

氏 名(本籍)	よし 吉	かわ 川	まさ 正	のぶ 信
学位の種類	博 士 (農 学)			
学位記番号	農 博 第 4 5 6 号			
学位授与年月日	平 成 5 年 3 月 25 日			
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当			
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 農 学 専 攻			
学位論文題目	キュウリモザイクウイルス感染ササゲ葉 に生成する感染特異的タンパク質の性状 に関する研究			
論文審査委員(主査)	教 授	江 原	淑 夫	
	教 授	斎 藤	隆	
	教 授	山 谷	知 行	

論文内容要旨

植物ウイルスは侵入した細胞から隣接細胞、そして他の部位へ移行し増殖する。ウイルスの増殖は宿主の代謝系を利用して行われる。ウイルスが感染植物全体に移行し増殖する場合を全身感染といい、その結果症状が全身に現れるのが全身病徴である。それに対しウイルス増殖が感染部位近辺に限定される局部感染がある。後者の場合、細胞が壊死し壊死斑が形成されることがある。すなわち、ウイルス増殖部位が急激に壊死することにより積極的にウイルスの増殖、複製を阻害し、ウイルスはその部位に封じ込められる。このような現象は過敏反応と呼ばれ、植物の積極的な抵抗反応の一つと考えられている。過敏反応により形成される局部壊死斑の周辺細胞では代謝が活性化され、一群のタンパク質が生成される。これらは感染により特異的に生成されることから感染特異的タンパク質 (pathogenesis-related proteins; 略してPRタンパク質) と呼ばれている。PRタンパク質は種々の病原体感染にともない局部壊死斑を形成した複数の植物種でその生成が確認されている。タバコでは5つのグループのPRタンパク質が分離・同定され、このうち多くのもので遺伝子のクローニングが行われ、その構造が明らかとなっている。一方、タバコ以外にいくつかの植物種でPRタンパク質の解析が行われてきたが、その機能など不明な点も多い。本研究ではキュウリモザイクウイルス (CMV) 感染ササゲ葉 (*Vigna unguiculata* cv. Kurodane-sanjaku) における過敏反応と関連して生成するPRタンパク質 (CpPR) の性状を明らかにすることを目的とし、その生化学的特性、及び遺伝子構造解析を行った。

第1章 CpPRの同定及び精製

ササゲ初生葉にCMVを接種すると約12時間後に直径0.3mm程度のくぼみが現れ、14時間後にその部位の柵状組織が褐変し壊死斑が形成される (Fig. 1)。壊死斑を形成したササゲ葉より抽出バッファ [100mM Tris-HCl pH8.3, 0.3% 2-mercaptoethanol, 1.5% polyvinylpolypyrrolidone(PVPP), 5mM ascorbate] を用い、CpPR4成分を検出した (Fig. 2)。検出したCpPRは10% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) による易動度の大きい成分よりCpPR-1, 2, 3, 4と命名した。これらのタンパク質は銀染色を高度に行うことで健全葉中にもごくわずかであるが存在することが認められた。CpPRの精製を行うため、Native-PAGEにより4成分を展開し、分離したCpPRをそれぞれエレクトロエリユーションにより電気泳動的に抽出した。得られた精製物はNative-PAGEで単一のバンドとして検出された (Fig. 3)。

第2章 CpPRの性状

SDS-PAGE, IEF-PAGEよりCpPR4成分の分子量及び等電点はCpPR-1 (14 kDa,

pI 5.1), -2 (14, 5.3), -3 (15, 5.4), -4 (15, 5.6) と推定された。IEF/SDS 2次元電気泳動によりCpPRはそれぞれ単一のスポットとして検出され、酸性側(陽極側)よりCpPR-1, 2, 3, 4に対応した(Fig. 4)。CpPRの生成の経時変化を観察するため経時的にCMV接種葉よりCpPRを抽出した。CMV (100 μ g/ml) 接種後14時間目に約500~600の壊死斑が褐変化し始めると同時にCpPR-2が銀染色したNative-PAGEで検出され始め、他の3成分はそれより約20分遅れ検出された(Fig. 5)。CpPR-2は14時間目に検出され始めてから36時間目まで増加し続け、36時間目の生成量はササゲ初生葉の新鮮重1g当り10 μ gに達した。一方、他の3成分は検出され始めてから24時間目まで増加し続け、それ以降はプラトーに達した。本タンパク質の高次構造(4次構造)を分析するため、還元剤を1次元目のSDS-PAGEに加えず、2次元目のSDS-PAGEに加えることによりジスルフィド結合を解離させた。その結果、CpPRはポリペプチド鎖間のジスルフィド結合を持たないモノマーであることが明らかとなった(Fig. 6)。次に、ササゲと他の植物のPRタンパク質との血清学的関係を検討した。すなわち、CpPRと分子量(14~15 kDa)及び等電点(pI 5~6)の類似したタバコのPR-1cに対する抗体を用いてウエスタンブロットを行った。試料として精製CpPR-1~4、コントロールとしてTMV感染タバコ(Samsun NN)葉のPR-1画分をSDS-PAGEに供試した(Fig. 7)。CpPR4成分はいずれも抗タバコPR-1c抗体と反応したが、反応性は弱かった。CpPRの生成量がプラトーに達するCMV接種48時間後における局在部位について検討するため、ササゲ初生葉をphenylmethyl sulphonyl fluoride (PMSF)に浸漬し細胞膜を可塑化した後、遠心分離処理により細胞内容物と細胞間隙抽出物とに分画した。各分画をNative-PAGEにより分析した結果、CpPR4成分全てが主に細胞間隙中に存在した(Fig. 8)。また、経時的に局在部位を分析したところ、24時間目までCpPRは細胞内容物に、それ以後は細胞間隙中で主に検出された(Fig. 9)。CpPRが局在する細胞間隙は植物のタンパク質分解酵素が多く存在することが知られている。そこで、CpPRのタンパク質分解酵素に対する耐性について*Staphylococcus aureus* V8 proteaseを用いて調べた(Fig. 10)。その結果、100 μ gのCpPRに対し20 μ gのV8 proteaseを処理しほぼ完全に部分分解産物に消化されたことから、本タンパク質はタンパク質分解酵素に耐性であることが明らかとなった。

第3章 CpPRのアミノ酸配列分析

CpPR4成分はCMV接種後の生成時期、その他生化学的性質がよく似ており、類似の構造をとることが予想された。そこで、ペプチドマッピングによりタンパク質の1次構造を解析した。V8 protease処理後SDS-PAGEに供試した結果、CpPR4成分の限定分解産物の泳動パターンがきわめて類似していることから、1次構造上類似したV8 protease切断認識部位を持つと考えられる(Fig. 11)。CpPR4成分を2次元電気泳動により展開後PVDF (polyvinylidene difluoride)

に転写し、アミノ酸シーケンサーに供試した。その結果、4成分のN末端アミノ酸配列は決定した10アミノ酸残基中、8アミノ酸残基目でCpPR-1,2がGln、CpPR-3,4がGluである以外は相同であった (Fig. 12)。CpPR-2,4をV8 protease処理し得られた限定分解産物のアミノ酸配列を決定したところ、きわめて類似していることが明かとなった (Fig. 13)。

第4章 CpPRの塩基配列分析

CpPR4成分のペプチドマッピング並びにN末端アミノ酸配列の解析より部分1次構造を決定し、各成分はその領域内で類似したアミノ酸配列を有することが示された。そこでタンパク質の諸性状の情報にコードされている1次構造を解析するためCpPR生合成が認められ始めたササゲ初生葉よりcDNAライブラリー (3.5×10^5 クローン) を作成した。前章において決定したCpPR-3のN末端アミノ酸配列中コドン縮重度の少ないアミノ酸を多く含む領域の塩基配列に相補的なオリゴヌクレオチドを合成した (Fig. 14)。本オリゴヌクレオチドをプローブとしてcDNAライブラリーより選択したポジティブクロンのシーケンスを行った結果、ORF及び5', 3' 非翻訳領域を含むクローンpCp8 (Fig. 15) は推定される分子量および等電点からCpPR-3をコードする事が明かとなった。また、本クローンはマメ科やパセリのPRタンパク質と80%以上の相同性が認められた (Fig. 16)。pCp8はこれらのタンパク質の塩基配列中、3' 非翻訳領域以外の大部分で高い相同性が認められた。

第5章 CpPRの発現調節機構の解析

CpPRはNative-PAGEによりCMV接種後14時間目より確認された。本タンパク質の発現はウイルス感染により急激に増高することから、その発現機構に興味もたれる。CMV接種後4時間毎にtotal RNAを抽出し、pCp8をプローブとしてノザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、接種12時間後よりCpPRの転写物が生成することが明かとなった (Fig. 17)。また、小麦胚芽抽出物により *in vitro* translationを行ったところ、同様に接種12時間後から15~16kDaの翻訳産物が顕著に増加することが認められた (Fig. 18)。これらの結果より、CpPRの発現は主に転写レベルで調節されていると考えられる。次に、CpPR遺伝子の構成を検討するため、ササゲ葉よりゲノムDNAを抽出しpCp8をプローブとしたゲノミックサザンハイブリダイゼーションを行った (Fig. 19)。ゲノムDNAにおいて複数のハイブリダイズしたバンドが検出されたことから、CpPRは複数の遺伝子にコードされ各遺伝子に少なくとも1~2コピー存在すると考えられ、総遺伝子数はかなり多いことが示唆された。

第6章 総合考察

ササゲ初生葉にCMVを接種すると14~15時間後に壊死斑が形成される。このような急激な壊死斑形成には極端な代謝変化を伴う。CMV感染ササゲ葉に壊死斑が形成された直後に感染に特異的なCpPR4成分が検出された。このCpPRは壊死斑における褐変化が進むにつれ増加し、接種48時間後には感染葉の可溶性タンパク質の約1%を占めることから、壊死斑形成との関連が注目された。CpPRの生化学的性状、及び1次構造の解析より4成分はきわめて類似したものであることが示された。4成分を支配する遺伝子はおそらく同一の進化的起源を持ち、進化の過程で一部塩基配列の変化があったと推定される。すなわち、CpPRは1つのgene familyを形成し、互いにhomologous geneであると考えられる。このメカニズムは、PRタンパク質がウイルス感染後短時間に大量に生成されることを反映していると考えられる。また、CpPR-3の塩基配列の解析の結果、マメ科とパセリのPRタンパク質と高い相同性が認められたが、タバコのPRタンパク質に対しては比較的相同性が低かった。したがって、タバコとマメ科のPRタンパク質は進化的に早期に分離したと考えられるが、タバコのPR-1に対する抗体と反応性を持つことから、なんらかの機能を支配する領域は比較的保存されている可能性が示唆された。また、CpPR遺伝子がマメ科と隔たった種のパセリと高い相同性が認められたことから、CpPRは進化において比較的初期のタンパク質であり、その構造は大きく変化していないと考えられる。

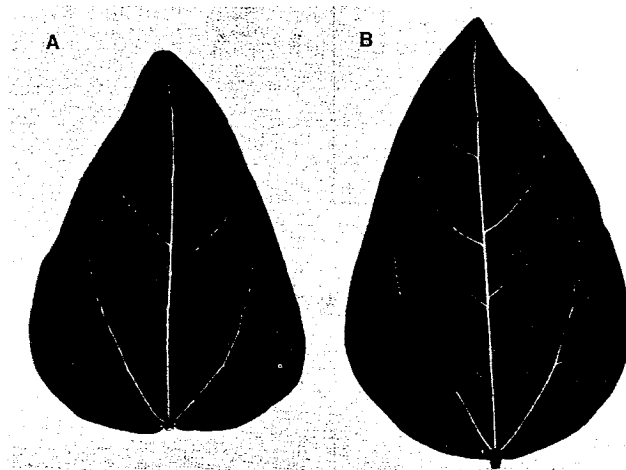


Fig.1. Photographs of a healthy (A) and a CMV-infected (B) cowpea leaves.

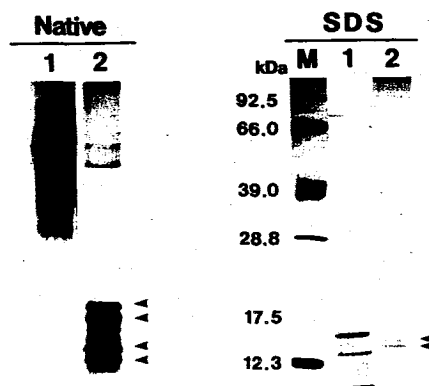


Fig.2. Electrophoretic analysis of soluble proteins extracted from cowpea leaves. The samples were applied to native (Native) and SDS (SDS) -PAGE. The soluble proteins of healthy (lane 1), CMV-inoculated (lane 2), and molecular weights marker (lane M) were resolved by electrophoresis and gel was silver-stained. Arrows indicate specific bands appeared in CMV-inoculated leaves.

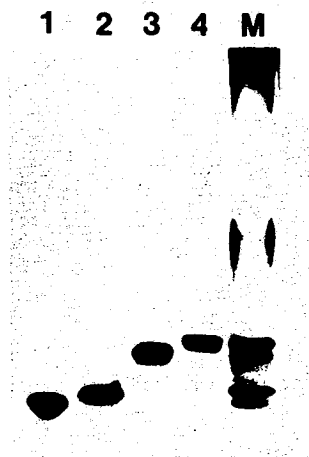


Fig.3. Profiles after native-PAGE of purified preparations of CpPRs. Preparations (lane 1:CpPR-1, lane 2:CpPR-2, lane 3:CpPR-3, lane 4:CpPR-4) separated by electroelution from native-PAGE, were subjected to native-PAGE, and proteins were stained with silver. Soluble proteins from CMV-inoculated cowpea leaves was applied to lane M.



Fig.4. Silver-stained gels after two-dimensional gel electrophoresis(IEF/SDS-PAGE) of soluble proteins from CMV-inoculated cowpea leaves. The pH range was 10.0 to 3.5, left to right. Polypeptide spots unique to the extract of CMV-inoculated leaves are indicated by arrows.

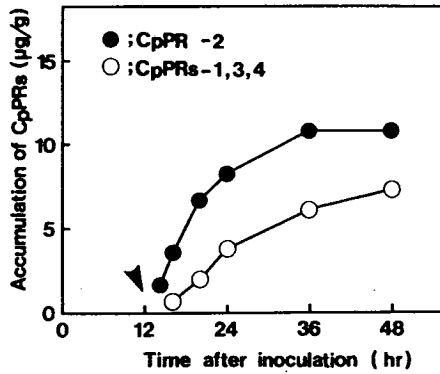


Fig.5. Time course of CpPRs production. Closed symbol indicates data of CpPR-2 and open symbols indicate that of CpPR-1, 3, and 4, respectively. An arrow indicates the time of necrotic local lesion appearance.

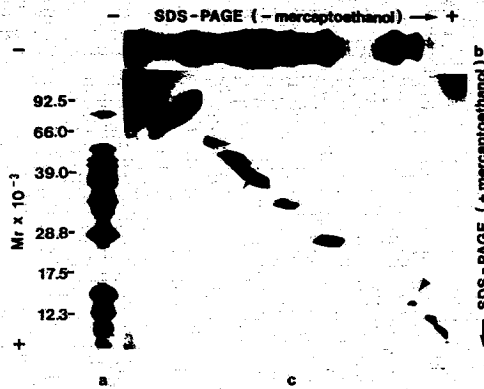


Fig.6. Two-dimensional SDS-PAGE of the soluble proteins from CMV-infected cowpea leaves. a, SDS-PAGE under reducing condition; b, SDS-PAGE under nonreducing condition; c, 2D-SDS-PAGE in the first dimension under nonreducing condition, the second dimension under reducing condition. Arrow indicates the polypeptide spots of CpPRs.

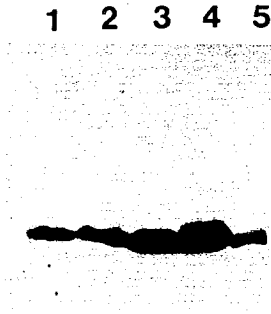


Fig.7. Western blot and immunostained with antibodies against tobacco PR-1c polypeptide, after SDS-PAGE of purified CpPRs (lane 1:CpPR-1, lane 2:CpPR-2, lane 3:CpPR-3, lane 4:CpPR-4), and soluble proteins from TMV-inoculated tobacco Samsun NN (lane 5). 2 µg of each CpPR and 100ng of tobacco proteins were applied to each lane for western blotting.

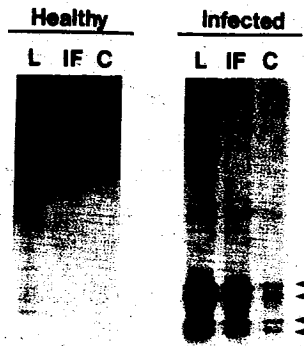


Fig.8. Electrophoretic patterns of soluble proteins in healthy (panel: Healthy) and CMV-infected (panel: Infected) cowpea leaves. Leaf tissue (lane L) was infiltrated *in vacuo* followed by low-speed centrifugation and electrophoresised under native conditions. Intercellular fluid extracts (lane IF) and intracellular extracts (lane C) were compared. Arrows indicate CpPRs.

1 2 3 4 5 6



Fig.9. Electrophoretic patterns of tobacco leaf proteins from successive intracellular extracts (lane 1:24hr, lane 2:36hr, lane 3:48hr) and intercellular fluid extracts (lane 4:24hr, lane 5:36hr, lane 6:48hr) subjected to PAGE under native conditions.

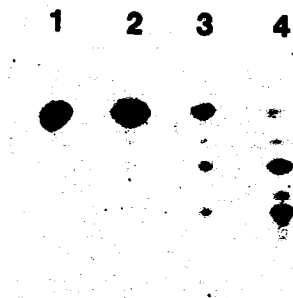


Fig.10. Electrophoresis analysis of CpPR-1 digested with V8 protease. CpPR-1 was digested with 0 μ g (lane 1), 0.2 μ g (lane 2), 2 μ g (lane 3), 20 μ g (lane 4) of V8 protease. 10 μ g of CpPR-1 were treated with V8 protease after electroelution.



Fig.11. Peptide mapping patterns of CpPRs (lane 1:CpPR-1, lane 2:CpPR-2, lane 3:CpPR-3, lane 4:CpPR-4) digested with 20 μ g of V8 protease. 10 μ g of each CpPR were applied to electrophoresis and stained by Coomassie blue. Peptide fragments numbers are indicated on the right side.


```

      10      20      30      40      50      60
TACCCTTTCCGATTCTCTCCATCTCAGTTCCATTAAAGCATGGCCGTTTCACATTCGAG
      MetAlaValPheThrPheGlu
      70      80      90      100     110     120
GACGAACCAACTTCTCCCGTGGCTCTGCCACCCCTTACAAGCTCTTGTGAAAGACGCC
AspGluThrThrSerProValAlaProAlaThrLeuTyrLysAlaLeuValLysAspAla
      130     140     150     160     170     180
GACAACATCGTCCCAAAGCCGTTGATTCTCTCAAGAGTGTGAAATCGTGGAGGCAAC
AspAsnIleValProLysAlaValAspSerPheLysSerValGluIleValGluGlyAsn
      190     200     210     220     230     240
GCTGGCCCGGAACCATCAAGAAGATCTCTTTCTTAGGATCGAGAGACAAAGTTTGTG
GlyGlyProGlyThrIleLysLysIleSerPheLeuGluAspGlyGluThrLysPheVal
      250     260     270     280     290     300
TTGCACAAATGAAAGCAATAGATGAGGCAACTTGGATACAGCTACAGCATTCTTGA
LeuHisLysIleGluAlaIleAspGluAlaAsnLeuGlyTyrSerTyrSerIleValGly
      310     320     330     340     350     360
GGTGTGCTTGGCCAGACACTCCAGAGAAGTCAACAATCGACACCAAACTCAGTGATGCC
GlyAlaAlaLeuProAspThrAlaGluLysIleThrIleAspThrLysLeuSerAspGly
      370     380     390     400     410     420
TCCAACGGAGGCTCTGTGGTGAAGCTGAGCATAAAATACCACAACAAGGAGATGCTCCA
SerAsnGlyGlySerValValLysLeuSerIleLysTyrHisAsnLysGlyAspAlaPro
      430     440     450     460     470     480
CCCAACGAAAGATGAACTCAAGCTGCTAAAGCCAAGAGTGTGCTCTTTTCAAGGTATC
ProAsnGluAspGluLeuLysAlaGlyLysAlaLysSerAspAlaLeuPheLysValIle
      490     500     510     520     530     540
GAGGCTTACCAATTGGCCCAAGCTTGAATTATTACCTGCTTTCCCTGTGTGTTATC
GluAlaTyrGlnLeuAlaAsnAla
      550     560     570     580     590     600
TTAAAATTGGCTTTCAACATACAGTGTTTAAGTTAAGTTTGTGTAAGGTTATCTTTGT
      610     620     630     640     650     660
ATCCACTACATCAACCAATAAGTTAAATAAAGGAAAGTATTACTTAAATACAAAAAAA
      670     680
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Fig.15. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence within open reading frame of the pCp8 clone. Polyadenylation signal are indicated by underline.

Pea disease resistance response protein	(PI176)	70.5%
	(PI 49)	71.2%
	(DRRG49-c)	68.6%
Bean pathogenesis-related protein 1	(PvPR1)	87.7%
2	(PvPR2)	92.5%
Parsley pathogenesis-related protein type A	(PcPR1-2)	58.0%
type B	(PcPR1-3)	57.1%
2	(PcPR2)	71.0%

Fig.16. Sequence homology of pCp8 clone with the pea disease resistance response proteins, bean pathogenesis-related proteins, and parsley pathogenesis-related proteins.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



Fig.17. Induction of CpPR mRNA in cowpea leaves after inoculation with CMV. Total RNA was extracted at different time after inoculation (lane 1:0hr, lane 2:4hr, lane 3:8hr, lane 4:12hr, lane 5:16hr, lane 6:20 hr, lane 7:24 hr, lane 8:mock inoculation, lane 9:healthy). Aliquots of 10 µg and probe(pCp8) control(lane 10:10pg, lane 11:100pg) are applied to the gel.

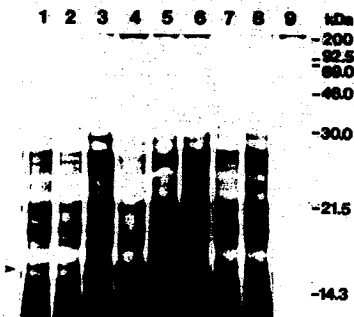


Fig.18. *In vitro* translation analysis. Poly(A) mRNA extracted at different time after inoculation (lane 1:4hr, lane 2:8hr, lane 3:12hr, lane 4:16hr, lane 5:20hr, lane 6:24hr, lane 7:mock inoculation, lane 8:healthy, lane 9: no poly(A) mRNA). Poly(A) mRNA were applied to *in vitro* translation in presence of ^{35}S -Met. Translation products were electrophoresis under denatured condition by SDS and applied to fluorography. Arrow indicates deduced position of CpPRs. Size markers are indicated on the left side.

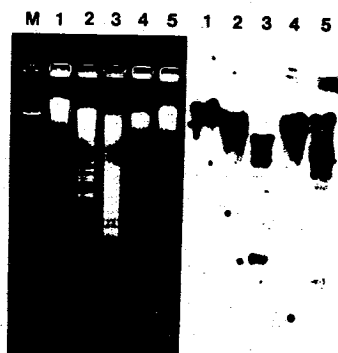


Fig.19. Genomic southern hybridization analysis(left: ethidium-stained gel, right:autoradiography). Genomic DNA was digested with 10 units of the restriction enzymes(lane 1:*Bam*HI, lane 2:*Eco*RI, lane 3:*Hind*III, lane 4:*Pst*I). Size markers (*Hind*III fragments of λ DNA)are loaded on the lane M.

審査結果の要旨

キュウリモザイクウイルス (cucumber mosaic virus; CMV) に感染したササゲ (*Vigna unguiculata* cv. Kurodane-sanjaku) 葉には過敏反応により局部壊死斑が形成される。この際特異的に生成される感染特異的タンパク質 (CpPR タンパク質) の生化学的性質及び遺伝子構造の解析を行い、その変動を分子レベルで解明した。

CMV 接種14時間後に局部壊死斑を形成したササゲ初生葉より可溶性タンパク質を抽出し Native-PAGE に供試した結果、4成分の CpPR タンパク質を検出した。これらは壊死斑形成にともしない生成され、可溶性タンパク質の約1%に達することから壊死斑形成に関連するタンパク質であることが明らかとなった。

本タンパク質4成分の性状を解析するため精製法としては、Native-PAGEにより展開した各成分を電気泳動的に精製するエレクトロエリユージョン法が、変性を伴わず高度に精製する方法であった。本精製法により得られた精製 CpPR タンパク質を用い分子量、等電点を検討した結果、低分子 (14~15kDa) の酸性タンパク質 (pI5.1~5.6) であることがわかった。本タンパク質は壊死斑の周辺細胞において生成されることから、その所在に注目し、phenylmethylsulphonylfluoride (PMSF) により細胞膜を可塑化した後、細胞間隙中の成分を分画した。その結果、CpPR タンパク質は細胞間隙抽出物中に検出される分泌タンパク質であることが明らかとなった。また、過敏反応を示すタバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) でその生成が確認され、本タンパク質と分子量、等電点の類似した感染特異的タンパク質 PR-la との血清学的関係をウエスタンブロット法により検討し、反応性が認められたことから、これら低分子量の酸性感染特異的タンパク質は自然界に広く分布することが示唆された。

CpPR タンパク質はその発現時期、分子量、等電点などから4成分は類似した1次構造であると考えられ、その部分アミノ酸配列分析を行った。N末端及び、内部領域の部分アミノ酸配列においてほぼ相同であることから、4成分は極めて類似した1次構造を有する。

タンパク質の情報がコードされている1次構造を分析するため、ササゲの cDNA ライブラリーを作成し、CpPR タンパク質をコードするクローンのシーケンスを行った結果、マメ科やパセリの感染特異的タンパク質と高い相同性が認められた。また、ノザンハイブリダイゼーション、*in vitro* translation 実験より、CpPR タンパク質の mRNA が CMV 接種後12時間目より急激に生成されることから、転写レベルでその合成が調節されることを明らかにした。さらに、ゲノミックノザンハイブリダイゼーションにより複数のハイブリダイズしたバンドが検出されたことから、CpPR タンパク質遺伝子はマルチジーンファミリーを形成することが明らかとなった。

以上のように、本研究はウイルス感染組織における壊死斑形成関連タンパク質の解析を行ったものであり、過敏反応機構を解明する上での重要な基礎的知見を得たものである。よって、審査員一同は本論文提出者は博士 (農学) の学位を受けるに値すると判定した。