

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 竹 本 浩

ダイズ退緑斑紋ウイルス (*Soybean chlorotic mottle virus*: SbCMV) は本邦にのみ分布し、ダイズなど4種のマメ科植物にだけ感染する径約50nmの球状の2本鎖DNAウイルスである。本ウイルスはカリモウイルス科SbCMV様ウイルス属に属し、すでにそのゲノムの全塩基配列の解析から8個の遺伝子 (Ia、Ib、II、III、IV、V、VI、VII) が存在することが明らかにされている。しかし、それら各遺伝子の機能については直接的な証明がなされていない。また、SbCMV感染葉で転写されているウイルスmRNAについても不明のままである。

そこで、本研究では、最初にSbCMVゲノムの全塩基配列の再解析によって若干の配列の修正を行った後、本ウイルスの感染性DNAクローンを作製し、これを用いた *in vitro* mutagenesisによって各遺伝子の機能を明らかにするとともに、ウイルスmRNAについても解析することを目的として研究を行った。得られた成果の概要は次のとおりである。

1. ダイズ退緑斑紋ウイルス (SbCMV) の全塩基配列の改訂

SbCMVゲノムの全塩基配列は既に報告されているが、本研究では以降で行う変異導入実験に正確な塩基配列情報が必要不可欠であることから、まず、PCRダイレクトシーケンシングにより、SbCMVゲノムの全塩基配列の再解読を行うこととした。その結果、SbCMVゲノムは既報より3bp長い全長8178bpからなることが明らかになった。さらに、本研究で得られた塩基配列を既報のものと比較したところ、52箇所の塩基置換、13箇所の塩基挿入、10箇所の塩基欠失が見出され、OPF Ia以外の7個のORFで推定アミノ酸配列を一部変更した。

2. SbCMVの感染性DNAクローン (pSbCMV1.3) の構築

ウイルス遺伝子の機能を解析するためには、まず感染性クローンを構築し、これに種々の遺伝的変異を導入した後、表現形質の変化をみるのが重要である。本研究では、SbCMVが環状ゲノムであるため、その一部配列を重複させることによって、感染性の1.3mer DNAクローン (pSbCMV1.3) を作製した。

3. SbCMV各遺伝子の機能の解析

pSbCMV1.3の重複部分以外に存在するORF Ia、Ib、II、III、IV、Vについて *in vitro* mutagenesisによって欠失あるいは発現停止変異を導入し、得られた各変異クローンをインゲンマメに

接種した。その結果、Ia、II、III、IV、Vの各遺伝子の変異クローンでは全身感染が認められなかったのに対し、Ib遺伝子の変異クローンは親クローンと同様の病徴を呈して全身感染し、上葉からウイルス粒子とDNAが検出された。また、全身感染することが出来なかった各クローンの接種葉を用いて immunoselection PCRを行ったところ、Ia遺伝子の変異クローンに限りその接種葉から微量のウイルス粒子が検出された。以上のことから、Ib遺伝子はウイルスの全身感染に不要な遺伝子であるのに対し、Ia、II、III、IV、Vの各遺伝子は全身感染に必須であり、このうち、Ia遺伝子は本研究結果とアミノ酸配列の相同性から細胞間移行タンパク質をコードしていることが証明された。なお、Ib遺伝子の翻訳産物は全身感染に不要だが、この遺伝子の内部塩基配列には逆転写反応のプライマー結合部位 (PBS) と推定される配列が含まれており、この部位に変異を導入した場合にはウイルスの複製が認められなかった。また、IV遺伝子に関してはアミノ酸シーケンシングにより外被タンパク質遺伝子であることが確認された。

4. SbCMV の mRNA の解析

SbCMV 感染葉を用いてウイルス DNA から転写される mRNA のノーザン解析を行ったところ、約 8.2kb および約 1.8kb の RNA が検出され、さらに、8.2kb RNA はプレゲノム RNA であり、1.8kb RNA は VI 遺伝子 mRNA であることが示された。

以上、本研究によって、SbCMV の各遺伝子産物は、Ia が細胞間移行タンパク質、Ib が全身感染に不要な機能不明タンパク質、II および III が全身感染に必須の機能不明タンパク質、IV が外被タンパク質、V がプロテアーゼ/リバーシトランスクリプターゼ、VI が封入体タンパク質であり、また、Ib のうちの PBS の配列が複製に必須であることが明らかにされた。さらに、ウイルス DNA の転写産物としてプレゲノム RNA と ORF VI の mRNA が見出された。

本研究で得られた成果は学術上、応用上寄与するところが大きい。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。