

理学博士岡田吉美氏の「植物ウイルス
RNA遺伝子の分子生物学的解析と農業へ
の応用」に対する授賞審査要旨

岡田氏が本研究を開始した当時、植物ウイルスに関する研究は、専ら生物学的手法によって行われ、しかも大多数の植物ウイルスがRNA遺伝子から成るため、既知のDNAの遺伝子操作系を適用することもできなかった。同氏は、一九六六年以来、今日に至るまで、一貫して植物ウイルス、特にタバコモザイクウイルス(TMV)のRNA遺伝子を主たる対象として、広範な分子生物学的研究を進め、ウイルス学ならびに植物病理学に、新たな発展をもたらすとともに、ウイルスとウイロイドRNAにかかわる斬新な遺伝子工学技術を開発して、農業の分野にも多大の貢献をした。

一、TMV粒子の再構成反応の解明

岡田氏は、抗原性の異なる二種類のコート蛋白質(CP)を持つ混成TMV粒子を、試験管内で作製する独創的方法を考案し、その抗原抗体反応を電子顕微鏡で観察することによって、ゲノムの3'末端

から80塩基の内部に再構成開始点があり、まず5'側に速やかに伸長し(約五分)、その後、3'側にゆっくり進む(約三〇分)という、新しい二方向再構成モデルを、一九七八年に提案した。この研究は、再構成反応はゲノムの一端から一方向に進むという、既往の通説を覆した画期的成果である。

二、TMVゲノムの分子構造の決定と遺伝子の機能解析

岡田氏は一九八二年、TMV-RNAを相補DNA(cDNA)としてクロニングすることにより、初めて、cDNAを介してTMV-RNAの塩基配列を決定することに成功した。そして、再構成開始部位のヘアピン構造と開始点の共通塩基配列を決定するとともに、開始部位のゲノム上の位置が、系統により異なることを明らかにし、さらに、ゲノムの遺伝子構成に基づくウイルス分類法をいち早く提唱した。これら一連の研究は、植物ウイルスRNA研究の長年にわたる停滞を打破する決定的な契機になった。また、コート蛋白質遺伝子を導入した植物が、TMVに抵抗性を示すことが報告されたのを契機として、同氏の開発したTMV-CPのcDNAクローニングが、わが国最初のウイルス抵抗性組換えトマトに導入され、諸外国でも広く利用されるに至った。

ついで岡田氏は一九八六年、TMVの全長cDNAクローニングから、

感染性TMV-RNAを合成する実験系を、世界で初めて構築した。そして、ゲノムがコードする、(1) 130Kと180K蛋白質はRNAポリメラーゼであること、(2) 30K蛋白質はTMVの細胞間移行に関与する因子であること、(3) コート蛋白質はTMVの粒子形成能と、葉から葉への遠距離移行に必須の因子であること、などを実証した。かくして、他の植物ウイルスに先駆け、TMVにコードされる四個の遺伝子の機能が、すべて解明されるに至った。この研究成果は、植物ウイルスの原形質連絡(糸)の通過、ならびに植物体内移行に関与する蛋白質の遺伝子が、それぞれウイルス自身にコードされていることを発見した最初の報告として、国際的に高く評価されている。

三、弱毒ウイルスならびに宿主のTMV抵抗性遺伝子の機能解析

弱毒ウイルスを予め宿主に感染させると、同種ウイルスの強毒系統の感染が阻止される。岡田氏は一九八四年、わが国のトマトに画期的なTMV防除効果を挙げた弱毒系統L₁A₁ならびにその強毒親系統(TMV-D)の全塩基配列を決定した。そして、L₁A₁では130Kと180KのRNAポリメラーゼに三個のアミノ酸置換があり、この変異によって30K蛋白質遺伝子の転写が阻害され、TMVの細胞間移行が低下して弱毒化することを明らかにした。

ついで岡田氏は、TMV 抵抗性遺伝子 $Tm-1$ 、 $Tm-2$ を持つトマトにおいても増殖が可能な TMV 変異株のゲノム解析から、(1) $Tm-1$ は、130K と 180K RNA ポリメラーゼにアミノ酸置換を生じ、ゲノムの複製を阻害すること、(2) $Tm-2$ は、30K 移行蛋白質にアミノ酸置換を生じ、TMV の細胞間移行を阻害すること、さらに、(3) タバコの抵抗性遺伝子 Z は、コート蛋白質との相互作用によって、壞疽斑を形成し、TMV の広がりを抑制することなど、TMV にコードされている蛋白質の多様な機能を明らかにした。

四、植物ウイルス及びウイロイドにかかわる遺伝子工学の展開と農業への応用

岡田氏は一九八七年、TMV-CP 遺伝子を外来遺伝子と置換して、対応する外来蛋白質を植物体内で発現させるウイルスベクターを、世界に先駆けて構築した。さらに同氏は、コート蛋白質遺伝子の終止コドンの後にリードスルー配列(この配列を導入すると、終止コドンを読み過(して翻訳が行われる)を付加し、その後方に外来遺伝子をつなぐこと)によって、有用ペプチドの結合したコート蛋白質と、正常なコート蛋白質の両方を合成できるといふ、独創的な全身感染性 TMV ベクターを開発した。そして、血圧降下ペプチドをはじめ、エイズウイルス抗原やインフルエンザウイルス抗原のエピト

ープ(抗原決定基)などを、タバコやトマトで生産することに成功した。これらの成果は一九九五年、科学技術庁より注目発明として表彰され、アメリカでも既に実用化されている。

岡田氏はまた、ウイロイドに特徴的な二本鎖 RNA を切断することにより、植物にウイロイド抵抗性を付与する方法を考案し、切断活性を持った遺伝子 *pac1* をジャガイモに、続いてキクに導入することに成功した。これは、世界で初めてのウイロイド抵抗性組換え植物の創製であり、一九九六年、再び科学技術庁の表彰を受けた。

以上のように岡田氏は、TMV とウイロイド RNA にかかわる基礎的研究の分野で、世界的にトップレベルの業績を挙げ、さらに、それらの遺伝子工学的研究を通じて、新しい農業技術の発展にも多大の貢献をした。これらの功績に対して、一九九六年には、日本農業研究所賞が授与されている。

TMV は、一九三五年の結晶化以来、ウイルス学において、常に先端的研究の対象となってきた。一九九八年、TMV 発見百周年の国際シンポジウムがエジンバラで開催され、岡田氏はそこに招かれて、TMV ゲノムのセッションの座長に指名され、さらに総括講演をも行った。このように、岡田氏の業績は、国際的にも極めて高く評価されている。

片断遺伝子クローニング

4. 烟草花葉ウイルス

1. Amino acid sequence of common Japanese strain of tobacco mosaic virus. Y. Nozu, and Y. Okada. *J. Mol. Biol.*, 35, 643-646 (1968).
2. Enzymatic removal of the 5'-terminal methylated blocked structure of tobacco mosaic virus RNA and its effects on infectivity and reconstitution with coat protein. T. Ohno, Y. Okada, K. Shimotoho, K. Miura, H. Shinshi, and T. Sugimura. *FEBS Lett.*, 67, 209-213 (1976).
3. Reconstitution of tobacco mosaic virus rods occurs bidirectionally from an internal initiation region: Demonstration by electron microscopic serology. Y. Otsuki, I. Takebe, T. Ohno, M. Fukuda, and Y. Okada. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 1913-1917 (1977).
4. Kinetics of biphasic reconstitution of tobacco mosaic virus *in vitro*. M. Fukuda, T. Ohno, Y. Okada, Y. Otsuki, and I. Takebe. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 1727-1730 (1978).
5. Correlation between particle multiplicity and the location on virion RNA of the assembly initiation site for viruses of tobacco mosaic virus group. M. Fukuda, T. Meshi, Y. Okada, Y. Otsuki, and I. Takebe. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 4231-4235 (1981).
6. Mechanism of tobacco mosaic virus assembly: Role of subunit and larger aggregate protein. M. Fukuda, and Y. Okada. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 5833-5836 (1982).
7. Molecular cloning and nucleotide sequence of the 30K and the coat protein cistron of TMV (tomato strain) genome. N. Takamatsu, T. Ohno, T. Meshi, and Y. Okada. *Nucleic Acid Res.*, 11, 3767-3778 (1983).
8. Hop stunt viroid: Molecular cloning and nucleotide sequence of the complete cDNA copy. T. Ohno, N. Takamatsu, T. Meshi, and Y. Okada. *Nucleic Acid Res.*, 11, 6185-6197 (1983).
9. Single amino acid substitution in 30K protein of TMV defective in virus transport function. T. Ohno, N. Takamatsu, T. Meshi, Y. Okada, M. Nishiguchi, and Y. Kihno. *Virology*, 131, 255-258 (1983).
10. Synthesis of TMV-specific RNAs and proteins at the early stage of infection in tobacco protoplasts: Transient expression of the 30K protein and its mRNA. Y. Watanabe, Y. Emori, I. Ooshika, T. Meshi, T. Ohno, and Y. Okada. *Virology*, 133, 18-24 (1984).
11. Nucleotide sequence of the tobacco mosaic virus (tomato strain) genome and comparison with the common strain genome. T. Ohno, M. Aoyagi, Y. Yamamashi, H. Saito, S. Ikawa, T. Meshi, and Y. Okada. *J. Biochem.*, 96, 1915-1923 (1984).
12. Molecular basis of plant viral virulence: the complete nucleotide sequence. M. Nishiguchi, S. Kikuchi, Y. Kihno, T. Ohno, T. Meshi, and Y. Okada. *Nucleic Acid Res.*, 13, 5585-5590 (1985).
13. Elongation in the major direction of tobacco mosaic virus assembly. M. Fukuda, and Y. Okada. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 3631-3634 (1985).
14. *In vitro* transcription of infectious RNAs from full-length cDNAs of tobacco mosaic virus. T. Meshi, M. Ishikawa, F. Motoyoshi, K. Senba, and Y. Okada. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 5043-5047 (1986).
15. *In vitro* mutagenesis of the putative replicase genes of tobacco mosaic virus. M. Ishikawa, T. Meshi, F. Motoyoshi, N. Takamatsu, and Y. Okada. *Nucleic Acid Res.*, 14, 8291-8301 (1986).
16. Expression of bacterial chloramphenicol acetyltransferase gene in tobacco plants mediated by TMV-RNA. N. Takamatsu, M. Ishikawa, T. Meshi, and Y. Okada. *EMBO J.*, 6, 307-311 (1987).
17. Function of the 30 kd protein of tobacco mosaic virus: Involvement in cell-to-cell movement and dispensability for replication. T. Meshi, Y. Watanabe, T. Saito, A. Sugimoto, T. Maeda, and Y. Okada. *EMBO J.*, 6,

- 2557-2563 (1987).
18. Attenuated strain of tobacco mosaic virus reduced synthesis of a viral protein with a cell-to-cell movement function. Y. Watanabe, N. Morita, M. Nishiguchi, and Y. Okada. *J. Mol. Biol.*, 194, 699-704 (1987).
 19. Bidirectional assembly of tobacco mosaic virus *in vitro*. M. Fukuda, and Y. Okada. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 4035-4038 (1987).
 20. Coat protein gene sequence of tobacco mosaic virus encodes a host response determinant. T. Saito, T. Meshi, N. Takamatsu, and Y. Okada. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 6074-6077 (1987).
 21. Two concomitant base substitutions in the putative replicase genes of tobacco mosaic virus confer the ability to overcome the effects of a tomato resistance gene *Tm-1*. T. Meshi, F. Motoyoshi, A. Adachi, Y. Watanabe, N. Takamatsu, and Y. Okada. *EMBO J.*, 7, 1575-1581 (1988).
 22. Mutations in the tobacco mosaic virus 30kD protein gene overcome *Tm-2* resistance in tomato. T. Meshi, F. Motoyoshi, T. Maeda, S. Yoshikawa, H. Watanabe, and Y. Okada. *The Plant Cell*, 1, 515-522 (1989).
 23. A new tobacco mosaic virus vector and its use for the systemic production of angiotensin-I-converting enzyme inhibitor in transgenic tobacco and tomato. H. Hamamoto, Y. Sugiyama, N. Nakagawa, E. Hashida, Y. Matsunaga, S. Takemoto, Y. Watanabe, and Y. Okada. *Bio/Technology*, 11, 930-932 (1993).
 24. Systemic production of foreign peptides on the particle surface of tobacco mosaic virus. Y. Sugiyama, H. Hamamoto, S. Takemoto, Y. Watanabe, and Y. Okada. *FEBS Letters*, 359, 247-250 (1995).
 25. Transgenic potato expressing dsRNA-specific ribonuclease (pac1) is resistant to potato spindle tuber viroid. T. Sano, A. Nagayama, T. Ogawa, I. Ishida, and Y. Okada. *Nature Biotech.*, 15, 1290-1294 (1997).
 26. Phosphorylation and /or presence of serine 37 in the movement protein of tomato mosaic tobamovirus is essential for intracellular localization and stability *in vivo*. S. Kawakami, H. S. Padgett, D. Hosokawa, Y. Okada, R. N. Beachy, and Y. Watanabe. *J. Virol.*, 73, 6831-6840 (1999).
- Ⅱ 雑記 (雑記)
1. Molecular assembly of tobacco mosaic virus. Y. Okada (1986). In "Advances in Biophysics" (M. Kotani ed.), Vol. 22, pp. 95-149, Elsevier, Limerick: Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
 2. Systemic movement of viruses. T. Meshi and Y. Okada (1986). In "Plant-Microbe Interaction: Molecular and Genetic Perspectives" (T. Kosuge & E. W. Nester eds.), Vol. 2, pp. 285-304.
 3. Structure and function of tobacco mosaic virus RNA. Y. Okada, T. Meshi, and Y. Watanabe (1990). In "Viral Gene and Plant Pathogenesis" (T. P. Prine & J. G. Show eds.), Springer-Verlag, pp. 23-38.
 4. Molecular pathology of tobacco mosaic virus revealed by biologically active cDNA. T. Meshi, Y. Watanabe, and Y. Okada (1992). In "Genetic Engineering with plant Viruses" (T. M. A. Wilson & J. W. Davies eds.), CRC Press, Inc. USA, pp. 149-186.
 5. Historical overview of the research on tobacco mosaic virus genome: Genome organization, infectivity, and gene manipulation. Y. Okada (1999). *Phil. Trans. Royal Soc. London B*, 353, 569-582.