

学 位 論 文 題 名

クローバー葉脈黄化ウイルスゲノム複製における
3'末端領域シス因子の解析

学位論文内容の要旨

クローバー葉脈黄化ウイルス *clover yellow vein virus* (CIYVV) は、ポティウイルス科ポティウイルス属に属する。そのゲノム構造は、ピコルナウイルスと類似しており、一本鎖(+)RNA で、5'末端に Vpg タンパク質が結合しており、3'末端にポリアデニル鎖を持つ。その遺伝子発現機構はウイルスにコードされている一つの ORF が翻訳された後、自身のプロテアーゼにより切断され、成熟したタンパク質となる。これまでにピコルナウイルスでは、複製に関与するシス因子の研究が数多くなされているが、ポティウイルスに関しては、殆ど知見がない。そこで本研究は、CIYVV の感染性 cDNA を用いて、ゲノムの 3'末端領域に存在する、複製に関与するシス因子を特定することを第一の目的とした。

ポティウイルスの複製において、ポリアデニル鎖(ポリ A 鎖)は重要なシス因子であることが知られている。ピコルナウイルスの感染性 cDNA には、長鎖(50 塩基以上)のポリ A 鎖が含まれており、ウイルス感染におけるポリ A 鎖の重要性が指摘されている。しかしながら、CIYVV の感染性 cDNA では、ポリ A 鎖がなくとも感染すること、親ウイルスが持たないポリ A 鎖が子孫ウイルスでは付加していたことが、すでに明らかとなっている。これはポリ A 鎖が CIYVV 感染に必ずしも必要ではなく、複製の段階でポリ A 鎖付加のステップが存在することが考えられる。そこで本研究は、ポリ A 鎖付加のメカニズムを解明することを第二の目的とした。

1) ゲノムの 3'末端領域に存在する、複製に関与するシス因子

ウイルス複製に必要な 3'末端領域に存在するシス因子を解明する目的で、3'非翻訳領域を欠損させた cDNA クローンを作製した。3'非翻訳領域の塩基配列解析より、5'-UAAGUGAGG-UUUUACCUC-3'の繰り返し配列が 2 カ所見付き、二次構造解析の結果、この繰り返し配列がヘアピン構造に隣接していることが見出された。この結果を基に、2 つの繰り返し配列のどちらか一方、もしくはその両方を欠損させるよう、cDNA クローンを作製した。接種試験では、作製したクローン全てで感染性が消失していた。また、3'末端領域を重複させたクローンを作製し、接種した結果、野生型と比較して感染率は低かったものの、感染性が認められた。その感染植物の子孫ウイルス RNA を解析したところ、親ウイルスが持つ 3'末端領域の重複配列は消失し、野生型と同じ配列に回復していることが明らかとなった。これらの結果から、3'非翻訳領域はウイルス複製における非常に重要なシス因子であること、また 3'末端領域に重複配列が存在し

でも、組換え現象により、野生型の配列に復帰することが示唆された。

シス因子解明のための実験系確立を目的に、bean yellow mosaic virus (BYMV) の CP 遺伝子を C1YVV の N1b/CP 遺伝子間に挿入し、pC1YVV CP/BYCP/W を構築して感染性を調べた。野生型の C1YVV と同様の感染性を示した。BYMV-CP の発現をウェスタンブロッティングにより確認したところ、C1YVV-CP と移動度が同じ、あるいは C1YVV-CP と BYMV-CP との中間の移動度を示すバンドが確認された。BYMV-CP 遺伝子挿入部位を RT-PCR により解析した結果、BYMV-CP 遺伝子を保持しているもの、あるいは欠失していると思われるバンドが複数存在するものが、一個体の接種植物から確認され、異なった CP 遺伝子を持つ子孫ウイルス RNA が存在していることが示唆された。BYMV-CP と同じ移動度を示した子孫ウイルス RNA の 3'末端領域を解析したところ、CP 遺伝子の N 末端側が BYMV-CP 遺伝子 695 塩基、C 末端側が C1YVV-CP 遺伝子 127 塩基からなるキメラウイルスであることが分かり、両 CP 遺伝子の間で組換えが起こったことが明らかとなった。CP 遺伝子の大部分が BYMV-CP 遺伝子であっても C1YVV は野生型と同様の感染性を示したことから、ウイルス複製において、CP 遺伝子の C 末端領域が非常に重要なシス因子である可能性が示唆された。

2) ポリ A 鎖付加のメカニズム

ポティウイルスは、3'非翻訳領域の後にポリ A 鎖を持ち、どちらもウイルス複製にとって重要であるといわれている。しかし、C1YVV の感染性 cDNA では、ポリ A 鎖がなくとも感染し、親ウイルスが持たないポリ A 鎖が、子孫ウイルスでは付加していたことが報告されている (Takahashi and Uyeda, 1999)。これより、ウイルス複製の段階でポリ A 鎖付加のステップが存在することが考えられる。そこで、ポリ A 鎖付加のメカニズムを解明することを目的に、C1YVV の 3'非翻訳領域を導入した 3 種類の形質転換 *Nicotiana benthamiana* GFPA10UC、GFPA0UC、GFPA0 を作製した。GFPA10UC は、GFP 遺伝子の下流に C1YVV の 3'非翻訳領域およびポリ A 鎖とこれに続いて pUC 配列をもつ DNA を導入してある。GFPA0UC は、GFP 遺伝子の下流に C1YVV の 3'非翻訳領域とこれに続いて pUC 配列をもち、ポリ A 鎖は持たない。また、GFPA0 では、GFP 遺伝子の下流に C1YVV の 3'非翻訳領域をもつ DNA を導入してあり、ポリ A 鎖とこれに続いて pUC 配列を欠いている。外来遺伝子 mRNA の 3'末端領域を RT-PCR して、塩基配列を決定した。全ての形質転換植物において、3'非翻訳領域の 1 塩基目を 1 番とした場合、28、115 番目でポリ A 鎖が付加したクローンが数多く検出された。また、3'非翻訳領域末端の正確な位置でポリ A 鎖が付加したクローンも確認された。ウイルスタンパク質を供給した場合のポリ A 鎖付加に対する影響を調べるために、各形質転換体に野生型 C1YVV を接種した。C1YVV 接種 GFPA10UC、GFPA0UC において、3'非翻訳領域を通り越してそれに続く pUC 配列内でポリ A 鎖が付加したクローンが多く確認された。これらの結果より、ウイルスタンパク質の非存在下で、植物の宿主因子のみでポリ A 鎖の付加が起こり、3'非翻訳領域末端の正確な位置でポリ A 鎖が付加されることも明らかとなった。この結果により、ポリ A 鎖を欠損した C1YVV の感染性 cDNA でも同様にポリ A 鎖の付加が起こることが予想され、3'非翻訳領域末端の正確な位置でポリ A 鎖が付加されたウイルス RNA がウイルス複製の鋳型として機能し、感染性を示したことが推測された。

以上の結果から、ポティウイルスの CP 遺伝子の C 末端領域および 3'非翻訳領域は、ウイルスの複製において非常に重要なシス因子であること、宿主因子と 3'非翻訳領域

のみでポリ A 鎖の付加が起こることが明らかとなった。またポティウイルスのポリ A 鎖も、ウイルスの感染性において重要なシス因子であることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 田 一 郎

副 査 教 授 増 田 税

副 査 教 授 伴 戸 久 徳

副 査 講 師 畑 谷 達 児

学 位 論 文 題 名

クローバー葉脈黄化ウイルスゲノム複製における

3'末端領域シス因子の解析

本論文は、図31、表3、引用文献226を含み8章からなる総頁数104の和論文である。他に参考論文2編が添えられている。

本研究は、クローバー葉脈黄化ウイルス *clover yellow vein virus* (ClYVV) の感染性 cDNA を用いて、ゲノムの 3'末端領域の、複製に関与するシス因子を特定することを第一の目的とした。またポティウイルスの複製において、ポリアデニル鎖(ポリ A 鎖)は重要なシス因子であるが、ClYVV の感染性 cDNA では、ポリ A 鎖がなくとも感染して、ポリ A 鎖が子孫ウイルスでは付加されている。そこで本研究は、ポリ A 鎖付加のメカニズムを解明することを第二の目的とした。その内容は以下のように要約される。

1) ウイルス複製に必要な 3'末端領域に存在するシス因子を解明する目的で、3'非翻訳領域を欠損させた cDNA クローンを作製した。3'非翻訳領域の塩基配列解析より、5'-UAAGUGAGG-UUUUACCUC-3'の繰り返し配列が2カ所見つかり、二次構造解析の結果、この繰り返し配列がヘアピン構造に隣接していることが見出された。この結果を基に、2つの繰り返し配列のどちらか一方、もしくはその両方を欠損させるよう、cDNA クローンを作製した。接種試験では、作製したクローン全てで感染性が消失していた。また、3'末端領域を重複させたクローンを作製し、接種した結果、野生型と比較して感染率は低かったものの、感染性が認められた。その感染植物の子孫ウイルス RNA を解析したところ、親ウイルスが持つ 3'末端領域の重複配列は消失し、野生型と同じ配列に回復していることが明らかとなった。これらの結果から、3'非翻訳領域はウイルス複製における非常に重要なシス因子であること、また 3'末端領域に重複配列が存在しても、組換え現象により、野生型の配列に復帰することが明になった。

シス因子解明のための実験系確立を目的に、bean yellow mosaic virus (BYMV) の CP 遺伝子を ClYVV の NIb/CP 遺伝子間に挿入し、pClYVV CP/BYCP/W を構築して感染性を調べた。このキメラは、野生型の ClYVV と同様の感染性を示した。BYMV-CP 遺伝子挿

入部位を RT-PCR により解析した結果、CP 遺伝子の N 末端側が BYMV-CP 遺伝子 695 塩基、C 末端側が C1YVV-CP 遺伝子 127 塩基からなるキメラウイルスであることが分かり、両 CP 遺伝子の間で組換えが起こったことが明らかとなった。CP 遺伝子の大部分が BYMV-CP 遺伝子であっても C1YVV は野生型と同様の感染性を示したことから、ウイルス複製において、CP 遺伝子の C 末端領域が非常に重要なシス因子であることが明らかになった。

2) ポリ A 鎖付加のメカニズムを解明することを目的に、C1YVV の 3'非翻訳領域を導入した 3 種類の形質転換 *Nicotiana benthamiana*GFPA10UC、GFPA0UC、GFPA0 を作製した。GFPA10UC は、GFP 遺伝子の下流に C1YVV の 3'非翻訳領域およびポリ A 鎖とこれに続いて pUC 配列をもつ DNA を導入してある。GFPA0UC は、GFP 遺伝子の下流に C1YVV の 3'非翻訳領域と pUC 配列をもち、ポリ A 鎖は持たない。また、GFPA0 では、GFP 遺伝子の下流に C1YVV の 3'非翻訳領域を持つが、ポリ A 鎖とこれに続く pUC 配列を欠いている。導入された遺伝子 mRNA の 3'末端領域を RT-PCR して、塩基配列を決定した。全ての形質転換植物において、3'非翻訳領域の 1 塩基目を 1 番とした場合、28、115 番目でポリ A 鎖が付加したクローンが数多く検出された。また、3'非翻訳領域末端の正確な位置でポリ A 鎖が付加したクローンも確認された。各形質転換体に野生型 C1YVV を接種した場合は、GFPA10UC、GFPA0UC において、3'非翻訳領域を通り越してそれに続く pUC 配列内でポリ A 鎖が付加したクローンが多く確認された。これらの結果から、ウイルスタンパク質の非存在下で、植物の宿主因子のみでポリ A 鎖の付加が起こり、3'非翻訳領域末端の正確な位置でポリ A 鎖が付加されることもあることが明らかとなった。

以上のように、ポティウイルスの CP 遺伝子の C 末端領域および 3'非翻訳領域は、ウイルスの複製において非常に重要なシス因子であること、宿主因子と 3'非翻訳領域のみでポリ A 鎖の付加が起こることを明らかにした。さらに、ポティウイルスのポリ A 鎖も、ウイルスの感染性において重要なシス因子であることが示唆された。これらの研究成果は、関連学会で学術上高く評価されている。

よって、審査員一同は、関口 博史氏が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有すると認めた。