

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	岩川 弘宙
論文題目	Translation and RNA replication mechanisms of <i>Dianthovirus</i> (ダイアンソウウイルスの翻訳とRNA複製機構)		
(論文内容の要旨)			
ウイルスはヒトに様々な病気を引き起こすだけではなく、ヒトの生存に必須な穀物や野菜、また家畜などに壊滅的な被害を及ぼす病原体である。しかしながら、有効な防除法は未だ確立されておらず、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。本論文では試験管内で植物RNAウイルス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、その系内で容易に複製することができる二分節の一本鎖プラスセンスRNAをゲノムとして持つダイアンソウウイルスをモデルウイルスとして用い、RNAウイルスの複製及び遺伝子発現機構を分子レベルで解析した。その内容は以下の通りである。 1. ダイアンソウウイルスに属する<i>Red clover necrotic mosaic virus</i> (RCNMV) RNA1の3'非翻訳領域 (UTR) には相補鎖合成に必要なシス因子の他、翻訳の促進、遺伝子発現制御に必須なシス因子が複雑に絡み合っており、植物体やプロトプラストを用いた変異体解析ではそれらのシス因子を詳細に分けることは困難であった。本論文ではBYLと5'末端にキャップを付加した変異RNA1を組み合わせることにより、RNA1の3'UTRに存在する翻訳に必要なシス因子と複製に必要なシス因子を完全に分けることに成功した。 2. 近年、ウイルス由来の低分子量RNAが宿主の遺伝子発現を制御し、ウイルス感染に有利な宿主環境を作り出すことが知られてきた。本論文ではRCNMV RNA1から3'UTRに由来する低分子量RNA (SR1f)が粒子化され、感染後期の植物細胞に大量に蓄積することを発見した。タバコ培養細胞BY-2及びBYLを用いてSR1fの生成機構及び機能解析を行ったところ、SR1fは、RNA1の3'UTRに存在するシス因子が5'→3'エキソリボヌクレアーゼの分解から3'末端側のRNAを守ることにより生成される分解中間体であり、ウイルスが行うキャップ/ポリ(A)非依存的翻訳と宿主mRNAが行うキャップ/ポリ(A)依存的翻訳を負に制御することが明らかとなった。 3. ウイルス複製酵素は大量に存在する宿主のRNAの中からウイルスRNAを特異的に認識しなければならないが、その機構は未だにほとんど分かっていない。複製酵素によるRCNMVのゲノムRNA認識機構を解析するため、ストレプトマイシンに結合するアプタマー配列 (ストレプトタグ) を付加したRNA1及びRNA2の様々な断片を、BYL内で発現させたウイルス複製酵素と混和し、ストレプトマイシン結合カラムで精製した。その結果、複製酵素はRNA2の3'UTRでのみ精製され、更なる解析より3'UTRに存在するY字型のRNA構造が複製酵素の認識に必要十分であることが分かった。一方複製酵素認識シス因子を持たないRNA1は、複製酵素を翻訳したRNAのみが複製酵素と相互作用することが明らかとなった。 4. ウイルスは様々な宿主タンパク質を利用して効率よく遺伝子発現およびRNA複製を成し遂げる。RCNMVのゲノムRNAに結合し、ウイルスの翻訳またはRNA複製に関わる宿主タンパク質を同定するため、ストレプトタグを融合したウイルスRNA断片を用いてタバコ培養細胞BY-2脱液胞化プロトプラスト抽出液からウイルスRNAに特異的に結合する宿主タンパク質を共精製した。その結果、RNA1及びRNA2に結合する9種の宿主タンパク質を同定することに成功した。その中の一つであるポリ (A) 結合タンパク質はRNA1 3'UTRに存在するアデニンが豊富な領域に結合し、RNA1のキャップ/ポリA非依存的翻訳を促進することが明らかとなった。			

(論文審査の結果の要旨)

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。本論文では植物RNAウイルスの翻訳及び複製を再現できる試験管内系と、その系内で容易に複製することができる二分節の一本鎖プラスセンス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、従来の植物細胞を用いた研究では不可能であった詳細なウイルス複製機構の解析を行った。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に属する*Red clover necrotic mosaic virus* (RCNMV) RNA1とRNA2が効率良く翻訳及び複製できる試験管内系の立ち上げに成功した。
2. 試験管内系と変異体解析を組み合わせることによって、RCNMV RNA1の複製中枢である3'非翻訳領域(UTR)に存在する翻訳に必要なシス因子とRNA複製に必要なシス因子を完全に分けることに成功した。
3. RCNMV RNA1の3'UTRに由来する低分子量RNA (SR1f)の生成機構、及び潜在的な機能を試験管内系で解析した結果、SR1fはRNA1の3'UTRの分解中間体で、ウイルスが行うキャップ/ポリ(A)非依存的翻訳と宿主mRNAが行うキャップ/ポリ(A)依存的翻訳を負に制御するという、新規の低分子量RNAであることを見出した。
4. 複製酵素によるRCNMVのゲノムRNA認識機構を、RNAアプタマーを用いたプルダウンアッセイ、複製酵素-RNA免疫沈降アッセイ、及び試験管内膜分画アッセイによって解析した結果、RNA1とRNA2はそれぞれ、「複製酵素の翻訳と共役した複製酵素認識」と「特異的なシス因子を介した複製酵素認識」という異なる複製酵素認識機構を持つことを明らかにした。
5. RCNMVのゲノムRNAに結合するタバコ培養細胞BY-2脱液胞化プロトプラスト抽出液由来のタンパク質をRNAアプタマー法を用いて精製し、RNA1及びRNA2に結合する9種の宿主タンパク質を同定した。また、同定された宿主タンパク質の一つ、ポリ(A)結合タンパク質がRNA1 3'UTRのアデニンが豊富な領域に特異的に結合し、RNA1のキャップ/ポリA非依存的翻訳を促進す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機構及びRNA複製機構を試験管内で詳細に解析することにより、RNAウイルスの遺伝子発現制御機構およびRNA複製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2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