (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が分かった。しかし、C 末端欠損 3a タンパク単独の発現により ToMV の移行能欠損は相補されたが、PVX は相補されなかったことから、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。

略語表

ウイルス名

ToMV : Tomato mosaic virus

TMV : Tobacco mosaic virus

SHMV : Sunn hemp mosaic virus

CGMMV : Cucumber green mottle mosaic virus

PVX : Potato virus X

CMV : Cucumber mosaic virus

WCIMV : White clover mosaic virus

BSMV : Barley stripe mosaic virus

タンパク名

MP : Movement protein (移行タンパク)

CP : Coat protein (外被タンパク)

3a : CMV の MP (3a タンパク)

3a Δ C33 : C 末端 33 アミノ酸を欠失した CMV の 3a タンパク

erG3 : erG3GFP (ER 局在化シグナルを融合した G3GFP)

Nm : NmGFP (SV40 核移行シグナル-mGFP 融合タンパク)

G4NE : G4NEGFP (GAL4 DNA 結合ドメイン-SV40 核移行シグナル-EGFP 融合タンパク)

その他

TGB : Triple gene block

SEL : Size exclusion limit (排除分子量限界)

ER : Endoplasmic reticulum (小胞体)

PM : Plasma membrane (原形質膜、細胞膜)

目次

第1章		
序論	-----	1
図 (図1、図2)	-----	5
第2章	ToMV の細胞間移行の分子機構の解析	
序	-----	8
材料と方法	-----	12
結果	-----	19
考察	-----	27
図と表 (図3~13、表1~5)	-----	31
第3章	PVX の細胞間移行の分子機構の解析	
序	-----	48
材料と方法	-----	51
結果	-----	54
考察	-----	58
図と表 (図14~19、表6~8)	-----	63
第4章	異種ウイルス間での移行能欠損相補実験による細胞間移行の解析	
序	-----	73
材料と方法	-----	75
結果	-----	76
考察	-----	80
図と表 (図20~24、表6~11)	-----	83
第5章		
結論	-----	91
謝辞	-----	94
参考文献	-----	95

第1章 序論

植物ウイルスは植物に対する病原体の一種で、宿主植物にモザイク症状や壊死、萎縮症状など様々な病徴を引き起こす。植物ウイルスが宿主植物の全身に感染するまでには大きく分けて3つの過程がある。複製、細胞間移行、ある葉から別の葉への遠距離移行である。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タンパクをコードしている。このタンパクは移行タンパク (movement protein、MP) と呼ばれている。

ウイルス種によってMPの分子量やアミノ酸配列、発現様式は様々に異なる。Tobacco mosaic virus (TMV)に代表される Tobamovirus 属や Red clover necrotic mosaic virus (RCNMV)などの Dianthovirus 属のウイルスはそれぞれ分子量約30 kDa および35 kDaの単一のMPをコードする (Deom et al. 1987, Meshi et al. 1987, Lommel et al. 1988, Vaewhongs and Lommel 1995)。Brome mosaic virus (BMV)をはじめとする Bromovirus 属や Cucumber mosaic virus (CMV)などの Cucumovirus 属のウイルスも単一のMP (3a タンパク) を持つが、BMV や CMV の細胞間移行には3a タンパクだけでなく、外被タンパク (CP) も必要である (Shmitz and Rao 1996, Canto et al. 1997)。また、植物ウイルスの中には複数のMPを持つものも存在する。Potato virus X (PVX) に代表される Potexvirus 属をはじめ、Carlavirus 属、Hordeivirus 属、Benyvirus 属、Pecluvirus 属等のウイルスのMPは互いにオーバーラップした3つのORF (triple gene block、TGB) にコードされている (Beck et al 1991, Gilmer et al 1992, Herzog et al. 1994, 1998, Petty et al. 1990)。

植物ウイルスの多くは植物体の細胞間に存在する原形質連絡 (plasmodesmata) を介して細胞間移行する。電子顕微鏡観察により、原形質連絡は細胞壁を貫通した細胞膜 (plasma membrane, PM) の中を desmotubule と呼ばれる小胞体膜 (endoplasmic reticulum, ER) の一部が貫通した構造になっていることが分かっている (図1、Ding et al. 1992, Overall et al. 1982, Tilney et al. 1991)。植物体では様々な分子が原形質連絡のPMとERの間隙 (cytoplasmic annulus) を通過して細胞間を移動する。拡散によって原形質連絡を通り抜けられる分子の大きさ、すなわち排除分子量限界 (size exclusion limit、SEL) は組織によって異なる。様々な分子量の蛍光標識した分子をマイクロインジェクションする実験により、原形質連絡のSELは、葉肉細胞間では1 kDa (Goodwin 1983, Lucas

1995a,b, Wolf et al. 1989)、篩部細胞とその伴細胞の間では 3 kDa (Kempers et al. 1993)、葉の trichome の細胞間では 7 kDa (Waigmann et al. 1995) であることが報告されている。しかし、一方でトウモロコシから単離された *KNOTTED1* をはじめ、キンギョソウの *DEFICIENCE* や *GLOBOSA*、シロイヌナズナの *PISTILLATA* 等、植物の内在性のタンパクやその mRNA 等、数 kDa をはるかに越える巨大分子が細胞間を移行している可能性が示唆されている (Jackson et al. 1994, Lucas et al. 1995b, Carpenter et al. 1995, Hantke et al. 1995, Perbal et al. 1996, Bouhidel et al. 1996)。また、茎頂に近い若い組織では、パーティクルボンバードメントにより一過的に発現させた緑色蛍光タンパク (green fluorescent protein, GFP、分子量約 26 kDa) が細胞間を拡散することが報告されている (Oparka et al. 1999)。これらの結果は、原形質連絡の SEL の値が、ある種のタンパクの発現によって上昇したり、発生過程に応じて変化したりすることを意味する。

蛍光標識した 10~20 kDa のデキストランを TMV や RCNMV 等のリコンビナント MP と共にマイクロインジェクションすると、デキストランが細胞間を拡散することが報告されている (Waigmann et al. 1994, Fujiwara et al. 1993)。また、TMV や CMV、White clover mosaic virus (Potexvirus の一種) の MP を発現するトランスジェニックタバコの葉において、約 10 kDa のデキストランが細胞間を拡散することが報告されている (Wolf et al. 1991, Vaquero et al. 1994, Lough et al. 1998)。これらの実験から、MP は原形質連絡の SEL を上昇させる機能を持っていると考えられている。また、TMV や CMV、PVX の MP 自身が細胞間移行することを示唆する結果も報告されており (Crawford and Zambryski 2000, Yang et al. 2000, Itaya et al. 1997)、SEL を上昇させる機能とタンパク自身の細胞間移行は多くの MP に共通する特徴であると考えられるようになった。しかし、SEL を上昇させる MP の活性や MP 自身の細胞間移行に関しては、互いに矛盾するような報告もある (後述)。また、マイクロインジェクションを用いた実験の結果は MP の本来の機能を反映していないことを示唆する結果も報告されている (後述)。したがって、これらの MP の性質は再度調べ直す必要があると考えられる。

MP 遺伝子を欠損するウイルスは細胞間移行できないが、MP を発現するトランスジェニック植物に接種すると細胞間移行する (Holt and Beachy 1991, Vaewhongs and Lommel

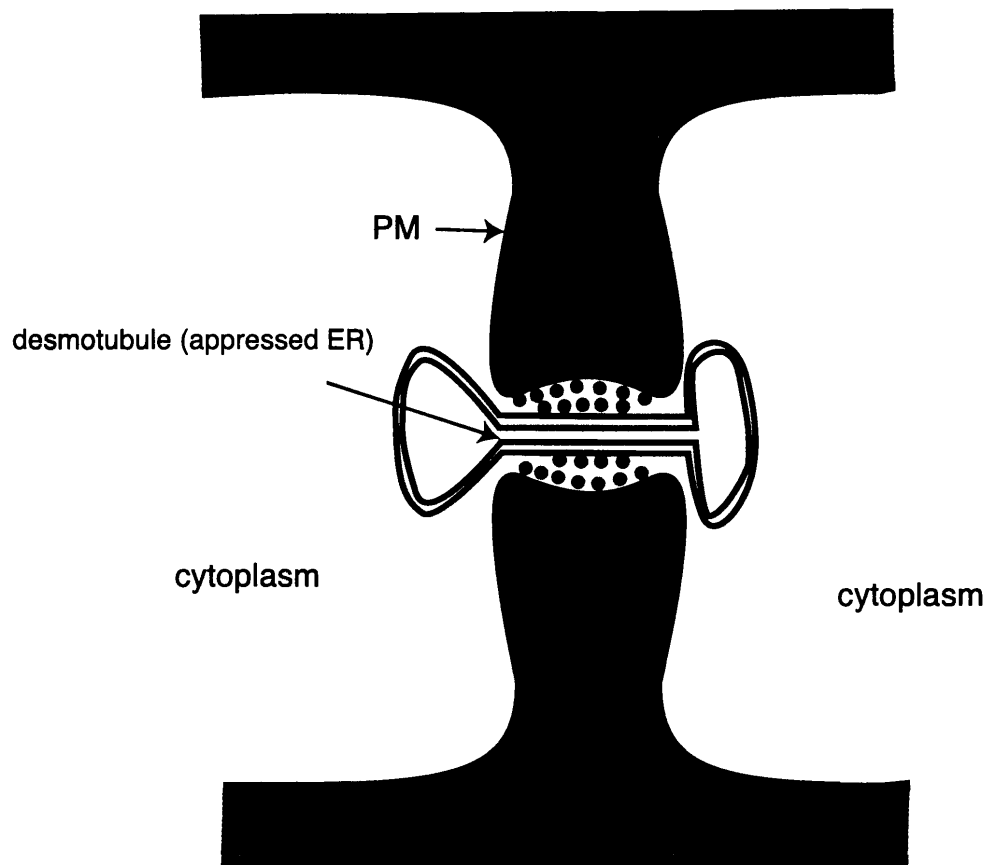
1995, Kaplan et al. 1995)。すなわち植物ウイルスの MP は、外部から供給することによっても機能する。また、MP 遺伝子を欠損したウイルスや、ある植物においては移行できないウイルス（これを dependent virus と呼ぶ）が、異種ウイルス（helper virus と呼ぶ）との同時接種あるいは異種ウイルスの MP を発現するトランスジェニック植物への接種によって移行するという例が知られている（Atabekov et al. 1999, Cooper et al. 1996, Giesman-Cookmeyer et al. 1995)。また、MP 遺伝子を他のウイルスの MP と入れ替えた組み換えウイルスが細胞間移行するという例も報告されている（Solovyev et al. 1996, 1997, Giesman-Cookmeyer et al. 1995)。

これらの現象は、異種ウイルス間で細胞間移行のメカニズムに共通した部分が存在することを意味する。このような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ことになると考えられる。しかしながら複数ウイルスの同時接種による解析では、dependent virus の移行能欠損が helper virus の MP 以外のコンポーネントによって相補される可能性を排除することができない。また、helper virus の感染によって gene silencing 等の植物の抵抗性が打破された結果 dependent virus の細胞間移行が起こっている可能性も否定できない。トランスジェニック植物や組み換えウイルスを用いた解析は手間と時間がかかることや、感染性を持った組み換えウイルスを作成することが困難な場合があることから、一度に多くのデータを集めることが難しい。さらに、これまでの解析では、ウイルスが細胞間移行したかどうかは主に病徴の発現またはウイルス RNA やコートタンパクの感染植物における蓄積によって検出していたため、ウイルスが全く移行しないのか、それともごくわずかに（数細胞に）拡がるのか区別されていなかった。

植物ウイルスの細胞間移行のメカニズムを知るためには植物細胞における MP の挙動を知ることが不可欠である。しかしマイクロインジェクションのように細胞の生理状態を乱す可能性の高い方法や、大腸菌に発現させた組み換えタンパクを用いた解析は、そのタンパク本来の生化学的な活性を反映しない結果を生じる可能性がある。したがって何か別の方法を用いて MP の挙動を解析する必要がある。

葉のある1細胞でMPを発現させることが細胞間移行を含めたMPの挙動を調べるための有効な手段である。パーティクルボンバードメントによる遺伝子導入はこのように目的に最適の実験法である。しかし、ウイルス感染細胞におけるMPの挙動を調べるには、遺伝子が導入された細胞(MPを一過的に発現させた細胞)に同時にウイルスを感染させなければならない。しかしRNAウイルスを研究対象にする場合、そのような実験をすることは難しい。そこで、RNAウイルスをDNAによって感染させる系が有用なツールとなる。MorozovらはMP遺伝子を欠損したPVXの感染性プラスミドと、MPを発現するプラスミドを共にパーティクルガンで植物の葉の細胞に導入することにより、PVXの移行能欠損が相補されることを報告した(trans-complementation実験、Morozov et al. 1997)。この実験系は、ある1細胞にウイルスとは独立にMPを発現させ、かつその細胞にウイルスを感染させた状態でMPの挙動を解析することを可能にする。また、この実験系は、異種ウイルス間での細胞間移行相補実験にも応用できる。DNA感染系があれば目的とするタンパクを一過的に発現するプラスミドを構築するだけで相補実験が行えるため、短期間で多くのデータを集めることが可能である。また、レポーター遺伝子を組み込んだウイルスのDNA感染系を作成することにより、ウイルスの移行を1細胞のレベルで検出することもできる。

本研究で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、Tomato mosaic tobamovirus (ToMV) と PVX の DNA 感染系を利用した trans-complementation の実験系を用い、ウイルス感染細胞におけるそれぞれのMPの挙動を解析した(図2)。また、CMVの3aタンパクとCPも併せて用い、異種ウイルス間での移行能欠損相補実験を行い、植物ウイルスの細胞間移行のメカニズムについて考察した。



● : plasmodesmal proteins

PM : plasma membrane

CW : cell wall

図1 原形質連絡の構造

電子顕微鏡観察により推定されている原形質連絡の構造を模式的に示す。細胞壁を貫通する孔の中にER膜の一部 (desmotubule) が入り込んでいる。また、原形質連絡内部の細胞膜及びER膜にはタンパクが存在すると考えられている。

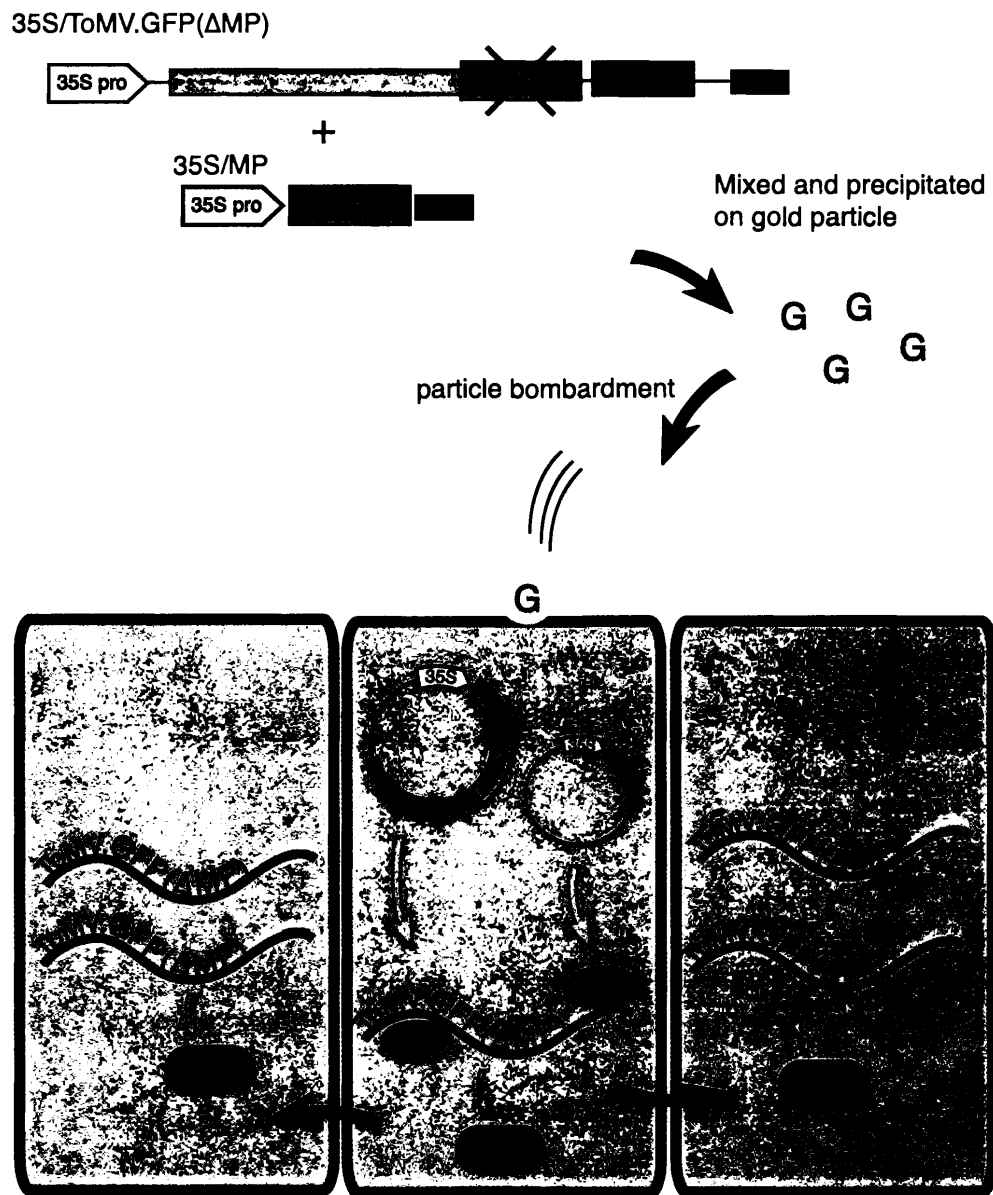


図2 Trans-complementation実験

Trans-complementation実験の方法を模式的に示す。この図ではToMVの場合を例にとって説明する。感染に伴ってGFPを発現するように改変し、さらにMP遺伝子を破壊した組み換えToMVのcDNAをCaMV35Sプロモーターの下流に連結したプラスミド（感染性プラスミド）を構築する。一方MP遺伝子をCaMV35Sプロモーターにより植物細胞内で一過的に発現するプラスミドを構築し、この2種類のプラスミドを混合して金粒子にコーティングし、パーティクルボンバードメントにより葉の細胞に導入する。感染性プラスミドからはToMVゲノムRNAが転写され、ウイルスが増殖する。また、もう一方のプラスミドからMPが一過的に発現し、ToMVの移行能欠損が相補される。感染細胞はToMV複製に伴って発現するGFPの蛍光によって同定する。

第2章 ToMV の細胞間移行の分子機構の解析

序

TMV は、最も古くから研究されてきた植物ウイルスであり Tobamovirus と呼ばれるグループのタイプウイルスである。TMV のゲノムは約 6.4 kb の一本鎖 RNA であり、粒子はゲノム RNA を中心に外被タンパクがらせん状に集合した 300 nm×18 nm の円筒形である。TMV は植物体の表面に出来た小さな傷から細胞内に侵入し、細胞質内で増殖し、細胞間移行して感染域を拡げていく。やがてウイルスは篩部組織に到達し、同化あるいは代謝産物と共に遠距離移行し、全身感染に至る。

TMV のゲノム RNA はプラス鎖 (mRNA として機能する) であり、およそ 126 kDa、183 kDa、30 kDa、17 kDa の 4 種類のタンパクをコードする (図 3)。126 kDa タンパクと 183 kDa タンパクはウイルスの複製を行う RNA 複製酵素である。183 kDa タンパクは 126 kDa タンパクの終止コドンにチロシンが入ることによってさらに翻訳が続けられ生成する。TMV が細胞に感染すると、これらの RNA 複製酵素が RNA ゲノムのマイナス鎖を合成し、そこから再びプラス鎖が合成される。それと同時に 2 種類の短いサブゲノムが合成され、これを mRNA として 30 kDa タンパクと 17 kDa タンパクが翻訳される (Hunter et al. 1976, Guilley et al. 1979, Watanabe et al. 1984)。このうち 17 kDa タンパクが外被タンパク (coat protein, CP) である。CP はウイルスが篩部を通過して遠距離移行する際に必要である。30 kDa のタンパクに関しては、このタンパクをコードする遺伝子に変異を持つウイルスが感染細胞内で増殖はするものの周囲の細胞に拡がる事が出来ないことや (Ohno et al. 1983)、人工的に 30 kDa タンパクの遺伝子に変異を導入したウイルスが細胞間移行が出来なくなる事 (Meshi et al. 1987)、また 30 kDa タンパクを発現するトランスジェニックタバコでは 30 kDa タンパク遺伝子に温度感受性変異を持つ ToMV が非許容温度下でも細胞間移行しうる事から (Deom et al. 1987)、TMV の細胞間移行に必須である事が証明された。この事実により、この 30 kDa タンパクは移行タンパク movement protein (MP) と呼ばれるようになった。このように TMV では複製、細胞間移行、遠距離移行という 3 つの過程に必要な機能がそれぞれ別のタンパクにコードされているため、これらの過程はそれぞれ独立に解析されてきた。

抗体を用いた局在解析により、TMV の MP はタバコ感染葉において原形質連絡に

局在することが示されている (Tomenius et al. 1987)。また、MP を発現するトランスジェニックタバコにおいても MP の原形質連絡への局在が観察されている (Ding et al. 1992)。これらの観察結果から、MP は原形質連絡に何らかの影響を及ぼすと考えられた。

葉肉細胞では、拡散によって細胞間を移行する分子の分子量は約 1 kDa までである (Goodwin 1983, Lucas 1995a, b, Wolf et al. 1989)。一方、TMV の MP を発現するトランスジェニック植物にマイクロインジェクションした場合、分子量約 10 kDa のデキストランが細胞間を拡散する (Wolf et al 1991)。また、大腸菌で発現させた TMV の MP と共に注入すると分子量 10~20 kDa のデキストランの拡散が観察されることが報告されている (Waigmann et al. 1994)。その際デキストランは注入細胞から 2 細胞以上離れたところまで拡がったことから、MP 自身も細胞間移行することが示唆された。このことから、TMV の MP は原形質連絡の SEL を増大させる機能を持っており、さらに MP 自身も細胞間移行すると考えられた。

その一方で、互いに矛盾するような知見も報告されている。葉肉細胞では TMV の MP によってデキストランの細胞間移行が促進され、MP 自身も細胞間移行することが示唆された (Waigmann et al. 1994)。ところが trichome の細胞では β -glucuronidase を融合した MP の細胞間移行が観察されたにも関わらず、MP との同時注入によってデキストランの拡散は促進されないことが報告されている (Waigmann et al. 1995)。また、TMV の MP を発現するトランスジェニックタバコでは、圧力をかけてデキストランを注入する方法 (pressure injection method) を用いた場合は、10 kDa のデキストランの細胞間拡散が観察されるが (Waigmann et al. 1995, Storms et al. 1998)、電場をかけて注入する方法 (iontophoresis method) を用いた場合は観察されない。このことからマイクロインジェクションによって得られる実験結果は MP 本来の機能を反映していない可能性が考えられた (Storms et al. 1998)。

葉の細胞に MP-GFP 融合タンパクを発現する組み換え TMV を感染させると、TMV が移行していく様子が GFP の蛍光により観察される。この時、感染部位の最先端及び感染部位中央すなわち感染初期及び後期の細胞において MP-GFP 融合タンパクが原形

質連絡に局在する様子が観察されている (Padgett et al. 1996)。さらに、TMV 感染部位の最先端の細胞よりも先の非感染細胞には MP-GFP 融合タンパクの蛍光は観察されず、MP 自身は TMV 感染に先行して移行していないことが示唆された (Oparka et al. 1997)。この結果は感染細胞と非感染細胞という相違点はあるが、MP 自身が細胞間移行するという知見と矛盾するものである。

TMV 感染中期の細胞では MP-GFP 融合タンパクは細胞骨格との相互作用の結果と思われるフィラメント状の局在や、不定形の塊状の局在を示す (Padgett et al. 1996, Heinlein et al. 1998、図 3)。不定形の塊状の凝集体は ER に関係した構造体であると考えられている (Heinlein et al. 1998, Reichel and Beachy 1998)。フィラメント状の局在や、不定形の塊状の局在は TMV 感染プロトプラストにおいても観察されている (Heinlein et al. 1995, 1998, Kawakami and Watanabe 1997、図 4)。また TMV の MP は一本鎖 RNA と配列非特異的に結合することが *in vitro* の系で示されている (Citovsky et al. 1990, 1992)。

これらの知見から、MP がゲノム RNA と複合体 (viral ribonucleoprotein complex、vRNP) を構成し、vRNP が細胞骨格に沿って原形質連絡まで運搬され、MP の活性により広げられた原形質連絡の内部を通過してウイルスは隣接細胞に移行していくというモデルが提唱されている。しかし、MP-GFP 融合タンパクの局在は必ずしもこのモデルで推測されているような TMV の細胞間移行の分子機構を反映していないと考えられる(後述)。

本研究では、TMV の細胞間移行の分子機構を解明するため、これまで矛盾した結果が報告されている MP 自身の細胞間移行の解析を行った。また、MP の細胞内局在の解析も併せて行った。その際、ウイルスの移行が活発に行われている状況下で MP の挙動を解析し、またウイルス非存在下での MP の挙動と比較することが必要であると考えられた。trans-complementation の実験系はこのような目的には最適な手段である (第 1 章参照)。しかし、これまでウイルスの細胞間移行を容易に検出できるような TMV の DNA 感染系は報告されていなかった。そこで本研究では、まず Tobamovirus 属のウイルスである Tomato mosaic virus (ToMV) を用い、レポーター遺伝子を発現する ToMV の DNA 感染系を構築した。この系を用いて trans-complementation 実験を行い、ウイル

ス感染部位での MP の挙動を解析した。その結果、ToMV 感染細胞において MP は主に原形質連絡に局在し、細胞間移行することが分かった。一方、非感染細胞では、MP は主に不定形の塊状の局在及びフィラメント状の局在を示し、原形質連絡への局在や隣接細胞への移行は極めて低い頻度でしか観察されなかった。これらのことから、ToMV の細胞間移行と複製の間には何らかの相互作用があることが示唆された。また、本章では MP 遺伝子を GFP 遺伝子と共にパーティクルボンバードメントにより導入すると、GFP の細胞間移行が促進されることを見いだした。これにより原形質連絡の透過性を上昇させるという MP の活性を、マイクロインジェクションに代わる方法で確認することができた。

材料と方法

【ToMV の DNA 感染性プラスミドの構築】

piL.G3、piL.G3(SF3)

pBI221 (Clontech) をテンプレートとし、35Sfw 及び 35Srev プライマーを用いた PCR により CaMV35S プロモーターをコードする 0.8 kbp の DNA 断片を増幅した。この断片を *SacI* と *XbaI* で消化し、pBluescriptKS+の *SacI* 部位と *XbaI* 部位の間に挿入し、pb35S を作製した。次に ToMV ゲノム全長をコードする pTLW3 をテンプレートとし、TMV5fw 及び TMV5rev プライマーを用いた PCR により TMV ゲノム cDNA の 5'末端の 1.2 kbp をコードする DNA 断片を増幅し、*SnaI* と *SpeI* で消化した後、pb35S の *AatI* 部位と *SpeI* 部位の間に挿入して p35TMV5 を作製した。pTLW3 を *NcoI* と *SmaI* で消化した TMV ゲノム cDNA の 3'末端の 0.9 kbp を含む DNA 断片を pBI221 の *NcoI* 部位と *SacI* 部位の間に挿入し (*SacI* 末端は Klenow fragment 処理により平滑化した)、pTMV3n を得た。次に pTMV3n を *SpeI* と *EaeI* で消化した断片 (*EaeI* 末端は平滑化) を p35TMV5 の *SpeI* 部位と *KpnI* 部位 (*KpnI* 末端は平滑化) に挿入し、pLΔn を作製した。pLΔn の *SpeI* 部位に pTLW3 を *SpeI* 消化して得られる TMV ゲノム cDNA の中央部分をコードする DNA 断片を挿入し、piLW3 を得た。pTLQG3::fus (東京大学、渡辺雄一郎博士より分与、Kawakami and Watanabe 1997) を *KpnI* と *BstEII* で消化した約 2 kbp の断片を pBluescriptKS+の *KpnI* 部位と平滑化した *SacI* 部位の間に挿入し、pLQΔKB を作製した。次に pTLW3 をテンプレートとし、LF 及び ΔCX プライマーを用いた PCR により増幅した断片を *NcoI* と *BstEII* で消化し、pLQΔKB の *NcoI* 部位と *BstEII* 部位の間に挿入し、pLACXKB を得た。pLACXKB の *SmaI* 部位と *BstEII* 部位の間に pTLQG3::fus を *SacI* と *BstEII* で消化して (*SacI* 末端は平滑化) 得られる G3GFP をコードする断片を挿入して pLACG3KB を得た。pLACG3KB を *KpnI* と *BstEII* で消化した MP 及び G3GFP 遺伝子を含む DNA 断片を piLW3 の *KpnI* 部位と *BstEII* 部位の間に挿入し、piL.G3 を得た。

また、piL.G3 の *KpnI* から *AatII* までの MP 遺伝子を含む部分を pLQSF3 (Meshi et al. 1987) の *KpnI*-*AatII* 断片と入れ替えて piL.G3(SF3)を得た。

piL.erG3、piL.erG3(SF3)

pLACXKB の *KpnI* から *SacI* までの MP 遺伝子を含む部分を pt5L18 (ToMV ゲノム cDNA の *KpnI* 部位から MP 遺伝子の 3'末端までをコードする) の *KpnI-SacI* 断片と入れ替えて pt5LSB を得た。次に pt5LSB の平滑化した *SacI* 部位に、pBlerG3 (後述) から erG3GFP をコードする断片を *BamHI-SacI* 消化により切り出し、末端を平滑化して挿入し、pLACerG3 を得た。pLACerG3 を *BstEII* で消化し、末端を平滑化した後 *KpnI* 消化して得られる MP 及び erG3GFP 遺伝子を含む断片と piL.G3 を *SpeI-MluI* 消化し、*SpeI* 末端を平滑化した TMV ゲノム cDNA の 3'末端をコードする断片を piL.G3 を *KpnI* 部位と *MluI* 部位の間に挿入して piL.erG3 を得た。

また、piL.erG3 の MP 遺伝子を含む *KpnI-AatII* 断片を pLQSF3 の *KpnI-AatII* 断片と入れ替えて piL.erG3(SF3)を得た。

piL.Nm(SF3)

pGBT9 (clontech) の *EcoRI-SacI* 部位に pBImGFP5ER (後述) から *EcoRI-SacI* 消化により切り出した mGFP5 遺伝子を挿入し、得られたプラスミドの *EcoRI* 部位に SV40T 抗原の Nuclear localization signal (NLS) をコードするオリゴヌクレオチドを挿入して pGNmGFP を得た。pGNmGFP から NLS-mGFP (NmGFP) 遺伝子を *HpaI-SacI* 消化により切り出し (*HpaI* 末端を平滑化)、pLACXKB の *XmaI* 部位と *SacI* 部位の間に (*XmaI* 末端を平滑化) 挿入し、pLACNm を得た。pLACNm を *KpnI* と *BstEII* で消化して得られる MP 及び NmGFP 遺伝子を含む断片を piL.erG3 の *KpnI* 部位と *BstEII* 部位の間に挿入して piL.Nm を得た。

さらに piL.Nm の MP 遺伝子を含む *KpnI* 部位から *AatII* 部位までの部分を pLQSF3 の *KpnI-AatII* 断片と入れ替えて piL.Nm(SF3)を得た。

piL.G4NE

pEGFPiRESneo (clontech) を *NcoI-NotI* 消化し、末端を平滑化した後、pLACNm の平滑末端化した *EcoRI* 部位と *SacI* 部位の間に挿入し、pLACNE を得た。次に、pGNmGFP

をテンプレートとし、G4DBN 及び GFP N-link プライマーを用いた PCR により GAL4DNA binding domain と NLS をコードする DNA 断片を増幅した。この断片を *KpnI-EcoRI* 消化し、pLACNE の *KpnI* 部位と *EcoRI* 部位の間に挿入し、pKSG4NE を得た。pKSG4NE から G4NEGFP をコードする DNA 断片を *SmaI-BstEII* 消化により切り出し (*SmaI* 末端は平滑化)、pLACXKB の平滑末端化した *SmaI* 部位と *BstEII* 部位の間に挿入し、pLACG4NE を得た。pLACG4NE を *BstEII* 消化後、末端を平滑化し、*KpnI* 消化して得られる約 2.5 kbp の DNA 断片と、piL.G3 を *SacI-KpnI* 消化して得られる 35S プロモーター及び TMV ゲノムの 5'末端から 4390 塩基をコードする断片、piL.G3 を *SpeI* 消化後、末端を平滑化し *SacI* 消化して得られる断片を連結し、piL.G4NE を得た。

プライマーの配列を以下に示す。プラスミド構築のために利用した制限酵素の認識配列を枠で囲む。

35S-5'	5' - TGC	GAGCTC	GTCCCCAGATTAGCCTTTTCA -3'
35S-3'	5' - GTC	TCTAGAGGCCT	CTCCAAATGAAATGAACT -3'
TMV5f	5' - GCGAAGCT	TACGTA	TTTTTACAACAATTACCAA -3'
TMV5r	5' - TTGCGTGTTCTTTT	ACTAGT	CTCGAGAGAT -3'
LF	5' - GTT	GAGCTCGAG	ATGGCTCTAGTTGTTAAA -3'
ΔCX	5' - CACG	GTTACCGAGCTCCCGGG	ATTGAGTAAGACATAT -3'
NLS-1	5' - AATTGCCTCCA	AAAAAAGAAGAGAAAGGTCG	-3'
NLS-2	5' - AATTCGACCTTTCTCTTCTTTTTTGGAGGC		-3'
G4DBN	5' - TT	GGTACCCGGG	ATGAAGCTACTGTCTTC -3'
GFP N-link	5' - CCATTAACATCACCATCTA		-3'

【GFP variant の一過性発現プラスミドの構築】

pBlmGFP5ER、pBIG3、pBIerG3、pBINm、pBIG4NE

pBIN m-gfp5-ER (Hasloff et al. 1997, 1998) の約 0.7 kbp の *BamHI-SacI* 断片 (GFP を

コードする) を pBI221 の *Bam*HI 部位と *Sac*I 部位の間に挿入し、pBI_mGFP5ER を作製した。

pTLQG3::*fus* を *Sac*I-*Nsp*V 消化し、末端平滑化して得られる約 0.6 kbp のフラグメントを pBI_mGFP5ER の平滑末端化した *Bam*HI 部位と *Sac*I 部位の間に挿入し、pBIG3 を得た。

pBI_mGFP5ER を *Nco*I 消化して得られる約 0.7 kbp の DNA 断片を pBIG3 を *Nco*I 消化して得られる約 3.9 kbp の断片とライゲーションして pBI_{er}G3 を得た。

pLACNm (上述) を *Aat*II 消化後末端を平滑化し、*Sac*I 消化して得られる NmGFP をコードする DNA 断片を pBI221 の平滑末端化した *Bam*HI 部位と *Sac*I 部位の間に挿入し、pBINm を得た。

pKSG4NE (上述) を *Sma*I-*Sac*I 消化して得られる G4NEGFP をコードする DNA 断片を pBI221 の平滑末端化した *Bam*HI 部位と *Sac*I 部位の間に挿入し、pBIG4NE を得た。

【MP 及び KN1 の一過性発現プラスミドの構築】

p35LM、p35OMM

pTLW3 をテンプレートとし、LF、 Δ CX の両プライマーを用いた PCR によって ToMV の MP をコードする DNA 断片を増幅した。その後 *Xho*I 消化し、末端を平滑化した後 *Sac*I で消化した断片を、pBI221 の平滑末端化した *Bam*HI 部位と *Sac*I 部位の間に挿入し、p35LM 作製した。また、TMV (OM 系統) の MP の配列を含む OM5H2 (Meshi et al. 1982a, Takamatsu et al. 1983) をテンプレートとし、LF、OM30rev の両プライマーを用いた PCR によって TMV の MP をコードする断片を増幅し、*Xho*I-*Sac*I 消化し、p35LM の *Xho*I-*Sac*I 断片 (ToMV の MP をコードする) と入れ替え、p35OMM を得た。

p35LME

pTLW3 をテンプレートとし、LF、LR の両プライマーを用いた PCR によって ToMV の MP をコードする DNA 断片を増幅した。この断片を *Sac*I-*Hind*III 消化し、同様に消化した pBluescriptKS+ に挿入し、pLM を得た。pEGFP_{IRES}neo (Clontech) より *Eco*RI-*Not*I

消化 (*NotI* 末端は平滑化した) で切り出した EGFP 遺伝子を含む断片を、pbLM の *EcoRI* 部位と平滑末端化した *HindIII* 部位の間に挿入し、pbLME を得た。pbLME を *SacI-SalI* 消化後末端を平滑化して得られる MP-EGFP をコードする断片を、pBI221 を *XbaI* 部位と *SacI* 部位 (両末端は平滑化した) の間に挿入し、p35LME を得た。

p35CgM、p35CcM、p35ObM、p35WM

pCGI13 (Yamanaka et al. 1998) をテンプレートとし、CgF2 及び CgR2 プライマーを用いて PCR によって増幅した DNA 断片を *EcoRI/SalI* 消化した約 600 塩基対の断片 (Cg-TMV の MP の N 末端から Arg206 までをコードする) を pBluescriptKS+ の *EcoRI/SalI* 部位に挿入し、pbCgM1 を作製した。さらに pCGO (Yamanaka et al. 1998) をテンプレートとし、CgF3 及び CgR2 プライマーを用いて PCR によって増幅した DNA 断片を *NspV/SalI* 消化して得られた約 300 塩基対の断片 (Cg-TMV の MP の Glu186 から C 末端までをコードする) を pbCgM1 上の *NspV/SalI* 部位に挿入し、pbCgM を得た。pbCgM を *EcoRI-SalI* 消化して得られる Cg-TMV の MP の全長をコードする断片の末端を平滑化し、pBI221 の平滑末端化した *XbaI* 部位と *SacI* 部位の間に挿入し、p35CgM を得た。

p35CcM、p35ObM、p35WM はそれぞれ pCc6D4 (Meshi et al. 1982b, c)、pOb Δ CG3 (Heinlein et al. 1995)、pCG9F2 (Meshi et al. 1983, Saito et al. 1988) をテンプレートとし、SHMV30fw 及び SHMV30rev プライマー、Ob30fw 及び Ob30rev プライマー、CGMMV30fw 及び CGMMV30rev プライマーを用いた PCR により、それぞれ SHMV、Ob-TMV、CGMMV の MP をコードする DNA 断片を増幅し、*XbaI-SacI* 消化した後、pBI221 の *XbaI* 部位と *SacI* 部位の間に挿入して作製した。

プライマーの配列を以下に示す。プラスミド構築のために利用した制限酵素の認識配列を枠で囲む。また、塩基置換変異を導入した部位を二重下線で示す。

CgF2 5' - TGAG GAATTC CATATGTCTTACGAGCCTAAAGTGAG -3'

CgR2 5' - TTC TGTCGAC TTCTGAAAGTGTC AACCGCCTTG -3'

CgF3 5' - CCGAATGTCGAAGGT**TTTCGAA**GGCGTG -3'
 CgR3 5' - GAC**GTCGAC**TGGTT**AAGCTT**CGCTGTG -3'
 LR 5' - GAC**AAGCTT**AATACGAATCA**GAATT**C**GCGACC** -3'
 OM30rev 5' - AAG**GAGCTC**TTAAAACGAATCCGATTCGG -3'
 CGMMV30fw 5' - TTT**TCTAGA**ATGTCTCTAAGTAAGGTATC -3'
 CGMMV30rev 5' - TAA**GAGCTC**TAGGTGTGATCGGATTGTA -3'
 SHMV30fw 5' - TAT**TCTAGA**ATGTCTGAGGTGTCTAAAAT -3'
 SHMV30rev 5' - CAA**GAGCTC**TAGGAGTCGGAATCGAGTA -3'
 Ob30fw 5' - AAC**TCTAGA**ATGTCAAAGGCTATTGTCAA -3'
 Ob30rev 5' - AAG**GAGCTC**TTAAATAAACGAATCGGATG -3'

p35KN1

KN1 遺伝子をコードする pDJX1 (Lucas et al. 1995b) を *Nco*I 消化後 *Bam*HI 消化して得られる KN1 をコードする DNA 断片を pBluescriptKS+ の *Eco*RI 部位と *Bam*HI 部位の間に (*Eco*RI 末端は平滑化した) 挿入し、pKS.KN1 を得た。pKS.KN1 を *Eco*RI-*Bam*HI 消化し、末端を平滑化して得られる KN1 をコードする DNA 断片を pBI221 の平滑末端化した *Xba*I 部位と *Sac*I 部位の間に挿入して p35KN1 を得た。

【*N. benthamiana* の栽培】

培養土としてはスミリンコンパル (住友林業) を用い、播種後温室で育成させた。育成温度は 8 時~18 時の 10 時間は 26°C、18 時~8 時の 14 時間は 24°C とし、18 時~20 時の 2 時間補光ランプを点灯した。播種後約 2 週間で 4~5 枚の本葉が出た時点で新しい植木鉢に植え替え、さらに 2~3 週間温室で育成させ、長さ 8~10 cm になった本葉を実験に用いた。

【パーティクルガンによる遺伝子導入】

パーティクルガンは Bio-Rad 社製の PDS-1000 を用いた。金粒子懸濁液の調製は Bio-Rad 社の推奨する方法を用いた。プラスミド DNA の金粒子へのコーティングは以下のように行った。2.5 μg の DNA に対し 50%グリセロールに懸濁した 25 μl の金粒子を混合し、ボルテックスで攪拌しながら 25 μl の 2.5 M CaCl_2 及び 10 μl の 0.1 M スペルミジンを混合する。約 1 分攪拌した後、1~2 秒間遠心分離し、金粒子を沈殿させる。上清を除いた後 75%エタノールを 100 μl 加え、沈殿を乱さないようにすぐに除き、100%エタノールを 100 μl 加え、再び除く。100%エタノールによる洗浄をもう一度繰り返した後、金粒子の沈殿を 45 μl の 100%エタノールを加え、チューブを指で弾いて懸濁した。また、複数種類のプラスミドを同時に導入する場合は、等量ずつの DNA を金粒子懸濁液に加えた (2 種類同時導入する場合は 25 μl に対し 1.25 μg ずつ)。

エタノールに懸濁した金粒子を 12 μl ずつマクロキャリア上に滴下し、風乾し、遺伝子導入を行った。

撃ち込みの条件としてはラプチャーディスク-マクロキャリア-ストッピングスクリーン-試料台の距離をそれぞれ 17 mm, 17 mm, 55 mm とし、ラプチャーディスクは 1350 psi の破壊圧のものを用いた。ヘリウムのボンベ圧はラプチャーディスク破壊圧+200 psi とし、-20 in.Hg の陰圧下で撃ち込みを行った。遺伝子導入後の葉は MS 寒天培地の上で 26°C、暗所で一定時間静置した。

【蛍光顕微鏡観察】

顕微鏡は Karl Zeiss 社製の Axioskop、共焦点顕微鏡は同社の CLSM410 を用いた。蛍光顕微鏡による GFP の観察の際、青色光励起の場合は Karl Zeiss 社製の No.10 フィルターセットまたは Chroma 社製の 41014 フィルターセットを用い、UV 励起の場合、Chroma 社製の 31022 フィルターセットを用いた。また、画像のコンピューターへの取り込みには C5810 COLOR CHILLED 3CCD camera (Hamamatu Photonics) を用い、画像の処理には Adobe 社の Photoshop 5.0J を用いた。

結果

【ToMV の DNA 感染系と MP の一過的発現による細胞間移行能欠損の相補】

Tobamovirus の MP の感染細胞における挙動を解析するため、trans-complementation の実験系を構築することにした。それには Tobamovirus の DNA 感染系が必要となる。そこで、Tomato mosaic tobamovirus (ToMV) を材料に用い、そのゲノムの cDNA を Cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S RNA プロモーターの下流に連結し、パーティクルガン法を用いた遺伝子導入により、ToMV ゲノム RNA を植物細胞内で発現するプラスミドを構築した。

ToMV ゲノムの 5'末端から正確に転写されるようにするため、プロモーターの転写開始点に ToMV の cDNA の 5'末端が来るように連結した。3'末端は nopaline synthase 遺伝子のターミネーター配列に連結した。また、ToMV の CP 遺伝子はウイルスの複製及び細胞間移行には必要ではないため (Takamatsu et al. 1987)、GFP 遺伝子と入れ替え、ウイルス感染細胞を GFP の蛍光によって同定できるようにした。レポーターの GFP は、アミノ酸置換により野生型のものより強い蛍光を発する G3GFP と呼ばれるものを用いた (Kawakami and Watanabe 1997、表 1)。このようにして構築したプラスミドを piL.G3 と命名した (図 5A)。

piL.G3 を *Nicotiana benthamiana* の葉 (長さ 8~10 cm) にパーティクルガン法により導入した。図 6A は遺伝子導入 2 日後に蛍光顕微鏡により観察した像で、GFP の蛍光が複数細胞に拡がっている様子が分かる。一方、ToMV の複製酵素の遺伝子にフレームシフト変異を持つプラスミドを *N. benthamiana* の葉に導入した場合には、GFP の蛍光は観察されなかった (data not shown)。このことから GFP はプラスミド DNA から直接転写された RNA から発現しているのではなく、ウイルス複製に伴い合成されるサブゲノム RNA から翻訳されていることが確認された。これにより、piL.G3 の導入によってレポーター遺伝子を持つ ToMV を感染させられることが分かった。

次に piL.G3 の MP 遺伝子にフレームシフト変異を導入したプラスミド piL.G3(SF3) を構築し (図 5A)、*N. benthamiana* の葉の細胞に導入したところ、GFP の蛍光は一細胞にとどまっていた (図 6B)。導入した変異はすでに移行能欠損をもたらすことが分かっ

ている (Meshi et al. 1987)。そのほかにも MP の 76 番目から 234 番目までの 158 アミノ酸を欠失した変異体や、37 番目の Ser を Ala に置換したアミノ酸置換変異体 (Kawakami et al. 1999) を感染させた場合にも同様の結果が得られた (data not shown)。これにより、DNA 感染によっても MP に変異を持つ ToMV は細胞間移行できないことを再現できた。以後 piL で始まる名前を持つプラスミドに由来するウイルスを ToMV.G3(SF3)のように、ピリオドの後にレポーター遺伝子の名前、かっこ内に MP の変異を示して表記することにする。

piL.G3(SF3)と共に p35LM (ToMV の MP 遺伝子を 35S プロモーターの下流に連結したプラスミド：図 5B) を同時に導入すると、GFP の蛍光が複数細胞に拡がっている様子が観察された (図 6C)。これは ToMV.G3(SF3)の移行能欠損が一過的に発現した MP により相補された結果と考えられる。しかし、ウイルス感染の範囲を正確に同定するにはレポーターの GFP 自身が細胞間移行しないことが必要条件となる。そこで、まず MP が GFP を細胞間移行させている可能性について検討した。

【MP による GFP の細胞間移行の促進】

G3GFP を 35S プロモーターにより一過的に発現するプラスミド pBIG3 (図 5B) をほぼ完全に展開した *N. benthamiana* の葉に導入し、遺伝子導入 24 時間後に観察すると、ほとんどの遺伝子導入部位では G3GFP の蛍光は一細胞にとどまっていたが (図 7A)、数%の部位において、明るく光る 1 細胞の周囲に弱く蛍光を発する細胞がハローとして観察された (図 7B、表 2)。また、48 時間後では約 40 パーセントの部位でハローが見られた。このことは G3GFP 自身がわずかながら細胞間を拡散することを意味する。

pBIG3 を p35LM (ToMV の MP を発現する) と共に *N. benthamiana* の葉に導入すると、24 時間後には約 50 パーセントの遺伝子導入部位で GFP の細胞間の拡散が観察された (図 7C、表 2)。また、Tobacco mosaic virus (TMV)、Cg-TMV、Ob-TMV、Sunn hemp mosaic virus (SHMV)、Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV) など他の tobamovirus 属のウイルスの MP 遺伝子または Cucumovirus 属の Cucumber mosaic virus (CMV) の MP である 3a タンパク遺伝子を同時導入した場合も、遺伝子導入 24 時間後において GFP

発現部位の 40~60%で G3GFP の細胞間の拡散が観察された (図 7D-G)。また、トウモロコシ由来のタンパクで、原形質連絡の SEL を上昇させると考えられている KNOTTED1 (Lucas et al. 1995b) を同時に発現させた場合にも G3GFP の細胞間の拡散が促進された (図 7H、表 2)。なお、ネガティブコントロールとして、GAL4 DNA-binding domain と単純ヘルペスウイルスの転写活性化因子 VP16 の転写活性化領域の融合タンパクを発現するプラスミドと pBIG3 との同時導入を行ったが、GFP の拡散の頻度は有意に上昇しなかった (表 2)。したがって、GFP の細胞間拡散の促進は原形質連絡の透過性を高めるといふ MP または KNI の機能を反映したものと考えられる。

上述の結果より、MP の持つ SEL を上昇させる活性を GFP 遺伝子と MP 遺伝子の同時導入という別の方法を用いて検出することができることが分かった。しかし同時にこの結果は MP の存在下では GFP はウイルス感染細胞を正確に同定するためのレポーターとしては適切ではないということも意味する。そこで GFP にシグナルペプチドまたはタンパクを融合し、細胞内の何らかの器官に局在化させることにより、細胞間を移行しないものを作製することにした。

細胞間を拡散しないレポーターの候補として、ER に局在する GFP が考えられた。そこで G3GFP の N 末端に ER 移行シグナル及び C 末端に ER 保持シグナルを融合した erG3GFP 遺伝子を作製した。erG3GFP を一過的に発現するプラスミド (pBIerG3、図 5B) を葉の細胞に導入すると、erG3GFP の蛍光は ER に局在し、遺伝子導入後 24 時間、48 時間のいずれにおいても erG3GFP が拡散した像は認められなかった (図 7I)。2~3%の遺伝子導入部位では隣り合った 2 細胞で GFP の蛍光が観察されたが、それらは全て同等の強度の蛍光を発していたことから、これらの部位では隣り合った 2 細胞にプラスミドが同時に導入されたものと判断された (表 2)。次に pBIerG3 を p35LM と共に葉の細胞に導入したが、複数細胞で erG3GFP の蛍光が観察される割合は 4~5%で、pBIerG3 単独で導入した場合とほとんど変わらなかった。このことから、erG3GFP は MP の存在下でも細胞間移行しないことが示された。また、pBIerG3 と p35LM の同時導入では、ER の形状が変化する細胞も観察された (図 7J, K、表 2)。この結果は MP と ER が相互作用するという知見を支持するものであると考えられる (Reichel and Beachy 1998)。

次に、細胞内で核に局在するタイプの GFP が利用可能かどうか調べた。まず SV40 の nuclear localization signal (NLS) を融合した mGFP (NmGFP と名付ける) 及び GAL4 DNA-binding domain と NLS を融合した EGFP (G4NEGFP と名付ける) を一過的に発現するプラスミド pBINm 及び pBIG4NE を作製した (図 5B)。pBINm を単独で遺伝子導入した場合、GFP の蛍光はやや核に強く観察されたが、細胞質にも存在していた。これは NmGFP の分子量が核膜孔を拡散によって通過できる大きさであるためと考えられる。pBINm を p35LM と共に導入した場合、24 時間後で 27%、48 時間後で 57% の割合で NmGFP のハローが観察された (図 7N、表 2)。しかし、NmGFP の蛍光強度は弱く、特に UV 励起によって観察する場合、NmGFP を発現している細胞と、拡散した GFP によって光っている細胞の区別は容易であった (図 7N, O、表 2)。pBIG4NE を単独で導入した場合、蛍光は核に局在し、細胞間の拡散は 3~5% の遺伝子導入部位でしか見られなかった。また、ToMV の MP を共発現させた場合でもハローが観察される割合は 5~11% であった (図 7L, M、表 2)。

以上の結果から、細胞間を拡散しないレポーターとして erG3GFP と G4NEGFP が使用可能であることが分かった。また、若干の拡散は起こるが、NmGFP を使用した場合でも、遺伝子が導入された細胞とその周りの GFP が拡散した細胞を識別することは十分可能であると思われた。

【Trans-complementation 実験によって調べた MP の作用範囲】

erG3GFP をレポーターとして持つ ToMV の DNA 感染クローン piL.erG3 を作製し、*N. benthamiana* の葉に導入した。その結果、図 8A に示すように、ウイルス感染に伴い erG3GFP を発現する細胞の集団が観察され、ToMV.erG3 の複製と細胞間移行を erG3GFP の蛍光によって検出できることが分かった。MP 遺伝子にフレームシフト変異を導入したプラスミド piL.erG3(SF3) を導入した場合には、プラスミド由来のウイルス ToMV.erG3(SF3) は移行できず、ウイルス感染は 1 細胞にとどまっていた (図 8B)。また、piL.erG3(SF3) を p35LM と共に導入した場合にはウイルスの移行が相補され、複数細胞で erG3GFP の発現が見られた (図 9A、図 10A)。

G4NEGFP をレポーターとして持つ ToMV の DNA 感染クローン piL.G4NE を導入した場合には、野生型の MP 遺伝子を持っているにもかかわらず、ToMV.G4NE の細胞間移行が観察されなかった (図 8C)。piL.G4NE を p35LM と共に導入した場合には ToMV.G4NE の細胞間移行が観察された (data not shown)。したがって、ToMV.G4NE は MP を発現していないか、発現量が低下していると考えられた。そこで、以後の実験では主に erG3GFP を、また一部の試験では NmGFP をウイルス感染細胞を同定するためのレポーターとして用いた。

次に、移行能を欠損した ToMV が、1 細胞で一過的に別のプラスミドから発現した MP によって複数の細胞境界を越えて拡がることのできるかを明らかにすることにした。感染部位において遺伝子導入された細胞、すなわち最初に感染した細胞を同定するため、piL.erG3(SF3)と p35LM に加え、NmGFP を発現するプラスミド pBINm の 3 者を混合して葉の細胞に導入した。NmGFP は青色光でも紫外光でも励起することができるが (表 1)、ToMV 感染細胞が発現する erG3GFP は紫外光ではほとんど励起されないため、ウイルス感染部位を UV 照射下で観察すると遺伝子導入された細胞だけが蛍光を発する。この方法で、ToMV が最初に感染した細胞からどれだけ離れたところまで移行するか調べたところ、ウイルスの移行が観察された部位の約 90%において、ウイルスは細胞境界を 2 つ以上越えたところまで拡がっていることが分かった (図 9A, B、表 3)。この結果は 1 細胞で合成された MP がその細胞だけでなく、隣接した細胞においても機能したと解釈できる。遺伝子導入された細胞を同定するためのレポーターを ER に局在するタイプの mGFP5ER に変えても同様の結果が得られた (図 9C, D、表 3)。また、ウイルス複製のレポーターとして NmGFP を発現する感染性プラスミド piL.Nm(SF3)と p35LM、pBlerG3 という組み合わせで感染させた場合も結果は同様であった。ただしこの場合、遺伝子導入された細胞は、青色光照射下で強く光り、UV 照射下で弱くなる蛍光を指標に同定した (図 9E, F、表 3)。

【他種 Tobamovirus の MP による ToMV 移行能欠損相補実験】

MP を欠く ToMV が他の Tobamovirus の MP の機能によって移行できるかどうか調

べるため、TMV、Cg-TMV、Ob-TMV、SHMV、CGMMV の MP を一過的に発現するプラスミド（それぞれ p35OMM、p35CgM、p35ObM、p35CcM、p35WM、図 5B 参照）を構築し、それぞれ piL.erG3(SF3)と共に同時導入した。ToMV.erG3(SF3)の移行能欠損は、ここで用いたどのウイルスの MP 遺伝子によっても相補された（図 10A-F、表 4）。しかし CGMMV の MP との同時導入では、ToMV.erG3(SF3)の感染範囲は他の Tobamovirus の MP との同時導入の場合に比べて小さく、また ToMV.erG3(SF3)の移行能欠損が相補されない割合がやや高かった（図 10F、表 4）。このことから、*N. benthamiana* の葉における CGMMV の MP の活性は、他の Tobamovirus の MP に比べてやや劣ると考えられた。このことが *N. benthamiana* において CGMMV があまり増殖しない（接種葉においてのみ低いレベルで増殖が検出される）ことの原因なのかもしれない。また、Tobamovirus の MP と同様に原形質連絡の SEL を上昇させると考えられる CMV の MP である 3a タンパク（詳細は第 4 章参照）及び KN1 遺伝子を同時導入しても ToMV.erG3(SF3)の細胞間移行は観察されなかった（図 22A、表 4、表 10）。これらの結果より、ToMV.erG3(SF3)の移行能欠損は、程度の差は見られるものの、今回調べた全ての Tobamovirus の MP によって相補されることが分かった。また、単に原形質連絡の SEL の上昇によって ToMV.erG3(SF3)の RNA が移行するわけではないことが分かった。

【MP-GFP 融合タンパクの細胞内局在と細胞間移行】

ToMV の MP が、遺伝子導入された細胞に隣接した細胞においても機能しているという結果から、MP は少なくとも感染部位においては細胞間を移行すると考えられた。このことを直接証明するため、感染細胞及び非感染細胞における MP-GFP 融合タンパクの細胞間移行能及び細胞内局在性を調べることにした。

MP と EGFP (Clontech、表 1) の融合タンパクを一過的に発現するプラスミド p35LME（図 5B）を *N. benthamiana* の葉の細胞に導入すると、MP-EGFP 融合タンパクの不定形の塊状の局在及びフィラメント状の局在が観察された。（図 11A、図 12A）。しかし、GFP の蛍光を発している部位の約 80%では、MP-EGFP の蛍光が2細胞以上に分布する様子は観察されなかった。残り約 20%の部位では、細胞壁内部に小さなドット状の蛍光が

観察された。またこのドット状の蛍光は複数細胞の細胞壁にわたって観察された(図 11B、表 5)。細胞壁内部のドット状の蛍光は MP-EGFP が原形質連絡に局在した結果であると考えられる (Atkins et al. 1991)。また、MP-EGFP の原形質連絡への局在が観察される細胞では、不定形の塊状の凝集体の数は減少する傾向にあった。これらの観察結果から MP-EGFP 融合タンパクは細胞間を移行し得るが、その頻度は低いことが分かった。

ウイルス感染が MP-GFP 融合タンパクの局在パターンに及ぼす影響を調べるため、p35LME と共に piL.Nm(SF3)を導入した。ウイルス感染細胞は NmGFP を発現しているため、青色光、紫外光のどちらを照射しても蛍光を発し、核が強く光る。一方、MP-EGFP は青色光照射下でのみ蛍光を発する。したがって励起光の切り替えにより、両者を区別することができる。プラスミド導入 15 時間後には MP-EGFP の蛍光はすでに検出できたが、NmGFP の蛍光によるウイルス感染は確認できなかった (data not shown)。プラスミド導入 24 時間後ではウイルス感染及びウイルスの細胞間移行が観察された。このとき、MP-EGFP の蛍光は原形質連絡に局在し、また、遺伝子導入された細胞に隣接する細胞の細胞壁にも MP-EGFP の蛍光が観察された。細胞質内の不定形の凝集体は数、大きさ共に減少しているか、全く見られなかった (図 11C)。プラスミド導入 40 時間後にはウイルスの感染域はほぼ最大に達していた。この時間においても MP-EGFP は原形質連絡に局在し、MP-EGFP の蛍光が見られる感染部位のうち、約 90%の部位で MP-EGFP の複数細胞にわたる分布が観察された(図 11E、図 12B、表 5)。また、細胞質内に MP-EGFP の蛍光は観察されなかった。約 25%のウイルス感染部位では、ウイルスの細胞間移行が観察された (MP-EGFP が機能している) にもかかわらず、MP-EGFP の蛍光が観察されなかった (表 5)。

以上の結果から、MP-EGFP 融合タンパクの細胞内、細胞間の分布様式はウイルス感染部位と非感染部位では大きく異なることが分かった。

p35LME と piL.Nm(SF3)の同時導入において、MP-EGFP の蛍光だけが観察される細胞でもウイルスゲノム RNA は転写されていると考えられるが、このような部位で MP-EGFP の蛍光が複数細胞で観察される割合は p35LME のみを導入した場合と変わらなかった (表 5)。また 3'末端領域を欠いた ToMV ゲノムを発現する (すなわち複製酵素の

みを発現すると考えられる) プラスミド p35LRp を p35LME と共に細胞に導入しても MP-EGFP が細胞間移行する割合は上昇しなかった (表 5)。したがって、MP-EGFP の局在を変化させるには、ゲノム RNA や複製酵素の存在だけでなく、ToMV が複製のサイクルに入っていることが必要であると考えられる。

考察

【MP の細胞間移行】

序論で述べたように、マイクロインジェクションを用いた解析では、MP 自身が細胞間移行するという結果が報告されていた (Waigmann et al. 1994, 1995)。一方、MP-GFP 融合タンパクを発現する組み換え TMV を用いた解析では、TMV 感染部位では MP は細胞間移行していないことが報告された (Oparka et al. 1997)。この互いに矛盾した報告例のため、MP 自身に細胞間移行能があるのかという問題は未解決のままであった。

本研究では、ToMV を材料に用い、trans-complementation 実験によってこの点を明らかにすることを計画した。その結果、*N. benthamiana* の葉において、1細胞で一過的に発現させた MP が、ToMV.erG3(SF3)を2細胞以上離れたところまで移行させることができたことから、ある1細胞で発現した MP はその周囲の細胞においても機能しうることが明らかになった。また、ToMV 感染部位において一過的に発現した MP (MP-GFP) は、複数細胞にわたって原形質連絡に局在していることが分かった。非感染細胞では、MP-EGFP 融合タンパクの原形質連絡への局在と細胞間移行は低頻度にしか観察されなかった。このことから、MP は細胞間移行能を持つが、その細胞間移行はウイルスの感染により大幅に促進されることが分かった。

【ToMV の細胞間移行のモデル】

Tobamovirus の細胞間移行に関して、MP がゲノム RNA と複合体 (viral ribonucleoprotein complex、vRNP) を形成し、vRNP が細胞骨格に沿って原形質連絡まで運搬され、MP の活性により助けられた原形質連絡を通過して隣接細胞に移行していくというモデルが提唱されている。trans-complementation 実験で得られた結果を考慮すると、ToMV の MP はゲノム RNA と共に vRNP の形で隣接細胞に移行していくと考えられる。移行した先の細胞で MP は再び利用され、その細胞で複製しているウイルスをさらに先の細胞に移行させるのであろう (図 13)。また、一部の vRNP は、隣接細胞で複製に入ることなく、細胞境界を2つ以上越えて移行するかもしれない。低頻度ではあるが、非感染細胞でも MP-GFP 融合タンパクが細胞間移行することから、一部の MP は

単独で細胞間移行すると考えられる (図 13)。MP-GFP 融合タンパクの複数細胞にわたる分布は、MP の移行と同時にその mRNA が細胞間移行し、隣接細胞で翻訳された結果である可能性も考えられる。しかし、MP 遺伝子と erG3GFP 遺伝子との同時導入では、erG3GFP の蛍光が複数細胞に拡がることはほとんどなかったことから、MP が配列非特異的に mRNA を移行させる可能性は否定される。また、ウイルス非感染細胞での MP-GFP 融合タンパクは主に細胞質内の凝集体となって局在した。しかし、MP-GFP 融合タンパクが複数細胞にわたって観察される場合、その蛍光は主に原形質連絡に見られ、特に遺伝子導入された細胞の周囲の細胞では凝集体は観察されなかった。したがって、MP 自身の mRNA が移行し、隣接細胞で翻訳されるという可能性も低いと考えられる。ただし、ウイルス感染部位においては、MP の原形質連絡への局在が促進されるため、MP 自身の mRNA が移行し、隣接細胞で翻訳される可能性は現時点では否定できない。

【MP-EGFP の感染に伴う局在性変化及び ToMV の複製と細胞間移行の関連】

ウイルス非感染細胞では、MP-EGFP は主に不定形の塊状の局在及びフィラメント状の局在を示した。同様の局在は MP-GFP 融合タンパクを発現する組み換え TMV をプロトプラストに感染させた場合や宿主植物の葉へ感染させた場合にも観察されている。しかし、感染葉でこのような細胞質内の局在が観察されるのは、拡がりつつある感染部位の先端から感染部位の中心に向かって少し内部に入ったところであり、感染部位の最先端部における MP-GFP 融合タンパクの局在は原形質連絡に限定されている (Padgett et al. 1996)。つまり、塊状の凝集体やフィラメント状の構造が観察されるのは非感染細胞や、ウイルスの移行が起こらないプロトプラストへの感染、感染葉においてはすでにウイルスの移行が終了していると考えられる部位の細胞などであり、それらは全てウイルスの細胞間移行が活発には行われていない状況下であるといえる。言い換えると、TMV の移行と MP-GFP 融合タンパクの塊状の局在やフィラメント状の局在には相関が無いということになる。

動物細胞では、正常な構造に折りたたまれなかったタンパクが分解しきれないほど蓄積した場合、aggreosome と呼ばれる塊状の構造物ができることが知られている (Johnston

et al. 1998, García-Mata et al. 1999)。この構造体は正常な構造をとれなかったタンパクとプロテアソームが微小管を介した輸送によって中心体の付近に集められてできる。植物細胞では aggresome に相当する構造物はまだ報告されていないが、MP-GFP 融合タンパクによってできる不定形の塊は、細胞にとって有害なタンパクの蓄積に対する植物細胞の応答の結果現れたものかもしれない。プロトプラストでは MP がプロテアソームによって分解されていることや (Reichel and Beachy 2000)、感染中期～後期の細胞では微小管に沿った MP の局在が観察されること (Heinlein et al. 1995, Mclean et al. 1995, Padgett et al. 1996) は aggresome 仮説とよく一致する。したがって MP-GFP 融合タンパクの塊状及びフィラメント状の局在は MP が活発に機能している状態ではなく、分解されていく MP の様子を反映している可能性がある (図 13)。

しかし、ウイルスの生活環において、細胞骨格を介したウイルス粒子やゲノム核酸の細胞内輸送が重要であることは、動物ウイルスの例をみても明らかであり (Cudmore et al. 1995, Sasaki et al. 1995, Suomalainen et al. 1999, Sodeik et al. 1997, Sodeik 2000)、Tobamovirus の細胞間移行にも細胞骨格を介した輸送系が関与している可能性は極めて高い。MP-GFP 融合タンパクのフィラメント状の局在がこのことを反映しているかどうかは疑わしいが、他の方法、例えば nocodazole や brefeldin A などの薬剤を用いた輸送系の阻害などにより、ウイルスの細胞間移行と細胞骨格との関係を調べることができれば大変興味深い知見が得られるのではないかと考えている。

ウイルス感染に伴い、MP-EGFP の蛍光は原形質連絡に顕著に見られるようになり、細胞質内の凝集体は減少する。この現象は MP がウイルス感染により速やかに利用され、隣接細胞に移行していった結果であると解釈できる (図 13)。別の可能性として、ウイルス感染によって何らかのタンパク分解系が誘導され、一過的に発現した MP の余剰分 (不定形の凝集体) が速やかに分解されることも考えられる (図 13)。第三の可能性として、ウイルスが複製している細胞に限って MP-EGFP の生成量が少なくなっているということも考えられる。しかし、ウイルス感染していない部位では、MP-EGFP 遺伝子を単独で導入した場合と同様の局在パターンが見られ、蛍光強度も変わらない。また、ウイルスの増殖が確認されるよりもずっと早い時期 (遺伝子導入後 15 時間以内) にお

いて、すでに塊状に局在する蛍光は観察される。これらのことは、複数プラスミドの同時導入によってタンパク発現量が顕著に低下することではなく、また、ウイルスの増殖に先立って MP-EGFP は凝集体を形成するのに十分なだけ蓄積していることを意味する。したがって、ウイルス感染特異的に MP-EGFP の合成量が低下しているという可能性は低いと考えられる。

ウイルス感染細胞と非感染細胞の間で MP の局在や細胞間移行能に大きな違いが存在することは、ゲノム RNA を隣接細胞に運搬する際に、MP がウイルスの複製複合体と直接、あるいは間接的に相互作用していることを示唆する。TMV 感染プロトプラストや感染葉において、MP と複製複合体の局在が感染のある時期において一部重なるという報告例もこのことを支持する結果である (Heinlein et al. 1998, Más and Beachy 1999, Szécsi et al. 1999)。

これらの観察結果から、Tobamovirus の細胞間移行に必要な機能の一部は複製酵素にコードされており、ウイルスの細胞間移行はウイルス複製と協調して行われているのではないかと考えられる。ウイルスの複製と移行の間に相互作用が存在することは、細胞間移行に関して MP とウイルスの間には種特異性が存在することを示唆する。この可能性に関しては、第3章で述べる PVX の DNA 感染系も併せて利用し、第4章で検討する。

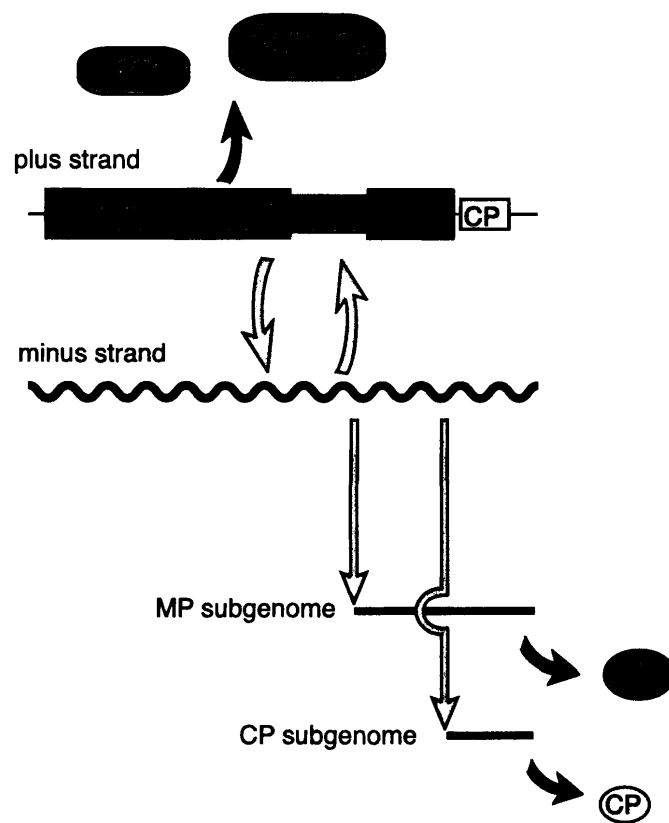


図3 ToMVとPVXの複製とタンパク合成

ゲノムRNAのプラス鎖から翻訳される約126 kDaと約183 kDaの2種類のRNA複製酵素により、プラス鎖を鋳型にマイナス鎖が合成される。逆にマイナス鎖を鋳型にプラス鎖が合成され、ウイルスは増殖する。また、マイナス鎖を鋳型に2種類のサブゲノムが合成され、それぞれのサブゲノムからMPとCPが翻訳される。

Infection with TMV-MP:GFP

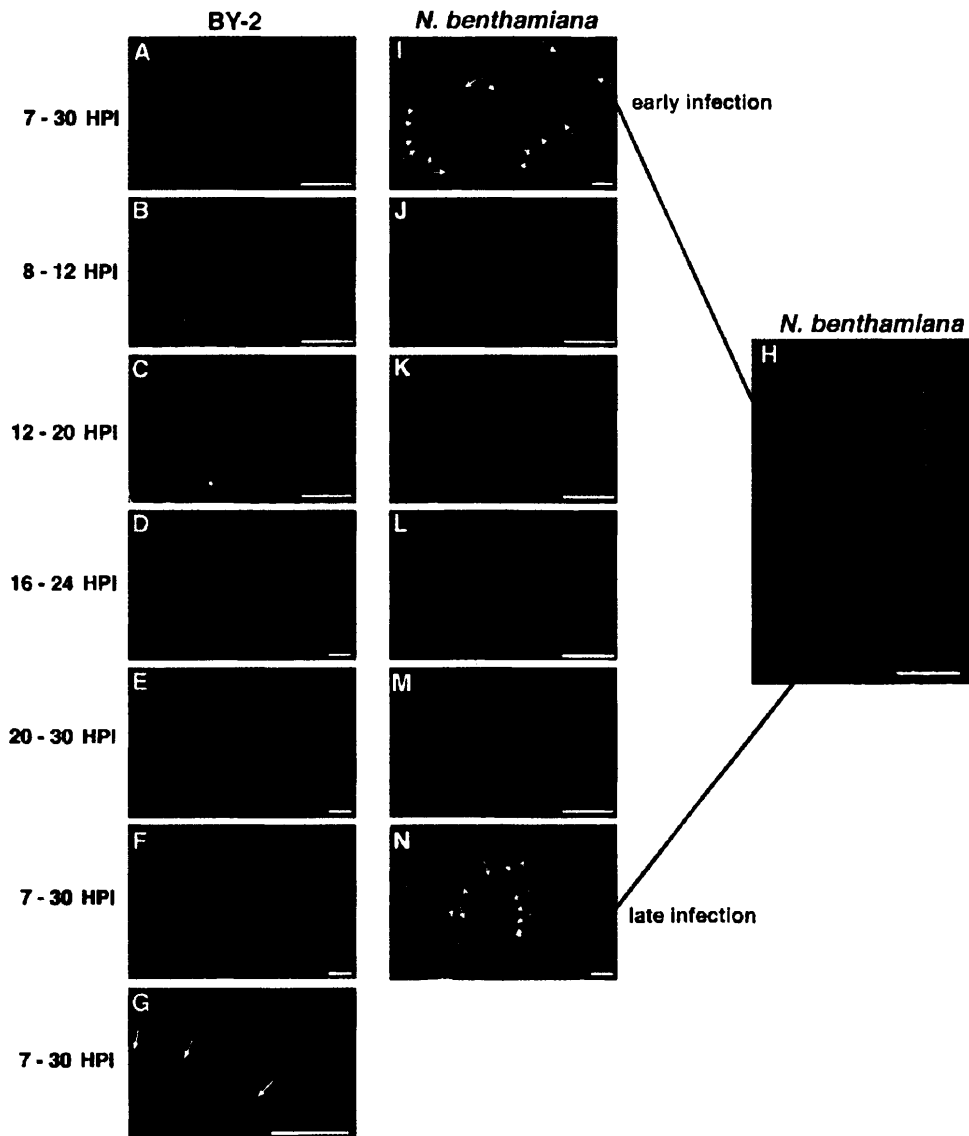
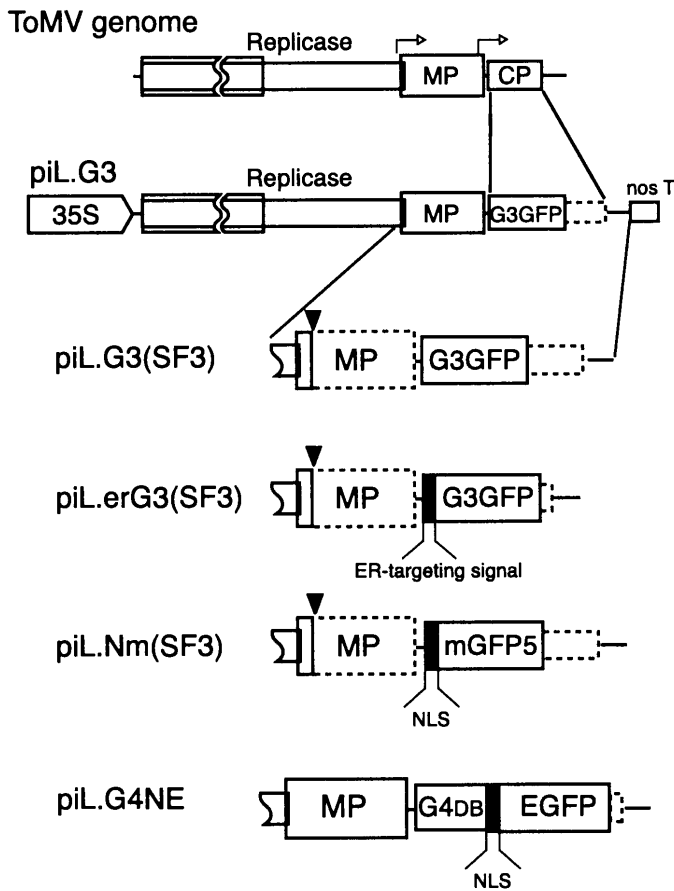


図4 組み換えTMVによって発現したMP-GFP融合タンパクの細胞内局在
 A-G、TMV-MP:GFPをBY2プロトプラストに感染させた場合のMP-GFP融合タンパクの経時的局在変化。
 MP:GFPは感染中期～後期にかけて不定形の塊状及びフィラメント状の局在を示す (B-E)。また、感染細胞表面から突起物を伸ばす (G)。H、*N.benthamiana*の葉におけるTMV-MP:GFPの感染部位。ウイルス感染は写真右から左へ進行している。I-N、感染部位の先端部から内部にかけてのMP-GFP融合タンパクの細胞内局在。
 MP-GFP融合タンパクは感染初期及び後期の細胞では原形質連絡に局在し (I、N、矢印)、感染中期～後期の細胞で不定形の塊状の局在及びフィラメント状の局在を示す (J-M)。HPI : hour post inoculation

Heinlein *et al.* 1998 Plant Cell vol. 10, 1107-1120 より引用

A



B

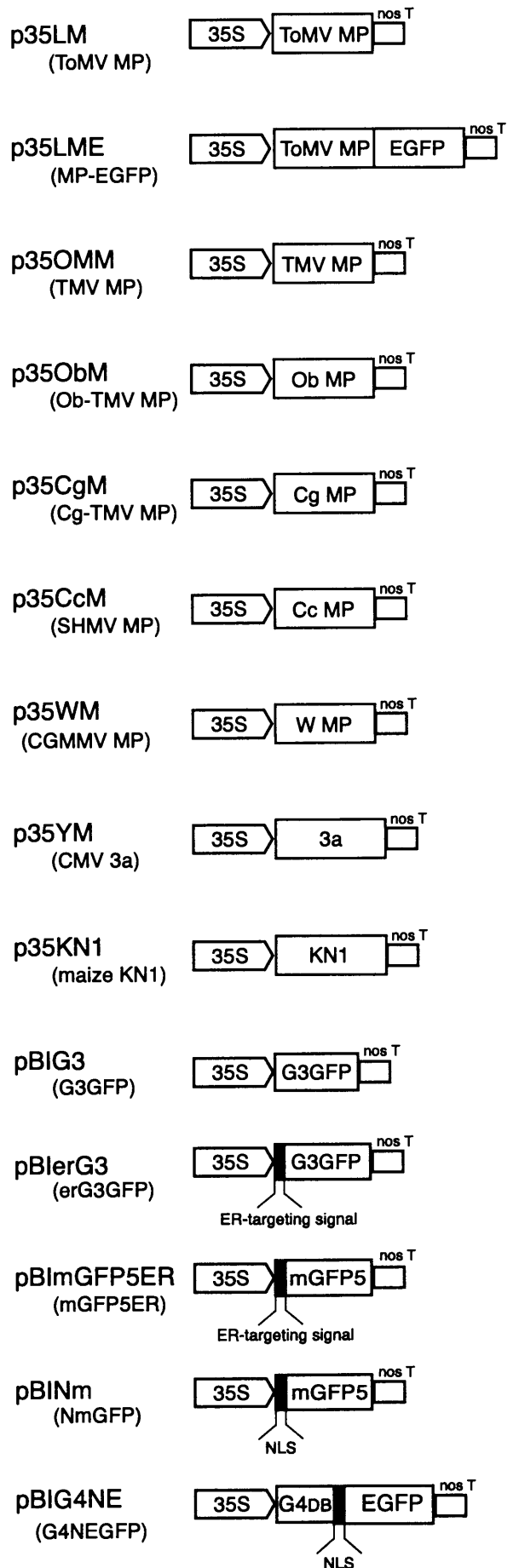


図5 実験に用いたプラスミドの模式図

(A) ToMVの感染性プラスミドの模式図。最上段にToMVのゲノム構造を示す。矢印はサブゲノムプロモーターの位置を示す。黒塗りの三角はフレームシフト変異を導入した箇所、破線はMP及びCPのORFが残っているが、翻訳されない部分を示す。G4DBはGAL4 DNA binding domainの略。

(B) MP及びGFPの一過性発現プラスミドの模式図。プラスミド名の下 () 内に植物細胞内で発現するタンパクの名前を記した。

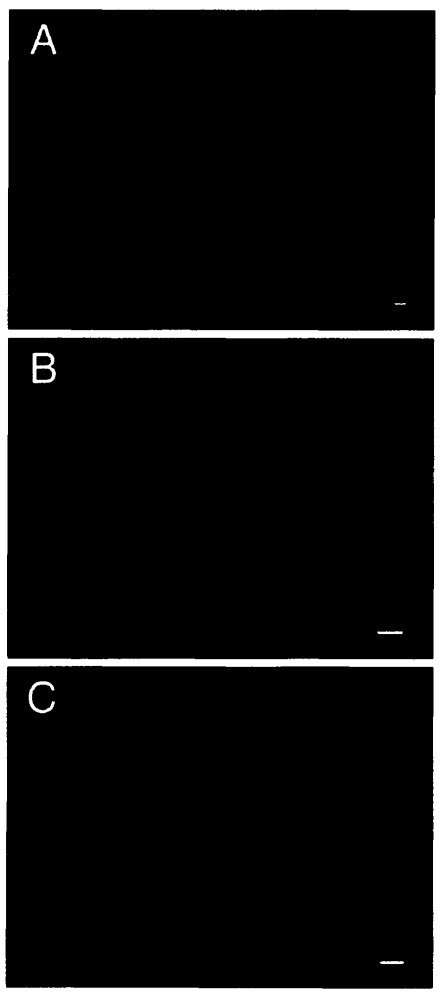


図6 ToMVのDNA感染

(A) piL.G3の*N.benthamiana*の本葉への導入から48時間後のウイルス感染部位。ウイルス感染に伴いGFPの蛍光が拡がっている様子が観察される。(B) piL.G3(SF3)を導入した場合。蛍光は一細胞にとどまっている。(C) piL.G3(SF3)をp35LMと共に導入した場合、ToMVの移行能欠損がp35LMから発現したMPによって相補され、GFPの蛍光が複数細胞に拡がっている。Bar=50 μ m

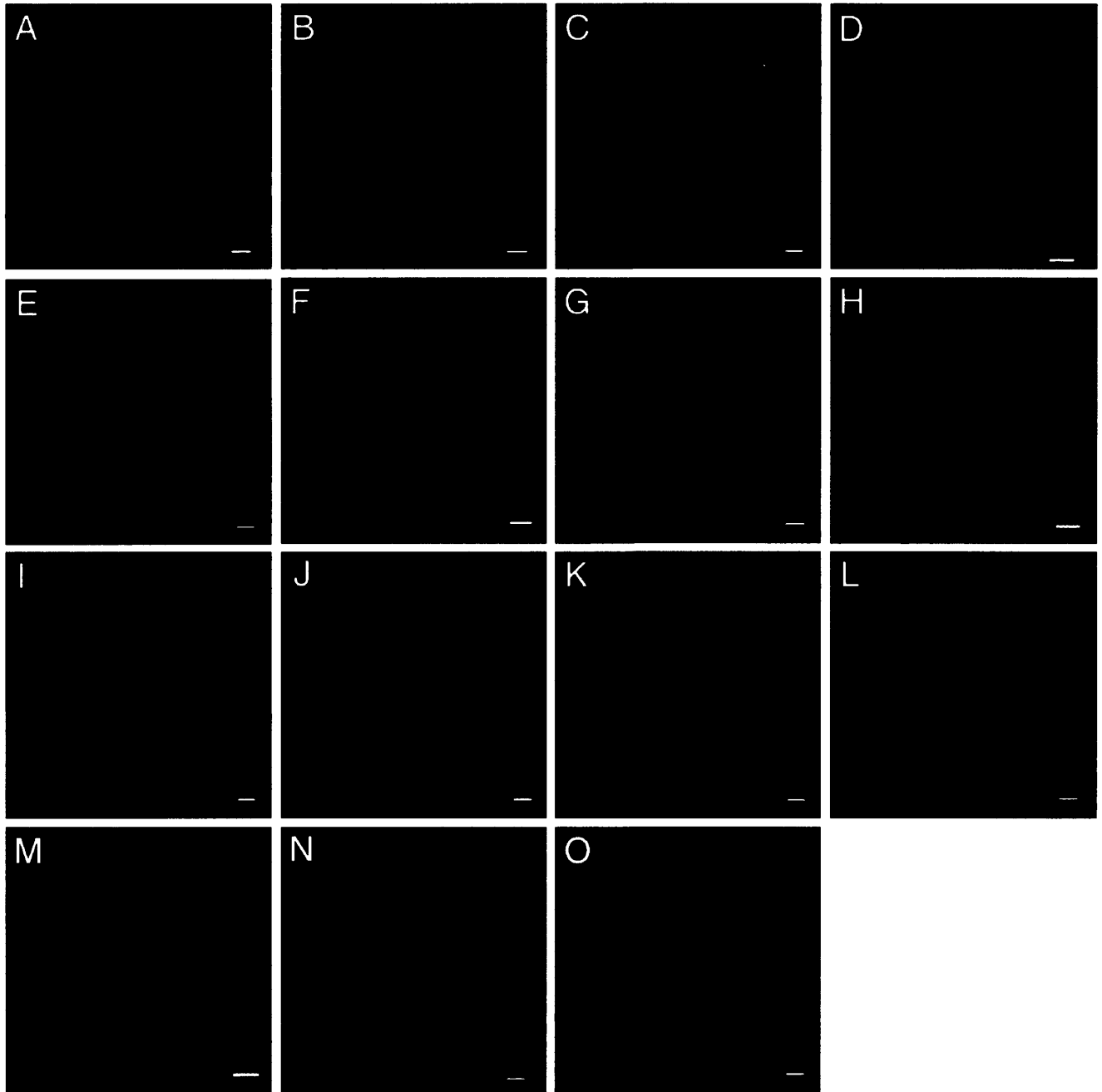


図7 GFPの細胞間拡散

写真はすべて*N.benthamiana*の本葉にプラスミド導入後24時間で撮影したものである。(A) pBIG3のみを導入した。GFPの蛍光が一細胞にとどまっている。(B) pBIG3のみを導入した。約6%の遺伝子導入部位でGFPの蛍光が複数細胞に拡がっている。(C-H) pBIG3をp35LM (C)、p35OMM (D)、p35CcM (E)、p35ObM (F)、p35YM (G)、p35KN1 (H)と共に導入した場合、GFPの細胞間の拡散が促進され、GFPの蛍光が複数細胞に拡がっている。(I) pBlerG3を導入した場合。GFPの蛍光は一細胞にとどまり、ERのネットワークが観察される。(J, K) pBlerG3をp35LMと共に導入した。GFPの蛍光は一細胞にとどまっており、ERの変形が観察される。また、(K)のように隣接した二つの細胞に蛍光が観察される場合もあるが、これは遺伝子が二つの細胞に同時に導入された結果であると考えられる。(L, M) pBIG4NEをp35LMと共に導入した。核に強い蛍光が観察され、細胞質にもわずかに蛍光が観察される。ほとんどの遺伝子導入部位でGFPの拡散は観察されないが(L)、隣接細胞でわずかに蛍光が観察される場合もある(M)。(N, O) pBINmをp35LMと共に導入した。青色光照射下でGFPの細胞間拡散が観察されたが(N)、UV照射下では拡散したGFPの蛍光は弱かった(O)。Bar=25 μ m

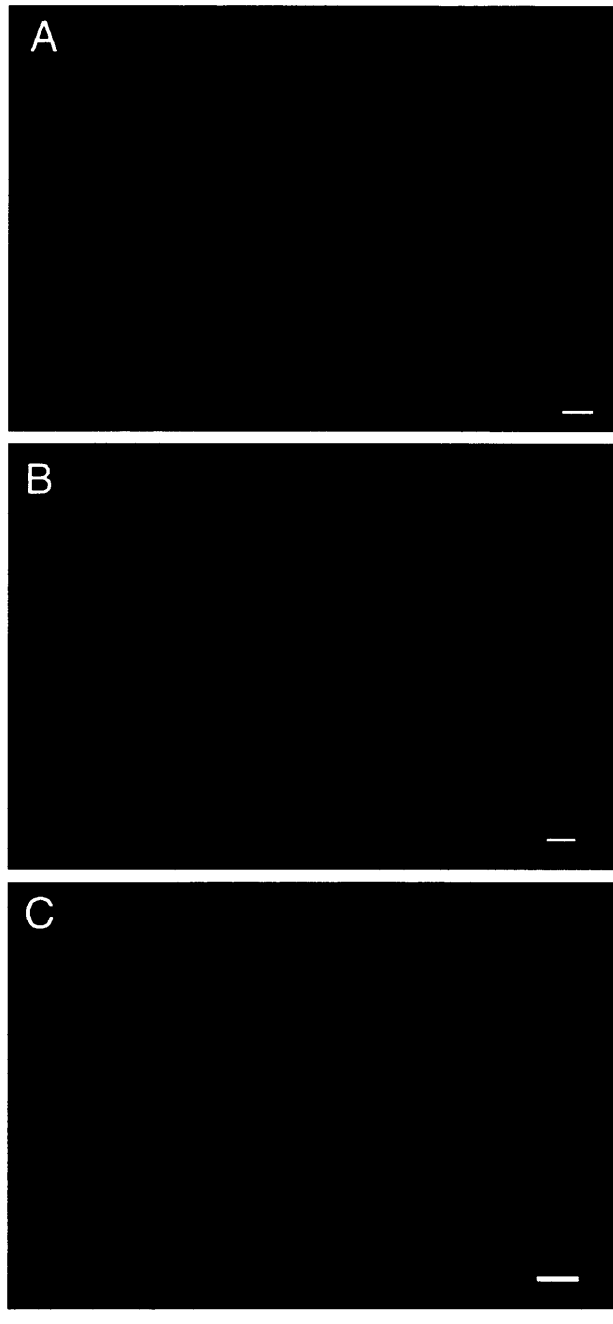


図8 erG3GFP及びG4NEGFPをレポーターとして持つToMVの感染

(A) piL.erG3を導入し、48時間後に観察した。ウイルス感染に伴いerG3GFPの蛍光が広がっている様子が観察される。また、ERの変形が見られる。Bar=50 μ m。 (B) piL.erG3(SF3)を導入した。GFPの蛍光は一細胞にとどまっている。 (C) piL.G4NEを導入した。野生型のMP遺伝子を持っているにもかかわらず、細胞間移行が観察されない。Bar=25 μ m

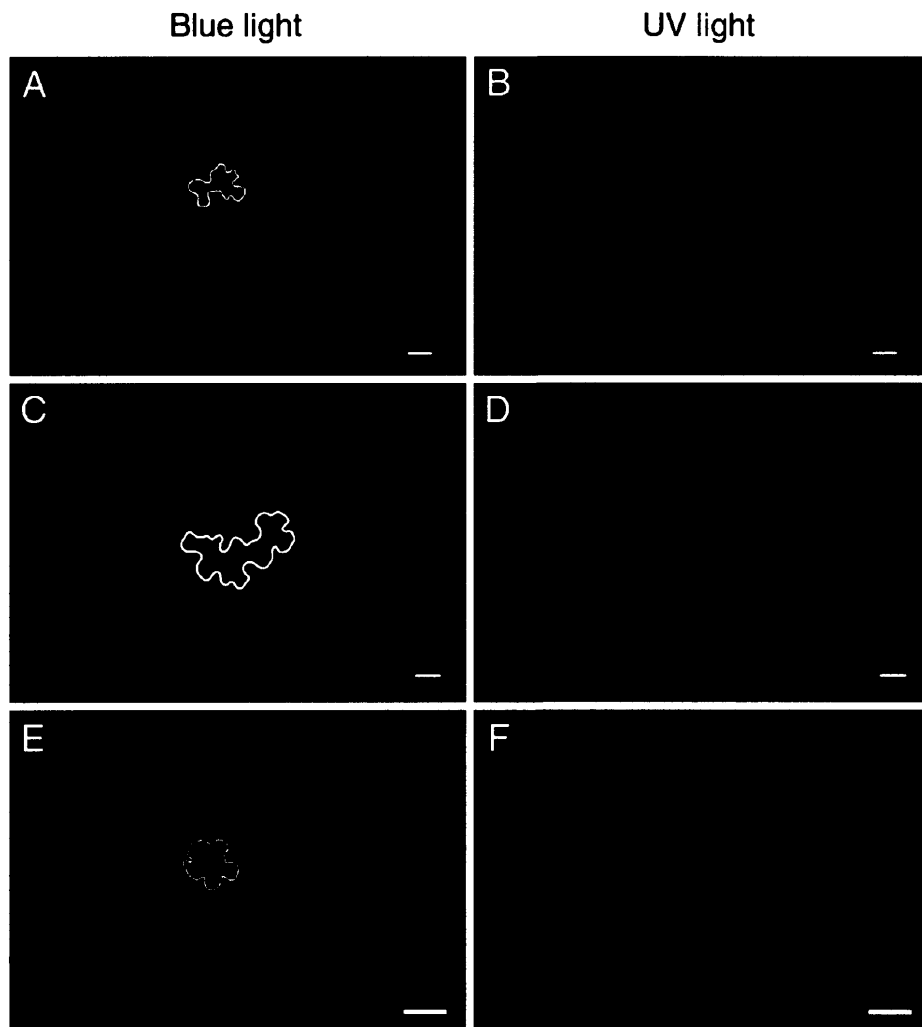


図9 Trans-complementation実験によって調べたMPの作用範囲

写真はすべてプラスミド導入48時間後に撮影したものである。A、C、Eは青色光照射下、B、D、Fはそれぞれ同じ視野をUV照射下で撮影した。(A、B) piL.erG3(SF3)、p35LM、pBINmの3種類のプラスミドを同時導入した。(C、D) piL.erG3(SF3)、p35LM、pBImGFP5ERの3種類のプラスミドを同時導入した。

(E、F) piL.Nm(SF3)、p35LM、pBlerG3の3種類のプラスミドを同時導入した。UV照射によって同定される遺伝子導入細胞(Eでは最も強く光っている細胞)の輪郭を白線で、その細胞に境を接する一部の細胞の輪郭を赤線で示した。赤線よりも先にウイルス感染細胞が観察されることから、白線で囲んだ細胞で合成されたMPは、その周辺の細胞(赤線で囲んだ細胞)においても機能していることが分かる。

Bar=50 μ m。

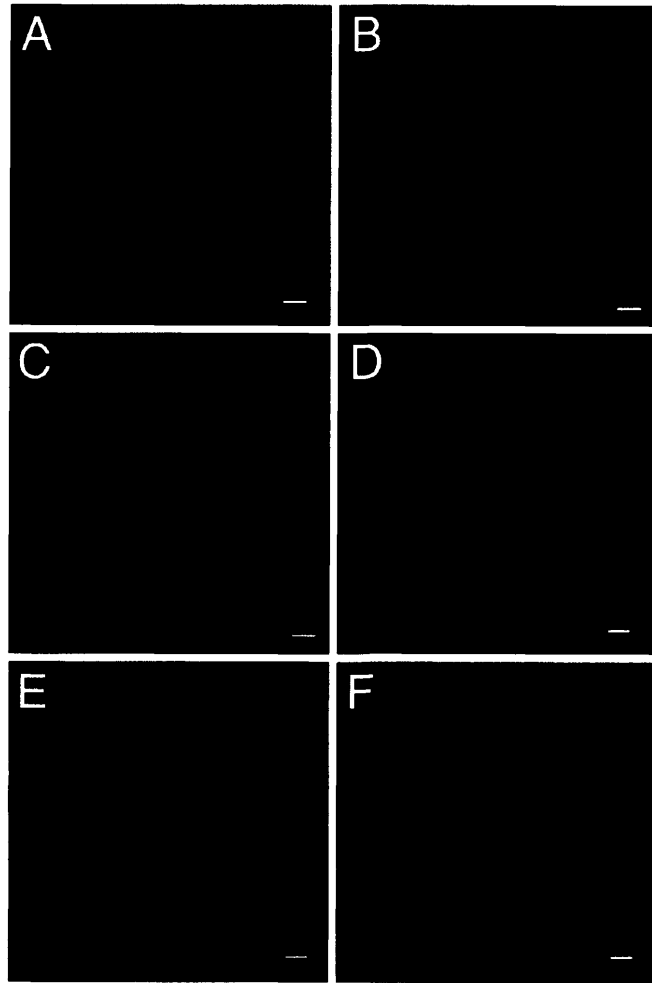


図10 異種TobamovirusのMPによるToMV移行能欠損の相補
piL.erG3(SF3)をp35LM (A)、p35OMM (B)、p35ObM (C)、p35CgM (D)、p35CcM (E)、
p35WM (F) と共に導入した。全てのMPによってToMVの移行能欠損は相補されるが、CGMMVのMP
遺伝子 (p35WM) の相補能は他のものと比べて弱いことが分かる。観察は全て遺伝子導入48時間後
に行った。Bar=50 μ m。

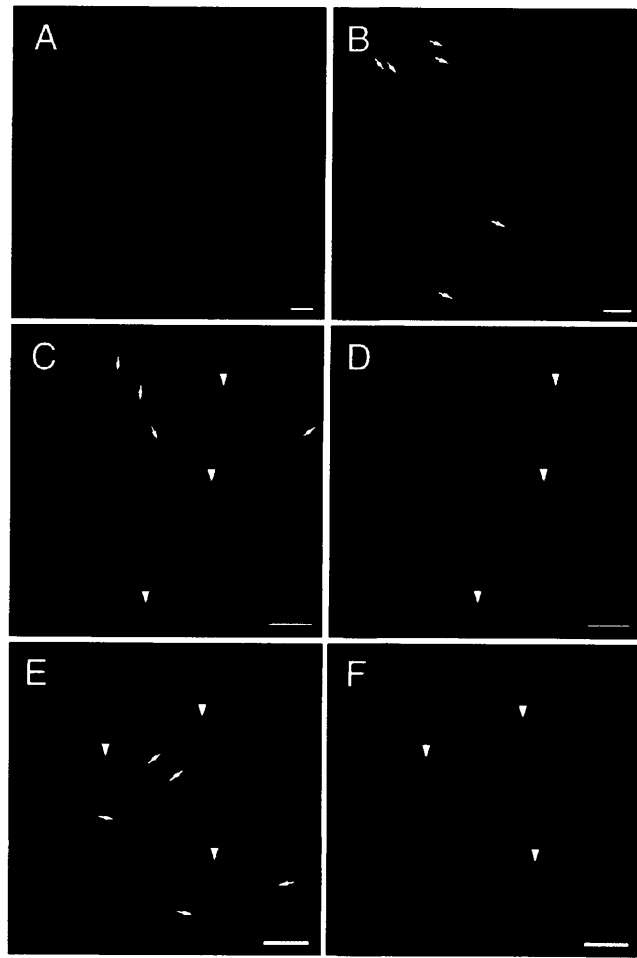


図11 MP-EGFP融合タンパクの局在

(A) p35LMEのみを導入し、40時間後に観察した。MP-EGFPは不定形の塊状の局在を示し、GFPの蛍光は一細胞にとどまっている。約80%の遺伝子導入部位でこのような局在が観察される。(B) p35LMEのみを導入し、40時間後に観察した。塊状の構造物は少なく、細胞壁の原形質連絡と考えられる部分にドット状の蛍光の局在が観察される(矢印)。また、約20%の遺伝子導入部位において、原形質連絡への局在が複数細胞で観察される。(C) p35LMEをpiL.Nm(SF3)と共に導入し、24時間後に観察した。核に局在するGFPの蛍光(白三角)はウイルス感染していることを示す。MP-EGFPは原形質連絡に局在する(矢印)。原形質連絡に局在する蛍光はUV照射下では観察されないことから、MPに融合したEGFPによるものであることが確認できる(D)。(E) p35LMEをpiL.Nm(SF3)と共に導入し、40時間後に観察した。Cと同様、MP-EGFPは原形質連絡に局在し(矢印)、その蛍光はUV照射下では観察されない(F)。Bar=25 μm。

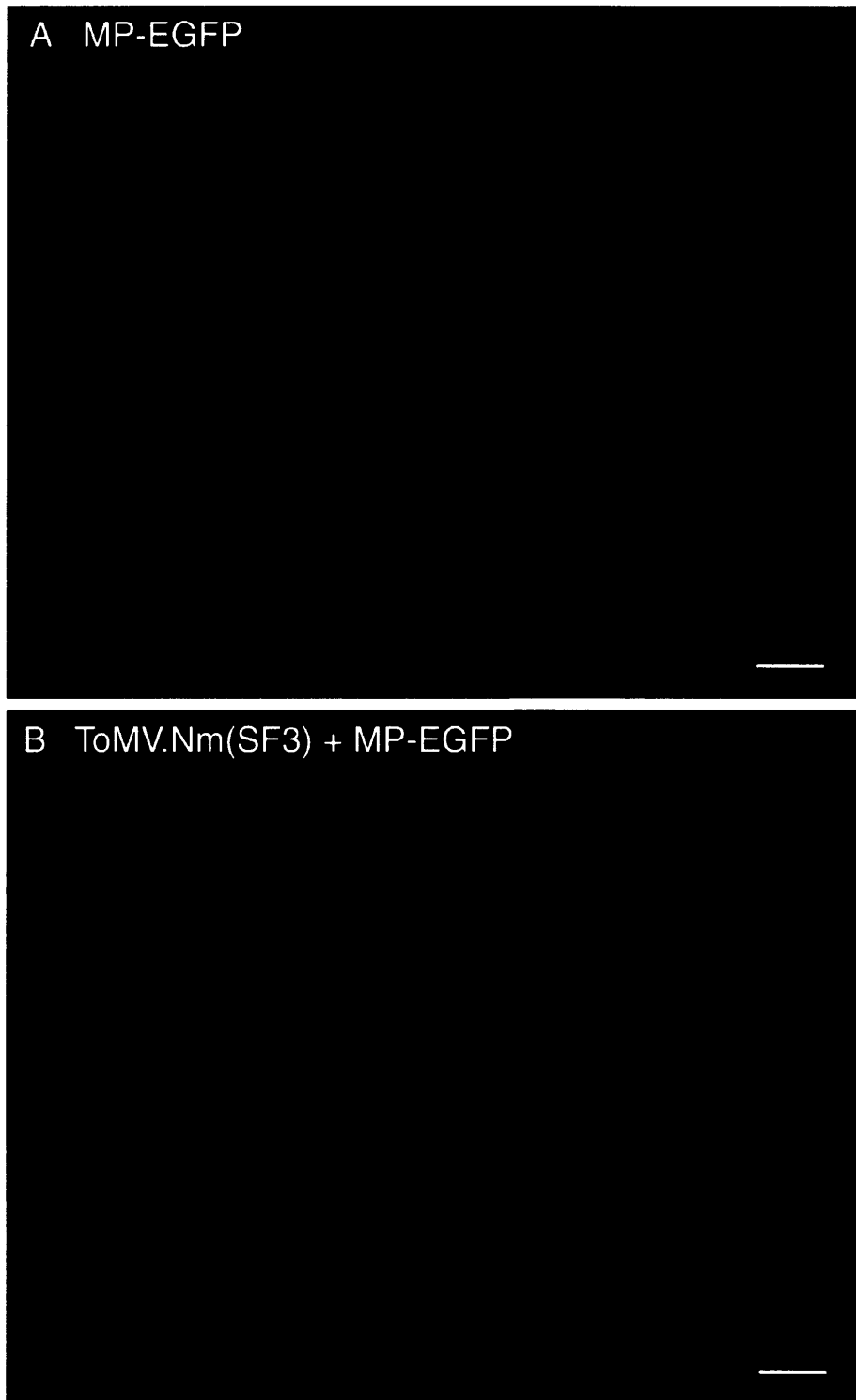


図12 共焦点顕微鏡によるMP-EGFPの局在解析

(A) p35LMEのみを導入し、40時間後に観察した。不定形の塊状の構造及びフィラメント状の局在が観察される。(B) p35LMEをpiL.Nm(SF3)と共に導入し、40時間後に観察した。塊状の構造及びフィラメント状の局在は観察されず、細胞壁のドット状の蛍光が観察される。強く光る丸い塊及び細胞質内に網目状に見えるものは、核と細胞質に存在するNmGFPのシグナルであると考えられる。Bar=25 μ m。

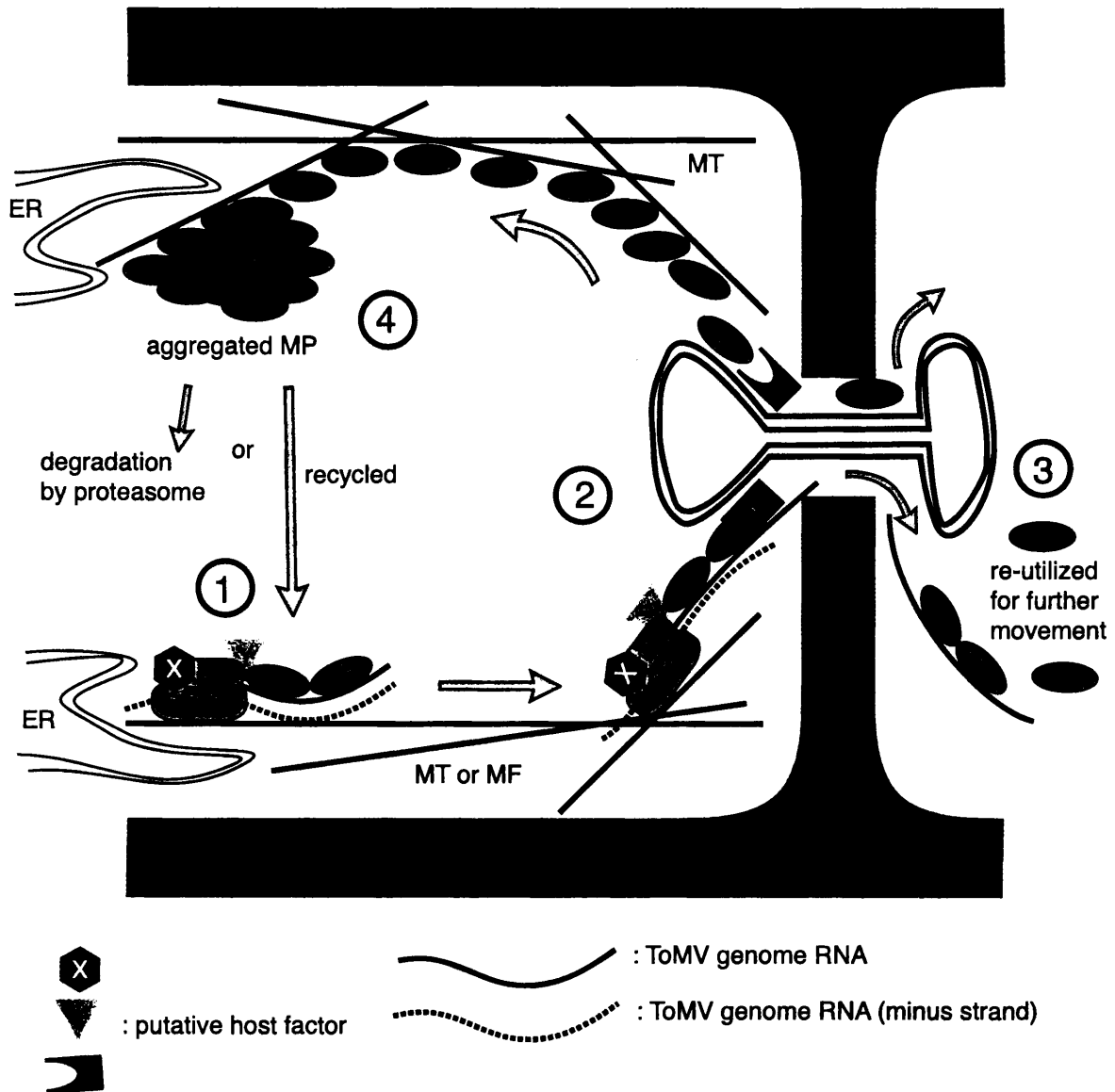


図13 ToMVの細胞間移行のモデル

- 1、MPはウイルス複製の場で合成され、複製酵素と直接、または宿主因子を介して間接的に相互作用し、複合体を形成する。
- 2、この複合体は微小管 (MT) またはアクチンフィラメント (MF) を利用して原形質連絡に到達する。その後、複製酵素を含めた複合体全体、もしくはMP-RNA複合体のみが原形質連絡を通過する。一部のMPは単独で隣接細胞に移行する。
- 3、隣接細胞に放出されたMPはウイルスをさらに先の細胞に移行させるために再利用される。
- 4、感染後期になり、ウイルスの移行が活発に行われなくなってくると、余剰分のMPはMTを介して細胞内部に輸送され、凝集する。凝集したMPはプロテアソームによって分解される。またはウイルスの移行のために再利用される。

表 1. GFP variant の性質

GFP variant ^a	excitability		subcellular localization
	UV	blue-light	
G3GFP (G3)	-	+	nucleus ~ cytosol
NmGFP (Nm)	+	+	nucleus > cytosol
erG3GFP (erG3)	-	+	ER
mGFP5ER	+	+	ER
EGFP ^b	-	+	nucleus ~ cytosol
G4NEGFP	-	+	nucleus >> cytosol

^a () 内にはプラスミドの名前に用いられた略称を示す (図 5 参照)。

^b 相同配列による gene silencing が起こる可能性を下げるため、他の GFP とは配列が異なる (約 77% identity) EGFP を用い、ToMV MP との融合タンパクを作製した。

表 2. GFP variants の細胞間拡散と MP による細胞間拡散の促進

expressed proteins	frequency of GFP signals in two or more adjoining cells	
	24-h post-bombardment	48-h post-bombardment
G3GFP	6/100 (6)	54/139 (39)
G3GFP + ToMV MP	60/115 (52)	21/42 (50)
erG3GFP	3/133 (2)	5/145 (3)
erG3GFP + ToMV MP	3/55 (5)	2/48 (4)
G4NEGFP	2/70 (3)	1/50 (2)
G4NEGFP + ToMV MP	4/87 (5)	5/47 (11)
NmGFP	2/52 (4)	12/35 (34)
NmGFP + ToMV MP	23/84 (27)	34/60 (57)
G3GFP + TMV MP	98/160 (61)	n. d.
G3GFP + Cg-TMV MP	75/164 (46)	13/27 (48)
G3GFP + SHMV MP	44/78 (56)	n. d.
G3GFP + CGMMV MP	77/132 (58)	n. d.
G3GFP + Ob-TMV MP	87/153 (57)	n. d.
G3GFP + CMV 3a MP	30/47 (64)	20/34 (59)
G3GFP + maize KN1	42/87 (48)	21/35 (60)
G3GFP + GAL4-VP16	5/39 (13)	n. d.

データは (複数細胞で蛍光が観察された部位の数) / (蛍光が観察された部位の総数) を示す。() 内の数字はその%である。また、trichome の細胞間では GFP の移行が MP 非存在下でも頻繁に観察されるため、数に含めていない。n.d. : not determined

表3. MPの一過性発現によるToMVの移行の範囲

bombarded plasmids ^a	cell-cell boundaries ^b		total no. of infection sites examined
	1	2 or more	
piL.erG3(SF3) + p35LM + pBINm	8 (13)	54 (87)	62 (100)
piL.erG3(SF3) + p35LM + pBImGFP5ER	17 (18)	77 (82)	94 (100)
piL.Nm(SF3) + p35LM + pBIerG3	4 (12)	30 (88)	34 (100)

^a プラスミドの構造は図5に示した。

^b 数字は表に示した数の細胞境界を越えてToMV.erG3(SF3)移行した感染部位の数を示す。

() 内に全感染部位に対する割合を%で示す。典型的な感染パターンを図9に示した。

表4. 様々なMPによるToMV移行能欠損の相補

co-expressed protein	single-cell infection (%)	2 – 3 cells infected (%)	4 or more cells infected (%)	total no. of infection sites examined
none	98	2	0	53
ToMV MP	9	19	72	166
TMV MP	4	21	75	56
Cg-TMV MP	10	25	65	207
SHMV MP	14	16	70	196
CGMMV MP	20	54	27	97
Ob-TMV MP	14	18	68	50
KN1	96	4	0	26

ToMV の感染性プラスミド piL.erG3(SF3)を単独で (none) または表に示したタンパクを発現するプラスミドと共に導入し、遺伝子導入後 48 時間で GFP 発現細胞の数をカウントした。左 3 列の数字はウイルスの移行が相補された感染部位の数の全感染部位に対する割合を%で示したものである。最右列に観察した全感染部位の数を示す。ただし、葉肉細胞は細胞の形がわかりにくいため、数に含めなかった。

表 5. ToMV 複製による MP-EGFP の細胞間移行の促進

bombarded plasmid ^a	Distribution of MP-EGFP ^b				
	in uninfected sites		in infected sites ^c		
	single	2 or more (%)	n.d.	single	2 or more (%)
p35LME	206	58 (22)	–	–	–
p35LME + piL.Nm(SF3)	292	82 (22)	25	8	71 (90)
p35LME + p35LRp	39	11 (22)	–	–	–

^a プラスミドの構造は図 5 に示した。

^b single : MP-EGFP が遺伝子導入された細胞の内部及びその細胞を囲む細胞壁にのみ観察された部位の数。 2 or more : MP-EGFP が周辺の細胞の細胞壁にも観察された部位の数。 n.d. : ウイルスの移行は観察されるが、MP-EGFP の蛍光が観察されなかった部位の数。() 内に MP-EGFP の蛍光が観察された全ての部位の数に対し、MP-EGFP が複数細胞に分布する部位の割合%を示した。典型的な局在パターンを図 11、12 に示した。

^c 感染細胞は UV 照射下で NmGFP の蛍光により同定した。

第3章 PVX の細胞間移行の分子機構の解析

序

Potato virus X (PVX) に代表される Potexvirus 属のウイルスは近年盛んに研究されているウイルスグループの一つである。PVX は約 6.4 kb の一本鎖のプラス鎖 RNA をゲノムとするウイルスであり、ひも状の粒子を形成する。ゲノムには約 165 kDa の複製酵素と、互いにオーバーラップした 3 つの ORF (Triple gene block、TGB) にコードされている分子量約 25 kDa、12 kDa、8 kDa の 3 種類のタンパク (それぞれ 25K タンパク、12K タンパク、8K タンパクと呼ぶ)、及び約 25 kDa の CP がコードされている (図 14)。TGB にコードされる 3 種類のタンパクが PVX の MP であるが、細胞間移行にはこれらに加えて CP も必要である (Chapman et al. 1992)。PVX の複製様式は TMV の場合と同様、RNA 複製酵素によってマイナス鎖が合成され、それを鋳型にして再びプラス鎖が合成される。その際、ゲノム RNA と同時に約 2.1 kb、1.4 kb、0.9 kb の 3 種類のサブゲノムが合成される。2.1 kb のサブゲノムからは 25K タンパク、1.4 kb のサブゲノムからは 12K タンパクが合成される。8K タンパクは、リボソームがある割合で 12K タンパクの翻訳開始コドンを読み飛ばし (leaky ribosome scanning)、1.4 kb サブゲノムの 5' 末端から数えて 2 番目の開始コドンから翻訳が始まることによって合成される (Morozov et al. 1991)。0.9 kb のサブゲノムからは CP が合成される。

Potexvirus 属をはじめ、Carlavirus、Hordeivirus、Benyvirus、Pecluvirus 属等、TGB を持つウイルスの MP は、TGB の上流の ORF にコードされるものから順にそれぞれ TGBp1、TGBp2、TGBp3 と総称される。Potexvirus の TGBp1 は ATP/GTPase 活性を持ち、in vitro では RNA との結合能が示されている (Rouleau et al. 1994, Kalinina et al. 1996)。また、ある種の RNA helicase に見られるドメインを持っている (Wong et al. 1998)。さらに、Potexvirus の一種である White clover mosaic virus (WCIMV) の TGBp1 が、10 kDa のデキストランの細胞間の拡散を促進することが報告されており、Potexvirus の TGBp1 は TMV の MP と同様に原形質連絡の SEL を上昇させる活性を持っていると考えられている (Lough et al. 1998)。しかし Potexvirus の TGBp1 は、TMV の MP とは異なり、原形質連絡には局在せず、主に感染細胞の細胞質内に形成される封入体に局在する (Davies et al. 1993, Rouleau et al. 1994, Chang et al. 1997)。

N 末端に GFP を融合した PVX の 25K タンパクは細胞間移行することが報告されており、Potexvirus の TGBp1 はそれ自身細胞間移行する能力を持つと考えられている (Yang et al. 2000)。しかし、N 末端に GFP を融合した PVX の 25K タンパクはウイルスを細胞間移行させる機能を失っており、C 末端に GFP を融合した場合、機能は保持するが 25K タンパク自身は細胞間移行しないという報告もある (Morozov et al. 1999)。

TGBp2 及び TGBp3 については TGBp1 ほど研究が進んでいないが、膜タンパクに特徴的な疎水性のドメインを持ち、細胞内で ER 膜及び細胞膜や細胞壁に局在することや、TGBp3 の発現により TGBp2 の細胞内局在が変化することが報告されている (Hefferon et al. 1997, Solovyev et al. 2000)。

PVX の CP は感染細胞においては主に細胞質中に蓄積するウイルス粒子内に観察され、一部は原形質連絡に局在する (Rouleau et al. 1995, Oparka et al. 1996)。しかし CP は原形質連絡の SEL を上昇させることはない (Lough et al. 1998, Santa Cruz et al. 1998, Oparka et al. 1996)。また、単独で発現させた場合には原形質連絡に局在することも CP 自身が細胞間移行することもないと報告されている (Rouleau et al. 1995, Oparka et al. 1996)。細胞間移行に CP が必要であることから PVX はウイルス粒子の形で移行するという説と、ウイルス粒子とは異なる形のタンパク-RNA 複合体 (vRNP) を形成して移行しているとする二つの説があるが、そのどちらであるのかはまだ分かっていない (Lough et al. 1998, 2000; Santa Cruz et al. 1998)。

以上のような知見から、Potexvirus はゲノム RNA が TGBp1 (25K タンパク) 及び CP と複合体 (vRNP) を構成し、原形質連絡を通過していくというモデルが提唱されている (Lough et al. 1998)。またその際、TGBp1 が原形質連絡の SEL を上昇させると考えられている。一方 TGBp2 (12K タンパク) 及び TGBp3 (8K タンパク) はそれらが発現した細胞内で機能し、vRNP を複製の場から原形質連絡まで運搬する役割を担っていると考えられている。

しかし、TGBp1 の SEL 上昇活性はマイクロインジェクションの実験によって示されたものである。前章でも述べたとおりマイクロインジェクションの実験結果は MP 本来の性質を反映していない可能性がある。そこで本研究では PVX の細胞間移行のメカ

ニズムを解明することを目的とし、PVX のどの MP に SEL を上昇させる活性があるのかを GFP 遺伝子との同時導入の実験系を用いて検討した。また、PVX の DNA 感染系を用いて trans-complementation 実験を行い、TGB タンパク及び CP の細胞間移行能についても検討した。

その結果、PVX の細胞間移行に必要な 4 種類のタンパクのうち、12K タンパクが原形質連絡の SEL を上昇させる能力を持つことが明らかになった。また、trans-complementation 実験により、25K タンパク、12K タンパク、及び CP が感染部位において細胞間を移行し、複数細胞において機能するのに対し、8K タンパクは移行せず、発現した細胞内で機能することを明らかにした。さらに本研究では 12K タンパクの過剰発現により 8K タンパクの変異による移行能欠損が相補されることを見いだした。これらの結果に基づき、本章では PVX の細胞間移行のメカニズムに関する新規のモデルを提唱する。

材料と方法

【PVX の DNA 感染性プラスミドの構築】

piX.erG3

pBIerG3（第2章材料と方法参照）から *XbaI-SacI* 消化 (*SacI* 末端は平滑化した) により切り出した erG3GFP をコードする断片と、pPVX201 (Baulcombe et al. 1995) の *ApaI-NheI* 断片約 0.7 kbp を pPVX201 の *ApaI* 部位と平滑末端化した *SalI* 部位の間に挿入し、piX.erG3 を作製した。

piX.erG3(25fs)

piX.erG3 を *ApaI* で切断し、末端を平滑化した後 self ligation させて piX.erG3(25fs)を得た。

piX.erG3(12fs)

piX.erG3 を *XbaI* 消化し、末端を平滑化した後、*ApaI* または *XhoI* で切断した約 0.3 kbp 及び 1.8 kbp の断片を piX.erG3 の *ApaI* 部位と *XhoI* 部位の間に挿入し、piX.erG3(12fs)を得た。

piX.erG3(8d)

piX.erG3 をテンプレートとし、8Kdel 及び GFPprev プライマーを用いて PCR で増幅した DNA 断片を *SmaI-NspV* 消化し、pPVXUK3/OIII (東北大学高橋博士より分与) を *ApaI-ScaI* 消化して得られる約 0.7 kbp の断片と共に piX.erG3 の *ApaI* 部位と *NspV* 部位の間に挿入し、得られたプラスミドの *XbaI* 部位から *NspV* 部位までの断片を piX.erG3 の *XbaI* 部位と *NspV* 部位の間に再び挿入して piX.erG3(8d)を得た。

piX.erG3(8dm)

piX.erG3(8d)を *NheI* 消化し、末端を平滑化した後 *XbaI* 消化してして得られる約 1 kbp の断片を pKF18k の *XbaI* 部位と末端を平滑化した *SalI* 部位の間に挿入した。得られた

プラスミドを Mutan Super Express Km Kit (TAKARA) を用いて site directed mutagenesis を行い、8K タンパク ORF の開始コドンを AUG から ACG に変異させた。変異導入に用いた 8kmut プライマーの配列は下に示す。変異を導入したプラスミドから *XbaI-NspV* 断片を切り出し、piX.erG3 の *XbaI* 部位と *NspV* 部位の間に挿入して piX.erG3(8dm)を得た。

piX.erG3(Cd)

piX.erG3 を *NheI* と *XhoI* で消化し、末端を平滑化した後 self ligation させて piX.erG3(Cd) を得た。

piX.erG3(TdCd)

piX.erG3(8dm) を *XbaI* 消化し、末端を平滑化した後 *NspV* 消化して得られる約 1000bp の断片を、piX.erG3(Cd) の平滑化した *ApaI* 部位と *NspV* 部位の間に挿入して piX.erG3(TdCd) を得た。

p35X25、p35X12、p35X8、p35XCP

PVX (O 系統) の TGB 配列を含む pPVXUK3/OIII をテンプレートに TGBfw 及び TGBrev プライマーを用い、PCR によって PVX (O strain) の TGB をコードする DNA 断片を増幅した。この断片を *XbaI* 消化し、末端を平滑化した後、pBI221 の平滑末端化した *XbaI* 部位と *SacI* 部位の間に挿入して p35X25 を得た。また、PCR で増幅した TGB をコードする DNA 断片を *NdeI-ScaI* 消化し、末端を平滑化し、pBI221 の *SmaI* 部位と平滑末端化した *SacI* 部位の間に挿入して p35X12 を得た。pPVXUK3/OIII をテンプレートとし、PVX8Kfw 及び TGBrev プライマー、PVXCPfw 及び PVXCPrev プライマーを用いた PCR によって 8K タンパク及び CP をコードする DNA 断片を増幅し、*XbaI-SacI* 消化した後、pBI221 の *XbaI* 部位と *SacI* 部位の間に挿入して p35X8、p35XCP を得た。

プライマーの配列を以下に示す。プラスミド構築のために利用した制限酵素の認識

配列を枠で囲む。また、塩基置換変異を導入した部位を二重下線で示す。

PVX8Kdel 5' - TTACCCGGGAAATCAATCACAGTGTTG -3'
8kmut 5' - CTTTGCTGATCTACCGGAAGTAAATACA -3'
GFPrevSpe 5' - AAGACTAGTTTATTTGTATAGTTCATCCATGCC -3'
TGBfw 5' - CCTTCTAGATTTGAATAAGATGGATATT -3'
TGBrev 5' - ACAGAGCTCGAGTATCAATGGAAACT -3'
PVXCPfw 5' - TGATCTAGAAAAGATGTCAGCACCAGC -3'
PVXCPrev 5' - ACTGAGCTCTGGGGTAGGCGTCGGTT -3'
PVX8Kfw 5' - TGCTCTAGACTTTACTGATCTATGG -3'

【*N. benthamiana* の栽培とパーティクルガンによる遺伝子導入及び顕微鏡観察】

第2章の材料と方法を参照のこと。ただし、PVX 感染性プラスミド（名前が piX.で始まるもの）のパーティクルガンによる遺伝子導入では、ラプチャーディスクは 1100 psi の破壊圧のものを用いた。

結果

【TGB タンパクによる原形質連絡の SEL の上昇】

Potato virus X は、その細胞間移行に Triple gene block (TGB) にコードされた 3 種類のタンパク (25K タンパク、12K タンパク、8K タンパク) と外被タンパク (CP) の 4 種類のタンパクを必要とする。Tobamovirus と同様 PVX の感染に伴い原形質連絡の SEL が上昇する (Angell et al. 1996) ことから、移行に必要な 4 種類のタンパクの中に原形質連絡の透過性を高める機能を持っているものが存在すると考えられる。4 種類のタンパクのうち、どのタンパクにその機能が存在するのかを、第 2 章で用いた GFP 遺伝子との同時導入によるアッセイ系で調べた。

TGB タンパクあるいは CP を一過的に発現するプラスミド p35X25、p35X12、p35X8、p35XCP を作成し (図 15B)、pBIG3 (G3GFP を一過的に発現する) と共に *N. benthamiana* の葉にパーティクルガン法で導入した。遺伝子導入から 24 時間後に蛍光顕微鏡観察し、G3GFP の細胞間拡散 (ハロー) が観察される頻度を調べたところ、p35X12 と pBIG3 の組み合わせで同時導入した場合のみ約半数の GFP 発現部位でハローが観察された (図 16B、表 6)。p35X25、p35X8、p35XCP との同時導入における GFP の拡散の頻度は pBIG3 単独で導入した場合と変わらなかった (図 16A, C, D、表 6)。この結果から、12K タンパクが原形質連絡の透過性を上昇させる活性を持っていることが分かった。それ以外のタンパクにはそのような活性は見い出されなかった。

【PVX の DNA 感染系と trans-complementation 実験】

pPVX201 (David Baulcombe 博士より分与、Baulcombe et al. 1995) は、35S プロモーターにより植物細胞内で PVX のゲノム RNA を発現するプラスミドであり、パーティクルガンで植物細胞に導入することで PVX を感染させることができる。この PVX は重複した CP サブゲノムプロモーターにより外来遺伝子を発現するように設計されている。このプラスミドを利用し、複製に伴って GFP を発現する PVX の DNA 感染プラスミドを構築した。PVX 感染細胞を正確に同定するため、細胞間を拡散しない erG3GFP (ER に局在する G3GFP。表 1 参照) の遺伝子を pPVX201 に組み込み、piX.erG3 を作

成した (図 15A)。このプラスミドをパーティクルガンで *N. benthamiana* の葉に導入した。導入3日後には、図 17A に示したように PVX 感染した細胞の集州が観察された。遺伝子導入2日後では GFP の蛍光が弱かったため、以後の実験では観察は全て遺伝子導入3日後に行った。

次に、細胞間移行能を欠損した PVX のコンストラクトを作成した。25K タンパク遺伝子と 12K タンパク遺伝子にはそれぞれフレームシフト変異を導入し、piX.erG3(25fs) 及び piX.erG3(12fs)を作成した。CP 遺伝子には 635 塩基の内部欠失変異を導入した piX.erG3(Cd)を作成した (図 15A)。以後これらのプラスミドから発現するウイルスを PVX.erG3(25fs)、PVX.erG3(12fs)、PVX.erG3(Cd)のようにピリオドの後にレポーター遺伝子、かっこ内に変異の名前を入れて表記することにする。

変異 PVX のコンストラクトを *N. benthamiana* の葉に導入したところ、PVX.erG3(25fs)、PVX.erG3(12fs)、及び PVX.erG3(Cd)の感染は、全ての部位において1細胞にとどまっていた (図 17B, C, D、表7)。これにより 25K タンパク、12K タンパク、CP の遺伝子を欠く PVX は細胞間移行できないことが確認された。

次に 25K タンパク、12K タンパク、CP を一過的に発現するプラスミドを、それぞれに対応する遺伝子に変異を導入した PVX の感染性プラスミドと共に導入し、trans-complementation 実験を行った。その際、第2章と同様 pBImGFP5ER を共に導入し、UV 照射によって遺伝子導入された細胞を同定できるようにした。25K タンパク、12K タンパク及び CP の一過性発現により、各変異体 PVX の移行能欠損は相補され、複数細胞で erG3GFP の発現が観察された。また、表 8 に示すように、76~83%の感染部位で、遺伝子導入された細胞から細胞境界2つ以上越えたところまで PVX の感染は進行していた (図 18A-D, G, H、表 8)。したがって、25K タンパク、12K タンパク及び CP は、発現した細胞に隣接する細胞においても機能することが明らかになった。このことからこれらのタンパクは PVX の移行に伴い、感染部位において細胞間移行することが示唆された。

【8K タンパク欠損変異体の表現型および 12K タンパクの過剰発現による 8K タンパク

機能欠損の相補】

8K タンパク 遺伝子を不活化するため、8K タンパク ORF にフレームシフトを伴う 44 塩基の欠失変異を導入したコンストラクト piX.erG3(8d)を作成した。このプラスミドを *N. benthamiana* の葉の細胞に導入したところ、約 10%の PVX.erG3(8d)の感染部位において、2~4 個の互いに隣接する細胞で erG3GFP の発現が観察され、PVX.erG3(8d)はわずかながら細胞間移行することが分かった (data not shown)。PVX.erG3(8d)には 12K タンパク ORF とオーバーラップした 8K タンパクの N 末端 23 アミノ酸をコードする部分が残っている。この 8K タンパクの N 末端部分の発現が PVX.erG3(8d)の細胞間移行の原因になっている可能性が考えられた。そこでこの部分の発現を完全に抑えるため、上述の 44 塩基の欠失に加えて、8K タンパク ORF の開始コドン AUG を ACG に変える塩基置換を導入した (図 15A)。この塩基置換は 12K タンパクのアミノ酸置換を伴わない。この塩基置換を導入したプラスミド piX.erG3(8dm)を用いた実験でも、約 14%の感染部位で PVX.erG3(8dm)が複数細胞に拡がったことを示す像が観察された (図 17F、表 7)。PVX.erG3(8d)、PVX.erG3(8dm)どちらの変異体も同程度に細胞間移行することから、8K タンパクは PVX の細胞間移行に必要な不可欠なものではないことが示唆された。

このことを別のプラスミドの組み合わせで確認することにした。TGB タンパクと CP の全てを欠くウイルスのコンストラクト piX.erG3(TdCd)を作成し (図 15A)、p35X25、p35X12、p35XCP の 3 種類のプラスミドと共に葉の細胞に導入した。25K タンパク、12K タンパク、CP の共発現により、図 17H に例示するように、約 34%の感染部位で PVX.erG3(TdCd)の細胞間移行が観察された (表 7)。また、piX.erG3(TdCd)を p35X25、p35X12、p35X8、p35XCP の 4 種類のプラスミドと共に導入した場合、ウイルスの移行が観察される割合は 82%に上昇した (図 17I、表 7)。この結果から、8K タンパクは PVX が細胞間移行するために不可欠なものではないが、移行の効率を高めるために必要であると結論づけられた。

25K タンパク、12K タンパク、CP を共発現させた場合、PVX.erG3(TdCd)の細胞間移行が観察される割合 (34%) は PVX.erG3(8dm)単独の感染の場合 (14%) に比べて有意に高かった (表 7)。このことから、35S プロモーターによって 25K タンパク、12K

タンパク、CP のいずれかが過剰発現されたことで 8K タンパクの機能欠損が相補された可能性が考えられた。

この可能性を検討するため、piX.erG3(8dm)を p35X25、p35X12、p35XCP のいずれか一つと共に葉の細胞に導入した。その結果、piX.erG3(8dm)を p35X12 と共に導入した場合に、約 60%の感染部位でウイルスの移行が観察された (図 17J、表 7)。このことから PVX.erG3(8dm)の移行能欠損は 12K タンパクの過剰発現によって部分的に相補されることが判明した。一方、p35X25 または p35XCP との同時導入では、ウイルスの細胞間移行が観察される割合は piX.erG3(8dm)を単独で導入した場合と変わらなかった (表 7)。また、positive control として piX.erG3(8dm)を p35X8 と共に導入した場合には、約 90%の部位で PVX の移行が観察された。PVX.erG3(25fs)及び PVX.erG3(Cd)の移行能欠損は 12K タンパクの一過的発現によって相補されなかった (図 17K、L、表 7)。したがって 8K タンパクの機能欠損は 12K タンパクの過剰発現によって相補されることが分かった。

【8K タンパクの作用範囲】

一過的に発現した 8K タンパクが、ウイルスの移行に伴って感染部位で細胞間移行するかどうかを明らかにするため、piX.erG3(8dm)、p35X8、pBIImGFP5ER の 3 種類のプラスミドを *N. benthamiana* の葉に導入した。表 8 に示すように、約 91%の感染部位において PVX.erG3(8dm)の感染域は遺伝子導入された細胞に隣接する細胞までであった (図 18、表 8)。残り 9%の感染部位では PVX.erG3(8dm)は遺伝子導入された細胞に接していない細胞まで移行していた。しかし、この割合は 8K タンパク非存在下での PVX.erG3(8dm)の細胞間移行のレベルと同程度であった。したがって 8K タンパクは遺伝子導入された細胞においてのみ機能し、ウイルスの移行に伴って細胞間を移行することはないと考えられた。

考察

【12K タンパクによる原形質連絡の SEL 増大】

原形質連絡の透過性を高めるという機能は、多くの MP に共通すると考えられている機能である。様々な分子量のデキストランをマイクロインジェクションする方法により、Potexvirus の移行に必要なタンパクの中では TGBp1 (25K タンパク) がその機能を担っているということが報告されていた (Lough et al. 1998)。しかし、第2章の序で述べたように、マイクロインジェクションにより得られる結果は必ずしも目的とするタンパク本来の生化学的な活性を反映していないという批判がある (Storms et al. 1998)。したがって原形質連絡の透過性を上昇させるという MP の活性は、別の方法でも確かめておく必要がある。

第2章では、MP と GFP をそれぞれ一過的に発現するプラスミドをパーティクルガン法により葉の細胞に同時導入するという方法で、Tobamovirus の MP や CMV の 3a タンパクが GFP の細胞間の拡散を促進することを明らかにした。これらのタンパクは、過去にマイクロインジェクションを用いた解析でも、原形質連絡の SEL を増大させることが報告されている (Waigmann et al. 1994, Wolf et al. 1991, Vaquero et al. 1994)。したがって、MP と GFP の同時導入の実験系は、MP の SEL 増大活性を検出するための系として利用可能であると考えられる。

PVX の TGB タンパク及び CP についてもこの系を用いて SEL 増大活性を調べたところ、12K タンパクがこの活性を持つことが分かった。12K タンパクが原形質連絡の透過性を上昇させるという知見はこれまで得られていない。しかし Angell らは 25K タンパクを欠いた PVX が感染した細胞でも非感染細胞に比べてわずかにデキストランの移行が促進されていることを報告し、SEL の増大にかかわるタンパクが 25K タンパクだけではないということを述べている (Angell et al. 1996)。このわずかな SEL の上昇は 12K タンパクの機能によるものかもしれない。12K タンパクは膜タンパクに特徴的な疎水的なドメインを持ち、細胞内で ER と思われる細胞内膜系と相互作用することが示唆されている (Solovyev et al. 2000)。一方、原形質連絡の構成成分の一つである desmotubule は ER 膜由来の構造であることから、12K タンパクは ER との相互作用を介して原形質

連絡の SEL を上昇させるのかもしれない。

これまで SEL 上昇活性を持つと考えられてきた 25K タンパクについて、その活性が検出されなかった理由は不明であるが、上述したようにマイクロインジェクションを用いた解析には問題点があり、これまで 25K タンパクについて観察されてきた SEL の増大は何か二次的な効果によるのかもしれない。しかし trans-complementation 実験の結果は PVX 感染部位において 25K タンパクが原形質連絡を通過していることを示唆している。このことから 25K タンパクがウイルス感染特異的に原形質連絡と相互作用し、SEL を上昇させる可能性は否定できない。しかし GFP 遺伝子との同時導入の結果を見るかぎり、PVX がコードするタンパクのうち、原形質連絡の SEL の上昇に中心的な役割を果たしているのは 12K タンパクであると思われる。

【感染細胞における TGB タンパク及び CP の細胞間移行】

Trans-complementation 実験により、25K タンパク、12K タンパク及び CP は 1 細胞で一過的に発現させた場合、隣接細胞においても機能し、ウイルスをさらにその先の細胞まで移行させることが分かった。これにより、25K タンパク、12K タンパク、CP の 3 種類のタンパクは、PVX 感染細胞において、ウイルスの移行に伴って細胞間を移行していることが示唆された。一方、8K タンパクは発現した細胞においてのみ機能することが分かった。

これまでにウイルス非感染細胞において 12K タンパク及び CP が細胞間移行するという報告はない。本章の序で述べたように、N 末端に GFP を融合した 25K タンパクは細胞間移行し、一方、C 末端に GFP を融合した 25K タンパクは移行しないと報告されている (Yang et al. 2000)。この 2 種類の融合タンパクに関して、両者とも PVX を移行させる機能を持つという報告と (Yang et al. 2000)、C 末端に GFP を融合した 25K タンパクだけが PVX を移行させる活性を持つという報告がある (Morozov et al. 1999)。したがって、25K タンパクが細胞間移行能を持っているのかという問題は未解決のままであった。一方、ウイルス感染部位では、1 細胞で発現した 25K タンパク、12K タンパク及び CP が隣接細胞においても明らかに機能する。したがって、第 2 章で示した ToMV

の場合と同様に、25K タンパク、12K タンパク及び CP の細胞間移行は PVX の複製によって促進されると考えられる。このことは PVX の移行と複製の間には何らかの相互作用が存在することを示唆する。

Trans-complementation の実験系を用いた解析により、Lough ら (2000) は 25K タンパク及び CP がウイルスの移行に伴って細胞間移行していることを報告した (Lough et al. 2000)。しかし、彼らの報告は、12K タンパクは 1 細胞で一過的に発現させた場合、その細胞でのみ機能し、隣接細胞までしかウイルスを移行させられないという点で、本研究で得た結果とは矛盾している。彼らの解析と本研究で行った解析とはいくつかの点で異なるが、最も重要と考えられる相違点は、用いた PVX ベクターとウイルスの複製を同定するためのレポーターにある。本研究では、重複した CP サブゲノムプロモーターからレポーターとして erG3GFP を発現する PVX を用いたが、彼らの解析では、GFP-2A-CP 融合タンパクを発現する PVX を用いている。GFP-2A-CP 融合タンパク自身は機能しないが、自己切断活性を持つアミノ酸配列である 2A 配列の働きにより、活性を持つ CP が生成し、この PVX は細胞間移行できるようになる (Santa Cruz et al. 1996)。しかし、GFP-2A-CP 融合タンパクを発現する PVX の移行は、重複した CP サブゲノムプロモーターから GFP を発現するタイプのものに比べて遅いことが報告されている (Santa Cruz et al. 1996)。その理由として、2A 配列による自己切断が完全ではないため、少なからず存在する GFP-2A-CP 融合タンパクが、ウイルスの細胞間移行において阻害的に働いていることが考えられる。Lough らが行った GFP-2A-CP を発現する PVX を用いた trans-complementation の系では、12K タンパクまたは 8K タンパク遺伝子を各変異 PVX のコンストラクトと共に導入した場合、PVX の移行能欠損が相補されない割合が約 60% ~70% と非常に高い (Lough et al. 2000)。一方、本研究では、8K タンパクの機能喪失が 12K タンパクの過剰発現により相補されることを示した。このことから、GFP-2A-CP 融合タンパクは 12K タンパクの機能に対して阻害的に働くのではないかと考えられる。この観点から、CP と 12K タンパクとの相互作用、もしくは移行機能における両者の関連性を調べてみると興味深い知見が得られるかもしれない。

【PVX の細胞間移行における 8K タンパクの役割】

8K タンパクを欠く PVX は、細胞間移行能を完全には失っていなかった。このことは、PVX は 8K タンパクを欠いても細胞間移行することができるが、効率よく移行するためには 8K タンパクの機能が必要であることを意味する。また、PVX.erG3(8dm)が細胞間移行する割合は 12K タンパクの過剰発現により上昇した。従って、12K タンパクは 8K タンパクが存在しない場合、十分に機能できないが、過剰発現により、その機能レベルを回復できると考えられる。すなわち、8K タンパクの役割は、12K タンパクが十分にその機能を果たせるように補助することであるといえる。

N. benthamiana の葉の表皮細胞では、GFP-12K 融合タンパクは、細胞内部の ER 膜由来と考えられる構造に局在するが、8K タンパクを共に発現させると、GFP-12K 融合タンパクの局在は細胞の周縁部に変化することが報告されている (Solovyev et al. 2000)。このことから、8K タンパクの役割は 12K タンパクを細胞の周縁部に局在させることであり、それによって原形質連絡の透過性を高める 12K タンパクの機能を補助しているのではないかと考えられる。また、12K タンパクの過剰発現により 8K タンパクの機能欠損を相補できることから、8K タンパクが存在しない場合でも 12K タンパクのごく一部は細胞周縁部に存在でき、機能すると考えられる。8K タンパクを欠く PVX が leaky な表現型を示すのはそのためであろう。

【PVX の細胞間移行のメカニズム】

以前 Lough らによって提唱された Potexvirus の細胞間移行に関するモデルでは、ゲノム RNA が TGBp1 (25K タンパク) 及び CP と複合体 (vRNP) を構成し、原形質連絡を通過していくとされる。その際、原形質連絡の SEL を上昇させるタンパクは TGBp1 であると考えられている。一方、TGBp2 (12K タンパク) 及び TGBp3 (8K タンパク) は vRNP を複製の場から原形質連絡まで運搬する役割を担っており、原形質連絡に直接働きかけたり、そこを通過する際に必要であるとは考えられていなかった。

本研究では 1 細胞で一過的に発現した 25K タンパク、12K タンパク及び CP がウイルスの細胞間移行に伴って隣接細胞に移行することを示した。さらに、12K タンパクが

原形質連絡の SEL を増大させることを明らかにした。

これらの知見のうち、25K タンパク及び CP に関するものは、Lough らの提唱したモデルを支持するが、12K タンパクの役割については修正する必要がある。以下に本研究で明らかになった知見を考慮した Potexvirus の細胞間移行のモデルを提唱する (図 19)。

PVX ゲノム RNA は 25K タンパク、CP 及び 12K タンパクの 3 者と複合体 (vRNP) を構成し、原形質連絡を通過し、隣接細胞に移行していくと考えられる (図 19-3)。隣接細胞に放出された 25K タンパク、12K タンパク及び CP はウイルスをさらに先の細胞に移行させるために再利用されるのであろう (図 19-4)。

8K タンパクの役割は 12K タンパクの機能補助であることから、8K タンパクは 12K タンパクと相互作用し、vRNP を原形質連絡、あるいはその近傍まで運搬することであると考えられる。12K タンパク及び 8K タンパクはそのアミノ酸配列から膜タンパクであることが予想され、また、実際に細胞内で ER 膜や細胞膜に局在することが知られている (Hefferon et al. 1997, Solovyev et al. 2000)。これらのことを考慮すると、PVX の vRNP は小胞輸送の系に乗って原形質連絡に到達するという可能性が考えられる (図 19-1)。あるいは、vRNP は 8K タンパクの働きにより、細胞周縁部 (細胞膜) にまず輸送され、細胞膜上を原形質連絡まで運搬されるという可能性も考えられる (図 19-1、2)。

原形質連絡に到達した vRNP は、12K タンパクの機能によって拡張された原形質連絡の内部を通過して隣接細胞に移行していくと考えられる。8K タンパクは発現した細胞内でのみ機能することから、vRNP が原形質連絡を通過する前に、8K タンパクは解離するのであろう (図 19-3)。PVX 感染細胞では原形質連絡の中を貫通する desmotubule が破壊されていることから (Santa Cruz et al. 1998)、vRNP は原形質連絡内部の細胞膜上を移動して通過するのかもしれない。

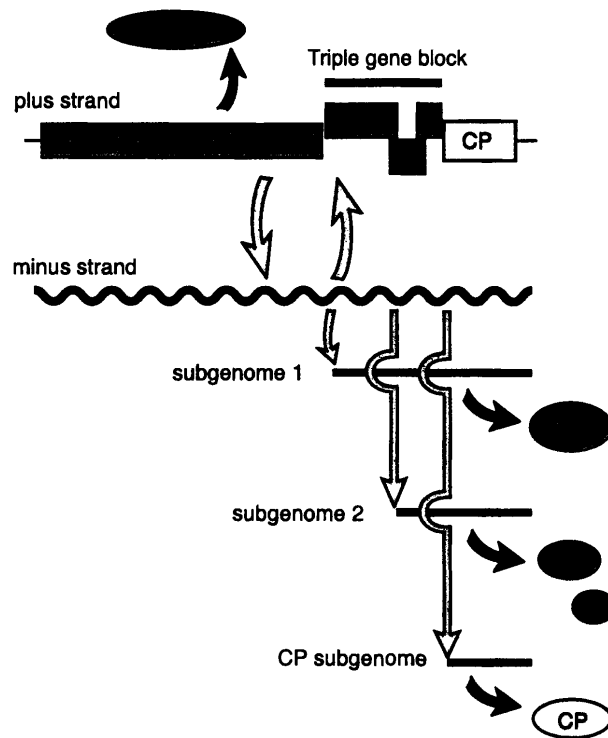


図14 PVXの複製とタンパク合成

ゲノムRNAのプラス鎖から翻訳される約160 kDaのRNA複製酵素により、プラス鎖を鋳型にマイナス鎖が合成される。逆にマイナス鎖を鋳型にプラス鎖が合成され、ウイルスは増殖する。また、マイナス鎖を鋳型に3種類のサブゲノムが合成され、それぞれのサブゲノムからTGBタンパクとCPが翻訳される。ただし、8Kタンパクは、12KタンパクORFの開始コドンのリボソームが通過し (leaky ribosome scanning)、8KタンパクORFの開始コドンを確認することによって合成される。

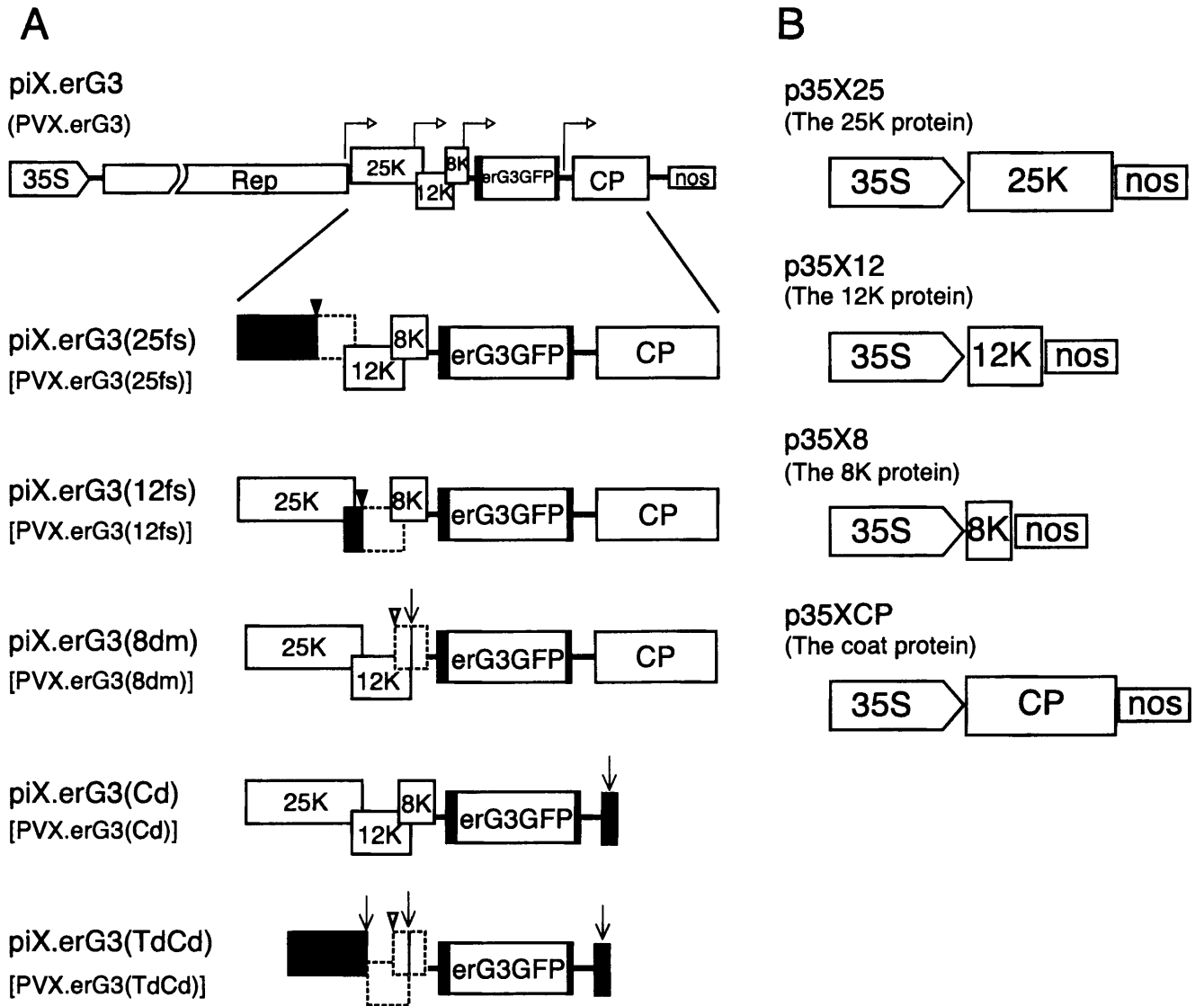


図15 実験に用いたプラスミドの模式図

(A) PVXの感染性プラスミドの模式図。最上段の折れた矢印はサブゲノムプロモーターの位置を示す。黒塗りの三角はフレームシフト変異、白塗りの三角は塩基置換変異を導入した箇所を示し、下向きの矢印は内部欠失変異を導入した箇所を示す。破線は各TGBタンパクORFの配列が残っているが、翻訳されない部分、また影付きの部分は翻訳される部分を示す。

(B) MP及びGFPの一過性発現プラスミドの模式図。プラスミド名の下()内に植物細胞内で発現するタンパクの名前を記した。

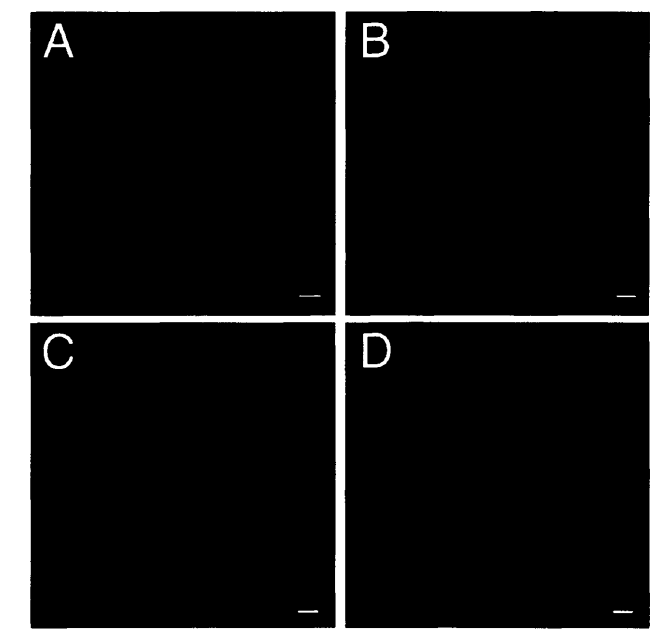


図16 TGBタンパク及びCPによるGFPの細胞間拡散
pBIG3を (A) p35X25、 (B) p35X12、 (C) p35X8、 (D) p35XCPと共に導入した。12Kタンパクを共発現した場合にGFPの細胞間の拡散が促進されたが (B)、他のタンパクとの共発現によってはGFPの拡散は促進されなかった (A、C、D)。観察は全て遺伝子導入後24時間で行った。Bar=25 μ m

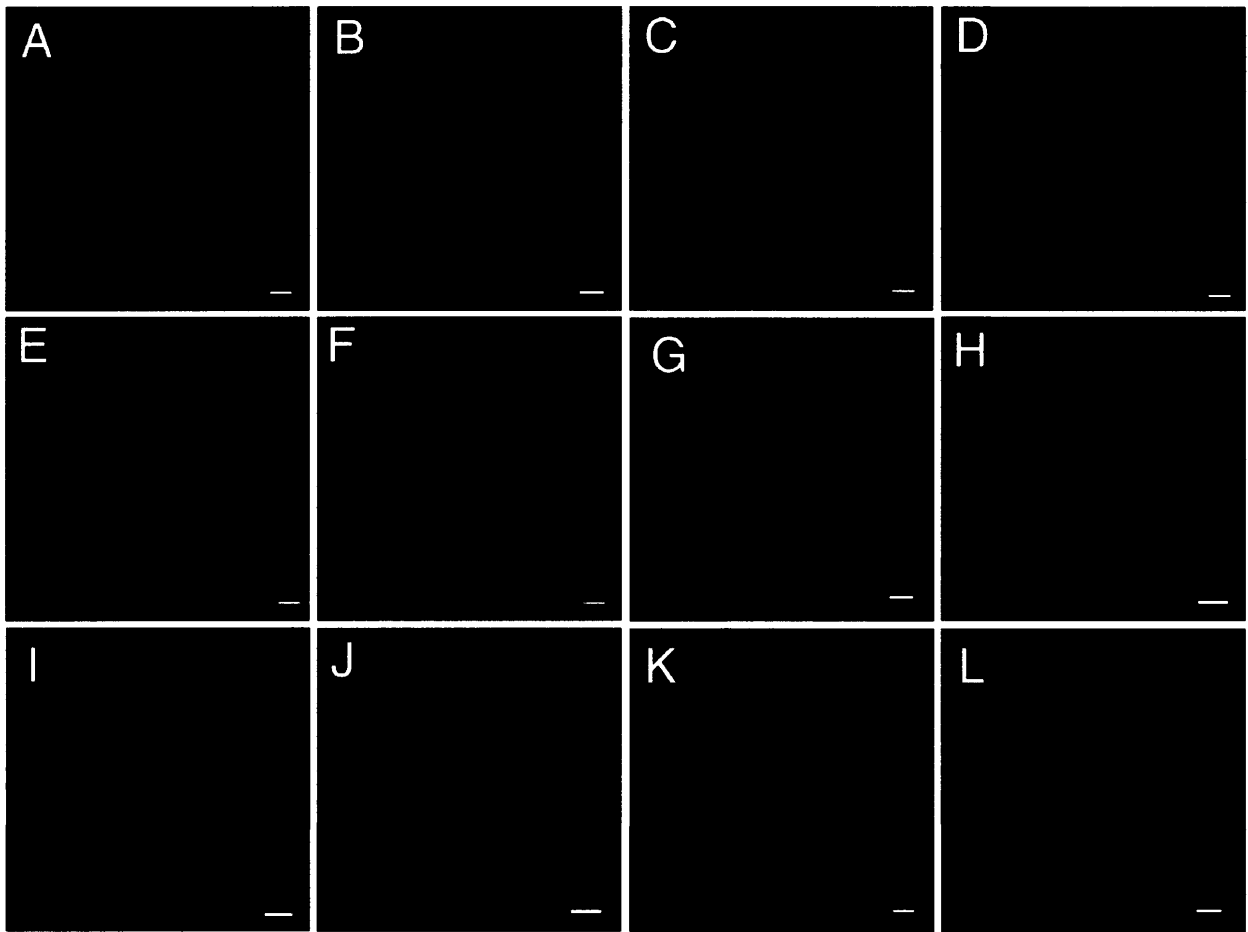


図17 PVXのDNA感染と移行能欠損の相補

(A) piX.erG3の*N.benthamiana*の本葉への導入から72時間後のウイルス感染部位。ウイルス感染に伴いGFPの蛍光が拡がっている様子が観察される。(B-G) 各TGBタンパク及びCPに変異を導入したPVXの感染部位。それぞれ (B) piX.erG3(25fs)、(C) piX.erG3(12fs)、(D) piX.erG3(Cd)、(E、F) piX.erG3(8dm)、(G) piX.erG3(TdCd)を導入した。piX.erG3(8dm)を導入した場合、約14%の部位でPVX.erG3(8dm)の感染が複数細胞に拡がっていた (F)。(H) piX.erG3(TdCd)をp35X25、p35X12、p35XCPの3種類のプラスミドと共に導入したところ、約34%の感染部位でPVX.erG3(TdCd)の移行が観察された。(I) piX.erG3(TdCd)をp35X25、p35X12、p35X8、p35XCPの4種類のプラスミドと共に導入した場合、約82%の感染部位でPVX.erG3(TdCd)の移行が観察された。(J) piX.erG3(8dm)とp35X12を同時導入したところ、約60%の感染部位でPVX.erG3(8dm)の移行能欠損が相補された。しかし、piX.erG3(25fs)とp35X12を導入した場合 (K) 及びpiX.erG3(Cd)とp35X12を導入した場合 (L) のいずれにおいてもPVXの移行能欠損は相補されなかった。B-Lも全て遺伝子導入後72時間で撮影したもの。Bar=50 μ m

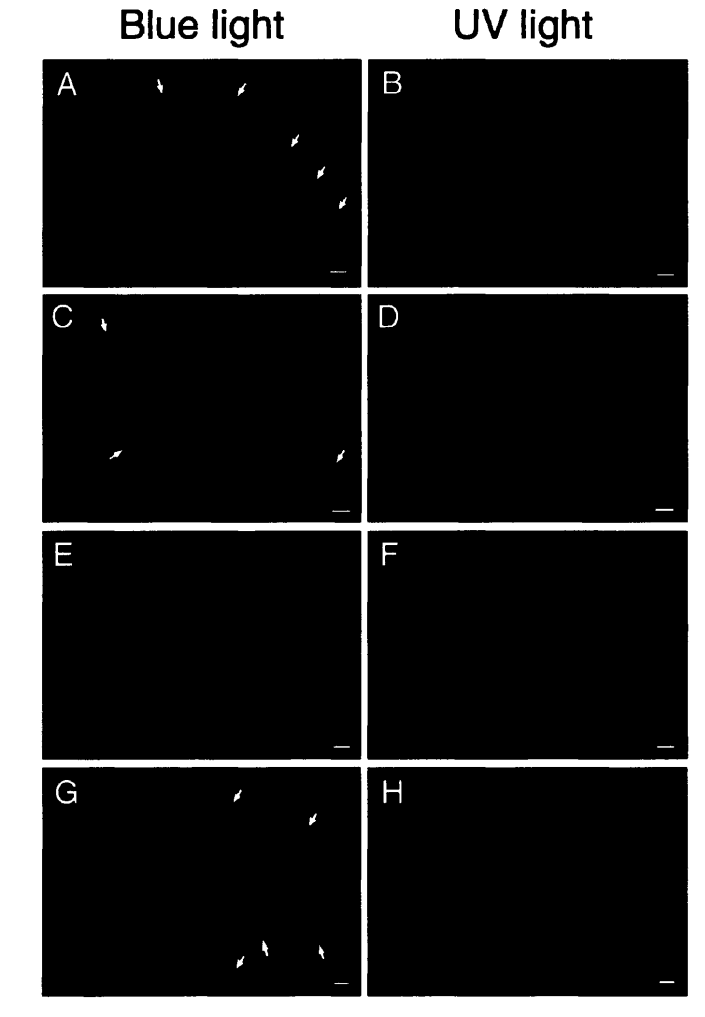


図18 Trans-complementation実験によって調べたTGBタンパク及びCPの作用範囲

(A, B) piX.erG3(25fs)、p35X25、pBImGFP5ERの3種類のプラスミドを同時導入した。(C, D) piX.erG3(12fs)、p35X12、pBImGFP5ERの組み合わせで導入した。(E, F) piX.erG3(8dm)、p35X8、pBImGFP5ERの組み合わせで導入した。(G, H) piX.erG3(Cd) p35XCP、pBImGFP5ERの組み合わせで導入した。A、C、E、Gは青色光照射下で、B、D、F、Hは同一の視野をUV照射下で撮影した。UV照射によって同定される遺伝子導入細胞の輪郭を赤線で示した。A、C、Gではこの細胞から細胞境界を2つ以上越えた細胞(矢印)でもGFPの蛍光が観察されることから、25Kタンパク、12Kタンパク、CPは遺伝子導入細胞に隣接する細胞においても機能していることが分かる。一方、EではGFPの蛍光は赤線で示した細胞に直接境を接する細胞までしか拡がっていないことから、8Kタンパクは遺伝子導入細胞においてのみ機能していると考えられる。Bar=25 μ m。

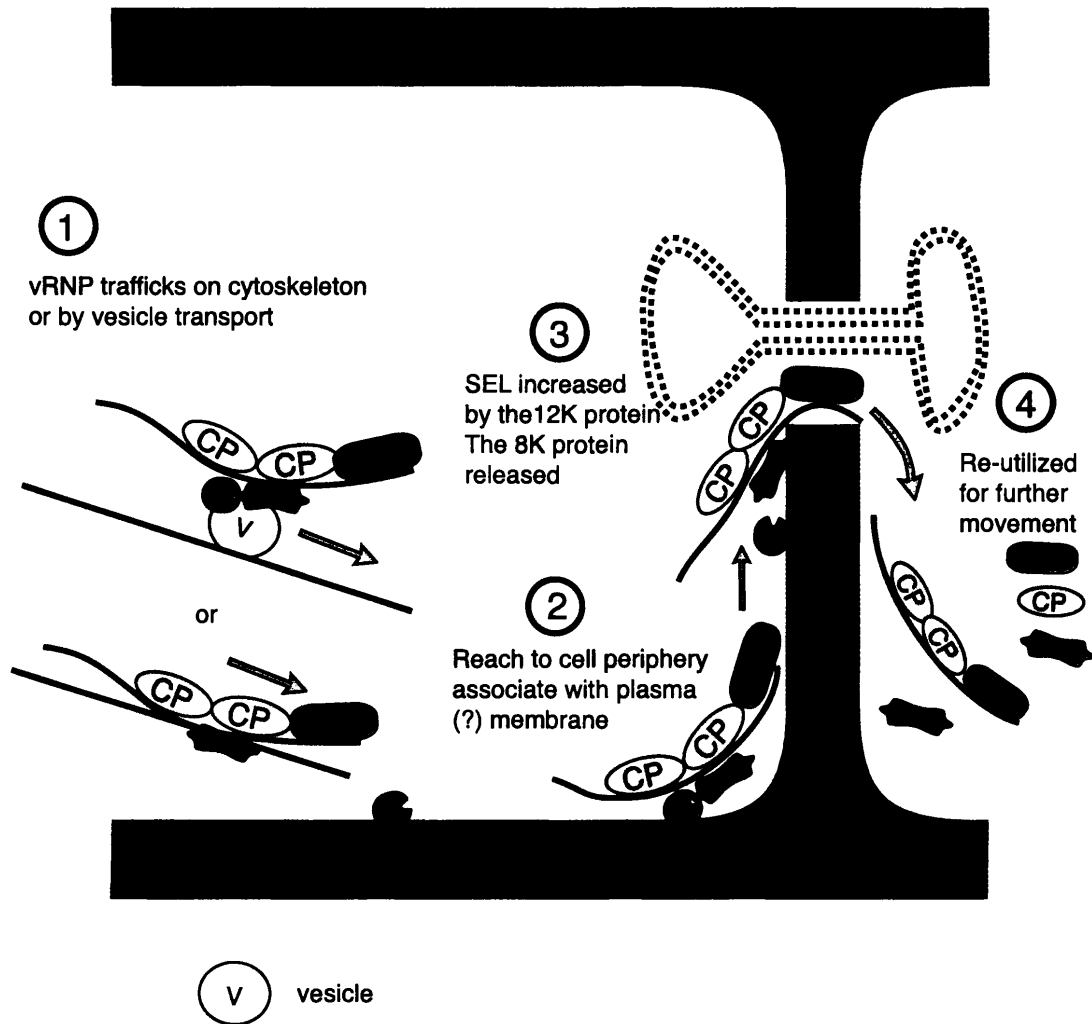


図19 PVXの細胞間移行のモデル

- 1、TGBタンパクとCPは、ゲノムRNAと複合体 (vRNP) を形成し、輸送小胞によって細胞の周縁部に運搬される。またはゲノムRNA、25Kタンパク、12KタンパクとCPの複合体が細胞周縁部に運ばれ、そこで8Kタンパクと結合する。
- 2、vRNPは細胞膜上または細胞周縁部のER膜上を原形質連絡まで移行する。
- 3、vRNPが原形質連絡に到達すると、8Kタンパクは解離する。また、12Kタンパクが原形質連絡に作用し、SELを増大させ、ゲノムRNA、25Kタンパク、12KタンパクとCPは隣接細胞に移行する。
- 4、隣接細胞に放出されたタンパクはウイルスをさらに隣の細胞に移行させるため、再利用される。

vRNPには複製に関わるコンポーネントが含まれている可能性も考えられるが、図を簡略化するため示さなかった。

表 6. TGB タンパク及び CP の GFP の細胞間拡散に対する影響

expressed proteins	frequency of GFP signals in two or more adjoining cells (%)
G3GFP + 25K	17/283 (6)
G3GFP + 12K	108/192 (56)
G3GFP + 8K	12/199 (6)
G3GFP + CP	10/144 (7)

データは遺伝子導入後 24 時間での（複数細胞で GFP の蛍光が観察された部位の数） / （GFP の蛍光が観察された部位の総数）を示す。（）内の数字はその%である。また、tichome の細胞間では GFP の移行が MP 非存在下でも頻繁に観察されるため、数に含めていない。

表 7. 各変異体 PVX の表現型と移行能欠損の相補

PVX mutant	co-expressed protein (s)	single-cell infection (%)	2 cells infected (%)	3 or more cells infected (%)
PVX.erG3(25fs)	-	47 (100)	0 (0)	0 (0)
PVX.erG3(12fs)	-	58 (100)	0 (0)	0 (0)
PVX.erG3(8dm)	-	101 (86)	13 (11)	4 (3)
PVX.erG3(Cd)	-	45 (100)	0 (0)	0 (0)
PVX.erG3(TdCd)	-	30 (100)	0 (0)	0 (0)
PVX.erG3(TdCd)	25K+12K+8K+CP	42 (18)	19 (8)	177 (74)
PVX.erG3(TdCd)	25K+12K+CP	95 (66)	31 (22)	18 (12)
PVX.erG3(8dm)	25K	100 (87)	12 (11)	2 (2)
PVX.erG3(8dm)	12K	55 (40)	32 (23)	51 (37)
PVX.erG3(8dm)	8K	13 (9)	22 (16)	105 (75)
PVX.erG3(8dm)	CP	73 (91)	6 (8)	1 (1)
PVX.erG3(25fs)	12K	33 (100)	0 (0)	0 (0)
PVX.erG3(Cd)	12K	58 (100)	0 (0)	0 (0)

移行能を欠損した PVX の感染性プラスミドを単独で、または TGB タンパク及び CP を発現するプラスミドと共に導入し、遺伝子導入後 72 時間で GFP を発現している細胞の数をカウントした。() 内の数字は全感染部位に対する割合を%で示したものである。ただし、葉肉細胞は細胞の形がわかりにくいため、数に含めなかった。

表 8. TGB タンパク及び CP の一過性発現による移行能欠損 PVX の感染範囲

bombarded plasmids ^a	cell-cell boundaries ^b		total no. of infection sites
	1	2 or more	
piX.erG3(25d) + p35/X25 + pBImGFP5ER	16 (17)	88 (83)	104
piX.erG3(12d) + p35/X12 + pBImGFP5ER	22 (24)	68 (76)	90
piX.erG3(8dm) + p35/X8 + pBImGFP5ER	64 (91)	6 (9)	70
piX.erG3(Cd) + p35/XCP + pBImGFP5ER	9 (17)	44 (83)	53

^a プラスミドの構造は図 15 に示した。

^b 数字は表に示した数の細胞境界を越えて PVX.erG3(SF3)が移行した感染部位の数を示す。() 内に全感染部位に対する割合を%で示す。典型的な感染パターンを図 18 に示した。

第4章 異種ウイルス間での移行能欠損相補実験による 細胞間移行の解析

序

植物ウイルスの MP は、ウイルス種によってアミノ酸配列や発現様式がそれぞれ異なっている。また、第 2 章、第 3 章では ToMV、PVX の細胞間移行と複製が協調的に行われている可能性があることを述べた。これらのことから細胞間移行のメカニズムはウイルス種によって異なり、MP とウイルスの間には特異性が存在すると考えられる。しかし、あるウイルスの移行機能が異種ウイルスの移行能欠損をを相補することを示唆する研究結果も報告されている。PVX を Tobamovirus 属の SHMV や Hordeivirus 属の Barley stripe mosaic virus (BSMV) と共に接種すると、PVX が本来移行できない種類の植物において移行することや、MP 遺伝子を欠損した PVX が SHMV との同時接種によって細胞間移行することが報告されている (Atabekov et al. 1999, Malysenko et al. 1989)。キメラウイルスを用いた解析では、BSMV の MP 遺伝子を TMV の MP または RCNMV (Dianthovirus の一つ) の MP と入れ替えても細胞間移行することや、RCNMV の MP を持つキメラ TMV が細胞間移行することも報告されている (Solovyev et al. 1996, 1997, Giesman-Cookmeyer et al. 1995)。また、TMV の MP を発現するトランスジェニックタバコにおいて、MP を欠損した CMV や RCNMV が細胞間移行することが報告されている (Cooper et al. 1996, Giesman-Cookmeyer et al. 1995)。

Morozov ら (1997) は、25K タンパクを欠く PVX の移行能欠損が、ToMV や Cr-TMV の MP の一過性発現により相補されることを報告した (Morozov et al. 1997)。しかし一方で、TMV の MP を発現するトランスジェニックタバコにおいて 25K タンパクを欠く PVX が移行できないという報告もあり (Ares et al. 1998)、PVX と Tobamovirus の移行機能が交換可能であるのかどうか分かっていなかった。

異種ウイルス間での細胞間移行の相補に関する知見を集め、その共通性と特異性を解析することは植物ウイルスの細胞間移行のメカニズムを理解する上で重要な手がかりを与えることになると考えられる。第 1 章で述べたように、DNA 感染系は異種ウイルス間での細胞間移行の相補現象の解析に応用可能である。そこで本研究では ToMV と PVX の DNA 感染系を用いた trans-complementation 実験により、異種ウイルス間での移行能欠損相補の解析を行った。また、本研究では、ToMV と PVX に加え、この両者と

は分類上異なる Cucumber mosaic virus (CMV) の MP と CP も併せて用い、解析を行った。

CMV は 3 分節のプラス鎖 RNA ゲノム (RNA1、RNA2、RNA3) を持つウイルスである。RNA1、RNA2 には 1a タンパクと 2a タンパクがコードされている (図 20A)。この 2 種類のタンパクはウイルス複製に必要なタンパクであり、1 細胞でのウイルス増殖には RNA1 と RNA2 だけで十分である。RNA3 には 3a タンパクと CP の 2 種類のタンパクがコードされており (図 20A)、CMV の細胞間移行にはこの両者が必須である (Canto et al. 1997)。したがって 3 本のゲノム RNA が同時に宿主植物の細胞に侵入することが全身感染に必要なとなる。

マイクロインジェクションを用いた解析により、3a タンパクは 10 kDa のデキストランを細胞間拡散させることが報告されている (Vaquero et al. 1994, Ding et al. 1995)。第 2 章でも 3a タンパクは GFP の細胞間の拡散を促進することが示されており、3a タンパクは原形質連絡の透過性を高める機能を持つと考えられる。また、in vitro の系において 3a タンパクは配列非特異的に RNA を結合することも報告されている (Ding et al. 1995, Li and Palukaitis 1996, Vaquero et al. 1997)。このような 3a タンパクの性質は TMV の MP と類似している。しかし、CMV の 3a タンパクを発現するトランスジェニックタバコでは MP 欠損 TMV は移行できないことが報告されている (Cooper et al. 1996)。

本研究ではまず、ToMV と PVX の移行機能が互いの移行能欠損を相補できるか調べた。その結果、ToMV と PVX の MP の一過性発現によって、それぞれ互いの移行能欠損は相補されないことを明らかにした。また、本章では CMV の 3a タンパクと CP 両者の一過性発現によって、ToMV と PVX 両者の移行能欠損が相補されることを明らかにした。しかし CP を必要としなくなる変異 3a タンパクは ToMV を移行させるが PVX は移行させないことから、CMV の 3a タンパク及び 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。

材料と方法

【CMV3a タンパク及び CP の一過性発現プラスミドの構築】

p35YM、p35YMd33、p35YCP

CMV (Y 系統) の 3a タンパクをコードするプラスミド pYMI22 (北海道大学石川雅之博士より分与) をテンプレートとし、3a-fw 及び 3aDelrev プライマーを用いた PCR により増幅した DNA 断片 (C3a Δ C33 をコードする) を *Bam*HI-*Sac*I 消化し、pBI221 の *Bam*HI 部位と *Sac*I 部位の間に挿入して p35YMd33 を得た。pYMI22 を *Bam*HI 消化し、末端を平滑化した後 *Nde*I 消化して得られる C3a をコードする断片を p35YMd33 の *Nde*I 部位と平滑化した *Sac*I 部位の間に挿入して p35YM を得た。CMV の CP 遺伝子を含むプラスミド pC3-3a247T (京都大学永野秀昭博士より分与、Nagano et al. 1997) をテンプレートとし、YCPfw 及び YCPrev プライマーを用いた PCR により YCP をコードする断片を増幅し、*Bam*HI-*Sac*I 消化して pBI221 の *Bam*HI 部位と *Sac*I 部位の間に挿入して p35YCP を得た。

プライマーの配列を以下に示す。プラスミド構築のために利用した制限酵素の認識配列を囲み線で示す。

YCPfw 5' - AGTGGATCCATGGACAAATCTGAATCA -3'
YCPrev 5' - TTTGAGCTCAGACTGGGAGCACTC -3'
3a-fw 5' - GGAAGGATCCCATATGGCTTTCCAAGGTA -3'
3aDelrev 5' - TCCGAGCTCTAACTGCGCGCATTCTGATT -3'

【*N. benthamiana* の栽培とパーティクルガンによる遺伝子導入及び顕微鏡観察】

第2章の材料と方法を参照のこと。ただし、PVX 感染性プラスミド (名前が piX で始まるもの) のパーティクルガンによる遺伝子導入では、ラプチャーディスクは 1100 psi の破壊圧のものを用いた。

結果

【移行能欠損 PVX と Tobamovirus の MP 遺伝子の同時導入】

PVX の細胞間移行能欠損が Tobamovirus の MP の一過性発現によって相補されるのかどうかを調べた。

25K タンパクを欠く PVX のコンストラクト piX.erG3(25fs)を p35LM (ToMV の MP を発現する：図 5B) と共に *N. benthamiana* の葉に導入し、3 日後に観察したところ、PVX.erG3(25fs)の感染は全ての感染部位で 1 細胞にとどまっていた (図 21A、表 9)。p35CcM (SHMV の MP を発現する：図 5B) との同時導入によっても PVX.erG3(25fs)の移行は全く見られなかった (図 21D、表 9)。しかし p35OMM (TMV の MP を発現する。図 5B) と同時導入した場合、約 10%の部位でウイルスの感染が数細胞に拡がっている様子が観察された (図 21C、表 9)。12K タンパクまたは CP を欠く PVX のコンストラクト piX.erG3(12fs)または piX.erG3(Cd)と p35LM を同時導入した場合にも PVX.erG3(12fs) または PVX.erG3(Cd)の細胞間移行は観察されなかった (表 9)。また、8K タンパクを欠くコンストラクト piX.erG3(8dm)と p35LM の同時導入では約 5%の部位で PVX.erG3(8dm)の細胞間移行が観察されたが、これは第 3 章に示すように 8K タンパクを欠く PVX がわずかに細胞間移行する能力を持っているためであると考えられた (表 9、表 7)。したがって、PVX の TGB タンパク及び CP のどの機能も ToMV の MP によっては代替できないことが分かった。しかし、TMV の MP が、弱いながらも PVX の移行能欠損を相補したことから、全ての Tobamovirus の移行機能が PVX の移行能欠損を相補しないわけではないことが示唆された。

TGB タンパク及び CP のいずれか一つだけを欠く PVX が感染した細胞では、それ以外の TGB タンパクまたは CP が PVX のゲノム RNA と相互作用する可能性がある。これにより、ToMV の MP と PVX ゲノム RNA との相互作用が阻害され、その結果変異 PVX の移行能欠損が相補されなかった可能性が考えられた。この可能性を検討するため、TGB タンパクと CP を全て欠く PVX の感染性クローン piX.erG3(TdCd)を p35LM と同時に導入したが、PVX.erG3(TdCd)の細胞間移行は全ての感染部位において観察されなかった (図 21E、表 9)。したがって、PVX の移行能欠損は ToMV の MP によって

相補できないことが分かった。

【移行能欠損 ToMV と TGB タンパク及び CP 遺伝子との同時導入】

逆の実験として、PVX のコードする移行機能によって ToMV の移行能欠損が相補されるかどうか調べるため、MP を欠く ToMV の感染性クローン piL.erG3(SF3)を、各 TGB タンパクと CP を一過的に発現する 4 種類のプラスミドと共に *N. benthamiana* の葉に導入した。しかし、ToMV.erG3(SF3)の細胞間移行は観察されなかった (図 21F、表 9)。第 3 章で示したとおり、PVX.erG3(TdCd)はこの 4 種類のプラスミドとの同時導入により、82%の感染部位で細胞間移行したことから (表 7)、計 5 種類のプラスミドの同時導入によっても、PVX.erG3(TdCd)の移行能欠損を相補するのに十分な量のタンパクが発現していると考えられる。したがって、PVX のコードする移行機能は ToMV の移行能欠損を相補できないことが分かった。

【CMV の 3a タンパクと CP による ToMV と PVX の移行】

CMV のコードする移行機能によって ToMV あるいは PVX の細胞間移行能欠損が相補できるかどうか trans-complementation 実験により調べた。piL.erG3(SF3)を CMV (Y 系統) の 3a タンパク (MP) を発現するプラスミド p35YM と同時に導入した場合は、ToMV.erG3(SF3)の細胞間移行は観察されなかった (図 22A、表 10)。ところが、CMV の CP を 3a タンパクと共に発現させた場合には、約 90%の感染部位において ToMV.erG3(SF3)の細胞間移行が観察された (図 22B、表 10)。なお、piL.erG3(SF3)と CMV の CP を発現する p35YCP との同時導入では ToMV.erG3(SF3)の移行は観察されなかった (表 10)。この結果から、CMV の 3a タンパクは原形質連絡の透過性を高め、RNA を結合する能力を有するが、それだけでは ToMV を細胞間移行させることはできず、CMV の移行に必要なコンポーネント (3a タンパクと CP) がそろった場合にのみ ToMV を移行させうることが分かった。

3a タンパクの C 末端 33 アミノ酸を欠失させると、その CMV は細胞間移行に CP を必要としなくなることが報告されている (Nagano et al. 1999)。この現象が ToMV の細

細胞間移行においても見られるか検証するため、C 末端 33 アミノ酸を欠失した 3a タンパク (3a Δ C33) を 35S プロモーターにより発現するプラスミド p35YMd33 を構築し、piL.erG3(SF3)と同時導入した。その結果、CP が存在しないにもかかわらず、97%の感染部位で ToMV の細胞間移行が観察された (図 22C、表 10)。このことから、ToMV の細胞間移行においても、CMV の場合と同様に C 末端 33 アミノ酸を欠失した 3a タンパクは CP 要求性を失うことが分かった。

3a Δ C33 単独の機能により CMV は細胞間移行する。しかし 3a Δ C33 と同時に完全長の 3a タンパクを発現するような組み換え CMV は、移行の速度が野生型あるいは 3a Δ C33 を発現する変異 CMV よりも遅いことが報告されている (京都大学、永野秀昭博士からの私信)。この現象が MP 欠損 ToMV の移行の相補においても観察されるか調べるため、piL.erG3(SF3)と p35YM、p35YMd33 を同時に導入した。その結果、3a タンパクと 3a Δ C33 の共発現により、ToMV.erG3(SF3)の細胞間移行が観察される割合は 49%にまで減少し (図 22E、表 10)、3a Δ C33 による ToMV.erG3(SF3)の移行は 3a タンパクによって阻害されることが分かった。さらに、piL.erG3(SF3)と p35YM、p35YMd33、p35YCP の 4 種類のプラスミドを導入し、3a、3a Δ C33 及び CP の 3 者を共発現させると、ToMV.erG3(SF3)の細胞間移行が観察される割合は 85%にまで回復した。また、ToMV の MP と 3a を共発現させた場合には、約 95%の部位で ToMV.erG3(SF3)の細胞間移行が観察された。したがって、ToMV の MP による ToMV.erG3(SF3)の細胞間移行は、3a の発現により阻害されないことが分かった (表 10)。

PVX の移行能欠損を CMV がコードする移行機能によって相補できるかどうか同様の実験によって調べた。移行能欠損変異体としては TGB タンパクと CP を全て欠く PVX.erG3(TdCd)を用いた。PVX.erG3(TdCd)の移行能欠損は 3a 遺伝子との同時導入によっては相補されなかったが、3a タンパクと CP の両遺伝子を供給した場合、約半分の感染部位で PVX の移行が観察された (図 23A, B、表 11)。しかし ToMV の場合とは異なり、C3a Δ C33 の発現によっては PVX.erG3(TdCd)の移行能欠損は相補されなかった。また、C3a Δ C33 に加えて CP 遺伝子を供給しても PVX.erG3(TdCd)の移行能欠損は相補されなかった (図 23C, D、表 11)。

これらの結果から、MP 欠損 ToMV の移行には CMV の 3a と CP 両者が必要であること、3a の C 末端の欠損により CP 要求性を失うこと、また、3a Δ C33 の機能による ToMV の移行に対して、完全長の 3a は阻害的に働くことなど、ToMV と CMV は細胞間移行に関して 3a タンパク及び CP への依存性が非常によく似ていることが分かった。しかし MP 欠損 PVX は 3a Δ C33 の機能によって移行できないことから、PVX の細胞間移行に関しては 3a タンパク及び CP への依存性が CMV、ToMV とは異なっていることが分かった。

考察

【細胞間移行における MP とウイルスの間の特異性】

本章では、ToMV と PVX の移行能欠損が互いの移行機能によって相補されないことを示した。両ウイルスの MP は共に原形質連絡の SEL 増大活性を持ち、RNA 結合能を有することが報告されている。しかし本研究で得られた結果は、ウイルスの細胞間移行には、これらの能力だけでは不十分であることを意味する。第2章では ToMV の MP の局在性がウイルス複製によって変化することから、MP が複製酵素複合体の構成成分または複製が起こることによって誘導される宿主因子と相互作用する可能性が示唆された。PVX の細胞間移行においても同様のことが起こる可能性を第3章で述べた。したがって、ToMV と PVX の間には、複製酵素や宿主因子と MP との相互作用において、互いに交換不能な関係があるのかもしれない。別の可能性として、ToMV と PVX の移行機能が交換不能であった原因が、MP と RNA の細胞内局在性の違いにあることが考えられる。ウイルスの細胞間移行には、MP がウイルスの複製の場に共存することが必要であると考えられる。ToMV も PVX も ER 膜に由来する封入体内で複製すると考えられている。しかし、それぞれのゲノム RNA の局在が互いの MP の局在と重ならないため、それぞれのウイルスの移行能欠損が他方のウイルスの MP によって相補されなかったのかもしれない。いずれにせよ、どちらのウイルスの MP も他方のウイルスの移行能欠損を相補できなかったことは、複製と細胞間移行との間に何らかの相互作用が存在するという説を支持する結果である。

ToMV、PVX 両者の移行能欠損は CMV の 3a タンパクの単独発現によっても相補されなかった。3a タンパクは 10kDa のデキストランを細胞間拡散させ、また配列非特異的に RNA を細胞間拡散させることがマイクロインジェクションを用いた解析によって示されている (Ding et al. 1995, Vaquero et al.1994)。また 3a タンパクは RNA 結合能を持つことも報告されている (Vaquero et al. 1997, Li and Palukaitis 1996)。SEL 増大活性や RNA 結合能を有するにもかかわらず、3a 単独では ToMV や PVX の移行能欠損を相補できないことから、ウイルスの細胞間移行はこれらの機能だけでは説明できないことが分かる。

【CMV の 3a タンパクと CP による ToMV 及び PVX の移行能欠損の相補】

3a タンパクは単独では ToMV や PVX の移行能欠損を相補できなかったが、CMV の CP との共発現によって ToMV と PVX 両者の移行能欠損を相補した。このことは、transgene から発現した 3a タンパクは MP を欠く TMV の細胞間移行を相補できないこと、また CMV の細胞間移行には 3a と CP の両者が必要であることと一致する (Cooper et al. 1996, Canto et al. 1997)。ToMV と PVX がコードする移行機能によって互いのウイルスは移行できないことから、これらのウイルスの移行のメカニズムには決定的に異なる部分があると考えられる。にもかかわらず、CMV がコードする細胞間移行の機能は両ウイルスを移行させることができた。したがって CMV の 3a タンパクと CP は、ウイルス種非特異的にゲノム RNA または複製複合体を細胞間移行させる能力があるのかもしれない。

3a と CP の共発現によって、ToMV.erG3(SF3)は約 90%の割合で細胞間移行したのに対し、PVX.erG3(TdCd)は約 50%しか移行しなかった。両ウイルスの移行の程度が異なる原因として、ToMV の複製複合体または移行に関わる宿主因子が、PVX のものよりも 3a と高い親和性を持って相互作用しているということが考えられる。その根拠として、3a Δ C33 の発現により ToMV の移行は相補されたが、PVX の移行は相補されなかったことが挙げられる。このことは 3a Δ C33 が ToMV の MP と類似した性質を持つことを示唆する。アミノ酸配列から立体構造を推測すると、Cucumovirus の 3a タンパクと Tobamovirus の MP には類似した部分が存在することが報告されている (Melcher 2000)。このことから、両者の MP は共に 30K タンパクスーパーファミリーという同じカテゴリーに分類できるといわれている (Melcher 2000)。

【3a タンパクによる細胞間移行の阻害】

3a Δ C33 は単独で MP 欠損 ToMV を移行させることができるが、完全長の 3a はできない。つまり、3a Δ C33 は MP 欠損 ToMV の移行に関して活性型であり、完全長の 3a は不活性型であると考えられる。また、3a Δ C33 と 3a を共発現させた場合、

3a Δ C33 による ToMV の移行が阻害されたことは、不活性型の 3a が活性型の 3a Δ C33 に対し、ドミナントネガティブ効果を発揮したと解釈できる。この阻害効果の分子機構として考えられることを図 24 に示す。

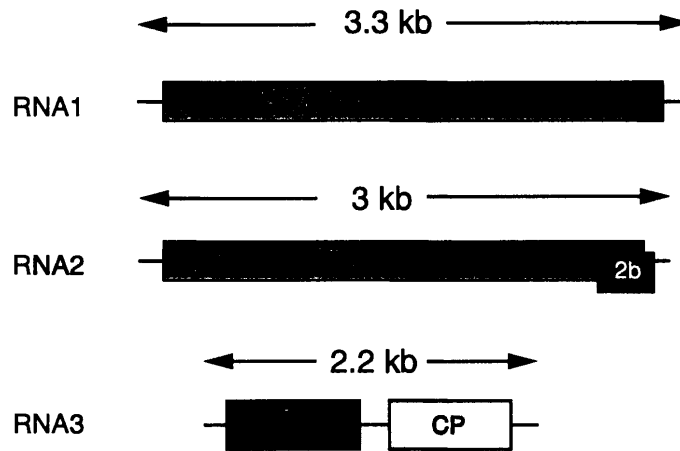
3a と CP が共存する場合、3a は活性型となり、ToMV のゲノム RNA、複製複合体及び宿主因子と共に移行可能な複合体を形成する (図 24-1)。3a Δ C33 は CP 非存在下でも活性型であり、移行可能な複合体を形成できる (図 24-1)。しかし、不活性型の 3a と活性型の 3a Δ C33 が共存すると、両者が ToMV の複製複合体またはゲノム RNA または宿主因子と競合的に相互作用し、その結果、移行能をもつ複合体の形成が阻害されると考えられる (図 24-3、4)。

また、ToMV の MP と 3a タンパクの共発現では細胞間移行の阻害は観察されなかったことから、3a タンパクと ToMV の MP では、相互作用部位が異なるか、相互作用する宿主因子が異なると考えられる (図 24、図 13 参照)。あるいは複製複合体または宿主因子との相互作用において、ToMV の MP の親和性は 3a タンパクよりもはるかに高いのかもしれない。

【移行相補現象の複雑性】

本章では ToMV と PVX の DNA 感染系を用い、異種ウイルス間での移行能欠損相補現象を一細胞レベルで詳細に解析し、ToMV と PVX の移行機能は互いに交換不能であることや、CMV の 3a と CP によって ToMV と PVX の移行能欠損は相補されることを明らかにした。しかし一方で、Tobamovirus の MP の中には PVX の移行能欠損を相補しうるものがあることや、CMV の 3a と CP の機能による移行の程度が ToMV と PVX では異なること、さらに C 末端欠損 3a タンパクに対し、両ウイルスは全く逆の応答をすることも分かった。このような複雑な結果は、植物ウイルスの細胞間移行のメカニズムが簡単に説明できるものではないことを意味する。植物ウイルスの移行のメカニズムを理解するには、今後さらに多くの種類のウイルス及びその MP を用いた移行相補現象の詳細な解析と共に、移行 (または複製) に関わる宿主因子の単離、及び機能解析が必要であろう。

A



B

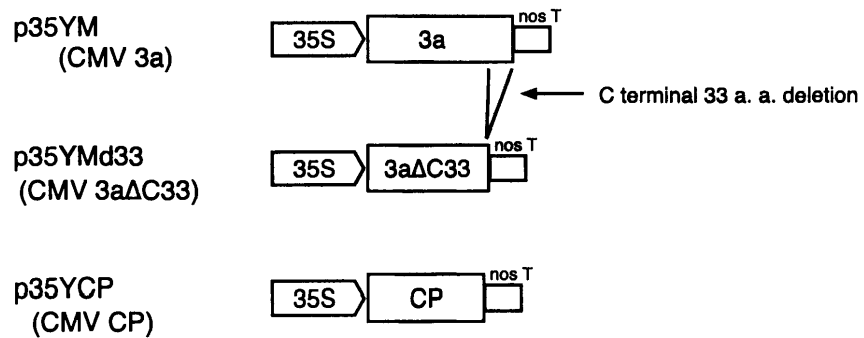


図20 CMVのゲノム構造と用いたプラスミドの構造

A、CMVのゲノム構造を模式的に示す。RNA1とRNA2にコードされる1aタンパクと2aタンパクはウイルスの複製を行う複製酵素である。RNA3にコードされる3aタンパクとCPはウイルスの細胞間移行に必要なタンパクである。2bタンパクはgene silencingを抑制する機能を持つことが報告されている (Brigneti et al. 1998)。

B、3aタンパク及びCPの一過性発現プラスミドの構造を示す。プラスミド名の下 () 内に発現するタンパクの名前を記す。3aΔC33はC末端33アミノ酸を欠失した3aタンパクを意味する。

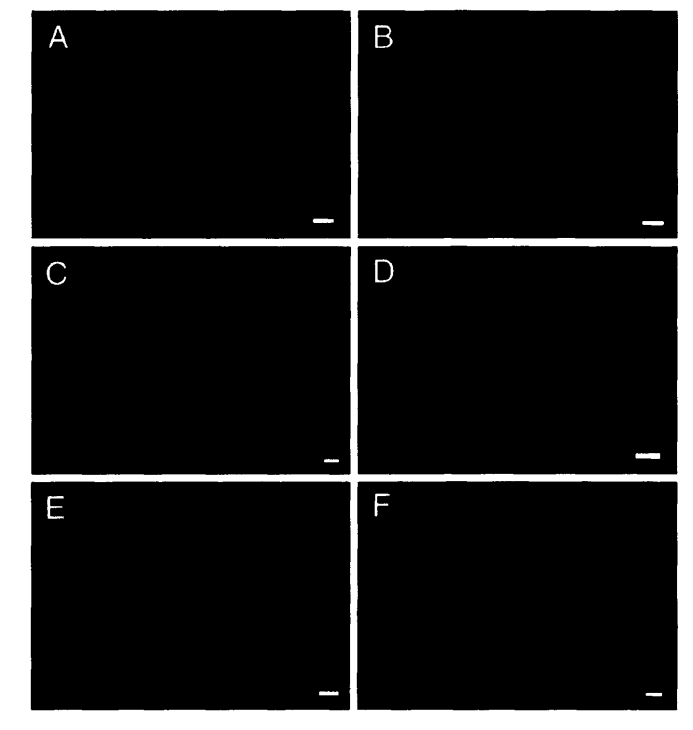


図21 Tobamovirus及びPVXの互いのMPを用いたtrans-complementation実験

(A-D) piX.erG3(25fs)をそれぞれ (A) p35LM、(B、C) p35OMM、(D) p35CcMと共に導入した。p35OMMを同時導入したときのみ約10%の感染部位でごくわずかなPVX.erG3(25fs)の移行が観察された (C)。(E) piX.erG3(TdCd)をp35LMと共に導入した場合もPVXの移行は観察されない。

(F) piL.erG3(SF3)をp35X25、p35X12、p35X8、p35XCPの4種類のプラスミドと共に導入した。この場合もToMV.erG3(SF3)の移行能欠損は相補されない。Bar=25 μ m。

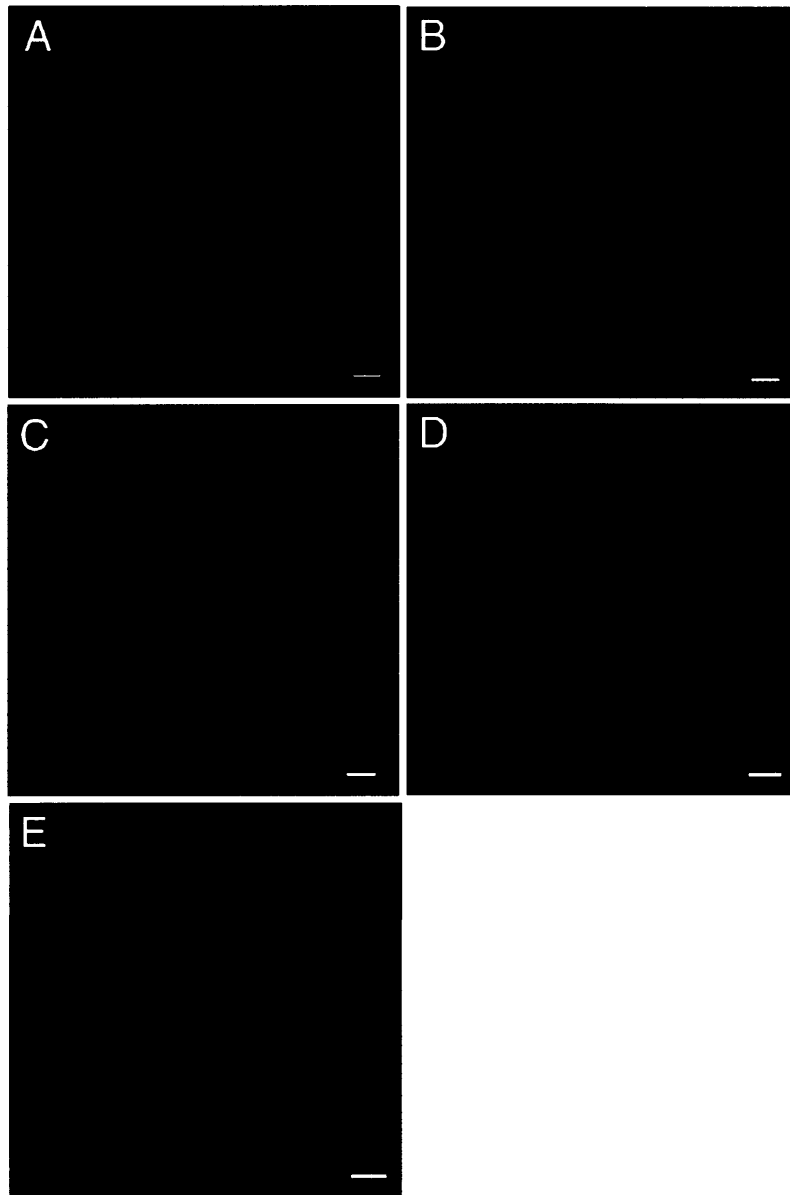


図22 CMVの3aタンパク及びCPによるToMV移行能欠損の相補実験

(A) piL.erG3(SF3)をp35YMと共に導入した場合、ToMVの移行能欠損は相補されない。(B) piL.erG3(SF3)、p35YM、p35YCPの3種類のプラスミドを同時に導入した。3aとCPの共発現によりToMV.erG3(SF3)の移行が観察される。(C) piL.erG3(SF3)とp35YMd33を同時に導入した。3a Δ C33の発現によりToMV.erG3(SF3)の移行が観察される。(D) piL.erG3(SF3)、p35YMd33、p35YCPを同時に導入した。(E) piL.erG3(SF3)、p35YM、p35YMd33を同時に導入した。3aの共発現により、3a Δ C33によるToMV.erG3(SF3)の移行が阻害され、ウイルスの感染範囲が小さくなっている。写真は全て遺伝子導入後48時間で撮影した。Bar=50 μ m。

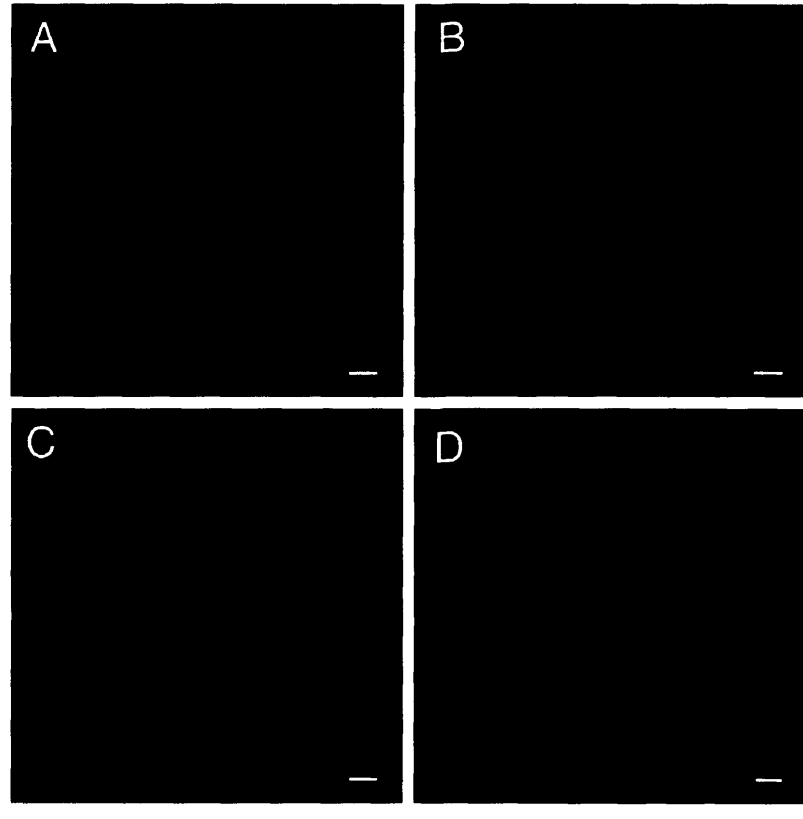


図23 CMVの3aタンパク及びCPによるPVX移行能欠損の相補実験

(A) piX.erG3(TdCd)をp35YMと共に導入した場合、PVXの移行能欠損は相補されない。(B) piX.erG3(TdCd)、p35YM、p35YCPの3種類のプラスミドを同時に導入した。CMVの3aタンパクとCPの共発現によりPVX.erG3(TdCd)の移行が観察される。(C) piX.erG3(TdCd)とp35YMd33を同時に導入した。3aΔC33を発現させてもPVX.erG3(TdCd)の移行は観察されない。(D) piX.erG3(TdCd)、p35YMd33、p35YCPを同時に導入した。3aΔC33とCMVのCPを共発現させてもPVX.erG3(TdCd)の移行は観察されない。写真は全て遺伝子導入後72時間で撮影した。Bar=50 μm。

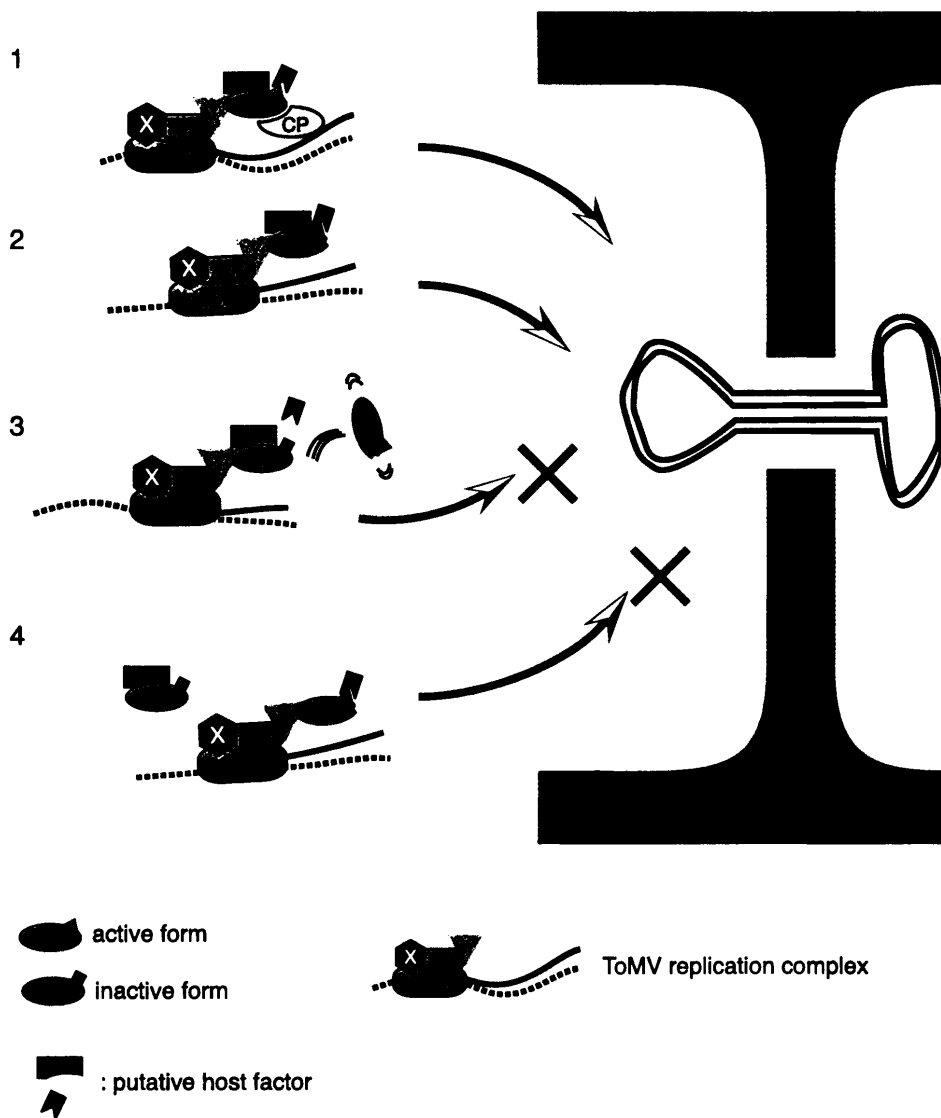


図24 CMVの3aタンパク及びCPによるToMVの細胞間移行のモデル

- 1、CPが共存する場合、3aは活性型となり、ToMV複製複合体及び移行に関わる宿主因子と相互作用することにより、ToMVを隣接細胞に移行させる。
- 2、C末端33アミノ酸を欠失すると、CPが無くても3a (3a Δ C33) は活性型となり、ToMVを移行させる。
- 3、3aと3a Δ C33が共存すると、不活性型の3aが複製複合体と相互作用することにより、3a Δ C33が複製複合体と相互作用できなくなり、移行の阻害が起こる。
- 4、移行阻害の別の原因として、3aが移行に関わる宿主因子と結合することで移行可能な複合体が形成できなくなることも考えられる。

表9. Tobamovirus と PVX の互いの MP を用いた trans-complementation 実験

virus	co-expressed protein (s)	2 or more cells infected (%)
PVX.erG3 (25fs)	ToMV MP	0/48 (0)
PVX.erG3 (25fs)	TMV MP	5/54 (9)
PVX.erG3 (25fs)	SHMV MP	0/32 (0)
PVX.erG3 (12fs)	ToMV MP	0/33 (0)
PVX.erG3 (8dm)	ToMV MP	8/161 (5)
PVX.erG3 (Cd)	ToMV MP	1/44 (2)
PVX.erG3(TdCd)	ToMV MP	0/86 (0)
ToMV.erG3(MPfs)	25K+12K+8K+CP	1/48 (2)

移行能を欠損したPVXまたはToMVの感染性プラスミドを単独で、またはMPを発現するプラスミドと共に導入し、PVX感染の場合は遺伝子導入後72時間、ToMV感染の場合は遺伝子導入後48時間でGFPを発現している細胞の数をカウントした。()内の数字は全感染部位に対する割合を%で示したものである。ただし、葉肉細胞は細胞の形がわかりにくいため、数に含めなかった。

表10. CMV 3a及びCPによるToMVの移行能欠損の相補

virus	co-expressed protein (s)	single cell infection (%)	2 to 3 cells infected (%)	>3 cells infected (%)
ToMV.erG3(MPfs)	3a	42 (98)	1 (2)	0 (0)
ToMV.erG3(MPfs)	3a + CP	8 (11)	19 (25)	49 (64)
ToMV.erG3(MPfs)	CP	22 (100)	0 (0)	0 (0)
ToMV.erG3(MPfs)	3a Δ C33	2 (3)	12 (16)	59 (81)
ToMV.erG3(MPfs)	3a Δ C33 + CP	7 (8)	37 (41)	46 (51)
ToMV.erG3(MPfs)	3a + 3a Δ C33	44 (50)	31 (36)	12 (14)
ToMV.erG3(MPfs)	3a + 3a Δ C33 + CP	14 (15)	25 (27)	55 (58)
ToMV.erG3(MPfs)	3a + ToMV MP	4 (5)	14 (16)	69 (79)

移行能を欠損したToMVの感染性プラスミドを、CMVの3aまたはCPを発現するプラスミドと共に導入し、遺伝子導入後48時間でGFPを発現している細胞の数をカウントした。

() 内の数字は全感染部位に対する割合を%で示したものである。ただし、葉肉細胞は細胞の形がわかりにくいため、数に含めなかった。

3a : CMV 3aタンパク、CP : CMV CP、3a Δ C33 : C末端33アミノ酸欠失3aタンパク

表11. CMV 3a及びCPによるPVXの移行能欠損の相補

virus	co-expressed protein (s)	PVX movement detected / total no. of infection sites (%)
PVX.erG3 (TdCd)	3a	0/44 (0)
PVX.erG3 (TdCd)	3a + CP	106/205 (51)
PVX.erG3 (TdCd)	3a Δ C33	3/59 (5)
PVX.erG3 (TdCd)	3a Δ C33 + CP	3/55 (5)

移行能を欠損した PVX の感染性プラスミドを CMV の 3a または CP を発現するプラスミドと共に導入し、遺伝子導入後 72 時間で GFP を発現している細胞の数をカウントした。() 内の数字は全感染部位に対する割合を%で示したものである。ただし、葉肉細胞は細胞の形がわかりにくいため、数に含めなかった。

第5章 結論

本研究ではパーティクルガン法での遺伝子導入によるタンパクの一過的発現系を利用し、MP と GFP の共発現によって原形質連絡の透過性の上昇を検出する系を構築した。また、ToMV 及び PVX の DNA 感染系を用いた trans-complementation 実験により、植物ウイルスの細胞間移行と複製の間には何らかの相互作用が存在することを見いだした。さらに trans-complementation 実験系により異種ウイルス間での移行能欠損相補実験を行い、ToMV と PVX の MP は他方のウイルスの移行能欠損を相補できないが、CMV の 3a タンパクと CP の共発現によって ToMV と PVX の両者の移行能欠損は相補されることを明らかにした。

植物ウイルスの細胞間移行に関するこれまでのほとんどの研究では、ウイルスの移行能の有無は病徴発現や RNA、CP の蓄積によって判断された。したがってウイルスがごくわずかに移行する場合と全く移行しない場合とは実質的に区別されてこなかった。本研究では細胞間を拡散しないタイプの GFP (ER 局在 GFP) を組み込んだウイルスの DNA 感染系を構築し、ウイルスの移行を 1 細胞レベルで観察することを可能にした。このことにより、異種ウイルス間での相補実験において、厳密な結果を得ることができるようになった。

【SEL 上昇活性の解析における GFP と MP の共発現実験系の有用性】

多くの植物ウイルスの MP は原形質連絡の SEL を増大させる活性を持っていると考えられてきた。本研究では GFP 遺伝子との同時導入により、Tobamovirus の MP や CMV の 3a タンパク及びトウモロコシの KN1 に SEL 増大活性があることを確認した。しかし、PVX の TGB タンパクについての解析で得られた結果は、マイクロインジェクション法によってこれまでに報告されていた知見とは一致しなかった。この相違点が実験方法の違いから生じることは明らかであり、どちらかの方法が、目的とするタンパクの本当の活性を見ていないということになる。Storms ら (1998) は TMV の MP を発現するトランスジェニック植物における 10 kDa デキストランの細胞間拡散はインジェクションの方法によって観察される場合とされない場合があることを報告した。このことから、

から、これまでに観察されている巨大分子の細胞間拡散は、MP の真の機能を反映した現象ではなく、マイクロインジェクションによって細胞の生理状態が乱された結果起こったという可能性を考える必要性が生じた。

GFP と MP の遺伝子をパーティクルガン法により同時に導入して SEL の増大を検出する方法では、細胞の生理状態はそれほど乱されていないと考えられる。また、GFP の細胞間の拡散は遺伝子導入から 24 時間後に観察しているので、ボンバードメント直後に起こるであろう傷害応答反応が結果に大きく影響を与える可能性も低いと考えられる。したがって、本研究で構築した GFP と MP の共発現系は、MP 本来の活性による原形質連絡の SEL 上昇を検出することのできる実験系として利用可能であると考えられる。

【細胞間移行の分子機構についてのこれからの解析】

本研究では ToMV の MP と GFP の融合タンパクを用い、ウイルス感染細胞における MP の局在解析を行った。その結果、原形質連絡への MP の局在がウイルスの細胞間移行において重要な意味を持つことが示唆された。MP-GFP 融合タンパクは TMV 感染細胞において、原形質連絡への局在以外にも不定形の塊状の局在やフィラメント状の局在を示すことが知られていた。このような局在解析から、TMV ゲノム RNA と MP が複合体を構成し、細胞骨格を介して原形質連絡へと運搬され、隣接細胞に移行していくというモデルが考えられてきたが、フィラメント状の局在がこのモデルで考えられているような MP の機能を反映していない可能性も十分にある。その一つの可能性として第 2 章で述べた aggresome 説が挙げられる。

しかし、植物ウイルスの細胞間移行に細胞骨格を介した輸送系が関わっている可能性は高い。細胞間移行と細胞骨格との関係を調べる一つの方法として、レポーターを持つウイルスを感染させた葉において、薬剤を用いて細胞骨格を破壊し、ウイルスの移行に対する影響を調べるという方法が考えられる。また、動物細胞では p50/dynamitin を過剰発現させると、微小管上を動くモーターである dynein-dynactin 複合体が解離し、微小管を介した輸送系が阻害されることが報告されている (Burkhardt et al. 1997, Echeverri

et al. 1996)。植物細胞でもこのような系が開発できれば、ウイルスの DNA 感染系と併用することで細胞骨格を介した細胞内輸送機構とウイルスの細胞間移行との関係に関する新たな知見を得られるのではないかと考えている。

【宿主因子の探索及びその機能解析への DNA 感染系の応用】

ToMV と PVX 両者の移行能欠損は CMV の 3a と CP の共発現によって相補された。しかし、CP 要求性を失った 3a Δ C33 によって MP 欠損 ToMV は移行したが、MP 欠損 PVX は移行しなかった。このような現象は、移行に関わる宿主因子の存在を想定しなければ説明できない。その因子は MP と結合することが考えられるが、ウイルスの移行と複製の間に何らかの相互作用が存在する可能性があることから、移行に関わる宿主因子は複製複合体の構成成分の一つであるかもしれない。

近年 TMV の MP と相互作用する宿主因子として pectin methyl esterase や転写の coactivator の一種が単離されている (Dorokhov et al. 1999, Chen et al. 2000, Matsushita et al. 1999)。しかし、これらの因子が本当にウイルスの移行をサポートする宿主因子であるのかを明らかにすることは、現在のところ困難な状況である。本研究では、CMV の 3a と 3a Δ C33 を用いた実験で、ウイルスの細胞間移行に対するドミナントネガティブ効果の検出が可能であることを示した。このことは、ウイルスの DNA 感染系と複数遺伝子の同時導入が宿主因子とウイルスの移行タンパクとの関わりを解析する目的にも利用できる可能性があることを意味する。例えば単離された因子の変異体の過剰発現によってウイルスの移行を阻害することができれば、その因子はウイルスの移行をサポートする宿主因子であると考えることができる。今後 DNA 感染系を用い、ウイルスの細胞間移行と宿主因子との関係を解析することにより、植物ウイルスの細胞間移行の分子機構を知るための重要な手がかりが数多く得られると考えられる。

謝辞

本研究を行うにあたり、直接ご指導頂いた京都大学大学院理学研究科、飯哲夫助教授、
激励していただいた岩淵雅樹岡山県生物科学研究所所長に深く感謝いたします。Ob-
TMV 及び G3GFP のクローンを分与していただいた東京大学大学院総合文化研究科の
渡辺雄一郎博士、CMV の 3a タンパクのクローンを分与していただいた北海道大学農学
研究科の石川雅之博士、CMV の RNA3 のクローンを分与していただいた京都大学大学
院農学研究科の三瀬和之博士ならびに永野秀昭博士、PVX (O 系統) のクローンを分与
していただいた東北大学農学研究科の高橋英樹博士、mGFP5ER のクローンを分与して
いただいた英国 Medical Resarch Council の Jimm Haseloff 博士、PVX の感染性プラスミ
ドを分与していただいた Sunsberry Labolatory の David Baulcombe 博士に深く感謝いたし
ます。また、日頃の実験に関する貴重なアドバイスを頂いた京都大学大学院理学研究科
植物学教室分子細胞生物学分野 (旧遺伝情報制御学分野) の諸氏に厚く御礼申し上げま
す。

参考文献

- Angell, S. M., Davies, C., and Baulcombe, D. C. (1996). Cell-to-cell movement of potato virus X is associated with a change in the size-exclusion limit of plasmodesmata in trichome cells of *Nicotiana clevelandii*. *Virology* 216, 197-201.
- Ares, X., Calamante, G., Cabral, S., Lodge, J., Hemenway, P., Beachy, R. N., and Mentaberry, A. (1998). Transgenic plants expressing potato virus X ORF2 protein (p24) are resistant to tobacco mosaic virus and Ob tobamoviruses. *J. Virol.* 72, 731-738.
- Atabekov, J. G., Malysenko, S. I., Morozov Yu, S., Talianky, M. E., Solovyev, A. G., Agranovsky, A. A., and Shapka, N. A. (1999). Identification and study of tobacco mosaic virus movement function by complementation tests. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 354, 629-635.
- Atkins, D., Hull, R., Wells, B., Roberts, K., Moore, P., and Beachy, R. N. (1991). The tobacco mosaic virus 30K movement protein in transgenic tobacco plants is localized to plasmodesmata. *J. Gen. Virol.* 72, 209-211.
- Baulcombe, D. C., Chapman, S., and Santa Cruz, S. (1995). Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. *Plant. J* 7, 1045-1053.
- Beck, D. L., Guilford, P. J., Voot, D. M., Andersen, M. T., and Forster, R. L. (1991). Triple gene block proteins of white clover mosaic potexvirus are required for transport. *Virology* 183, 695-702.
- Bouhidel, K., and Irish, V. F. (1996). Cellular interactions mediated by the homeotic PISTILLATA gene determine cell fate in the *Arabidopsis* flower. *Dev. Biol.* 174, 22-31.
- Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W. X., Ji, L. H., Ding, S. W., and Baulcombe, D. C. (1998). Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J.* 17, 6739-6746.

Burkhardt, J. K., Echeverri, C. J., Nilsson, T., and Vallee, R. B. (1997). Overexpression of the dynamitin (p50) subunit of the dynactin complex disrupts dynein-dependent maintenance of membrane organelle distribution. *J. Cell Biol.* *139*, 469-484.

Canto, T., Prior, D. A., Hellwald, K. H., Oparka, K. J., and Palukaitis, P. (1997). Characterization of cucumber mosaic virus. IV. Movement protein and coat protein are both essential for cell-to-cell movement of cucumber mosaic virus. *Virology* *237*, 237-248.

Carpenter, R., and Coen, E. S. (1995). Transposon induced chimeras show that *floricaula*, a meristem identity gene, acts non-autonomously between cell layers. *Development* *121*, 19-26.

Carrington, J. C., Kasschau, K. D., Mahajan, S. K., and Schaad, M. C. (1996). Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. *Plant Cell* *8*, 1669-1681.

Chang, B. Y., Lin, N. S., Liou, D. Y., Chen, J. P., Liou, G. G., and Hsu, Y. H. (1997). Subcellular localization of the 28 kDa protein of the triple-gene-block of bamboo mosaic potexvirus. *J. Gen. Virol.* *78*, 1175-1179.

Chapman, S., Hills, G., Watts, J., and Baulcombe, D. (1992). Mutational analysis of the coat protein gene of potato virus X: effects on virion morphology and viral pathogenicity. *Virology* *191*, 223-230.

Citovsky, V. (1999). Tobacco mosaic virus: a pioneer of cell-to-cell movement. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* *354*, 637-643.

Citovsky, V., Knorr, D., Schuster, G., and Zambryski, P. (1990). The P30 movement protein of tobacco mosaic virus is a single-strand nucleic acid binding protein. *Cell* *60*, 637-647.

Citovsky, V., Wong, M. L., Shaw, A. L., Prasad, B. V. V., and Zambryski, P. (1992). Visualization and characterization of tobacco mosaic virus movement protein binding to single-stranded nucleic acids. *Plant Cell* *4*, 397-411.

Cooper, B., Schmitz, I., Rao, A. L., Beachy, R. N., and Dodds, J. A. (1996). Cell-to-cell transport of movement-defective cucumber mosaic and tobacco mosaic viruses in transgenic plants expressing heterologous movement protein genes. *Virology* 216, 208-213.

Crawford, K. M., and Zambryski, P. (2000). Subcellular localization determines the availability of non-targeted proteins to plasmodesmatal transport. *Current Biology* 10, 1032-1040.

Cruz, S. S., Chapman, S., Roberts, A. G., Roberts, I. M., Prior, D. A., and Oparka, K. J. (1996). Assembly and movement of a plant virus carrying a green fluorescent protein overcoat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93, 6286-6290.

Cruz, S. S., Roberts, A. G., Prior, D. A., Chapman, S., and Oparka, K. J. (1998). Cell-to-cell and phloem-mediated transport of potato virus X. The role of virions. *Plant Cell* 10, 495-510.

Cudmore, S., Cossart, P., Griffiths, G., and Way, M. (1995). Actin-based motility of vaccinia virus. *Nature* 378, 636-8.

Davies, C., Hills, G., and Baulcombe, D. C. (1993). Sub-cellular localization of the 25-kDa protein encoded in the triple gene block of potato virus X. *Virology* 197, 166-175.

Deom, C. M., Oliver, M. J., and Beachy, R. N. (1987). The 30-kilodalton gene product of tobacco mosaic virus potentiates virus movement. *Science* 237, 389-394.

Ding, B., Haudenschild, J. S., Hull, R. J., Wolf, S., Beachy, R. N., and Lucas, W. J. (1992). Secondary plasmodesmata are specific sites of localization of the tobacco mosaic virus movement protein in transgenic tobacco plants. *Plant Cell* 4, 915-928.

Ding, B., Li, Q., Nguyen, L., Palukaitis, P., and Lucas, W. J. (1995). Cucumber mosaic virus 3a protein potentiates cell-to-cell trafficking of CMV RNA in tobacco plants. *Virology* 207, 345-353.

Dorokhov, Y. L., Makinen, K., Frolova, O. Y., Merits, A., Saarinen, J., Kalkkinen, N., Atabekov, J. G., and Saarma, M. (1999). A novel function for a ubiquitous plant enzyme pectin methylesterase: the host-cell receptor for the tobacco mosaic virus movement protein. *FEBS Lett.* *461*, 223-228.

Echeverri, C. J., Paschal, B. M., Vaughan, K. T., and Vallee, R. B. (1996). Molecular characterization of the 50-kD subunit of dynactin reveals function for the complex in chromosome alignment and spindle organization during mitosis. *J. Cell Biol.* *132*, 617-633.

García-Mata, R., Bebök, Z., Sorscher, E. J., and Sztul, E. S. (1999). Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimera. *J. Cell Biol.* *146*, 1239-1254.

Giesman-Cookmeyer, D., and Lommel, S. A. (1993). Alanine scanning mutagenesis of a plant virus movement protein identifies three functional domains. *Plant Cell* *5*, 973-982.

Giesman-Cookmeyer, D., Silver, S., Vaewhongs, A. A., Lommel, S. A., and Deom, C. M. (1995). Tobamovirus and dianthovirus movement proteins are functionally homologous. *Virology* *213*, 38-45.

Gilmer, D., Bouzoubaa, S., Hehn, A., Guilley, H., Richards, K., and Jonard, G. (1992). Efficient cell-to-cell movement of beet necrotic yellow vein virus requires 3' proximal genes located on RNA 2. *Virology* *189*, 40-47.

Goodwin, P. B. (1983). Molecular size limit for movement in the symplast of the *Elodea*. *Planta* *157*, 124 -130.

Guilley, H., Jonard, G., Kukla, B., and Richards, K. E. (1979). Sequence of 1000 nucleotides at the 3' end of tobacco mosaic virus RNA. *Nucleic Acids Res.* *6*, 1287-1308.

Hantke, S. S., Carpenter, R., and Coen, E. S. (1995). Expression of floricaula in single cell layers of periclinal chimeras activates downstream homeotic genes in all layers of floral meristems. *Development* *121*, 27-35.

Haseloff, J., and Siemering, K. R. (1998). The uses of green fluorescent protein in plants. In *Green fluorescent protein: Properties, applications, and protocols*, M. Chalfie and S. Kain, eds. (New York: A Wiley-Liss publication), pp. 191-220.

Haseloff, J., Siemering, K. R., Prasher, D. C., and Hodge, S. (1997). Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *94*, 2122-2127.

Hefferon, K. L., Doyle, S., and AbouHaidar, M. G. (1997). Immunological detection of the 8K protein of potato virus X (PVX) in cell walls of PVX-infected tobacco and transgenic potato. *Arch. Virol.* *142*, 425-433.

Heinlein, M., Epel, B. L., Padgett, H. S., and Beachy, R. N. (1995). Interaction of tobamovirus movement proteins with the plant cytoskeleton. *Science* *270*, 1983-1985.

Heinlein, M., Padgett, H. S., Gens, J. S., Pickard, B. G., Casper, S. J., Epel, B. L., and Beachy, R. N. (1998). Changing patterns of localization of the tobacco mosaic virus movement protein and replicase to the endoplasmic reticulum and microtubules during infection. *Plant Cell* *10*, 1107-1120.

Herzog, E., Guilley, H., Manohar, S. K., Dollet, M., Richards, K., Fritsch, C., and Jonard, G. (1994). Complete nucleotide sequence of peanut clump virus RNA 1 and relationships with other fungus-transmitted rod-shaped viruses. *J. Gen. Virol.* *75*, 3147-3155.

Herzog, E., Hemmer, O., Hauser, S., Meyer, G., Bouzoubaa, S., and Fritsch, C. (1998). Identification of genes involved in replication and movement of peanut clump virus. *Virology* *248*, 312-322.

Holt, C. A., and Beachy, R. N. (1991). *In vivo* complementation of infectious transcripts from mutant tobacco mosaic virus cDNAs in transgenic plants. *Virology* *181*, 109-117.

Hunter, T. R., Hunt, T., Knowland, J., and Zimmern, D. (1976). Messenger RNA for the coat protein of tobacco mosaic virus. *Nature* *260*, 759-764.

Itaya, A., Hickman, H., Bao, Y., Nelson, R., and Ding, B. (1997). Cell-to-cell trafficking of cucumber mosaic virus movement protein:green fluorescent protein fusion produced by biolistic gene bombardment in tobacco. *Plant J.* *12*, 1223-1230.

Johnston, J. A., Ward, C. L., and Kopito, R. R. (1998). Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J. Cell Biol.* *143*, 1883-1898.

Kalinina, N. O., Fedorkin, O. N., Samuilova, O. V., Maiss, E., Korpela, T., Morozov, S., and Atabekov, J. G. (1996). Expression and biochemical analyses of the recombinant potato virus X 25K movement protein. *FEBS Lett.* *397*, 75-78.

Kaplan, I. B., Shintaku, M. H., Li, Q., Zhang, L., Marsh, L. E., and Palukaitis, P. (1995). Complementation of virus movement in transgenic tobacco expressing the cucumber mosaic virus 3a gene. *Virology* *209*, 188-199.

Kawakami, S., Padgett, H. S., Hosokawa, D., Okada, Y., Beachy, R. N., and Watanabe, Y. (1999). Phosphorylation and/or presence of serine 37 in the movement protein of tomato mosaic tobamovirus is essential for intracellular localization and stability *in vivo*. *J. Virol.* *73*, 6831-6840.

Kawakami, S., and Watanabe, Y. (1997). Use of green fluorescent protein as a molecular marker tag of protein movement *in vivo*. *Plant Biotech.* *14*, 127-130.

Kempers, R., Prior, D. A. M., van Bel, A. J. E., and Oparka, K. J. (1993). Plasmodesmata between sieve elements and companion cells in extracellular passage of fluorescent 3 kDa probes. *Plant J.* *4*, 567-575.

Lazarowitz, S. G., and Beachy, R. N. (1999). Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants. *Plant Cell* *11*, 535-548.

Li, Q., and Palukaitis, P. (1996). Comparison of the nucleic acid- and NTP-binding properties of the movement protein of cucumber mosaic cucumovirus and tobacco mosaic tobamovirus. *Virology* *216*, 71-79.

Lommel, S. A., Weston-Fina, M., Xiong, Z., and Lomonossoff, G. P. (1988). The nucleotide sequence and gene organization of red clover necrotic mosaic virus RNA-2. *Nucleic Acids Res.* *16*, 8587-8602.

Lough, T. J., Netzler, N. E., Emerson, S. J., Sutherland, P., Carr, F., Beck, D. L., Lucas, W. J., and Forster, R. L. (2000). Cell-to-cell movement of potexviruses: evidence for a ribonucleoprotein complex involving the coat protein and first triple gene block protein. *Mol. Plant Microbe Interact.* *13*, 962-974.

Lough, T. J., Shash, K., Xoconostle-Cázares, B., Hofstra, K. R., Beck, D. L., Balmori, E., Forester, R. L. S., and Lucas, W. J. (1998). Molecular dissection of the mechanism by which potexvirus triple gene block proteins mediate cell-to-cell transport of infectious RNA. *Mol. Plant Microbe Interact.* *11*, 801-814.

Lucas, W. J. (1995a). Plasmodesmata: intercellular channels for macromolecular transport in plants. *Curr. Opin. Cell Biol.* *7*, 673-680.

Lucas, W. J., Bouché-Pillon, S., Jackson, D. P., Nguyen, L., Baker, L., Ding, B., and Hake, S. (1995b). Selective trafficking of KNOTTED1 homeodomain protein and its mRNA through plasmodesmata. *Science* *270*, 1980-1983.

Malysenko, S. I., Kondakova, O. A., Taliansky, M. E., and Atabekov, J. G. (1989). Plant virus transport function: complementation by helper viruses is non-specific. *J. Gen. Virol.* *70*, 2751-2757.

Matsushita, Y., Deguchi, M., Nishiguchi, M., and Nyunoya, H. (1999). Cloning of cDNAs coding plant cell factors that bind the movement protein of tobacco mosaic virus. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* *65*, 330.

McLean, B. G., Zupan, J., and Zambryski, P. C. (1995). Tobacco mosaic virus movement protein associates with the cytoskeleton in tobacco cells. *Plant Cell* *7*, 2101-2114.

Melcher, U. (2000). The '30K' superfamily of viral movement proteins. *J. Gen. Virol.* *81*, 257-266.

Meshi, T., Hosokawa, D., Kawagishi, M., Watanabe, Y., and Okada, Y. (1992). Reinvestigation of intracellular localization of the 30K protein in tobacco protoplasts infected with tobacco mosaic virus RNA. *Virology* *187*, 809-813.

Meshi, T., Kiyama, R., Ohno, T., and Okada, Y. (1983). Nucleotide sequence of the coat protein cistron and the 3' noncoding region of cucumber green mottle mosaic virus (watermelon strain) RNA. *Virology* *127*, 54-64.

Meshi, T., Ohno, T., and Okada, Y. (1982a). Nucleotide sequence and its character of cistron coding for the 30K protein of tobacco mosaic virus (OM strain). *J. Biochem.* *91*, 1441-1444.

Meshi, T., Ohno, T., and Okada, Y. (1982b). Nucleotide sequence of the 30K protein cistron of cowpea strain of tobacco mosaic virus. *Nucl. Acids Res.* *10*, 6111-6117.

Meshi, T., Takamatsu, N., Ohno, T., and Okada, Y. (1982c). Molecular cloning of the complementary DNA copies of the common and cowpea strains of tobacco mosaic virus RNA. *Virology* *118*, 64-75.

Meshi, T., Watanabe, Y., Saito, T., Sugimoto, A., Maeda, T., and Okada, Y. (1987). Function of the 30 kd protein of tobacco mosaic virus: involvement in cell-to-cell movement and dispensability for replication. *EMBO J.* *6*, 2557-2563.

Morozov, S., Miroshnichenko, N. A., Solovyev, A. G., Fedorkin, O. N., Zelenina, D. A., Lukasheva, L. I., Karasev, A. V., Dolja, V. V., and Atabekov, J. G. (1991). Expression strategy of the potato virus X triple gene block. *J. Gen. Virol.* *72*, 2039-2042.

Morozov, S. Y., Fedorkin, O. N., Juttner, G., Schiemann, J., Baulcombe, D. C., and Atabekov, J. G. (1997). Complementation of a potato virus X mutant mediated by bombardment of plant tissues with cloned viral movement protein genes. *J. Gen. Virol.* *78*, 2077-2083.

Morozov, S. Y., Solovyev, A. G., Kalinina, N. O., Fedorkin, O. N., Samuilova, O. V., Schiemann, J., and Atabekov, J. G. (1999). Evidence for two nonoverlapping functional domains in the potato virus X 25K movement protein. *Virology* 260, 55-63.

Nagano, H., Okuno, T., Mise, K., and Furusawa, I. (1999). Cell-to-cell movement mediated by truncated Cucumber mosaic virus movement protein does not require coat protein. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 65, 332-333.

Nagano, H., Okuno, T., Mise, K., and Furusawa, I. (1997). Deletion of the C-terminal 33 amino acids of cucumber mosaic virus movement protein enables a chimeric brome mosaic virus to move from cell to cell. *J. Virol.* 71, 2270-2276.

Oparka, K. J., Prior, D. A. M., Santa Cruz, S., Padgett, H. S., and Beachy, R. N. (1997). Gating of epidermal plasmodesmata is restricted to the leading edge of expanding infection sites of tobacco mosaic virus (TMV). *Plant J.* 12, 781-789.

Oparka, K. J., Roberts, A. G., Boevink, P., Santa Cruz, S., Roberts, I., Pradel, K. S., Imlau, A., Kotlizky, G., Sauer, N., and Epel, B. (1999). Simple, but not branched, plasmodesmata allow the nonspecific trafficking of proteins in developing tobacco leaves. *Cell* 97, 743-754.

Overall, R. L., Wolfe, J., and Gunning, B. E. S. (1982). Intercellular communication in *Azolla* roots: I. Ultrastructure of plasmodesmata. *Protoplasma* 111, 134-150.

Padgett, H. S., Epel, B. L., Kahn, T. W., Heinlein, M., Watanabe, Y., and Beachy, R. N. (1996). Distribution of tobamovirus movement protein in infected cells and implications for cell-to-cell spread of infection. *Plant J.* 10, 1079-1088.

Perbal, M. C., Haughn, G., Saedler, H., and Schwarz-Sommer, Z. (1996). Non-cell-autonomous function of the *Antirrhinum* floral homeotic proteins DEFICIENS and GLOBOSA is exerted by their polar cell-to-cell trafficking. *Development* 122, 3433-3441.

Petty, I. T., French, R., Jones, R. W., and Jackson, A. O. (1990). Identification of barley stripe mosaic virus genes involved in viral RNA replication and systemic movement. *EMBO J.* 9, 3453-3457.

Petty, I. T., and Jackson, A. O. (1990). Mutational analysis of barley stripe mosaic virus RNA beta. *Virology* 179, 712-718.

Reichel, C., and Beachy, R. N. (1998). Tobacco mosaic virus infection induces severe morphological changes of the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 11169-11174.

Rouleau, M., Smith, R. J., Bancroft, J. B., and Mackie, G. A. (1994). Purification, properties, and subcellular localization of foxtail mosaic potexvirus 26-kDa protein. *Virology* 204, 254-265.

Rouleau, M., Smith, R. J., Bancroft, J. B., and Mackie, G. A. (1995). Subcellular immunolocalization of the coat protein of two potexviruses in infected *Chenopodium quinoa*. *Virology* 214, 314-318.

Saito, T., Imai, Y., Meshi, T., and Okada, Y. (1988). Interviral homologies of the 30K proteins of tobamoviruses. *Virology* 164, 653-656.

Sasaki, H., Nakamura, M., Ohno, T., Matsuda, Y., Yuda, Y., and Nonomura, Y. (1995). Myosin-actin interaction plays an important role in human immunodeficiency virus type 1 release from host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 92, 2026-2030.

Schmitz, I., and Rao, A. L. (1996). Molecular studies on bromovirus capsid protein. I. Characterization of cell-to-cell movement-defective RNA3 variants of brome mosaic virus. *Virology* 226, 281-293.

Sodeik, B. (2000). Mechanisms of viral transport in the cytoplasm. *Trends Microbiol.* 8, 465-472.

Sodeik, B., Ebersold, M. W., and Helenius, A. (1997). Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J. Cell Biol.* 136, 1007-1021.

Solovyev, A. G., Stroganova, T. A., Zamyatnin, A. A., Jr., Fedorkin, O. N., Schiemann, J., and Morozov, S. Y. (2000). Subcellular sorting of small membrane-associated triple gene block proteins: TGBp3-assisted targeting of TGBp2. *Virology* 269, 113-127.

Solovyev, A. G., Zelenina, D. A., Savenkov, E. I., Grdzlishvili, V. Z., Morozov, S., Maiss, E., Casper, R., and Atabekov, J. G. (1997). Host-controlled cell-to-cell movement of a hybrid barley stripe mosaic virus expressing a dianthovirus movement protein. *Intervirology* 40, 1-6.

Solovyev, A. G., Zelenina, D. A., Savenkov, E. I., Grdzlishvili, V. Z., Morozov, S. Y., Lesemann, D. E., Maiss, E., Casper, R., and Atabekov, J. G. (1996). Movement of a barley stripe mosaic virus chimera with a tobacco mosaic virus movement protein. *Virology* 217, 435-441.

Storms, M. M. H., van der Schoot, C., Prins, M., Kormelink, R., van Lent, J. W. M., and Goldbach, R. W. (1998). A comparison of two methods of microinjection for assessing altered plasmodesmal gating in tissues expressing viral movement proteins. *Plant J.* 13, 131-140.

Suomalainen, M., Nakano, M. Y., Keller, S., Boucke, K., Stidwill, R. P., and Greber, U. F. (1999). Microtubule-dependent plus- and minus end-directed motilities are competing processes for nuclear targeting of adenovirus. *J. Cell Biol.* 144, 657-672.

Szécsi, J., Ding, X. S., Lim, C. O., Bendahmane, M., Cho, M. J., Nelson, R. S., and Beachy, R. N. (1999). Development of Tobacco Mosaic Virus Infection Sites in *Nicotiana benthamiana*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12, 143-152.

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.

Tilney, L. G., Cooke, T. J., Connelly, P. S., and Tilney, M. S. (1991). The structure of plasmodesmata as revealed by plasmolysis, detergent extraction, and protease digestion. *J. Cell Biol.* 112, 739-747.

Tomenius, K., Clapham, D., and Meshi, T. (1987). Localization by immunogold cytochemistry of the virus-coded 30K protein in plasmodesmata of leaves infected with tobacco mosaic virus. *Virology* 160, 363-371.

Vaewhongs, A. A., and Lommel, S. A. (1995). Virion formation is required for the long-distance movement of red clover necrotic mosaic virus in movement protein transgenic plants. *Virology* 212, 607-613.

Vallee, R. B., and Sheetz, M. P. (1996). Targeting of motor proteins. *Science* 271, 1539-1544.

Vaquero, C., Liao, Y. C., Nahring, J., and Fischer, R. (1997). Mapping of the RNA-binding domain of the cucumber mosaic virus movement protein. *J. Gen. Virol.* 78, 2095-2099.

Vaquero, C., Turner, A. P., Demangeat, G., Sanz, A., Serra, M. T., Roberts, K., and Garcia-Luque, I. (1994). The 3a protein from cucumber mosaic virus increases the gating capacity of plasmodesmata in transgenic tobacco plants. *J. Gen. Virol.* 75, 3193-3197.

Verchot, J., Angell, S. M., and Baulcombe, D. C. (1998). In vivo translation of the triple gene block of potato virus X requires two subgenomic mRNAs. *J. Virol.* 72, 8316-8320.

Wagmann, E., Lucas, W. J., Citovsky, V., and Zambryski, P. (1994). Direct functional assay for tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein and identification of a domain involved in increasing plasmodesmal permeability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 1433-1437.

Wagmann, E., and Zambryski, P. (1995). Tobacco mosaic virus movement protein-mediated protein transport between trichome cells. *Plant Cell* 7, 2069-2079.

Watanabe, Y., Meshi, T., and Okada, Y. (1984). The initiation site for transcription of the TMV 30-kDa protein messenger RNA. *FEBS Lett.* 173, 247-250.

Wolf, S., Deom, C. M., Beachy, R., and Lucas, W. J. (1991). Plasmodesmatal function is probed using transgenic tobacco plants that express a virus movement protein. *Plant Cell* 3, 593-604.

Wolf, S., Deom, C. M., Beachy, R. N., and Lucas, W. J. (1989). Movement protein of tobacco mosaic virus modifies plasmodesmatal size exclusion limit. *Science* 246, 377-379.

Xiong, Z., Kim, K. H., Giesman-Cookmeyer, D., and Lommel, S. A. (1993). The roles of the red clover necrotic mosaic virus capsid and cell-to-cell movement proteins in systemic infection. *Virology* 192, 27-32.

Yamanaka, T., Komatani, H., Meshi, T., Naito, S., Ishikawa, M., and Ohno, T. (1998). Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of tobacco mosaic virus strain Cg. *Virus Genes* 16, 173-176.

Yang, Y., Ding, B., Baulcombe, D. C., and Verchot, J. (2000). Cell-to-cell movement of the 25K protein of potato virus X is regulated by three other viral proteins. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13, 599-605.

A. Tamai, MPMI

manuscript no. #080-00 (revised)

Tobamoviral Movement Protein Transiently Expressed in a Single Epidermal Cell Functions beyond Multiple Plasmodesmata and Spreads Multicellularly in an Infection-Coupled Manner

Atsushi Tamai and Tetsuo Meshi

Department of Botany, Graduate School of Science, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan

Corresponding author: T. Meshi; Fax: +81-75-753-4141; E-mail: tmeshi@gr.bot.kyoto-u.ac.jp

ABSTRACT

Cell-to-cell movement of a plant virus requires expression of the movement protein (MP). However, it has not been fully elucidated how the MP functions in primary infected cells. By using a microprojectile bombardment-mediated DNA infection system for *Tomato mosaic virus* (ToMV), we found that the co-transfected ToMV MP gene exerts its effects not only in the initially infected cells but also in their surrounding cells to achieve multicellular spread of movement-defective ToMV. Five other tobamoviral MPs examined also trans-complemented the movement-defective phenotype of ToMV but the *Cucumber mosaic virus* 3a MP did not. Along with cell-to-cell movement of the mutant virus, a fusion between MP and a green fluorescent protein variant (EGFP) expressed in trans was distributed multicellularly and localized primarily in plasmodesmata between infected cells. In contrast, in non-infected sites, the MP-EGFP fusion accumulated predominantly inside the bombarded cells as irregularly shaped aggregates, and only a minute amount of the fusion was found in plasmodesmata. Thus, the behavior of ToMV MP is greatly modulated in the presence of replicating virus and it is highly likely that the MP spreads in the infection sites, coordinating with the cell-to-cell movement of the viral genome.

INTRODUCTION

Systemic infection of a plant virus involves replication in initially infected cells, subsequent local cell-to-cell movement through plasmodesmata (the intercellular channels providing symplasmic continuity of plant cells [Lucas et al. 1993; Ding 1998]), and long-distance movement through the vascular tissues. It has been well established that most plant viruses encode one or more proteins, referred to as movement proteins (MPs), required for their own cell-to-cell movement (as reviews, Atabekov and Taliansky 1990; Maule 1991; Deom et al. 1992).

Tobacco mosaic virus (TMV) and related tobamoviruses encode a single, 30-kDa MP (Deom et al. 1987; Meshi et al. 1987). TMV MP is localized in plasmodesmata of infected tobacco leaves (Tomenius et al. 1987) and in non-infected transgenic tobacco (Atkins et al. 1991; Ding et al. 1992), and is thought to increase the size exclusion limit (SEL) of the plasmodesmal pores (Wolf et al. 1989, 1991; Waigmann et al. 1994). At mid-to-late stages of infection, MP formed irregularly shaped aggregates inside the infected cells (Meshi et al. 1992; Padgett et al. 1996; Kawakami and Watanabe 1997) that involved the endoplasmic reticulum (ER) (Reichel and Beachy 1998), and later associated with microtubules and microfilaments (Heinlein et al. 1995; McLean et al. 1995). MP co-localized, albeit not completely, with plus- and minus-sense viral RNAs and a virus-encoded replicase component (Heinlein et al. 1998; Más and Beachy 1999). MP can bind to single-strand nucleic acids in vitro to form a filamentous ribonucleoprotein complex (Citovsky et al. 1990, 1992) and also has an affinity for tubulin and actin (McLean et al. 1995). In light of these observations, it has been proposed that the genomic RNA and MP assemble to form a viral ribonucleoprotein (vRNP) complex, which is then transported to plasmodesmata by using the cytoskeletal network; subsequently, the MP somehow modulates the plasmodesmal permeability, enabling vRNP to move through to the neighboring cells (as reviews, Carrington et al. 1996; Citovsky 1999; Lazarowitz and Beachy 1999). Despite such vivid modeling of cell-to-cell movement of tobamovirus, the molecular mechanisms are still largely unknown and in addition, some observations appear to contradict each other.

When bacterially expressed MP was microinjected into mesophyll cells of tobacco, the

A. Tamai, MPMI

plasmodesmal SEL rapidly (3 – 5 min) increased from <1 kDa to >20 kDa not only in the injected cells but also in far-distant cells (Waigmann et al. 1994). The injected MP itself moved between the trichome cells of *Nicotiana clevelandii* without markedly increasing the basal plasmodesmal SEL of ~7 kDa (Waigmann and Zambryski 1995). In the epidermal cells of TMV-infected *N. benthamiana*, virally expressed MP-green fluorescent protein (GFP) fusion was found only in and between infected cells, and in addition, the increased plasmodesmal SEL occurred between cells inside the infection foci but not between the most recently infected cells and as-yet-uninfected immediate neighbors (Oparka et al. 1997). Moreover, a comparative study by two microinjection methods suggested that the increase in the plasmodesmal SEL in MP-expressing tobacco tissues might not reflect a genuine biochemical activity of the MP (Storms et al. 1998).

The function of MP during the infection process has so far been analyzed mainly by using infectious transcripts synthesized in vitro and transgenic plants. However, these methods result in expression of wild-type or modified MP in at least most of the infected cells and, therefore, the activity of MP in the primary infected cells may not have been fully delineated. Previously, Morozov et al. (1997) showed that a *Potato virus X* mutant defective in cell-to-cell movement spread when an infectious DNA producing the mutant virus was co-bombarded with a separately cloned MP gene. This system makes it possible to introduce an MP gene in the primary infected cells only and to express it independently of virus infection. Here, we report data from such trans-complementation experiments with infectious DNAs for GFP-tagged *Tomato mosaic virus* (ToMV) mutants. Results showed that tobamoviral MPs expressed in an epidermal cell enable movement-defective ToMV to spread multicellularly and that infection greatly modulates the intercellular and intracellular distribution patterns of MP, implying coordination of cell-to-cell spread and intracellular multiplication in tobamovirus infection.

RESULTS

DNA-mediated infection of ToMV.

We constructed a series of infectious plasmids from which replication-competent ToMV (L

strain) derivatives were generated under the control of the *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) 35S RNA promoter after transfection by microprojectile bombardment. To monitor the infection, the CP gene, which is dispensable for replication and cell-to-cell movement (Meshi et al. 1987; Takamatsu et al. 1987), was replaced with a GFP gene. The structures of infectious plasmids are illustrated in Fig. 1A, and the characteristics of GFP variants are summarized in Table 1.

When piL.G3, encoding G3GFP (Kawakami and Watanabe 1997) as a reporter (Fig. 1A), was bombarded into the epidermal cells of nearly expanded leaves of *N. benthamiana*, clusters of GFP-expressing cells were observed 1 – 2 days after bombardment by fluorescent microscopy, as shown in Fig. 2A. No GFP signals were detected when a plasmid harboring a mutation in the replicase gene was bombarded (data not shown). Therefore, the GFP signals observed were not derived from any mRNA directly transcribed from the bombarded plasmids but from the subgenomic mRNA produced during the course of viral multiplication. When the MP gene of the infectious plasmid was mutated, the GFP signals were restricted to single cells, as seen in Fig. 2B for a frame-shift mutant derived from piL.G3(SF3) (Fig. 1A). The same result was obtained with MP mutants having a point mutation resulting in an amino acid change from Ser37 to Ala (Kawakami et al. 1999) or an internal deletion (data not shown).

Trans-complementation of movement-defective ToMV by transiently expressed tobamoviral MP genes.

When an MP-defective construct was bombarded with another plasmid p35LM, from which ToMV MP was expressed under the control of the 35S promoter (Fig. 1B), GFP-positive cells formed clusters, as exemplified in Fig. 2C. This suggests that the defect in cell-to-cell movement was complemented in trans by the co-bombarded MP gene. However, because the trafficking of GFP itself might be potentiated in the presence of MP, we assessed this possibility prior to further analysis.

G3GFP, initially used as a reporter, is a high fluorescent GFP variant localized in both the nucleus and the cytosol (Table 1 and Fig. 3A). When G3GFP alone was expressed, the bombarded sites formed halos at a frequency of ~5% and ~40% at 24-h and 48-h post-

A. Tamai, MPMI

bombardment, respectively, in which 1 – 3 cells adjoining a bombarded cell had weak GFP signals (Fig. 3B). When co-expressed with ToMV MP, 50% or more of the GFP-positive sites formed halos even at 24-h post-bombardment (Fig. 3C). Such enhancement of G3GFP diffusion was not observed with an unrelated protein, GAL4-VP16 (data not shown). Although these observations were consistent with a recent report showing the cell-to-cell trafficking of a soluble GFP alone (Oparka et al. 1999) as well as with the generally accepted activity of MP to promote the cell-to-cell trafficking of macromolecules through plasmodesmata (Wolf et al. 1989, 1991; Waigmann et al. 1994), the results also indicated that when an active MP is produced, the cytosolic type of GFP variants, such as G3GFP, can no longer be used as appropriate reporters for explicitly identifying the infected cells.

As an alternative, we examined an ER-localized GFP, erG3GFP (Table 1), which, as illustrated in Fig. 1B, contained the ER-targeting signal at the N-terminus and the ER retention signal at the C-terminus. When erG3GFP was expressed singly or together with MP (Fig. 3E and F), green fluorescence was restricted to the bombarded cells and, therefore, erG3GFP was not transported by the ToMV MP. It should be noted that intracellular localization pattern of erG3GFP was apparently modulated in the presence of MP without viral multiplication (compare Fig. 3E and F), confirming that TMV MP interacts with the ER (Reichel and Beachy 1998).

The activity of the MP gene in trans-complementing the movement-defective phenotype was re-examined by using piL.erG3(SF3) encoding erG3GFP in place of the CP (Fig. 1A). In this experiment, the inoculum included a third plasmid expressing NmGFP or mGFP5ER (Fig. 1B and Table 1) to identify the primary infected cells under UV irradiation. mGFP5ER (Haseloff and Siemering 1998) is localized in the ER and is non-traffickable, like erG3GFP. NmGFP had an NLS at the N-terminus to localize the fluorescence mainly in the nuclei. Because of its small size, NmGFP was not strictly localized in the nucleus and consequently trafficked between cells (Fig. 3G); however, the fluorescence intensity of the surrounding cells was low, particularly under UV irradiation (Fig. 3H).

As shown in Fig. 2D–G, the movement-defective phenotype of the mutant derived from piL.erG3(SF3) was apparently complemented when ToMV MP was co-expressed from

A. Tamai, MPMI

p35LM. Most infection sites contained as many as 8 – 20 GFP-positive cells at 48-h post-bombardment. Importantly, the distribution pattern of the virally expressed erG3GFP indicated that in 80–90% of the infection foci, the movement-defective virus spread from the initially infected cells across two or more cell boundaries, as summarized in Table 2. The results clearly demonstrated that the ToMV MP gene exerts its effects not only in the initially infected cells but also in their surrounding cells.

Essentially the same result was obtained when piL.Nm(SF3), p35LM, and pBIerG3 were co-bombarded, as summarized in Table 2. piL.Nm(SF3) is a movement-defective construct encoding nuclear-localized NmGFP (Fig. 1A), and its strong nuclear fluorescence made it easier to count the number of the infected cells, as exemplified in Fig. 2H. In this experiment, the bombarded cells were identified by strong cytoplasmic signals of the ER-localized erG3GFP derived from pBIerG3 (Figs. 1B and 2H). The distribution pattern of the GFP signals also demonstrated that the mutant virus spread across more than one cell boundary from the bombarded cells.

To know the specificity of trans-complementation, we examined the activity of other tobamoviral MPs derived from TMV, Cg-TMV, *Sunn hemp mosaic virus* (SHMV), *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV), and Ob-TMV, which were closely or distantly related; i.e., the identity to the ToMV MP at the amino acid sequence level varies from 20% for SHMV MP to 77% for TMV MP (see Aguilar et al. 1996). When co-expressed with G3GFP, all of these MPs promoted halo formation at similar frequencies (50–60% of the bombarded sites at 24-h post-bombardment), confirming their expression in the bombarded cells and their modulation of the plasmodesmal permeability (data not shown). Co-bombardment experiments with piL.erG3(SF3) showed that all of them had the ability to trans-complement the movement-defective phenotype (some are shown in Fig. 2I–L). However, the efficiency of complementation mediated by CGMMV MP, as evaluated by the number of infected cells in each infection site, was rather low (Fig. 2L).

We also examined the *Cucumber mosaic virus* (CMV) 3a MP, which, like TMV MP, is known to be localized in plasmodesmata, to bind to single-strand RNA, to increase the plasmodesmal permeability, and to move from cell to cell (as reviews, Lazarowitz and Beachy

1999; Ding 1998). Expression of the active 3a MP in the bombarded cells was confirmed by halo formation when co-expressed with the cytosolic G3GFP (Fig. 3D). However, the CMV 3a MP was unable to complement the defective movement of the ToMV mutant (Fig. 2M), consistent with the observation that movement-defective TMV failed to spread in transgenic tobacco expressing the 3a MP (Kaplan et al. 1995).

Facilitation of the intercellular distribution of MP-EGFP by virus infection.

The fact that the bombarded MP genes functioned beyond multiple cell-cell boundaries implied the presence of MP outside the initially infected cells. To confirm this, we examined the intracellular and intercellular distribution patterns of MP in infected and non-infected sites by means of the fluorescence of a fusion (MP-EGFP) between ToMV MP and an enhanced GFP variant, EGFP (Table 1).

When p35LME harboring the 35S/MP-EGFP gene (Fig. 1B) was bombarded alone, most of the fluorescence was inside the bombarded cells, accumulating into a number of irregularly shaped aggregates, which were sometimes associated with filamentous structures (Fig. 4A). Similar localization patterns have been reported for either virally or singly expressed MP-GFPs (e.g., Kawakami and Watanabe 1997; Heinlein et al. 1998; Más and Beachy 1999; Reichel et al. 1999). In ~80% of the fluorescent sites, MP-EGFP was restricted to the bombarded cells only (Table 3). In these sites, tiny fluorescent spots in the cell wall, representing plasmodesmal association of MP (Oparka et al. 1997), were rarely found. In the rest of the sites (~20%), a small amount of MP-EGFP was detected as tiny fluorescent spots in the cell wall just surrounding the bombarded cells and that of 1 – 3 adjoining cells at the portions not directly connecting to the bombarded cells (Fig. 4B). An increasing number of tiny fluorescent spots was usually accompanied with a decreasing number of intracellular aggregates. The observations suggest that MP-EGFP likely trafficked from cell to cell, although very inefficiently. The MP-EGFP mRNA did not seem to be transported, because cytoplasmic aggregates were never found in the neighboring cells.

To reveal the effect of viral infection on the distribution pattern of MP-EGFP, we used piL.Nm(SF3) (Fig. 1) as a movement-defective construct (Fig. 4C–F). Infected cells were

identified under UV irradiation as those having strongly fluorescing nuclei derived from the virally expressed NmGFP (Table 1). The fluorescence of NmGFP remaining in the cytosol did not interfere with weak signals (fluorescent spots) of MP-EGFP in the cell wall. At 15-h post-bombardment, when MP-EGFP already accumulated to form aggregates, NmGFP signals were barely found or were too weak to give evidence of infection. At 24-h post-bombardment, the infection was usually up to the immediate neighbors. Around this stage of infection, MP-EGFP was detected in the cell wall surrounding the bombarded cells and also between the adjoining (secondary infected) cells, as exemplified in Fig. 4C and D, while the cytoplasmic aggregates were diminished in both number and size or were undetectable.

At 40-h post-bombardment (infection reached nearly to the maximum size around this time after bombardment), each infection site contained a cluster of infected cells (Fig. 4E and F), indicating that the 35S/MP-EGFP gene trans-complemented the movement-defective phenotype. However, the activity of MP-EGFP (or the final size of infection reflecting the number of cell-cell boundaries trafficked) appeared to be slightly lower than that of the authentic MP. MP-EGFP signals were detected mainly in the cell wall as punctate spots (Fig. 4E). Remarkably, as many as ~90% of the MP-EGFP-positive foci exhibited multicellular distribution of MP-EGFP (Table 3). It is notable that the MP-EGFP signals in the cell wall were typically found between already infected (NmGFP-positive) cells, but rarely between an infected cell and a detectably uninfected (NmGFP-negative) cell. The bombarded cell sometimes contained cytoplasmic aggregates of MP-EGFP; however, their size and number were much smaller than those observed in non-infected cells.

The MP-EGFP fluorescence became rather weak at 40-h post-bombardment; in 25% of the infection foci, the fluorescence could not be detected even though the virus had spread across more than one cell boundary (Table 3). At 48-h post-bombardment, finding MP-EGFP signals was often difficult, whereas large and highly fluorescent intracellular aggregates, just like the pattern shown in Fig. 4A, were still clearly visible in non-infected (NmGFP-negative) cells. It is assumed that replicase proteins were expressed in many, if not all, of these non-infected sites. Actually, essentially the same distribution patterns were obtained when the 35S/MP-EGFP gene was co-bombarded with a replication-defective construct lacking the 3' non-coding

A. Tamai, MPMI

region of ToMV (data not shown). Therefore, expression of the replicase gene alone (at least under the control of the 35S promoter) appears to be insufficient for modulating the subcellular localization pattern of MP-EGFP. In addition, the cell-to-cell trafficking of MP-EGFP in non-infected sites occurred at a similar level and at the same frequency (22%) irrespective of whether the inoculum included the infectious construct (Table 3). Taken together, it is likely that ToMV infection (or the presence of replicating virus) markedly affects the intracellular and intercellular distribution patterns of the MP-EGFP.

DISCUSSION

Microinjection studies have shown that bacterially expressed TMV MP can move from cell to cell (Waigmann et al. 1994; Waigmann and Zambryski, 1995). On the other hand, the localization of MP produced during infection and analysis of the plasmodesmal gating in expanding infection sites suggested that the virally expressed MP is not transported to as-yet-uninfected distant cells (Padgett et al. 1996; Oparka et al. 1997). Further, Storms et al. (1998) revealed that the increase in the plasmodesmal SEL observed in MP-expressing tobacco tissues was a method-dependent phenomenon. Thus, it remained unclear whether tobamoviral MP traffics multicellularly in infected sites, or how far the MP in a given cell exerts its effects from the MP-expressing cell.

In this work, we employed trans-complementation experiments to clarify this problem. Results clearly showed that in *N. benthamiana* the transiently expressed MP gene enables movement-defective ToMV to move from the bombarded cells, through two or more cell boundaries, to their neighbors. Accompanied with multicellular spread of the movement-defective virus, the MP (as evaluated by the fluorescence of MP-EGFP) was intercellularly distributed and subsequently localized in plasmodesmata. In contrast, in non-infected sites, the cell-to-cell trafficking of MP-EGFP occurred only very infrequently. Taken together, it is likely that the MP itself moved from the initially infected cells to their neighbors, concurrently with the viral genome, as a component of vRNP or a free protein. In the neighboring cells, the MP could be re-utilized to move newly replicated viral RNA further away. Some vRNP (or genomic RNA) might be trafficked through more than one plasmodesma without entering the replication

cycle on the way. A possibility still remains that the MP mRNA might also be transported along with the genomic RNA in the infected sites.

It is noteworthy that in non-infected cells, the MP-EGFP predominantly accumulated into highly fluorescent intracellular aggregates. Similar intracellular aggregates have been reported for virally expressed MP or MP-GFP fusions in tobacco protoplasts infected with TMV, ToMV, or Ob-TMV (e.g., Meshi et al. 1992; Kawakami and Watanabe 1997; Heinlein et al. 1998; Más and Beachy 1999), and in leaf cells infected with TMV or Ob-TMV (Padgett et al. 1996; Heinlein et al. 1998). In the latter case, the cytoplasmic aggregates of MP-GFP were found somewhat inward from the leading edge of expanding infection sites, whereas in the cells located at the front edge, fluorescent signals of MP-GFP were primarily found in plasmodesmata. Collectively, the cells in which MP(-GFP) aggregated are non-infected cells lacking in replicating virus, protoplasts from which virus cannot move, and infected leaf cells from which active movement may have finished. Therefore, the presence of the cytoplasmic aggregates is not correlated with active cell-to-cell movement of tobamoviruses.

In animal cells, it is known that when misfolded protein is produced at a level exceeding the capacity of proteasomes, so-called aggresomes (proteasome-enriched large aggregates) develop around the microtubule organization center with an aid of the cytoskeletal network (Johnston et al. 1998; García-Mata et al. 1999). Although the corresponding structures have not been revealed in plant cells, it is possible that the aggregates of MP(-GFP) are likewise formed as a result of host cell response to sequester problematic proteins, as briefly argued by Más and Beachy (1999). Proteasome-mediated degradation of MP expressed in protoplasts (Reichel and Beachy 2000) and the association of MP with microtubules at relatively later stages of infection (Heinlein et al. 1995; McLean et al. 1995; Padgett et al. 1996) appear to be consistent with the aggresome hypothesis. Thus, the cytoplasmic aggregates may not necessarily represent the potentially active MP.

As infection proceeded, the amount of MP-EGFP became very low or below the limit of detection; for example, around 24 h after bombardment, most signals of MP-EGFP were found in plasmodesmata, while only a small fraction was present in the intracellular aggregates. Assuming that the aggregates contain active MP, the change of the distribution pattern of MP-

EGFP upon infection may be explained by MP-EGFP (already synthesized and accumulated) being efficiently utilized in the bombarded cells and trafficked to their neighbors. Alternatively, an excess amount of MP-EGFP might be efficiently destabilized upon infection. Another possibility that MP-EGFP might be expressed at a low level specifically in the cells later undergoing infection seems unlikely, considering the following observations: GFP derivatives used as reporters for identifying the bombarded cells were stably detected in both infected and non-infected cells; aggregates of MP-EGFP were detected much earlier than the time when infected cells were recognized by the expression of a virally expressed GFP reporter; and MP-EGFP was stably detected in non-infected cells.

It is evident that there is a remarkable difference in the distribution patterns of MP(-EGFP) between infected and non-infected sites, and the final distribution pattern (multicellular spread and plasmodesmal localization) of MP in infected sites is in good agreement with its cell-to-cell movement function. Apart from the mechanisms, the fact that the behavior of MP is greatly affected by infection suggests that the MP requires some factor specifically induced in the infected cells to fulfill its activity to transport the tobamoviral genome from cell to cell.

Beachy and colleagues have shown that TMV MP colocalizes with vRNA and replicase component at least at certain stages of infection in tobacco protoplasts (Heinlein et al. 1998; Más and Beachy 1999). Although such colocalization has yet to be observed in leaf cells from which virus moves actively, their finding suggests that MP is produced in close proximity to the replication machinery in infected leaf cells. Together with our observations indicating that multicellular spread of MP in leaves is greatly enhanced in the presence of replicating virus and likely co-ordinates with the cell-to-cell movement of the viral genome, it is tempting to examine whether tobamoviral MP interacts, directly or indirectly, with replication machinery components.

MATERIALS AND METHODS

Construction of infectious ToMV plasmids.

The CaMV 35S RNA promoter sequence (from -864 to -1 relative to the transcription

A. Tamai, MPMI

initiation site) was PCR-amplified from pBI221 (Clontech, Palo Alto, CA) with a set of oligonucleotide primers designed to have an *AatI* site between -1 and +1 (see Yamaya et al. 1988), and *SacI* and *XbaI* sites at the ends. The amplified fragment was cloned between the *SacI* and *XbaI* sites of pBluescriptSK+ (Stratagene, La Jolla, CA) to generate pb35S. PCR-amplified regions and ligation junctions in all constructions were confirmed by sequencing.

Infectious plasmids (piL series, Fig. 1A) were made via several intermediates, in which the wild-type ToMV cDNA sequence was derived from pLFW3 (Meshi et al. 1986). Briefly, a PCR-amplified ToMV ds-cDNA (from nucleotide 1 to 1229 [*SpeI* site]) was inserted between the *AatI* and *SpeI* sites of pb35S to generate p35ToMV5, in which the transcription initiation site corresponded to the 5' end of ToMV. The 3' part of the ToMV sequence (from nucleotides 6099 to the 3' end; the *SpeI*–*SmaI* fragment of pLFW3) was ligated to the nopaline synthase gene (*nos*) terminator (the blunt-ended *SacI*–*EaeI* fragment of pBI221), then inserted between the *SpeI* and blunted *KpnI* sites of p35ToMV5 to yield p35LΔN. The internal part of the ToMV sequence was inserted into the *SpeI* site of p35LΔN to generate the full-length construct piLW3. The CP and MP genes were modified on subclones then returned to piLW3 or an appropriate infectious clone. piL.G3 (Fig. 1) had the *SacI* (blunted)–*BstEII* fragment of pTLQG3::fus (Kawakami and Watanabe 1997) encoding G3GFP plus a 19-bp linker-derived sequence in place of the ToMV sequence from nucleotide 5718 (the sixth codon of the CP gene) to 5799 (*BstEII* site). G3GFP expressed from piL.G3 had 12 extra amino acids at the N-terminus (MSYSIPISGGGG) prior to the authentic Met of GFP, in which the first 5 amino acids (underlined) were identical to those of the ToMV CP. piL.G3(SF3) and other plasmids with (SF3) in the name had a 1-bp deletion at nucleotide 4935, resulting in frame-shifting at the tenth codon of the MP gene, as in pLQSF3 (Meshi et al. 1987). The sequence from nucleotide 5703 (corresponding to the initiation codon of the CP gene) to 6098 (*SpeI* site) of piL.G3(SF3) was replaced with a fragment encoding erG3GFP (from the initiation codon to the *SacI* site of pBIerG3 [see later]) to yield piL.erG3(SF3). erG3GFP expressed from piL.erG3(SF3) had no CP-derived amino acids at the N-terminus. To create piL.Nm(SF3), the G3GFP gene of

A. Tamai, MPMI

piL.G3(SF3) was replaced with a synthetic ds-oligonucleotide encoding the NLS of SV40 large-T antigen, and the mGFP5-encoding *EcoRI*–*SacI* fragment of pBINmGFP5ER (Haseloff et al. 1997; Haseloff and Siemering 1998). NmGFP expressed from piL.Nm(SF3) had MSYSIPAELPPKKR~~K~~VEF at the N-terminus, followed by mGFP5, in which 5 CP-derived amino acids are underlined.

Plasmids for expression of MP, GFP, and MP-EGFP.

Each of the fragments encoding a tobamoviral or cucumoviral MP was PCR-amplified with an appropriate cDNA clone as a template and inserted between the *XbaI* and *SacI* sites of pBI221. The resulting plasmids, p35LM (Fig. 1B), p35CgM, p35OMM, p35CcM, p35WM, p35ObM, and p35YM, contained the MP gene of ToMV (L strain), Cg-TMV, TMV (OM strain), SHMV, CGMMV (W strain), Ob-TMV, and CMV (Y strain), respectively. In all cases, the first ATG from the transcription initiation site corresponded to the authentic initiation codon. The plasmid pBIImGFP5ER was constructed by replacing the *BamHI*–*SacI* fragment of pBINmGFP5ER for the corresponding fragment of pBI221. The larger *BamHI* (blunted)–*NspV* fragment of pBIImGFP5ER was ligated with the *SacI* (blunted)–*NspV* fragment of pTLQG3::fus encoding G3GFP to generate pBIG3 (Fig. 1B). The expressed G3GFP had no extra amino acids at the N-terminus and 4 additional amino acids (HDEL) derived from mGFP5ER at the C-terminus. To express erG3GFP, pBIerG3 (Fig. 1B) was constructed by replacing an *NcoI* fragment of pBIG3 with the corresponding fragment of pBIImGFP5ER to introduce the sequence for the N-terminal signal peptide. pBINm (Fig. 1B) was constructed by inserting an *AatII* (blunted)–*SacI* fragment of piL.Nm between the *BamHI* (blunted) and *SacI* sites of pBI221. To create the MP-EGFP fusion gene, a point mutation was introduced at nucleotide 5686 of ToMV to generate an *EcoRI* site in a pBluescript-based subclone, into which the EGFP gene excised from pEGFPiRESneo (Clontech, Palo Alto) was inserted. The resulting MP-EGFP fusion gene was then inserted between the blunted *XbaI* and *SacI* sites of pBI221 to yield p35LME (Fig. 1B). The MP-EGFP lacked the last 5 amino acids (DSDSY) of the ToMV MP and instead had the linker-derived 11 amino acids

A. Tamai, MPMI

NSVDPRVPVAT before the first Met of EGFP.

Microprojectile bombardment.

Bombardment was performed with PDS1000 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) essentially according to the manufacturer's instruction. Briefly, mature or nearly expanded leaves (8 – 10 cm in length) of *N. benthamiana* (6 – 8 weeks old) were cut and placed on an MS-agar plate at a target distance of 6 cm. Three mg of 1- μ m gold particles were coated with 5 μ g of plasmid DNA and divided into 6 equal parts, each of which was subjected to a shot with a rupture disk of 1,350 psi. In co-bombardment experiments, equal amounts of the respective plasmids (in total 5 μ g) were mixed before coating the gold particles. A single leaf was bombarded twice, then incubated at 26 °C in the dark. At appropriate times after bombardment, leaves were cut into pieces and GFP signals were observed under an epifluorescent microscope (Axioskop; Carl Zeiss, Germany). Images were obtained by a color-chilled 3CCD camera, C5810 (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan). The filter set 41014 (Chroma Technologies, Brattleboro, VT) or No. 10 (Carl Zeiss, Germany) was used to observe GFP variants under blue-light irradiation, and the filter set 31022 (Chroma Technologies) under UV irradiation.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs. J. Haseloff, S. Kawakami, W. Watanabe, and M. Ishikawa for plasmids, and Drs. M. Iwabuchi and Y. Okada for encouragement. This work was supported in part by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan.

LITERATURE CITED

Aguilar, I., Sánchez, F., Martín, A. M., Martínez-Herrera, D., and Ponz, F. 1996. Nucleotide sequence of Chinese rape mosaic virus (oilseed rape mosaic virus), a crucifer tobamovirus

A. Tamai, MPMI

infectious on *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 30:191-197.

Atabekov, J. G., and Taliansky, M. E. 1990. Expression of a plant virus-coded transport function by different viral genomes. *Adv. Virus Res.* 38:201-248.

Atkins, D., Hull, R., Wells, B., Roberts, K., Moore, P., and Beachy, R. N. 1991. The tobacco mosaic virus 30K movement protein in transgenic tobacco plants is localized to plasmodesmata. *J. Gen. Virol.* 72:209-211.

Carrington, J. C., Kasschau, K. D., Mahajan, S. K., and Schaad, M. C. 1996. Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. *Plant Cell* 8:1669-1681.

Citovsky, V. 1999. Tobacco mosaic virus: a pioneer of cell-to-cell movement. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* 354:637-643.

Citovsky, V., Knorr, D., Schuster, G., and Zambryski, P. 1990. The P30 movement protein of tobacco mosaic virus is a single-strand nucleic acid binding protein. *Cell* 60:637-647.

Citovsky, V., Wong, M. L., Shaw, A. L., Prasad, B. V. V., and Zambryski, P. 1992. Visualization and characterization of tobacco mosaic virus movement protein binding to single-stranded nucleic acids. *Plant Cell* 4:397-411.

Deom, C. M., Lapidot, M., and Beachy, R. N. 1992. Plant virus movement proteins. *Cell* 69:221-224.

Deom, C. M., Oliver, M. J., and Beachy, R. N. 1987. The 30-kilodalton gene product of tobacco mosaic virus potentiates virus movement. *Science* 237:389-394.

Ding, B. 1998. Intercellular protein trafficking through plasmodesmata. *Plant Mol. Biol.* 38:279-310.

Ding, B., Haudenschild, J. S., Hull, R. J., Wolf, S., Beachy, R. N., and Lucas, W. L. 1992. Secondary plasmodesmata are specific sites of localization of the tobacco mosaic virus movement protein in transgenic tobacco plants. *Plant Cell* 4:915-928.

García-Mata, R., Bebök, Z., Sorscher, E. J., and Sztul, E. S. 1999. Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimera. *J. Cell Biol.* 146:1239-1254.

Haseloff, J., and Siemering, K. R. 1998. The uses of green fluorescent protein in plants. Pages 191-220 in: *Green Fluorescent Protein: Properties, Applications, and Protocols*. M.

A. Tamai, MPMI

Chalfie, and S. Kain, eds. A Wiley-Liss Publication, New York.

Haseloff, J., Siemering, K. R., Prasher, D. C., and Hodge, S. 1997. Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:2122-2127.

Heinlein, M., Epel, B. L., Padgett, H. S., and Beachy, R. N. 1995. Interaction of tobamovirus movement proteins with the plant cytoskeleton. *Science* 270:1983-1985.

Heinlein, M., Padgett, H. S., Gens, J. S., Pickard, B. G., Casper, S. J., Epel, B. L., and Beachy, R. N. 1998. Changing patterns of localization of the tobacco mosaic virus movement protein and replicase to the endoplasmic reticulum and microtubules during infection. *Plant Cell* 10:1107-1120.

Johnston, J. A., Ward, C. L., and Kopito, R. R. 1998. Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J. Cell Biol.* 143:1883-1898.

Kaplan, I. B., Shintaku, M. H., Li, Q., Zhang, L., Marsh, L. E., and Palukaitis, P. 1995. Complementation of virus movement in transgenic tobacco expressing the cucumber mosaic virus 3a gene. *Virology* 209:188-199.

Kawakami, S., Padgett, H., Hosokawa, D., Okada, Y., Beachy, R. N., and Watanabe, Y. 1999. Phosphorylation and/or presence of serine 37 in the movement protein of tomato mosaic tobamovirus is essential for intracellular localization and stability in vivo. *J. Virol.* 73:6831-6840.

Kawakami, S., and Watanabe, Y. 1997. Use of green fluorescent protein as a molecular marker tag of protein movement in vivo. *Plant Biotech.* 14:127-130.

Lazarowitz, S. G., and Beachy, R. N. 1999. Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants. *Plant Cell* 11:535-548.

Lucas, W. J., Ding, B., and van der Schoot, C. 1993. Plasmodesmata and the supracellular nature of plants. *New Phytol.* 125:435-476.

Más, P., and Beachy, R. N. 1999. Replication of tobacco mosaic virus on endoplasmic reticulum and role of the cytoskeleton and virus movement protein in intracellular distribution of viral RNA. *J. Cell Biol.* 147:945-958.

Maule, A. J. 1991. Virus movement in infected plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 9:457-473.

A. Tamai, MPMI

McLean, B. G., Zupan, J., and Zambryski, P. C. 1995. Tobacco mosaic virus movement protein associates with the cytoskeleton in tobacco cells. *Plant Cell* 7:2101-2114.

Meshi, T., Hosokawa, D., Kawagishi, M., Watanabe, Y., and Okada, Y. 1992.

Reinvestigation of intracellular localization of the 30K protein in tobacco protoplasts infected with tobacco mosaic virus RNA. *Virology* 187:809-813.

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.

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.* 6:2557-2563.

Morozov, S. Y., Fedorkin, O. N., Jüttner, G., Schiemann, J., Baulcombe, D. C., and Atabekov, J. G. 1997. Complementation of a potato virus X mutant mediated by bombardment of plant tissues with cloned viral movement protein genes. *J. Gen. Virol.* 78:2077-2083.

Oparka, K. J., Prior, D. A. M., Santa Cruz, S., Padgett, H. S., and Beachy, R. N. 1997. Gating of epidermal plasmodesmata is restricted to the leading edge of expanding infection sites of tobacco mosaic virus (TMV). *Plant J.* 12:781-789.

Oparka, K. J., Roberts, A. G., Boevink, P., Santa Cruz, S., Roberts, I., Pradel, K. S., Imlau, A., Kotlizky, G., Sauer, N., and Epel, B. 1999. Simple, but not branched, plasmodesmata allow the nonspecific trafficking of proteins in developing tobacco leaves. *Cell* 97:743-754.

Padgett, H. S., Epel, B. L., Kahn, T. W., Heinlein, M., Watanabe, Y., and Beachy, R. N. 1996. Distribution of tobamovirus movement protein in infected cells and implications for cell-to-cell spread of infection. *Plant J.* 10:1079-1088.

Reichel, C., and Beachy, R. N. 1998. Tobacco mosaic virus infection induces severe morphological changes of the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:11169-11174.

Reichel, C., and Beachy, R. N. 2000. Degradation of tobacco mosaic virus movement protein

A. Tamai, MPMI

- by the 26S proteasome. *J. Virol.* 74:3330-3337.
- Reichel, C., Más, P., and Beachy, R. N. 1999. The role of the ER and cytoskeleton in plant viral trafficking. *Trends Plant Sci.* 4:458-462.
- Storms, M. M. H., van der Schoot, C., Prins, M., Kormelink, R., van Lent, J. W. M., and Goldbach, R. W. 1998. A comparison of two methods of microinjection for assessing altered plasmodesmal gating in tissues expressing viral movement proteins. *Plant J.* 13:131-140.
- 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.
- Tomenius, K., Clapham, D., and Meshi, T. 1987. Localization by immunogold cytochemistry of the virus-coded 30K protein in plasmodesmata of leaves infected with tobacco mosaic virus. *Virology* 160:363-371.
- Waigmann, E., Lucas, W. J., Citovsky, V., and Zambryski, P. 1994. Direct functional assay for tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein and identification of a domain involved in increasing plasmodesmal permeability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:1433-1437.
- Waigmann, E., and Zambryski, P. 1995. Tobacco mosaic virus movement protein-mediated protein transport between trichome cells. *Plant Cell* 7:2069-2079.
- Wolf, S., Deom, C. M., Beachy, R. N., and Lucas, W. J. 1989. Movement protein of tobacco mosaic virus modifies plasmodesmatal size exclusion limit. *Science* 246:377-379.
- Wolf, S., Deom, C. M., Beachy, R., and Lucas, W. J. 1991. Plasmodesmatal function is probed using transgenic tobacco plants that express a virus movement protein. *Plant Cell* 3:593-604.
- Yamaya, J., Yoshioka, M., Meshi, T., Okada, Y., and Ohno, T. 1988. Expression of tobacco mosaic virus RNA in transgenic plants. *Mol. Gen. Genet.* 211:520-525.

Table 1. Characteristics of GFP variants

GFP variant ^a	excitability		subcellular localization
	UV	blue-light	
G3GFP (G3)	–	+	nucleus ~ cytosol
NmGFP (Nm)	+	+	nucleus > cytosol
erG3GFP (erG3)	–	+	ER
mGFP5ER	+	+	ER
EGFP ^b	–	+	nucleus ~ cytosol

^a Abbreviations used in the plasmid names (see Fig. 1) are shown in parentheses.

^b EGFP was used only as the fusion protein with ToMV MP. The sequence of the EGFP gene differs considerably (~77% identity) from the coding sequences for the other GFP variants listed in this Table.

Table 2. Multicellular spread of movement-defective ToMV by the co-bombarded ToMV MP gene

bombarded plasmids ^a	cell-cell boundaries ^b		total no. of infection sites examined
	1	2 or more	
piL.erG3(SF3) + p35LM + pBINm	8 (13)	54 (87)	62 (100)
piL.erG3(SF3) + p35LM + pBImGFP5ER	17 (18)	77 (82)	94 (100)
piL.Nm(SF3) + p35LM + pBIerG3	4 (12)	30 (88)	34 (100)

^a The structures of the plasmids are shown in Fig. 1. In each combination, the three plasmids, in order, produced movement-defective ToMV [piL.erG3(SF3) and piL.Nm(SF3)], ToMV MP (p35LM), and a GFP derivative absolutely (pBImGFP5ER and pBIerG3) or mainly (pBINm) localized in the bombarded cells.

^b Data are presented as the number of infection sites in which the movement-defective virus spread across the indicated number of cell-cell boundaries at 48-hr post-bombardment. The frequency (%) is shown in parentheses. Single-cell infection was not detected. Typical patterns are shown in Fig. 2D–H.

Table 3. Effect of infection on intercellular distribution of MP-EGFP

bombarded plasmid ^a	Distribution of MP-EGFP ^b				
	in uninfected sites		in infected sites ^c		
	single	2 or more (%)	n.d.	single	2 or more (%)
p35LME	206	58 (22)	–	–	–
p35LME + piL.Nm(SF3)	292	82 (22)	25	8	71 (90)

^a p35LME encodes the 35S/ToMV MP-EGFP gene, and piL.Nm(SF3) is an infectious clone producing a movement-defective ToMV (see Fig. 1).

^b Data are presented as the number of the bombarded sites exhibiting different distribution patterns of MP-EGFP at 40-h post-bombardment: single, MP-EGFP was detected inside the bombarded cell and/or in the cell wall just surrounding the bombarded cell only; 2 or more, MP-EGFP was present in the cell wall not adjoining the bombarded cell (i.e., between two non-bombarded cells); n.d., MP-EGFP signals were not detected, even though multiple cells were infected. The percentage (%) of '2 or more' in the total number of MP-EGFP-positive sites are shown in parentheses. Typical patterns are shown in Fig. 4A, B, E, and F.

^c Infected cells were identified by strongly fluorescing nuclei having virally expressed NmGFP under UV irradiation. All of the infected sites identified contained a cluster of infected cells.

Captions for Figures

Fig. 1. A, Schematic representation of infectious ToMV plasmids. The genomic organization of ToMV is shown at the top. Boxes, coding regions; thin lines, non-coding regions. Bent arrows denote the starting positions of the subgenomic mRNAs. In piL.G3, the pentagon designates the CaMV 35S RNA promoter (35S) and the small box indicates the *nos* terminator (*nosT*). Boxes delineated with broken lines indicate non-expressed portions derived from the MP or CP gene. The portions corresponding to the ER-targeting signal and NLS are in black. Closed triangles indicate the SF3 frame-shift mutation introduced at the tenth codon of the MP gene. **B**, Schematic representation of the genes for ToMV MP, ToMV MP-EGFP, and GFP derivatives, which are expressed under the control of the 35S promoter. The protein expressed from each plasmid is shown in parentheses below the name of the plasmid.

Fig. 2. Trans-complementation of movement-defective ToMV. Images were taken under blue-light (**A–D**, **F**, and **H–M**) or UV irradiation (**E**, and **G**) at 48-h post-bombardment. Plasmid structures are shown in Fig. 1. **A**, Bombardment of piL.G3 encoding the wild-type MP and G3GFP, resulting in multicellular infection. **B**, Bombardment of piL.G3(SF3) with a frame-shift mutation in the MP gene, resulting in single-cell infection. **C**, Co-bombardment of piL.G3(SF3) and p35LM with the 35S/ToMV MP gene, forming a cluster of GFP-positive cells. **D–G**, Co-bombardment of piL.erG3(SF3), a movement-defective construct encoding erG3GFP, together with p35LM and pBINm encoding NmGFP (**D** and **E**) or with p35LM and pBIImGFP5ER encoding mGFP5ER (**F** and **G**). The initially infected (bombarded) cells were visualized by UV irradiation in **E** and **G**, and marked by arrows in **D–G**. **H**, Co-bombardment of piL.Nm(SF3), a movement-defective construct encoding NmGFP, together with p35LM and pBIerG3 encoding erG3GFP. Infected cells exhibit nuclear fluorescence derived from virally expressed NmGFP. An arrow indicates the bombarded cell, having strong fluorescence of erG3GFP. **I–M**, Typical patterns obtained when piL.erG3(SF3) was co-bombarded with another plasmid expressing ToMV MP (**I**), Cg-TMV MP (**J**), SHMV MP (**K**), CGMMV MP (**L**), or CMV 3a MP (**M**). Bars = 50 μ m.

Fig. 3. Distribution patterns of GFP variants in the presence or absence of MP. Images were taken under blue-light (**A–G**) or UV irradiation (**H**) at 24-h post-bombardment. **A** and **B**, bombardment of pBIG3 with the 35S/G3GFP gene. G3GFP fluorescence was restricted to the bombarded cell in **A** or formed a halo in **B**. **C** and **D**, frequently observed patterns obtained when G3GFP was co-expressed with ToMV MP (p35LM) (**C**) or CMV 3a MP (p35YM) (**D**). **E** and **F**, expression of ER-localized erG3GFP (pBIerG3) alone (**E**) or with ToMV MP (p35LM) (**F**). erG3GFP was not traffickable. Note that the ER was distorted in the presence of the MP (**F**). **G** and **H**, co-expression of NmGFP (pBINm) and ToMV MP (p35LM). NmGFP was detected in cells adjoining the bombarded cell (**G**), but their fluorescence intensity was weak under UV irradiation (**H**). Bars = 25 μ m.

Fig. 4. Different distribution patterns of MP-EGFP in infected and non-infected sites. Images were taken under blue-light (**A–C**, and **E**) or UV irradiation (**D** and **F**) at 40-h (**A**, **B**, **E**, and **F**) or 24-h post-bombardment (**C** and **D**). **A** and **B**, bombardment of p35LME, harboring the ToMV MP-EGFP fusion gene under the control of the 35S promoter. MP-EGFP accumulates into multiple aggregates in the bombarded cell (shown in **A**) or infrequently traffics from the bombarded cell to the neighboring cells (shown in **B**). Small arrows highlight tiny fluorescent spots in the cell wall, representing plasmodesmal localization of MP-EGFP. **C–F**, Co-bombardment of p35LME with piL.Nm(SF3), an infectious clone producing a movement-defective ToMV (see Fig. 1A). Nuclear-localized NmGFP signals (arrowheads in **D** and **F**), indicative of infection, were UV-excitable. Small arrows in **C** and **E** indicate plasmodesma-localized MP-EGFP signals. Bars = 25 μ m.

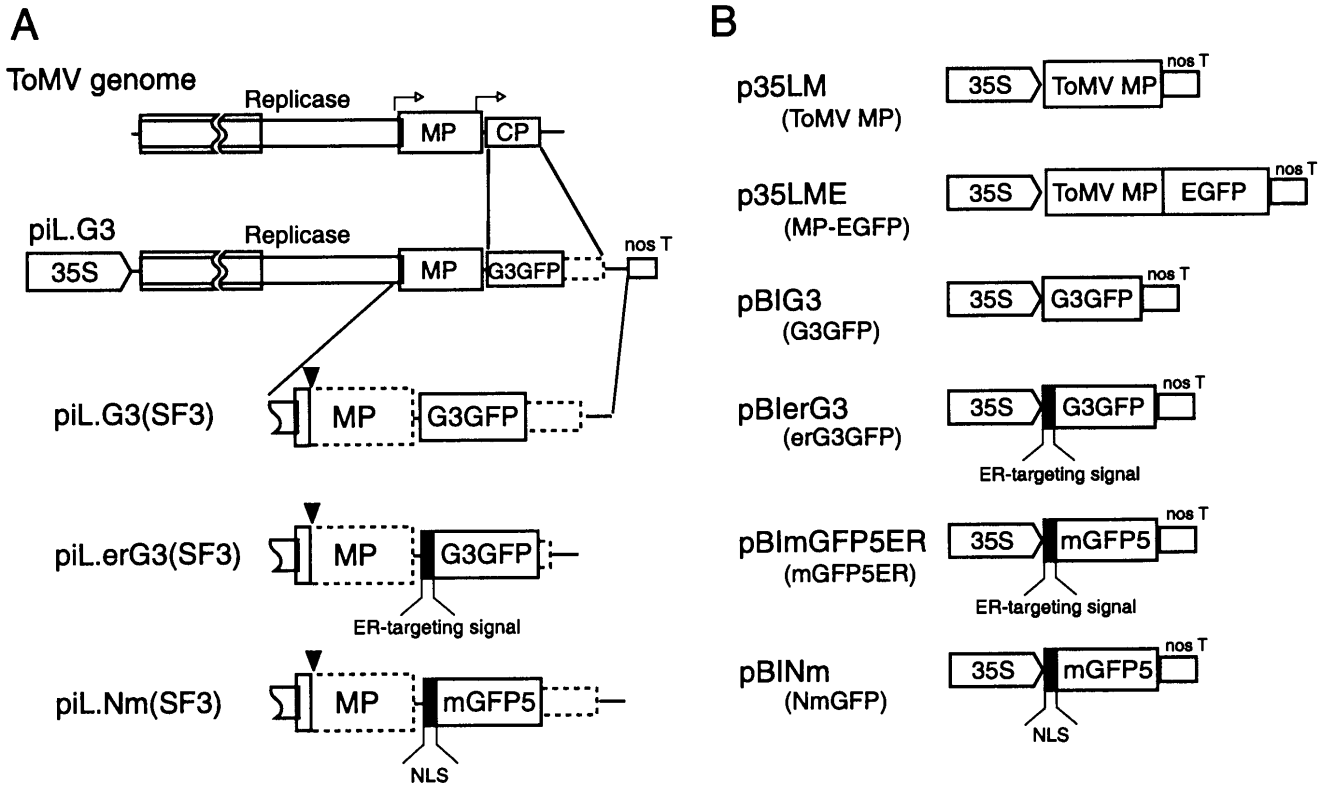


FIG. 1

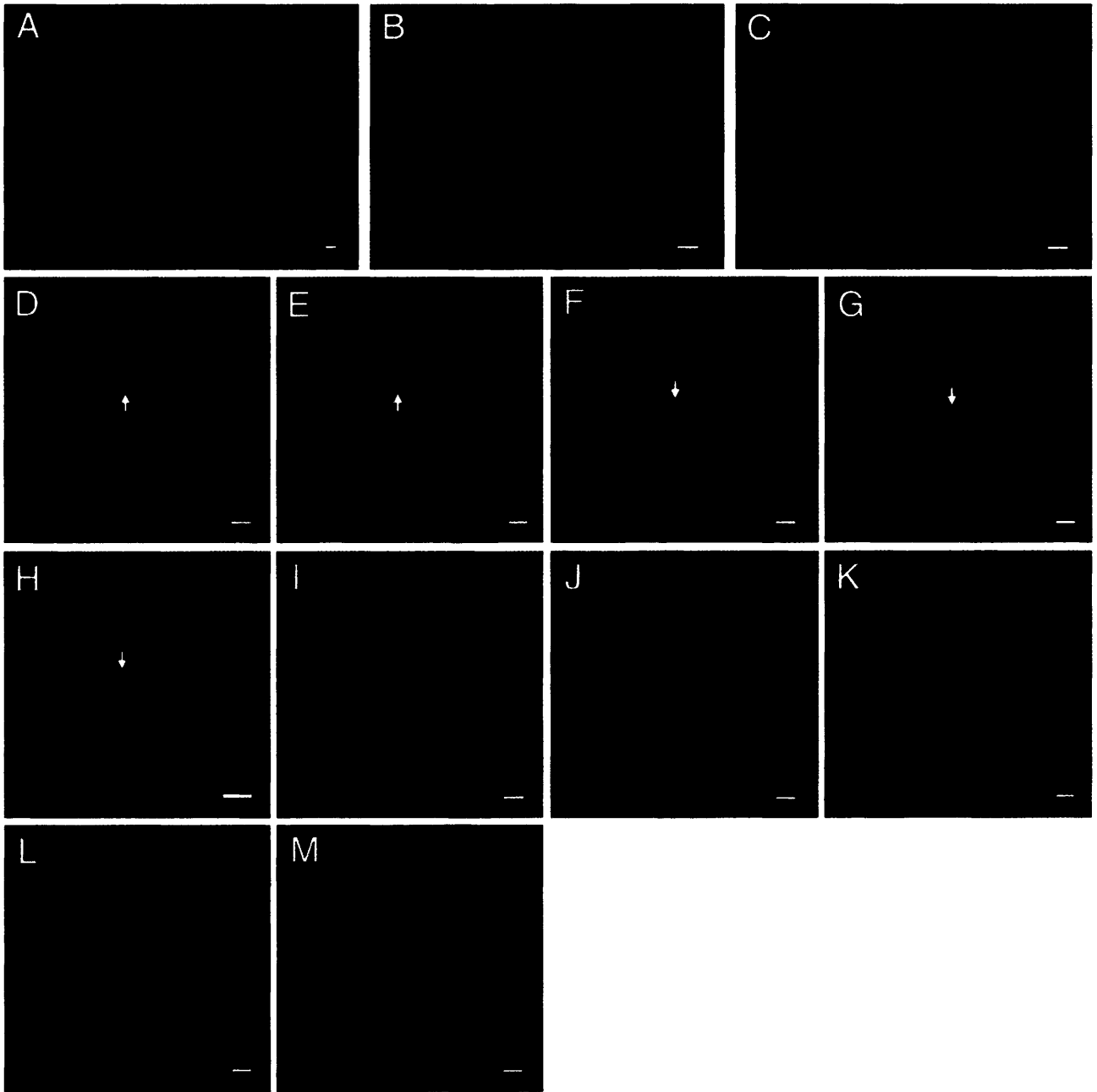


FIG. 2

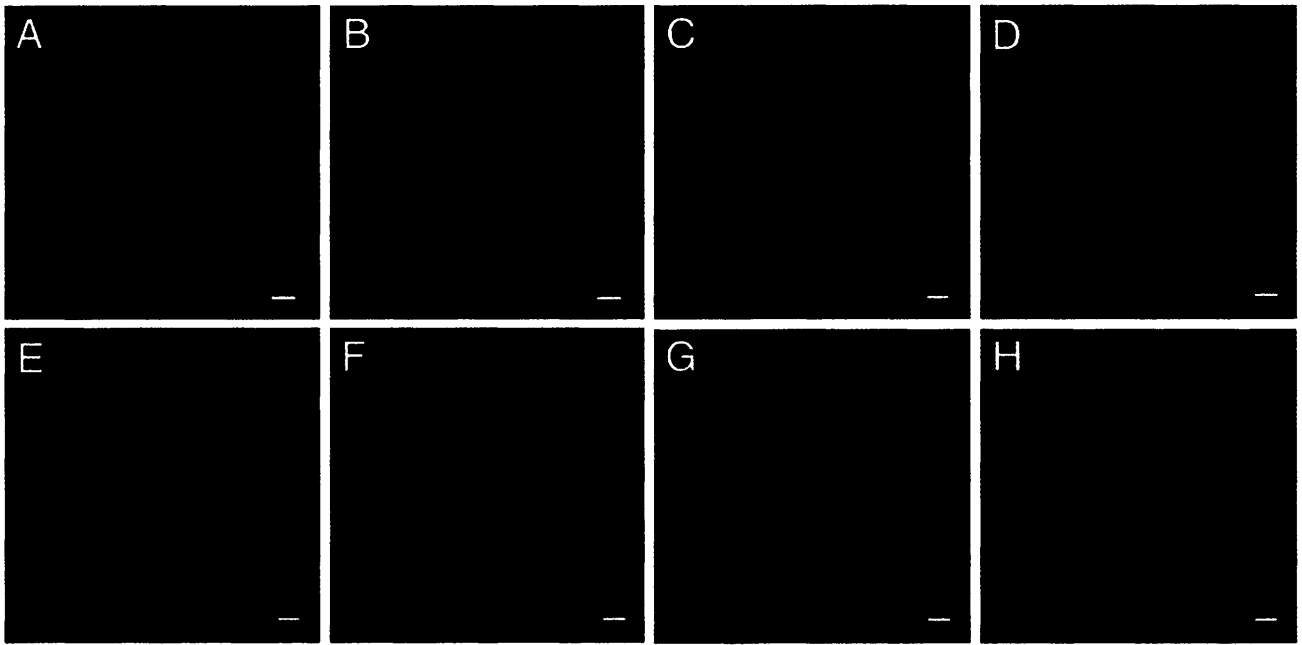


FIG. 3

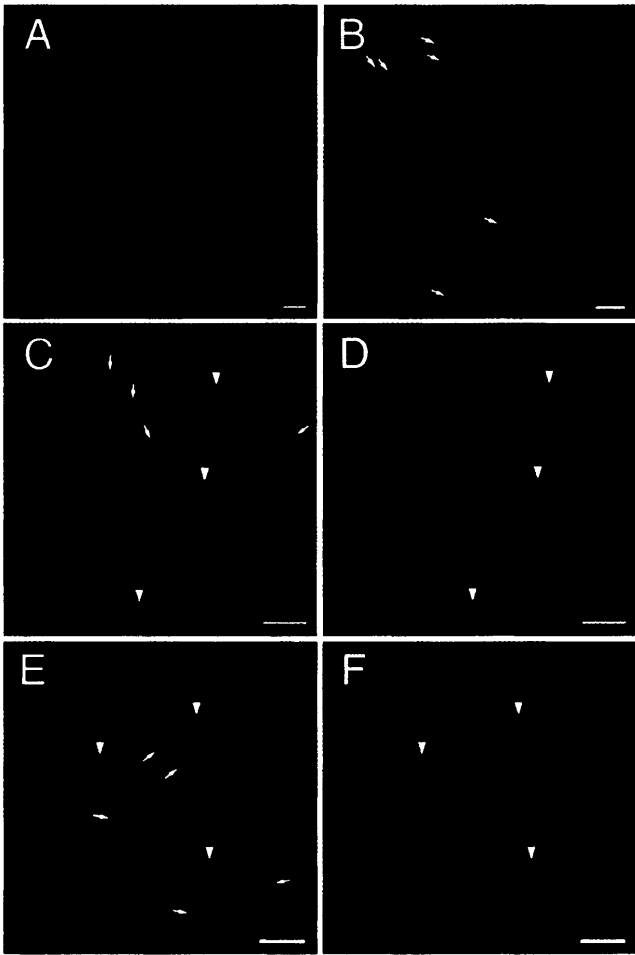


FIG. 4