

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、
分離株間のゲノム比較、および非構造タンパク質に関する研究

学位論文内容の要旨

イネ萎縮ウイルスは日本、韓国、ネパール、中国、フィリピンの稲作地帯で発生が報告されているが、これら各地域で分離されたイネ萎縮ウイルスのゲノムを比較した研究はこれまでなされていなかった。イネ萎縮ウイルスは12本に分節した2本鎖RNAをゲノムとする。ゲノムセグメントは電気泳動で移動度の遅いものから順番にS1からS12と呼ばれている。本研究では各地で発生するイネ萎縮ウイルスを採集し、分離株間のゲノム類縁関係を電気泳動法、ハイブリダイゼーション法およびゲノムの塩基配列の解析より明らかにした。また免疫電子顕微鏡観察により、S12がコードするP12タンパク質が細胞質に局在していることを明らかにした。

1. まずゲノムセグメントの同定やハイブリダイゼーション法に必要なプローブを完成するために、すでに全長クローンがあるS1を除く、全ゲノムセグメントに対する全長cDNAクローンを、日本の分離株のゲノムを鋳型として作製した。S3-S12までのcDNA合成は、ゲノム全長の逆転写-PCR法(RT-PCR)により行った。日本の分離株RDV-Hの塩基配列をもとに作製した3'末端プライマーを用い、RT反応によってcDNAを合成し、5'と3'末端プライマーを用いてPCRによって増幅した。アガロースゲル電気泳動より確認した結果、S3からS12の各セグメントの全長に対応するバンドが確認出来た。S4とS6からS12のcDNAクローニングはRT-PCR産物を、PCR反応に用いたプライマーに付けた制限酵素で切断し、同じ制限酵素で処理を行ったプラスミドベクターpUC119に挿入した。S3とS5のcDNAクローニングは、RT-PCRによって得たcDNAにポリdC鎖を付加し、これをPst I部位にポリdG鎖を付加したプラスミドベクターpUC9にアニーリングさせ、全長cDNAを挿入した。S2は3,512塩基で非常に長いのでRT-PCRによって全長の増幅が出来なかったため、cDNA合成はRDV-Hの塩基配列より予想される5'末端から約1,800塩基にある制限酵素認識部位Hind IIIを用いてその上流と下流部分に分けてRT-PCRを行った。cDNAクローニングには、Hind IIIの上流と下流部分のRT-PCR産物を各々ブ

ラスミドベクターBlueScript II SK-とpUC119に挿入した後、更に *HindIII* 下流の部分を上流部分と連結することで全長cDNAをクローニングした。

2. 日本と国外(フィリピン、ネパール、中国、韓国)の分離株を用いて、ゲノムRNAのPAGEにおける移動度による分離株の識別を行った。その結果、全て同じ泳動パターンを示す分離株は存在せず、同一の採集地であっても分離株のゲノム泳動パターンは異なった。国別に比較したところ韓国の株は中国、ネパール、フィリピン株に比べて日本の株に似た泳動パターンを示した。

3. 非構造タンパク質をコードするS4、S6、S9、S10、S11、S12の全長cDNAクローンからプローブを作成し、各分離株から抽出したゲノムRNAとドットプロットハイブリダイゼーションを行った。その結果、S4、S6、S9、S10、S11プローブでは明確な分離株の識別が出来なかったが、S12のプローブを用いた場合にのみ日本の分離株が国外の分離株より強く反応し、日本と国外の分離株を識別することが出来た。S12をプローブとすると各国の分離株が識別できることがわかったので、既報の数分離株のS12の塩基配列の比較から変異が多い領域(283-381塩基)を特定した。更に日本の分離株ANのcDNAよりこの領域のプローブを作製し、各分離株から抽出したゲノムRNAとドットプロットハイブリダイゼーションを行った。その結果、日本、韓国の分離株とフィリピン、ネパール、中国の分離株間で明確な識別が出来た。

4. ハイブリダイゼーションの結果からS12の塩基配列の比較が分離株間のゲノム類縁関係の解析に最も適当と思われたので、まだ塩基配列の解析されていない韓国の分離株(RDV-KOR1)とネパールの分離株(RDV-NEL19)のS12を新たにクローニングして、全塩基配列の解析を行った。全塩基数は2分離株とも1,066であり、P12、P12OPa及びP12OPbの3つのタンパク質をコードするORFの開始コドン及び終止コドンが保存されていた。RDV-Hと塩基配列の相同性を比べた結果、RDV-KOR1で96.1%、RDV-NEL19で95.4%の相同性を示した。S12の部分的なプローブ作製に用いた領域(283-381塩基)の塩基配列は各国の分離株間でもっとも変異の多い領域であった。この領域の配列をRDV-Hと比較した結果、AN1は5カ所、KOR1は4カ所、CK18は9カ所、NEL19は12カ所、Pは9カ所の変異があった。RDV-KOR1とRDV-NEL19のS12の塩基配列から予想されるアミノ酸配列をRDV-Hと比較した結果、P12でRDV-KOR1は94.2%、RDV-NEL19は91.1%を示してOPaではRDV-KOR1、NEL19とも96.8%を示した。RDV-KOR1は18カ所、RDV-NEL19では25カ所変異があった。さらに各分離株の塩基配列とアミノ酸配列を比較した結果、日本と韓国株間の相同性が日本とネパール、中国、フィリ

ピン株間の相同性より高かった。各国の数分離株のP12のアミノ酸配列を用いて遺伝的系統樹を作製し、類縁関係を分析した結果、中国株は一つのグループを形成した。韓国株は日本株と一つのグループを形成し、他の国外の分離株より日本株と近縁なことが示された。

5. P12に対する抗体を用いて金コロイドによるイムノラベリングを行い、免疫電顕法により感染イネ細胞中のP12の発現を調べた。その結果、金粒子が細胞小器官またはウイルス粒子とは反応せず、細胞質全体に散在していることを明らかにした。

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

イネ萎縮ウイルスゲノムのcDNAクローニング、 分離株間のゲノム比較、および非構造タンパク質に関する研究

本論文は、9章で構成され、図30、表8、引用文献70、総頁数113頁の和論文で、他に参考論文5編が添えられている。

本研究は世界各地の稲作地帯で発生するイネ萎縮ウイルス(RDV)のゲノム類縁関係を明らかにしたものである。主な研究成果は以下のようにまとめられる。

1. イネ萎縮ウイルスは12本に分節した2本鎖RNA(dsRNA)をゲノムとして、ゲノムセグメントは電気泳動で移動度の遅いものから順番にS1からS12と呼ばれている。まずゲノムセグメントの同定やハイブリダイゼーション法に必要なプローブを完成するために、すでに全長クローンがあるS1を除く、全ゲノムセグメントに対する全長cDNAクローンを、日本の分離株のゲノムを鋳型として作製した。S3からS12までの全長cDNA合成は、ゲノムdsRNAから逆転写-PCR法(RT-PCR)により行った。S4とS6からS12については、RT-PCR産物をプラスミドの適当な制限酵素切断部位にクローニングした。S3とS5のcDNAクローニングは、RT-PCRによって得たcDNAにポリdC鎖を付加し、これをポリdG鎖を付加したプラスミドベクターにアニーリングさせ、全長cDNAを挿入した。S2は、RT-PCRによって全長の増幅が出来なかったため、cDNA合成は5'末端から約1,800塩基にある制限酵素認識部位HindIIIを用いてその上流と下流部分に分けてRT-PCRを行った。cDNAクローニングの後に、下流の部分を上流部分と連結することで全長cDNAをクローニングした。

2. 日本と国外(フィリピン、ネパール、中国、韓国)の分離株を用いて、ゲノムdsRNAのPAGEにおける移動度による分離株の識別を行った。その結果、同

じ泳動パターンを示す分離株は存在せず、同一の採集地であっても分離株のゲノム泳動パターンは異なった。国別に比較したところ韓国の株は中国、ネパール、フィリピン株に比べて日本の株に似た泳動パターンを示した。

3. 非構造タンパク質をコードする S4、S6、S9、S10、S11、S12 の全長 cDNA クローンをプローブとして用い、各分離株のゲノム RNA とドットプロットハイブリダイゼーションを行った。その結果、S12 のプローブを用いた場合にのみ、日本の分離株が国外の分離株より強く反応し、日本と国外の分離株を識別することが出来た。そこで、既報の数分離株の S12 の塩基配列の比較から、変異が多い領域(283-381 塩基)を特定した。更に日本の分離株の cDNA よりこの領域のプローブを作製し、各分離株から抽出したゲノム RNA とドットプロットハイブリダイゼーションを行った。その結果、日本、韓国の分離株とフィリピン、ネパール、中国の分離株間で明確な識別が出来た。

4. ハイブリダイゼーションの結果から S12 の塩基配列の比較が分離株間のゲノム類縁関係の解析に最も適当と思われたので、まだ塩基配列の解析されていない韓国の分離株 (RDV-KOR1) とネパールの分離株 (RDV-NEL19) の S12 を新たにクローニングして、全塩基配列を決定した。全塩基数は2分離株とも1,066であり、P12、P12OPa及びP12OPbの3つのタンパク質をコードする ORF の開始コドン及び終止コドンが保存されていた。S12 の部分的なプローブ作製に用いた領域(283-381 塩基)の塩基配列は各国の分離株間でもっとも変異の多い領域であった。さらに各分離株の塩基配列とアミノ酸配列を比較した結果、日本と韓国株間の相同性が日本とネパール、中国、フィリピン株間の相同性より高かった。各国の分離株の P12 のアミノ酸配列を用いて遺伝的系統樹を作製し、類縁関係を分析した結果、中国株は一つのグループを形成した。韓国株は日本株と一つのグループを形成し、他の国外の分離株より日本株と近縁なことが示された。

以上のように本研究は、世界各国のイネ萎縮ウイルス分離株のゲノム類縁関係を非構造タンパク質に焦点を当てて比較解析したものであり、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、本論文の提出者李達春は博士(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。