

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	田島 由理
論文題目	Molecular mechanisms of programmed ribosomal frameshifting and cap-independent translation of <i>Dianthovirus</i> (ダイアンソウウイルスのフレームシフト翻訳とキャップ非依存的翻訳の分子機構)		
(論文内容の要旨)			
<p>ウイルスはヒトに病気を引き起こすだけでなく、家畜や農作物にも壊滅的な被害をもたらす農業上重要な病原体である。しかしながら、ウイルスの有効な防除法は未だ確立されていない。その大きな要因の一つとしてウイルスの複製機構解明の遅延が挙げられる。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ウイルス属の<i>Red clover necrotic mosaic virus (RCNMV)</i>をモデルウイルスとして用い、RNAウイルスの遺伝子発現制御機構ならびにキャップ非依存的翻訳機構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> <p>1. ウイルスは様々な方法で自らの遺伝子発現を制御し、宿主細胞内で効率よく複製する。その制御機構の一つに-1フレームシフト翻訳機構が挙げられる。-1フレームシフト翻訳機構とは、翻訳途中にコドンの読み枠が5' 端方向に1塩基ずれ、C末端側の異なるタンパク質が翻訳される機構である。RCNMV RNA1がコードする複製タンパク質p88はp27終止コドン上流で-1フレームシフトが起こり翻訳される。この機構によりp27とp88の量がウイルス複製に適する量に調節されていると考えられる。これまでRNA1の-1フレームシフト翻訳には、p27終止コドン上流の塩基配列及びその数塩基下流に予測されるステムループ構造(BulgeSL)が必要だと報告されていた。本研究では、植物RNAウイルスの翻訳と複製を試験管内で再現できるタバコBY2細胞脱液胞化プロトプラスト抽出液(BYL)を用いてRNA1変異体の解析を行い、RCNMV RNA1の-1フレームシフト翻訳に必要なRNA因子(3'SLCsSL)を新たにRNA1の3' 端非翻訳領域(UTR)に同定するとともに、3'SLCsSLのループとBulgeSL内のバルジとの塩基対形成が-1フレームシフト翻訳に必要なことを示した。</p> <p>2. 宿主のmRNAとは異なり、植物RNAウイルスの多くはゲノムにキャップ構造やポリA配列を持たず、独自の戦略により翻訳を行う。しかし、その詳細な機構は明らかでない。RCNMVのゲノムRNAにはキャップ構造とポリA配列は存在せず、翻訳はキャップ非依存的に行われる。RNA1には複製タンパク質と外被タンパク質が、RNA2には移行タンパク質がコードされている。これまでに、RNA1の翻訳に必要なRNA因子と宿主因子(PABP)が同定されている。一方、RNA2にはそれらのような因子は見つかっておらず、翻訳はRNA2の複製とリンクして行われる。本研究では、翻訳開始因子eIF4F(eIF4E+eIF4G)またはeIFiso4F(eIFiso4E+eIFiso4G)に変異を持つシロイヌナズナ変異体を用いた遺伝学的解析と試験管内翻訳系での生化学的解析を行い、RCNMVのキャップ非依存的翻訳に必要な翻訳開始因子を同定した。植物体への接種実験の結果から、RCNMVの感染にはeIF4F及びeIFiso4Fが必要であることがわかった。シロイヌナズナ変異体プロトプラストを用いた解析から、eIF4E、eIF4G及びeIFiso4G2がRCNMVの複製に必要なことが分かった。プロトプラストでのルシフェラーゼアッセイ及び、翻訳開始因子を除いたBYLと翻訳開始因子のリコンビナントタンパク質を用いてRNA1の翻訳を試験管内で再構成した実験から、RNA1の翻訳にはeIF4EとeIF4Gが必要であることが分かった。一方、複製タンパク質を発現するプラスミドとRNA2をプロトプラストに共接種することにより、RNA1の翻訳に依存せずRNA2の翻訳を解析し、RNA2のキャップ非依存的翻訳には</p>			

eIFiso4EとeIFiso4G1が必要であることを示した。本結果から、RCNMVはRNA1とRNA2の翻訳に異なる翻訳開始因子を用いることが示された。異なる翻訳開始因子を用いて翻訳を行うことにより、RCNMVは宿主植物への感染ステージに応じて遺伝子発現を制御していることが示唆される。

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)

ウイルスが宿主に全身感染するためには、一細胞内でウイルスの遺伝子の発現を適切に制御し、ウイルスゲノムの複製や隣接細胞への移行を効率よく行う必要がある。しかし、いずれの過程もその全容は未だ解明されていない。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イルスをモデルウイルスとして用い、植物 RNA ウイルスの遺伝子発現制御機構とキャップ非依存的翻訳機構に焦点を当て、解析を行った。評価すべき主な点は以下の通りである。

1. 植物 RNA ウイルスの翻訳と複製を再現できる *in vitro* 系である BYL とウイルス変異体解析を組み合わせ、ダイアンソウイルスに属する *Red clover necrotic mosaic virus (RCNMV) RNA1* にコードされる複製タンパク質 p88 の翻訳 (-1 フレームシフト翻訳) を制御する RNA 因子を新たに同定した。また、本研究で同定した RNA 因子と既知の RNA 因子が塩基対を形成することにより -1 フレームシフト翻訳を制御していることを明らかにした。

2. モデル植物であるシロイヌナズナの種々の変異体を用いて遺伝学的な解析を行い、翻訳開始因子複合体である eIF4F 及び eIFiso4F が RCNMV の感染に必要であることを示した。

3. シロイヌナズナ変異体由来のプロトプラストを用いた解析から、eIF4E、eIF4G 及び eIFiso4G2 が一細胞レベルでの RCNMV の複製に必要であることを明らかにした。さらに、シロイヌナズナ変異体プロトプラストを用いた遺伝学的解析と試験管内翻訳系を用いた生化学的解析を組み合わせ、RNA1 のキャップ非依存的翻訳には eIF4E と eIF4G が必要であることを示した。

4. シロイヌナズナ変異体由来のプロトプラストを用いて、RNA1 の翻訳と切り離して RNA2 の翻訳を解析し、RNA2 のキャップ非依存的翻訳に必要な翻訳開始因子として、eIFiso4E と eIFiso4G1 を同定した。これらの結果から、分節ゲノムを持つウイルスがゲノム間で異なる翻訳開始因子を用いて翻訳を行うという新規な現象を見いだした。

以上のように、本研究はダイアンソウイルスの -1 フレームシフト翻訳機構ならびにキャップ非依存的翻訳機構を詳細に解析することにより、RNA ウイルスの遺伝子発現制御機構及びキャップ非依存的翻訳機構でいくつかの重要な新規の知見を提示したものであり、植物病理学及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 26 年 2 月 14 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。

また、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表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 (学位授与日から 3 ヶ月以内)