

学位論文題名

STUDIES ON GENOME STRUCTURE OF RICE RAGGED STUNT VIRUS

イネラギッドスタントウイルスの遺伝子構造に関する研究

学位論文内容の要旨

Rice Ragged Stunt Virus (RRSV) は、東南アジアの稲作地帯で流行し、毎年経済的に深刻な被害を与えているウイルスである。RRSV は植物レオウイルスに属するが、その中で分類学的位置はまだ不明である。本研究は RRSV の遺伝子解析を中心に、RRSV とそれに類似している *Echinochloa Ragged Stunt Virus* (ERSV) を遺伝子レベルで解析し、分類学的位置を初めて明らかにした。更に遺伝子構造とその機能の解明を目的として、RRSV のゲノムセグメント 10 (S10)、S9 及びその変異株の塩基配列を解析した。

1. RRSV 純化法の検討

従来の純化方法を検討し、グリシン及び MgCl_2 を含むトリス緩衝液に改良し、ウイルス収量が最も高くかつ粒子崩壊の少ない純化方法を確立した。この方法によって寄生植物成分の混入を最少にし、常に高純度のウイルス分画を得ることが初めて出来た。また、ウイルス遺伝子解析のために十分な試験材料を得ることができた。さらに、RRSV 純化に最も良い季節は夏であることを明らかにした。

2. RRSV 粒子形態に関する研究

純化粒子を chymotrypsin あるいは $0.3-0.5\text{M}$ MgCl_2 含有トランスクリプト反応液で処理し、粒子構造の変化を蛋白質の電気泳動と粒子の電顕観察によって解析した。その結果、RRSV の spike は植物レオウイルスの他の 2 属と全く異なった構造であることを始めて明らかにした。また、45K、35K のポリペプチドは粒子の表面に存在し、spike の成分であると推定した。

3. RRSV と他の植物レオウイルスの関係

(1) 寄主範囲

近年報告された ERSV は、そのゲノムの電気泳動パターンが RRSV に類似しているので、両者の関係を解明するため、まず寄主範囲を調べた。その結果、RRSV は ERSV の主なる寄主 *Echinochloa crus-galli* に感染せず、また ERSV はイネに感染しないことから両ウイルス

の寄主範囲が異なることを明らかにした。

(2) RNA/RNA ハイブリダイゼーション

RRSV, ERSV のゲノム RNA をそれぞれプローブとし、他の植物レオウイルスと遺伝子レベル上の共通性をハイブリダイゼーション法で解析した。反応はそれぞれ45℃, 50℃, 55℃の3段階の温度で行った。その結果 RRSV は植物レオウイルスの他の2属とは共通性のないことを明らかにした。また、RRSV と ERSV の間では弱い反応しか認められず、両ウイルスはゲノムレベルで相同性の少ないことを明らかにした。

(3) RRSV 及び ERSV ゲノムの両末端構造解析

RRSV と ERSV のすべてのゲノム両末端塩基配列をゲノム2本鎖 RNA より2次元ゲル電気泳動法(Wandering spot 法)で直接解析した。RRSV ではすべてのセグメントに共通な配列 5' GAUAA...GUGC 3' が見いだされた。ゲノム両末端の塩基は PEI セルロースプレート展開法で確かめた。S 9, S 10の末端塩基配列は cDNA の塩基配列解析あるいは RNA プライマーシーケンス法による結果と一致した。ERSV では全分節ゲノムで共通な配列 5' GAUAAAU...GGUGC 3' が存在した。ゲノム末端の塩基は PEI セルロースプレート展開法で同定した。両ウイルスで保存されている共通配列は同じであった。この共通配列は植物レオウイルスの他の2属のそれとは全く異なっており、従って RRSV 及び ERSV は新しい属に分類すべきであることを遺伝子レベルで証明した。また、複製と転写に関する末端保存配列が植物レオウイルスの分類の一つの重要な基準となることを提唱した。

4. RRSV ゲノム S 10の遺伝子構造解析

本研究では、RRSVS10の全塩基配列を決定し、推定されたアミノ酸を他の植物レオウイルスのコードする蛋白質のアミノ酸配列と比較した。最初に RRSV の転写産物を鋳型として、Gubler と Hoffman (1983) 法で cDNA を合成し、大腸菌プラスミド pBR322を用いてクローニングした。得られた1000個以上の cDNA クローンの ampicillin 感受性を調べ、493個のクローンを選抜し電気泳動によって挿入 cDNA の長さを調べた。さらに、長いクローンの中からハイブリダイゼーション法より S 10のクローンを選別しディレーションシリーズクローンを作成した。このクローンの塩基配列をジデオキシチェインターミネーター法で決定したところ840塩基対であり、ゲノムの両末端領域を含んでいなかった。欠損していた 5' 末端領域はゲノムまたは転写産物 RNA を直接解析して塩基配列を決定した。3' 末端では新たに cDNA を合成し塩基配列を決定した。更に PCR 法より S 10の full-length cDNA を合成し両末端から塩基配列を確かめた。S 10は1162塩基対からなり、最も長い ORF は 5' 末端より 2 番目の AUG コンドに

始まり、297アミノ酸残基からなる32.3Kのポリペプチドをコードしていた。このアミノ酸配列は *Phytoreovirus* 属の Wound Tumor Virus (WTV) の S11がコードする P9 蛋白質と約20%の相同性を有していた。異なる属のウイルス間でアミノ酸の相同性が認められた。RRSVS10の5'末端から最初の AUG コドンより55塩基目まで短い ORF も認められた。更に5', 3'両末端で6塩基の逆向き繰り返し配列も見いだされた。

5. RRSV ゲノム S9 全塩基配列及び S9 の変異

(1) S9 の全塩基配列

Wandering spot 法で得られた RRSVS9 の3'末端の塩基配列は李ら(1988)の結果と異なるため、S9 の3'末端領域を改めてクローニングした。この cDNA より塩基配列を分析したところ、Wandering spot 法と一致した結果を得た。よって、S9 は全長1132塩基対であることを明らかにした。S9 はS10より短いことから両セグメント電気泳動移動度はポリアクリルアミドゲルで逆転していることが示唆された。S9 は338アミノ酸残基からなる分子量38.6Kのポリペプチドをコードしていた。このポリペプチドの分子量は RRSV 粒子の spike の構成タンパクの分子量とほぼ同様である。

(2) S9 の変異

RRSV のゲノム核酸を電気泳動したところ、S9 の位置で2本のバンドが生ずるウイルス株を発見した。感染したイネの株によってS9 の位置で2本のバンドが現れるものと、どちらか1本だけのバンドが現れるものがあった。これらのS9 の泳動パターンは株分け法で継代しても安定していた。虫媒によってイネに接種試験を2回行った結果、2回とも2本のS9 を持つ株を接種したイネは1本のS9 を持つ株を接種源としたものより明らかに感染率が低くなった。従って、S9 は媒介虫伝搬率に関与していることが示唆された。更に、PCR 法でそれぞれのウイルス株のS9 の cDNA を合成し、塩基配列調べたところ、2塩基の違いが2本のS9 バンドの間で認められた。この2塩基はさらにコードするポリペプチドはウイルス粒子の表面に存在していると考えられるので、このポリペプチドはウイルス-媒介虫-寄主植物の相互作用において重要な役割を果たしていると推察した。

6. キャップ構造

ウイルスの転写機構を解析する目的で、転写 RNA の5'末端構造をプライマー伸長反応で調べたところ、5'末端で2本の停止バンドが認められた。2本の上のバンドはキャップを除く化学的処理を加えた RNA を鋳型としてプライマー伸長反応させた結果、上のバンドが消失したので、転写 RNA がキャップをもつと結論づけた。この構造の同定は植物レオウイルスの中で

WTV に続いて 2 番目である。キャップ構造の解明は、ウイルスゲノムの末端構造に関する研究の一環として、非常に大きな意義をもつ。

以上の研究成果は、イネラギットスタントウイルスのゲノムの構造と機能に関して世界的に先駆的なものであり、その知見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 邦 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

本論文は英文、6 章、引用文献を含め 267 頁よりなり、他に参考論文 2 編が添えられている。

Rice Ragged Stunt Virus (RRSV) は東南アジアの稲作地帯で流行し、甚大な被害を与えているウイルスである。RRSV は植物レオウイルスに属するが、その中で分類学的位置が不明であり、ウンカによってイネ、ムギ類及びトウモロコシなどに伝搬され、10 本に分節した 2 本鎖 (ds) RNA ゲノムを含む直径 65nm の球形粒子である。本研究は RRSV ゲノムの遺伝子解析を中心に、これに類似の Echinochlia Ragged Stunt Virus (ERSV) を遺伝子レベルで解析し、二つのウイルスの分類学的位置を明らかにした。さらに遺伝子構造とその機能の解明を目的として、RRSV ゲノムのセグメント 10 (S10)、S9 及びのそ変異株の塩基配列を解析した。

1) RRSV 純化法の検討

従来用いられていた純化法を検討し、グリシン及び MgCl_2 を含むトリス緩衝液に改良し、作法手法を単純化して、高純度、高ウイルス収量の純化法を確立した。この方法により、高純度のウイルス標品が初めて得られ、RRSV ゲノム遺伝子解析の研究が可能となった。

2) RRSV 粒子の構造解析

純化 RRSV 粒子をキモトリプシンまたは高濃度 MgCl_2 含有トランスクリプト反応液で処理し、粒子構造の変化を蛋白質の電気泳動法及び粒子形態の変化を電顕観察により解析した。その結果、RRSV の spike は 45K と 35K の 2 ポリペプチドで構成され、植物レオウイルスの他の 2 属と異なった構造であることを明らかにした。

3) RRSV を植物レオウィルスの他の属との関係

① 寄主範囲

近年報告された ERSV はゲノムの電気泳動パターンが RRSV に類似しているので、両者の関係を解明するため、寄主範囲を試験した。その結果、RRSV は ERSV の主たる寄主ヒエに感染せず、また ERSV はイネに感染し難いことから両ウイルスの寄主範囲が異なることを示した。

② 異属間の RNA/RNA ハイブリダイゼーション

RRSV と ERSV のゲノム RNA をそれぞれプローブとし、他の植物レオウィルスと遺伝子レベルでの共通性をハイブリダイゼーション法で解析した。反応は45℃、50℃及び55℃の3温度で行った。その結果、RRSV は植物レオウィルスの他の2属とは共通性のないことを証明した。また、RRSV と ERSV の間では弱い反応しか認められず、両ウイルスはゲノムレベルで相同性の少ないことを明らかにした。

③ RRSV と ERSV ゲノムの両末端構造解析

RRSV と ERSV の全ゲノム両末端塩基配列をゲノム dsRNA より2次元ゲル電気泳動法 (Wandering Spot 法) で直接解析した。RRSV では全セグメントに共通な配列 5' GAUAAA の6塩基, GUGC 3' の4塩基が見出された。ERSV では全セグメントで共通な配列 5' GAUAAAU の7塩基, GGUGC 3' の5塩基が存在した。両ウイルスで保存されている両末端共通配列は5' 末端6塩基, 3' 末端4塩基が同じであった。この両末端共通配列は植物レオウィルスの他の2属のそれとは全く異なっており、従って RRSV と ERSV は新しい属に分類すべきことを遺伝子レベルで証明し、この末端保存配列が植物レオウィルス分類の重要な一基準となることを提唱した。

4) RRSV ゲノムの S10 の遺伝子構造解析

RRSV の転写産物を鋳型として、Gubler と Hoffman (1983) 法で cDNA を合成し、大腸菌プラスミド pBR322 を用いてクローニングした。得られた cDNA クローンの中から S10 のクローンを選抜して塩基配列を決定したところ840塩基対で、ゲノム両末端領域を含んでいなかった。5' 末端はゲノムまたは転写産物 RNA の直接解析、3' 末端は cDNA を合成して S10 の全塩基配列を決定し、推定されるアミノ酸を他の属のウィルスのコードする蛋白質のアミノ酸配列と比較した。この S10 は1162塩基対よりなり、最長の ORF は5' 末端より2番目の AUG コドンに始まり、297アミノ酸残基からなる32.3K のポリペプチドをコードしていた。このアミノ酸配列は Phytoreovirus 属の Wound Tumor Virus (WTV) の S11 がコードする P9 蛋白

質と20%の相同性を有していた。またS10の5'末端から最初のAUGコドンより55塩基目まで短いORFも認められ、さらに両末端で6塩基の逆向き繰り返し配列も認められた。

5) RRSV ゲノムのS9の全塩基配列及びS9の変異

① S9の全塩基配列

S9のcDNAより塩基配列を分析し全長1132塩基対であることを明らかにした。S9はS10より短いことから両セグメントの電気泳動移動度はポリアクリルアミドゲル中で逆転していた。S9は338アミノ酸残基からなる分子量38.6Kの蛋白質をコードし、これはRRSV粒子のspike構成蛋白質の分子量とほぼ同じである。

② S9の変異株

RRSVゲノムRNAを電気泳動した結果、S9の位置に2本のバンドを示す株とどちらか1バンドしか示さない株が見い出された。これらの株は株分けで継代しても安定していた。この両株をウシカによるウイルスの伝搬試験を行った結果、2バンドのS9株は1バンドのS9株より伝搬率で1/2低かった。従って、S9は虫媒伝搬に関与することが示唆された。さらに、PCR法で両株のS9のcDNAを合成し、塩基配列を解析した結果、2塩基の違いが2本のS9バンドの間で認められ、これらがコードする蛋白質の2ヶ所のアミノ酸の置換が生じた。S9のコードする蛋白質は粒子のspikeを構成していると考えられ、RRSVの表面に存在するので虫媒伝搬に重要な役割を果たしていると考えられた。

6) キャップ構造

RRSVの転写機構で解析する目的で、転写RNAの5'末端構造をプライマー伸長反応で調べた結果、5'末端で2本の停止バンドが認められた。2本の上のバンドはキャップ構造であることが考えられたので、それを除去する化学的処理を加えて、さらにプライマー伸長反応させてもこのバンドは現れなかったのでRRSVの5'末端にはキャップ構造を持っていると結論した。この証明は植物レオウイルスの中でWTVについて2番目である。

以上の研究成果はRRSVのゲノム構造と機能に関して世界に先駆けて行われ、植物レオウイルスの虫媒伝染に関与する遺伝子の解明上重要な貢献をなすもので、学術上高く評価されるものである。

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 顔 瑾は博士(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。