

氏 名	みずもとひろゆき 水 本 祐 之
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1389 号
学位授与の日付	平成 16 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	農 学 研 究 科 応 用 生 物 科 学 専 攻
学位論文題目	Gene Expression Mechanisms of Dianthovirus (ダイアンソウウイルスの遺伝子発現制御機構)

論文調査委員 (主 査) 教 授 奥 野 哲 郎 教 授 遠 藤 隆 教 授 泉 井 桂

論 文 内 容 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。現在まで、様々なウイルスを用いてゲノム複製機構の研究がなされてきたが、その完全な理解には至っていない。ダイアンソウウイルスは一本鎖プラスセンスRNAをゲノムとして持ち、おもにマメ科植物に感染するウイルスである。ダイアンソウウイルスのゲノムは二分節のプラスセンスRNAからなり、RNA1には複製酵素成分タンパク質と外被タンパク質が、RNA2には細胞間移行タンパク質がコードされている。本論文ではダイアンソウウイルスのゲノムRNA構造とその複製機構及び翻訳機構を詳細に解析するとともに、ウイルスがコードする遺伝子の発現が時間的に制御されていることを示した。その主な内容は以下のとおりである。

1. ダイアンソウウイルス属に属する *Red clover necrotic mosaic virus* (RCNMV) の複製機構を解明するため、RNA1の一細胞での複製過程で温度感受性を示すRCNMVカナダ株 (R-Can) と明らかな温度感受性を示さないRCNMVオーストラリア株 (R-Aus) のキメラRNA1を作成し、温度感受性因子の同定を行った。ダイアンソウウイルスのRNA1とRNA2の3'末端には高度に保存されたステムループ構造が存在する。R-AusとR-CanのRNA1ではその部分に一塩基置換が認められた。この一塩基置換をR-Aus由来のものに置換すると、R-Canの温度感受性が認められなくなったことから、3'末端のステムループ構造はRNA1の複製に必要なシス因子であることが分かった。

2. RCNMVのRNA1とRNA2には、真核生物のmRNA翻訳開始過程で重要な役割を果たすCap構造が存在しないことを明らかにした。Cap構造に依存しない新たな翻訳機構の解明を目指し、ルシフェラーゼをレポーター遺伝子とした翻訳アッセイ系を用いて、RNA1の翻訳に必須なシス因子の解析を行った。その結果、RNA1の3'非翻訳領域 (3'-UTR) がCap非依存的な翻訳に重要な役割を持つことがわかった。3'-UTR内に種々の欠失を導入したところ、3'-UTRの中央領域約130塩基がcap非依存的な翻訳に必須であった。この領域には5つのステムループ構造 (SL1, SL2, SL3, SL4とSL5) の存在が予測された。塩基配列の比較から、SL1はダイアンソウウイルス属だけでなく近縁のルテオウイルス属のウイルスにも保存された構造であった。SL1のループ部分の塩基を置換したところ、RNA1のCap構造に依存しない翻訳活性は失われた。

3. RNA1と同様に、RCNMV RNA2の翻訳機構をルシフェラーゼをレポーター遺伝子とした翻訳アッセイ系を用いて調べたところ、RNA2の翻訳はRNA1によって活性化されることが明らかになった。このようなRNA2の翻訳活性化にはRNA1がコードする複製酵素成分タンパク質が必要であった。ルシフェラーゼ活性の経時的な変化を調べたところ、RNA1の翻訳活性はプロトプラストに接種直後から認められたのに対し、RNA2の翻訳活性はRNA1の存在下で接種4時間後から認められた。またRNA1から合成されるサブゲノムRNAの翻訳活性はRNA2の存在下で接種8時間後から認められた。以上の結果より、RCNMVがコードするタンパク質の発現はRNAの転写過程と翻訳過程の両方で制御されていることが明らかになった。

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。本論文では、植物RNAウイルスであるダイアンソウイルスのゲノム末端構造を明らかにするとともに、一細胞でのゲノムRNA複製機構とタンパク質翻訳機構を詳細に解析し、ウイルスがコードする遺伝子の発現が時間的に制御されていることを見出したものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1. ダイアンソウイルスのゲノムRNAは二分節の一本鎖プラスセンスRNAからなる。RNA1にはウイルスの複製酵素成分がコードされているため、複製に必要なシス因子の解析は従来困難であった。本論文では温度感受性変異体を用いることにより、RNA1の3'末端に存在するステムループ構造がRNA1の複製に必要なシス因子であることを初めて同定した。

2. ダイアンソウイルスのゲノムRNAの5'末端にはcap構造が存在すると報告されていた。本論文では、cap構造に特異的な抗体を用いた実験及び塩基配列の解析から、ダイアンソウイルスのゲノムRNA1とRNA2の5'末端にはcap構造が存在しないことを見出し、従来の報告を訂正した。さらに、RNA1の3'非翻訳領域にはRNA1のcap構造とpoly(A)配列に依存しない翻訳に必要なシス因子が存在することを見出した。

3. ダイアンソウイルスのゲノムRNA2は、RNA1とは異なる機構で翻訳されることを見出した。さらにRNA1がコードする複製酵素成分タンパク質はRNA2の翻訳を活性化させる機能を持つことを見出した。翻訳活性の経時的な観察から、RNA1とRNA2およびRNA1から合成されるサブゲノムRNAの翻訳は時間的に調節されていることを示した。

以上のように、本論文はダイアンソウイルスの一細胞でのRNA複製機構および翻訳機構をゲノムRNA構造との関係において詳細に調べることにより、RNAウイルスの遺伝子発現制御機構で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、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16年1月15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。