

| | |
|---------|------------------------------|
| 氏名(本籍) | はまもとひろし 濱本宏 (石川県) |
| 学位の種類 | 博士(農学) |
| 学位記番号 | 博乙第1,383号 |
| 学位授与年月日 | 平成10年3月23日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第2項該当 |
| 審査研究科 | 農学研究科 |
| 学位論文題目 | タバコモザイクウイルス複製酵素のアミノ酸変異と宿主特異性 |
| 主査 | 筑波大学教授 農学博士 柿 真 |
| 副査 | 筑波大学教授 農学博士 正野俊夫 |
| 副査 | 筑波大学教授 農学博士 高柳謙治 |
| 副査 | 筑波大学教授 理学博士 鎌田 博 |
| 副査 | 東京大学教授 農学博士 日比忠明 |

論文の内容の要旨

タバコモザイクウイルストマト系 (TMV-L) は (+) 鎖一本鎖 RNA をゲノムとして持つ棒状単粒子の植物ウイルスである。TMV を含むトバモウイルスグループのウイルスは、タバコ、トマト、トウガラシといったナス科植物を中心に幅広い宿主域を持ち、世界的に農作物に大きな被害を与えているウイルスの一つである。TMV を含む植物ウイルスの防除の有効な手段は、抵抗性品種の育種であるが、抵抗性を打破する変異株の出現が問題となっている。このため、ウイルスがどのように宿主の持つ抵抗性を打破するかを解明することは、植物病理学や育種学上重要な課題である。

TMV-L のゲノムには、130 K/180 K タンパク質、30 K タンパク質、コートタンパク質の4つのタンパク質をコードする遺伝子が存在し、そのうち130 K/180 K タンパク質はウイルスの複製と関係している。トマトの持つ TMV 抵抗性遺伝子 Tm-1 は植物細胞中でのウイルス複製を阻害する遺伝子であるが、この Tm-1 抵抗性は、130 K/180 K タンパク質の979番目のアミノ酸 (AA 979) の変異 (Gln 979→Glu) によって打破されることが知られていた。この Tm-1 抵抗性打破の機構として、Tm-1 遺伝子産物と130 K/180 K タンパク質は静電的な力によって相互作用しているが、Glu の持つ負電荷によってこの相互作用がくずれ、抵抗性が打破されるとする考えが提唱されていた。

本研究では、AA979の変異と Tm-1 抵抗性の打破との関係をさらに詳細に調べることを目的とし、電荷に着目して AA 979 を、負電荷を持つ Asp、電氣的に中性な Asn, Ile、正電荷を持つ His, Lys, Arg に変換した TMV-RNA (TLAsp, TLAsn, TLIle, TLHis, TLLys, TLArg) を部位特異的な変異導入によって作成し、これら変異体について、エレクトロポレーション実験によって Tm-1 抵抗性の打破を調べた。その結果、TLIle, TLHis は抵抗性を打破しないが、TLAsp のみならず TLLys も抵抗性を打破すること、また、TLAdn, TLArg も低いレベルではあるが抵抗性を打破することが判明した。このように AA 979 が正電荷を持つ場合にも Tm-1 抵抗性が打破されたことより、Tm-1 遺伝子産物と130 K/180 K タンパク質の相互作用は、従来の仮説のように単純に静電的な力のみによっては説明できないことが明らかとなった。

また上記の結果より、TLIle はタバコ細胞中では野生型ウイルスと同様に複製するが、トマト細胞中では Tm-1 の有無に関わらず複製が認められないという、極めて特殊な挙動を示すことが判明した。そこで、TLIle

を Tm-1 を持たない トマト 植物 個体 に 感染 させる 実験 を 行っ た ところ、 野生 型 ウィルス と 比べ る と 遅い が、 ウィルスの 増殖 が 認め られた。 この トマト 植物 個体 中 で 増殖 し た TLIIe の 子孫 ウィルスの AA 979 付近 の 塩基 配列 を 調べ る と、 AA 979 の コドン に AUU (Ile) から AAU (Asn) あ る い は UUU (Phe) の よう な 二 次 的 な 変異 が 起 こ っ て い る こ と が 判 明 し た。 これ ら の 結 果 か ら、 TMV-L は 130 K/180 K タンパ ク 質 の 1 アミ ノ 酸 の 変異 に よ っ て、 宿主 特異 性 が ウィルスの 複製 レベル で 容易 に 変 化 す る こ と が 明 ら か と な っ た。

さら に、 本 研究 で 得 ら れ た 成 果 よ り、 AA 979 ウィルスの 130 K/180 K タンパ ク 質 が 宿主 因子 と 相 互 作 用 し、 複 合体 を 形 成 す る 際 に 重 要 な 役 割 を 果 し て い る の で は な い か と 考 え ら れ た。 この 複 合体 が 形 成 さ れ な い と ウィルス は 複製 し な い が、 AA 979 の 変異 は 宿主 因子 と の 複 合体 形 成 能 を 変 化 さ せ、 宿主 特異 性 を 変 え る も の と 考 え ら れ た。 ま た、 Tm-1 は 変異 を 持 っ た 宿主 因子 遺 伝 子 で あ る 可 能 性 が あ る と 考 え ら れ た。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本 論 文 は、 タバコ モザイ ク ウィルス (TMV) の 宿主 抵抗 性 打 破 機 構 の 解 明 を 目 的 と し て 研究 を 行 っ た も の で あ る。 これ ま で の 研究 か ら、 トマト の 持 つ TMV 抵抗 性 遺 伝 子 Tm-1 は ウィルス に コー ド さ れ る 複製 酵 素 130 K/180 K タンパ ク 質 の 979 番 目 の アミ ノ 酸 (AA 979) が Gln から Glu へ と 変異 す る こ と に よ っ て 打 破 さ れ る こ と が 知 ら れ て お り、 Glu の 持 つ 負 電 荷 が Tm-1 抵抗 性 打 破 に 大 き な 役 割 を 果 し て い る の で は な い か と 推 察 さ れ て い た。

そ こ で、 本 研究 で は、 抵抗 性 打 破 の メカニ ズ ム を さ ら に 詳 細 に 調 べ る た め、 AA 979 を Asp, Asn, Ile, His, Lys, Arg に 変 換 し た TMV 変異 体 (TLAsp, TLAsn, TLIIe, TLHis, TLLys, TLArg) を 遺 伝 子 操 作 に よ り 作 成 し た。 そ し て、 これ ら の 変異 体 を 用 い て、 トマト 培 養 細胞 に 直 接 感染 さ せ る と と も に、 植物 個 体 に も 接 種 実験 を 行 い、 ウィルスの 複製 の 有 無 に よ り、 Tm-1 抵抗 性 遺 伝 子 の 打 破 を 調 べ た。 そ の 結 果、 AA 979 が 負 の 電 荷 を 持 つ 場 合 の み で は な く 正 の 電 荷 を 持 つ 場 合 に も ウィルスの 複製 が 認め ら れ、 抵抗 性 が 打 破 さ れ る こ と を 明 ら か に し た。 この こ と は、 抵抗 性 の 打 破 は、 AA 979 の 電 荷 に よ っ て で は な く、 アミ ノ 酸 の 変異 そ の も の が 関 係 し て い る こ と を 明 確 に 示 し た も の で あ り、 大 変 高 く 評 価 さ れ る。

ま た、 AA 979 を Ile に 変 換 し た TMV 変異 体 (TLIIe) を 用 い た 接 種 実験 と、 増殖 し た ウィルスの 塩基 配列 の 解 析 結 果 か ら、 TLIIe は トマト 植物 個 体 内 で アミ ノ 酸 の 二 次 的 な 変異 を 起 こ す こ と に よ り、 そ の 複製 機 能 を 回 復 す る こ と が 可 能 な こ と を 明 ら か に し た。 この こ と は、 1 つ の アミ ノ 酸 の 変異 に よ っ て ウィルスの 宿主 特異 性 が 複 数 レベル で 容易 に 変 化 し 得 る こ と を 示 し た 初 め て の 報 告 で あ り、 大 変 注 目 さ れ る。

以 上 の よ う に、 本 研究 は、 ウィルス タンパ ク 質 の 1 つ の アミ ノ 酸 が 変異 す る こ と に よ り、 宿主 の 抵抗 性 が 打 破 さ れ る こ と を 明 確 に 示 す と と も に、 ま た、 1 つ の アミ ノ 酸 の 変異 が ウィルスの 宿主 特異 性 ま で を 変 化 さ せ て し ま う こ と を 明 ら か に し た も の で あ り、 ウィルス と 宿主 の 相 互 作 用 の 解 明 に 重 要 な 知 見 を も た ら す ば か り で は な く、 ウィルスの 抵抗 性 品 種 の 育 成 や そ の 防 除 に と っ て も 大 き な 示 唆 を 与 え る 研究 で あ る と 判 断 さ れ る。

よ っ て、 著 者 は 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 る。