

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 山口 友加

トガウイルス科アルファウイルス属には、哺乳類、鳥類、昆虫等に感染するプラス鎖 RNA ウイルスの多くの種が含まれる。本属のタイプ種であるシンドビスウイルスを代表とするアルファウイルス・スーパーファミリーは動物と植物の RNA ウイルスの大半を含んでおり、アルファウイルスの感染複製機構の解明は、植物 RNA ウイルスの感染性と病原性を理解する上で、重要な役割を果たしている。本研究では、日本産アルファウイルスであるサギヤマウイルスを材料とし、先ずアルファウイルスゲノムを有効利用する観点から、RNA レプリコン型一過性発現ベクターの開発を試みた。さらに発現系を利用してウイルス増殖過程での重要な一段階である成熟粒子形成に必要とされる RNA ゲノム上の領域を特定した。

1. サギヤマウイルス RNA を用いた一過性タンパク質発現ベクターの開発

アルファウイルスは粒子形成に必要な3種の構造タンパク質、キャプシドタンパク質 (C) と2種類の膜糖タンパク質 (E1 および E2) をサブゲノム RNA の 5'末端側から翻訳する。サブゲノム RNA はゲノム RNA に比べて転写量が数倍多いため、シンドビスウイルスを始め数種のアルファウイルスで構造タンパク質遺伝子を外来遺伝子と置き換えたタンパク質発現系が開発されている。サギヤマウイルスはこれらのウイルスに比べヒトへの病原性がない点に特徴があり、本研究ではサギヤマウイルスを用いた安全性の高い発現ベクター系の開発を試みた。マーカー遺伝子に GFP 遺伝子を用い、サギヤマウイルスの管全長 cDNA クローン pSAG2 から構造タンパク質遺伝子の全てあるいは膜糖タンパク質遺伝子を GFP 遺伝子と置き換えた RNA レプリコン型ベクターを構築した。感染性疑似ウイルス粒子を形成させるために、pSAG2 の複製酵素遺伝子内に変異を加えた非増殖性 pSAG2.3L をヘルパーとして用いた。*in vitro* 転写によって合成されたベクター-RNA とヘルパー-RNA を BHK21 細胞にエレクトロポレーション後、30°C で2日間培養したところ、培地からベクター-RNA とヘルパー-RNA を含む2種類の感染性疑似ウイルス粒子を回収された。さらに高タイター化した疑似感染性粒子を用いて BHK21 細胞に接種し、30°C で2日間培養したところ、 1×10^6 細胞当たり 50 μ g の GFP が合成された。さらに、この発現系を改良し、GFP の C 末端にヒスチジンタグを付加し、ニッケルカラムで精製可能とした。また、C 遺伝子あるいはその 3'側半分の直下流に GFP 遺伝子を連結し、細胞内で C 内在性セリンプロテアーゼ活性によって C/GFP 間が切断されることを明らかにした。また、シンドビスウイルスと異なり、C 遺伝子の 5'側には翻訳エンハンサーが存在せず、構造タンパク質遺伝子全域を外来遺伝子と置き換えても、発現効率は目立って減少しないこと、等を明らかにした。

2. サギヤマウイルス RNA のパッケージングシグナルの特定

アルファウイルスは感染細胞内でウイルス RNA のみを特異的にウイルス粒子内に取り込みヌcleoキャプシドを形成後、細胞膜表面で膜糖タンパク質を獲得し、成熟ウイルス粒子として出芽する。ウイルス RNA 上には C タンパク質と特異的に結合するパッケージングシグナルが存在する。これまで、シンドビスウイルスを始め3種類のアルファウイルスでは 5'側の非構造タンパク質コード領域にこのシグナルが存在することが明らかになっている。本研究では、1. で構築した発現ベクター系を用い、感染性疑似ウイルスによる 2 次感染の有無を指標とし、パッケージングシグナルの特定を試みた。その結果、ヘルパーRNA 内で 301-400 塩基の領域を欠失させた場合には感染性疑似ウイルスが形成されず、401-7350 塩基まで欠失させた場合には感染性疑似ウイルスが形成されて 2 次感染が拡大した。従って、301-400 塩基の領域がゲノム RNA のパッケージングに必要であることが示された。一方、野生型ウイルス粒子内にはゲノム RNA と共にサブゲノム RNA も取り込まれていることが、ノーザン解析の結果、明らかとなった。GFP 発現レプリコン RNA を用いても、レプリコン RNA 由来のサブゲノム RNA が粒子内の効率良くパッケージングされたことから、ゲノムの 3'側にもサブゲノム RNA をパッケージングするシグナルが存在することが明らかとなった。このように、異なる機能を持つパッケージングシグナルがゲノム上の 2 カ所存在すること証明したのは、本研究が初めてである。

以上、本研究ではウイルスゲノムを一つの遺伝資源と見なし、その有効活用の観点から高発現一過性 RNA レプリコン型発現ベクターを開発した。さらにそれを利用して RNA ウイルスの複製過程における一段階である RNA パッケージング機構の一端を明らかにした。従って、本論文は学術上のみならず応用上も価値が高く、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。