

氏 名	たけ だ あつ し 竹 田 篤 史
学位の種類	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1417 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	Analysis of Plant Virus Movement Proteins and RNA Silencing Suppressors (植物ウイルスの移行タンパク質およびRNAサイレンシングサプレッサーの解析)
論文調査委員	(主 査) 教 授 奥 野 哲 郎 教 授 遠 藤 隆 教 授 西 岡 孝 明

論 文 内 容 の 要 旨

植物がウイルスに感染し病気になるとき、ウイルス感染は植物体全身に拡大している。ウイルス感染の拡大機構については、様々なウイルスを用いて研究が行われてきたが、その完全な理解には至っていない。本論文では、植物ウイルスの感染過程において、「ウイルスがどのように細胞間および組織間を移行するのか」、また、「宿主のウイルス抵抗性機構のひとつであるRNAサイレンシングにどのように対抗して感染を拡大させているのか」に着目して研究を行っている。本論文の内容は、以下に示すように大きく三つに分けられる。

1. *Brome mosaic virus* (BMV) は主に単子葉植物に感染するウイルスで、そのゲノムは三分節の一本鎖プラスセンスRNAからなる。BMVのRNA1とRNA2には複製に必要なタンパク質が、RNA3には感染拡大に必要な3aタンパク質と外被タンパク質がコードされている。BMVの3aタンパク質中の感染拡大に重要な部位を同定するために、アラニン置換変異法を用いて感染性実験を行った。その結果、「3aタンパク質の中央領域がBMVの細胞間移行に重要であること」、「3aタンパク質は長距離移行においても重要な役割を果たしていること」および「3aタンパク質は感染植物に誘導する病徴発現に関与していること」が明らかとなった。また、GFPを用いてBMVの細胞間移行を可視化する系を構築し、3aタンパク質のC末端領域に変異をもつ変異体が、野生型よりも効率よく細胞間移行することを見いだした。さらに、これらの変異体は野生型BMVと異なり、外被タンパク質なしでも細胞間移行できることが明らかとなった。この結果は、3aタンパク質中の数アミノ酸の置換によってBMVの細胞間移行形態が変化しうることを示している。

2. 複数のBMV系統を用い細胞間移行形態を調べたところ、いくつかの系統のBMVは、外被タンパク質なしでも細胞間を移行できることを明らかにした。これまで、BMVは外被タンパク質に覆われた粒子の形態で細胞間を移行すると報告されてきたが、この結果は、BMVが移行タンパク質とウイルスRNAの複合体で細胞間を移行できることを示している。通常、同じ科に属するウイルスは同じ移行形態をとると考えられていた。本研究は、ウイルス種間でもその移行形態が異なる場合があることを示した最初の例である。さらに、細胞間移行に外被タンパク質を必要とするBMVの接種実験中に、細胞間移行に外被タンパク質を必要としなくなった変異体を単離することに成功した。この結果は、自然界においても、細胞間移行に外被タンパク質を必要とするBMVから、細胞間移行に外被タンパク質を必要としないBMVが生じたことを示唆している。

3. BMV, *Red clover necrotic mosaic virus* (RCNMV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) の3種の植物RNAウイルスがどのようにRNAサイレンシング機構に対抗しているのかを調べた。BMVのRNAはRNAサイレンシング機構によって分解されることが明らかとなったが、BMVはRNAサイレンシングに対してこれまでに知られているような機構では対抗していないことが示唆された。また、独自の増殖機構をもつRCNMVはRNA1上にRNAサイレンシング抑制遺伝子をもつことが明らかとなった。しかし、RNA1上の既知の3つのタンパク質にはRNAサイレンシングを抑制する活性が認められなかったことから、未知の遺伝子産物が関与している可能性が示唆された。さらに、マイナス鎖ゲノムとしてもつ

TSWVのNSsタンパク質がRNAサイレンシング抑制活性をもつことを明らかにした。このNSsは動植物を通じてマイナス鎖RNAウイルスでは初めて同定されたRNAサイレンシング抑制遺伝子である。逆位反復配列を用いたRNAサイレンシング抑制実験の結果、NSsタンパク質は植物のRNA依存RNAポリメラーゼによって二本鎖RNAが合成される過程を阻害することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

植物がウイルスに感染し病気になるとき、ウイルス感染は植物体全身に拡大している。本論文では、植物RNAウイルスである*Brome mosaic virus* (BMV), *Red clover necrotic mosaic virus* (RCNMV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV)を用いて、植物ウイルスの感染拡大過程において重要な働きをしている移行タンパク質、外被タンパク質およびRNAサイレンシング抑制タンパク質の役割について解析し、いくつかの新たな知見を得ている。評価すべき点は以下のとおりである。

1. 三分節の一本鎖プラスセンスRNAをゲノムとして持つBMVは、RNA3に細胞間移行に必要な移行タンパク質と外被タンパク質をコードしている。BMVの細胞間移行は、外被タンパク質によってウイルスRNAが包み込まれたウイルス粒子の形態で起こるとこれまで考えられていた。本論文では、変異導入法を用いてBMV感染に重要な移行タンパク質の部位を明らかにするとともに、移行タンパク質のC末端に変異をもついくつかの変異体が、細胞間移行に外被タンパク質を必要としなくなったことを明らかにした。この結果から、BMVの細胞間移行形態は、移行タンパク質中の数残基のアミノ酸置換で変わることが示された。

2. BMVには異なった地域と異なった植物種から分離されたいくつかの系統が存在するが、これまでの研究は、主に、このうちの1系統を用いて行われてきた。本論文では、複数のBMV系統を用いてそれらの細胞間移行形態を調べた。その結果は、いくつかのBMV系統は細胞間移行に外被タンパク質を必要としないことを示した。このことから、同一ウイルス種内においてもウイルスの細胞間移行形態が異なることが明らかとなった。さらに、本論文では、細胞間移行に外被タンパク質を必要とするBMVの接種実験を繰り返し行い、細胞間移行に外被タンパク質を必要としなくなった変異体を単離することに成功した。このことは、自然界において、細胞間移行に外被タンパク質を必要としないBMV系統が外被タンパク質を必要とするBMV系統から生じたことを示唆するものである。

3. BMV, RCNMV, TSWVを用いて、新規のRNAサイレンシング抑制遺伝子の探索を行い、RCNMVのRNA1, およびTSWVのNSs遺伝子にRNAサイレンシング抑制活性があることを明らかにした。TSWVのNSs遺伝子は、マイナス鎖RNAをゲノムとして持つウイルスでは動植物を通じて初めて同定されたRNAサイレンシング抑制遺伝子である。さらに、NSs遺伝子について解析を行った結果、NSs遺伝子はRNAサイレンシング経路の中で、植物のRNA依存RNAポリメラーゼ等によって二本鎖RNAが合成されるより前の過程を阻害していることが示唆された。

以上のように、本論文は、植物ウイルスの感染拡大に関わる因子の解析を行い、その機構についていくつかの重要な新知見を提示しており、植物病理学およ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16年2月13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。