

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 農 学 )	氏名	高田 昌汰
論文題目	Studies on the cell-to-cell movement mechanism of red clover necrotic mosaic virus via analysis of intracellular dynamics of double-stranded RNA and movement protein (二本鎖RNAおよび移行タンパク質の細胞内動態解析によるred clover necrotic mosaic virusの細胞間移行機構に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>植物に感染するプラス一本鎖RNAウイルスは、オルガネラ膜由来のウイルス複製の場を形成し、二本鎖RNAを介してゲノムRNAを複製する。複製後、新規に合成されたRNAは原形質連絡を通じて隣接細胞へと運ばれる。この輸送過程は細胞間移行と呼ばれ、移行タンパク質がその中心的役割を担う。移行タンパク質は原形質連絡に局在し、ウイルスRNAが通過できるように原形質連絡を広げることが知られている。また、免疫染色法によって、移行タンパク質は複製中間産物である二本鎖RNAを含むウイルス複製の場に局在することが明らかとなっている。このような移行タンパク質の細胞内の局在性は細胞間移行において重要であると推察される。しかし、移行タンパク質が複製の場へと局在する具体的な意義や異なる細胞内局在を可能にする機構の分子基盤は不明である。本研究では、植物ウイルスであるred clover necrotic mosaic virusの移行タンパク質に焦点を当て、移行タンパク質や複製の場を示す二本鎖RNAの細胞内動態などを解析し、移行タンパク質の細胞内局在機構および当該タンパク質の局在の生物学的意義を解明することを目指した。</p> <p>第1章では、近年開発された二本鎖RNAレポーター植物(B2:GFP植物)を用い、ウイルス複製時のウイルス二本鎖RNAの詳細な細胞内局在を解析した。B2:GFP植物にウイルスRNAを接種し、経時的に観察を行った。感染初期に表皮細胞の表層に微小な構造体が観察され、時間の経過とともにサイズが増大し、核と同程度の大きさの凝集構造が形成されることが明らかとなった。また、これらの二本鎖RNAの構造体は複製の場を形成する複製タンパク質p27と共局在し、複製の場を示すことが明らかとなった。続いて、二本鎖RNAの構造体が細胞内を移動することから、移行タンパク質が二本鎖RNAの構造体を輸送するという仮説を立てた。そこで、移行タンパク質を発現しない変異体を接種したところ、二本鎖RNAの構造体は野生型と同様に凝集することが確認され、二本鎖RNAの構造体の凝集は移行タンパク質を必要としないことが明らかとなった。さらに二本鎖RNAと移行タンパク質の局在関係を明らかにするため、B2:GFP植物に蛍光タンパク質を付加した移行タンパク質を発現する組換えウイルスRNAを接種し、観察を行った。高倍率での顕微鏡観察から、移行タンパク質および二本鎖RNAの構造体はたがいに独立した微小な構造体を形成することが明らかとなった。一方、低倍率でも観察可能である二本鎖RNAの構造体が凝集したものでは、移行タンパク質が共局在することが明らかとなった。これらの結果から、感染初期に二本鎖RNAを含むウイルス複製の場は移行タンパク質と独立して微小な構造体を形成し、移行タンパク質に依存せず融合し、凝集体を形成する過程で移行タンパク質を取り込んで共局在するようになることが示唆された。</p> <p>第2章では、まず初めに、移行タンパク質の原形質連絡への局在に関わる植物の輸送経路を探索した。その結果、アクチン-小胞体ネットワークおよび小胞体-ゴルジ体小胞輸送のいずれにも依存せず、移行タンパク質は原形質連絡へ局在することが示唆された。続いて、移行タンパク質の細胞内局在に重要な機能領域やアミノ酸残基の探索を行った。膜貫通ドメインやシグナル配列が予測されなかったことから、タンパク質間相互作用に関わるとされる<math>\alpha</math>-helix領域に注目し、解析を行った。予測ツールによって移行タンパク質内には5つの<math>\alpha</math>-helixが予測された。各<math>\alpha</math>-helix内に変異を導入した移</p>			

行タンパク質の機能解析から、1番目の $\alpha$ -helix内にある11番目のロイシンおよび3番目の $\alpha$ -helix内にある182番目のスレオニンをアラニン置換した変異移行タンパク質が複製の場への局在性を失うことが分かった。また、2番目の $\alpha$ -helix内にある50番目のアスパラギン酸のアラニン置換変異を持つ移行タンパク質は原形質連絡への局在性を失うことが分かった。さらに、いずれの変異体も細胞間移行能の有意な低下を示した。したがって、これらのアミノ酸残基の細胞内局在への重要性が明らかとなるとともに、移行タンパク質が原形質連絡および複製の場へ局在することはウイルスの細胞間移行にとって重要であることが明らかとなった。今後、野生型の移行タンパク質と局在性を失った変異移行タンパク質の相互作用因子の比較解析を進めることで、移行タンパク質の異なる細胞内局在を可能にするメカニズムの更なる解明が期待される。

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)

植物ウイルスは原形質連絡を通じて、感染細胞から隣接する細胞へと感染を広げる。この移行過程は細胞間移行と呼ばれ、ウイルスが持つ移行タンパク質がその中心的な役割を果たす。移行タンパク質は原形質連絡およびウイルス複製の場に局在することが知られているが、その局在機構や生物学的意義は不明であった。本研究では、移行タンパク質の細胞内局在機構を明らかにすることを目的として、red clover necrotic mosaic virus(RCNMV)の移行タンパク質とウイルス複製中間産物である二本鎖RNAの細胞内動態に注目し、そのメカニズムおよび生物学的意義の解明に取り組んでいる。まず、本研究は複製の場を示す二本鎖RNA構造体が感染の進行とともにダイナミックに細胞内を移動し、凝集することを明らかとした。さらに、この凝集と移行タンパク質との共局在が関連することを示唆した。そして、移行タンパク質内のアミノ酸残基の変異体解析から、原形質連絡および複製の場への局在に重要なアミノ酸残基を同定することに成功している。本研究の評価できる点は以下の通りである

1. 二本鎖RNAレポーター植物を利用することにより、感染初期に二本鎖RNAおよび移行タンパク質の微小な構造が互いに独立して形成され、時間が進行するにつれ凝集し、共局在するという動態を初めて明らかにした。
2. 細胞骨格の阻害剤および輸送関連タンパク質のドミナントネガティブ型を用いた阻害実験から、RCNMVの移行タンパク質は既報とは異なる輸送系を用いて原形質連絡に局在することを示唆した。
3. 移行タンパク質内の原形質連絡および複製の場に局在するために重要なアミノ酸残基を初めて同定し、さらにこれらの局在がウイルスの細胞間移行に重要であることを明らかにした。また、原形質連絡への局在とウイルス複製の場への局在には移行タンパク質内の異なる領域が関与していることを明らかにした。

以上のように、本論文は移行タンパク質に焦点を当て、その細胞内局在に重要なアミノ酸残基を同定し、さらに同タンパク質がウイルスの複製の場に局在するまでの過程と両者が共局在することの生物学的意義を明らかにすることに成功している。これらの成果は、植物ウイルスの細胞間移行機構について、新たな知見を得ることに成功しており、植物病理学、ウイルス学の発展に寄与することが大きい。

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、令和6年1月22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) 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）