

(続紙 1)

京都大学	博士（ 農 学 ）	氏名	SARAWANEYARUK SIRIRUK
論文題目	Studies on Cap-independent Translation and RNA Replication Mechanisms of <i>Dianthovirus</i> (ダイアンソウウイルスのキャップ非依存性翻訳とRNA複製機構の研究)		
(論文内容の要旨)			
ウイルスは農業上重要な穀類、野菜、果樹、また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。その大きな要因のひとつとして感染細胞でのウイルスの複製機構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、ウイルスが宿主に感染する際にたどる最初の過程である翻訳と複製機構を詳細に解析した。 ダイアンソウ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がコードされている。RNA1とRNA2の5'末端と3'末端にはそれぞれキャップ構造とポリ(A)配列が存在しない。RNA1の3'非翻訳領域（3'-UTR）にはキャップ構造に変わるRNA因子（3' TE-DR1）が存在する。本論文では、特にウイルスタンパク質の翻訳とプラス鎖RNA合成の開始領域であるRNA1の5'-UTRに着目し、そのキャップ非依存性翻訳、RNA複製、RNA安定性、及び3'-UTRとの相互作用における役割を解析し、それらに関わるRNA配列、及び推定RNA二次構造を明らかにした。その主な内容は以下のとおりである。 1. コンピューター解析によりRNA1の5'-UTRは4つのステムループ構造（SL1～SL4）からなることが推定された。RCNMV RNA 1 の5'-UTRと3'-UTRを持つルシフェラーゼリポーターmRNA（R1-Luc mRNA）の5'-UTRに様々な変異を導入し、翻訳活性を調べた。SL1～SL4はタバコBY2プロトプラストにおけるキャップ非依存性翻訳に必須であった。一方、ササゲプロトプラストにおいてはSL1～SL4はいずれもキャップ非依存性翻訳に必須でなく、さらに非ウイルス配列（3～63塩基）を5'-UTRとして持つ変異R1-Luc mRNAは野生型の35～50%のキャップ非依存性翻訳活性を示した。これらの結果から、3' TE-DR1依存キャップ非依存性翻訳におけるRNA1の5'-UTRの役割は宿主細胞によりその要求性が大きく異なることが分かった。 2. RNA 1 の5'-UTRと3'-UTRにはRNA-RNA相互作用が可能ないくつかの配列が存在し、これらのRNA-RNA相互作用が3' TE-DR1依存キャップ非依存性翻訳に必要である可能性が示唆されていた。R1-Luc mRNAを用い、ウイルスUTRのRNA配列に様々な変異を導入し、翻訳活性を調べた。その結果、3' TE-DR1依存キャップ非依存性翻訳には5' UTR と3' UTR 間のRNA-RNA相互作用が必ずしも必要で			

ないことが示唆された。

3. R1-Luc mRNAの5'-UTRに導入した変異がRNA安定性とキャップ非依存性翻訳活性に及ぼす影響を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で調べた。キャップ機能を持たないApppGキャップを付与するとSL2、SL3、SL4に導入した様々な変異のキャップ非依存性翻訳への影響がBY2プロトプラストで完全に相殺されたが、SL1構造の変異はApppGキャップ付与で相殺されなかった。これらの結果から、SL2、SL3、SL4はRNAの安定性に重要であること、そして、SL1は安定性に加えキャップ非依存性翻訳機構そのものに重要であることが示唆された。
4. RNA1から転写されるCPサブゲノムRNA (CPsgRNA) は3' TE-DR1依存キャップ非依存性翻訳機構によりCPを発現する。CPsgRNAの5'-UTRには複雑なRNA二次構造が予測されない。そこでCPsgRNAの5'-UTRとRNA1の3'-UTRをもつリポーターLuc mRNA (CPsgR-Luc mRNA) の5'-UTRに安定なSL構造を導入し、キャップ非依存性翻訳に及ぼす影響を調べた。安定なSL構造の導入はキャップ非依存性翻訳活性を完全に阻害した。このことから3' TE-DR1依存キャップ非依存性翻訳は、キャップ依存翻訳と同様、5' 端からのリボソームのスキャニングにより進行することが示された。
5. RNA1 5'-UTRに様々な変異を導入し、5'-UTR のRNA1複製における役割をBYL *in vitro*系、ササゲとタバコBY-2プロトプラスト、及び植物体レベルで調べた。その結果、5' 末端から16塩基 (GACAAACGUUUUACCG) を5'-UTRとして持つRNA1 (mutD-RNA1) はササゲとタバコBY-2プロトプラストで野生型RNA1と同様に複製した。また、5' 末端のGACAAACを持たないすべての変異RNA1は複製活性を持たなかった。このことから5' 末端から16塩基 (GACAAACGUUUUACCG) がRNA1の複製に必要且つ十分であることが分かった。さらに、mutD-RNA1をRNA2とともにベンタミアーナタバコ (*Nicotiana benthamiana*) に接種すると、効率よく全身感染した。ただし、5' 末端から22塩基を持つRNA1はササゲプロトプラストでは効率よく複製したが、BY-2タバコプロトプラストでは複製しなかった。このように複製においても5'-UTRに存在するRNA因子の要求性が宿主により異なることが明らかになった。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

全てのウイルスが宿主に感染する際にたどる最初の過程は、一細胞でのウイルスゲノムの複製過程であるが、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をモデルウイルスとして用い、ウイルスタンパク質のキャップ非依存性翻訳機構とゲノムRNA複製機構を*in vitro*系、細胞レベル、植物体レベルで詳細に解析した。評価すべき主な点は以下の通りである。

1. ダイアンソウイルスに属する *Red clover necrotic mosaic virus* (RCNMV)

RNA1の3' 非翻訳領域 (3'-UTR) に存在するRNA因子 (3' TE-DR1) が介在するキャップ非依存性翻訳における5'-UTRの要求性が宿主により異なることを明らかにし、ウイルスの宿主特異性機構解明に重要な情報を提供した。

2. 3' TE-DR1介在キャップ非依存性翻訳に重要であると考えられていた5'-3' RNA-RNA相互作用は必ずしも必要でないことを明らかにした。さらに、ササゲ細胞では3' TE-DR1介在キャップ非依存性翻訳に5'-UTRは必須でないこと示し、3' TE-DR1がリボソームを翻訳開始コドンにリクルートする新たな機構の存在を示唆した。

3. キャップ機能を持たないApppGキャップを用いることにより、3' TE-DR1介在キャップ非依存性翻訳とRNA安定性における5'-UTRの役割とその領域を明らかにした。キャップ構造を持たないRCNMV RNA1の安定性に5'-UTRの全領域が重要であること、ただし、5' 端のステムループ構造 (SL1) は3' TE-DR1依存キャップ非依存性翻訳で重要な役割を持つことを示した。

4. 5'-UTRに複雑なRNA二次構造を持たないリポーターLuc mRNA (CPsgR-Luc mRNA) の5'-UTRへの安定な人工SL構造の導入が、キャップ非依存性翻訳活性を完全に阻害することを示し、3' TE-DR1依存キャップ非依存性翻訳は、5' 端からのリボソームのスキャニング機構により進行することを明らかにした。

5. RNA1 5'末端からの16塩基がRNA1の複製に必要且つ十分であることを示した。一方、5'末端から22塩基を持つRNA1はササゲ細胞では効率よく複製するが、BY2タバコ細胞では複製しないことを示し、翻訳と同様、複製においても5'-UTRに存在するRNA因子の要求性が宿主により異な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翻訳及びRNA複製機構を複数の異なる宿主細胞を用いて解析することにより、RNAウイルスの遺伝子発現機構、RNA複製機構、及び宿主特異性決定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、ウイルス学およびRNA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22年9月16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