

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

氏名 平田 久笑

本論文は、9 chapters から構成され、各 chapter の概要は以下の通りである。

Chapter 1: イントロダクション

植物ウイルスは、秩序だった遺伝子発現によって宿主特異的な感染から発病に至るまでのプロセスを、実に巧妙に制御している。カピロウイルス属のタイプ種であるリンゴステムグルーピングウイルス (*Apple stem grooving virus*: ASGV) は、ORF1 に複製酵素 (Rep) と外被タンパク質 (CP)、また ORF2 には移行タンパク質 (MP) とプロテアーゼ (Pro) の保存配列が認められるが、各遺伝子発現機構は明らかでない。本研究では ASGV のゲノムにコードされる遺伝子の機能を探るとともに、その発現機構を明らかにすることを目的として行った。

Chapter 2: 材料と方法

本研究に用いた材料と実験手法について記されている。

Chapter 3: CP および p36 の発現機構の解析

ノーザンブロット解析と変異導入解析を行い、外被タンパク質 (CP) および ORF2 から発現する p36 は ASGV の感染に必須なタンパク質であり、それぞれサブゲノム RNA を介して発現することが示された。

Chapter 4: p36 の機能解析

ORF2 に認められる MP と Pro それぞれの保存配列にアミノ酸置換を導入した変異ウイルスの病原性を比較した結果、MP 保存配列の変異株はすべて感染性を消失した。また一方、green fluorescent protein (GFP) との融合タンパク質として P36 を植物細胞に導入・発現させたところ、MP の保存配列に依存して、既知の MP に特徴的な細胞内局在を示し、以上の結果より、p36 は MP であることが示された。

Chapter 5: DNA 修復系欠損大腸菌株を用いたウイルスゲノムへのランダム変異導入による新規変異株の作出

遺伝子発現機構をより詳細に調べる目的で、DNA 修復系欠損大腸菌株を用いて ASGV のゲノム全長へのランダム変異導入を試みた。その結果、病原性を消失した非感染変異株を 6 株、野生株よりもやや軽微な病徴を発現する弱毒変異株を 2 株、感染性を示すが病徴を発現しない無病徴変異株を 1 株単離した。それぞれの変異はゲノム全長にわたりランダ

ムに挿入されており、植物ウイルスに初めて応用した本法は、従来の変異導入法より簡便かつ効率的であると考えられた。

Chapter 6: 1塩基のサイレント変異による病原性の変化に関する解析

作出された無病徴変異株は、Repの保存配列の直下にあるゲノムの1塩基にサイレント変異を有するのみであり、解析の結果、この変異はウイルスゲノムの複製効率に影響することが示された。また、変異部位付近には、この塩基を含む強固なステムループ構造が予測され、Repの発現に関与していることが示唆された。ウイルスゲノムのサイレント変異によって病徴が劇的に変化する現象は、これが初めて見出された例である。

なお、Chapter 5は、Lu Xiaoyun、山次康幸、宇垣正志、難波成任らとの、またChapter 6は上記研究者と鍵和田聡との共同研究であるが、いずれも論文提出者が主体となって分析および検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

Chapter 7: ORF1にコードされるRep領域の発現様式の解析

ゲノムRNAの*in vitro*翻訳解析、また一方でステムループ構造周辺配列に続き翻訳フレームを違えてGFP遺伝子を結合したコンストラクトの構築と植物細胞における発現解析を行った。その結果、ORF1が翻訳される際、ステムループ構造とその周辺の配列によりある頻度でマイナス1フレームシフトが起こり、その直後の終止コドンで翻訳を終止した短いタンパク質(trans frame protein: TFP)と、フレームシフトせずに翻訳を続けた長いタンパク質(frame protein: FP)が発現することが示された。フレームシフト翻訳により翻訳を終止する短いタンパク質が発現する機構は、ウイルスではこれが初めて見出された例である。

Chapter 8: ウイルス感染に必要なFPの発現領域の解析

ORF1の途中に終止コドンを導入した変異株を複数作出して解析した結果、ASGVの感染はTFPのみでは成立しないが、FPはORF1全長の融合タンパク質として発現する必要はなく、感染に必須なCPはサブゲノムRNAから発現することが示された。

Chapter 9: 考察

ORF1に終止コドンを導入した結果、Rep領域とCP領域が分かれたORFの構成は、カピロウイルス属と近縁なトリコウイルス属のウイルスに見られる。本研究では、ASGVの遺伝子の機能と発現機構に関して明らかにした結果、両属の進化的な関連性が示唆された。

以上の知見は、植物ウイルス学のみならず広くウイルス学に貢献するものであり、博士(生命科学)の学位を授与できると認める。