

[別紙2]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 Pritsana Chomchan

イネグラッシースタントウイルス (*Rice grassy stunt virus*, RGSV) は、東アジアに発生するイネの重要病原ウイルスである。自然界ではイネと媒介昆虫であるトビロウンカの間を循環し、感染したイネは葉身が細く黄化し、分げつ数が増加し、草丈が低くなる。RGSVはテヌイウイルス属の一種で、ゲノムは6断片のambisense RNAからなり合計12個のORFを持つ。これらのORFから翻訳される推定12種類のタンパク質のうち、機能が明らかなのはP1.339KウイルスRNA複製酵素タンパク質とP5.36Kキャプシドタンパク質のみである。

本病害の有効な防除法を確立するためには、ウイルスの遺伝子発現様式と複製機構の解明などの基礎的な研究が不可欠である。そこで本研究では、6種のRNA上に存在する12個のORFと5種類のタンパク質について、感染イネおよび保毒トビロウンカ体内での発現の有無を調べ、無細胞タンパク合成系を用いて翻訳様式を調べた。さらに、ウイルスタンパク質による複合体形成の可能性を探るため、酵母2ハイブリッド系を用いてウイルスタンパク質間の相互作用を解析した。

### 1. RGSVゲノムの遺伝子発現

感染イネ葉および保毒トビロウンカからRNAを抽出し、ノーザンブロット法によりプラス鎖RNA、マイナス鎖RNAおよびサブゲノムmRNAの検出を試みた。その結果、イネとトビロウンカ由来の全てのRNA試料において、全長のプラス鎖およびマイナス鎖RNAが検出されたが、サブゲノムmRNAに相当する短いRNAは検出されなかった。

次に、RNA2およびRNA5にコードされる3種類のタンパク質に対するポリクローナル抗体を作製し、RNA5およびRNA6にコードされる2種類のタンパク質に対する既存の抗体とともに、感染イネおよび保毒トビロウンカ抽出液から、ウェスタンブロット法により5種類のウイルスタンパク質の検出を試みた。その結果、RNA2にコードされた23 kDaタンパク質は感染イネの細胞壁、オルガネラ画分、膜画分および可溶性画分の全てに検出され、保毒トビロウンカからは約17%の個体から検出された。RNA2にコードされた94 kDaタンパク質は、感染イネおよび保毒トビロウンカのいずれからも検出されなかった。RNA5にコードされた22 kDaタンパク質は感染イネの可溶性画分と保毒トビロウンカから大量に検出され、本ウイルスの複製に重要な機能を持つものと推察さ

れた。同様にRNA5にコードされたキャプシドタンパク質も、イネおよびウンカから大量に検出された。RNA6にコードされた21 kDaタンパク質は感染イネからは検出されたが、保毒トビイロウンカからは検出されなかった。

ウサギ網状赤血球由来無細胞タンパク合成系を用いて、RNA2にコードされた94 kDaタンパク質の翻訳産物を調べた。その結果、N末端側領域は合成されたが、C末端側領域を含むタンパク質は検出されず、94 kDaタンパク質のC末端側領域にはそれ自体を不安定化させる要因があり、感染イネおよび保毒トビイロウンカから本タンパク質が検出できない原因となっているものと推察された。また、RNA2およびRNA5にコードされたタンパク質においては、全長RNAよりもサブゲノムmRNAに相当する短いRNAの方が翻訳効率が10倍以上も高く、RGSVのタンパク質はサブゲノムmRNAから翻訳されることが示唆された。

## 2. RGSVウイルスタンパク質間相互作用の解析

合計12種類のウイルスタンパク質は、同一タンパク質、異種タンパク質、および宿主タンパク質と複合体を形成し、ウイルスRNA複製、細胞間移行、媒介虫伝搬、粒子形成などに機能していると考えられる。そこで、12種類のウイルスタンパク質間の核内での相互作用を酵母2ハイブリッド実験系を用いて解析した。その結果、RNA2にコードされた23 kDaタンパク質とRNA5にコードされた22 kDaタンパク質は、同一分子間で強い相互作用を示した。キャプシドタンパク質間では弱い相互作用が検出された。それ以外のタンパク質では同一分子間、異種タンパク質間とも特異的な相互作用は検出されなかった。RNA5にコードされた22 kDaタンパク質は細胞質内でも同一分子間で強く反応し、さらにファーウェスタン法により*in vitro*でも相互作用することが確認された。

以上を要するに、本研究ではRGSVの遺伝子発現様式を解析しウイルスタンパク質間の相互作用の有無を明らかにした。本論文は、RGSV病害の有効な防除法確立に有用な新知見を多く含むものであり、学術上、応用上寄与するところが少なくない。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。