

学 位 論 文 題 名

キュウリモザイクウイルスの増殖に
関与する宿主因子の遺伝学的研究

— シロイヌナズナを利用したアプローチ —

学位論文内容の要旨

多くの植物 (+) 鎖RNAウイルスについて、ゲノムの構造が解明され、さらにゲノムの人工改変系の確立によりウイルスゲノムにコードされた遺伝子の発現様式および遺伝子産物の機能についての理解は進みつつある。しかしながら、ウイルス増殖に関与する宿主側の因子に関する知見は数えるほどである。植物 (+) 鎖RNAウイルスの増殖機構を分子レベルで理解するためには、宿主因子とウイルス因子の機能を踏まえて考える必要があり、増殖に関与する宿主因子の同定とその機能解析を行うことが必須である。

植物 (+) 鎖RNAウイルスが宿主細胞に侵入すると、感染細胞内で自らの複製を開始するためにウイルス粒子からゲノムRNAを露出させる。この過程は脱外被と呼ばれている。宿主のリボソームによってウイルスにコードされたウイルスRNA依存RNA複製酵素サブユニットが翻訳され、相補鎖RNAを介したゲノム複製が起こる。感染細胞内で増殖したウイルスはプラスモデスマータを介して隣接細胞に移行する。この過程は細胞間移行と呼ばれている。プラスモデスマータには排除分子量限界 (size exclusion limit; SEL) があり、通常700-800 Daの低分子は自由に移行できるが、それ以上の大きさの分子に対しては障壁となる。ウイルスはこのSELを積極的に拡大させて隣接細胞に移行する。維管束系に到達したウイルスは非接種上位葉などの離れた非感染部位に移行する。この過程は遠隔移行と呼ばれている。その後、遠隔移行したウイルスは非感染部位において複製、細胞間移行を繰り返して全身感染に至る。植物ウイルスは、増殖の各過程において、宿主に本来備わっている機能を利用して増殖していると考えられるが、どのような宿主因子を利用しているかはほとんど明らかになっていない。

本研究では、ウイルス増殖に関与する宿主因子を遺伝学的に同定することを目的に、宿主として分子遺伝学的解析に広く利用されているシロイヌナズナを用い、ウイルスとしてはウイルス側因子の解析が進んでいるキュウリモザイクウイルス (CMV) を用いて、CMVの増殖に異常をきたしたシロイヌナズナ突然変異株を単離し、遺伝学的解析を行った。

代表的なCMVの1系統黄斑系 (CMV-Y) は、シロイヌナズナ野生型 (エコタイプ; Col-0) 株において、過敏反応を示すことなく効率よく増殖し、全身感染に至る。したがって、Col-0株はCMV-Yの増殖に必要な宿主因子を全て備えていると考えられる。そこで、Col-0株をエチルメタンスルホン酸で突然変異誘起処理し、得られた自殖2世代目 (M2) 植物から、感染植物体内でのCMVコートタンパク質の蓄積量を指標にCMV増殖効率の低下した突然変異株を選択した。その結果、約4,800株のM2植物の中から、CMVコートタンパク質の蓄積がCol-0株よりも有意に遅れる2株の突然変異株 (RB568およびRB663突然変異株) を単離した。

遺伝解析の結果、RB568およびRB663突然変異株はそれぞれ核ゲノム上に異なる劣性1因子変異をもつことが明らかとなり、それぞれに生じた原因変異を *cum1-1* および *cum2-1* (*cucumovirus multiplication*) と命名した。変異が劣性であることから、野生型CUM1およびCUM2遺伝子の産物は、CMVの増殖をサポートするような因子であることが示唆された。さらに、遺伝的マッピングの結果、CUM1遺伝子座は第4染色体中央部に、CUM2遺伝子座は第3染色体下部に位置することが明らかになった。

cum1-1 および *cum2-1* 変異のウイルス特異性を調べた結果、*cum1-1* 変異は調べた限りCMVの増殖を特異的に抑制し、分類上異なるグループに属するウイルスであるタバコモザイクウイルス (TMV) およびターニップクリンクルウイルス (TCV) の増殖には影響を及ぼさなかった。一方、RB663変異株は、TMVの増殖には影響を及ぼさなかったが、CMV以外にTCVの増殖も抑制した。調べた限り、RB663変異株の持つCMVの増殖を抑制する変異とTCVの増殖を抑制する変異は遺伝学的に分離することができなかった。従って、*cum2-1* 変異はCMVとTCVという2種類のウイルスの増殖に影響を及ぼすことが示唆された。

cum1-1 変異株におけるCMV増殖阻害あるいは*cum2-1* 変異株におけるCMVとTCVの増殖阻害が、それぞれのウイルス増殖過程のどの段階で生じているのかを知るために (i) 接種葉におけるウイルス増殖、および (ii) プロトプラストにおけるウイルス増殖を調べた。接種葉内でのウイルス増殖を調べることにより、ウイルス増殖阻害が遠隔移行の過程以前の過程にあるか否かを判別することができるであろう。さらに、接種源にウイルス粒子とウイルスRNAを用いることにより、脱外被が正常におきているか否かも区別できる。また、プロトプラストにおけるウイルス増殖を調べることにより感染細胞内での増殖が正常におきているか否かを知ることができるであろう。このように、(i) と (ii) の解析結果を併せて考えることにより、両突然変異株におけるウイルス増殖阻害が起きるステップを推定できると考えた。CMV粒子あるいはCMV RNAを接種した場合、*cum1-1* 変異株の接種葉に蓄積するCMVコートタンパク蓄積量は、いずれを接種した場合もCol-0株よりも低下していた。一方、*cum1-1* 変異株プロトプラスト内におけるCMV RNA蓄積量の経時変化は野生型Col-0株における経時変化と同様であった。これらの結果は、*cum1-1* 変異株において、接種葉内における細胞間移行の過程でCMV増殖が阻害されていることを示唆している。また、*cum2-1* 変異株接種葉内に蓄積するウイルスコートタンパク質量はCMV粒子、CMV RNA、TCV粒子あるいはTCV RNAのいずれを接種した場合も野生型株よりも低下していた。また*cum2-1* 変異株プロトプラストにおけるウイルスRNA蓄積量はCol-0株と変わらなかった。よって、*cum2-1* 変異株においては、CMVとTCVの2つのウイルスの細胞間移行が阻害されていると考えられる。

本研究で初めて、ウイルス細胞間移行をサポートすると推定される宿主因子CUM1およびCUM2の存在を明らかにした。多くの場合、ウイルスの感染が成立するか否かは感染細胞から隣接細胞に移行できるか否かで決まる。CMV特異的な細胞間移行に関与すると考えられるCUM1因子と、CMVとTCVという属の異なる2種のウイルスの細胞間移行の過程に関与していると示唆されるCUM2因子の機能の解明は、ウイルスの細胞間移行の機構に関する理解のみならず、ウイルスの宿主特異性に関する理解にも大きく寄与するものと考えられる。

ウイルスの増殖はウイルスにコードされた因子と宿主の持つ因子との相互作用によって成立する。しかしながら、宿主植物がウイルスの増殖をサポートするために特別な機能を用意しているとは考えがたい。ウイルスは、宿主が捨てることのできない機能を上手く利用して増殖していると考えるのが適当である。CUM因子の研究は植物の持つ機能についての新たな研究方策を切り開くのみならず、ウイルス耐性植物の分子育種学的研究にも新たな展開をもたらすものと期待される。さらに、植物ウイルスの細胞間移行の通路であるプラスモデスマータは植物の生体内においても物質輸送経路として重要な機能を担っている。したがって、CUM1およびCUM2因子の植物内での機能の解明は、植物体内の物質輸送の機構に新しい光を投じるものとなろう。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 内 藤 哲
副 査 教 授 千 葉 誠 哉
副 査 助 教 授 石 川 雅 之

学 位 論 文 題 名

キュウリモザイクウイルスの増殖に 関与する宿主因子の遺伝学的研究

— シロイヌナズナを利用したアプローチ —

本論文は2表, 12図, 引用文献50を含む和文55ページからなり, 別に参考文献1編が添付されている。

植物ウイルスの宿主植物における増殖過程は, 1) 感染細胞内における複製, 2) プラスモデスマータを介した隣接細胞への細胞間移行, 3) 維管束系を介して植物全体に広がる遠隔移行, という3つの過程に大別される。これらの過程が効率よく進行するためには, ウイルス側にコードされた因子と宿主側にコードされた因子の協奏的な相互作用が必要である。植物ウイルスのゲノム構造の解明およびゲノムの人工改変系の確立により, ウイルスゲノムにコードされた遺伝子の機能についての理解は進みつつある。しかしながら, 植物ウイルスの増殖に必要な宿主因子に関する知見は未だ少なく, 植物ウイルスの増殖機構を分子レベルで理解するためには, ウイルス増殖に関与する宿主因子を同定し, その機能解析を行うことが必要である。

本研究は, ウイルス増殖に関与する宿主因子を遺伝学的に同定することを目的に, 宿主として分子遺伝学的解析の系が確立しているシロイヌナズナを用い, ウイルスとしてはウイルス側因子の解析が進んでいるキュウリモザイクウイルス (CMV) を用いることにより, CMVの増殖に異常をきたしたシロイヌナズナ突然変異株を単離し, 遺伝学的解析を行ったものである。本論文の内容は以下のように要約される。

1. 実験系の確立と変異株の分離: 代表的なCMVの1系統である黄斑系 (CMV-Y) 株は, 野生型シロイヌナズナにおいて効率よく増殖し, 全身感染に至る。したがって, シロイヌナズナはCMV-Y株の増殖に必要な宿主因子を全て備えていると考えられる。突然変異誘起処理を施したシロイヌナズナ約4,800株を調べ, CMVコートタンパク質の蓄積が野生型シロイヌナズナ株よりも有意に遅れる2株の突然変異株を分離した。

2. 変異株の遺伝解析：2株の突然変異株がそれぞれ核ゲノム上に異なる劣性変異をもつことを明らかにし、原因変異を*cum1-1*および*cum2-1* (*cucumovirus multiplication*) と命名した。変異が劣性であることから、野生型*CUM1*および*CUM2*遺伝子産物は、CMVの増殖をサポートするような因子であることが示唆された。遺伝的マッピングにより、*CUM1*遺伝子座は第4染色体中央部に、*CUM2*遺伝子座は第3染色体下部にそれぞれ位置することを明らかにした。
3. 変異のウイルス特異性：*cum1-1*変異は分類上異なるグループに属するウイルスであるタバコモザイクウイルス (TMV) およびターニップクリンクルウイルス (TCV) の増殖には影響を及ぼさないことを示し、CMVの増殖を特異的に抑制すると考えられた。一方、*cum2-1*変異株は、TMVの増殖には影響を及ぼさないが、CMVとともにTCVの増殖をも抑制することを示した。*cum2-1*変異株の持つCMVの増殖を抑制する変異とTCVの増殖を抑制する変異は遺伝学的に分離することができず、*cum2-1*変異はCMVとTCVという2種類のウイルスの増殖に影響を及ぼすと考察した。
4. 変異株における欠損段階の解析：*cum1-1*および*cum2-1*変異が、ウイルス増殖過程のどの段階で作用しているのかを明らかにするために、感染細胞内でのウイルス複製および接種葉内におけるウイルスの増殖を調べた。得られた結果から、*cum1-1*変異株は隣接細胞への移行の過程でCMV増殖阻害が生じていること、*cum2-1*変異株はCMVとTCVの両ウイルスの細胞間移行を阻害することを明らかにした。

以上、本論文によりウイルスの細胞間移行をサポートすると考えられる宿主因子の存在が初めて明らかになった。ウイルスの増殖はウイルスにコードされた因子と宿主の持つ因子との相互作用によって成立する。しかしながら、宿主植物がウイルスの増殖をサポートするために特別な機能を用意しているとは考えがたい。ウイルスは、宿主が捨てることのできない機能を上手く利用して増殖していると考えるのが適当である。CUM因子の研究は植物の持つ機能についての新たな研究方策を切り拓くのみならず、ウイルス耐性植物の分子育種学的研究にも新たな展開をもたらすものと期待される。さらに、植物ウイルスの細胞間移行の通路であるプラスモデスマータは植物体内における物質輸送経路として重要な機能を担っており、物質輸送の研究にも新展開をもたらすものと期待される。よって、審査員一同は、吉井基泰が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。