

## クローバー葉脈黄化ウイルスの複製機構に関する研究

## 学位論文内容の要旨

本研究は、RNA をゲノムとするクローバー葉脈黄化ウイルス (clover yellow vein virus; CIYVV) の感染性 cDNA クローンを構築し、ウイルスゲノムの 3' 末端領域に、宿主因子が認識するポリアデニル化に必要な配列があることを初めて明らかにしたものである。

## 1. CIYVV ゲノムの全塩基配列決定と感染性 cDNA クローンの構築

CIYVV は、主にマメ科植物に感染し、ポティウイルス科ポティウイルス属に属する約 9.5 K ヌクレオチドの一本鎖(+)鎖 RNA をゲノムとする。植物 RNA ウイルスの複製機構や遺伝子機能の解析には、感染性 cDNA クローンを用いた逆遺伝学的手法が最も有効である。そこで本研究は、ゲノムの全塩基配列を決定しそのゲノム構成を明らかにし、感染性 cDNA クローンを構築してその遺伝子機能を研究する実験系を確立することを第一の目的とした。

まず初めに、CIYVV ゲノムのほぼ全域におよぶ cDNA クローンをシーケンスし、ゲノムの 5' 末端側約 5.5 k の塩基配列を決定した。cDNA ライブラリーに含まれていなかった 5' 末端領域は、ゲノム RNA を直接シーケンスした結果と、5' RACE 法で得られた cDNA クローンをシーケンスした結果を合わせて決定した。既報の 3' 末端側約 5400 塩基の配列と合わせ、CIYVV ゲノムの全塩基配列が決定された。CIYVV のゲノム RNA は 3' 末端のポリ A 鎖を除いて 9584 塩基で、3072 アミノ酸からなる非常に長い一つの ORF をコードしていた。このポリタンパク質は、ウイルス自身がコードするプロテアーゼによって約 10 種類のタンパク質に切断されると予想される。非翻訳領域はそれぞれ、5' 末端が 190 塩基、3' 末端側が 175 塩基であった。CIYVV RNA のコードするアミノ酸配列から、P1、HC-pro、NIa-pro の各プロテアーゼによる切断部位を推測し、ゲノム構成を予測した。その結果、CIYVV は典型的なポティウイルス属のゲノム構成を持つことが明らかになった。

次に、cDNA 断片をつなげて全長の cDNA クローンを作製し、35S プロモーター下流に挿入して pUC 系プラスミド pCIYVV を得た。転写開始部位には非ウイルス由来の配列を含まず、また、3' 末端 10 塩基のポリ A 鎖が付加されている。CIYVV cDNA の下流に転写終結シグナルの NOS ターミネーターは付加されていない。pCIYVV を接種したソラマメは高率に発病し、CIYVV の典型的病徴を示した。感染ソラマメからは CIYVV 粒子が電子顕微鏡で観察され、RT-PCR で CIYVV ゲノムの 3' 末端が特異的に検出された。これにより pCIYVV が感染性 cDNA クローンであることが証明された。また、500 pg/μl の低濃度で感染することから、pCIYVV は既報の他のポティウイルスの感染性 cDNA クローンと比べ、高い感染性を持つことが明らかになった。

## 2. ゲノム RNA 3'末端のポリアデニル化機構

cDNAが感染性を保持するには、十分な長さのポリA鎖と、転写終始シグナルのNOSターミネーターが必要であると従来考えられていた。しかしpCIYVVはそのどちらの条件も満たさずに高い感染性を保持していた。そのため、これらの不足を補う何らかの機構がCIYVVの複製過程で働くのではないか、あるいはCIYVVゲノムにこれらの不足を補う何らかのシグナルが存在すると思った。そこで、複製機構の中で(+)鎖RNAから(-)鎖RNAが合成される機構と、(+)鎖RNAのポリアデニル化の機構について研究することを第二の目的とした。

まず、ポリA鎖長の感染性に及ぼす影響を調べた。ポリA鎖としてAを10塩基含むpCIYVVをもとに、Aを5塩基含むもの(pCIYVV-PA5)、Aを完全に欠失したもの、ポリA鎖の1塩基をTに置換したcDNA3種類、ATの5反復配列にしたもの、3'末端の5塩基を重複させたもの、10塩基を重複させたものの9種類のプラスミドを作製した。さらに、CIYVV cDNAの下流に、外被タンパク質(CP)のORF全域と3'非翻訳領域をあわせた1022塩基を重複させたもの、CPのC末端側と3'非翻訳領域をあわせた662塩基を重複させたものを作製した。これらの感染性を調べたところ、全ての構築で感染性があり、ポリA鎖が長いほど感染性が高く、また、重複した領域が長いほど感染性が高い傾向がみられた。さらに、3'末端にポリA鎖がない感染性cDNAクローン(pCIYVVΔPA)はこれが初報告である。

次に、これらのソラマメ感染葉から子孫ウイルスのゲノムRNA 3'末端領域の塩基配列を調べた。その結果、pCIYVVΔPAを含め、全てのプラスミド由来の子孫ウイルスがポリA鎖を持っていたことから、その付加は鋳型非依存性であることが示唆された。また、ポリA付加部位の塩基配列は、3'末端の塩基配列を正確に保持しており、接種源のプラスミドでは後に続くはずの非ウイルス由来の配列は完全に欠失していた。

ここで、ソラマメのpCIYVV感染葉から(-)鎖RNAの検出を試みた。これまで、ポティウウイルスの(-)鎖RNAの検出と解析は前例がない。そこで、感染葉の全RNAからウイルス二本鎖RNAとして、(-)鎖RNAを分画した。次に(-)鎖RNAの5'末端領域を5'RACE法でクローニングし、塩基配列を調べたところ、(-)鎖RNAの5'末端はポリUが付加していることが分かった。これにより(-)鎖RNAは、(+)鎖のポリA配列を鋳型にしたポリUから合成が開始されることになる。つまりこれらの実験結果は、(+)鎖RNAをポリアデニル化する装置の存在を示唆している。一般に、細胞のmRNAでは、ポリA付加に先行してポリA部位でRNAが切断され、それに共役してポリAが付加されることが知られている。そこで、CIYVVの3'非翻訳領域とその下流のベクターの配列を含むRNAが、細胞の成分によって切断されるかどうか調べた。

pCIYVV-PA5の3'非翻訳領域を*in vitro*で転写し、ソラマメの全細胞抽出液にそのRNAを加え、RNAがどのような断片に変化するか調べた。その結果、ポリA部位付近で切断されたRNAが主産物として検出できた。これにより、何らかの細胞成分がCIYVV RNAの切断に関与していること、CIYVV RNAが潜在的にポリAシグナルを持つことが示唆された。

以上の結果から、cDNAから転写されたRNAは、3'末端で正確に切断された後にポリアデニル化され、十分に(+)鎖として機能するRNAが核外に移行すると考えられた。次にこの(+)鎖がポリUでプライミングする(-)鎖合成の鋳型となりその後、RNA-RNAの通常の複製サイクルに入ると考えられた。

# 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

### クローバー葉脈黄化ウイルスの複製機構に関する研究

本論文は、8章で構成され、図21、表6、引用文献198、総頁数103の和論文で、他に参考論文2編が添えられている。

クローバー葉脈黄化ウイルス (clover yellow vein virus; CIYVV) は、主にマメ科植物に感染し、ポティウイルス科ポティウイルス属に属する約9.5 Kヌクレオチドの一本鎖(+)鎖RNAをゲノムとする。本研究は、CIYVVの感染性cDNAクローンを構築し、これを用いて、ウイルスゲノムの3'末端領域に、一連のポリアデニル化反応に必要な宿主因子に認識される配列があることを初めて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. CIYVVゲノムの全塩基配列決定と感染性cDNAクローンの構築

ゲノムの全塩基配列を決定して、ゲノム構成を明らかにし、感染性cDNAクローンを構築して遺伝子機能を解析する実験系を確立した。

CIYVVゲノムの5'末端側約5.5 kの塩基配列を決定し、既報の3'末端側約5400塩基の配列と合わせ、全塩基配列が決定された。ゲノムRNAは3'末端のポリA鎖を除いて9584塩基で、3072アミノ酸からなる非常に長い一つのORFをコードしていた。このポリタンパク質は、ウイルス自身がコードするプロテアーゼによって約10種類のタンパク質に切断されると予想された。非翻訳領域はそれぞれ、5'末端が190塩基、3'末端側が175塩基であった。

次に、cDNA断片をつなげて全長のcDNAクローンを作製し、35Sプロモーター下流に挿入してpUC系プラスミドpCIYVVを得た。転写開始部位には非ウイルス由来の配列を含まず、また、3'末端に10塩基のポリA鎖が付加されている。CIYVV cDNAの下流に転写終結シグナルは付加されていない。pCIYVVを接種したソラマメは高率に発病し、ウイルスが回収されるのでpCIYVVが感染性cDNAクローンであることが証明された。また、500 pg/ $\mu$ lの低濃度で感染することから、pCIYVVは既報の2種のポティウイルス感染性cDNAクローンと比べ、高い感染性を持つことが明らかになった。

#### 2. ゲノムRNA3'末端のポリアデニル化機構

cDNAが感染性を保持するには、充分な長さのポリA鎖と、転写終始シグナルが必要であると従来考えられていた。しかしpCIYVVはそのどちらの条件も満たさずに高い感染性を保持していた。そのため、これらの不足を補う何らかの機構がCIYVVの複製過程で働くか、あるい

は CIYVV ゲノムにこれらの不足を補うシグナルが存在すると考えた。そこで、(+鎖 RNA から(-鎖 RNA が合成される機構と、(+鎖 RNA のポリアデニル化の機構について解析した。

まず、ポリ A 鎖長の感染性に及ぼす影響を調べた。ポリ A 鎖として A を 10 塩基含む pCIYVV をもとに、A を 5 塩基含むもの、A を完全に欠失したもの、ポリ A 鎖の 1 塩基を T に置換したものや AT の 5 反復配列に置換したプラスミドを作製した。さらに、CIYVV cDNA の下流に、ゲノム 3'末端 1022 塩基、662 塩基、10 塩基および 5 塩基を重複させたものも作製した。これらの感染性を調べたところ、全てのプラスミドで感染性があった。また、3'末端にポリ A 鎖がない感染性 cDNA クローン(pCIYVVΔPA)はこれが初報告である。

更に、pCIYVVΔPA 由来のウイルスを含め、子孫ウイルスは全てポリ A 鎖を持っていたことから、付加は鋳型非依存性であることが示唆された。また、ポリ A 付加部位の塩基配列は、3'末端の塩基配列を正確に保持しており、接種源のプラスミドでは下流に続くはずの非ウイルス由来の配列は完全に欠失していた。

次に、(-鎖 RNA の 5'末端にポリ U が付加していることをポティウイルスとして初めて明らかにした。これにより(-鎖 RNA は、(+鎖のポリ A 鎖を鋳型にしたポリ U から合成が開始されることになる。

また、ソラマメの全細胞抽出液にウイルス RNA を加えると、ポリ A 部位付近で切断された RNA が検出できた。

以上の結果から、cDNA から転写された RNA は、3'末端で正確に切断された後にポリアデニル化され、(+鎖として機能する RNA が核外に移行すると結論した。この(+鎖を鋳型としてポリ U でプライミングする(-鎖が合成され、ウイルスの RNA-RNA 複製サイクルに入ると考えられた。この成果は、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、本論文の提出者高橋 葉子は博士(農学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。