

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2001-29080  
(P2001-29080A)

(43) 公開日 平成13年2月6日 (2001.2.6)

| (51) Int.Cl. <sup>7</sup> | 識別記号  | F I            | テ-マコード* (参考)      |
|---------------------------|-------|----------------|-------------------|
| C 1 2 N 15/09             | Z N A | C 1 2 N 15/00  | Z N A A 2 B 0 3 0 |
| A 0 1 H 5/00              |       | A 0 1 H 5/00   | A 4 B 0 2 4       |
| C 0 7 K 14/415            |       | C 0 7 K 14/415 | 4 B 0 6 5         |
| C 1 2 N 5/10              |       | C 1 2 N 5/00   | C 4 H 0 4 5       |

審査請求 有 請求項の数 3 O L (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願平11-207753

(22) 出願日 平成11年7月22日 (1999.7.22)

(71) 出願人 391012442

京都大学長

京都府京都市左京区吉田本町36の1番地

(72) 発明者 古澤 巖

京都府京都市左京区高野東開町1-23 東  
大路高野第三住宅36-303

(72) 発明者 冲中 泰

京都府京都市左京区一乗寺野田町12

(72) 発明者 三瀬 和之

京都府京都市左京区北白川東瀬の内町50-  
1

(74) 代理人 100059258

弁理士 杉村 暁秀 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 植物ウイルスの感染に関与する宿主遺伝子及びポリペプチド

(57) 【要約】

【課題】 ウイルスによる植物の病害を防止するための、遺伝子工学的な手法による新たな技術を開発する。

【解決手段】 本発明により、新規遺伝子 H c p 1 及び当該遺伝子がコードするポリペプチドである H C P 1 が与えられた。H c p 1 はオオムギ由来の遺伝子であり、プロモモザイクウイルスの外被蛋白質との結合活性を有し、ウイルスの増殖に不可欠な蛋白質をコードするため、当該遺伝子の改変により、ウイルス耐性を付与した形質転換植物の作成が可能である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)または(b)に示すアミノ酸配列からなることを特徴とする、ポリペプチド。

(a) 配列表の配列番号1に示す、アミノ酸番号1-352で示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする、ポリペプチド。

(b) (a)の一部が欠損、置換若しくは付加され、ブロムモザイクウイルス外被蛋白質との結合活性を有する、ポリペプチド。

【請求項2】 請求項1記載のポリペプチドをコードする、遺伝子。

【請求項3】 請求項1記載のポリペプチドをコードして、以下の(c)または(d)に示す塩基配列からなることを特徴とする、遺伝子。

(c) 配列表の配列番号2に示す、塩基番号1-1360で示される塩基配列からなることを特徴とする、遺伝子。

(d) (c)の一部が欠損、置換若しくは付加された、遺伝子。

【請求項4】 請求項2ないし3のいずれか一つの請求項記載の遺伝子を植物に導入することにより、植物に抗ウイルス耐性を付与した、形質転換植物。

【請求項5】 請求項2ないし3のいずれか一つの請求項記載の遺伝子を導入する事により、植物に抗ウイルス耐性を付与する方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、植物ウイルスの感染に関与するオオムギ由来の宿主遺伝子であるHcp1遺伝子、及び当該遺伝子がコードするHCP1ポリペプチドに関する。

## 【0002】

【従来の技術】各種のウイルスによる植物の病害は、現在の農業における大きな問題である。ウイルスによる被害を防止する方法として、ウイルスを仲介する昆虫の駆除が主として用いられているが、直接的な方法ではない。そのため、遺伝子工学的な手法を用いて、ウイルスによる植物の病害をより効率的に防止する技術について、種々の研究がなされてきた。例えば、ウイルスゲノムの一部を植物で発現させ、植物にウイルス耐性を付与する方法が、実用化しつつある。しかし、この方法の場合、ウイルスの遺伝子を利用しているため、生体内での遺伝子組み換えにより、抵抗性を打ち破る新規ウイルスの出現が危惧される事が問題となっていた。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】ところで、ウイルスが宿主植物に感染するためには、ウイルス因子だけでなく宿主側の因子の存在が必要不可欠ではないか、という可能性が指摘されてきた。本発明者らはそのような知見に注目し、宿主遺伝子の改変によりウイルスに耐性を付与

する可能性を検討した。これまでの抗ウイルス戦略は、ウイルス側の遺伝子によるが、本発明の方法は宿主遺伝子の操作によるため、上に述べた問題を根本的に解決するものである。植物へのウイルスの感染に関与する宿主因子の存在を示唆する実験データが報告されてはいるが、実際にそれらが単離同定された例はほとんどないのが現状である。わずかに、シロイヌナズナ由来のウイルス増殖因子が報告されているのみであり(特願平10-301810)、シロイヌナズナ以外の植物体においても、ウイルスの増殖に関与する宿主因子の同定される事が求められていた。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】そこで、本発明者らは、ブロムモザイクウイルス外被タンパク質(Bromemosaic virus coat protein: BCP)と相互作用する植物因子に注目した。ブロムモザイクウイルス(BMV)は比較的研究の進んだプラス鎖RNAウイルスであり、オオムギ、コムギ、トウモロコシ等の单子葉植物が主な宿主である。外被タンパク質(CP)は数々のプラス鎖RNAウイルスゲノムにコードされている因子の一つであり、様々な機能を持つことが知られている。例えば、(1)RNAゲノムを分解から保護する役割、(2)病徴の発現をコントロールする役割、(3)ウイルスの細胞間移行を促す役割、そして(4)師管を介したウイルスの全身移行を促す役割を担っていることが知られている。また、CPはウイルス感染した植物において最も大量に存在するタンパク質の一つである。植物がそのような外来タンパク質の大量蓄積を許容することは他に例が無く、この点も特筆すべきCPの性質の一つである。

【0005】宿主側の植物材料としては、重要な作物であるオオムギを用いて解析を行った。即ち、BCPとの相互作用を指標として、オオムギの相補的DNA(cDNA)ライブラリーのスクリーニングを、酵母のツーハイブリッドシステムを用いて行なった。その結果、BCPとの結合能を有する蛋白質をコードするオオムギcDNAクローンを取得することに成功し、得られたクローンより全長のcDNA(Hcp1)を得た。そのようにして単離されたHcp1の塩基配列(1360塩基対)、及び当該遺伝子の翻訳産物であるHCP1のアミノ酸配列(352アミノ酸)を決定した。

【0006】また、インビトロにおける結合アッセイを行ったところ、HCP1とBCPとの直接的な結合が確認された。更に、BCPのC末端付近にアミノ酸変異を導入する事により、HCP1との結合能を失ったBCP変異体を作成した。BCPとHCP1が相互作用する能力と、ウイルス感染性の相関性を検討したところ、両者の相関性が確認され、オオムギのブロムモザイクウイルス感染にHCP1が関与している事が示された。

## 【0007】

【発明の実施の形態】本発明のHcp1遺伝子のcDNAは配列表の配列番号2に記載した塩基配列により特定される。またHcp1遺伝子がコードするポリペプチドであるHCP1は、配列表の配列番号1に記載したアミノ酸配列により特定される。上述したように、Hcp1はオオムギ由来の遺伝子であり、HCP1ポリペプチドはプロモモザイクウイルス外被蛋白質との結合活性を有する。そのため、本発明の遺伝子の発現を制御したり、改変する事により、植物にウイルス抵抗性を付与することが可能であり、そのような目的に本発明の遺伝子を利用する事ができる。例えば、Hcp1遺伝子のアンチセンスRNAを利用したり、導入したHcp1によるコサプレッションを利用することにより、オオムギ本来のHcp1遺伝子の発現を制御する方法がある。又はBCPとの結合能を欠いた蛋白質をコードするHcp1遺伝子を導入する事により発現するドミナントネガティブ効果を利用する事で、植物にウイルス抵抗性を付与することが可能である。

【0008】多くのアミノ酸については、それをコードするDNAの塩基配列は複数存在する。本発明で明らかにされたHCP1のアミノ酸配列をコードする遺伝子の場合にも、そのDNAの塩基配列として、天然の遺伝子の塩基配列以外にも、多数の塩基配列が存在する可能性がある。しかし、本発明の遺伝子は、天然のDNA塩基配列のみに限定されるものではなく、本発明により明らかにされたHCP1のアミノ酸配列をコードする、他のDNA塩基配列を含むものである。

【0009】また、遺伝子組み換え技術によれば、基本となるDNAの特定の部位に、当該DNAがコードする蛋白質の基本的な特性を変化させることなく、あるいは

その特性を改善する様に、人為的に変異を起こすことができる。本発明により提供される天然の塩基配列を有する遺伝子、あるいは天然のものとは異なる塩基配列を有する遺伝子に関しても、同様に人為的に挿入、欠失、置換を行うことにより天然の遺伝子と同等のあるいは改善された特性を有するものとする事が可能であり、本発明はそのような変異遺伝子を含むものである。

【0010】また、本発明の遺伝子を植物に導入して形質転換を行う方法、及び形質転換した植物も本発明の範囲内である。本発明の遺伝子を導入する対象として適している植物の例として、オオムギのみならず、コムギ、トウモロコシ等の植物が挙げられる。本発明の遺伝子を導入する方法の例としては、本技術分野で通常用いられている種々の方法を用いる事が可能である。即ち、アグロバクテリウム法、プロトプラスト法、PEG法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法、マイクロインジェクション法等が挙げられる。以下の実施例により、本発明を更に詳細に説明するが、本発明は上述した例又は以下の実施例に限定されるものではなく、本発明の技術分野における通常の変更をする事ができる。

【0011】

【実施例】ツーハイブリッドシステムにおいて用いられた、種々の遺伝子を導入したプラスミドを表1に示す。更に、インピトロ転写系及び結合実験のためのグルタチオンS-トランスフェラーゼ融合蛋白質作成に用いたプラスミドを表2に示す。尚、置換したヌクレオチドを太文字で示す。

【0012】

【表1】

| プラスミド*                    | コードするホリホリ*<br>アミノ酸 | 置換した<br>ホリホリ*        | 欠損した<br>アミノ酸   | 置換した<br>アミノ酸 |
|---------------------------|--------------------|----------------------|----------------|--------------|
| pAS2-1                    | BD                 |                      |                |              |
| pACT2                     | AD                 |                      |                |              |
| Bait plasmids with BMV CP |                    |                      |                |              |
| pASBcp                    | BD/BCP (2-189)     |                      | 1              |              |
| pASBcpd (12-189)          | BD/BCP (12-189)    |                      | 1-11           |              |
| pASBcpd (77-189)          | BD/BCP (77-189)    |                      | 1-76           |              |
| pASBcpd (123-189)         | BD/BCP (123-189)   |                      | 1-122          |              |
| pASBcpd (138-189)         | BD/BCP (138-189)   |                      | 1-137          |              |
| pASBcpd (159-189)         | BD/BCP (159-189)   |                      | 1-158          |              |
| pASBcpd (2-177)           | BD/BCP (2-177)     |                      | 178-189        |              |
| pASBcpd (2-172)           | BD/BCP (2-172)     |                      | 173-189        |              |
| pASBcp (2-156)            | BD/BCP (2-156)     |                      | 157-189        |              |
| pASBcpd (138-185)         | BD/BCP (138-185)   |                      | 1-137, 186-189 |              |
| pASBcpd (138-177)         | BD/BCP (138-177)   |                      | 1-137, 178-189 |              |
| pASBcpd (138-172)         | BD/BCP (138-172)   |                      | 1-137, 173-189 |              |
| pASBcpdP178A              | BD/dP178A          | 5' GCT3' (1778-1780) | 1-137          | 178 (P)      |
| pASBcpdT179A              | BD/dT179A          | 5' GCG3' (1781-1783) | 1-137          | 179 (T)      |
| pASBcpdF180A              | BD/dF180A          | 5' GCC3' (1784-1786) | 1-137          | 180 (F)      |
| pASBcpdD181A              | BD/dD181A          | 5' GCT3' (1787-1789) | 1-137          | 181 (D)      |
| pASBcpdD182A              | BD/dD182A          | 5' GCC3' (1790-1792) | 1-137          | 182 (D)      |
| pASBcpdF183A              | BD/dF183A          | 5' GCC3' (1793-1795) | 1-137          | 183 (F)      |
| pASBcpdF184A              | BD/dF184A          | 5' GCC3' (1796-1798) | 1-137          | 184 (F)      |
| pASBcpdT185A              | BD/dT185A          | 5' GCC3' (1799-1801) | 1-137          | 185 (T)      |
| Prey plasmids with CMV CP |                    |                      |                |              |
| pACTCcp                   | AD/CCP (2-218)     |                      | 1              |              |

【0013】

【表2】

| プラスミド*                      | コードするホリホリ*<br>アミノ酸  | 置換した<br>ホリホリ*        | 欠損した<br>アミノ酸 | 置換した<br>アミノ酸 |
|-----------------------------|---------------------|----------------------|--------------|--------------|
| pB1TP3                      | BMV wt 1a           |                      |              |              |
| pB2TP5                      | BMV wt 2a           |                      |              |              |
| pB3TP8                      | BMV wt 3a and wt CP |                      |              |              |
| BMV CP mutant plasmids      |                     |                      |              |              |
| pB3P178A                    | BMVwt 3a and P178A  | 5' GCT3' (1778-1780) |              | 178 (P)      |
| pB3T179A                    | BMVwt 3a and T179A  | 5' GCG3' (1781-1783) |              | 179 (T)      |
| pB3F180A                    | BMVwt 3a and F180A  | 5' GCC3' (1784-1786) |              | 180 (F)      |
| pB3D181A                    | BMVwt 3a and D181A  | 5' GCT3' (1787-1789) |              | 181 (D)      |
| pB3D182A                    | BMVwt 3a and D182A  | 5' GCC3' (1790-1792) |              | 182 (D)      |
| pB3F183A                    | BMVwt 3a and F183A  | 5' GCC3' (1793-1795) |              | 183 (F)      |
| pB3F184A                    | BMVwt 3a and F184A  | 5' GCC3' (1796-1798) |              | 184 (F)      |
| pB3T185A                    | BMVwt 3a and T185A  | 5' GCC3' (1799-1801) |              | 185 (T)      |
| GST fusion protein plasmids |                     |                      |              |              |
| pGEX-2TK                    | GST                 |                      |              |              |
| pGEXdHcp1                   | GST/HCP1            |                      | 1-10         |              |

【0014】(全RNAの採取)オオムギを光時間16時間、温度25 °Cの条件下で生育させ、7日目の苗の葉組織より全RNAを採取した。そしてポリ(A)<sup>+</sup>RNAを、バイオマグオリゴ(dT)<sub>20</sub>(パーセプティブバイオシステム)を用いて単離した。スーパースク립トチョイスシステム(BRL)を用いて、cDNAを合成

し、プラスミドpACT2(クローンテック)のEcoRI部位へ挿入した。これを大腸菌DH5株に導入し、約2.4 × 10<sup>6</sup>個のコロニーを得た。

【0015】(ツーハイブリッドシステムによるスクリーニング)オオムギcDNAライブラリーのスクリーニングは、酵母ツーハイブリッドシステムのキットであ

る、マッチメーカー-ツーハイブリッドシステム2(クローンテック)を用いて行った。酵母ツーハイブリッドシステムでは、酵母の転写活性化因子であるGAL4には、DNA結合領域(DNA-binding domain: DNA-BD)と、転写活性化領域(transcriptional activation domain: AD)のような複数の領域が存在し、転写活性化の開始には両者の相互作用が必要であることを利用した方法である。まず標的蛋白質であるBCPのペプチド断片をコードするDNA断片を、GAL4のDNA-BDベクター(pAS2-1)中に組み込み、「ベイトプラスミド」を作成する。一方、オオムギのcDNAライブラリーをGAL4のADベクター(pACT2)中に組み込み、「ブレイプラスミド」を作成する。両プラスミドを酵母Y190株に導入して形質転換を行い、得られたコロニーにつき、ヒスチジン栄養要求性及び $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性により形質転換体のスクリーニングを行う。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を示すコロニーにおいてはGAL4による転写活性化が起こっており、pAS2-1に組み込まれた標的蛋白質と、pACT2に組み込まれたcDNAがコードする蛋白質の間に、何らかの物理的相互作用がある事を示している。

【0016】上述の表1に示されたプラスミドで形質転換した酵母Y190株を、30mMの3-アミノトリアゾールを含み、トリプトファン、ロイシン及びヒスチジンを含まないプレート上で培養した。10日以内に生じた大きなコロニーにつき、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性をアッセイ(マッチメーカー-ツーハイブリッドシステム2の添付マニュアルによる)し、ポジティブコロニーをスクリーニングした。ポジティブコロニーより全核酸を調製し、大腸菌DH5a株への形質転換を利用して、オ

オムギcDNAを含むブレイプラスミドを単離した。得られた4個のcDNAクローンを、5'及び3'末端の塩基配列により、3つの異なったグループに分類した(図1)。得られたcDNAグループの1つが、部分Hcp1(dHcp1)を含むブレイプラスミド(pACTdHcp1)である。以下、Hcp1につき特性解析を行った。

【0017】pACTdHcp1をY190細胞に再び導入し、相互作用の特異性を検討した(表3)。その結果、BCP(138-189)とdHCP1を共発現している酵母細胞(サンプル2)は、レポーター遺伝子を活性化した。ところが、dHCP1のみを発現している酵母細胞(サンプル2)は、レポーター遺伝子を活性化しなかった。一方、任意の蛋白質をコードしているcDNAを有するブレイプラスミド(サンプル4: pACTCcp)は任意の蛋白質をコードし、ここではキュウリモザイクウイルスの外被蛋白質をコードする場合、または蛋白質をコードするcDNAを有していないブレイプラスミド(サンプル3)の場合には、BCP(138-189)を発現している酵母細胞のレポーター遺伝子の活性化が認められなかった。また、dHCP1と全長BCP(2-189)とを共に発現(サンプル5)する酵母細胞でも、レポーター遺伝子の活性化はやはり認められなかった。これらの結果は、BCP(138-189)とdHCP1の両者が、レポーター遺伝子の活性化には必要であるという事を示している。即ち、酵母ツーハイブリッドシステムにおいて、これら2つの蛋白質間の物理的な相互作用が認められた。

【0018】

【表3】

|       | ベイトプラスミド        | ブレイプラスミド  | $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性 |
|-------|-----------------|-----------|---------------------|
| サンプル1 | pAS2-1          | pACTdHcp1 | -                   |
| サンプル2 | pASBCP(138-189) | pACTdHcp1 | +                   |
| サンプル3 | pASBCP(138-189) | pACT2     | -                   |
| サンプル4 | pASBCP(138-189) | pACTCcp   | -                   |
| サンプル5 | pASBCP(2-189)   | pACTdHcp1 | -                   |

【0019】(Hcp1遺伝子の塩基配列、Hcp1がコードするアミノ酸配列の決定)更に、pACTdHcp1のcDNA断片をプローブとして用いたコロニーハイブリダイゼーションにより、オオムギcDNAライブラリーより全長Hcp1クローンをスクリーニングし、配列を決定した。得られた全長Hcp1遺伝子は1360塩基より構成され、また、当該遺伝子がコードするポリペプチドは352個のアミノ酸より構成されていた。Hcp1遺伝子の塩基配列を配列表の配列番号2に、HCP1ポリペプチドの推定アミノ酸配列を配列表の配列番号1に、それぞれ示す。両配列を併記した図を、図2

に示す。尚、図2において、矢印はdHcp1遺伝子の5'末端の塩基を示す。HCP1ポリペプチドの推定アミノ酸配列は、植物の鉄-アスコルビン酸依存的酸化還元酵素と、明確な類似性を有している。

【0020】BCPとHCP1との直接的な相互作用を示すために、HCP1とグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)との融合蛋白質を利用した、インビトロ結合実験を行った。インビトロ結合実験の詳細を下記に示す。この実験により、上述したBCP-HCP1蛋白質の相互作用が、ツーハイブリッドシステムのアーティファクトにすぎない、という可能性を除外する事がで

きる。

【0021】(BCPの調製) Hiebertら(Hiebert et al. (1968): Virology, 34: 492-508)の方法により、ブロムモザイクウイルス外被タンパク質(BCP)を調製した。ウイルス粒子を、1M NaCl、1mMジチオスレイトールを含む20mM Tris-HCl(pH7.4)中で、4℃で14時間透析した。その懸濁液を、4℃で601,000gで4時間遠心分離し、非破碎ウイルス粒子とウイルスRNAを除去した。さらに、濃縮器(セントリコン-10:アミコン)を用いて蛋白質の濃縮を行い、最終濃度を0.3µg/µlとした。BCPの濃度は、励起定数により分光学的に決定した。

励起定数: 0.1%(w/v)溶液につきA260nm = 0.76

【0022】(GST蛋白質の発現) GSTとHCP1との融合蛋白質を得るために、プレプラスミドpACTdHcp1よりcDNA部分を回収し、pGEX-2TKプラスミド(アマシャムファルマシアバイオテック)のEcoR1部位へ導入した。GSTまたはGST/HCP1融合蛋白質はBL21大腸菌細胞(アマシャムファルマシアバイオテック)にて発現させた。50µg/mlのアンピシリンを含むLB培地(LB-Amp)2.5mlにて、目的のプラスミドを持ったBL21大腸菌細胞を、37℃で16時間培養した。この培養液を12.5mlのLB-Ampに添加し、170rpmで震盪しながら、OD600が1.0になるまで、25℃でインキュベートした。IPTGが1mMになるように添加して4時間後に、GST蛋白質及びGST/HCP1融合蛋白質の発現が誘導された。細胞を回収し、1×PBS(10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1.8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、140mM NaCl、2.7mM KCl)の中に懸濁し、超音波処理により破碎した。遠心分離を行うことにより細胞ライゼートを得、トライトンX-100(最終濃度: 1%(v/v))を添加した。

【0023】(GST蛋白質の精製)ライゼートをグルタチオンセファロース4B(アマシャムファルマシアバイオテック)と混合し、室温で1時間、穏やかに攪拌した。カラム担体を、バッファーAで3回洗浄し(1%トライトンX-100及び5mMジチオスレイトールを含む1×PBS)、その後GST蛋白質及びGST/HCP1融合蛋白質を、バッファーB(50mM Tris-NaOH、pH9.0、10mM還元型グルタチオン、1%トライトンX-100、5mMジチオスレイトール)にて溶出させた。溶出蛋白質をバッファーAに対して透析し、グルタチオンを除去した。蛋白質の単離精製度は、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)にて分離した蛋白質サンプルを、クマシーブルーで染色した後、マーカー蛋白質の量と比較して評価した。

【0024】(結合実験による相互作用の検出)1µgのGST蛋白質またはGST/HCP1融合蛋白質を、100µlのバッファーC(0.05%(w/v)ウシ血清アルブミンを含むバッファーA)に溶解した1µgのBCPと共に混合し、4℃で1時間穏やかに攪拌してインキュベートした。その懸濁液を、10µlのグルタチオンセファロース4B(50%スラリー)と混合し、4℃で1時間、穏やかに攪拌した。カラム担体を250µlのバッファーCで5回洗浄した後、25µlのバッファーBの中で室温で20分間攪拌しながらインキュベートした。その混合液を、4℃において6,000gで10秒間遠心分離し、上清を回収した。溶出蛋白質を15%のSDS-PAGEゲルで分離し、PVDF膜(ミリポア)に転写し、抗BCP抗体又は抗GST抗体により検出した(図3)。図3において、レーン1及びレーン4はバッファーとインキュベーションしたコントロールサンプルの結果、レーン2及びレーン5はGSTのみを用いたサンプルにおける結果、レーン3及びレーン6はGST/HCP1融合蛋白質を用いたサンプルにおける結果を示している。尚、レーン1からレーン3(A)は抗BCP抗体で、レーン4からレーン6(B)は抗GST抗体でイムノプロットングを行った。図3において、GST/HCP1とBCPとの結合が認められた(レーン3)。尚、GST単独ではBCPとの結合は観察されなかった(レーン2)。これらの結果は、HCP1とBCPとが直接的に結合している事を示している。

【0025】(BCP結合領域のマッピング)BCPのアミノ酸配列の中で、HCP1との相互作用に関与している部位を決定するために、N末端またはC末端を欠失させたBCPをコードするDNA断片を、pAS2-1プラスミド中に導入した。これら欠失したBCP遺伝子を有するベイトプラスミドと、pACTdHcp1プレプラスミドにより、酵母Y190株を形質転換し、両者の相互作用をツーハイブリッドシステムを用いてアッセイした(図4)。C末端より4アミノ酸残基を除いたBCP(138-185)では、HCP1との結合活性の低下は見られなかった。一方、C末端より12アミノ酸残基を除いたBCP(138-177)では、HCP1との結合活性が低下した。また、BCP(12-189)及びBCP(77-189)は、BCP(138-189)より長いN末端を含んでいるにもかかわらず、HCP1に対して結合活性を有していなかった。これらの結果は、BCPにおいて、アミノ酸配列の138番目から185番目にまたがる部分が、HCP1との結合に関与している事を示している。

【0026】(HCP1-BCP結合と感染性の相関性)HCP1とBCPとの結合と、ウイルス感染性との相関性を評価した。C末端部位にそれぞれ1アミノ酸置換を生じた、BCP変異体を作成し、HCP1との結合能、ウイルスの感染性、及び粒子化作用について評価し

た(表4)。表4において、アスタリスクマークは、アミノ酸置換が生じている箇所を示している。HCP1との結合アッセイは、酵母ツーハイブリッドシステムにより行った。ウイルス感染性のアッセイは、ティッシュプリンタッセイ(Mise et al. (1993): J. Virol. 67: 2815-2823)により行った。即ち、転写産物を6日目のオオムギの苗に接種し、ウイルスRNA量の蓄積量により、ウイルスの感染性を評価した。粒子化作用は、転写産物をオオムギのプロトプラストに接種した後に粒子画分を調製し、ウイルスRNAを粒子より抽出し、ノーザンブロット解析を行う事により評価した。

【0027】それら変異体の中で、P178A及びD182Aにおいて、結合のレベルの低下が観察され、これ

らの変異体はオオムギにおいて感染性を有さなかった(表4)。逆に、野生株と同程度のHCP1結合活性を有する変異体は、通常のウイルス感染性を保持した。F184Aにおいても感染性の消失が認められ、この現象はHCP1との結合活性と合致していないが、これは粒子化作用の消失に原因があると考えられる。尚、ウイルス外被蛋白質の粒子化作用により、ウイルスゲノムはRNA分解酵素の作用から保護され、ウイルスの毒性が促進される。これらの結果は、変異BCPとHCP1との結合活性と、変異BCP遺伝子をコードするBMV変異体のオオムギへの感染性とが、顕著な相関性を有する事を示している。

【0028】

【表4】

| アミノ酸置換により作成したBMV CP 変異体 | アミノ酸位置 |                               | HCP1との結合活性 | オオムギへのウイルスの感染性 | 粒子化作用 |
|-------------------------|--------|-------------------------------|------------|----------------|-------|
|                         | 178 th | 185 th                        |            |                |       |
| Wild                    | ---    | HVRPTFDDFFTPVYR               | +++        | +              | +     |
| P178A                   | ---    | HVR <sup>*</sup> ATFDDFFTPVYR | +          | -              | +     |
| T179A                   | ---    | HVRP <sup>*</sup> AFDDFFTPVYR | +++        | +              | +     |
| F180A                   | ---    | HVRPTA <sup>*</sup> DDFFTPVYR | +++        | +              | +     |
| D181A                   | ---    | HVRPTF <sup>*</sup> ADFFTPVYR | ++         | +              | +     |
| D182A                   | ---    | HVRPTFD <sup>*</sup> AFFTPVYR | +          | -              | +     |
| F183A                   | ---    | HVRPTFDD <sup>*</sup> AFTPVYR | +++        | +              | +     |
| F184A                   | ---    | HVRPTFDDF <sup>*</sup> ATPVYR | +++        | -              | -     |
| T185A                   | ---    | HVRPTFDDFF <sup>*</sup> APVYR | +++        | +              | +     |

【0029】

【発明の効果】本発明により、植物ウイルスの感染に関与するオオムギ由来の宿主遺伝子である、Hcp1 遺伝子及び当該遺伝子がコードする蛋白質HCP1が与えら

<110> 出願人氏名: 京都大学長

<120> 発明の名称: 植物ウイルスの感染に関与する宿主遺伝子及びポリペプチド

<160> 配列の数: 2

<210> 配列番号: 1

<211> 配列の長さ: 352

<212> 配列の型: アミノ酸

<213> 起源: *Hordeum vulgare* L. (オオムギ) leaf

<400> 配列

```

MAASDEMPMV QDLVSAGVQE PPSRYLVHEQ DRHGDLAAH EMPEPIPLID LSRLMDADEA 60
DKLRAALQTW GFFLATNHGI EDSLMEAMMS ASREFFRQPS EEKQKCSNLV DGNGKHYQVE 120
GYGSDKVESE DQVLNWNDR LHLRVEPEDER NFAKWPSHPE SFRDVLNEYA SKTKKIRDLV 180
LRSIAKLEI DEDYFVNQIS NKASGFARLY YPPCPRPDL VLGLTPHSDG NLLTILFVDD 240
DVGGLQVQRD GKWYNVPAKP HTLVINLADC LEIMNNGIFR SPVHRVVTNT EKERLSLAVF 300
YAVDEETVLE PAPGLLDEKR PPRYRKMMAK DFVVGLFEHF LQGKRFIDTL KM 352

```

れた。

【0030】

【配列表】

< 2 1 0 > 配列番号 : 2  
 < 2 1 1 > 配列の長さ : 1 3 6 0  
 < 2 1 2 > 配列の型 : 核酸  
 < 2 1 3 > 起源 : *Hordeum vulgare* L. (オオムギ) leaf  
 < 4 0 0 > 配列

```

GAAGTGAACA GTAGTAATAA CAGAATGGCT GCGTCCGATG AGATGCCGAT GGTGCAAGAC 60
CTTGTGTCGG CCGGAGTTCA GGAGCCGCCG AGCCGGTACT TAGTGCACGA GCAAGACCGT 120
CACGGCGACC TGCTGGCCGC CCACGAAATG CCGGAGCCCA TCCCTCTCAT TGACCTTAGC 180
CGGCTCATGG ACGCCGACGA GGCCGACAAG CTCCGGCCGG CTCTACAGAC CTGGGGCTTC 240
TTCCTGGCCA CCAACCATGG GATCGAGGAC TCTCTCATGG AAGCAATGAT GAGCGCGTCG 300
AGGGAGTTCT TCCGTCAACC GTCTGAGGAG AAGCAGAAAT GCAGCAACCT GGTGGACGGC 360
AACGGCAAGC ACTACCAGGT GGAAGGTAT GGAAGTGACA AGGTGGAGTC CGAGGATCAG 420
GTCCTCAATT GGAACGACCG GTTGCATCTG AGAGTTGAGC CCGAAGATGA GAGGAATTTT 480
GCTAAGTGGC CCAGTCACCC AGAATCTTTC AGGGATGTGC TGAATGAGTA CGCATCAAAA 540
ACCAAGAAAA TAAGAGACCT TGTCTTGGCA TCGATAGCCA AGCTCCTGGA GATTGACGAG 600
GATTACTTCG TCAACCAGAT ATCAAACAAG GCTTCCGGGT TTGCTAGATT GTACTACTAC 660
CCTCCGTGTC CGAGACCTGA CCTAGTTTTG GGCCTCACGC CTCACTCTGA TGGCAACCTC 720
CTTACCATCC TTTTTGTCGA CGACGATGTT GGTGGCTTGC AAGTTCAGAG AGATGGGAAA 780
TGGTACAATG TTCCAGCCAA GCCTCACACG CTGGTGATCA ACTTAGCAGA CTGCCTGGAG 840
ATAATGAACA ATGGAATCTT TAGGAGCCCG GTTCACAGAG TGGTGACGAA CACTGAGAAG 900
GAGAGGCTTT CGCTGGCCGT GTTCTATGCC GTGGATGAAG AAACGGTGCT GGAGCCAGCG 960
CCCGGTTTGC TGGATGAGAA GCGACCACCA AGATATAGGA AAATGATGGC CAAGGATTTT 1020
GTAGTCGGAC TCTTTGAACA TTTCTTCAA GGAAGAGAT TCATCGACAC CCTGAAGATG 1080
TAAGTTATAG TACGTGTAA CATTGATTAC CTATGTAGAA TAAAGAGATG GTCCTATCGT 1140
CTCTGAGTGG GGGTTTTATC TATCATTATC ATAAGCAACT TAGGTTGTGT TTATATTCAG 1200
TTGTTTCAA AGGATGCAAA ACTTCGCTCC ATCTCAGTGA TTAAGAAGAA CGGTGTGCTA 1260
GTAAATTATA AAGTGGAAG ACGGATCAAA GTAAATACTC CCTCCATCCG AAAATACTTG 1320
TATAAGAATG GATGTATGTA AATGTATTTT AGTTCTATAG 1360

```

## 【図面の簡単な説明】

【図1】 酵母ツーハイブリッドシステムにより、プロムモザイクウイルス外被蛋白質結合因子のスクリーニングを行った過程を示した図である。

【図2】 Hcp1 遺伝子の塩基配列と、Hcp1 がコードするポリペプチドの推定アミノ酸配列を示した図で

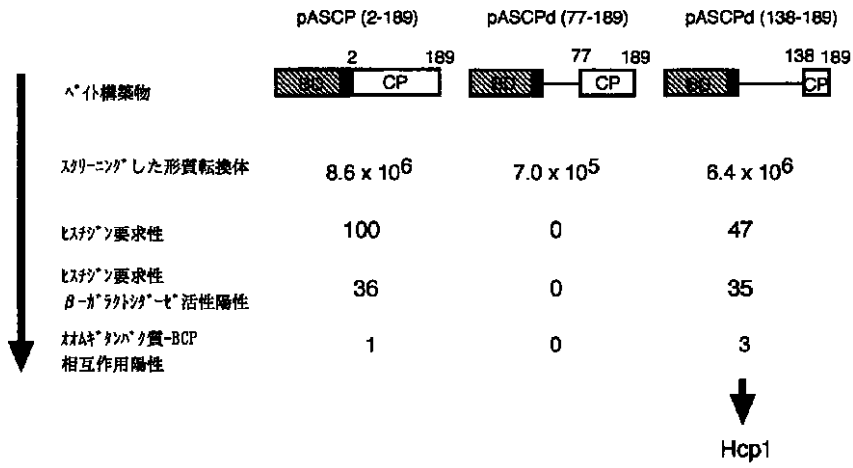
ある。

【図3】 HCP1 と BCP との結合を、インビトロ結合アッセイで検出したイムノプロットングを示す写真である。

【図4】 HCP1 との結合部位のマッピングを行った結果を示す図である。



【図1】

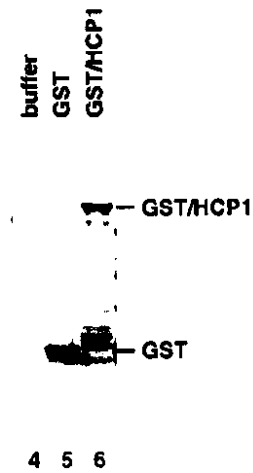


【図3】

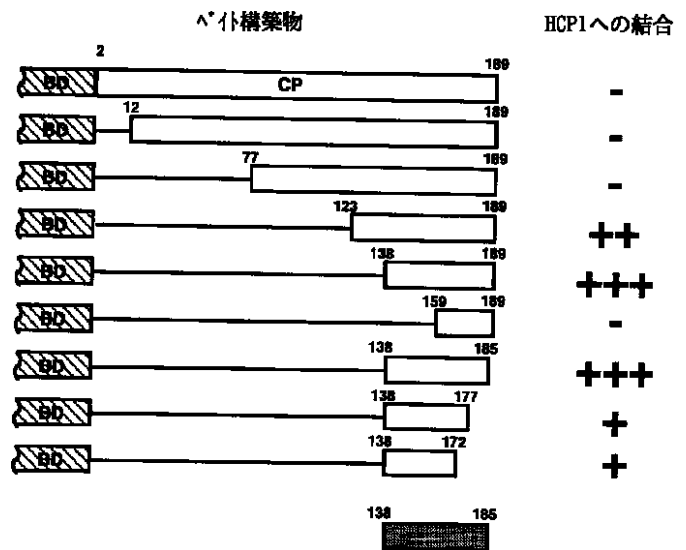
(A) 抗BCP抗体



(B) 抗GST抗体



【図4】



【図2】

↓

```

5' GAA GTG AAC AGT AGT AAT AAC AGA ATG GCT GCG TCC GAT GAG ATG CCG ATG GTG CAA GAC 60
   M A A S D E M P M Y Q D
   90
CTT GTG TCG GCC GGA GTT CAG GAG CCG CCG AGC CGG TAC TTA GTG CAC GAG CAA GAC CGT 120
   L V S A G V Q E P P S R Y L V H E Q D R
   150
CAC GGC GAC CTG CTG GCC GCC CAC GAA ATG CCG GAG CCG ATC CCT CTC ATT GAC CTT AGC 180
   H G D L L A A H E M P E P I P L I D L S
   210
CCG CTC ATG GAC GCC GAG GCC GAC AAG CTC CCG GCG GCT CTA CAG ACC TGG GCG TTC 240
   R L M D A D E A D K L R A A L Q T W G F
   270
TTC CTG GCC ACC AAC CAT GGG ATC GAG GAC TCT CTC ATG GAA GCA ATG ATG AGC GCG TCC 300
   F L A T N H G I E D S L M E A M W S A S
   330
AGG GAC TTC TTC CGT CAA CCG TCT GAG GAG AAG CAG AAA TGC AGC AAC CTG GTG GAC GCG 360
   R E F F R Q P S E E K Q K C S N L V D C
   390
AAC GGC AAG CAC TAC CAG GTG GAA GGG TAT GGA AGT GAC AAG GTG GAG TCC GAG GAT CAG 420
   N G K H Y Q V E G Y G S D K V E S E D Q
   450
GTC CTC AAT TGG AAC GAC CCG TTG CAT CTG AGA GTT GAG CCC GAA GAT GAG AGG AAT TTC 480
   V L N W N D R L H L R V E P E D E R N F
   510
GCT AAG TGG CCC AGT CAC CCA GAA TCT TTC AGC GAT GTG CTG AAT GAG TAC GCA TCA AAA 540
   A K W P S H P E S F R D V L N E Y A S K
   570
ACC AAG AAA ATA AGA GAC CTT GTC TTG CGA TCG ATA GCC AAG CTC CTG GAG ATT GAC GAG 600
   T K K I R D L V L R S I A K L L E I D E
   630
GAT TAC TTC GTC AAC CAG ATA TCA AAC AAG GCT TCC GGG TTT GCT AGA TTG TAC TAC TAC 660
   D Y F V N Q I S N K A S G F A R L Y Y Y
   690
CCT CCG TGT CCG AGA CCT GAC CTA GTT TTG GGC CTC ACG CCT CAC TCT GAT GCC AAC CTC 720
   P P C P R P D L V L G L T P H S D G N L
   750
CTT ACC ATC CTT TTT GTC GAC GAC GAT GTT GGT GGC TTG CAA GTT CAG AGA GAT GGG AAA 780
   L T I L F V D D D Y G G L Q V Q R D G K
   810
TGG TAC AAT GTT CCA GCC AAG CCT CAC ACG CTG GTG ATC AAC TTA GCA GAC TGC CTG GAG 840
   W Y N V P A K P H T L V I N L A D C L E
   870
ATA ATG AAC AAT GGA ATC TTT AGG AGC CCG GTT CAC AGA GTG GTG ACG AAC ACT GAG AAG 900
   I M N N G I F R S P V H R V V T N T E K
   930
GAG AGG CTT TCG CTG GCC GTG TTC TAT GCC CTG GAT GAA GAA ACG GTG CTG GAG CCA GCG 960
   E R L S L A V F Y A V D E E T V L E P A
   990
CCC GGT TTG CTG GAT GAG AAG CGA CCA CCA AGA TAT AGG AAA ATG ATG GCC AAG GAT TTC 1020
   P G L L D E K R P P R Y R K M M A K D F
   1050
GTA GTC GGA CTC TTT GAA CAT TTC CTT CAA GGG AAG AGA TTC ATC GAC ACC CTG AAG ATG 1080
   Y V G L F E H F L D G K R F I D T L K M
   1110
TAA GTT ATA GTA CGT GTT AAC ATT GAT TAC CTA TGT AGA ATA AAG AGA TGG TCC TAT CGT 1140
   *
   1170
CTC TGA GTG GGG GTT TTA TCT ATC ATT ATC ATA AGC AAC TTA GGT TGT GTT TAT ATT CAG 1200
   1230
TTG TTT CCA AAG GAT GCA AAA CTT CCG TCC ATC TCA GTG ATT AAG AAG AAC GGT GTG CTA 1260
   1290
GTT AAT TAT AAA GTG GAA AGA CCG ATC AAA GTA AAT ACT CCC TCC ATC CGA AAA TAC TTG 1320
   1350
TAT AAG AAT GGA TGT ATG TAA ATG TAT TTT AGT TCT ATA G 3'

```

【手続補正書】

【提出日】平成12年7月7日(2000.7.7)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】以下の(a)または(b)に示すアミノ酸配列からなることを特徴とする、ポリペプチド。

(a)配列表の配列番号1に示す、アミノ酸番号1-352で示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする、ポリペプチド。

(b)(a)の一部が欠損、置換若しくは付加され、プロモモザイクウイルス外被蛋白質との結合活性を有する、ポリペプチド。

【請求項2】 請求項1記載のポリペプチドをコードする、遺伝子。

【請求項3】 以下の(c)または(d)に示す塩基配列からなることを特徴とする、遺伝子。

(c)配列表の配列番号2に示す、塩基番号1-1360で示される塩基配列からなることを特徴とする、遺伝子。

(d)(c)の一部が欠損、置換若しくは付加され、プロモモザイクウイルス外被蛋白質との結合活性を有するポリペプチドをコードする、遺伝子。

フロントページの続き

Fターム(参考) 2B030 AA02 AB03 AD05 CA06 CA17  
CA19 CB03 CD03 CD07 CD09  
4B024 AA08 BA80 CA04 DA01 EA04  
GA11 HA01 HA12  
4B065 AA88X AA88Y AA99Y AB01  
BA02 CA24 CA53  
4H045 AA10 AA30 BA10 CA32 DA50  
EA05 FA74