

学 位 論 文 題 名

イネ萎縮ウイルスゲノムの cDNA クローニングと
ゲノムセグメント10の構造解析

学位論文内容の要旨

植物ウイルスの多くは一本鎖の RNA をゲノムに持つことが知られており、これらのウイルスに関しては、そのゲノム構造の解析が進められている。しかし、本研究で用いたイネ萎縮ウイルス（RDV）は二本鎖の RNA をゲノムに持つウイルスで、それらのウイルスゲノムの cDNA クローニングおよび構造解析に関する研究は行われていなかった。そこで本研究では RDV ゲノムの cDNA クローニングを行って、初めてその一分節ゲノム10番の塩基配列を決定し、その構造を明らかにし、他の植物レオウイルス、クローバーの wound tumor virus（WTV）のゲノム構造と比較・検討した最初の研究である。さらに *in vitro* で分節ゲノム10番 RNA を合成し、発現させる系を確立することにより、ゲノム構造から推測される機能を初めて *in vitro* で実証した研究である。

1) RDV の転写活性とゲノム転写産物の cDNA 合成：RDV 自体が持っている RNA 転写酵素は純化 RDV 標品100 μ g から約150 μ g の転写産物を得た。本純化標品は凍結保存により本酵素活性は極端に減少した。本ゲノム転写産物はアクリルアミド-尿素電気泳動を行った結果、一本鎖 RNA に変性したゲノム RNA と対応する位置にバンドが認められ、全分節ゲノムに相当する転写産物が得られた。本ゲノム転写産物を鋳型として、cDNA クローニング法として Okayama and Berg 法と Gubler and Hoffman 法で合成した cDNA を用いて大腸菌 HB101 株を形質転換された結果、後者の方法でより容易に cDNA クローンが得られることが明らかになった。

2) RDV の分節ゲノム10番の cDNA クローンの構造解析：Gubler and Hoffman 法で得られた RDV の cDNA クローンの中から分節ゲノム10番の cDNA 断片を選抜し、その完全な長さの cDNA で全塩基配列を決定した。本ゲノム10番は 5' 末端配列は 5' NGUAAACUUG- であり、3' 末端のそれは-GGAUUCUGAU 3' であることが明らかとなり、全体では、1,321 塩基対よりなり、5' 末端から27番目の開始コドンから1,086番目の終始コドンまでの一つの大

きな翻訳領域を持っており、分子量約39 kの翻訳産物をコードしていると推測され、従って、本産物は非構造蛋白質であろうと考えられた。RDV に類似のウイルス、WTV の分節ゲノム10番の塩基配列と対応する RDV のそれを比較すると約58%と高い相同性が認められ、両ウイルスのゲノム10番の5' および3' 末端の4塩基対がそれぞれ全く同一配列であることを明らかにした。また、RDV の分節ゲノム10番の保存された両末端配列の近傍に逆向き相同配列が存在することを明らかにした。また、RDV、WTV 両ウイルスのゲノム10番の翻訳領域の塩基配列を比較した結果、その長さにおいて、18塩基対、アミノ酸数にして6個、WTVの方が短く、翻訳産物のアミノ酸の相同性も61%と高いものであった。

3) RDV の分節ゲノム10番 RNA の試験管内合成：これまでの推測を実証するために、*in vitro* で Gubler and Hoffman 法で得られた cDNA クローンと合成 DNA プライマーを用いて、完全な長さのゲノム10番の cDNA 鎖を合成し、この cDNA 鎖を T 7 RNA プロモータの転写開始部位に挿入してクローンを作成した。このクローンの cDNA を T 7 RNA ポリメラーゼと反応させて、完全な長さの分節ゲノム10番 RNA を *in vitro* で転写させた。この RNA をウサギ網状赤血球溶血液を用いて翻訳させた結果、塩基配列から推測された分子量と同じ約39 kの翻訳産物の合成が認められた。このことから、塩基配列から推測された翻訳領域が実際に機能しており、その分子量から分節ゲノム10番は非構造蛋白質をコードしていることを明らかにした。さらに、分節ゲノム10番の cDNA を大腸菌での発現ベクターに挿入することにより、プロテイン A との融合蛋白質として大腸菌内で大量に発現して、その分子量から分節ゲノム10番の翻訳領域は大腸菌でも同様に機能することを実証した。

以上のように本研究は RDV ゲノムの cDNA クローニングを行って、分節ゲノム10番の遺伝子構造を明らかにし、その塩基配列から推測される機能を実証したものである。特に、*in vitro* で RDV の完全な長さの分節ゲノムを転写合成し、翻訳発現させることに成功した。本研究で開発したゲノム RNA の転写系は他の分節ゲノムにも容易に応用できるものである。

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156頁の和文論文で、表2、図52、引用文献104を含み、7章で構成されている。別に参考論文10編が添えられている。

本研究は二本鎖 RNA をゲノムに持つイネ萎縮ウイルス (RDV) ゲノムの cDNA クローニングを行って、その一分節である分節ゲノム10番の全塩基配列を決定して構造を解明し、他の植物のレオウイルスで類似のクローバの wound tumor virus (WTV) ゲノム構造と比較・検討した最初の研究である。さらに *in vitro* で RDV 分節ゲノム10番の RNA を合成し、ウサギの網状赤血球溶血液を用いて翻訳させ、その発現系を確立したことにより、ゲノム構造から推測される機能を *in vitro* で初めて実証した研究である。

1) RDV 転写活性とゲノム転写産物の cDNA 合成: RDV 自体が持つ RNA 転写酵素は純化 RDV 標品100 μ g から約150 μ g の転写産物を得た。本純化標品は凍結保存により本酵素活性が極端に減少した。ゲノムの転写産物を鋳型として、cDNA クローニング法として Okaya-ma and Berg 法と Gubler and Hoffman 法で合成した cDNA を用いて、大腸菌 HB101を形質転換させた結果、後者の方がより容易に cDNA クローニングが得られることが明らかになった。

2) RDV の分節ゲノム10番の cDNA クローンの構造解析: Gubler and Hoffman 法で得られた RDV の cDNA クローンの中から分節ゲノム10番の cDNA 断片を選抜し、その完全な長さの cDNA で全塩基配列を決定した。本ゲノム10番は 5' 末端配列 NGUAAACUUG-であり、3' 末端のそれは-GGAUUCUGAU 3' であることが明らかとなり、全体では1,321塩基対よりなり、5' 末端より27番目の開始コドンより1,086番目の終始コドンまでの一つの大きな翻訳領域を持っており、分子量約39 k の翻訳産物をコードしていると推測され、従って、本産物は非構造蛋白質であろうと考えられた。RDV と WTV の分節ゲノム10番の塩基配列は58%の高い相同性が認められ、両ウイルスの分節ゲノム10番の 5' および 3' 末端の 4 塩基対がそれぞれ全く同一配列であることを明らかにした。また RDV 分節ゲノム10番において、この保存された

両末端配列の近傍に逆向き相同配列が存在することを明らかにした。他方、両ウイルスのゲノム10番の翻訳領域の塩基配列を比較した結果、その長さにおいて、18塩基対、アミノ酸数にして6個、WTVの方が短く、翻訳産物のアミノ酸の相同性も61%と高いものであった。

3) RDVの分節ゲノム10番RNAの試験管内合成：*in vitro*でGubler and Hoffman法で得られたcDNAクローンと合成DNAプライマーを用いて完全な長さの分節ゲノム10番cDNA鎖を合成し、このcDNA鎖をT7RNAプロモータの転写開始部位に挿入してクローンを作成した。このクローンのcDNAをT7RNAポリメラーゼと反応させて、完全な長さの分節ゲノム10番RNAを*in vitro*で転写させた。このRNAをウサギ網状赤血球溶血液を用いた翻訳させた結果、塩基配列から推測された分子量と同じ約39kの翻訳産物の合成が認められた。このことから、塩基配列から推測された翻訳領域が実際に機能しており、その分子量から分節ゲノム10番は非構造蛋白質をコードしていることが明らかにされた。さらに、分節ゲノム10番のcDNAを大腸菌での発現ベクターに挿入することにより、プロテインAとの融合蛋白質として大腸菌内で大量に発現して、この分子量から分節ゲノム10番の翻訳領域は大腸菌でも同様に機能することを確認した。

以上のように本研究はRDVゲノムのcDNAクローニングを行って、分節ゲノム10番の遺伝子構造を明らかにし、その塩基配列から推測される機能を確認したものであり、特に、*in vitro*でRDVの完全な長さの分節ゲノムを転写合成し、さらに翻訳発現させることに成功した。本研究で用いたゲノムRNAの転写系は他の分節ゲノムでも容易に応用できる。これらの研究は二本鎖RNAウイルスの複製過程、すなわち、転写および翻訳機構の分子レベルでの解明に、重要な基礎的知見を与えるもので、ウイルス学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ている。

よって審査員一同は、別に行った学力認定試験の結果と合わせて、本論文の提出者松村健は博士（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。