

学位論文題名

タバコモザイクウイルスの増殖が抑制される

シロイヌナズナ *tom2-1* 変異株の研究

- *TOM2A*, *TOM2B* 遺伝子の同定を通して -

学位論文内容の要旨

ウイルスは作物や動物にとってきわめて重要な病原体となる一方、生命現象を解析するモデルとして格好の材料である。ウイルスの増殖過程において宿主因子はウイルス側の因子と協調して重要な役割を担うと考えられている。しかし、ウイルスの増殖に関与する宿主因子の同定例は少なく、同定された因子に関してもウイルス増殖への関与についての情報はまだ不十分である。

我々の研究室では、シロイヌナズナを用いた遺伝学的アプローチにより、ウイルスとしての性格付けが進んでいるプラス鎖 RNA ウイルス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の同定が試みられてきた。TMV はシロイヌナズナ (Col-0) に全身感染することから、シロイヌナズナは TMV の増殖に必要な宿主因子を全て持っていると考えられる。

速中性子線を変異源とし、タバコモザイクウイルス (TMV) の増殖効率が低下する YS241 変異株が単離された。遺伝解析により YS241 変異株の形質は核ゲノム上の劣性 1 因子によって支配されていることが明らかとなり、*tom2-1* (*tobamovirus multiplication 2-1*) 変異と名付けられた。*tom2-1* 変異は細胞内で TMV RNA の増殖を抑制する。また、TMV とは分類学上異なるウイルス群に分類されるウイルス (カブクリンクルウイルス、キュウリモザイクウイルスおよびカブ黄斑モザイクウイルス) の増殖には *tom2-1* 変異は顕著な影響を与えなかった。一方、TMV-Cg と近縁な TMV-L については、YS241 変異株 (M3 世代) を戻し交雑した変異株の中に、増殖が抑えられるもの (B1-113 株) と抑えられないもの (B1-234 株) が混在することが明らかになった。このことから、もともとの YS241 変異株 (M3 世代) には *tom2-1* 変異に加えて TMV-L の増殖に影響を与えるモディファイアーが存在していたことが示唆された。遺伝解析により、TMV-L の増殖に影響を与えるモディファイアーが優性 1 因子によって支配され、TMV-Cg の増殖にも影響を与えることが明らかとなった。このモディファイアーは *ttm1* (*tom two modifier 1*)

と名付けられた。 *ttm1* 変異をもたない *tom2-1* 変異株である B1-113 株では TMV-L および TMV-Cg の増殖が抑制されるが、 *ttm1* 変異を持つ *tom2-1* 変異株である B1-234 株では TMV-L の増殖は野生型株と同様で、 TMV-Cg の増殖は B1-113 株と野生型株の間であった。 速中性子線は DNA の欠失・逆位・転座による変異を誘発すると報告されていることから、 原因遺伝子の単離にあたり、 クロモソームウォーキングと PCR を利用したゲノミックサブトラクション法である Representational difference analysis (RDA) を併用した。 RDA により、 野生型株には存在するが B1-113 株には存在しない DNA 断片 (RDA フラグメント) が増幅し、 B1-113 株の染色体が欠失を起こしていることが示唆された。 そこでサザン解析により欠失領域を調べたところ、 欠失は約 20 kbp に及ぶことが明らかとなった。 さらに B1-234 株ではそのうちの約 18 kbp の領域が転座していることが明らかとなった。 欠失領域を含む領域を互いにオーバーラップするクローン化 DNA 断片でカバーし、 それらを B1-113 株に導入し、 TMV の増殖低下形質を相補する領域の同定をおこなった。 その結果、 B1-113 株において TMV の増殖を野生型レベルに回復させる領域および B1-234 株レベルに回復させる領域をそれぞれ得た。 これらの断片上には各一つずつの転写単位が存在し、 それぞれを *TOM2A*, *TOM2B* と名付けた。 B1-234 株では *TOM2A* 遺伝子は欠損しており、 *TOM2B* 遺伝子は転座していた。 B1-113 株では *TOM2A*, *TOM2B* 両遺伝子が欠損していた。 つまり、 *TOM2A*, *TOM2B* 遺伝子の同時欠損により TMV 増殖抑制形質が強くなるということが明らかになった。 *TOM2A* 遺伝子は 281 アミノ酸からなる 4 回膜貫通型タンパク質と予想される産物を、 また、 *TOM2B* 遺伝子は 122 アミノ酸からなる小さな塩基性タンパク質をコードしていた。 本研究ではさらに 3 種類の *TOM2A* ホモログをシロイヌナズナから単離した。 *TOM2A* 遺伝子および *TOM2B* 遺伝子の TMV 増殖における機能および本来の植物体におけるの機能は現在のところ不明であるが、 *TOM2A* 遺伝子の TMV 増殖における機能についてはそれを示唆するいくつかの結果を総合し考察した。

# 学位論文審査の要旨

主 査 助 教 授 石 川 雅 之  
副 査 教 授 内 藤 哲  
副 査 教 授 伴 戸 久 徳

学 位 論 文 題 名

タバコモザイクウイルスの増殖が抑制される

シロイヌナズナ *tom2-1* 変異株の研究

- *TOM2A*, *TOM2B* 遺伝子の同定を通して -

ウイルスゲノムの複製は、ウイルスにコードされた因子とともに多くの宿主因子に依存する。しかし、ウイルス増殖に関与する宿主因子に関する知見は未だ少なく、その増殖機構を理解する上で大きな障害となっている。本研究では、シロイヌナズナを用いた遺伝学的アプローチにより、タバコモザイクウイルス (TMV) の増殖に関与する宿主因子の同定を行った。まず、速中性子線を変異源とし、TMV の増殖効率が低下する YS241 変異株が単離された。遺伝解析により YS241 変異株の形質は核ゲノム上の劣性 1 因子によって支配されていることが明らかとなり、*tom2-1* (*tobamovirus multiplication 2-1*) 変異と名付けられた。*tom2-1* 変異は細胞内で TMV RNA の増殖を抑制した。詳細な遺伝解析により YS241 変異株には *tom2-1* 変異に加えて TMV の増殖を正に制御するモディファイアー *ttm1* が存在することも示唆された。本研究では、これらの変異の原因遺伝子の同定が行われた。本論文の内容は以下のように要約される。

1、YS241 株における染色体転座：速中性子線は DNA の欠失・逆位・転座による変異を誘発すると報告されていることから、クロモソームウォーキングと PCR を利用したゲノミックサブトラクション法である Representational

difference analysis (RDA) を併用した解析を行った。RDA により、野生型株には存在するが *tom2-1* 株には存在しない DNA 断片 (RDA フラグメント) が増幅し、*tom2-1* 株の染色体が欠失を起こしていることが示唆された。そこでサザン解析により欠失領域を調べたところ、欠失は RDA フラグメントを含む約 20 kbp の領域に及ぶことが明らかとなった。さらに *tom2-1 ttm1* 株ではそのうちの約 18 kbp の領域が転座していることが明らかとなった。

**2、TMV の増殖に関与する遺伝子の同定：**欠失領域を含む領域を互いにオーバーラップするクローン化 DNA 断片でカバーし、それらを *tom2-1* 株に導入し、TMV の増殖低下形質を相補する領域の同定をおこなった。その結果、*tom2-1* 株において TMV の増殖を野生型レベルに回復させる領域および *tom2-1 ttm1* 株レベルに回復させる領域をそれぞれ得た。これらの領域には各一つずつの転写単位が存在し、それぞれを *TOM2A*, *TOM2B* と名付けた。*tom2-1 ttm1* 株では *TOM2A* 遺伝子は欠損しており、*TOM2B* 遺伝子は転座していた。*tom2-1* 株では *TOM2A*, *TOM2B* 両遺伝子が欠損していた。つまり、*TOM2A*, *TOM2B* 遺伝子の同時欠損により TMV 増殖抑制形質が強くなるということが明らかになった。*TOM2A* 遺伝子は 281 アミノ酸からなる 4 回膜貫通型タンパク質と予想される産物を、また、*TOM2B* 遺伝子は 122 アミノ酸からなる小さな塩基性タンパク質をコードしていた。

以上、本論文により当該変異株のゲノムに起きた事象の大部分が解明され、2つの新規宿主遺伝子が TMV の増殖に関与することが示された。これは、TMV の複製機構を解明する上で重要であると同時に、TMV 増殖の人為的コントロールの基礎となりうる重要な発見である。また、放射線による変異に関する新規な知見も得られた。よって審査員一同は、辻本弥生が博士 (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。