

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 山 宮 彩

ムギ類萎縮ウイルス (*Soil-borne wheat mosaic virus*, SBWMV) は *Furovirus* 属のタイプ種で、RNA1 (7.2 kb) と RNA2 (3.6 kb) からなる 2 分節性プラス鎖 RNA ウィルスである。世界各地の冬コムギに感染し、モザイク病や萎縮病を引き起こすコムギの重要病害の一つである。自然界ではネコブカビ目の *Polymyxa graminis* 菌によって土壌伝搬され、ウイルス保毒菌に汚染された圃場でのウイルス病防除は非常に困難である。このように SBWMV は、農業上重要な病原ウイルスであるが、機械的接種による感染性が低い上、増殖に低温が必要で、さらにウイルス精製が困難なため、実験材料として扱いにくく、ウイルスゲノムの分子生物学的研究が立ち後れていた。

本研究では、(1) SBWMV ゲノムの構造と機能の分子生物学的解析を目的に RNA1 と RNA2 の感染性 cDNA クローンを構築し、(2) RNA2 にコードされるタンパク質の感染性における役割を *in vitro* mutagenesis により作出した部位特異的変異体を用いて調べ、(3) RNA2 の自然欠失変異現象を詳細に解析した。

1. 感染性全長 cDNA クローンの構築

プラス鎖 RNA ウィルスのゲノム構造と機能の分子生物学的解析には、全長 cDNA クローンを用いた感染性 RNA の *in vitro* 転写系の確立が必須だが、*Furovirus* 属のウィルスではこれまで感染性 cDNA クローンの構築に成功した例はない。そこで本研究では、SBWMV 日本分離株を用いて感染性 cDNA クローンの構築を試みた。RNA1 と RNA2 の全長 cDNA をそれぞれ T7 プロモーター下流に配置し、大腸菌プラスミドにクローニングし、RNA1 と RNA2 の完全長 cDNA クローン、pJS1 および pJS2 を構築した。T7 RNA ポリメラーゼを用いて pJS1 および pJS2 から *in vitro* で合成した転写産物は、局部病斑宿主 *Chenopodium quinoa* に感染し接種葉にウイルス RNA 接種後と同様の退緑斑を形成した。全身感染宿主コムギ (*Triticum aestivum* 品種フクホ) に対しては全身的に穏やかなモザイク症状を引き起こし、上位葉より電子顕微鏡観察で棒状のウィルス粒子が確認された。従って、pJS1 および pJS2 の *in vitro* 転写 RNA は野生型ウィルス RNA と同様の生物学的性状を示すことが明らかとなり、SBWMV 感染性 RNA の *in vitro*

転写系の確立が確認された。以上の結果、SBWMV ゲノムの構造と機能の分子遺伝学的解析が可能になった。*Furovirus* 属のウイルスで感染性 cDNA クローンを構築したのは本研究が初めてである。

## 2. SBWMV RNA2 にコードされたタンパク質の感染性における役割

RNA2 は、5' 末端に 19 kDa のウイルス外被タンパク質 (CP)、その UGA 終止コドンの読み過ぎにより C 末端側に 64 kDa 領域 (RT) が付加された 83 kDa タンパク質 (CP-RT)、および CP の翻訳開始コドンから 120 塩基上流の CUG を翻訳開始コドンとする 24 kDa の N-CP タンパク質を、3' 側にはシステイン残基に富む機能不明の 19 kDa タンパク質 (Cys19) をコードしている。CP を除く、3 種類のタンパク質 (N-CP、CP-RT、Cys19) の感染性における役割を調べるため、pJS2 を用いて各タンパク質を発現しない変異体を作成し、接種試験を行った。その結果、N-CP と CP-RT は共にコムギに対する全身感染性およびウイルス粒子形成に不要であり、一方、Cys19 は感染性に必須であることが証明された。

## 3. SBWMV から生ずる自然欠失変異 RNA2 の解析

SBWMV は、野外分離株を機械的接種によりコムギで継代すると RNA2 の CP 遺伝子の直下流の RT コード領域に欠失を生じ、野生型ウイルスに比べて激しいモザイク及び萎縮症状を引き起こすことが知られている。本研究では、感染性 cDNA クローン由来の *in vitro* 転写 RNA を接種源とし、欠失 RNA の出現様式と塩基配列を詳細に解析した。その結果、RT コード領域内の欠失はランダムに生じ、継代を繰り返すと RT コード領域の大半がイン・フレームに欠失した変異 RNA2 のみとなることが明らかとなった。従って、RT 領域は感染性と粒子形成には必須ではないが、CP の C 末端に RT 領域の C 末端側の短いペプチドが付加されることが、ウイルスの全身感染性に有利に働くものと推察された。

以上、本研究では、農業上の重要な病原ウイルスであるムギ類萎縮ウイルスの分子生物学的研究を可能にするため、感染性全長 cDNA クローンを構築し、特に RNA2 に絞って、ウイルスタンパク質の感染性における役割を明らかにし、RNA2 の欠失変異現象を詳細に解析した。従って、本研究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) の学位を授与するにふさわしいものと認めた。