

氏 名 小 林 括 平
 学位(専攻分野) 博 士 (農 学)
 学 位 記 番 号 論 農 博 第 2193 号
 学位授与の日付 平 成 10 年 5 月 25 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 Studies on Cauliflower Mosaic Virus Gene Expression
 (カリフラワーモザイクウイルスの遺伝子発現に関する研究)

(主査)
 論文調査委員 教授 古澤 巖 教授 泉井 桂 教授 津田盛也

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、植物ウイルスでは数少ないDNAウイルスであるカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の遺伝子発現に関して、特にウイルス増殖サイクルの中での遺伝子発現の制御、未知のウイルス転写産物の遺伝子発現への関与、およびCaMV特異的な遺伝子発現機構のウイルス増殖サイクルにおける意義について検討した結果をまとめたものである。主な内容は、次のとおりである。

1. CaMVのコードする6種類の遺伝子産物 (P1, P2, P3, P4, P5およびP6) に対する抗体を作製し、各遺伝子産物がコマツナプロトプラスト-CaMV感染系を用いた一段増殖系においても発現されることを明らかにした。さらに、これらCaMV遺伝子産物の蓄積動態を比較検討した。その結果、P1, P5およびP6は感染初期に蓄積し、引き続きP3が、さらに遅れてP2およびP4が蓄積することが明らかになった。これらの結果は、CaMVの各遺伝子の発現がそれぞれ個別の制御を受けていることを示唆するとともに、CaMV遺伝子発現の制御が、これまで明らかにされていたCaMV遺伝子産物の機能に対する要求にしたがって行われていることを示していた。

2. 上記の結果は、CaMVの遺伝子発現には、翻訳活性化因子 (TAV) であるP6および主要転写産物である35SRNAが関与する、既知の遺伝子発現機構以外に、未同定のmRNAあるいは翻訳制御機構が関与する可能性をも示唆していた。そこで、P1およびP4の発現における、35SRNA以外のCaMV転写産物の関与を検討する目的で、これら遺伝子の発現が35SRNAの転写を司るプロモーター (35Sプロモーター) に依存するか否かを検討した。レポーター遺伝子をそれぞれの遺伝子に融合させたプラスミドを用い、CaMV感染植物由来プロトプラストへの単独でのトランスフェクションおよび非感染プロトプラストへのP6発現プラスミドとのコトランスフェクションによって検討した結果、P1発現においては、35SプロモーターおよびTAVに依存する遺伝子発現機構に加えて、微弱なものではあるが、新規モノシストロニックmRNAを介する発現機構も存在することが示唆された。また、P4に関しては、35SプロモーターおよびTAVに依存する遺伝子発現機構とほぼ同等の強度を持つ、モノシストロニックmRNAを介する発現機構の存在が示唆された。これらの結果は、1985年にPlantらが提唱したdual strategy仮説を、全く異なる実験系において支持したものである。

3. P6のTAV活性は、35SRNAの翻訳に重要な役割を果たすことがリポーター遺伝子を用いた解析から明らかにされていたが、そのCaMV増殖における意義は明らかでなかった。P6遺伝子のフレームシフト変異体をコマツナプロトプラストにトランスフェクションしたところウイルスの増殖は認められず、この変異はP6発現プラスミドのコトランスフェクションによって相補された。また、P6の過剰発現が、ウイルス増殖の成功率を高めること、およびウイルス遺伝子産物の蓄積を亢進することが明らかになった。この結果は、P6のTAV活性がウイルス増殖サイクルにおいても重要であることを示している。ウイルス転写産物の解析も、このことを支持した。さらに、モノシストロニックにP1～5を強制的に発現するプラスミドを用いた解析から、P6はCaMV構造蛋白質の安定化にも寄与することが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

CaMVの遺伝子発現に関するこれまでの研究は、古典的なウイルス転写産物の解析やレポーター遺伝子を用いたシスエレメントおよびトランス因子の解析、特に転写後の調節に関する研究に重点がおかれており、ウイルス増殖サイクルのなかでのウイルス遺伝子発現制御に関する理解は著しく遅れていた。本論文は、ウイルス増殖サイクルにおけるCaMV遺伝子の発現制御を明らかにするとともに、ウイルス増殖サイクルのなかでどのような遺伝子発現機構が実際に働いているかを明らかにしたものである。評価すべき点は以下のとおりである。

1. CaMV感染植物中にこれまでに検出されていた6種類すべてのウイルス遺伝子産物が、プロトプラスト系においても発現されることを示した。さらに、それらの蓄積動態を比較し、P1、P5およびP6は感染初期に蓄積し、引き続きP3が、さらに遅れてP2およびP4が蓄積することを示した。この結果は、CaMVの各遺伝子の発現がそれぞれ個別に制御されていることを示唆している。さらに、CaMV遺伝子発現がそれぞれの遺伝子産物機能に対する要求に応じて制御されていることを示唆しており、CaMV増殖サイクルに対する理解を深める知見である。

2. P1およびP4の発現に関して、P6のTAV機能および35SRNAの関与する発現機構に加えて、モノシストロニックなmRNAを介する機構が関与することを示した。さらに、ウイルス増殖サイクルにおけるそれら遺伝子発現機構の重要性を明らかにする目的で、CaMV感染植物由来プロトプラストへのレポータープラスミドのトランスフェクションという新たなモデル実験系を考案し、2種類の遺伝子発現機構がウイルス増殖サイクルのなかにあっても機能している可能性を示した。以上の結果は、ウイルス遺伝子発現機構の多様性を示すものとして興味深い。

3. レポーター遺伝子の発現によってのみ検出されてきたP6のTAV機能に関して、ウイルス増殖サイクルにおいてもその機能が発現されていること、ウイルスの増殖がその機能に依存していることを示した。これらの結果は、TAV機能のウイルス増殖における意義を示すものとして重要である。さらに、ポリシストロニックなmRNAである35SRNAにその発現を依存すると考えられるP6以外の5種類のCaMV遺伝子を、それぞれ35Sプロモーターの下流に接続することによって、モノシストロニックなmRNAからそれぞれの蛋白質を発現する系を構築し、P6がそれらCaMV遺伝子産物のうち、ウイルス構造蛋白質(P3、P4およびP5)の安定化にも寄与することを示した。すなわち、ウイルス遺伝子発現が翻訳後のレベルにおいても、ウイルスの調節蛋白質によって制御されていることを示す知見として興味深い。

以上のように、本論文は、ウイルス増殖サイクルの理解という基礎ウイルス学の中心課題にそってウイルス遺伝子発現機構とその制御を明らかにし、また、モデル系で示された分子機構のウイルス増殖における重要性を明らかにしたものであり、植物ウイルス学および植物病理学に貢献するところが大きい。

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10年3月19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。