

氏名 濱松千賀

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第61号

学位授与の日付 平成5年9月30日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻

学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 イネ縞葉枯ウイルスのゲノム構造と遺伝子発現

論文審査委員 主査 教授 堀内賢介

教授 森島啓子

教授 廣瀬進

助教授 佐野芳雄

教授 水本清久（北里大学）

論文内容の要旨

イネ縞葉枯ウイルス(rice stripe virus: RSV)はテヌイウイルスグループの植物ウイルスで、昆虫によって媒介され、イネ科植物に寄生して縞葉枯病を起こす。このウイルスのゲノムは、4分節の一本鎖RNAから構成されており、ウイルス粒子を構成する蛋白質としては、主要外被蛋白と微量成分としてのRNAポリメラーゼのみが検出されている。

イネ縞葉枯ウイルスのゲノムRNAのうち、最長の分節である分節1を除く3つのRNA分節について、その全塩基配列が決定された。(浜松さんは分節2の塩基配列決定に参画した。)その結果、これら3分節の全てについて、ゲノムRNA(vRNA)の5'末端領域とアンチゲノムRNA(cRNA)の5'末端領域のいずれにも、大きなオープン・リーディング・フレーム(ORF)が見いだされた。従って、イネ縞葉枯ウイルスは、アンビセンスゲノムウイルスである可能性が示唆されることとなった。

イネ縞葉枯ウイルスのゲノムRNAが、アンビセンスゲノムとして機能していることを実証する目的で、RNA分節2、3及び4の各ORFを含むcDNAを発現ベクターにクローニングし、T7 RNAポリメラーゼを用いてin vitroで転写させた。合成されたRNAを、ウサギ網状赤血球溶血液またはコムギ胚芽抽出液の2つの無細胞翻訳系を用いて翻訳させたところ、翻訳の効率に多少の差はあったが、どちらの翻訳系でも、各ORFについて塩基配列から予想される大きさの蛋白質が、主要産物として合成された。また、これらの蛋白質のうちvRNAセンスで発現するものについては、ウイルスRNAをin vitroで直接翻訳させたときにも合成されることがわかった。更に、ウイルス粒子の外被蛋白に対する抗体、及び、感染イネ中に蓄積する特異蛋白(Ns蛋白)に対する抗体を用いて、in vitroでの翻訳産物を免疫沈殿させた結果、分節3のcRNAの翻訳産物は外被蛋白であり、分節4のvRNAの翻訳産物はNs蛋白であることが明らかになった。すなわち、異なる分節においては、vRNAとcRNAの両鎖が発現することがわかった。

これらのin vitro実験系での結果をin vivoで検証し、その上で、イネ縞葉枯ウイルスがこのような独特なゲノム構造をとることがどのような意味を持つのかを知る目的で、プロトプラスト感染系を開発することを試みた。ウイルス感染イネ個体を使った生化学的解析は、極めて困難であるが、培

養細胞を使った感染系が確立すれば、ウイルスの増殖を同調させることまでも可能になり、遺伝子発現制御機構の研究には、極めて有効なシステムであると考えられる。

そこで、イネの培養細胞を用いて、これをプロトプラスト化し、主にエレクトロポレーション法を用いて、ウイルス粒子をイネ細胞に強制的に感染させることを試みた。この系で、ウイルス粒子の完全増殖があったか否かは、今のところ明瞭ではない。しかし、ウイルス粒子に対する抗体を用いてウエスタンブロッティングを行うと、感染後2日目以降、外被蛋白の発現は強くなって、新たな外被蛋白の合成があったことが示された。これに反し、Ns蛋白に対する抗体を用いた実験では、目的のバンドを検出することができなかった。このことは、感染ウイルスゲノムRNAを鋳型としてmRNAが合成されたが、cRNAからのmRNA合成は起こらなかったことを示唆している。プロトプラストのなかで、イネ縞葉枯ウイルスの完全な生活環を再現するための感染条件の確立は、今後の課題として残されている。

イネ縞葉枯ウイルスは、そのゲノム構造の特徴とウイルス蛋白の部分的相似性から、動物ブニヤウイルスとの近縁性が指摘されている。しかし、動物ブニヤウイルスではゲノムRNA分節の一部だけがアンビセンスである。イネ縞葉枯ウイルスがブニヤウイルスと共通の祖先ウイルスから分化したものだとなれば、植物を宿主としたウイルスが、より多くのアンビセンス遺伝情報をもっていることは、宿主との相互関係から、このゲノム戦略が適応上有効であったからではないかと考えられる。イネ縞葉枯ウイルスのこのようなゲノム構成と、植物宿主でのウイルス遺伝子の発現制御様式とが、いかに関連しているかは、今後に残された興味ある課題である。

論文の審査結果の要旨

イネ縞葉枯ウイルス(rice stripe virus: RSV)は、昆虫によって媒介され、イネ科植物に寄生して縞葉枯病を起こすウイルスである。そのゲノムは4分節の一本鎖RNAから成り、その内、塩基配列が未決定の分節1を除く3分節の全てについて、ゲノムRNA(vRNA)の5'末端領域とアンチゲノムRNA(cRNA)の5'末端領域のいずれにも、大きなopen reading frame(ORF)が見いだされる。従って、このウイルスのゲノムは、アンビセンスである可能性が示唆される。浜松さんは、この点を実証する目的で、RNA分節2、3及び4の各ORFを含むcDNAを発現ベクターにクローニングし、T7 RNAポリメラーゼを用いてin vitroで転写させ、得られたRNAを無細胞系で翻訳させる実験を行った。その結果、塩基配列から予想される大きさの蛋白質が、各ORFから合成されることが示された。更に、ウイルス粒子の外被蛋白と、感染イネ中に蓄積する特異蛋白(Ns蛋白)に対する抗体を用いて、in vitroでの翻訳産物を免疫沈殿させる実験を行うことにより、分節3のcRNAの翻訳産物は外被蛋白であり、分節4のvRNAの翻訳産物はNs蛋白であることを明らかにした。かくして、異なる分節においてではあるが、vRNAとcRNAの両鎖が発現することが証明された。これらの結果は、RSVゲノムがアンビセンスであることを極めて強く示したものであり、ウイルスの増殖機構や進化過程の研究に重要なデータを提供するものである。更に、これらのin vitro実験系での結果をin vivoで検証する目的で、イネ培養細胞感染系の開発を試みた。ウイルス粒子の完全増殖は未成功であるが、細胞内でウイルス外被蛋白の合成があったことが示された。浜松さんの提出した論文は博士論文としての条件を満たすものであることを、審査員全員一致で認めた。

なお、博士論文に関わる専門分野並びにその関連分野に関する学識、及び独立の研究者として必要なその他の能力について口述試験を行ったところ、浜松さんの応答は極めて満足すべきもので、この分野全般にわたって十分な知識をもつことが明かであった。この結果、審査委員全員一致して、浜松さんが学位授与に足る学識と能力を持つとの結論に達した。