

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	安 夢楠
論文題目	Studies on RNA replication and cell-to-cell movement mechanisms of <i>Red clover necrotic mosaic virus</i> (レッドクローバーネクロティックモザイクウイルスのRNA複製と細胞間移行機構に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>ウイルスは農業上重要な穀類、野菜、果樹、及び家畜などに壊滅的な被害を及ぼす病原体である。しかし、有効な防除法は未だ確立されていない。その大きな要因として、ウイルスの複製機構や細胞間移行機構の解明の遅延が挙げられる。申請者は、マメ科植物に病害をもたらすダイアンソウイルスに属する <i>Red clover necrotic mosaic virus</i>(RCNMV) をモデルウイルスとして用い、ウイルスのゲノムRNA複製と細胞間移行機構を詳細に解析した。</p> <p>ダイアンソウイルスは二分節の一本鎖プラスセンスRNA(RNA1とRNA2)をゲノムとして持つ。RNA1には複製酵素成分タンパク質と外被タンパク質(CP)が、RNA2には細胞間移行タンパク質(MP)がコードされている。RNA1は自らが合成した複製酵素しか複製に用いることはできないが、RNA2はRNA1が合成した複製酵素をトランスに用いて複製することができる。第一章ではRNA2のRNA1と異なる複製メカニズムを解明するため、RCNMVの翻訳及び複製を再現できるタバコ培養細胞BY-2脱液胞化プロトプラスト抽出液(BYL)とプロトプラスト系の二つの実験系を用いて、RNA2の3'-UTRやMPコード領域(ORF)に存在する複製に重要なRNAシス因子を同定した。本論文第二章では、RCNMVの細胞間移行を解明するため、特に宿主タンパク質の細胞骨格タンパク質であるアクチン、チューブリン、及びモータータンパク質であるミオシンに着目し、それらのタンパク質のRCNMVと <i>Tomato mosaic virus</i>(ToMV)細胞間移行における役割を比較解析した。おもな内容は以下のとおりである。</p> <p>1. コンピューター解析によりRNA2の3'-UTRは7つのステムループ構造(SL7~SL13)からなることが推定された。それらのステムループ構造のなかで、SL7、SL8とその基部の</p>			

構造は遺伝子発現に関わるリボスイッチに酷似するY字型構造をとることが予測された。SL11とSL13はRNA1の3'-UTRにも保存されていた。RNA2の3'-UTRに欠損変異やRNAの二次構造を変える塩基置換変異を導入し、BYLとプロトプラストで複製活性を調べた結果、SL7とSL8を含むY字型構造の三つのステム構造とSL8のループの塩基配列、さらにSL10、SL11及びSL13のステム構造とループの塩基配列はRNA2のマイナス鎖合成に重要であることが明らかとなった。

2. RNA2のMP ORF内に存在するトランスアクティベーターであるSL2は、RNA複製、サブゲノムRNA転写、及び粒子化に重要な役割を持つ多機能なステムループ構造である。SL2にRNAの二次構造を変える塩基置換変異を導入し、BYLとプロトプラストで複製活性、及びCPの蓄積量を調べた。その結果、SL2のステム構造は、RNA2の複製過程において、RNA2のマイナス鎖合成に重要であることが分かった。また、SL2下流のSL6のステム構造とループ塩基配列もRNA2のマイナス鎖合成に重要であることが示された。

3. 宿主タンパク質であるアクチン、チューブリン、及びミオシンがRCNMVの細胞間移行における役割を調べるために、アクチン重合阻害剤であるLatB、チューブリン重合阻害剤であるOryzalin、ミオシンATPase阻害剤であるBDMを用いて、RCNMVとToMVの細胞間移行に及ぼす影響を調べた。RCNMVとToMVの細胞間移行はいずれもミオシンに依存し、チューブリンに依存しないことが示された。一方、ToMVの細胞間移行はアクチン依存的であったが、RCNMVはアクチンに対して依存性を示さなかった。本結果から、RCNMVとToMVの細胞間移行はアクチンに対し異なる依存性を持つことが明らかとなった。

4. 宿主のミオシンVIII-1、ミオシンVIII-2、ミオシンXI-K及びミオシンXI-2のそれぞれの機能をdominant negative inhibition(DNI)により特異的に阻害し、RCNMVとToMVの細胞間移行に与える影響を調べた。ミオシンXI-Kの機能阻害において、RCNMVとToMVの細胞間移行が顕著に阻害された。また、ミオシンVIII-1とミオシンXI-2の阻害もRCNMVの細胞間移行を阻害した。本結果から、ミオシンXI-K、ミオシンVIII-1、及び

ミオシンXI-2はRCNMVの細胞間移行において重要な役割を果たすことが明らかとなった。

RCNMVの効率的な細胞間移行には、MPの原形質連絡(PD)への局在とcortical punctuate structure(CPS)の形成が関係することが知られている。そこで、ミオシンVIII-1、ミオシンVIII-2、ミオシンXI-K、及びミオシンXI-2のMPのPD局在性とCPS形成との関係を調べた。四種のミオシンのDNIによる機能阻害はMPのPDへの局在に影響しなかった。一方、ミオシンVIII-1の機能阻害はCPSの形成を阻害した。本結果から、RCNMVの細胞間移行における様々なステップに、異なるミオシンが特異的に関与していることが示唆された。

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)

植物ウイルスの宿主への感染は、一細胞でのウイルスゲノム複製と増殖、その後の細胞間移行からなる。しかし、いずれの機構もその全容は未だ解明されていない。本論文では、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属の *Red clover necrotic mosaic virus*(RCNMV) をモデルウイルスとして用い、ウイルスゲノムRNA複製機構を *in vitro* と細胞レベルで詳細に解析するとともに、ウイルスの細胞間移行機構を植物体レベルで解析した。評価すべき主な点は以下の通りである。

1. RCNMV RNA2の3'非翻訳領域(3'-UTR)に存在するリボスイッチに類似するY字型RNA構造とその下流に存在するいくつかのRNA構造はRNA2のマイナス鎖合成に重要であることを明らかにした。
2. MP ORF内のトランスアクティベーターであるSL2とその下流のSL6の二つのRNA構造はRNA2のマイナス鎖合成に重要であることを明らかにした。また、SL2のステムの塩基配列がRNA合成とサブゲノム合成いずれにも重要であることを示した。
3. 宿主タンパク質であるアクチン、チューブリン、ミオシンの阻害剤処理から、RCNMVと *Tomato mosaic virus*(ToMV) の細胞間移行はいずれもミオシンに依存し、チューブリンに依存しないことを示した。一方、RCNMVの細胞間移行はToMVと異なりアクチンに依存しないことを示し、細胞間移行におけるアクチンへの依存性がこれらのウイルスで異なることを示した。
4. 植物ウイルスの細胞間移行における知見の乏しかったミオシンの研究から、個々の内在性ミオシンの特異的な機能阻害実験により、特にミオシンXI-KがRCNMVの細胞間移行に重要な役割を果たすことを明らかとした。また、ミオシンVIII-1とミオシンXI-2の機能もRCNMVの細胞間移行において補足的な役割を持つことを示唆した。

以上のように、本論文はダイアンソウイルスのRNA複製と細胞間移行機構をそれぞれ *in vitro*、細胞レベル、植物体レベルで詳細に解析することにより、植物RNAウイルスの複製機構と細胞間移行機構においていくつかの重要な新規の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あるものと認める。

なお、平成24年2月21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