

氏 名	トリ アスミラ ダマヤンティ Tri Asmira Damayanti
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1241 号
学位授与の日付	平成 14 年 3 月 25 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	Studies on Generation, Amplification, and Packaging of <i>Brome mosaic virus</i> Defective RNAs (プロモモザイクウイルス欠損 RNA の発生, 増幅及び粒子化に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 奥 野 哲 郎 教 授 西 岡 孝 明 教 授 泉 井 桂

論 文 内 容 の 要 旨

プロモモザイクウイルス (BMV) は, 3 分節の一本鎖プラスセンス RNA (RNA1, RNA2 と RNA3) をゲノムとして持つ球形 RNA ウィルスである。一般に, ウィルスは, ゲノムが RNA, DNA に関わらず, ゲノムの一部あるいはその大部分が欠失した小さな RNA 又は DNA 分子を持つことが知られている。これらの分子は, 複製と粒子化に必要なシス配列を持っており, 欠損 RNA (D-RNA) あるいは欠損 DNA と呼ばれる。また, ウィルスゲノムの複製に干渉する場合は欠損干渉 RNA あるいは欠損干渉 DNA と呼ばれる。いくつかの植物 RNA ウィルスにおいても D-RNA の存在が報告されているが, BMV での D-RNA の存在は本研究で発見されるまでは知られていなかった。本研究では, D-RNA の発生機構及び生物学的性質を解析するとともに, D-RNA の性質を利用して, これまでほとんど明らかにされていない球形 RNA ウィルスの植物細胞内での粒子化に重要な役割を果たす RNA 塩基配列と 2 次構造を明らかにしたものである。

第一章では, 接種 8 週間後の BMV 感染オオムギ葉から純化したウィルス粒子の RNA を分析し, 通常粒子に含まれるゲノム RNA1,2,3 と外被タンパク質 (CP) をコードするサブゲノム RNA4 の 4 種の RNA 以外に RNA3 より小さく RNA4 より大きい RNA が存在することを示した。本 RNA を BMV D-RNA (以下 D-RNA) と命名した。D-RNA は, 感染初期には発生せず, 感染後期 (接種 8 週間以上) の感染葉で生じること, また, D-RNA はゲノム RNA とともにオオムギに接種しても維持されず, *de novo* に生じること示した。ただし, D-RNA はオオムギプロトプラストでは効率よく複製し粒子化された。塩基配列の解析結果から, D-RNA は, RNA3 の 3a タンパク質遺伝子 ORF の約 500 塩基が欠損した分子で, RNA3 から生じたこと, また, 欠損の生じる領域はほぼ一定であるが, 感染細胞中では D-RNA はヘテロな分子集団で存在していることを示した。欠損領域周辺の塩基配列を解析し, D-RNA の発生機構は鋳型スイッチングモデルで説明できることを示唆した。

第二章では, 発生する D-RNA は, すべて RNA3 の 3a タンパク質遺伝子 ORF の中央約 500 塩基が欠損した分子であることを明らかにした。このことは, 欠損領域以外の領域は D-RNA の複製と粒子化に必要なであることを示唆した。そこで, 3aORF の様々な領域に同様の約 500 塩基の欠損を導入して 6 種類の人工 D-RNA (AD-RNA) を作り, RNA1,2 とともにオオムギプロトプラストに接種し, AD-RNA の複製と粒子化に必要な領域を調べた。CP を発現しない AD-RNA は, いずれも RNA3 と同程度に蓄積し, 欠失は AD-RNA の複製と安定性には影響しなかった。しかし, CP 存在下では, 3aORF の 3' 領域を欠失した AD-RNA の蓄積量が顕著に減少したことから, 3aORF の 3' 領域は粒子化そのものに必要なシス配列を含んでいることを示した。AD-RNA を RNA1,2,3 とともに接種し, RNA3 との競合を調べると, 3aORF の 5' 領域を欠失した AD-RNA も 3' 領域を欠失した AD-RNA と同様にその蓄積量が顕著に減少した。このことから 3aORF の 5' と 3' 領域は複製において RNA3 との競合で必要であることを明らかにした。

第三章では, 粒子化に必要なシス配列をさらに限定するために, RNA3 の様々な領域に 69 塩基あるいは 66 塩基を欠失した AD-RNA を作製し, 先と同様の実験を行った。その結果, 3aORF の 3' 領域 (RNA3 の塩基 867 から 933 の 66 塩基) を

欠失した AD-RNA の蓄積量が顕著に減少し、RNA3 の塩基867から933の66塩基が RNA3 の粒子化に重要であることを示した。コンピューターによる RNA2 次構造解析から、本領域は2つのステムループ構造を取ることが予想された。そこで、野生型 AD-RNA のこの領域あるいはその周辺に14塩基の置換を導入した3種の AD-RNA を作製し、RNA1,2 とともにオオムギプロトプラストに接種し、粒子画分の RNA を調べると、3' 側のステムループ構造を形成できない AD-RNA の蓄積が顕著に減少していた。このことから、本ステムループ構造が AD-RNA の粒子化に重要な役割を持つことを示唆した。

論文審査の結果の要旨

本論文は、ブロムモザイクウイルス (BMV) でこれまでその存在の知られていなかった欠損 RNA (以下 D-RNA) が存在することをはじめて明らかにし、その生物学的性質と発生機構を解析するとともに、D-RNA の性質を利用して BMV ゲノム RNA3 の複製と粒子化に必要な RNA 配列と2次構造を明らかにした研究であり、その評価すべき点は以下のとおりである。

1. BMV 感染後期のオオムギ葉から純化したウイルス粒子の RNA を分析し、ゲノム RNA3 に由来する欠損 RNA を発見した。D-RNA は、感染後期にのみ発生し、継代感染では維持されないというこれまでに知られていない性質を持つ欠損 RNA であることを明らかにした。

2. D-RNA は、3a タンパク質遺伝子 ORF の中央約500塩基のほぼ均一な領域を欠失しているが、感染細胞中ではヘテロな分子集団で存在していることを示すとともに、欠損領域周辺の塩基配列を解析することにより、鋳型スイッチング機構で D-RNA が発生することを提唱した。

3. 自然界で発生する D-RNA と同様のサイズの欠失を 3aORF の様々な領域に導入した人工 D-RNA (AD-RNA) を作製し、プロトプラストでの複製と粒子化を詳細に解析することにより、自然界で発生する D-RNA が維持している 3aORF の領域は D-RNA の複製と粒子化に必要であることを明らかにした。すなわち、自然界で発生する D-RNA がもつ RNA 構造を生物学的に説明した。

4. D-RNA の性質を利用し、さらに小さな欠失を 3aORF の様々な領域に導入した AD-RNA を作製し、プロトプラストで複製と粒子化を解析することにより、3aORF の3' 領域の約66塩基が BMV ゲノム RNA3 の粒子化に必要であること、さらにその領域に存在するステムループ構造が重要な役割を持つことを示した。

以上のように、本論文は、BMV ではじめて D-RNA を発見し、その D-RNA が感染後期に出現すること、また細胞間移行能を持たないなど、これまでに知られていない新規な性質を持つことを明らかにするとともに、D-RNA の性質を論理的かつ有効に利用することにより、球形 RNA ウイルスである BMV のゲノム RNA3 の粒子化に必要な RNA 領域とその構造を明らかにしたものであり、ウイルス学、植物病理学、植物保護学および 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14年2月21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。