

学 位 論 文 題 名

イネ黒条萎縮ウイルスゲノムの構造解析

学位論文内容の要旨

植物レオウイルスは、*Phytoreovirus* 属、*Fijivirus* 属及び未分類（rice ragged stunt virus グループ）の三つのグループに分類されている。イネ黒条萎縮ウイルス(RBSDV)は、*Fijivirus* 属に分類されており、ウンカによって主にイネ、ムギ類及びトウモロコシなどのイネ科植物に伝搬されるウイルスであり、10本に分節した2本鎖(ds) RNA をゲノムとしている。本研究は、RBSDV ゲノムの構造及びゲノムのコードする蛋白質の機能を解明する目的で cDNA ライブラリーを作製し、セグメント1 (S1), S7, S8, S10, の制限酵素地図を作製し、更に S7, S8, S10については全塩基配列を決定するとともに、S7のコードする蛋白質を大腸菌体内に於いて発現させた。また、ゲノム dsRNA を直接解析することにより全セグメントの末端領域の構造を決定し、他の *Reoviridae* 科のウイルスの構造と比較した。

1) RBSDV の純化法の改良

従来の純化法ではウイルス収量が低かったため、純化法の改良を行った。本研究により改良した純化法では従来用いられていた方法に比べ、有機溶媒の四塩化炭素を使用せず、また操作手順が簡略化されたため、純化に要する時間が短縮でき、ウイルス収量は従来の方法の4倍量に増加した。また、従来トウモロコシ標品より安定したポリメラーゼ活性が認められなかったが、本法によってトウモロコシ標品からも高く安定なポリメラーゼ活性を得ることができ、ゲノム dsRNA 及び転写 ssRNA を安定して得ることが初めて可能となった。

2) cDNA ライブラリーの作製

cDNA クローニングはゲノム dsRNA 及び、転写 ssRNA を鋳型とする方法により行った。作製した cDNA クローンは、ゲノムとのハイブリダイゼーションによりセグメント対応を決定した。その結果、全セグメントの cDNA クローンが作製でき、これらを用いて各セグメントを特異的に検出する方法を検討した。プラスミドベクター pBR322 の cDNA 挿入部位を挟んだ塩基配列15マーをプライマーとし、反応基質中に α - 32 P [dCTP] を混入させて Polymerase Chain Reaction (PCR) を行いプローブを作製した。本法は一度に数多くの種類のプローブ作

製が容易であり、作製したプローブはアルカリノーザンブロットハイブリダイゼーションによって、対応するセグメントのみを特異的に検出した。

3) RBSDV ゲノムの構造解析

① S 1 の制限酵素地図の作製

ゲノムとのハイブリダイゼーションにより選抜した S 1 の cDNA クローン(pRB12, pRB90, pRBC 2) の制限酵素地図を作製した。3 クローンはそれぞれ同様の制限酵素認識部位を持っており、それらの部位で重複するものと考えられた。これら 3 クローンの cDNA 部位は約4000塩基対であった。この値は電子顕微鏡による塩基数の測定、及びゲノムの分子量から測定された塩基数よりも大きいことより、cDNA は S 1 のほぼ全領域を占めているものと推定された。

② S 10, S 8 及び S 7 の全塩基配列の決定

それぞれのセグメントに対応したほぼ全長の cDNA クローンを用いて、ダイデオキシ法により塩基配列を解析した。末端領域の塩基配列は RNA の解析（プライマーシーケンス法）により決定し、3 セグメントの全塩基配列を決定した。解析の結果、S 10は1801塩基対から構成され、558アミノ酸残基から構成される推定分子量63.2Kの蛋白質をコードし、S 8は1927塩基対から構成され、591アミノ酸残基から構成される推定分子量68.1Kの蛋白質をコードしていた。S 10及び S 8 の決定した塩基配列から得られたアミノ酸配列は、*Phytoreovirus* 属の wound tumor virus (WTV) S 6 及び S 10のアミノ酸配列と各々相同性が認められた。S 7は、2192塩基対から構成されており、それぞれ離れた領域に2つの ORF が検出された。また、決定した塩基配列は *Fijivirus* 属の maize rough dwarf virus (MRDV) S 6 の塩基配列と85%の相同性が認められ、ゲノム上の ORF の分布も同様で、コードするアミノ酸配列も ORF 1 では90.9%, ORF 2 では85%相同であり、これら2つのゲノムのコードする蛋白質は同様の機能を持つことが示唆された。

③ 大腸菌体内に於ける S 7 ORF の発現

S 7 の ORF 領域をそれぞれ PCR により増幅した後、大腸菌発現ベクター pKK223-3 に組み込み、大腸菌 JM109 株を形質転換した。発現させた蛋白質は10%SDS-PAGE によりそれらの分子量を解析した。塩基配列から得られたアミノ酸配列からの推定分子量は、ORF 1 が41.1 K, ORF 2 が36.2Kであったが、発現蛋白質の電気泳動により算出された分子量は2つの ORF とも約40Kであった。

④ 全セグメントの末端領域の構造解析

RBSDV ゲノムの両末端塩基を PEI セルロースプレート展開法により解析し、両末端領域の

塩基配列を2次元ゲル電気泳動法（Wandering Spot 法）で RNA ゲノムを直接解析した。その結果、5'末端は全てのセグメントに於いて5' AAGUUUUU…の8塩基の共通保存配列が存在し、3'末端は…GUC 3'の3塩基の共通保存配列が存在した。決定した RBSDV の末端保存配列は、同じ属の MRDVS 6, S 7, S 8 にも存在していたが、他ウイルス属の末端配列とは異なっていた。

Fijivirus 属のウイルスは、ウイルス粒子が不安定であるため純化が困難であり研究が遅れてきた。本研究では純化法の改良により、遺伝子構造解析の研究を進めるに十分のウイルス純化試料を得ることを初めて可能にした。そして、*Fijivirus* 属では一早く充実した cDNA ライブラリーを作製し、世界に先駆けて RBSDV 全10本のゲノムセグメント中 S10, S 8, S 7, の3セグメントの全塩基配列を決定した。解析の結果、S10及びS 8のコードする蛋白質は、他の属に分類されるウイルスのアミノ酸配列と相同性が存在することが明らかとなり、これらは植物レオウイルス共通不可欠の蛋白質である可能性が示唆され、さらに植物レオウイルス間の進化的類縁関係を明らかにする上でも興味深いことである。また、S 7 は同じ属に分類される MRDV-S 6 の塩基配列と非常に相同性が高く、他の属のウイルスでは例のないゲノム上の離れた領域に2つの ORF が存在することを明らかにした。本研究では2つの ORF の蛋白質を大腸菌体内で個々に発現させた。この結果は、ORF 特異的抗血清の作製が可能であることを示唆しており、今後これら2つの ORF が生体内で発現しているかどうかを明かとする上で重要な研究成果である。また、RBSDV ゲノムの末端保存配列を明らかにし、この末端構造は他の属の末端構造とは全く異なるものであり、*Fijivirus* 属特有の構造であることが示唆された。レオウイルスゲノムの末端構造は、ウイルス属特異的でありレオウイルスの分類学上の一つの重要な基準と成る可能性を示した成果は大きい。以上のように本研究により解明された結果は、RBSDV のみならず今後の植物レオウイルスの研究上寄与するところ極めて大であり、その成果は高く評価されるものである。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 木 村 郁 夫

副 査 教 授 生 越 明

副 査 教 授 喜久田 嘉 郎

副 査 助教授 上 田 一 郎

本論文は和文6章，引用文献を含め212頁よりなり，他に参考論文3編が添えられている。

植物レオウイルスは *Phytoreovirus* 属，*Fijivirus* 属及び未分類 (rice ragged stunt virus など) の3グループに分類されている。イネ黒条萎縮ウイルス (RBSDV) は *Fijivirus* 属に分類され，ウンカによってイネ，ムギ類及びトウモロコシなどのイネ科植物に伝搬され，10本の分節した2本鎖 (ds) RNA ゲノムを有し，直径約70nm の球形粒子である。本研究は RBSDV ゲノム構造及びゲノムがコードする蛋白質の機能を解明する目的で，cDNA ライブラリーを作製し，セグメント1 (S1)，S7，S8，S10の制限酵素地図を作製して，S7，S8，S10については全塩基配列を決定し，さらにS7がコードする蛋白質を大腸菌体内で発現させた。また，ゲノム dsRNA を直接解析した全セグメントの末端構造を決定し，*Reoviridae* 科の他属のウイルスとの構造と比較した。

1) RBSDV の純化法の改良

従来の純化法ではウイルス収量が低かったため，純化法の改良を行った。本研究により改良した純化法は従来用いられた方法に比べ，有機溶媒四塩化炭素を使用せず，また操作手順を簡略化したため純化に要する時間が短縮され，純化ウイルス収量は4倍量に増加した。また，従来トウモロコシよりの純化標品に安定したポリメラーゼ活性が認められなかったが，本法によりトウモロコシ標品からも，安定した高ポリメラーゼ活性が得られ，ゲノム dsRNA 及び転写 ssRNA を安定して得られ，本ウイルスの構造解析が初めて可能になった。

2) cDNA ライブラリーの作製

cDNA クローニングはゲノム dsRNA 及び転写 ssRNA を鋳型とする方法で行い，作製した cDNA クローンはゲノムとのハイブリダイゼーションによりセグメント対応を決定した。その結果，全セグメントの cDNA クローンが作製できた。

cDNA クローンを用いて各セグメントを特異的に検出する方法はプラスミドベクター pBR322の cDNA 挿入部位を挟んだ塩基配列15マーをプライマーとし，反応基質中に α - 32 P [dCTP] を混

入させて Polymerase Chain Reaction (PCR) を行いプローブを作製した。本法は一度に数多くの種類のプローブ作製が容易であり、それらはアルカリノーザンプロットハイブリダイゼーションによって、対応するセグメントを特異的に検出した。

3) RBSDV ゲノムの構造解析

① S 1 の制限酵素地図の作製

ゲノム dsRNA とハイブリダイゼーションにより選抜した S 1 の 3 cDNA クローンの制限酵素地図を作製した。3 クローンはそれぞれ制限酵素認識部位をもっており、それらの cDNA 部位は約4000塩基であって、この値は電子顕微鏡による塩基数の測定、及びゲノムの分子量から測定された塩基数よりも大きいことより、これら 3 cDNA は S 1 のほぼ全領域を占めていると推定された。

② S 10, S 8 及び S 7 の全塩基配列の決定

それぞれのセグメントに対応したほぼ全長の cDNA を用いてダイデオキシ法により塩基配列を解析した。末端領域の塩基配列は RNA を鋳型としたプライマーシーケンス法により決定し、3 セグメントの全塩基配列を決定した。その結果、S 10は1801塩基対、558アミノ酸残基から構成され、推定分子量63.2Kの蛋白質をコードし、S 8は1927塩基対、591アミノ酸残基から構成され、推定分子量68.1Kの蛋白質をコードしていた。S 10及びS 8の決定した塩基配列から得られたアミノ酸配列は *Phytoreovirus* 属の wound tumor virus (WTV) の S 6 及び S 10 のアミノ酸配列と各々相同性が認められた。S 7は2192塩基対から構成されており、それぞれ離れた領域に2つの ORF が検出された。その塩基配列は *Fijivirus* 属の maize rough dwarf virus (MRDV) の S 6 の塩基配列と85%の相同性が認められ、ゲノム上の ORF の分布も同様に、コードするアミノ酸配列も ORF 1では90.9%、ORF 2では85%相同であることから、これらの蛋白質が類似の機能を持つことが示唆された。1 ゲノム上の離れた領域に2つの ORF が存在することは他属のウイルスでは例がない。

③ 大腸菌体内における S 7 の ORF により増幅した後、大腸菌発現ベクター pKK223-3 に組み込み、大腸菌 JM109株を形質転換させた。塩基配列から得たアミノ酸配列から推定される分子量は ORF 1 が約41.1K、ORF 2 が約36.2Kであったが、発現した蛋白質の電気泳動から算出された分子量は2つの ORF とも約40Kであった。

④ 全セグメントの末端領域の構造解析

RBSDV ゲノムの両末端塩基を PEI セルロースプレート展開法により解析し、両末端領域の塩基配列を2次元ゲル電気泳動法 (Wandering Spot 法) で RNA ゲノムを直接解析した。そ

の結果、5'末端は全てのセグメントにおいて5' AAGUUUUU…の8塩基、3'末端は…GUC 3'の3塩基の共通保存配列が存在した。このRBSDVの末端保存配列は同属のMRDVのS6, S7, S8に存在していたが、他の属のウイルスの末端配列とは異っており、この末端配列はウイルス属特有なものであり植物レオウイルスの分類学上の重要な基準となることを提唱した。

以上の研究により2本鎖RNAウイルスの分類、複製、転写や遺伝子の発現機構の分子レベルの解明上重要な基礎的知見が得られたもので、その成果は学術上高く評価が得られるものである。

よって審査員一同は最終試験の結果と合わせて本論文の提出者 小豆畑二美夫は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。