

タバコモザイクウイルスの増殖に関与するシロイヌナズナ *TOM1* 遺伝子のクローニングならびに TMV-Cg 株の全塩基配列の決定

学位論文内容の要旨

ウイルスは自身が生理活動を行う「場」を持たず、それぞれのウイルスに特異的な宿主細胞内においてのみ増殖することができる。従って、すべてのウイルスは宿主由来の特異的な因子との相互作用のもとに増殖する。

真核生物のプラス鎖RNAウイルスの感染細胞内における増殖機構は未だ不明の部分が多い。その原因の一つとして、ウイルス増殖過程における未知の宿主因子の関与が上げられる。現在、この宿主因子の研究は、ウイルスRNAの複製機構の研究における中心的な興味の対象の一つとなっている。近年、ウイルスのゲノムRNA複製活性画分に含まれる宿主由来のタンパク質が生化学的手法によりいくつか同定された。本研究の目的は、シロイヌナズナを用いた遺伝学的手法によって、植物のプラス鎖RNAウイルスの一つであるタバコモザイクウイルス（TMV）の増殖に関与する宿主因子を同定をすることにある。

ウイルス側の研究材料としてはTMVの中でもシロイヌナズナ植物体において効率よく増殖するTMV-Cg株（crucifer strain isolated from garlic）を使用した。TMV-Cg株はモザイク斑を示した北海道のニンニクから分離され、血清学的にはアブラナ科系統のトバモウイルスと近縁である。本論文では、まずTMV-Cg株の全塩基配列の同定をおこない、その配列上の特徴を明らかにした。TMV-Cg株のゲノムRNAの全長は6,303塩基であった。これは、現在までに塩基配列が決定されたトバモウイルス属のウイルスの中では最も短いものの一つである。ゲノム上には他のトバモウイルスと同様に4つの大きな読み枠（ORF）が見いだされ、ゲノム構成、塩基配列およびアミノ酸配列は他のアブラナ科系統のトバモウイルスと共通の特徴を示した。

植物側の研究材料としてはTMVの増殖が野生型株より低く抑えられるシロイヌナズナの *tom1* (*tobamovirus multiplication*) 突然変異株を使用した。*tom1*変異は劣性変異であり、TMVの一細胞内における増殖を抑制する。また、*tom1*変異株において、TMV-Cg株感染時にTMVコートタンパク質の蓄積が野生型株と比較して低く抑えられるのに対し、調べた限り、他のウイルスの増殖には影響を与えない。従って、野生型の *TOM1* 遺伝子産物はTMV RNAの一細胞内における複製をTMV特異的にサポートする宿主因子であると考えられている。

TOM1遺伝子をポジショナルクローニング法によりクローニングすることを目指し、TOM1遺伝子座の遺伝的マッピングをおこなった。RFLPマッピングにより、TOM1遺伝子座はシロイヌナズナ第4染色体下部にあることを示した。次に約3,000のマッピングラインを用いた詳細な遺伝的マッピングをおこなった。その結果、TOM1遺伝子座がシロイヌナズナ第4染色体上の22 kbの領域の中に存在することを明らかにした。

この領域に対応する様々なDNAクローンを用いてTOM1遺伝子を含む領域の整列クローンの集団 (contig) を構築した。これらのDNA断片をT-DNAベクターにサブクローン化し、アグロバクテリウムを用いて*tom1-1*突然変異株に導入し、形質転換体を得た。得られた形質転換体の内、共通する6 kbのDNA領域を持つ2つのT-DNAクローン由来の形質転換体において、TMVの増殖が野生型株と同程度のレベルに回復した。このことより、この6 kbのDNA断片は*tom1-1*変異を相補する能力を持ち、この領域内にTOM1遺伝子が存在することが分かった。

この6 kbのDNA断片をプローブにシロイヌナズナcDNAライブラリーを検索した。得られたcDNAクローンの塩基配列と、それと相同なexpressed sequence tag (EST) クローンの塩基配列を統合した結果、この領域上に1,215塩基、11個のエキソンからなるmRNAがコードされており、この配列上に873塩基、291アミノ酸からなるORFが存在することを見いだした。これまでに分離された3つの互いに独立な*tom1*変異株 (*tom1-1*、*tom1-2*、*tom1-3*) の変異部位がすべてこの転写単位内に存在したこと、またノザン解析により3つの*tom1*変異株においてこの転写産物の蓄積量が野生型株に比べて減少していたことから、これをTOM1遺伝子と同定した。

TOM1 ORFから予想されるアミノ酸配列についてコンピューターによるホモロジー解析、ならびにタンパク質構造予測プログラムによる解析の結果、TOM1タンパク質は7回貫通型膜タンパク質と予測された。

TOM1タンパク質の細胞内局在を知るために、TOM1とgreen fluorescent protein (GFP) の融合タンパク質をシロイヌナズナ野生型株のカルス培養細胞由来のプロトプラスト内で一過的に発現させ、細胞内における蛍光の局在を観察した。その結果、少なくとも一部の蛍光は液胞膜に局在することがわかり、TOM1タンパク質を液胞膜に局在する7回膜貫通型タンパク質であると予測した。

TMVをはじめとする大多数のプラス鎖RNAウイルスのRNA複製酵素はその抽出時に必ず膜画分に含まれることが分かっており、感染細胞内で何らかの膜と相互作用していると考えられている。これは遠縁のウイルスにおいても保存されていることから、ウイルス増殖において重要かつ基本的な事象であると考えられる。しかしながら、その機構や相互作用を必要とする理由は明らかになっていない。TMVのゲノム上にコードされるタンパク質、および生化学的に同定された因子は、いずれも膜結合性タンパク質ではないと考えられている。従って、TOM1タンパク質はTMV増殖関連分子としては現在のところ唯一の膜タンパク質であると考えられ、TOM1タンパク質はTMVの複製酵素と膜をつなぐアンカーの役割を持つタンパク質である可能性が考えられる。

TOM1遺伝子はプラス鎖RNAウイルスの宿主因子を遺伝学的に同定した最初の例であり、TOM1因子の機能が同定されることによりTMVの増殖機構の分子レベルでの解明、

中でも感染細胞内におけるウイルス複製関連分子の動態の解明が期待される。さらには本研究を起点にプラス鎖RNAウイルスと宿主細胞との相互作用の研究における新たな局面の展開が期待でき、ウイルス増殖機構の研究に大きく寄与するものと考えられる。

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

タバコモザイクウイルスの増殖に関与するシロイヌナズナ *TOM1*

遺伝子のクローニングならびに TMV-Cg 株の全塩基配列の決定

本論文は7表、34図、引用文献94を含む和文101ページからなり、別に参考論文2編が添付されている。

真核生物のプラス鎖RNAウイルスの感染細胞内における増殖機構は未だ不明の部分が多いが、その原因の一つにウイルス増殖過程における未知の宿主因子の関与が上げられる。近年、ウイルスのゲノムRNA複製活性画分に含まれる宿主由来のタンパク質が生化学的手法によりいくつか同定されたが、未同定の宿主因子が数多く存在することに疑問の余地はなく、新たな手法による宿主因子の同定が急がれる。

本論文は、シロイヌナズナの突然変異株を用いた遺伝学的手法によって、タバコモザイクウイルス (TMV) の増殖に関与する宿主因子を同定したものである。トバモウウイルスに属するTMVには多くの系統が知られているが、TMV-Cg株 (crucifer strain isolated from garlic) はシロイヌナズナで効率よく増殖する。一方、シロイヌナズナの *tom1* (tobamovirus multiplication) 変異は感染細胞内におけるTMVの増殖を特異的に抑制し、従って、野生型の *TOM1* 遺伝子産物はTMVの感染細胞内における増殖をサポートする宿主因子であると考えられている。

本論文の内容は以下のように要約される。

1. TMV-Cg株ゲノムRNAの全塩基配列の決定

本論文の研究で中心的な材料として用いたTMV-Cg株の全塩基配列を決定した。TMV-Cg株のゲノムRNAの全長は6,303塩基であり、現在までに塩基配列が決定されたトバモウウイルスの中では最も短いものであった。ゲノム上には他のトバモウウイルスと同様に4つの読み枠 (ORF) が見いだされ、ゲノム構造、塩基配列ならびにアミノ酸配列は他のアブラナ科系統のトバモウウイルスと共通の特徴を示した。

2. シロイヌナズナ *TOM1* 遺伝子のクローニング

TOM1 遺伝子座の詳細な遺伝的マッピングをおこない、シロイヌナズナ第4染色体上

の22 kbの領域の中にTOM1遺伝子が存在することを明らかにした。この領域に対応する様々なDNAクローンを作製し、T-DNAベクターにサブクローン化し、*tom1*突然変異株に導入して形質転換体を得た。このうち2つのT-DNAクローン由来の形質転換体においてTMVの増殖が野生型株と同程度に回復したことより、これら2つのクローンに共通する6 kbのDNA断片が*tom1*変異を相補する能力を持ち、この領域内にTOM1遺伝子が存在することを明らかにした。この領域に1,215塩基からなるmRNAがコードされていることを見だし、11個のエキソンに分断された873塩基、291アミノ酸からなるORFが存在することを発見した。独立に分離された3つの*tom1*変異株の変異部位がすべてこの転写単位の内部に存在すること、およびこれらの変異株においてこの転写産物の蓄積量が野生型株に比べて減少していることを明らかにし、これがTOM1 mRNAであると同定した。

3. TOM1遺伝子産物の解析

コンピューターによるホモロジー検索、ならびにタンパク質構造予測によりTOM1タンパク質は7回貫通型膜タンパク質と予測された。TOM1と緑色蛍光タンパク質の融合タンパク質をシロイヌナズナ野生型株のカルス培養細胞由来のプロトプラストで発現させ、細胞内局在を観察した結果、少なくとも一部は液胞膜に局在することを明らかにした。これよりTOM1タンパク質は液胞膜に局在する7回貫通型膜タンパク質であると推論した。

多くのプラス鎖RNAウイルスのRNA複製酵素活性は、膜画分に含まれることから、生体内では何らかの膜構造と相互作用していると考えられている。一方、TMVのゲノム上にコードされるタンパク質、そして本研究以前に発見されたTMV複製に参与する宿主因子は膜結合性タンパク質ではないと考えられている。TOM1タンパク質はTMV増殖に関連した分子としては最初の膜タンパク質と考えられ、このことからTOM1タンパク質はTMVの複製酵素と膜をつなぐ役割を持つタンパク質である可能性を考察した。

以上、本論文においてTMVの細胞内における増殖に参与する宿主因子であるTOM1遺伝子のクローニングに成功した。本論文はプラス鎖RNAウイルスの宿主因子を遺伝学的に同定した最初の例であり、プラス鎖RNAウイルスと宿主細胞との相互作用の研究に新たな研究方策を導入したものである。

本研究の成果はTMVの増殖機構の分子レベルでの解明、とりわけ感染細胞内におけるウイルス複製関連分子の動態の解明に大きく貢献するものと期待されるのみならず、植物にウイルス耐性を付与するための基礎研究としても重要なものである。よって審査員一同は、山中拓哉が博士（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。