

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者氏名 山次 康幸

植物ウイルスにより、作物は自身の品質と生産量を著しく低下させるだけにとどまらず、種子伝染による被害拡大の危険性もはらんでいる。ウイルスによる被害は全作物生産量の約 10 パーセントにも上るといわれているが、局所的にはより深刻な被害を与えていると考えられる。本研究では植物 1 本鎖 RNA ウイルスを対象としてその種のボーダーラインに関する分子系統学的解析ならびに複製に関わる宿主翻訳伸長因子に関する解析を行った。

### 1. 植物 1 本鎖 RNA ウイルスの種のボーダーラインに関する解析

チューリップ X ウイルス (TVX, *Tulip virus X*) は長さ約 495 nm、幅約 13 nm のひも状ウイルスであり、チューリップに感染し、葉に退緑斑および壊死斑を生じ、花卉には線状斑を形成するが、TVX はその性状が明らかではなく、従って抗体や PCR などによる感染植物からの検出技術も確立していなかった。そこで、本研究では TVX のゲノムの全塩基配列を解読し、系統解析によりその分類学的性状を明らかにした。

TVX のゲノム RNA の全長塩基配列を解読したところ 3'末端の polyA 配列を除き全長 6056 塩基からなることが明らかになり、典型的な *Potexvirus* 属ウイルスの遺伝子構造を示した。

TVX の分類学的所属を明らかにする目的で、各 ORF にコードされる遺伝子について系統学的解析を行ったところ、TVX は *Potexvirus* 属ウイルスであると判断された。またオオバコモザイクウイルス (PIAMV, *Plantago asiatica mosaic virus*) と最も近縁であり、各タンパク質配列の identity も極めて高い値を示した。そこで、TVX と PIAMV のタンパク質配列の identity を *Potexvirus* 属ウイルスの種間の identity および系統間の identity と比較し、pairwise 解析 (Shukula and Ward, 1988) を行い、その結果と生物学的・理化学的性状などをもとに総合的に判断した結果 TVX と PIAMV は近縁ではあるが異種ウイルスであると結論づけられた。

最近、属レベル以上の分類には RdRp 遺伝子、種レベルの分類には CP 遺伝子が用いられている。しかし、本研究により 1 本鎖 RNA ウイルスの分類は CP のみでは種レベルにおいて分類に支障を生じるケースが見出されるため、CP のみならずその上流の遺伝子、特に RNA ウイルスで保存されており、その複製に普遍的な機能を果たすと考えられる RdRp を比較し、生物学的性状とも併せ、総合的に判断する必要があることを示した。

### 2. 植物 1 本鎖 RNA ウイルスの複製に関わる翻訳伸長因子の解析

RNA ウイルスの複製に関連して、これまで様々な宿主因子の関与が報告されてきたが、中でも翻訳伸長因子 (EF, translation elongation factor) の関与が数多く報告されており、動植物を通じて

RNA ウイルスの複製に普遍的に関与している可能性が考えられる (Lai, 1998)。そこで本研究では、長らく植物のモデルウイルスとして研究が進められてきたタバコモザイクウイルス (TMV, *Tobacco mosaic virus*) を対象として eEF1A が RNA 複製に際し、担っている機能について解析を行った。

#### (1) 翻訳伸長因子と TMV 複製因子の結合解析

eEF1A と TMV ゲノム RNA との結合を GST pull-down 法およびゲルシフト法で解析したところ、eEF1A は TMV 3'UTR と結合することが明らかになった。また、eEF1A と TMV RdRp との結合を免疫沈降法により解析したところ、両者が *in vivo* で結合することが示された。次いで GST pull-down 法および酵母 two-hybrid システムを利用した解析により、eEF1A が TMV RdRp の M ドメインと結合することが示された。以上の結果より eEF1A は TMV ゲノム RNA および RdRp と結合することが示された。

#### (2) 複製における翻訳伸長因子の機能解析

eEF1A が TMV の感染に与える影響について調べる目的で、ジャガイモ X ウイルス (PVX, *Potato virus X*) ベクターを用いた virus-induced gene silencing (VIGS) 法を用いて *eEF1A* のサイレンシングを誘導し、TMV 感染に対する影響を調べた結果、*eEF1A* のサイレンシングにより TMV の感染が抑制されることを示した。次いで、*eEF1A* を過剰発現するタバコ培養細胞を作製し、そこから抽出したプロトプラストにおける TMV RNA の複製を解析したところ、eEF1A の過剰発現により TMV RNA の複製が促進されることが示唆された。*eEF1A* が TMV の RNA 合成に影響を与えているのか、TMV タンパク質や TMV 感染に関わる宿主タンパク質の翻訳に影響を与えているのかを明らかにするため、*eEF1A* のサイレンシングにより宿主翻訳活性に与える影響について調べたところ、eEF1A のサイレンシングは GFP mRNA の翻訳に影響を与えないことが示され、eEF1A が TMV RNA 複製における RNA 合成に関わっていることが示唆された。

感染細胞におけるウイルス複製複合体 (VRC, virus replication complex) と eEF1A の細胞内局在観察を行った。eEF1A と GFP の融合タンパク質 (eEF1A:GFP) をタバコプロトプラストで発現させ、阻害剤処理やマーカータンパク質との局在比較を行ったところ、eEF1A は ER に局在することが示された。一方、MP:GFP を発現する TMV ベクター TMVom-MP:GFP を作出し、TMVom-MP:GFP 感染プロトプラストに対して抗 eEF1A 抗体で免疫染色を行ったところ、VRC は抗 eEF1A 抗体で染色された ER 膜上に分布しており、VRC の集積により形成される大型の VRC は ER 膜の窪みに形成される様子が観察された。これらの結果より、eEF1A が TMV 複製の場に深く関わるということが明らかになった。

以上を要するに、本研究では植物 1 本鎖 RNA ウイルスに種のボーダーラインの概念を導入し、従来の分類基準に一石を投じた。また、植物 1 本鎖 RNA ウイルスの複製に関わる宿主翻訳伸長因子について解析することにより、翻訳伸長因子が動植物を通じて RNA ウイルスの複製に深く関わる事を明らかにした。これらの成果は、学術上また応用上きわめて価値が高い。よって審査委員一同は本論分が博士 (農学) に値するものと認めた。