

サツマイモ斑紋モザイクウイルスのコードするタンパク質 (VPg, Nib) の核移行性の解析

森 昌樹・木村貴志・酒井淳一・花田 薫・*西口正通
(九州農業試験場・*農業生物資源研究所)

Masaki MORI, Takashi KIMURA, Jun-ichi SAKAI, Kaoru HANADA, and Masamichi NISHIGUCHI :
Analysis of Nuclear Targeting Activity of VPg and Nib Proteins Encoded
by Sweet Potato Feathery Mottle Virus RNA

ポティウイルスであるタバコエッチウイルス (TEV) のコードする2種類の核封入体タンパク質 N1a 及び N1b が核に移行すること¹⁾, また N1a の N 末端側に位置する VPg ドメインのうち N 末端から76アミノ酸残基のみで核に移行することが GUS 遺伝子との融合実験で明らかにされている²⁾。これは VPg ドメインの N 末端側 1-11アミノ酸, 及び43-72アミノ酸に塩基性アミノ酸が多く存在しており, これが核移行シグナルとして機能したためと考えられている²⁾。一方 N1b の核への移行には核移行シグナルに加えて, タンパク質全体の3次構造が重要な役割を担っていると考えられている³⁾。本研究では, 同じポティウイルスであるサツマイモ斑紋モザイクウイルスの強毒系統 (SPFMV-S) について, 同様に VPg, N1b が核移行性を有しているかどうか検討したので報告する。

1. 試験方法

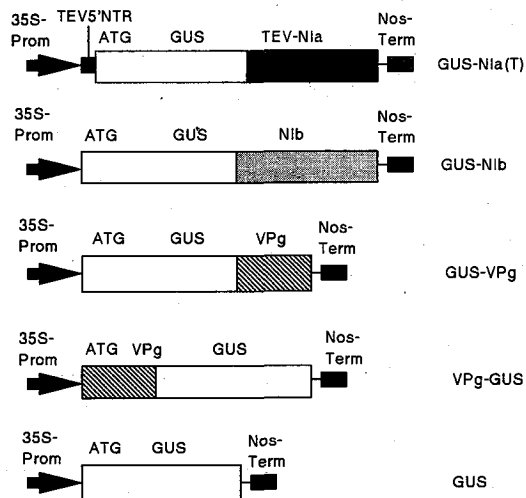
SPFMV-S の cDNA クローン⁴⁾と塩基配列⁶⁾をもとに, 植物細胞で発現するように GUS-VPg, VPg-GUS, GUS-N1b の融合プラスミドを pUC19 上に構築した (第1図)。GUS プラスミドは pBI221 (Clontech) を使用した。TEV の GUS-N1a プラスミド (GUS-N1a (T))¹⁾は Carrington 博士より分与を受けた。これらのプラスミド DNA 20 μ g を西口らの方法⁵⁾で調製したタバコプロトプラスト 1.6×10^6 / ml にエレクトロポレーションで導入した。エレクトロポレーションはハリオの CFP-1 を用いて, 矩形波を 437V / cm, 10ミリ秒の条件で与えた。エレクトロポレーション後, プロトプラストを 40-48時間培養し, Restrepo らの方法¹⁾に従い X-glucuronide (Clontech) で 2-12hr 染色した。但し X-glucuronide は 2 mM で使用した。

2. 結果及び考察

対照として行った GUS-N1a(T) を導入したものは, 約30%のプロトプラストが青く染色され, 細胞質に比べ核がはるかに濃く染色される核特異的な染色像が観察された。それに対して GUS-VPg を導入したものは, 約5%のプロトプラストが青く染色され, 細胞質に比べ核がやや濃く染色されるものの対照区ほど明確な核特異的な染色像は認められなかった。GUS-N1b, VPg-GUS, GUS ではこの条件では青く染色されるプロトプラストがほとんど得られなかったため, 今後 DNA 導入効率の向上及びプロモーターの改良などによる発現効率の向上が望まれる。

引用文献

- 1) Restrepo, M. A., Freed, D. D., and Carrington, J. C.: *The Plant Cell* 2, 987-998, 1990.
- 2) Carrington, J. C., Freed, D. D., and Leinicke, A. J.: *The Plant Cell* 3, 953-962, 1991.
- 3) Li, X. H. and Carrington, J. C.: *Virology* 193, 951-958, 1993.
- 4) 森 昌樹・酒井淳一・林 隆治・宇杉富雄・西口正通: 日本分子生物学会年会講演要旨集 p. 136. 1991.
- 5) 酒井淳一・田中正美・森 昌樹・花田 薫・宇杉富雄・西口正通 九農研 55, 90, 1993.
- 6) 森 昌樹・酒井淳一・林 隆治・宇杉富雄・西口正通: 日本農芸化学会誌 66, 487, 1992.
- 7) 酒井淳一・田中正美・森 昌樹・花田 薫・宇杉富雄・西口正通 九農研 55, 91, 1993.
- 8) Nishiguchi, M., Sato, T., and Motoyoshi, F.: *Plant Cell Reports* 6, 90-93, 1987.



第1図 エレクトロポレーションに供試したプラスミド

注) 35S-Prom : カリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーター
- Nos-Ter : Ti プラスミドのノバリン合成酵素遺伝子のターミネーター
TEV5'NTR : タバコエッチウイルスの5'非翻訳領域
ATG : 開始コドン