

氏 名(本籍) 小 川 俊 也

学位の種類 博 士 (農 学)

学位記番号 農 第 4 7 8 号

学位授与年月日 平 成 5 年 6 月 17 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 タバコモザイクウイルスのコードする  
130K/180K, および30Kタンパク質  
の機能に関する研究

論文審査委員(主 査) 教 授 伊 崎 和 夫  
教 授 江 原 淑 夫  
教 授 山 谷 知 行

# 論文内容要旨

## 第I章 諸論

大部分の植物ウイルスは、+鎖RNAをゲノムとして持っている。本研究で用いたタバコモザイクウイルス(TMV)は、らせんを巻いた約6400ntの一本鎖RNAゲノムにコートタンパク質が同様にらせん状に積み重なりウイルス外殻を形作った構造をとっている(Fig. 1)。ゲノムRNAは3つの非構造タンパク質と構造タンパク質であるコートタンパク質(CP)をコードしている<sup>1), 2)</sup>。3つの非構造タンパク質は、大きさによってそれぞれ130Kタンパク質、180Kタンパク質の終止コドンを読みスルーして翻訳される180Kタンパク質、および30Kタンパク質と呼ばれている(Fig. 2)。130K/180Kタンパク質は直接ゲノムRNAから翻訳されるのに対して、30Kタンパク質とCPはいったんそれらをコードするサブゲノムRNAが合成され、そこから翻訳される。それぞれのタンパク質の基本的な機能が最近分子レベルで解明されてきた。130K/180Kタンパク質はウイルスの複製酵素であり<sup>3)</sup>、30Kタンパク質はウイルスの細胞間転移 (cell-to-cell movement) に関与するタンパク質であることがわかった<sup>4), 5)</sup>。また、CPは構造タンパク質であるだけでなく、ウイルスの遠距離移行(long distance movement)に関与していることもわかっている<sup>6)</sup>。しかし、まだ詳細な機能に関しては不明な点も多い。本研究ではTMVの非構造タンパク質に着目し、1) 非分節ゲノム型ウイルスであるTMVの複製酵素が、分節ゲノム型ウイルスの複製酵素のようにゲノムRNAの複製に対してトランスに機能しうるかの検討、2) 複製酵素をトランスに機能させゲノムRNAを複製させる系を利用して、複製酵素をコードしているゲノムRNA領域内に存在するゲノムRNAの複製に関してシスに働く領域の検索、3) 形質転換植物中で発現した複製酵素が機能するかの検討、4) 30Kタンパク質の修飾の解析と修飾と機能発現の関係、などについて検討した。

## 第II章 タバコモザイクウイルスのコードする複製酵素の、ゲノムRNAの複製に対するトランスの機能

植物ウイルスには、TMVのような一本のRNAをゲノムとする非分節ゲノム型ウイルスと、プロモモザイクウイルス(BMV)などのように複数のRNAをゲノムとして持つ分節ゲノム型ウイルスが存在する。ゲノムの複製に際して、分節ゲノム型ウイルスの複製酵素は複製酵素をコードしていないゲノムを認識し複製させている。つまり、複製酵素はゲノムRNAの複製に対してトランスに機能している。しかし非分節ゲノム型ウイルスであるTMVの複製酵素は、翻訳されたゲノムRNAのみを認識し複製させている(シスの機能)可能性もあり、ゲノムRNAの複製に対してトランスに機能しているかはまったくわかっていなかった。一方、非分節、分節ゲノム型のウイルスのコードしているタンパク質、特に複製酵素のアミノ酸配

列を比較すると相同性がかなり高いことがわかっていた<sup>7)</sup> (Fig. 3)。そこで本研究では、非分節型ゲノムを持つTMVのRNAを、複製酵素を合成するRNA (複製酵素供与変異体) と合成しないRNA (複製酵素欠損変異体) の2本に人工的に分割し分節ゲノム型とし、複製酵素供与変異体から産生された複製酵素が、複製酵素欠損変異体に対してトランスに機能し複製させることができるかを検討した。その結果、非分節ゲノム型ウイルスであるTMVの複製酵素も分節型ウイルスの複製酵素と同様に、ゲノムRNAの複製に関してトランスに機能することがわかった。

## II-1 ゲノムRNAの複製に対するトランスの機能

TMV-L株の完全長RNAに対するcDNAを、λファージ由来のRNAポリメラーゼに対するプロモーター (Pmプロモーター) の転写開始部位の直後に連結し、転写終了部位直後にMluIの認識部位を導入しクローン化することによって *in vitro* で感染性のあるTMV-RNAを合成することのできるプラスミド (pLPW3<sup>8)</sup>) を用いて、複製酵素供与変異体合成用プラスミド (pLDCS29) と複製酵素欠損変異体合成用プラスミド (pLDR28) を作成した。pLDCS29およびpLDR28から *in vitro* でRNAを合成した。以後、*in vitro* で合成したRNAおよびその複製されたRNAをプラスミドの "p" を除いて標記する。LDCS29およびLDR28の構造を、野生型のRNA (LFW3) と比較したものをFig. 4に示した。LDCS29はCPをコードしている領域に欠損を導入した変異体である。複製酵素 (130K/180Kタンパク質) をコードする領域と、後に述べる5' 3' 末端部分のゲノムRNAの複製に関して必須の領域はそのまま残っているため、複製酵素を発現し複製するが、CPが発現されないためウイルス粒子は形成しない。またLDR28は、130K/180Kタンパク質をコードしている領域の大部分を欠損させた変異体であり、単独では複製できない。これら二種の合成RNAを、同時にタバコ培養細胞より調製したプロトプラストにエレクトロポレーション法によって導入し、経時的にRNAを抽出した。Fig. 5に抽出したRNAの、CP領域に対するcDNAをプローブ (プローブA) としたノーザン分析の結果を示した。CP領域をプローブとしたため、LDCS29は複製しているが検出されない。この図から解るように、培養3時間後には導入したLDR28が、LDR28を単独で導入したときとLDCS29と同時に導入した時の両方にみられる (Fig. 5, lanes 1, 5)。しかし、時間が経過するにしたがって、単独で導入したときにはLDR28のバンドは検出されなくなった (Fig. 5, lanes 1-4)。これらのことから、LDR28を単独で導入したときに検出されたバンドは、導入したRNAの分解され残ったものであると考えられる。一方、LDCS29と同時に導入したときには、ほとんど変わらないレベルでLDR28が検出された (Fig. 5, lanes 5-8)。このことは同時に導入した細胞中では、LDR28が分解される一方で新たに複製されたことを示唆している。LDR28をLDCS29と同時に導入した

際と、単独で導入した際に検出されたLDR28の差を、オートラジオグラフィのバンドの濃さによって算出し、新たに合成されたLDR28とし、その経時的な変化をグラフに示した (Fig. 6)。この結果から、LDR28の複製は培養初期に活発であり、培養後9時間くらいで定常状態となることがわかった。複製の結果として産生されたと考えられるCPサブゲノムRNAも、LDR28とLDCS29を同時に導入した細胞でLFW3と同様に検出され、このこともLDR28が複製したことを裏付けている (Fig. 5, lanes 5-8, 13-16)。

以上の結果から、非分節ゲノム型のTMVのコードする複製酵素も、分節ゲノム型のウイルスのそれと同様にゲノムRNAの複製に関してトランスに機能することがわかった。しかし、LDR28の複製量はLFW3の約1/30であり、その効率の違いが非分節型と分節型の違いを現しているのかもしれない。

## II-2 複製酵素のトランスの機能によって複製された変異体ゲノムRNAの、ウイルス粒子形成

II-1でTMVのコードする複製酵素がトランスに機能し、複製酵素欠損変異体ゲノムRNAを複製させることがわかった。そこで、この系によって複製された変異体ゲノムRNAがウイルス粒子を形成しているかを検討した。

II-1で述べたLDR28とLDCS29を同時に導入し、20時間培養したプロトプラストからリン酸バッファーによって可溶性成分を抽出し、抽出液を電子顕微鏡によって観察した。また、抽出液をショ糖密度勾配遠心によってウイルス画分を分取し、RNAを抽出しノーザン分析を行った。

LDR28とLDCS29を同時に、およびLFW3を導入したプロトプラスト抽出液を電子顕微鏡によって観察した結果をFig. 7に示した。LFW3を導入したプロトプラスト抽出液からは、300nmのワイルドタイプのTMVが観察されたのに対して、LDR28とLDCS29を同時導入したものからは280nmと100nmの2種の棒状ウイルスが観察された。密度勾配遠心の各画分をSDS-PAGE後、TMV抗体を用いてウェスタン分析をした結果をFig. 8に示した。ウイルスの画分(a)とウイルスの存在しない画分(b)からRNAを抽出し、ノーザン分析をした結果をFig. 9に示した。AはTMV-cDNAの完全長をプローブ (プローブB) として用い、BはII-1で述べたプローブA (CP領域に対するcDNA) を用いた。Aより、ウイルス画分中にはLDCS29とLDR28の大きさに相当するRNAが検出された。またBより、プローブAによってLDR28と予想されるバンドのみ検出された。これらのことによって、LDR28およびLDCS29ともにウイルス粒子を構成していることがわかった。またLDCS29の粒子形成のためにはCPはLDR28から供給される必要があり、LDCS29が粒子形成したことによってTMVの粒子形成に関してCPがトランスに働くことも明らかになった。

### 第三章 複製酵素をコードする領域中の、ゲノムRNAの複製に関してシスに働く領域

各種欠損変異体の解析によって、ゲノムRNAの3' <sup>9)</sup>および5' <sup>10)</sup>の末端領域には、ゲノムRNAの複製に必須なシスの領域が存在することがわかりその領域が特定された。一方、30Kタンパク質、およびCPをコードしている領域は、欠損させてもゲノムRNAの複製能は保持されることもわかっている<sup>4)</sup>。しかし、複製酵素をコードしている領域は欠損によって複製酵素そのものが合成されなくなり、シスの領域を特定することは不可能だった。しかし、II章で述べたように複製酵素をトランスに働かせることによって複製酵素をコードしている領域を欠損させてもゲノムRNAが複製される系ができ、それによって複製酵素をコードする領域に存在するゲノムRNAの複製に関してシスに働く領域も決定できるようになった。

pLPW3をもとにして、複製酵素をコードする領域に様々な大きさの欠損を導入したプラスミドを作成した。それらのプラスミドから *in vitro* で合成したRNAの構造をFig. 10に示した。これらのRNA (LDRs)を、それぞれLDCS29と同時にタバコプロトプラストに導入し、20時間培養後RNAを抽出し、各変異体のゲノムRNAの複製様式を比較した。

抽出したRNAのCP領域に対するcDNAをプローブ(プローブA)としたノーザン分析の結果をFig. 11Aに、また Fig. 11A のlanes 1, 6-10を長時間露光した結果をFig. 11Bに示した。Fig. 11Bからわかるように、各変異体ゲノムRNAはLDCS29と同時に導入することによってプロトプラスト中ですべて複製した。しかし複製量、複製様式にはかなりの違いがあることがわかった。Fig. 11Aからわかるように、LDR28が最も複製量が多かった(lane 8)。また、それよりも小さな欠損を持った変異体(LDR22、24)や、大きな欠損を持った変異体(LDR29、21)も、LDR28と比較すると複製量が少なかった(lanes 6-10)。この違いはLDR28とLDR24、およびLDR28とLDR20で顕著であり、このことから180Kタンパク質遺伝子の3'側約1/3の部分(TMV-cDNA 4529-4937)にゲノムRNAの複製に関して負に働く領域が、また30Kタンパク質遺伝子の5'側約半分の部分(TMV-cDNA 4938-5263)に正に働く領域が存在すると考えられる。

### 第四章 形質転換タバコ中で発現された複製酵素の機能発現

近年、植物の形質転換系(特にAgrobacteriumを用いた系)がかなり日常的な技術になってきた。植物ウイルス学の分野でもその技術を利用して、ウイルス遺伝子を導入した形質転換植物を作成し解析する手法が取り入れられてきている。形質転換植物中で発現されたTMVの複製酵素が複製能を持つかどうかを調べるために、本研究では複製酵素を産生する複

製酵素供与変異体に対するcDNAをタバコに導入し、形質転換タバコ植物を作成し解析した。

#### IV-1 複製酵素供与変異体cDNAを導入した形質転換タバコの作成と変異体の複製

TMV-RNAの全長に対するcDNAを、CaMV35Sプロモーターの転写開始部位の直後に接続し、AgrobacteriumのTiプラスミド中間ベクターに導入したプラスミド(pOKL4)とpLDCS29を用いて、中間ベクターpOKLDCS29を作成した。このpOKLDCS29を用いて、常法によって形質転換タバコ植物(LDCSタバコ)を作成した。この形質転換タバコ植物体を用いて、cDNAの導入、RNAの発現を検討した。また複製中間体である一鎖RNAを検出した。なおL4タバコは、Yamayaら<sup>11)</sup>の作成したTMV-L株cDNAの全長が組み込まれている形質転換タバコである。

LDCSタバコにLDCS29-cDNAが導入されていることを確認するために、LDCSタバコ葉から抽出したDNAを、TMV-cDNAの全長をプローブ(プローブB)としてサザン分析を行った(Fig. 12)。独立した5個体の形質転換体全てからLDCS29-cDNAの組み込みを示す2本のバンドが検出された。組み込まれたcDNAの発現を検討するために、サザン分析に供した植物2個体の葉からRNAを抽出し、プローブBを用いてノーザン分析を行った(Fig. 13)。Fig. 13からわかるように、LDCSタバコ植物中でLDCS29-RNAが発現していた。

細胞内RNA中の、LDCS29-RNAの占める割合を調べるために、Fig. 13, lane 1のRNAを用いてドット分析を行った(Fig. 14)。Fig. 14から、LDCSタバコ葉RNA1 $\mu$ gあたりLDCS29-RNAが約1ng存在することがわかった。これは全RNAの0.1%に相当する量であり、一般にCaMV35Sプロモーターから転写される外来のRNA量と比較するとかなり多かった。このことはLDCSタバコ植物で転写されたLDCS29-RNAが、ウイルス複製機構によって複製していることを示唆している。LDCS29-RNAが形質転換植物中で複製していることを裏付けるために、複製中間体である一鎖RNAを検出した。検出には、一鎖RNAに対して特異的なリボプローブを用いたRNase Protection Assayによって行った(Fig. 15)。Fig. 15からわかるようにLDCSタバコ中に、RNaseの分解を受けなかったバンドが検出された。このことはTMVの複製中間体である、TMV-RNAに対する一鎖RNAが存在することを示している。これらのことによって、形質転換タバコ植物中で発現されたLDCS29-RNAは、ウイルス複製機構によって複製していることがわかった。以上の結果は、とりもなおさずLDCS29-RNAから発現された複製酵素が機能したことを示している。

## IV-2 形質転換タバコ中で発現された複製酵素の、ゲノムRNAの複製に対するトランスの機能

IV-2において、LDCSタバコ中で複製酵素が発現していることがわかった。この複製酵素が、I章で述べたようにゲノムRNAの複製に対してトランスに機能するかを検討した。

LDCSタバコ葉からプロトプラストを調製し、複製酵素欠損変異体合成RNA (LDR) を導入した。20時間培養後タンパク質を抽出し、LDRの複製の結果産生されるCPをウエスタン分析によって検出した。

Fig. 16にLDCS29タバコプロトプラストにLDRを導入し抽出したタンパク質の、TMV抗体を用いたウエスタン分析の結果を示した。この図からわかるように、LDR22、およびLDR24から、ゲノムRNAの複製の結果産生されたCPが検出された。このことは、形質転換タバコ細胞中で発現された複製酵素が、トランスに機能しLDRを複製させたことを示している。

## 第V章 タバコモザイクウイルスの細胞間移行タンパク質のリン酸化

TMVの30Kタンパク質はウイルス感染の際細胞間隙に集積し<sup>12)</sup>、その大きさを広げる<sup>13)</sup>ことによってウイルスが細胞間を移行できるようにする働きをしている。一方、プロトプラストにTMVを感染させると、30Kタンパク質は、細胞質中の電子密度の濃い領域に特異的に集積する<sup>14)</sup>こともわかっている。

Atabekovら<sup>15)</sup>は、30Kタンパク質の温度感受性変異体であるLS1株がcAMPの添加によってその機能が回復することを見だし、30Kタンパク質がcAMP依存型のリン酸化酵素によってリン酸化されているのではないかと考えた。この章では、30Kタンパク質が*in vivo*でリン酸化しているのかを検討し、リン酸化と30Kタンパク質の機能発現について検討した。

### V-1 リン酸化、およびリン酸化アミノ酸の決定

タバコプロトプラストへTMV-RNAを導入し、 $H_3^{32}PO_4$ を培地に加え培養した。6時間培養後タンパク質を抽出し、30Kタンパク質抗体によって免疫沈降させ、SDS-PAGEによって検出した (Fig. 17)。Fig. 17からわかるように、TMVを感染させたプロトプラストに特異的に沈降された30Kタンパク質のバンドが検出された。このことは、30Kタンパク質が植物細胞内でリン酸化されていることを示している。

30Kタンパク質のリン酸化されたアミノ酸を決定するために、電気泳動した際のリン酸化された30Kタンパク質のバンドを切り出し、ゲルからタンパク質を抽出後タンパク質を部分加水分解した。分解したタンパク質

を、TLCを用いた2次元電気泳動により展開しオートラジオグラフィーによってスポットを検出した。また、リン酸化された30Kタンパク質を部分加水分解したものをTLC電気泳動した結果をFig. 18に示した。標準品との比較から、30Kタンパク質のリン酸化されたアミノ酸はSerのみであることがわかった。

## V-2 リン酸化部位の解析、およびリン酸化の意味

リン酸化されたSerのタンパク質中の部位を検討し、リン酸化が30Kタンパク質の機能発現に関与しているかを検討した。

pLFW3を基にして各種30Kタンパク質部分欠損変異体cDNAを作成しRNAを合成し (Fig. 19)、細胞内でのリン酸化の有無を検討した。

Fig. 19に示した変異体の30Kタンパク質のリン酸化を検討した結果をFig. 20に示した。Fig. 20 からわかるように、LQD261とLQD9/142を感染させたプロトプラストからはリン酸化された欠損30Kタンパク質のバンドが検出されたが、LQD233とLQDNFからは検出されなかった。このことから、30Kタンパク質の234-261番目のアミノ酸中のセリンがリン酸化されていると考えられる。LQD233は植物中で細胞間転移はするがLFW3に比べると不十分であることがわかっている<sup>15)</sup>。このことは、30Kタンパク質のリン酸化はその機能発現に対して直接関与しているわけではないが、その機能を変化あるいは増強させていると考えられる。

## 第VI章 総括

本研究では、TMVのコードする非構造タンパク質の機能について検討した。その結果、複製酵素である130K/180Kタンパク質が分節型ゲノムウイルスと同様にゲノムRNAの複製に関してトランスに機能することがわかった。また、この複製酵素をトランスに機能させる系によって複製された変異体RNAがウイルス粒子を形成していることもわかった。さらに、複製酵素をトランスに機能させる系を利用して、いままで調べることでできなかった複製酵素をコードしている領域中のゲノムRNAの複製に関してシスに働く領域を検討し、180Kタンパク質遺伝子の3'側1/3の領域 (TMV-cDNA 4529-4937) に複製に関して負に働く領域が存在することがわかった。また形質転換植物中で発現された複製酵素が、複製に関して機能することもわかった。ウイルスの細胞間転移に関する30Kタンパク質については、細胞内でリン酸化されていることを突き止め、リン酸化されたアミノ酸はセリンであることがわかった。このリン酸化と30Kタンパク質の機能についての関係についてはまだはっきりとした結論は出ていないが、機能を増強するような働きがあるのではないかと今のところ考えている。このようにTMVのコードしている非構造タンパク質の機能について新たな知見を述べた。これらの結果を足がかりにして、今後さらに研究を発展させて行きたい。

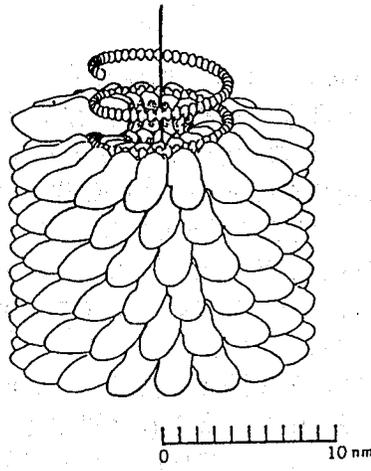


Fig. 1. Molecular model of TMV. The spiral line shows the genome RNA. The CPs coil around the genome RNA.

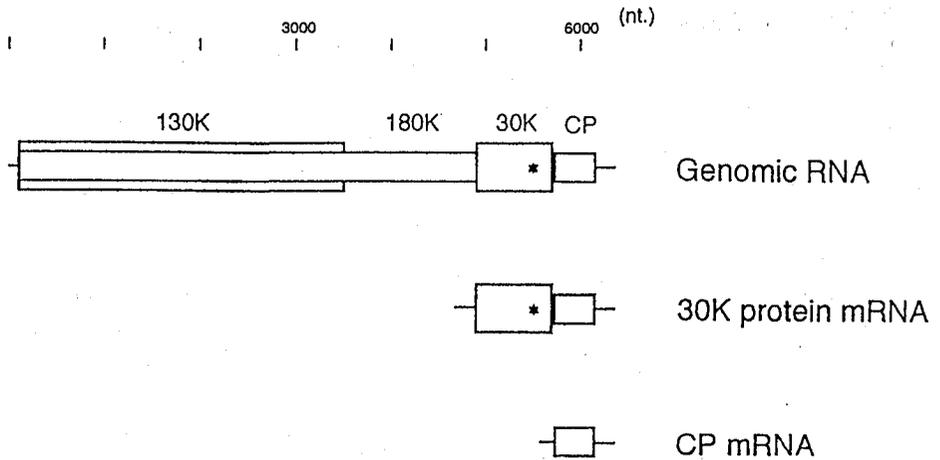


Fig. 2. Schematic representation of genome organization of TMV. 130K, 180K, 30K and CP represent 130K protein, 180K protein, 30K protein and coat protein, respectively. Subgenomic RNAs for the 30K and coat protein are also shown below the genomic RNA. Star symbols denote the assembly origin.

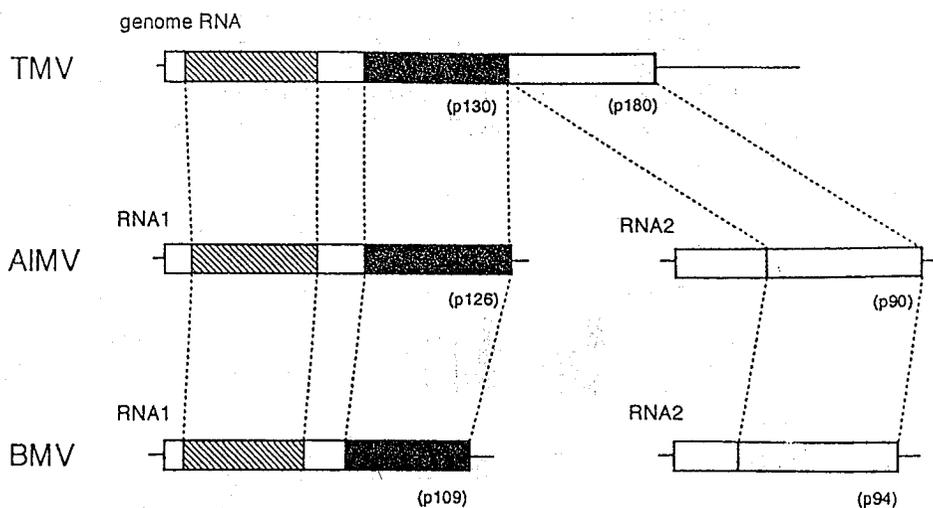


Fig. 3. Schematic representation of homologous region of the amino acids sequence of the putative RNA virus-encoded replicase. The regions surrounding the broken lines indicate the homologous regions.

(植物ウイルスと分子生物学、東京大学出版会より引用)

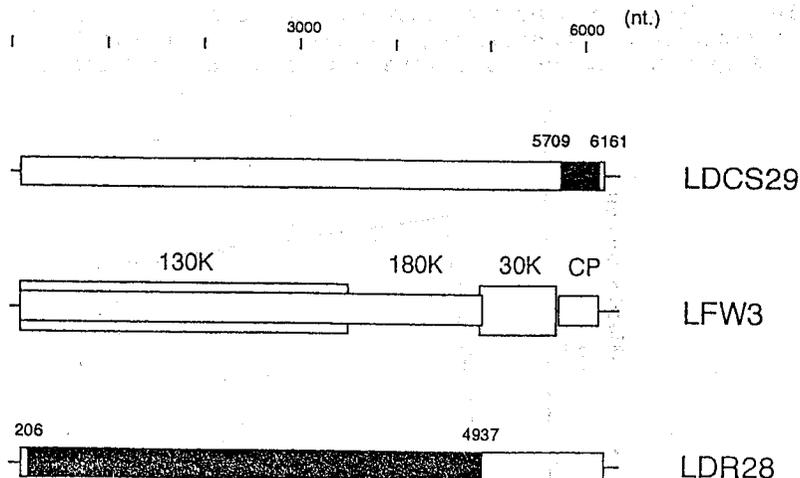


Fig. 4. Schematic representation of the replication-defective mutant (LDR28), the replication-competent mutant (LDCS29), and wild-type genome (LFW3) of TMV. The black boxes show the deleted region of each mutant. The 5' and 3' termini of the deleted region of these mutants are indicated by the number of the terminal residues.

LDR28	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
LDCS29	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
LFW3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	
hr samples	3	5	9	20	3	5	9	20	3	5	9	20	3	5	9	20
lanes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16

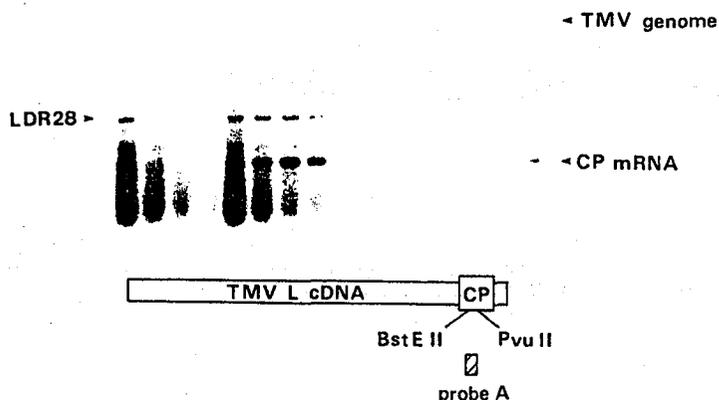


Fig. 5. Northern blot analysis of total RNAs inoculated with mutant or wild-type TMV transcripts probed with a  $^{32}$ P-labeled BstEII/PvuII fragment from the coat protein gene of TMV-cDNA (striped box). RNAs were extracted from protoplasts inoculated with LDR28 (lanes 1-4), LDCS29 (lanes 9-12), the mixture of these two mutants (lanes 5-8), and LFW3 (lanes 13-16). Lanes 1, 5, 9, 13, lanes 2, 6, 10, 14, lanes 3, 7, 11, 15, and lanes 4, 8, 12, 16 are RNAs from protoplasts extracted at 3, 5, 9, and 20 hr post-inoculation, respectively. Lanes 1-12 are RNA from  $7.5 \times 10^8$  protoplasts. Lanes 13-16 are RNA from 75 protoplasts.

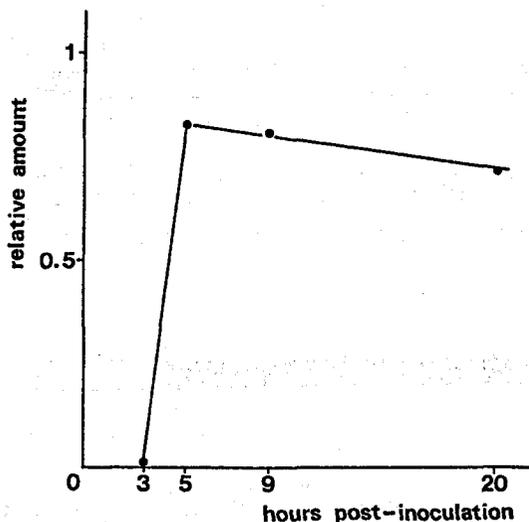


Fig. 6. The relative amount of newly synthesized LDR28 in co-inoculated protoplasts at each time post-inoculation. The amount was calculated by the differences in density between the autoradiographed LDR28 band in co-inoculated protoplasts (Fig. 4, lanes 5-8) and that in LDR28-inoculated protoplasts (Fig. 4, lanes 1-4) at each time postinoculation.

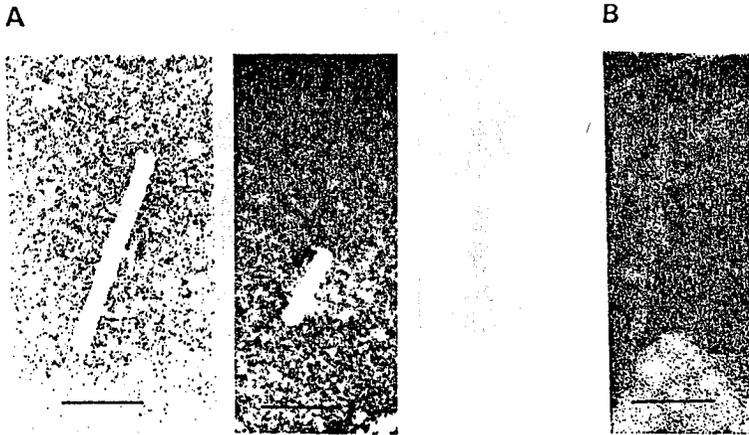


Fig. 7. Electron microscopy of virions : (A) virions obtained from protoplasts co-inoculated with LDCS29 and LDR28, and (B) virions obtained from protoplasts inoculated with LFW3. The length of the bar in each micrograph represents approximately 100 nm.

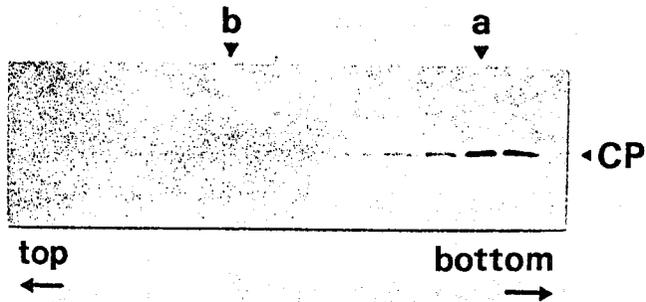


Fig. 8. Western blot analysis of protein from protoplasts co-inoculated with LDCS29 and LDR28 using anti-TMV antiserum. The protein was fractionated with 10-40% sucrose gradient. Fractions (a) and (b) represent the virion and no-virion fractions, respectively.

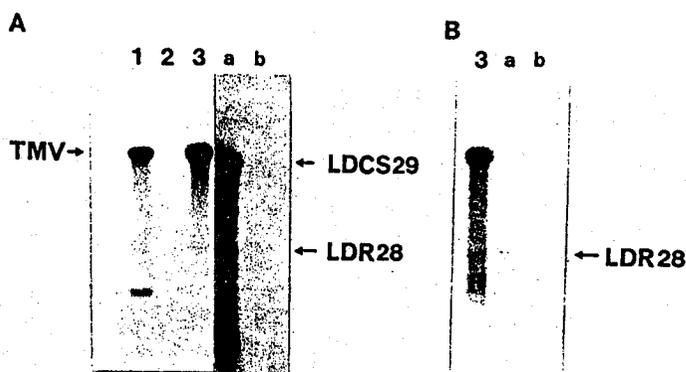


Fig. 9. Northern blot analysis using (A) full-length TMV-cDNA and (B) CP gene-specific probe. Lane (a) and (b); RNA extracted from fraction (a) and (b) in fig. 8. Lane 1; RNA extracted from protoplasts inoculated with LFW3. Lane 2; RNA extracted from mock-inoculated protoplasts. Lane 3; RNA extracted from viron fraction of protoplasts inoculated with LFW3.

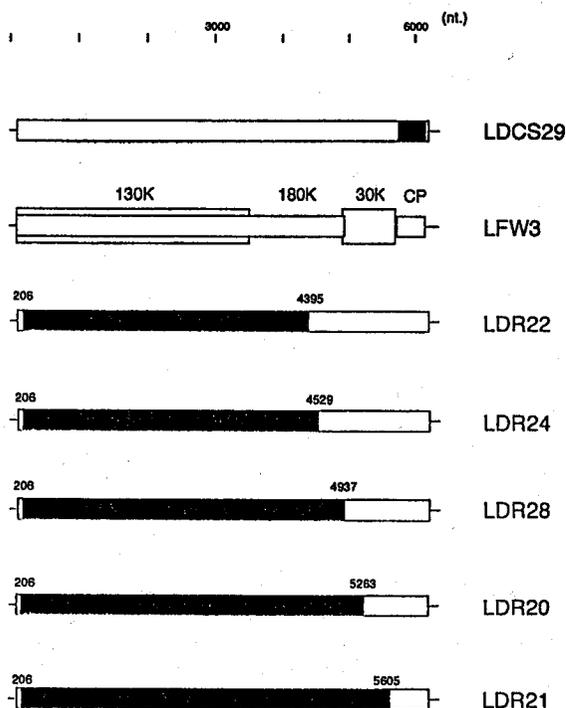


Fig. 10. Schematic representation of the replication-defective mutants (LDR22, LDR24, LDR28, LDR20, and LDR21), the replication-competent mutant (LDCS29), and the wild type genome (LFW3) of TMV. The black boxes show the deleted regions of each mutant. The 5' and 3' termini of the deleted region of the LDRs are indicated by the number of the terminal residues.

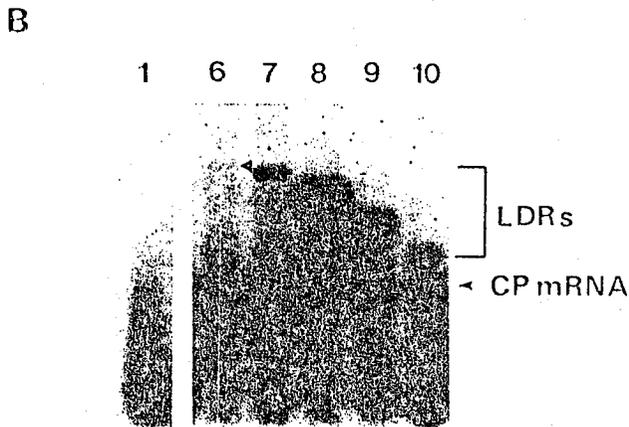
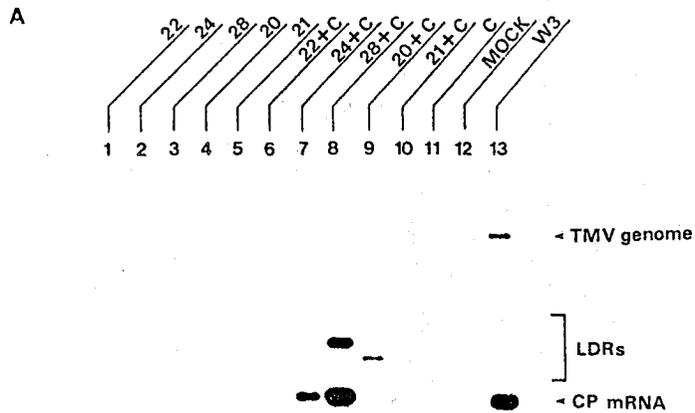


Fig. 11. Northern blot analysis of total RNAs from protoplasts inoculated with mutant or wild-type TMV transcripts using a CP gene-specific probe. Total RNAs were extracted from protoplasts inoculated with LDR22 (lane 1), LDR24 (lane 2), LDR28 (lane 3), LDR20 (lane 4), LDR21 (lane 5), LDCS29 (lane 11), and LFW3 (lane 13), or co-inoculated with LDR22 and LDCS29 (lane 6), LDR24 and LDCS29 (lane 7), LDR28 and LDCS29 (lane 8), LDR20 and LDCS29 (lane 9), and LDR21 and LDCS29 (lane 10), respectively. Lane 12 is RNA from mock-inoculated protoplasts. Lanes 1-12 contain RNA from  $7.5 \times 10^5$  protoplasts and lane 13 contains RNA from 75 protoplasts. (A) Autoradiographed for 3 days at  $-80^\circ$  with an intensifying screen. The blot containing lanes 1 and lanes 6-10 of (A) was further autoradiographed for 3 days at  $-80^\circ$  with intensify screen (B). The open triangle in (B) shows the mobility of LDR22.

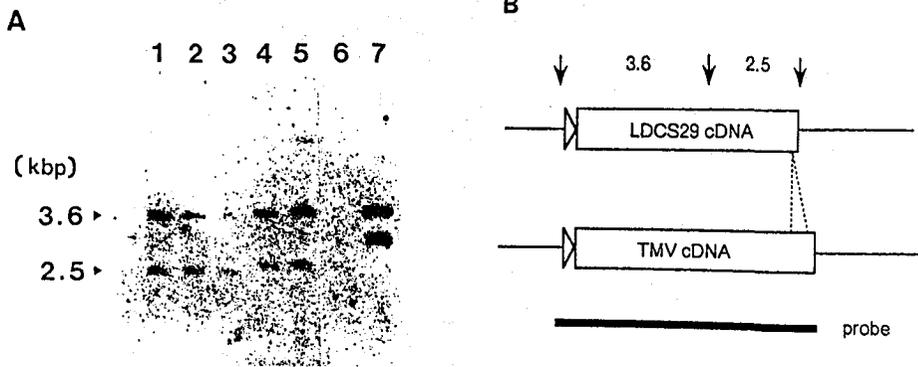


Fig. 12. Southern blot analysis of the total DNA from transgenic plants. (A) Lanes 1-5, five independent pOKLDCS29-transgenic tobacco lines; lane 6, normal tobacco; lane 7, pOKL4/BamHI as the copy number standard (5 copies/haploid).

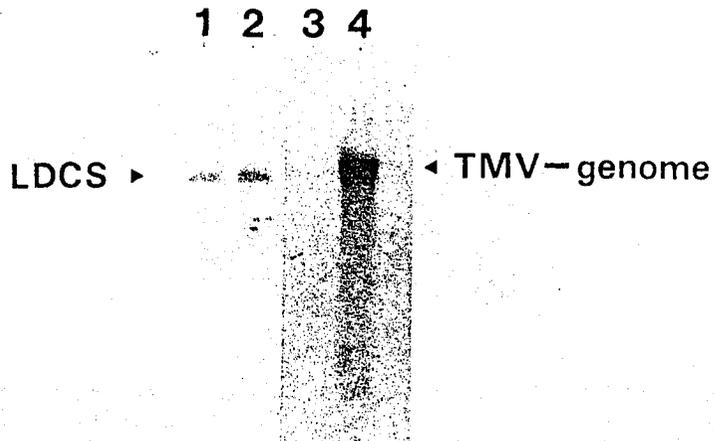


Fig. 13. Northern blot analysis of the total RNA from transgenic plants. Lanes 1 and 2, independent pOKLDCS29-transgenic tobacco lines which corresponds to the lanes 1 and 2 of Southern analysis; lane 3, normal tobacco; lane 4, pOKL4-transgenic tobacco. LDCS indicates the expected size of LDCS29-RNA.

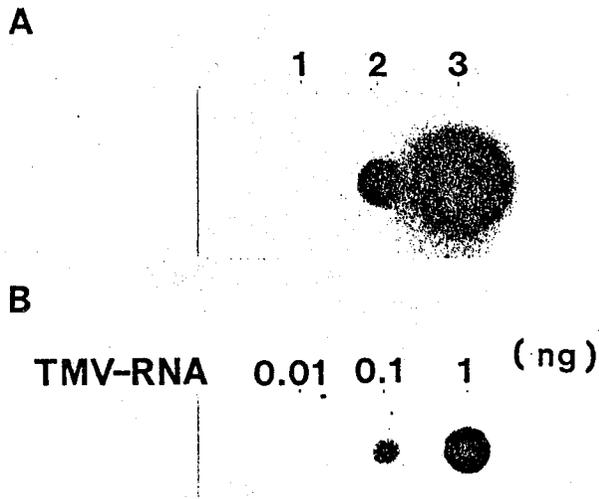


Fig. 14. Dot blot analysis of (A) the total RNA from transgenic tobacco and (B) TMV-RNA. (A) Lane 1, normal tobacco; lane 2, pOKLDCS29-transgenic tobacco which corresponds to the lane 1 of Southern and Northern analyses; lane 3, pOKL4-transgenic tobacco. (B) 0.01, 0.1 and 1 ng of TMV-RNA, respectively. (A) and (B) are hybridized at the same time.

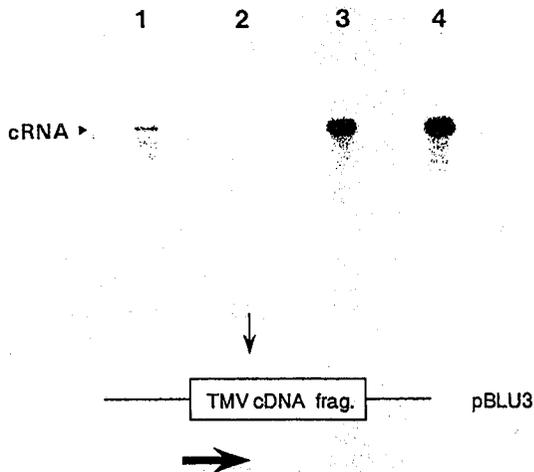


Fig. 15. RNase protection assay of the total RNA from transgenic tobacco probed with  $^{32}\text{P}$ -labeled plus-strand TMV-RNA (thick arrow). Lane 1, pOKLDCS29-transgenic tobacco; lane 2, normal tobacco; lane 3, normal tobacco without the RNase treatment; lane 4, probe. The cRNA shows the expected size of minus-strand LDCS29-RNA. The thin arrow shows the ScaI site in the TMV cDNA HindIII fragment on pBLU3.

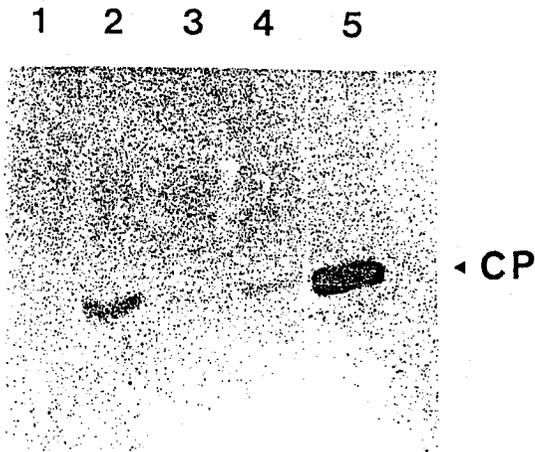


Fig. 16. Western blot analysis of total protein extracted from protoplasts inoculated with LDR mutants using anti-TMV antiserum. Total proteins were extracted from pOKLDCS29-transgenic tobacco leaves. Total proteins were extracted from protoplasts inoculated with LDR22 (lane 2), LDR21 (lane 3), LDR24 (lane 4), and LFW3 (lane 5). Lane 1 is the protein from mock-inoculated protoplasts.

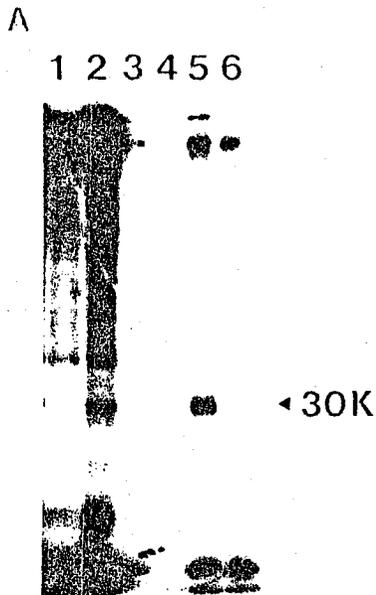


Fig. 17. Detection of the *in vivo* phosphorylation of the 30K protein. Mock-inoculated (lanes 1, 3 and 4) and TMV-infected (lanes 2, 5 and 6) protoplasts were  $^{32}\text{P}$ -labelled *in vivo*. Lanes 1 and 2 were analyzed directly. Lanes 3 and 5, and lanes 4 and 6 were analyzed after immunoprecipitation by anti-30K protein antiserum and normal serum. 30K indicates the mobility of the 30K protein detected by Western blot analysis.

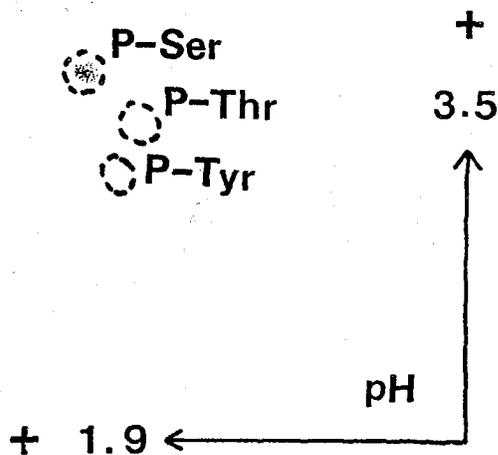


Fig. 18. Detection of the  $^{32}\text{P}$ -labelled amino acid of 30K protein by two dimensional electrophoresis at pH 1.9 and pH 3.5. Open circles represent the mobilities of the standard phosphorylated amino acids visualized by ninhydrin staining.

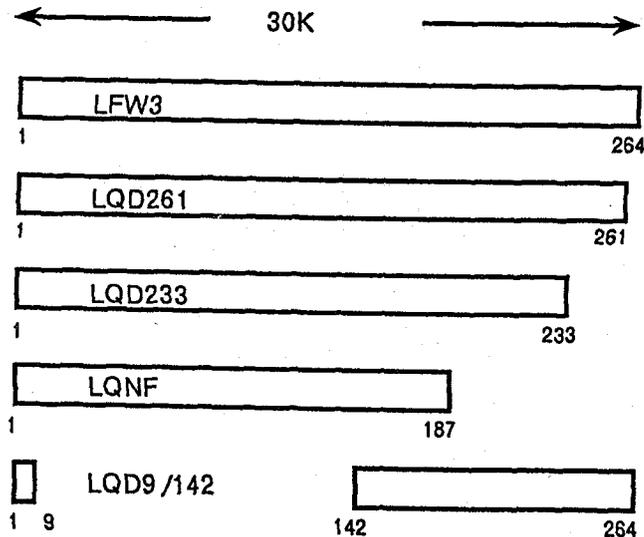


Fig. 19. Schematic representation of truncated 30K proteins and wild-type 30K protein. The numbers indicate the positions of N- and C-terminal amino acids.

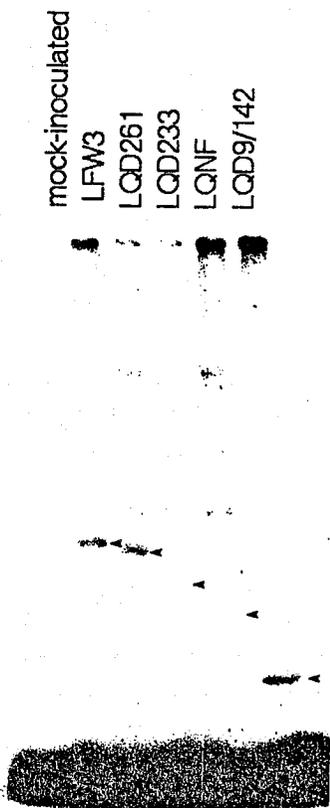


Fig. 20. Immunodetection of the truncated 30K protein by anti-30K protein antiserum. Arrowhead indicate the mobility of each protein.

## 参考文献

- 1) Goelet, P., Lomonosoff, G.P., Bulter, P.J.G., Akam, M.E., Gait, M.J., and Karn, J.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 5818 (1982).
- 2) Ohno, T., Aoyagi, M., Yamanashi, Y., Saito, H., Ikawa, S., Meshi, T., and Okada, Y.; J. Biochem. 96, 1915 (1984).
- 3) Ishikawa, M., Meshi, T., Motoyoshi, F., Semba, K., and Okada, Y.; Nucl. Acid Res. 14, 8291 (1986).
- 4) Meshi, T., Watanabe, Y., Saito, T., Sugimoto, A., Maeda, T., and Okada, Y.; EMBO J. 6, 2557 (1987).
- 5) Deom, C.M., Oliver, M.J., and Beachy, R.N.; Science 237, 389 (1987).
- 6) Saito, T., Yamanaka, K., and Okada, Y.; Virology 176, 329 (1990).
- 7) Kamer, G., and Argos, P.; Nucl. Acid Res. 12, 7269 (1984).
- 8) Meshi, T., Ishikawa, M., Motoyoshi, F., Semba, K., and Okada, Y.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 5043 (1986).
- 9) Takamatsu, N., Watanabe, Y., Meshi, T., and Okada, Y.; J. Virol. 64, 3686 (1991).
- 10) Takamatsu, N., Watanabe, Y., Iwasaki, T., Shiba, T., Meshi, T., and Okada, Y.; J. Virol. 65, 1619 (1991).
- 11) Yamaya, J., Yoshioka, M., Meshi, T., Okada, Y., and Ohno, T.; Mol. Gen. Genet. 211, 520 (1988).
- 12) Tomenius, K., Clapham, D., and Meshi, T.; Virology 176, 329 (1990).
- 13) Wolf, S., Doem, C.M., Beachy, R.N., and Lucas, W.J.; Science 246, 377 (1989).
- 14) Meshi, T., Hosokawa, D., Kawagishi, M., Watanabe, Y., and Okada, Y.; Virology 187, 809 (1992).
- 15) Atabekov, J.G., and Taliensky, M.E.; Adv. Virus Res. 38, 201 (1990).

## 論文審査の要旨

タバコモザイクウイルス (TMV) の一本鎖 RNA ゲノムは 3 つの非構造タンパク質と構造タンパク質であるコートタンパク質をコードしている。3 つの非構造タンパク質は、大きさによって 130K タンパク質, 180K タンパク質, および 30K タンパク質と呼ばれている。それぞれのタンパク質の基本的な機能が最近分子レベルで解明されてきたが、まだ詳細な機能に関しては不明な点も多い。本論文は非分節ゲノム型ウイルスである TMV の複製酵素が、分節ゲノム型ウイルスの複製酵素のようにゲノム RNA の複製に対してトランスに機能すること、複製酵素をコードしているゲノム RNA 領域内にゲノム RNA の複製に関してシスに働く領域が存在すること、形質転換植物中で発現した複製酵素が機能すること、30K タンパク質は修飾されている等について明らかにしたものである。

第一に、TMV の RNA を、複製酵素を合成する RNA (複製酵素供与変異体) と合成しない RNA (複製酵素供与変異体) の 2 本に人工的に分割し分節ゲノム型とし、複製酵素供与変異体から産生された複製酵素が、複製酵素欠損変異体に対しトランスに機能しうるか否かを調べた結果、TMV の複製酵素も分節型ウイルスの複製酵素と同様に、ゲノム RNA の複製に関してトランスに機能することを明らかにした。またこの複製酵素をトランスに機能させる系によって複製された変異体ゲノム RNA がウイルス粒子を形成していることを明らかにした。

第二に、第一で述べた方法を用いると、複製酵素をトランスに働かせる事によって複製酵素をコードしている領域を欠損させてもゲノム RNA が複製される系ができる。そこで複製酵素をコードする領域に様々な大きさの欠損を導入したプラスミドを作成し、それから *in vitro* で合成した RNA を複製酵素供与変異体 RNA と同時にタバコプロトプラストに導入して、各変異体 RNA の複製様式を解析した。その結果 180K タンパク質遺伝子の 3' 側 1/3 の領域に複製に関して負に働く領域が存在することが明らかにした。

第三に、形質転換植物中で発現された TMV の複製酵素が複製酵素が複製能を持つかどうかを調べるために、複製酵素を産生する複製酵素供与変異体に対する cDNA をタバコに導入した結果、複製酵素が複製に関して機能することを明らかにした。

第四に、ウイルスの細胞間転移に関係する 30K タンパク質について、細胞内でリン酸化されていることを見だし、リン酸化されているアミノ酸はセリンであることを明らかにした。

以上のように、本論文は主として TMV の複製酵素について、いままで不明であった幾つかの機能を明らかにしたもので、これらの知見は植物ウイルス学に新知見を加えるものと思われ、審査員一同は博士 (農学) を授与するに値するものと判定した。