

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	
C12N 15/09		C07K 14/415	
C07K 14/415		C12P 21/02	C
// C12P 21/02		C12N 15/00	ZNA A

請求項の数 3 (全 7 頁)

<p>(21)出願番号 特願平11 - 346387</p> <p>(22)出願日 平成11年12月 6日(1999.12.6)</p> <p>(65)公開番号 特開2001 - 161365(P 2001 - 161365 A)</p> <p>(43)公開日 平成13年 6月19日(2001.6.19)</p> <p>審査請求日 平成11年12月 6日(1999.12.6)</p>	<p>(73)特許権者 391012442 京都大学長 京都府京都市左京区吉田本町36の 1 番地</p> <p>(72)発明者 石川 雅之 北海道札幌市手稲区前田 2 条 4 丁目 3 - 1 - 803</p> <p>(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</p> <p>(74)代理人 100059258 弁理士 杉村 暁秀 (外 2 名)</p> <p>審査官 本間 夏子</p> <p>(56)参考文献 <i>Virology</i>(1998)Vol.243 , No.2 , p.472 - 481</p>
---	---

最終頁に続く

(54)【発明の名称】植物ウイルスの増殖に必須の宿主遺伝子TOM2A

1

(57)【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 - 280 で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。

(b) タバコモザイクウイルスの増殖に必要な宿主由来因子であり、(a) の一部が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなることを特徴とする、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、請求項 2 記載の遺伝子。

(c) 配列表の配列番号 2 に示す、塩基番号 1 - 843

2

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) タバコモザイクウイルスの増殖に必要な宿主由来因子をコードし、(c) の一部が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなることを特徴とする、遺伝子。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】本発明は、植物ウイルスの増殖に必須な宿主遺伝子であるシロイヌナズナ TOM2A 遺伝子、及び当該遺伝子を用いたウイルス耐性植物体の作出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】ウイルスの複製蛋白質あるいはウイルス関連 RNA と特異的に相互作用し、ウイルスの複製に関与する宿主蛋白質が存在するのではないか、という可能性

がこれまでの研究で指摘されてきた。しかし、過去に植物からウイルスの増殖に必須の宿主遺伝子が、単離・同定された例は、本発明者らによる TOM1 及び TOM3 のみであった（特願平 1 1 - 2 3 2 6 7 8 ）。

【 0 0 0 3 】

【発明が解決しようとする課題】本発明の TOM2A を用いた抗ウイルス戦略は、従来育種で用いられてきた抵抗性遺伝子の多くが過敏反応を介してウイルスを封じ込めるのと対照的である。従来の、過敏反応を介したウイルス抵抗性を付与する遺伝子の使用にあたっては、他種の植物に抵抗性を導入できないこと、特定の少数のウイルスにしか有効でないこと、抵抗性を打ち破るウイルス変異株が出現しやすいことが問題となってきた。一方、ウイルスゲノムの一部を植物で発現させることにより、ウイルス耐性を付与する方法が最近実用化されているが、その利用にあたっては、抵抗性が少数のウイルスにしか有効でないこと、組み換えによる新規ウイルス出現の危険性があることが問題となっていた。

【 0 0 0 4 】

【課題を解決するための手段】本発明において、植物ウイルスの増殖に必須の蛋白質をコードする遺伝子であるシロイヌナズナ遺伝子 TOM2A をクローニングした。 TOM2A 遺伝子の発現制御や改変により、植物にウイルス抵抗性を付与することが可能である。

【 0 0 0 5 】これまでの抗ウイルス戦略において、ウイルス耐性はウイルスの種類によって決まっており、普遍性がない。今回のターゲット遺伝子であるシロイヌナズナ TOM2A 遺伝子は、ウイルスが植物内で増殖するために必須な植物遺伝子であり、他種植物にも TOM2A と相同な遺伝子が存在すること、他の植物アルファ様ウイルスも TOM2A に類似した宿主遺伝子産物を使って増殖していることが予想される。従って、 TOM2A あるいはその類似遺伝子の操作によるウイルス耐性生物の作出は、広範囲の生物種の種々のアルファ様ウイルスに適用できる可能性があり、汎用性が期待できる。

【 0 0 0 6 】また、この方法のようにウイルスの増殖をサポートする因子を欠損させた場合、その欠損をウイルスゲノム上の変異が補償するのは困難と予想される。つまり、本抗ウイルス戦略はウイルスの変異により打破されにくいであろうと予想される。さらに、上述した TOM1 遺伝子を用いた同様の戦略を併用すれば、より強力なウイルス防除効果が期待できる。最近、ウイルスゲノムの一部を植物で発現させ、ウイルス耐性を付与する方法も実用化している。しかし、この方法の使用にあたっては、生体内での遺伝子組み換えによる新規ウイルスの出現を危惧する声もある。これに対して、本抗ウイルス戦略は宿主遺伝子の操作のみによるのでそのような危険性はない。

【 0 0 0 7 】

【発明の実施の形態】本発明者らは、タバコモザイクウ

イルス (TMV) の感染によるウイルス外被蛋白質の蓄積が抑制されたシロイヌナズナ変異株を作成した。その変異株を用いて、遺伝子の変異部位をマッピングし、当該変異を担っている遺伝子のクローニングを行う事により、ウイルスの増殖に必須の遺伝子である TOM2A 遺伝子を得てその塩基配列を解析し、当該遺伝子がコードする TOM2A 蛋白質のアミノ酸配列解析を行った。本発明の抗ウイルス戦略は宿主遺伝子の操作のみによるので、遺伝子組み換えにより、新規ウイルスが出現する危険性はない。以上のように、本遺伝子を利用した抗ウイルス戦略は、有効かつ安全であることが予想され、農学、医学分野において大いに活用される可能性がある。

【 0 0 0 8 】本発明の TOM2A 遺伝子は、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 TOM2A 遺伝子がコードするポリペプチドである TOM2A 蛋白質は、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。上述した通り、 TOM2A 遺伝子産物はウイルスの増殖をサポートすると考えられ、当該遺伝子の機能欠損は TMV の増殖抑制をもたらす。

【 0 0 0 9 】上述した TOM2A 遺伝子の機能より、遺伝子破壊、アンチセンスサプレッション、あるいはコサプレッションなどの手段を利用して、人為的にシロイヌナズナの TOM2A 遺伝子あるいは他の植物の TOM2A 遺伝子の機能ホモログの発現を抑制することにより、 TMV 耐性植物を作製できると期待できる。

【 0 0 1 0 】また、 TMV は多くの動植物 (+) 鎖 RNA ウイルス (アルファ様ウイルスと総称される) と基本的な複製機構を共有すると考えられている。下記の実施例で述べるように、 tom2a 変異はタバコモザイクウイルス外被蛋白質 (TMV-Cg) の増殖を特異的に抑制した。他のアルファ様ウイルスも TOM2A ファミリーの他のメンバーを使って増殖している可能性があり、 TOM2A ファミリーの他のメンバーの不活化により他のアルファ様ウイルスに耐性の植物が作出できる可能性がある。また TOM2A ファミリーメンバー全体を不活化する事により広範なアルファ様ウイルスに耐性の植物を作出できる可能性もある。

【 0 0 1 1 】また、 TOM2A 遺伝子に変異を与え、ウイルス増殖に対してドミナントネガティブに働くアリルを取得し、その様な遺伝子を植物に導入することにより TMV 耐性を付与する事が可能である。良好なドミナントネガティブ tom2 アリルを取得する事により、そのアリルの導入により種々の植物に広範なアルファ様ウイルスに対する耐性を付与できる可能性もある。

【 0 0 1 2 】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 TOM2A 蛋白質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 TOM2A蛋白質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。

【0013】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のが可能であり、本発明はそのような変異遺伝子を含むものである。

【0014】また、上述した様に、本発明の遺伝子を植物に導入して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、イネ、オオムギ、コムギ、トウモロコシ等の種々の単子葉植物、またナス、トマト、ジャガイモ等の種々の双子葉植物が挙げられる。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ことができる。

【実施例】

【0015】(tom2-1変異のマッピングとTOM2A遺伝子のクローン化)シロイヌナズナYS241株は、速中性子線照射により得られたタバコモザイクウイルス(TMV)の増殖が1細胞レベルで抑制される変異株である。遺伝解析の結果、アブラナ科系TMV-Cg株およびトマト系TMV-L株の増殖抑制形質は主として劣性変異tom2-1に支配されること、YS241株にはtom2-1に加えてtom2-1バックグラウンドでTMV-Lの増殖を野生株並にまで増加させる優性変異ttm1が存在することが明らかになっている。なお、ttm1はtom2-1バックグラウンドでTMV-Cgの増殖をわずかに増加させるのみであった。tom2-1変異は劣性なので、対応する野生型遺伝子TOM2の産物はTMVの増殖をサポートすると考えられた(Ohshima et. al. [1998]. Virology 243: 472-481.)。

【0016】TOM2遺伝子をクローン化するため、以下のようにしてtom2-1変異のマッピングを行った。まず、エコタイプColumbia由来のYS241株と野生型エコタイプLa-0をかけ合わせて得たF2植物のうちTMV-Cgの増殖が抑制される株38株を選択し、シロイヌナズナ染色体上に散在する制限酵素断片長多型(RFLP)マーカーm241, m235, m215, m335, m254, m253, m299, m213, m252, m251, m429, m583, m249, m506, m600, m247の各ジェノタイプを調べた。この結果、tom2-1変異は第1染

色体中央部RFLPマーカーm253とm299の間にマップされた。さらに同じF2集団を用い、m253とm299の間に存在する酵母人工染色体(YAC)クローンの挿入DNA末端をマーカーとしてマッピングを進めたところ、tom2-1はYAC由来のRFLPマーカー10D4Rと19F5Rの間約250kbの領域内に存在することが明らかになった(図1)。次いでこの領域を互いにオーバーラップするP1ゲノミッククローン群でカバーした。

【0017】一方、速中性子線が高頻度で染色体の転座、逆位、あるいは欠失を誘導することを考慮すると、ttm1はTOM2遺伝子領域が転座したものである可能性が考えられた。そこで、ttm1をもたないtom2-1株であるB1-113株と親株の野生型Columbia gl1株のゲノミックDNAを、ゲノミックサブトラクション法の変法であるrepresentational difference analysis(Lisitsyn et al. [1993]. Science 259: 946-951.)により比較したところ、後者には存在するが、前者には存在しない1608bpのHindIII断片(以下"RDA断片"と呼ぶ)が単離された。このRDA断片は、TOM2遺伝子座をカバーするP1整列クローン群中N20Lと特異的にハイブリダイズした。N20LよりRDA断片周辺の配列をサブクローンし、塩基配列を決定するとともに、周辺DNA断片をプローブとしてザンハイブリダイゼーションを行ったところ、B1-113株には当該領域に約20kbpにわたる欠失が存在することが明らかになった。さらに、ttm1をホモにもつ株ではその欠失領域の配列が大部分存在しており、この部分は転座したと推測された(図2)。

【0018】この欠失領域には複数個の転写単位が存在したので、それらのうちどれがTOM2に相当するのかを知るために、欠失をカバーする20kbの領域のサブフラグメントをT-DNA-アグロバクテリウム法を用いてtom2-1株に導入し、変異相補能を検討した。クローン#472の導入によってTMV-CgおよびTMV-Lの増殖が野生株並にまで回復した(図3)。また、クローン#273の導入によってTMV-Lの増殖が野生株並にまで回復した(TMV-Cgの増殖はわずかに増加した)。

【0019】以上より、tom2-1変異は#472上の遺伝子と#273上の遺伝子の二重突然変異であり、ttm1は、後者が転座した結果生じたものであると考えられた。ここで、#472上の遺伝子にコードされる遺伝子をTOM2A、#273上の遺伝子にコードされる遺伝子をTOM2Bと命名した。クローン#472上には単一の転写単位が存在していることがザンハイブリダイゼーションにより示唆された。cDNAクローニングおよび5', 3' RACE(rapid amplification of cDNA ends)法により、その転写産物はポリ(A)鎖を除いて1293ヌクレオチドの長さをもち、7個のエクソンからなることが示唆された。その上には終止コドンも含めて843ヌクレオチド(280アミノ酸)からなるオープンリーディングフレーム(ORF)が存在した(図4)。そのORFの上流にはインフレームの終止コ

ドンが存在したので、cDNAとして同定されていない領域に存在する AUGコドンから翻訳が始まる可能性は否定された。さらに cDNA 中この ORFに相当する配列をカリフラワーモザイクウイルス 35Sプロモーターを用いて B1-113 株で発現させるとtom2-1変異が相補されたので、この ORFが TOM2A蛋白質をコードすることが示された。なお、B1-113ゲノムにおいて、TOM2A 遺伝子は途中でトランケートしていた。

【 0 0 2 0 】 (TOM2A遺伝子産物の予想アミノ酸配列) 導き出された TOM2A蛋白質のアミノ酸配列には数カ所の疎水領域が存在した。蛋白質の膜貫通領域とその方向性を予測するコンピュータープログラム (PHDhtm/Predict Protein: B. Rost, R. Casadio, P. Fariselli, C. Sander, ProteinScience 4,521 [1995]. [http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html]; SOSUI: T. Hirokawa, S. Boon-Chieng, S. Mitaku, Bioinformatics 14, 378 [1998]. [http://www.tuat.ac.jp/~mitaku/adv_sosui/submit.html]) によれば、この蛋白質はN末端およびC末端が細胞質側に露出した4回膜貫通型蛋白質と予測された (図 4)。N末端あるいは他の部位にも、明らかなオルガネラターゲットシグナルは見いだされなかった (PSORT: K. Nakai and M. Kanehisa, Genomics, 14, 897 [1992]. [http://cookie.mcb.osaka-u.ac.jp/nakai/psort.html])。データベースサーチを行った結果、アミノ酸配列の類似性をもつシロイヌナズナ遺伝子が2個 (F16A16.120, F11A3.22) リストアップされた (図 4)。これらの遺伝子は、tom2a 単独変異存在下で許容される TMVの増殖を担っている可能性が考えられる。他にいくつかの内在性膜蛋白質も TOM2Aとアミノ酸配列の類似性をもつものとしてリスト

アップされたが、この結果は内在性膜蛋白質の構造的類似性を反映するものと考えられる。

【 0 0 2 1 】プロトプラストを用いた以前の解析から、tom2a 変異は TMVの1細胞内での増殖を、ゲノミック RNAの最初の脱外被以降の、RNA 複製を含むプロセスのどこかで阻害していると予想された (Ohshima et. al. [1998]. Virology 243: 472-481.)。TMV を含めて、ほとんどのあるいは全ての高等真核プラス鎖 RNAウイルスの複製は、膜に結合した複合体で起こると考えられている (K. W. Buck [1996]. Advances in Virus Research 47: 159; T. A. Osman and K. W. Buck [1996]. J. Virol. 70: 6227.)。しかしながら、TMV の複製蛋白質は明らかな膜貫通ドメインも膜への結合を起こさせる修飾を受けるためのコンセンサスアミノ酸配列ももたない。従って、TMV にコードされた複製蛋白質は膜に局在する宿主蛋白質と結合して機能すると考えられる。TOM2A 蛋白質の機能のメカニズムとして、TOM2A は先に同定された TOM1 と共に、複製複合体を膜に結合させる働きをしている可能性が考えられる。

【 0 0 2 2 】

【発明の効果】本発明により、配列表の配列番号2に示す TOM2A遺伝子、及び当該遺伝子がコードする配列表の配列番号1に示す TOM2A蛋白質が提供された。TOM2A遺伝子はシロイヌナズナ由来の遺伝子であり、タバコモザイクウイルスの増殖に必須な蛋白質をコードするため、当該遺伝子を改変することによりウイルス耐性を有する植物を作成できる。

【 0 0 2 3 】

【配列表】

< 1 1 0 > 出願人氏名: 京都大学長
 < 1 2 0 > 発明の名称: 植物ウイルスの増殖に必須の宿主遺伝子TOM2A
 < 1 6 0 > 配列の数: 2
 < 2 1 0 > 配列番号: 1
 < 2 1 1 > 配列の長さ: 2 8 0
 < 2 1 2 > 配列の型: アミノ酸
 < 2 1 3 > 起源: Arabidopsis thaliana heyneh TOM2A
 < 4 0 0 > 配列
 Met Ala Cys Arg Gly Cys Leu Glu Cys Leu Leu Lys Leu Leu Asn 15
 Phe Leu Leu Ala Val Ala Gly Leu Gly Met Ile Gly Tyr Gly Ile 30
 Tyr Leu Phe Val Glu Tyr Lys Arg Val Thr Asp Asn Ser Val Thr 45
 Phe Asp Leu Thr Asn Gly Asp Gln Ser Tyr Val Ser Phe Gly Arg 60
 Pro Ile Leu Met Ala Val Ser Leu Ser Ser Asn Ile Phe Asp Asn 75
 Leu Pro Lys Ala Trp Phe Ile Tyr Leu Phe Ile Gly Ile Gly Val 90
 Ala Leu Phe Val Ile Ser Cys Cys Gly Cys Val Gly Thr Cys Ser 105
 Arg Ser Val Cys Cys Leu Ser Cys Tyr Ser Leu Leu Leu Ile Leu 120
 Leu Ile Leu Val Glu Leu Gly Phe Ala Ala Phe Ile Phe Phe Asp 135
 Asn Ser Trp Arg Asp Glu Leu Pro Ser Asp Arg Thr Gly Asn Phe 150
 Asp Thr Ile Tyr Asn Phe Leu Arg Glu Asn Trp Lys Ile Val Arg 165
 Trp Val Ala Leu Gly Ala Val Val Phe Glu Ala Leu Leu Phe Leu 180

Leu Ala Leu Met Val Arg Ala Ala Asn Thr Pro Ala Glu Tyr Asp 195
 Ser Asp Asp Glu Tyr Leu Ala Pro Arg Gln Gln Ile Arg Gln Pro 210
 Phe Ile Asn Arg Gln Ala Ala Pro Val Thr Gly Val Pro Val Ala 225
 Pro Thr Leu Asp Gln Arg Pro Ser Arg Ser Asp Pro Trp Ser Ala 240
 Arg Met Arg Glu Lys Tyr Gly Leu Asp Thr Ser Glu Phe Thr Tyr 255
 Asn Pro Ser Glu Ser His Arg Phe Gln Gln Met Pro Ala Gln Pro 270
 Asn Glu Glu Lys Gly Arg Cys Thr Ile Met 280

< 2 1 0 > 配列番号 : 2
 < 2 1 1 > 配列の長さ : 8 4 3
 < 2 1 2 > 配列の型 : 核酸
 < 2 1 3 > 起源 : Arabidopsis thaliana heyneh TOM2A
 < 4 0 0 > 配列

ATGGCTTGTA GAGGTTGTTT GGAGTGTGTTG TTGAAGTTAC TCAACTTTCT CCTGGCTGTT 60
 GCTGGACTTG GCATGATTGG TTATGGTATC TATTTATTTCG TTGAGTACAA GAGAGTTACC 120
 GATAATTCTG TTACATTCGA TTTGACTAAT GGAGATCAAA GTTACGTTTC GTTTGGGAGG 180
 CCTATTCTTA TGGCTGTGTC ACTGTCTTCT AATATCTTTG ACAATCTTCC CAAAGCGTGG 240
 TTCATATACT TGTTCAATTGG TATTGGTGTG GCTCTCTTTG TTATTTCTTG CTGTGGCTGT 300
 GTTGGTACTT GTTCGAGGAG TGTCTGCTGC TTATCTTGCT ACTCTTCTCT TCTGATCTTG 360
 TTGATCTTGG TGGAGCTTGG ATTCGCAGCA TTTATTTTCT TCGATAACAG CTGGAGAGAT 420
 GAACTTCCTT CTGACAGGAC TGGAAACTTC GATACGATAT ATAATTTCTT TAGAGAGAAC 480
 TGGAAGATTG TAAGATGGGT AGCTCTAGGA GCAGTTGTTT TCGAGGCTTT ACTCTTCTTG 540
 CTTGCCCTTA TGGTCAGGGC AGCTAATACA CCAGCAGAGT ATGACAGTGA TGATGAATAT 600
 CTTGCTCCAA GGCAACAAT CAGGCAGCCA TTCATCAACC GCCAAGCCGC CCCTGTCACT 660
 GGTGTCCCAG TTGCTCCTAC TTTGGACCAA CGCCCAAGCC GCAGTGACCC TTGGAGTGCA 720
 CGTATGAGGG AAAAGTATGG GCTTGACACA TCTGAGTTCA CATACAATCC CTCAGAGTCA 780
 CACCGGTTCC AGCAAATGCC AGCGCAACCA AACGAAGAAA AGGGCCGATG CACCATCATG 840
 TGA 843

【図面の簡単な説明】

【図 1】 図 1 は、各種RFLPマーカーを用いた TOM2A遺伝子のマッピングを模式的に表した図である。

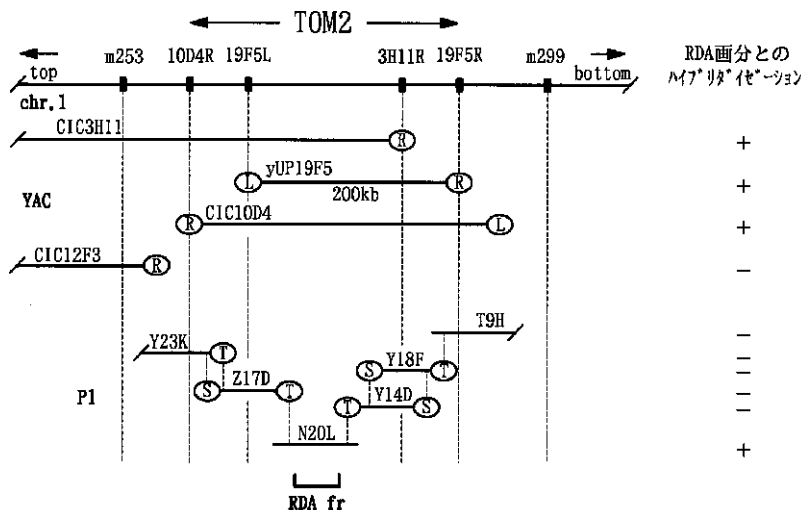
【図 2】 図 2 は、representational difference analysisを用いた TOM2A遺伝子のポジショナルクローニング

を模式的に表した図である。

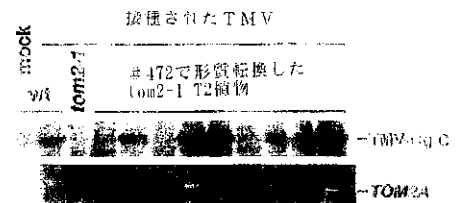
【図 3】 図 3 は、#472導入株における、TMV-Cg外被蛋白質の蓄積を示す写真である。

【図 4】 図 4 は、TOM2A蛋白質及び TOM2A類似蛋白質の推定アミノ酸配列を表す図である。

【図 1】



【図 3】



30

フロントページの続き

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C07K 14/415

C12P 21/02

BIOSIS (DIALOG)

WPI (DIALOG)

JICSTファイル (JOIS)

SwissProt/PIR/GenSeq

Genbank/EMBL/DDBJ/GenSeq