

学 位 論 文 題 名

萎縮症状に關与するイネ萎縮ウイルスのゲノム解析

学位論文内容の要旨

イネ萎縮ウイルス (rice dwarf virus; RDV) は、レオウイルス科に属し、イネの草丈を萎縮させる。粒子は球形で、12 本に分節した二本鎖 RNA をゲノムとし、媒介昆虫ツマグロヨコバイによって伝搬される。1994 年までに、植物レオウイルスとしては初めて全 12 本の遺伝子 (ゲノムセグメント) の塩基配列が決定され、それぞれのセグメントの機能解析が次の研究課題となっている。分節したゲノムをもつウイルスでは、2 系統のウイルスが混合感染した場合、互いのセグメントが入れ替わった形の新しいゲノム構成をもつ子孫ウイルスが生じる。これを遺伝的再集合というが、これによって生じた reassortant の示す表現型とゲノム構成を、それぞれの親株と比較・検討することによって、その表現型に關与しているゲノムセグメントを特定できる。本研究は、イネ萎縮ウイルスによる萎縮症状の激化に關与するウイルス遺伝子を遺伝学的に解析してゲノムセグメント 6(S6)が決定因子であることを証明したものである。

1) 圃場由来の RDV 分離株から、萎縮症状の異なる変異株を分離した。圃場から採集した RDV 感染イネ葉の粗汁液を、媒介昆虫ツマグロヨコバイに注射し、接種を行ったところ、次代の感染イネの萎縮症状は個体によって様々であった。そこで、最も萎縮症状の激しい株、または症状の軽い株を選抜し、注射による接種を繰り返し、それぞれの病徴の固定を試みた。RDV-W では 9 回の継代接種を繰り返した結果、特に激しい萎縮症状の変異株 RDV-W-M と、軽い症状の RDV-W-L が得られた。RDV-W-M に感染したイネは葉身、葉鞘がともに短くなり、分げつが増加したロゼット状の外観を呈した。萎縮症状はイネの生育とともに激しくなり、温室で栽培した場合、約 2 カ月で枯死に至った。RDV-W-M は後述の混合接種試験に使用した。圃場分離株 RDV-KaK では 5 回の継代接種により軽い萎縮症状の RDV-KaK-L とやや激しい症状の RDV-KaK-S とに分離したが、RDV-W-M のような激しい症状の変異株は得られなかった。同様に圃場分離株 RDV-AK では、2 回の継代接種を行った際、激しい萎縮症状の感染個体が生じたが、遺伝的に安定な変異株は得られなかった。以上の接種試験で得られた RDV 変異株には血清学的な違いは見られず、また RDV-W-L と RDV-W-M では構造タンパクの大きさにも違いは見られなかった。

2) 媒介昆虫による継代接種によって、複数の変異株が混合感染しているイネから単一の変異株が単離出来ることを示した。RDV の 12 本のゲノムセグメントはポリア

クリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) に供試すると 12 本のバンドとして検出されるが、それぞれの分離株は固有の泳動パターンを示し、PAGE はそれぞれを区別する最も鋭敏な解析方法であることを見出だした。RDV-W の元株を PAGE で解析した結果、複数の RDV 変異株が混合感染していることが示され、RDV-W-L や RDV-W-M は継代接種の過程でこれらの変異株の 1 つが選抜され PAGE で単一のゲノム組成を示した。

3) 次に、2 系統の RDV 分離株を混合接種し、遺伝的再集合が起こることを証明した。PAGE における諸条件を検討し、各セグメントのわずかな移動度の差も検出できるように改良した結果、変異株 RDV-S と RDV-AI では 12 本すべてのゲノムセグメントで移動度を区別することができた。これらの接種源を混合して媒介昆虫に注射し、接種吸汁の後、発病したイネに含まれる RDV ゲノムを PAGE に供試し、それぞれのセグメントの親の由来を調べた。その結果、RDV-S と RDV-AI に由来するセグメントを新しい組合せで持つ様々な reassortant が検出され、遺伝的再集合が起こっていることが証明された。

4) Reassortant に含まれる各セグメントの由来には特異性が見られるものがあり、RDV-S と RDV-AI 混合接種では RDV-S 由来の S9 が次代の感染イネから全く検出されなかった。そこでそれぞれの S9 の塩基配列を決定して比較したところ、塩基数およびコードされているタンパクのアミノ酸数が等しく、高い相同性が示された。これらには大きな構造的な違いは見られず、混合接種において、RDV-S 由来の S9 が次代の感染イネから検出されない原因については解明できなかった。

5) 二つの変異株から reassortant を単離する実験系を確立した。保毒虫体内では、接種源に含まれるほとんどすべてのゲノムセグメントが増殖し、様々な reassortant が生じていた。しかし接種吸汁の際、イネへは任意の一部のウイルス粒子しか侵入・感染しないため、同一の保毒虫が異なる reassortant を媒介する例も見られた。多くの場合、混合接種当代で発病したイネには複数の reassortant が混合感染していたが、継代接種を繰り返すことによって、それぞれを単離することができた。以上より、混合接種および継代接種により、様々な reassortant を単離できる実験系が確立された。

6) 次に、激しい萎縮症状の RDV-S、または RDV-W-M と、軽い萎縮症状の RDV-AI や RDV-N とを組み合わせる混合接種を行い、得られた reassortant の示す萎縮症状とゲノム構成を比較・検討することにより、萎縮症状に関与するゲノムセグメントの同定を試みた。その結果 RDV-S または RDV-W-M の S6 をもつ reassortant は、親株と同程度の激しい萎縮症状を引き起こし、S6 と萎縮症状との間に高い相関関係が認められた。

7) RDV-W-M などの激しい萎縮症状を引き起こす RDV 分離株は、軽い萎縮症状を起こす分離株に比べて、感染葉単位重量あたりに含まれるウイルス抗原濃度が高いことが明らかとなった。RDV-S と RDV-AI の混合接種で得られた reassortant においても同様の傾向が見られ、萎縮症状の強さと単位重量当たりのウイルス濃度には正の相関関係が認められた。

本研究は、RDVが媒介昆虫でしかイネに伝搬せず、抽出した核酸にも感染性が無いとゆう制約のもとで遺伝子の機能解析を行うための1つの実験系を示し、さらに萎縮症状にS6が関与していることが示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 田 一 郎

副 査 教 授 生 越 明

副 査 教 授 喜久田 嘉 郎

学 位 論 文 題 名

萎縮症状に関与するイネ萎縮ウイルスのゲノム解析

本論文は、7章で構成され、図46、表31、引用文献56、総頁数179頁の和論文で、他に参考論文3編が添えられている。

本研究は、イネ萎縮ウイルス (RDV) による萎縮症状に関与するウイルス遺伝子を遺伝学的に解析してゲノムセグメン 6(S6)がその決定因子であることを証明したものである。主な研究成果は以下のようにまとめられる。

1) 圃場由来の RDV 分離株から、萎縮症状の異なる変異株を分離した。圃場から採集した RDV 感染イネ葉の粗汁液を、媒介昆虫ツマグロヨコバイに注射し、接種を行ったところ、次代の感染イネの萎縮症状は個体によって様々であった。そこで、最も萎縮症状の激しい株と症状の軽い株を選抜し、注射による接種を繰り返し、それぞれの病徴の固定を試みた。RDV-W では、特に激しい萎縮症状の変異株 RDV-W-M と、軽い症状の RDV-W-L が得られた。圃場分離株 RDV-KaK では軽い萎縮症状の RDV-KaK-L とやや激しい症状の RDV-KaK-S とに分離したが、RDV-W-M のような激しい症状の変異株は得られなかった。同様に圃場分離株 RDV-AK では、激しい萎縮症状の感染個体が生じたが、遺伝的に安定な変異株は得られなかった。RDV-W-M は後述の混合接種試験に使用した。

2) 媒介昆虫による継代接種によって、複数の変異株が混合感染しているイネから単一の変異株が単離出来ることを示した。RDV ゲノムセグメントはポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) に供試すると 12 本のバンドとして検出されるが、それぞれの分離株は固有の泳動パターンを示し、PAGE はそれぞれを区別する最も鋭敏な解析方法であることを見出だした。RDV-W の元株を PAGE で解析した結果、複数の RDV 変異株が混合感染していることが示され、RDV-W-L や RDV-W-M は継代接種の過程でこれらの変異株の 1 つが選抜され PAGE で単一のゲノム組成を示すことを明らかにした。

3) 次に、2 系統の RDV 分離株を混合接種し、遺伝的再集合が起こることを証明した。PAGE における諸条件を検討し、変異株 RDV-S と RDV-AI では 12 本すべてのゲノムセグメントで移動度が区別出来るようにした。これらの接種源を混合して媒介昆虫に注射し、接種吸汁の後、発病したイネに含まれる RDV ゲノムを PAGE に供試し、そ

それぞれのセグメントの親の由来を調べた。その結果、RDV-SとRDV-AIに由来するセグメントを新しい組合せで持つ変異株 (reassortant) が検出され、遺伝的再集合が起こっていることが証明された。

4) 二つの変異株から reassortant を単離する実験系を確立した。保毒虫体内では、接種源に含まれるほとんどすべてのゲノムセグメントが増殖し、様々な reassortant が生じていた。しかし接種吸汁の際、イネへは任意の一部のウイルス粒子しか侵入・感染しないため、同一の保毒虫が異なる reassortant を媒介する例も見られた。多くの場合、混合接種当代で発病したイネには複数の reassortant が混合感染していたが、継代接種を繰り返すことによって、それぞれを単離することができた。

5) 次に、激しい萎縮症状の RDV-S、または RDV-W-M と、軽い萎縮症状の RDV-AI や RDV-N とを組み合わせて混合接種を行い、得られた reassortant の示す萎縮症状とゲノム構成を比較・検討することにより、萎縮症状に関与するゲノムセグメントの同定を試みた。その結果 RDV-S または RDV-W-M の S6 をもつ reassortant は、親株と同程度の激しい萎縮症状を引き起こし、S6 と萎縮症状との間に高い相関関係が認められた。

6) RDV-W-M などの激しい萎縮症状を引き起こす RDV 分離株は、軽い萎縮症状を起こす分離株に比べて、感染葉単位重量あたりに含まれるウイルス抗原濃度が高いことを明らかにした。RDV-S と RDV-AI の混合接種で得られた reassortant においても同様の傾向が見られ、萎縮症状の強さと単位重量当たりのウイルス濃度には正の相関関係が認められた。

以上のように本研究では、RDV が媒介昆虫によってしかイネに伝搬せず、また抽出した核酸にも感染性がないという制約のもとで、遺伝子機能解析を行うための実験系を確立した。さらに、この系を用いて萎縮症状に S6 が関与していることが示したもので、学術上の貢献が大きく、植物レオウイルスの遺伝子機能解析の進展に大きく寄与するものである。

よって審査員一同は、最終試験の結果と合わせて、本論文の提出者安藤 裕子は博士 (農学) の学位を受けるに十分な資格があるものと認定した。