

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	Kusumawaty Kusumanegara
論文題目	Functional Analysis of p27 Auxiliary Replicase Protein in RNA Replication of <i>Red clover necrotic mosaic virus</i> (レッドクローバーネクロティックモザイクウイルス複製酵素補助タンパク質p27のRNA複製における機能解析)		
(論文内容の要旨)			
ウイルスは生きた細胞でしか増殖できない絶対寄生病原体であるため、宿主への感染の成否は、ウイルスが宿主の様々な細胞装置を利用できる能力と宿主の防御機構を抑制あるいは回避できる能力に依存している。プラスセンス(+)RNA ウイルスが宿主植物に効率よく感染するためには、まず侵入した細胞で RNA 複製に必要なウイルスタンパク質を翻訳し、ゲノム核酸の複製の場を形成する必要がある。しかし、ウイルス RNA 複製プロセスの分子機構の詳細についてはほとんど明らかでなく、有効な防除法の開発には至ってない。 本論文では、多くのマメ科植物を自然界の宿主とするダイアンソウイルス属のレッドクローバーネクロティックモザイクウイルス (RCNMV) をモデルウイルスとして用い、植物 RNA ウイルスの感染初期過程における複製補助タンパク質 p27 の機能を詳細に解析した。RCNMV は、5' 末端と 3' 末端に真核細胞 mRNA に見られるキャップ構造とポリ(A)配列が存在しない 2 分子の 1 本鎖プラスセンス RNA (RNA1 と RNA2) をゲノムとして持つウイルスである。複製酵素成分タンパク質である p27 と p88 は RNA1 にコードされている。p88 は p27 のフレームシフト産物として翻訳され、RNA 依存 RNA ポリメラーゼモチーフを持つ。一方、複製補助タンパク質 p27 はウイルス RNA と結合し、RNA の複製の場である小胞体膜へ RNA をリクルートすることが分かっているが、その分子機構の詳細は明らかでない。本論文では p27 の膜結合機能を中心に p27 の RNA 複製における多様な機能を解析した。論文内容は以下の通りである。 1. 機能を保持した緑色蛍光タンパク (GFP) 融合 p27 (p27-GFP) を作成し、p27-GFP の様々な変異体を用いた共焦点顕微鏡観察、膜フローティングアッセイにより、p27 の膜ターゲティングに関わる領域とアミノ酸を解析、同定した。その結果、p27 の N 末端領域の 20 アミノ酸配列 (31 番目から 50 番目) が小胞体膜への局在に必要で、且つ十分であることが明らかになった。また、この膜ターゲティングドメイン (MTD; membrane targeting domain) は、膜との相互作用に重要である両親媒性 α ヘリックス構造をとることが推測された。 2. 膜ターゲティングに必要なアミノ酸変異は RCNMV RNA 複製複合体形成とウイルス RNA 合成を阻害することを示し、RCNMV RNA 複製複合体が小胞体膜上で形成されることを示唆した。 3. MTD には、その変異が膜ターゲティングには影響しないが、RNA 複製複合体形成と RNA 合成を阻害するアミノ酸が存在することを示した。 4. p27 がモノユビキチン化、及びポリユビキチン化されることを明らかにし、ユビキチン化が p27 の機能制御に関わることを示唆した。 以上の結果から、p27は小胞体膜への局在機能を持ち、小胞体膜を改変するとともに、RCNMV RNA複製の様々なステップで重要な役割を果たす多機能タンパク質であることが明らかとなった。			

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

ウイルスの大多数を占める(+)RNAウイルスのゲノムRNA複製はオルガネラ膜上に形成されるRNA複製複合体によって行われる。植物(+)RNAウイルスは、ウイルス特異的に小胞体、葉緑体、ミトコンドリア、ペルオキシソーム、液胞等の膜系を利用してRNA複製を行うことが知られている。その際、膜の性質、膜構造の変化がともなうと考えられるが、その分子機構の詳細については明らかでない。(+)RNAウイルスが誘導する膜構造変化に関わるウイルス因子と宿主因子を明らかにし、その分子機構を解明することは、ウイルスの複製機構の解明、さらには、植物ウイルス病の防除法開発に大きく貢献すると考えられる。本論文では、二分節の一本鎖(+)RNAをゲノムとして持つダイアンソウイルス属の*Red clover necrotic mosaic virus*(RCNMV)をモデルウイルスとして用い、複製補助タンパク質p27の膜ターゲティング、膜リモデリング、及びユビキチン化について分子レベルで解析を行った。評価すべき主な点は以下のとおりである。

1. ウイルスRNA複製下での細胞内局在解析を可能にする機能を保持した緑色蛍光タンパク (GFP) 融合p27 (p27-GFP) の作成に成功し、p27-GFP とその変異体を用いた共焦点顕微鏡観察、膜フローティングアッセイにより、p27のN末端領域の20アミノ酸配列が膜ターゲティングドメイン (MTD) であり、MTDはp27の小胞体膜への局在に必要な且つ十分であることを明らかにした。また、p27のMTDは、膜との相互作用に重要である両親媒性 α ヘリックス構造をとることを示した。
2. p27の膜ターゲティングに必要なアミノ酸における変異はRCNMV RNA複製複合体形成とウイルスRNA合成を阻害することを示し、RCNMV RNA複製複合体が小胞体膜上で形成されることを強く示唆した。
3. MTDには、その変異がp27の膜ターゲティングとは影響しないが、RNA複製複合体形成とRNA合成を阻害するアミノ酸が存在することを示し、p27のMTDはウイルスRNA複製の異なったステップに関わることを明らかにした。
4. p27がモノユビキチン化、及びポリユビキチン化されることを明らかにし、ユビキチン化がp27の機能制御に関わることを示唆した。

以上のように、本論文はダイアンソウイルスのRNA複製複合体構成成分である複製補助タンパク質p27の膜局在性に関わるドメインとアミノ酸を同定し、本ドメインのウイルスRNA複製における膜構造改変と複製複合体形成での役割を明らかにした。このように本研究は、p27が多機能タンパク質であることを示し、ウイルスRNA複製機構解明に向けて多くの重要な知見を提示したものであり、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24年10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。

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