

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 大里 修一

本論文は、世界各地で栽培される冬コムギに発生する重要病原ウイルスであるムギ類萎縮ウイルスの RNA ポリメラーゼタンパク質 p152 及び p211 の発現様式と生物学的特性についての詳細な解析とその結果を報告したものである。ムギ類萎縮ウイルスゲノムは 2 分節の RNA 断片から構成され、7.1 kb の RNA1 には p152 および p211 RNA 複製酵素遺伝子と p37 推定移行タンパク質遺伝子が、3.6 kb の RNA2 には外被タンパク質遺伝子、推定菌伝搬性決定因子、および機能不明の p19 遺伝子が存在する。接種源には感染性全長 cDNA クローン由来の *in vitro* 転写産物を用い、感染宿主にはオオムギ葉肉プロトプラスト (*Hordium vulgare* L. cv Monori)、局部感染宿主 *Chenopodium quinoa* 及び全身感染宿主コムギ (*Triticum aestivum* L. cv Fukuho) を用い、細胞レベルでのウイルス RNA 複製、接種葉一次感染細胞から周辺組織への二次感染及び維管束部を使った全身感染性、さらにそれにとまなうウイルスゲノム変異を解析している。

第一章の緒論では、植物 RNA ウイルスのゲノム構造と RNA 複製酵素の発現様式について述べた後、本ウイルスの RNA 複製酵素 p152 および p211 の発現がタバコモザイクウイルスの p126 および p183 RNA 複製酵素同様に、p152 遺伝子終止コドンの部分的読み過ごしにより p211 が翻訳することに着目し、その生物学的意義に関する現在の理解を概説している。

第二章では、本ウイルスの野生型感染性 RNA1 全長 cDNA クローンをを用い、p152 のみあるいは p211 のみを発現する変異型 RNA1 コンストラクト、および野生型 p152 遺伝子の UGA 終止コドンを UAG 及び UAA 終止コドンに改変した変異型 RNA1 コンストラクトを作成し、まず、ウサギ網状赤血球ライセート中での無細胞タンパク質合成系を用いて、目的とするタンパク質が合成されることを確認した。次に、各変異型 RNA1 コンストラクトと野生型 RNA2 コンストラクト由来の *in vitro* 転写産物を用いて局部感染宿主 *C. quinoa* への接種試験を行い、P152 遺伝子終止コドンの UAG あるいは UAA 変異体 RNA1 は、野生型 RNA1 と同様に感染し、大型の退緑病斑を形成することを示した。一方、UGA 終止コドンをセンスコドンに改変し p152 を翻訳せず、p211 のみを翻訳する変異型 RNA1 を用いた場合には極小型病斑のみを形成することを示した。極小型病斑からウイルス RNA を抽出し、改変部位の塩基配列を調べた結果、1 塩基置換で UGA および UAG コドンに変異しうる場合はどちらかの終止コドンへ復帰変異することを明らかにした。全身感染宿主コムギに対しては UAG および UAA 変異型 RNA1 は野生型 RNA1 同様に RNA2 と共に全身感染したが、p152 および p211 変異型 RNA1 には感染性は認められなかった。以上の結果は 2 種類の RNA 複製酵素タンパク質が p152 遺伝子

終止コドンの部分的読み過ごし翻訳により合成されることに重要な意味があることを示している。

第三章では、第二章で用いた変異型 RNA 1 由来の p152 および p211 複製酵素の複製能をオオムギ葉肉プロトプラストを用いて細胞レベルで解析している。まず、ムギ類萎縮ウイルスと植物プロトプラストの感染系を確立した報告例はないため、技術的確立を試みた。その結果、*in vitro* 転写 RNA を接種源とし、約 50%以上の細胞が感染する系の確立に成功した。その過程で、本ウイルス RNA の複製適温が 17°C であり、それより低温および高温では複製能が著しく低下し 25°C では全く活性を示さないことを明らかにした。また、p152 と p211 は異なる RNA 分子から翻訳させても野生型の複製酵素活性を示すことはなく、同一分子から p152 遺伝子終止コドンの部分的読み過ごし翻訳による両タンパク質の合成が野生型活性に必須であることが示された。

第四章では、イースト 2 ハイブリッド実験系を用いて、p152 および p211 を含め、本ウイルス RNA にコードされる全タンパク質間の相互作用を 17°C の培養温度で調べた。その結果、全ての組み合わせで反応は検出されなかった。

第五章では、第二章から第四章の実験結果に基づく総合考察を行なっている。その中で、p152 と p211 RNA 複製酵素が同一 RNA 分子から翻訳される必要があり、それぞれ単独に翻訳された場合には活性が向上せず、酵母核内でも反応しなかった事実から、一つのモデルとして翻訳共役的複製酵素複合体形成について提案している。これはタバコモザイクウイルスを始め、同様の複製酵素発現様式を取る他のウイルスについても適用できる斬新なアイデアである。

以上、本研究では、農業上重要なムギ類萎縮ウイルスの RNA 複製について、温度感受性を明確に証明し、野生型 RNA 複製複合体形成に関する有力なモデルを提唱した。従って、本研究の成果は植物 RNA ウイルスの複製と病原性を理解する上で、農学および生物学両面に大きく貢献するものである。よって、審査員一同は、本論文を博士（農学）の学位論文として価値あるものと判断した。