

学 位 論 文 題 名

Role of clover yellow vein virus-helper component protease
(CIYVV-HCPro) gene in replication and pathogenicity

(クローバー葉脈黄化ウイルス HCPro 遺伝子の複製と病原性における役割)

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し、マメ科作物の重要病害である。ゲノムは、一本鎖(+)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。ウイルス遺伝子は一つの長い ORF が翻訳された後、自身のプロテアーゼにより切断され、10の成熟したタンパク質として発現する。本研究では、このうち、ヘルパーコンポーネントプロテアーゼ (HCPro) と呼ばれる遺伝子について解析し、複製と病原性に重要な役割をはたしていることを明らかにした。

- 1) HCPro の感染細胞内での発現と蓄積を調べた。HCPro を、マルトース結合タンパクとの融合タンパク質として、大腸菌で発現させた。発現タンパク質はマルトースのアフィニティカラムを用いて精製し、ポリクローナル抗体作製に供した。この抗体を用いた、ウェスタンブロット法により、感染ソラマメ、エンドウ、インゲン、*Nicotiana benthamiana* から HCPro が 50KDa タンパク質として検出できた。ソラマメで発現を経時的にモニターしたところ、HCPro は、可溶性分画では感染5日後から、また不溶性分画では4日後から検出され、量的には不溶性分画により多く含まれていた。同時に外被タンパク質も検出したところ、感染4日後から可溶性分画と不溶性分画の両方から検出され、蓄積量も HCPro より多かった。
- 2) ウイルスタンパク質のうち、NIb が RNA ポリメラーゼとして機能し、VPg はゲノムの 5'末端に結合していることが既に知られている。またウイルスゲノムの複製過程で、複数のウイルスタンパク質が相互作用していることが推測されている。そこで、ウイルス複製に関与していると推測される HCPro、VPg、NIaPro、NIb タンパク質について、酵母 two-hybrid アッセイを用いて、タンパク質間の結合による相互作用を調べた。HCPro、VPg、NIaPro、NIb タンパク質を、Binding domain と Activation domain にそれぞれ挿入して、お互いの結合能を調べた。その結果、HCPro と VPg はそれぞれ自身で結合することが判った。また NIaPro が NIb と結合した。さらに HCPro と VPg が結合することが明らかになった。HCPro と VPg の結合は、ポティウイルスではいまままでに報告がなかった新しい相互作用であった。そこでこの結合を確かめるためにさらに、ファウエスタン法で解析した。バクテリアで発現した HCPro と VPg を電気泳動した後に、ニトロセルロース膜に転写し、これにそれぞれ VPg と HCPro を反応させた。さらに反応に用いたタンパク

質に対する抗体を用いて結合が確認できた。また酵母 two-hybrid アッセイを用いて、VPg と VPg、および VPg と HCPro の結合ドメインの特定を行った。VPg の遺伝子に、様々な欠損を導入させた結果、VPg の C-末端の 38 アミノ酸が VPg と VPg の相互結合に、また中央の 19 アミノ酸が HCPro との結合に必要なことを明らかにした。

- 3) クローバー葉脈黄化ウイルスは、ソラマメに感染するとエソをおこして枯死させる。このエソをおこすウイルス遺伝子を特定する目的で、エソをおこさない突然変異株 MM と野生株のゲノム比較を行った。まず、野生株の感染性 cDNA クローンをもとにして、MM 株と様々なキメラウイルスを作製した。キメラウイルスをソラマメに接種してその病徴を観察した。P3 遺伝子の C-末端から VPg 遺伝子の N-末端領域、あるいは VPg 遺伝子の C-末端から CP 遺伝子の N-末端領域を、MM 株に置き換えたキメラウイルスは、野生株と同じ病徴を現した。しかし、P1 遺伝子の C-末端から P3 の N-末端領域を MM 株に置き換えたキメラウイルスは、軽微な退緑病徴を呈し、また移行・複製能力の低下が見られた。この領域にコードされるタンパク質のアミノ酸配列を比較すると、8ヶ所で MM は野生株と異なっていた。すなわち、P1 で 182 番が E から G (E182G) に、HCPro では、27 番が T から I (T27I)、33 番が I から V (I33V)、51 番が R から I (R51I)、193 番が D から Y (D193Y)、327 番が L から Q (L327Q)、さらに 393 番が V から I (V393I) に、更に P3 では、122 番が N から S (N122S) に置換していた。そこで、P1 遺伝子の C-末端から P3 の N-末端領域をさらに細かい断片に分けてキメラを作製して、ソラマメでの病徴とウイルス複製を CP タンパク質の蓄積で解析した。P1 (E182G) と HCPro (T27I) を MM 株由来にするとウイルスの複製能が著しく低下したが、エソを誘導する能力は維持されていた。また HCPro (T27I) を野生株にすると複製能力回復がみられたので、このアミノ酸置換がウイルスの複製に重要であろうと思われた。HCPro (D193Y) から P3 (N122S) の領域を MM 由来にしたキメラは、エソを誘導しなかった。また複製能もやや低下していた。従って、この領域がエソ誘導に重要であろうと結論した。更に病徴や、ウイルス複製能に関与するウイルス遺伝子の機能解析を行うために、それぞれの遺伝子をウイルスベクターを用いて、単独で発現する実験系を開発した。Pea early browning virus (PEBV) ベクターに C1YVV の HCPro と P3 大部分の領域を挿入して、エンドウに接種した。接種エンドウからウエスタンブロット法で HCPro の発現が確認できたので、このウイルスベクターを用いた実験系が今後の C1YVV ウイルス遺伝子機能解析に有効であることが示された。

以上の結果から、HCPro 遺伝子が、C1YVV の複製と病徴発現に重要な役割を果たしていることが明らかに出来た。また HCPro に対する抗体が作製され、さらに PEBV ベクターを利用した実験系を確立できたので、今後の詳細な遺伝子機能解析が可能となった。

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

Role of clover yellow vein virus-helper component protease (CIYVV-HCPro) gene in replication and pathogenicity

(クローバー葉脈黄化ウイルス HCPro 遺伝子の複製と病原性における役割)

本論文は、図23、表6、引用文献198を含み8章からなる総頁数100の英論文である。他に参考論文5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(CIYVV)の10の遺伝子のうち、ヘルパーコンポーネントプロテアーゼ (HCPro) と呼ばれる遺伝子について解析し、複製と病原性に重要な役割をはたしていることを明らかにしたものである。その内容は以下のように要約される。

- 1) HCPro の感染細胞内での発現と蓄積を調べた。HCPro に対するポリクローナル抗体を作製し、これを用いてウエスタンブロット法により、感染ソラマメ、エンドウ、インゲン、*Nicotiana benthamiana* から HCPro が 50KDa タンパク質として検出できた。ソラマメで HCPro は、可溶性分画では感染5日後から、また不溶性分画では4日後から検出され、不溶性分画により多く含まれていた。同時に外被タンパク質も検出したところ、感染4日後から可溶性分画と不溶性分画の両方から検出され、蓄積量も HCPro より多かった。
- 2) ウイルス複製に関与していると推測される HCPro、VPg、NIaPro、NIb タンパク質について、酵母 two-hybrid アッセイを用いて、タンパク質間の結合による相互作用を調べた。HCPro、VPg、NIaPro、NIb タンパク質を、Binding domain と Activation domain にそれぞれ挿入して、お互いの結合能を調べた結果、HCPro と VPg はそれぞれ自身で結合することが判った。また NIaPro が NIb と結合し、さらに HCPro と VPg が結合することが明らかになった。HCPro と VPg の結合は、ポティウイルスではいまままでに報告がなかった新しい相互作用であった。この結合は、ファウエスタン法でも確認した。また酵母 two-hybrid アッセイを用いて、VPg と VPg、および VPg と HCPro の結合ドメインの特定を行い、VPg の C-

末端の 38 アミノ酸が VPg と VPg の相互結合に、また中央の 19 アミノ酸が HCPro との結合に必要なことを明らかにした。

- 3) クローバー葉脈黄化ウイルスがソラマメに感染するとエソをおこす遺伝子を特定する目的で、エソをおこさない突然変異株 MM と野生株のゲノム比較を行った。野生株の感染性 cDNA クローンをもとにした、MM 株との様々なキメラウイルスの病徴から、P1 遺伝子の C—末端から P3 の N—末端領域がエソ誘導に重要であることがわかった。この領域にコードされるタンパク質のアミノ酸配列を比較すると、8 ケ所で MM は野生株と異なっていた。すなわち、P1 で 182 番が E から G (E182G) に、HCPro では、27 番が T から I (T27I)、33 番が I から V (I33V)、51 番が R から I (R51I)、193 番が D から Y (D193Y)、327 番が L から Q (L327Q)、さらに 393 番が V から I (V393I) に、更に P3 では、122 番が N から S (N122S) に置換していた。そこで、この領域をさらに細かい断片に分けてキメラを作製して、ソラマメでの病徴とウイルス複製を解析した。P1 (E182G) と HCPro (T27I) を MM 株由来にするとウイルスの複製能が著しく低下したが、エソを誘導する能力は維持されていた。また HCPro (T27I) を野生株にすると複製能力回復がみられたので、このアミノ酸置換がウイルスの複製に重要であろうと思われた。HCPro (D193Y) から P3 (N122S) の領域を MM 由来にしたキメラは、エソを誘導せず、また複製能もやや低下していた。従って、この領域がエソ誘導に重要であろうと結論した。更に病徴や、ウイルス複製能に関与するウイルス遺伝子の機能解析を行うために、それぞれの遺伝子をウイルスベクターを用いて、単独で発現する実験系を開発した。Pea early browning virus (PEBV) ベクターに C1YVV の HCPro と P3 大部分の領域を挿入して、エンドウで HCPro の発現が確認できたので、このウイルスベクターを用いた実験系が今後の C1YVV ウイルス遺伝子機能解析に有効であることが示された。

以上のように、本論文は、HCPro 遺伝子が、C1YVV の複製と病徴発現に重要な役割を果たしていることを明らかにした。また HCPro に対する抗体が作製され、さらに PEBV ベクターを利用した実験系を確立できたので、今後の詳細な遺伝子機能解析が可能となった。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、ヤンバオ マ レオノラ ミラ氏が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有すると認めた。