

(論文内容の要旨)

植物ウイルスの感染は個々の細胞における増殖過程と隣接する細胞や上位組織への移行過程によって成立している。これらの過程の解明は植物ウイルス病の防除法開発の土台となると考えられる。モデルウイルスであるブロムモザイクウイルス (*Brome mosaic virus*; BMV) の移行機構には、BMV の遺伝子にコードされている 3a 移行タンパク質(B3a)と外被タンパク質(CP)の関与が知られている。宿主植物における BMV の感染過程において、これらのタンパク質が適切なタイミングで機能すると考えられるが、そのような機能制御機構についての報告はなかった。本論文では、タンパク質の翻訳後修飾の一つであり、また、生体機能制御機構の一つであるタンパク質のリン酸化に注目し、3a 移行タンパク質と外被タンパク質のリン酸化を明らかにし、その役割について解析を行った。その主な内容は以下のとおりである。

1. B3a と CP のリン酸化が、BMV 感染細胞内で起こっているかを検証するため、BMV を接種した宿主細胞を ^{32}P -オルトリン酸存在下で培養後、目的タンパク質を免疫沈降法で回収し、解析を行った。その結果、B3a と CP とともに感染細胞内でセリン残基がリン酸化することが明らかになった。また、BMV 感染細胞に対する B3a の免疫沈降において CP が B3a と共沈することから、感染細胞内で B3a と CP が相互作用していることが示唆された。

2. BMV の感染における B3a のリン酸化の役割を調べるために、B3a のリン酸化部位の同定を試みた結果、36 番目のセリン (Ser36) がリン酸化部位の一つとして同定された。Ser36 についてアミノ酸置換変異を導入したところ、リン酸化しないアラニン (Ala) や負電荷を帯び擬似的リン酸化状態であるアスパラギン酸

(Asp) への置換によって BMV の細胞間移行が遅延した。これらの結果から、B3a の Ser36 のリン酸化／脱リン酸化が BMV の移行能の制御機構として働くことが示唆された。また、感染細胞における B3a の局在について経時的観察を行った結果、これまでの報告にあるように、感染細胞表面に B3a で構成された管状構造が観察された。B3a の Ser36 にアミノ酸置換変異を導入したなかで、リン酸化しない Ala を導入した場合のみ管状構造が形成されなかった。さらに、リン酸化阻害剤処理によって B3a の管状構造形成率が低下した。これらの結果から、感染細胞表面に B3a が管状構造を形成するために Ser36 のリン酸化が必要であることが示唆された。

3. BMV の感染における CP のリン酸化の役割を調べるために、CP のリン酸化部位の同定を試みた。その結果、1 番目と 3 番目のセリン (Ser1、Ser3) がリン酸化部位として同定された。Ser1 と Ser3 についてアミノ酸置換変異を導入したところ、Asp を導入した場合に細胞間移行が野生型に比べ遅延した。CP の Ser1 と Ser3 に Asp を導入するとウイルス粒子は形成されるものの野生型に比べ不安定な構造をとることがわかった。その原因として、Asp の導入により CP とウイルス RNA との結合が阻害され、粒子形成に負の作用をもたらしていることが明らかになった。また、CP の Ser1 と Ser3 に Ala を導入し、野生型と感染競合実験を行ったところ、変異型は野生型に敗れた。以上の結果から、CP の Ser1 と Ser3 のリン酸化／脱リン酸化は CP とウイルス RNA の結合に作用し、ウイルス粒子形成などの BMV の感染過程において制御機構として働くことが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

植物ウイルスの宿主植物における感染は個々の細胞における増殖と隣接する細胞や上位組織への移行によって成立する。モデルウイルスであるブロムモザイクウイルスの移行において、ウイルスタンパク質である 3a 移行タンパク質と外被タンパク質の関与が報告されていたが、これらのタンパク質の機能制御機構については不明であった。本論文は、ブロムモザイクウイルス感染細胞において 3a 移行タンパク質と外被タンパク質のリン酸化が起こることを明らかにするとともに、その役割について解析し、ウイルスタンパク質のリン酸化／脱リン酸化がこれらウイルスタンパク質の機能制御として働き、ウイルスの感染戦略に寄与することを示したものである。評価すべき点は以下のとおりである。

1. ブロムモザイクウイルスの感染細胞に対し、免疫沈降法を用いることで、感染過程で 3a 移行タンパク質と外被タンパク質のリン酸化が起こることを示した。また、感染細胞に対する免疫沈降法によって、3a 移行タンパク質と外被タンパク質が相互作用をすることを示した。

2. ブロムモザイクウイルス 3a 移行タンパク質のリン酸化部位の一つの同定に成功し、この部位におけるリン酸化／脱リン酸化が 3a 移行タンパク質の機能制御機構として働き、ブロムモザイクウイルスの移行能を調節することを見出した。

また、本論文中で同定した 3a 移行タンパク質のリン酸化部位におけるリン酸化は、ブロムモザイクウイルス感染細胞表面に 3a 移行タンパク質が構成する管状構造の形成にも必要であることを明らかにした。リン酸化部位へのアミノ酸置換導入による移行能の低下と管状構造形成能の欠失により、ブロムモザイクウイルスの移行能への管状構造形成能の関与が見出された。

3. ブロムモザイクウイルス外被タンパク質の2つのリン酸化部位の同定に成功し、同定された部位におけるリン酸化／脱リン酸化がブロムモザイクウイルスの感染性を制御していることを見出した。本論文中で同定した部位のリン酸化が外被タンパク質とウイルス RNA との結合に阻害的に働くことが明らかになったことから、これらの部位でのリン酸化／脱リン酸化が外被タンパク質とウイルス RNA の相互作用の制御機構に関与していることを見出された。

以上のように、本論文は、ブロムモザイクウイルスの 3a 移行タンパク質と外被タンパク質のリン酸化について調べ、リン酸化部位を明らかにするとともに、植物ウイルスの感染過程でのウイルスタンパク質の機能制御機構へのリン酸化の関与を強く支持するいくつかの新知見を提示したものであり、植物病理学とウイルス学の分野に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値のあるものと認める。

なお、平成 20 年 3 月 13 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。