

学位論文題名

*Fijivirus*属group 2 及びgroup 3 のゲノム構造と分子分類

学位論文内容の要旨

本研究は、イネ黒条萎縮ウイルス（RBSDV）のゲノムセグメントS7、S8、S9およびS10の構造とコードするタンパク質の解析を中心として、ウイルスゲノムの多様性と他の*Fijivirus*属のウイルスとのゲノム類縁関係を明らかにして、本属の分子分類の基礎を築いた。

1. RBSDVゲノムセグメントS7、S8、S9およびS10がコードするタンパク質の解析

ゲノムセグメントS7からS10がコードするタンパク質を大腸菌で発現させ、各々に対する抗体を作成し、この抗体を用いてこれらゲノムセグメントがコードするタンパク質をウエスタンブロッティング解析と免疫電子顕微鏡法によって同定した。S7のORF1は感染トウモロコシと保毒ヒメトビウソウの細胞質に局在するチューブ構造を構成する非構造タンパク質をコードしていた。S7のORF2は、非構造タンパク質をコードするがその発現は、ウエスタンブロッティング解析と免疫電子顕微鏡法では確認出来なかったため、発現しても極微量か発現時期がきわめて限られているものと思われる。S8は、ウイルスコア粒子を構成する65kDaタンパク質をコードしていた。S9のORF1は、感染トウモロコシと保毒ヒメトビウソウの細胞質に局在するパイロプラズムの構成成分で非構造タンパク質であった。S9のORF2は、非構造タンパク質をコードするがその発現は、ウエスタンブロッティング解析と免疫電子顕微鏡法では確認出来なかったため、発現しても極微量か発現時期がきわめて限られているものと思われる。S10は、ウイルス粒子を完全粒子、Bスパイクの付いた亜粒子、コア粒子に分けて純化し、これをS10に対する抗体でウエスタンブロッティング解析した結果から、完全粒子の外殻カプシドをコードすると結論した。

2. イネ黒条萎縮ウイルスゲノムの多様性とmaize rough dwarfウイルス（MRDV）ゲノムとの類縁関係。

北海道で発生するRBSDV分離株と北海道大学で十数年継代維持している分離株では、ゲノムのポリアクリルアミドゲル電気泳動パターンが類似しているが僅かに異なっていた。そのため、圃場においてもRBSDVのゲノムが多様性に富んでいるのか調べるため、100個体のRBSDV感染植物を採集し、ゲノムの電気泳動パターンを比較した。その結果、各RBSDV分離株毎にゲノムの電気泳動パターンが異なり、1つの圃場内から採集した分離株間でさえも異なっていることを明らかにした。その多様性は、RBSDVとヨーロッパで発生し、RBSDVに近縁なMRDVのゲノム電気泳動パターンの差と同程度であったので、両ウイルスを識別する方法を開発する必要があった。そこで、両ウイルスをハイブリダイゼーション法で明確に識別出来るRBSDVゲノムに対するcDNAクローンを選抜した。更に、これらのcDNAクローンによるハイブリダイゼーション法で、韓国に発生する類似ウイルスがMRDVではなくRBSDVであることを明らかにした。

3. *Fijivirus*の分子分類

*Fijivirus*属group 3に分類されるoat sterile dwarf virus (OSDV)ゲノムのcDNAクローニングと塩基配列の決定・解析を行い、group 2のRBSDVおよび*Fijivirus*属に近縁な未分類の昆虫レオウイルス*Nilaparvatalugens virus* (NLRV)と比較して、分類学的考察を行った。NLRVは、トビイロウンカ体内で増殖するが、植物体では増殖できない。しかし昆虫がイネの篩管部に口針をさすとウイルスは侵入移動し、昆虫は新たにイネからウイルスを獲得出来る。従って昆虫と植物のウイルスの進化を考えるうえで極めて興味深いウイルスである。NLRVゲノムがコードするタンパク質はRBSDVと高い相同性を有するが、RBSDVのS7のORF2に対応するタンパク質をコードしていない。そこでOSDVにこれに対応するORFがあるか、S7、S8、S9およびS10の全塩基配列を決定しRBSDVとNLRVゲノムがコードするタンパク質と比較した。その結果S7とS10に2つのオーバーラップしないORFが見つかり、このうちS7のORF2が、RBSDVのS7のORF2に対応することを見だし、これが*Fijivirus*属に特徴的であり、NLRVと分類学的に分ける重要な基準であることを明らかにした。またOSDVの他のORFがコードするタンパク質をRBSDVおよびNLRVと比較して、その対応関係を決定した。

また、OSDVのcDNAクローンから、10本の全てのゲノムセグメントに対するcDNAを選抜し、その解析からゲノムセグメント間でみられる末端共通配列5' AACGAAAAA-----UUUUUUUAGUC 3'

を見いだした。これは、RBSDVが属する*Fijivirus*属 group 2の末端共通配列と異なっており、レオウイルス科の同属内のウイルスは全て同じ末端共通配列を持つとする従来の説を覆す新たな発見である。

さらにOSDV、RBSDV、MRDV、NLRVで相同性を持つタンパク質間で遺伝的系統樹を作製すると、NLRVと*Fijivirus*属で分かれ、*Fijivirus*属はさらにgroup 2(RBSDV、MRDV)とgroup 3(OSDV)に分かれた。このことから、NLRVが単に

*Fijivirus*属のgroup 2またはgroup 3のウイルスから植物での増殖能力を失ったウイルスではなく、group 2とgroup 3のウイルスが分岐する以前に分岐したウイルスであることを示唆した。

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

*Fijivirus*属group 2 及びgroup 3 のゲノム構造と分子分類

本論文は、8章で構成され、図84、表8、図版12、引用文献181、総頁数346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、イネ黒条萎縮ウイルス(RBSDV)のゲノムセグメントS7、S8、S9およびS10の構造とコードするタンパク質の解析を中心として、ウイルスゲノムの多様性と他の*Fijivirus*属ウイルスとのゲノム類縁関係を明らかにして、本属の分子分類の基礎を築いた。主な研究成果は以下のようにまとめられる。

1. RBSDVゲノムセグメントS7からS10がコードするタンパク質を大腸菌で発現させ、各々に対する抗体を作成し、この抗体を用いてこれらゲノムセグメントがコードするタンパク質をウエスタンブロットイング解析と免疫電子顕微鏡法によって同定した。S7のORF1は感染細胞の細胞質に局在するチューブ構造を構成する非構造タンパク質をコードしていた。S7のORF2は、非構造タンパク質をコードするが、その発現はウエスタンブロットイング解析と免疫電子顕微鏡法では確認出来なかったもので、発現しても極微量か発現時期がきわめて限られているものと思われた。S8は、ウイルスコア粒子を構成する65kDaタンパク質をコードしていた。S9のORF1は、感染細胞の細胞質に局在するパイロプラズムの構成成分で非構造タンパク質であった。S9のORF2は、非構造タンパク質をコードするがその発現は、ウエスタンブロットイング解析と免疫電子顕微鏡法では確認出来なかったもので、発現しても極微量か発現時期がきわめて限られているものと思われた。S10は、完全粒子の外殻カプシドをコードしていた。

2. 北海道の圃場で発生するRBSDV分離株ゲノムをポリアクリルアミドゲル電気泳動で比較した。その結果、各RBSDV分離株毎にゲノムの電気泳動パターンが異なり、1つの圃場内から採集した分離株間でさえも異なっ

ていることを明らかにした。その多様性は、RBSDVとヨーロッパで発生しRBSDVに近縁なMRDVのゲノム電気泳動パターンの差と同程度であったので、両ウイルスを識別する方法を開発する必要があった。そこで、両ウイルスをハイブリダイゼーション法で明確に識別出来るRBSDVゲノムに対するcDNAクローンを選抜した。更に、これらのcDNAクローンによるハイブリダイゼーション法で、韓国に発生する類似ウイルスがMRDVではなくRBSDVであることを明らかにした。

3. *Fijivirus* 属 group 3 に分類される oat sterile dwarf virus (OSDV) ゲノムのcDNAクローニングと塩基配列の決定・解析を行い、group 2 のRBSDVおよび *Fijivirus* 属に近縁な未分類の昆虫レオウイルス *Nilaparvata lugens reovirus* (NLRV) と比較して、分類学的考察を行った。NLRVゲノムがコードするタンパク質はRBSDVと高い相同性を有するが、RBSDVのS7のORF2に対応するタンパク質をコードしていない。そこでOSDVにこれに対応するORFがあるか否かを、塩基配列を解析して調べた結果、S7のORF2が、RBSDVのS7のORF2に対応することを見だし、このORFが *Fijivirus* 属に特徴的であり、NLRVと分類学的に分ける重要な基準であることを明らかにした。また、OSDVのゲノムセグメント間で末端共通保存配列 5' AACGAAAAA-----UUUUUUUAGUC 3' を見いだした。これは、RBSDVが属する *Fijivirus* 属 group 2 の末端共通保存配列と異なっており、レオウイルス科の同属内のウイルスは全て同じ末端共通保存配列を持つとする従来の説を覆す新たな発見となった。

さらにOSDV、RBSDV、MRDV、NLRVで相同性を持つタンパク質間の遺伝的系統樹解析からNLRVが単に *Fijivirus* 属の group 2 または 3 のウイルスとして進化し、植物での増殖能力を失ったウイルスではなく、group 2 と 3 のウイルスが分岐する以前に分岐したウイルスであることを示唆した。

以上のように本研究は、*Fijivirus* 属の分子分類の基礎を築いたものであり、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、本論文の提出者磯貝雅道は博士（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。