

博士(農学) 須賀 晴久

学位論文題名

イネラギッドスタンクトウイルスゲノムの分子構造解析

学位論文内容の要旨

イネラギッドスタンクトウイルス(RRSV)はレオウイルス科に属し、トビイロウンカで伝搬する。ウイルス粒子は球形で10本に分節した2本鎖RNA(dsRNA)をゲノムとする。分節したゲノムは電気泳動で移動度の遅いものから順番にゲノムセグメント1(S1)から10(S10)と呼ばれており、その粒子は7つの構造タンパク質より構成されている。本研究は、構造タンパク質と非構造タンパク質をどのゲノムセグメントがコードするかその同定を試み、更にS10がコードするタンパク質の感染細胞内での検出と発現調節を解析したものである。またS9の変異株を用いてトビイロウンカによるウイルスの伝搬様式を明らかにした。

1) S4を除く全てのゲノムセグメントがコードするタンパク質を大腸菌で発現させ、ウイルス粒子に対する抗体との反応を調べた。S1-S8についてはcDNAライブラリーからハイブリダイゼーションで対応するクローンを選抜した。それらのcDNAは全長に対応するものではなかったが、その塩基配列を決定してそれぞれのセグメントがコードすると考えられる読み取り枠(ORF)を同定した。S9とS10ではORFの全領域を含むcDNAをクローニングした。大腸菌発現用プラスミドベクターにそれらのcDNAを挿入してタンパク質の発現を誘導したところ、S4を除く全てのゲノムセグメントに対するcDNAで発現が認められた。ウェスタンプロッティング法によりRRSV粒子に対する抗体を用いて調べたところ、S1、S2、S3、S6、S8およびS9由来の発現タンパク質が反応した。

2) ウィルス粒子に対する抗体と反応するタンパク質をコードするこれらのセグメント(S1、S2、S3、S6、S8、S9)がどの構造タンパク質をコードするか調べるために、今度は大腸菌で発現させたタンパク質に対する抗体を作成してウイルス粒子との反応を調べた。RRSV粒子は7種類(113kDa、129kDa、123kDa、88kDa、63kDa、50kDa、35kDa)の構造タンパク質からなり、これらはRRSVのゲノムにコードされていると考えられる。S1、S2、S3由来タンパク質に対する抗体は反応が認められなかつたが、S6由来タンパク質に対する抗体は88kDaのタンパク質と反応した。また、S8由来タンパク質に対する抗体は63kDaと50kDaのタンパク質に反応した。またS9由来のタンパク質に対する抗体は35kDaのタンパク質と反応した。これらの結果から、S1、S2、S3は構造タンパク質をコードする可能性があること、S6が88kDa、S8が63kDaと50kDa、S9が35kDaの構造タンパク質をコードすることが明らかになった。

3) 北海道大学で継代しているRRSVにおいて通常のS9(S9U)の他に電気泳動の移動度が僅かに早いもの(S9L)が検出された。また、フィリピンのRRSVのS9はS9Lであることが分かった。本研究ではまず、S9UとS9Lの違いを明らかにするために北海道大学とフィリピンのS9Lの塩基配列を決定してS9Uと比較したところ、欠失ではなく、塩基置換のみが認められた。北海道大学とフィリピンのS9Lには共通して843番目(A→C)の置換があったことから、この塩基対だけを異にするS9を人工合成して移動度を比較したところ、S9UとS9Lの違いが再現できた。従って、S9UとS9Lの移動度が異なるのは843番目の塩基の違いによることが明らかになった。

4) S9UとS9Lのゲノム変異株を利用してトビイロウンカによるRRSVの伝搬様式を調べ、ウンカによるウイルスの獲得と、保毒したウンカによるウイルスの伝搬が非常に少ないウイルス量で起こること、従って虫媒伝搬でもウイルスの単一系統の分離が可能であることを虫媒伝搬性ウイルスで初めて明らかにした。RRSV保毒トビイロウンカ一頭からはS9UとS9Lを判定するのに十分な量のゲノムは抽出できなかった。そこで、RT-PCR法による遺伝子增幅法と843番目の塩基の違いにもとづく一本鎖多型解析を組み合わせて、S9UとS9Lの検定法を確立した。従来の方法では多数の個体の判定が困難であったが、この簡易的方法によって判定が可能になった。その結果、S9Uのみ、あるいはS9Lのみ、あるいはそれら両方が検出されるトビイロウンカ個体が見つかった。更に、伝搬後のイネにもS9Uのみ、あるいはS9Lのみ、あるいはそれら両方が検出される個体が見つかった。植物レオウイルスはブラークや局部病斑を形成しないので、特定のウイルス株を単離するのが困難とされていたが、以上の結果より媒介昆虫による単接種で単離できることを示した。

5) 真核生物のmRNAは通常一つのORFを持つ。RRSVのS9ではmRNAに一つの長いORFが見出された。S10においては297アミノ酸からなるORFの上流には12アミノ酸からなる小さいORFが見出された。このようにRRSVのS10は通常のmRNAと異なるORFの構造を持つことから、特殊な翻訳機構があると考えられた。本研究では主要なORFと小さいORF、両方の翻訳産物の検出を試みた。まず、主要なORFと小さいORFがコードするタンパク質(P10とP10mini)を大腸菌で発現させた。発現したP10は電気泳動でRRSVの一番小さい構造タンパク質(35kDa)より早く移動した。P10に対して作成した抗体はRRSVのどの構造タンパク質とも反応しなかった。そこで、RRSV罹病イネ及び、保毒トビイロウンカを用いて、ウェスタンプロットティングを行ったところ、約34kDaのタンパク質が検出された。P10同様にP10miniに対する抗体を作成してウェスタンプロットティングを行ったが、タンパク質の分子量が小さかったために検出はできなかった。そこでS10のmRNAとコムギ胚芽抽出液を用いて、翻訳産物の検出を試みた。P10miniはポリアクリルアミドゲル電気泳動による解析には小さすぎるので小さいORFを主要なORFの一部に連結して検出可能な分子量のタンパク質をコードする新たなORFを持つmRNAを作成した。このmRNAを用いた場合は翻訳産物が検出された。以上の結果から、S10の主要なORFがコードするのは非構造タンパク質であり、RRSV罹病イネと保毒トビイロウンカの両方で発現されることが明らかになり、更に、上流の小さいORFの開始コドンが機能する可能性があることが分かった。

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

イネラギッドスタントウイルスゲノムの分子構造解析

本論文は、7章で構成され、図3-4、表5、引用文献98、総頁数168頁の和論文で、他に参考論文6編が添えられている。

本研究は、イネラギッドスタントウイルス(RRSV)の構造タンパク質と非構造タンパク質を10本のゲノムセグメント(S1~S10)のうちどれがコードしているのか解析し、更にS10がコードする非構造タンパク質を感染細胞内で検出したものである。またS9の変異株を用いてトビイロウンカによるウイルスの伝搬様式を明らかにした。主な研究成果は以下のようにまとめられる。

1) S4を除く全てのゲノムセグメントがコードするタンパク質を大腸菌で発現させ、ウイルス粒子に対する抗体との反応を調べた。cDNAライブラリーから全てのゲノムセグメントに対応するクローニングを選抜し、それらのcDNAを大腸菌発現用プラスミドベクターに挿入してタンパク質の発現を誘導したところ、S4を除く全てのゲノムセグメントに対するcDNAで発現が認められた。ウェスタンプロッティング法によりRRSV粒子に対する抗体を用いて調べたところ、S1、S2、S3、S6、S8およびS9由来の発現タンパク質が反応した。

2) これらのセグメント(S1、S2、S3、S6、S8、S9)がどの構造タンパク質をコードするか調べるために、今度は大腸菌で発現させたタンパク質に対する抗体を作成してウイルス粒子との反応を調べた。その結果S1、S2、S3由来タンパク質に対する抗体はウイルス粒子を構成する7種類の構造タンパク質と反応しなかったが、S6が88KDa、S8が63KDaと50KDa、またS9が35KDaの構造タンパク質をコードする事が分かった。

3) RRSV分離株のなかには、通常のS9(S9U)の他に電気泳動の移動度が僅かに早いS9(S9L)を含む株がある。本研究ではまず、S9UとS9Lの違いを明らかにするため複数株のS9Lの塩基配列を決定してS9Uと比較した。その結果、欠失はなく、塩基置換のみが認められ、S9Lには共通して843番目(A→C)の置換があった。そこでこの塩基対だけを異にするS9を人工合成して移動度を比較したところ、S9UとS9L

の違いが再現できた。従って、S9U と S9L の移動度が異なるのは 843 番目の 1 塩基の置換によることが明らかになった。

4) S9U と S9L のゲノム変異株を利用してトビイロウンカによる RRSV の伝搬様式を調べ、ウンカによるウイルスの獲得と、保毒したウンカによるウイルスの伝搬が非常に少ないウイルス量で起こること、従って虫媒伝搬でもウイルスの単一系統の分離が可能であることを虫媒伝搬性ウイルスで初めて明らかにした。まず RRSV 保毒トビイロウンカ一頭から RT-PCR 法による遺伝子増幅法と 843 番目の塩基の違いにもとづく一本鎖多型解析を組み合わせて、S9U と S9L の検定法を確立した。この方法によって、S9U のみ、あるいは S9L のみ、あるいはそれら両方が保毒されているトビイロウンカ個体が見つかった。更に、伝搬後のイネにも S9U のみ、あるいは S9L のみ、あるいはそれら両方が検出される個体が見つかった。植物レオウイルスはブラークや局部病斑を形成しないので、特定のウイルス株を単離するのが困難とされていたが、以上の結果より媒介昆虫による単独接種で単離できることを示した。

5) S10 の mRNA は 297 アミノ酸からなる主要 ORF の他に、その上流に 12 アミノ酸からなる小さい ORF を持つ。本研究では主要な ORF が、上流に小さい ORF があるにもかかわらず生体内で発現することを証明した。S10 の mRNA をコムギ胚芽抽出液で翻訳させると主要な ORF に相当するタンパク質は検出されなかった。主要な ORF がコードするタンパク質を大腸菌で発現させ抗体を作成し、RRSV 罹病イネ及び、保毒トビイロウンカの抽出液とウェスタンプロッティング法で反応させたところ約 34KDa のタンパク質が検出された。また同時に S10 が非構造タンパク質をコードする事を証明した。

以上のように本研究は、これまで未知であった RRSV ゲノムがコードするタンパク質の同定・解析をしたもので、学術上の貢献が大きく、学会においても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、本論文の提出者須賀 晴久は博士（農学）の学位を受けるに充分な資格があるものと認定した。