

学 位 論 文 題 名

キュウリモザイクウイルスの
サイレンシングサプレッサーの解析

学位論文内容の要旨

近年、PTGS について盛んに研究され、PTGS の構成因子等詳細な知見が得られている。PTGS は二本鎖 RNA から誘導され、配列特異的な RNA 分解の結果、遺伝子発現が抑制される現象である。PTGS は二本鎖 RNA によって誘導されることから、ウイルスに対する抵抗性反応の一つとして考えられている。すなわち RNA ウイルスは自身のゲノムを複製する際に二本鎖 RNA を形成するため、PTGS の標的になる。一方、ウイルスは PTGS に対抗するため、PTGS を抑制するサプレッサータンパク質をゲノムにコードしている。現在まで、30 を越えるウイルス種からサプレッサーが同定されている。*Cucumber mosaic virus* (CMV) の 2b は PTGS サプレッサーとして早い段階から同定されているが、その作用機作は不明である。本研究では PTGS 抑制活性の異なる二つの CMV 分離株を用いて、PTGS 経路における 2b の作用機作について解明することを目的とした。

非放射性プローブによる siRNA の検出方法の確立

PTGS 経路で二本鎖 RNA が RNase III に属する Dicer によって 21~24nt の siRNA へ分解される。そのため siRNA は PTGS の指標として考えられる。siRNA の検出は放射性同位体ラベルされたプローブを用いた手法が一般的である。しかし放射性同位体の使用は場所が限定されることや被爆のリスクがあることなどの理由で、取り扱いが煩雑である。そこで Digoxigenin を用いて、非放射性プローブによる siRNA の検出方法を確立した。本研究では、この非放射性プローブを用いて、PTGS が生じている形質転換ペチュニア、ダイズ、そしてウイルス由来の siRNA の検出に成功した。さらに RNA プローブを用いて、センス鎖とアンチセンス鎖の siRNA も検出した。本方法はプローブの限定分解が必要でないこと、シグナルを得るまでの時間が短いことが特徴としてあげられる。

弱毒優良株 CM95 とその復帰突然変異株 CM95R の比較解析

弱毒優良株 CM95 は *N. benthamina* に対してほとんど病徴を示さないが、復帰突然変異株 CM95R は激しいモザイク症状を示す。PTGS サプレッサーは病徴発現と関連性があることから、CHS 遺伝子の PTGS が生じており、白い花を咲かすペチュニアにウイルスを接種した結果、CM95R 感染により紫色に着色した花を付けた。一方、CM95 感染では花色に変化がなかった。CHS 遺伝子の mRNA と siRNA を検出したところ、CM95R 感染では mRNA の蓄積が回復し、siRNA が減少していることが明らかとなった。CM95 (A2b) と CM95R (R2b) の 2b 遺

伝子の塩基配列を比較すると、1 アミノ酸の変異が存在していた。これらのことから CM95 と CM95R の PTGS 抑制活性の違いは、1 アミノ酸によって支配されることが示唆された。

ところで、CM95 と CM95R の複製量が異なることから、CM95 と CM95R 間の PTGS 抑制活性の違いがウイルス量に依存している可能性が考えられたため、CM95 と CM95R の複製量を比較したところ、CM9R は CM95 と比較して複製量がわずかに高いことが明らかとなった。

また、CMV の 2b の核移行シグナルは PTGS 抑制活性に重要であると報告されている。A2b と R2b 間の 1 アミノ酸の違いが、細胞内局在に影響して、PTGS 抑制活性の違いを生じた可能性がある。細胞内局在性を観察するため、A2b または R2b を GFP 遺伝子と繋ぎ、キメラタンパク質による一過的な発現を行った。その結果、A2b と R2b のどちらも核に局在することから、PTGS 抑制活性の違いが細胞内局在性によるものではないことが明らかとなった。

PTGS 経路における CMV 2b の作用機作の解明

PTGS 経路における 2b の作用機作を解明するため、PTGS 抑制活性の異なる CM95 と CM95R の 2b を使用して生化学的な解析を行った。A2b と R2b の PTGS 抑制活性を直接比較するため、アグロインフィルトレーション法を用いた。すなわち、GFP 遺伝子を発現する形質転換 *N. benthamiana* に GFP 遺伝子をアグロバクテリウムにより一過的に発現させる。つまり、GFP 遺伝子の発現過剰により人為的に PTGS が誘導され、GFP 蛍光が消失する。この時、サプレッサー遺伝子を同時に発現した場合、GFP 蛍光が維持され、サプレッサーの活性を比較することができる。アグロインフィルトレーションによる local silencing 及び systemic silencing に対する 2b の抑制活性を解析した結果、R2b の抑制活性は高く、A2b は低いことが明らかとなった。また GFP の siRNA の蓄積を解析したところ、PTGS 抑制活性の高い R2b では siRNA が減少していることが明らかとなった。

もっとも解析の進んでいる *Tomato bushy stunt virus* のサプレッサーである p19 は siRNA と結合し、PTGS を抑制する。そこで CMV 2b の siRNA に対する結合性を検討した。その結果、PTGS 抑制活性の高い R2b は二本鎖 RNA 及び siRNA の両方に結合するが、1 アミノ酸の置換により PTGS 抑制活性が低い A2b はほとんど結合しないことが示された。つまり CMV 2b の PTGS 抑制活性は二本鎖 RNA 及び siRNA に対する結合活性が決定していることが明らかとなった。次に内在性の遺伝子発現を制御する miRNA に対しての結合性についても検討したところ、R2b は p19 と異なり二本鎖 miRNA と結合しないことが明らかとなった。使用した二本鎖 miRNA は siRNA と異なり mismatches が二つ存在していることから、CMV 2b は二本鎖 RNA の構造を認識して結合していると示唆された。また CMV 2b は核移行シグナルが PTGS 抑制活性に重要であることから、核移行シグナルを欠損した R2b の siRNA 結合活性を検討した結果、siRNA と結合しないことが明らかとなった。A2b と R2b のどちらも核に移行することから、CMV 2b の PTGS 抑制活性に核局在性よりも二本鎖 RNA と siRNA に対する結合性が重要であると示唆された。

以上の結果を総合して、CMV 2b は二本鎖 RNA と siRNA に結合することから、①siRNA に結合して RISC への取り込みを阻害する、もしくは二本鎖 RNA に結合することから、②DCL による分解を阻害して、PTGS を抑制すると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 増 田 税
副 査 教 授 上 田 一 郎
副 査 助 教 授 金 澤 章

学 位 論 文 題 名

キュウリモザイクウイルスの サイレンシングサプレッサーの解析

本研究は図 3 3、引用文献 1 3 4 を含み、5 章からなる総ページ 1 0 5 の邦文論文である。他に参考論文 6 編が添えられている。

近年、PTGS について盛んに研究され、PTGS の構成因子について詳細な知見が得られている。PTGS は二本鎖 RNA から誘導され、配列特異的な RNA 分解の結果、遺伝子発現が抑制される現象である。PTGS は二本鎖 RNA によって誘導されることから、ウイルスに対する抵抗性反応の一つとして考えられている。一方、ウイルスは PTGS に対抗するため、PTGS を抑制するサプレッサータンパク質をゲノムにコードしている。*Cucumber mosaic virus* (CMV) の 2b タンパク質は PTGS サプレッサーとして早い段階から同定されているが、その作用機作は不明であった。本研究では PTGS 抑制活性の異なる二つの CMV 分離株を用いて、PTGS 経路における 2b の作用機作について解明することを目的とした。

非放射性プローブによる siRNA の検出方法の確立

PTGS 経路で二本鎖 RNA が RNase III に属する Dicer によって 21~24nt の siRNA へ分解される。そのため siRNA は PTGS の指標として考えられる。siRNA の検出には放射性同位体でラベルされたプローブを用いた手法が一般的である。しかし放射性同位体の使用は取り扱いが煩雑であるため、digoxigenin を用いて、非放射性プローブによる siRNA の検出方法を確立した。本研究では、この非放射性プローブを用いて、PTGS が生じている形質転換ペチュニア、ダイズ、そしてウイルス由来の siRNA の検出に成功した。

弱毒優良株 CM95 とその復帰突然変異株 CM95R の比較解析

弱毒優良株 CM95 は *N. benthamina* に対してほとんど病徴を示さないが、復帰突然変異株 CM95R は激しいモザイク症状を示す。PTGS サプレッサーは病徴発現と関連性があることから、CHS 遺伝子の PTGS が生じており、白い花を咲かすペチュニアに CM95R を接種した結果、感染により紫色に着色した花を付けた。一方、CM95 感染では花色に変化がなかった。CM95 (A2b) と CM95R

(R2b)の 2b 遺伝子の塩基配列を比較すると、1 アミノ酸の変異が存在していた。これらのことから CM95 と CM95R の PTGS 抑制活性の違いは、1 アミノ酸によって支配されることが示唆された。

ところで、CM95 と CM95R の複製量が異なることから、CM95 と CM95R 間の PTGS 抑制活性の違いがウイルス量に依存している可能性が考えられたため、CM95 と CM95R の複製量を比較したところ、CM9R は CM95 と比較して複製量がわずかに高いことが明らかとなった。

ところで、CMV の 2b の核移行シグナルは PTGS 抑制活性に重要であると報告されているため、A2b と R2b 間の 1 アミノ酸の違いが、細胞内局在に影響して、PTGS 抑制活性の違いを生じた可能性がある。そこで R2b と A2b の細胞内局在性を解析したところ、どちらの 2b も核に局在することから、PTGS 抑制活性の違いが細胞内局在性によるものではないことが明らかとなった。

PTGS 経路における CMV 2b の作用機作の解明

PTGS 経路における 2b の作用機作を解明するため、PTGS 抑制活性の異なる CM95 と CM95R の 2b を使用して生化学的な解析を行った。A2b と R2b の PTGS 抑制活性を直接比較するため、アグロインフィルトレーション法を用いた。アグロバクテリウムにより GFP 遺伝子を一過的に発現させ、GFP 遺伝子の PTGS を人為的に誘導する。この時、サプレッサー遺伝子を同時に発現させた場合、GFP 蛍光が維持され、サプレッサーの活性を比較することができる。アグロインフィルトレーションによる local silencing 及び systemic silencing に対する 2b の抑制活性を解析した結果、R2b の抑制活性は高く、A2b は低いことが明らかとなった。また GFP の siRNA の蓄積を解析したところ、PTGS 抑制活性の高い R2b では siRNA が減少していることが明らかとなった。

最も解析の進んでいる *Tomato bushy stunt virus* のサプレッサーである p19 は siRNA と結合し、PTGS を抑制する。CMV 2b についても siRNA に対する結合性を検討した。その結果、PTGS 抑制活性の高い R2b は二本鎖 RNA 及び siRNA の両方に結合するが、PTGS 抑制活性が低い A2b はほとんど結合しないことが示された。つまり CMV 2b の PTGS 抑制活性は、二本鎖 RNA 及び siRNA に対する結合活性と関連していることが明らかとなった。次に内在性の遺伝子発現を制御する miRNA に対しての結合性についても検討したところ、R2b は p19 と異なり二本鎖 miRNA と結合しないことが明らかとなった。使用した二本鎖 miRNA はミスマッチが二つ存在していることから、CMV 2b は二本鎖 RNA の構造を認識して結合していると示唆された。

以上の結果を総合して、CMV 2b は二本鎖 RNA と siRNA に結合することから、①siRNA に結合して RISC への取り込みを阻害する、もしくは二本鎖 RNA に結合することから、②DCL による分解を阻害して、PTGS を抑制すると考えられた。

以上のように本論文は CMV の 2b タンパク質の PTGS 抑制メカニズムを 2b の siRNA と二本鎖 RNA に対する結合活性によって説明しようとしたものである。これらの研究成果は、関連学会でも学術上の高い評価を受けている。

よって、審査員一同は、後藤一法氏が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有すると認めた。