

学位論文題名

イネ萎縮ウイルスゲノムの変異に関する研究

学位論文内容の要旨

イネ萎縮ウイルス(RDV)は12本に分節した2本鎖RNA(dsRNA)をゲノムとして持つ植物レオウイルスである。近年、そのゲノム構造の解析を中心に研究が進められ、全ゲノムセグメントの塩基配列が解明された。今後は個々の発現タンパク質の機能の解析を中心として、植物と昆虫の両寄主での感染・増殖、病徴の発現、および昆虫伝搬性などの機構の解明が中心的研究課題となる。このような研究に当たり、変異株との比較研究が有効な研究方法の一つであるが、現在までに報告された変異株は、罹病イネの株分け継代により生じた昆虫媒介性喪失株と、イネに激しい萎縮症状を引き起こすsevere strain(RDV-S)のみである。そこで、本研究ではポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)によるRDVのゲノムdsRNAの泳動パターンを指標としてゲノム変異株の探索を行った。さらに、PAGEにおける移動度が最も大きいゲノムセグメント12(S12)について、その塩基配列を解析し、それにコードされるタンパク質(P12)の感染宿主内での発現を調べた。

1. RDV感染イネ組織よりウイルスゲノムdsRNAの直接抽出法の確立

RDVゲノムの抽出を能率化するため、ウイルス純化の過程を経ることなく、感染イネからフェノール抽出、塩化リチウム処理、セルロースパウダーによる精製でRDVゲノムを直接抽出する方法を確立した。本法によれば、0.1g感染葉から数 μ gのゲノムdsRNAを調製することが可能であり、また、多数の試料や少量の材料からもゲノムdsRNAの調製が出来る極めて有効な方法である。

2. PAGEによるRDVゲノム変異株の検出

上述のRDVゲノムの直接抽出法により、日本および国外の17ヶ所の圃場から採取し、分離した株からウイルスゲノムを抽出し、PAGEによる泳動パターンを比較した結果、国内から32、国外から22の変異株を初めて分離した。変異株は異なる採取地のみならず、同一圃場からも検出された。また、17採取地の内、8ヶ所からは一つのセグメントに対して複数のバンドが検出される株が分離され、感染植物内でのゲノムの変異を生じたか、または2種以上の株が感染していたことが示唆された。

フィリピンおよびネパール分離株はS3、S8、S9、およびS10の泳動パターンが日

本の分離株のそれとは顕著に異なっていた。さらにフィリピン株以外の分離株のS12はPAGEでの移動度が小さいグループと大きいグループの2つに分類することができた。日本の分離株では、本州の株は全て前者に、九州株は全て後者に分類されたが、四国株は前者と後者に属するものが混在した。また、ネパール株は前者に、韓国株は後者に分類され、分離株の採取地とゲノムの変異におよその相関があることが示唆された。

3. RDV変異株のS12の塩基配列の解析

S12について、移動度の異なる代表的な4分離株の塩基配列を解析した結果、塩基配列の類似性についても2つのグループに分類でき、それは移動度によるグループ分けと一致した。さらに、S12に2本のバンドが検出された株（高知県奈半利町）について解析した結果、一方は移動度の小さい、他方は大きいグループに類似性が高かった。解析した全ての分離株のS12の変異は全て置換のみであり、全長は1,066塩基対、各株間の相同性は96-99%であった。

S12の塩基配列にコードされるタンパク質の読み枠(ORF)を調べた結果、いずれの分離株においても、*in vitro*での発現が確認されているP12、P120Pa、およびP120Pbの開始コドンと終止コドンに変異はなく、ORFは維持されており、これらが*in vivo*で発現し機能していることが示唆された。

フィリピン株のS11とS12の移動度が他の分離株と比べS11よりS12の方が移動度が小さい、即ち逆転しており、その塩基配列を解析して、84塩基の重複が生じていることを明らかにした。その結果、P12に相当するORFに28個のアミノ酸の重複が起きていた。重複領域の前後にはUCCG同方向繰り返し配列が認められた。遺伝子の再編は植物レオウイルスでは最初の報告である。他方、RDV-Sの変異株RDV-S-6でも、S12に変異が生じ、塩基配列を解析した結果、フィリピン株同様、121塩基が重複し、PAGEでの移動度がS11と逆転していることを明らかにした。この重複の結果、ORFにずれが生じて重複領域内に終止コドンが出現し、P12に相当するORFはカルボキシル末端側、82アミノ酸（約1/3）が欠損していることが推測された。RDV-S-6とRDV-Sの混合感染イネではRDV-Sが単独感染株に比べて萎縮症状が弱いことから、RDV-S-6はP12の機能が損なわれた干渉性欠損ウイルスであると考えられた。

4. RDVのS12の*in vivo*での発現

S12にコードされるP12の感染寄主内での発現について調べた。RDV-H株のP12をマルトース結合タンパク質(MBP)との融合タンパク質の形で大腸菌内で発現させ、家兎に免疫し、P12に特異的に反応する抗血清を作製した。この抗P12血清を用いて、RDV-H感染イネとRDV-S感染媒介虫培養細胞から分子量約38KDaの感染細胞に特異的なタンパク質を検出し、*in vivo*でP12の発現を初めて検出した。さらに重複を生じたS12を持つフィリピン株が感染したイネおよび媒介虫培養細胞からも感染細胞に特異的なタンパク質を検出した。そのタンパク質は分子量約40KDaで、塩基配列から推測された通り、RDV-HやRDV-Sが持つ正常のS12のコードするP12より大きかった。

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

学位論文題名

イネ萎縮ウイルスゲノムの変異に関する研究

本論文は159頁の和文論文で、表9、図34、引用文献102を含み、別に参考論文2編が添えられている。

本研究は、各地で採取したイネ萎縮ウイルス(RDV)分離株の12本に分節したゲノム2本鎖RNA(dsRNA)の、アクリルアミドゲル電気泳動パターンを比較した結果、RDVのゲノム変異株を発見した。さらに、変異が識別し易いゲノムセグメント12(S12)について、その塩基配列を決定しその変異を解析して、そこにコードされているタンパク質(P12)の感染宿主内での発現を実証した。

1. 感染イネ組織よりウイルスゲノムdsRNAの直接抽出法の確立

RDVゲノムの直接抽出法が、ウイルス純化の過程を経ることなく、感染イネからフェノール抽出、塩化リチウム処理、セルロースパウダーによる精製などにより確立された。本法によれば、0.1g感染葉から数 μ gのゲノムdsRNAを調製することが可能であり、多数の試料や少量の材料からもゲノムdsRNAの調製が出来る極めて有効な方法である。

2. アクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)によるRDVゲノム変異株の検出

上述のRDVゲノムの直接抽出法により、国内および国外の17ヶ所の圃場から採取し、分離した株から本ウイルスゲノムを抽出し、PAGEによる泳動パターンを比較した結果、国内から32、国外から22のゲノム変異株を初めて分離した。変異株は異なる採取地のみならず、同一圃場からも検出された。さらに、一つのセグメントに対して複数のバンドが検出される株が分離され、これは2種以上の変異株が感染していたか、または感染植物内でゲノムの変異を生じたことが示唆された。

フィリピンおよびネパール分離株はS3、S8、S9、およびS10の泳動パターンが日本の分離株のそれとは顕著に異なっていた。さらに、フィリピン株以外の分離株のS12について、PAGEでの移動度が小さいグループと大きいグループの2つに分類

することができた。日本の分離株では、本州の株は全て前者に、九州株は全て後者に分類されたが、四国株は前者と後者に属するものが混在した。また、ネパール株は前者に、韓国株は後者に分類され、分離株の採取地とゲノムの変異におよその相関があることが示唆された。

3. RDV変異株におけるS12の塩基配列

S12について、移動度の異なる代表的な4分離株の塩基配列を解析した結果、塩基配列の類似性についても2つのグループに分類でき、それは移動度によるグループ分けと一致した。さらに、解析した全ての分離株のS12の変異は全て置換であり、全長は1,066塩基対よりなり、各株間の相同性は96-99%であった。

S12にコードされるタンパク質の読み枠(ORF)を塩基配列より調べた結果、全分離株においても、*in vitro*での発現が確認されているP12、P120Pa、およびP120PbのORF部分は維持されており、これらが*in vivo*でも発現し機能していることが示唆された。

フィリピン株のS11とS12の移動度が他の分離株と比べS11よりS12の方が移動度が小さく、即ち逆転しており、その塩基配列を解析した結果、84塩基の重複が生じていることを明らかにした。これに対応して、P12のORFに28個のアミノ酸の重複が生じていた。重複領域の前後にはUUCCG同方向繰り返し配列が認められた。遺伝子の再編は植物レオウイルスでは初めて明らかにされた。同様に、RDV-Sの変異株RDV-S-6でも、S12に変異が生じ、塩基配列を解析した結果、121塩基が重複し、PAGEでの移動度がS11とS12が逆転していることを明らかにした。この重複の結果、ORFにずれが生じて重複領域内に終止コドンが出現し、P12に相当するORFはカルボキシル末端側、82アミノ酸(約1/3)が欠損していることが分かった。

4. RDV S12の*in vivo*での発現

S12にコードされるP12の発現が感染宿主内で調べられた。RDV-H株のP12をマルトース結合タンパク質(MBP)との融合タンパク質で大腸菌内で発現させ、これを家兔に免疫し、P12に反応する抗血清を作製した。本抗血清を用いて、RDV-H感染イネとRDV-S感染媒介虫培養細胞から分子量約38KDaのタンパク質を検出し、*in vivo*でP12の発現を初めて検出した。さらに重複配列を有するS12を持つフィリピン株が感染したイネおよび媒介虫培養細胞からも分子量約40KDaの特異的なタンパク質を検出した。塩基配列から推測された通り、正常のS12がコードするP12より大きかった。

以上のように、本研究は国の内外からRDV感染イネ株を採取し分離したRDVゲノムdsRNAの電気泳動パターンの違いから、これまで見いだされていなかったRDVのゲノム変異株を発見した。さらに、S12の塩基配列の解析により、変異を生じた分子の基盤が解明された。これらの研究は、今後植物レオウイルスのゲノム再編機構や遺伝学的機能の解明を行う上で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、最終試験の結果と合わせて、本論文の提出者、村尾和則は博士（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。