

氏 名	つ げ せい じ 津 下 誠 治
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2333 号
学位授与の日付	平 成 12 年 11 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	カリフラワーモザイクウイルスの増殖機構に関する研究 —— ORF I と ORF III 遺伝子産物の役割 ——

論文調査委員 (主 査) 教授 奥 野 哲 郎 教授 遠 藤 隆 教授 津 田 盛 也

論 文 内 容 の 要 旨

カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) は、コマツナ、ハクサイなどのアブラナ科植物を宿主とし、二本鎖 DNA をゲノムとする植物ウイルスである。CaMV のゲノム上にコードされる 6 つの ORF (ORF I-VI) については、それらの翻訳産物が感染植物体内において検出されている。しかし、そのうち ORF I と ORF III にコードされる遺伝子産物の機能は、これまで不明であった。本研究は、CaMV の植物体内での増殖過程におけるこれらの産物の役割を明らかにすることを目的としており、その成果は以下のように要約される。

1. ウイルスの遺伝子産物の機能の解析を行う上でプロトプラスト系の利用は極めて有効な手段となりうる。そこで、クローン化された CaMV DNA を高効率で宿主コマツナプロトプラストへ感染させる系を構築した。本ウイルスのトランスアクティベーターをコードする遺伝子を植物細胞内で発現するプラスミドとともに CaMV DNA を含むプラスミドを加え、これにポリエチレングリコールを添加することにより、最高50%以上の高い効率でプロトプラストにウイルスを感染させることに成功した。

2. CaMV の ORF I 産物 (PI) については、既知のタンパク質との相同性やプラズモデスマータへの局在性からウイルスの細胞間移行への関与が考えられてきたが、その実験的証明はなされていなかった。そこで、ORF I 内部への塩基挿入による変異体を作製し、それらの植物体とプロトプラストへの感染性について調べた。その結果、供試した変異体は植物体への全身感染能は喪失していたにもかかわらず、宿主プロトプラスト内においては野生株と同程度に増殖し、変異部位を保持したまま粒子形成まで行われることが明らかとなった。したがって、PI は一細胞におけるウイルスの増殖には必須ではなく、CaMV の移行、とくにウイルスの細胞間移行に関与することが示唆された。

3. CaMV の ORF III 産物 (PIII) については、その生物学的な機能が全く明らかでない。本研究では、CaMV 感染葉を非還元条件下でウエスタンブロット分析することによって、PIII が植物体内でテトラマーを形成していることを明らかにした。さらにショ糖密度勾配遠心分離の結果、PIII テトラマーが CaMV のコートタンパク質と共沈することが明らかになり、これらのことから、PIII は感染植物体内でテトラマーを形成し、ウイルス粒子に結合して存在することが示唆された。

4. PIII テトラマーは β -mercaptoethanol に感受性であり、その形成には PIII 内部の 2 つのシステイン残基によるジスルフィド結合の関与が考えられた。これらのいずれか一方、あるいは両方をアラニン残基に置換した変異体を作製し、その感染性とそこから発現される PIII の形態を調べたところ、2 つのシステイン残基は CaMV の感染性には必須ではないが、テトラマー形成には関与していること、およびこれらの変異体では PIII の蓄積量が低下することが確認された。一方、PIII の N 末端に相当するオリゴペプチドが *in vitro* において coiled-coil 構造によりテトラマーを形成することが報告されている。したがって、感染植物体内において PIII は、coiled-coil 構造によりテトラマーを形成した後、2 つのジスルフィド結合により安定化され、これによりウイルス粒子への強い結合能をもつとともに植物体内での安定性も増大することが考えられた。

5. CaMV の ORF III 領域に塩基挿入をもつ変異体を作製し、それらの植物体とプロトプラスト内での増殖について調べた。その結果、本変異体は植物体への全身感染能を喪失しているにもかかわらず、プロトプラストでは野生株と同程度に増殖し、ウイルス粒子形成も行うことが確認された。したがって、PIII は CaMV の植物体内での移行に関与していることが強く示唆された。

以上、本研究によりクローン化された CaMV DNA のプロトプラスト感染系の確立がなされたとともに、これまで機能が明らかでなかった ORF I と ORF III の遺伝子産物が、前者はプラズモデスマータに局在することによって、また後者はウイルス粒子と結合することによって、いずれも CaMV の移行に関与することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) は、他の多くの植物ウイルスが RNA をゲノムとしてもつものに対して、2 本鎖 DNA をゲノムとしてもつ数少ない植物ウイルスの一つである。本ウイルスは、広くアブラナ科植物を宿主とし、これらの植物に甚大な被害をもたらすことから、その病害防除の上からも、宿主植物体内における増殖機構や遺伝子産物の機能解析に関して多くの研究がなされてきた。しかし、本ウイルスのもつ 6 つの遺伝子のうち、ORF I と ORF III にコードされる遺伝子産物については、それらの機能が明らかでなかった。本論文では、これまで困難であった CaMV DNA によるコマツナプロトプラストへのウイルス感染系を確立し、本系を用いることにより、ORF I と ORF III の機能を解析するとともに、本ウイルスの植物体内での増殖過程におけるこれらのタンパク質の役割について考察を加えたものであり、評価される内容は以下のとおりである。

1. CaMV DNA を含むプラスミドを本ウイルスのトランスアクティベーターを植物細胞内で発現するプラスミドとともに加え、さらにポリエチレングリコールを添加することにより、ウイルスの遺伝子機能の解析を行うに足る高い効率でのプロトプラストへのウイルス感染を成立させることに成功した。
2. ORF I 変異体を作製し、その宿主植物体とプロトプラストへの感染性を調べることにより、本遺伝子産物は、植物体への全身感染には必須であるが、一細胞でのウイルスの複製、増殖には必要でないことを明らかにした。
3. CaMV の ORF III 産物が感染植物細胞内でテトラマーを形成していることを発見するとともに、これがウイルス粒子に結合していることを示した。さらに、この形成には本産物内に存在する 2 つのシステイン残基によるジスルフィド結合が関与していること、およびこれらの結合により、本産物の安定性と粒子への結合力が増大することを明らかにした。
4. ORF III 産物が、植物体への全身感染には必須であるが、CaMV のプロトプラスト内での複製、増殖には必要でないことを明らかにした。

以上のように、本論文は CaMV の ORF I と ORF III の産物が植物体での本ウイルスの増殖過程、とくにウイルスの移行に関与することを明らかにするとともに、クローン化された CaMV DNA のプロトプラストへの感染系を確立した。得られた知見は植物病理学、植物ウイルス学および分子生物学に寄与するところが多い。

よって本論文は、博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成12年9月25日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。