

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	峯 彰
論文題目	Identification and molecular dissection of RNA replication complexes of <i>Dianthovirus</i> (ダイアンソウウイルスのRNA複製複合体の同定と分子解剖)		
(論文内容の要旨)			
<p>ウイルスは、人に病気を引き起こすだけでなく、我々にとって重要な農作物や家畜などにも甚大な被害を及ぼす農業上重要な病原体である。ウイルス複製機構の解明は防除法開発の基盤となるため、これまでも盛んに研究されてきた。しかし、未だその機構の全容は解明されておらず、有効な防除法の開発にも至っていない。本論文では、二分節の一本鎖プラスセンスRNAをゲノムとして持つダイアンソウウイルスをモデルとして、プラスセンスRNAウイルスのゲノムRNA複製を行う装置であるRNA複製複合体に焦点を当て研究を行った。その内容は以下の通りである。</p> <ol style="list-style-type: none">1. 植物ウイルスの大多数はプラスセンスRNAウイルスである。これらのウイルスはウイルス自身がコードする複製酵素成分タンパク質と宿主植物由来のタンパク質から成るRNA複製複合体をオルガネラ膜上に形成し、ゲノムRNA複製を行うという共通の特徴を持つ。これまでもRNA複製複合体に関する研究は精力的に行われてきたが、その実体は未だ同定されていなかった。本研究では、ブルーネイティブゲル電気泳動法 (BN-PAGE) などの生化学的手法を用いて、ダイアンソウウイルス属 <i>Red clover necrotic mosaic virus</i> (RCNMV) のRNA複製複合体を特定の分子量を持つタンパク質複合体として分離・同定することに成功した。また、免疫学的手法と質量分析手法を用いて、RCNMVのRNA複製複合体が自身のコードする複製酵素成分タンパク質であるp27とp88を含むことを明らかにし、さらに、RCNMVのRNA複製複合体と相互作用する11種の宿主植物タンパク質を同定した。2. 多くのプラスセンスRNAウイルスは複数の複製酵素成分タンパク質をコードしている。これらの複製酵素成分タンパク質は相互作用してRNA複製複合体形成に関わると考えられるが、その分子機構はほとんど分かっていない。本研究では、精製したRCNMVの複製酵素成分タンパク質とその変異体を用いて、p27-p27およびp27-p88相互作用に関わる機能ドメインを同定した。同時に、p27とp88は重複領域を持つにも関わらず、その重複領域に依存せずに結合できることを明らかにした。さらに、p27の相互作用ドメインにアミノ酸置換を導入した変異体をBN-PAGEと免疫沈降法を組み合わせ解析することにより、p27-p27およびp27-p88相互作用の両者がRCNMVのRNA複製複合体形成に必要な不可欠であることを示した。3. RNA複製複合体の形成過程はウイルス複製酵素成分タンパク質-宿主タンパク質-ウイルスRNAの相互作用を介した複雑な過程であると考えられる。このような複雑な過程において機能的なRNA複製複合体が正しく形成されるためには何らかの制御機構が必要だと考えられるが、そのような制御機構に関する知見はほとんどない。本論文では、RCNMVのRNA複製複合体と相互作用する宿主タンパク質として同定されたHeat shock protein 70 (Hsp70)の詳細な機能解析を行った。Bimolecular fluorescence complementation法を用いた解析から、Hsp70はp27と結合することが示された。また、Virus-induced gene silencing法やHsp70の特異的機能阻害剤を用いた解析から、Hsp70はRCNMVのRNA複製に必要な宿主因子であることが分かった。さらに、試験			

管内ウイルス翻訳複製系とHsp70の特異的機能阻害剤を用いて、Hsp70がRCNMVのRNA複製複合体が適切に形成されるように制御していることを明らかにした。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

植物ウイルスの大多数を占めるプラスセンスRNAウイルスのゲノムRNA複製はオルガネラ膜上に形成されるRNA複製複合体によって行われる。したがって、RNA複製複合体の性状を理解することは、プラスセンスRNAウイルスの複製機構の解明、さらには、植物ウイルス病の防除法開発に大きく貢献すると考えられる。本論文では、二分節の一本鎖プラスセンスRNAをゲノムとして持つダイアンソウイルスをモデルウイルスとして、RNA複製複合体に焦点を当てた分子レベルの解析を行った。評価すべき点は以下のとおりである。

1. ブルーネイティブゲル電気泳動法 (BN-PAGE) などの生化学的手法を駆使して、ダイアンソウイルスに属する *Red clover necrotic mosaic virus* (RCNMV) のRNA複製複合体を特定の分子量を持つタンパク質複合体として分離・同定することに成功した。
2. BN-PAGEと免疫学的手法を組み合わせることで、RCNMVのRNA複製複合体にウイルスがコードする複製酵素成分タンパク質であるp27とp88が含まれることを証明した。また、質量分析手法を用いて、RCNMVのRNA複製複合体と相互作用する11種の宿主植物タンパク質を同定した。
3. 精製したRCNMVの複製酵素成分タンパク質とその変異体を用いて、p27-p27およびp27-p88相互作用に関わる機能ドメインを同定し、同時に、重複領域を持つウイルス複製酵素成分タンパク質としては初めて、p27とp88が異なる相互作用ドメインを持つことを示した。
4. p27の相互作用ドメインにアミノ酸置換を導入した変異体をBN-PAGEと免疫沈降法を組み合わせることで解析し、p27-p27およびp27-p88相互作用を介したRCNMVのRNA複製複合体の形成過程を明らかにした。
5. Bimolecular fluorescence complementation法を用いて、宿主植物由来のタンパク質であるHeat shock protein 70 (Hsp70)がp27と結合することを示した。また、Virus-induced gene silencing法や特異的機能阻害剤を用いた解析から、Hsp70はRCNMVのRNA複製に必要な宿主因子であることを示した。さらに、試験管内ウイルス翻訳複製系と特異的機能阻害剤を巧く利用することにより、Hsp70がRCNMVのRNA複製複合体形成を制御していることを明らかにした。

以上のように、本論文はダイアンソウイルスのRNA複製複合体の実体を同定し、その形成機構を詳細に解析することにより、プラスセンスRNAウイルスのRNA複製機構におけるいくつかの重要な新知見を提示したものであり、植物病理学および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あるものと認める。

なお、平成23年2月17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。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降