

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者氏名 橋本 将典

植物ウイルスは、様々な植物に感染し農作物の収量や品質の著しい低下を引き起こすが、感染・増殖の過程を宿主細胞に依存するために化学農薬による防除は極めて困難である。従って、多様な植物ウイルスに共通した感染戦略を明らかにし普遍性のあるウイルス防除手段の確立が望まれている。本研究では、日本国内で発生した *Flexivirus* 科ウイルスを対象として、遺伝子構造および系統関係を明らかにし、細胞間移行に関与する CP 遺伝子の機能に関する解析を行った。

### 1. *Flexivirus* 科ウイルスの遺伝子構造に関する解析

*Flexivirus* 科 *Potexvirus* 属のアスパラガスウイルス 3 (asparagus virus 3; AV3) および *Carlavirus* 属のフキモザイクウイルス (butterbur mosaic virus; ButMV) は、いずれも宿根性の作物を宿主としていることから遺伝子レベルでの正確な診断技術の確立が望まれている。そこで本研究では、両ウイルスの遺伝子構造ならびに分類学的性状を明らかにした。

AV3 のゲノム塩基配列は poly (A) tail をのぞき全長 6,937 塩基であった。ゲノムには、他の *Potexvirus* 属ウイルスと類似した 5 つの ORF が存在した。RdRp および CP のアミノ酸配列を用いて系統樹を作製したところ、いずれにおいても AV3 は scallion virus X (ScaVX) と非常に近縁であることが示唆された。次に AV3 と ScaVX の関係を明らかにするため、*Potexvirus* 属内で TGB を含めたすべての ORF について塩基配列ならびにアミノ酸配列に基づいてペアワイズ解析を行った結果、AV3 は ScaVX と同種異系統であると考えられた。

ButMV のゲノム塩基配列は poly (A) tail を除き全長 8,662 塩基であった。他の *Carlavirus* 属ウイルスと類似したゲノム構造を有し、RdRp および CP のアミノ酸配列を用いて系統樹を作製したところ、RdRp では CVNV と、CP では CLV と最も近縁であった。以上のことから、ButMV は *Carlavirus* 属に分類されるべきウイルスであることが明らかにされた。

### 2. *Flexivirus* 科ウイルスの細胞間移行における外被タンパク質に関する解析

#### 2.1 CP に存在する 2 つの AUG コドンと病原性の関係

*Potexvirus* 属に分類される *plantago asiatica mosaic virus* (PIAMV) は、CP 遺伝子の 5' 末端には同一フレーム内に 2 つの AUG コドン (5' 末端側から AUG1、AUG2 とする) が存在している。AUG1、AUG2 あるいは両方に変異導入したウイルス (それぞれ mCP1、mCP2 および mCP12) を構築し、CP の翻訳開始点とウイルスの感染性への影響について解析した。タバコ属植物において、mCP2 は野生型の PIAMV と同程度の病原性を示したのに対して、mCP1、mCP12 は病原性が著しく低下

した。また、CP 抗体を用いた Immuno-tissue blot 法により接種葉におけるウイルスの拡がりを調べたところ、mCP2 は野生型の PIAMV と同程度にウイルスが拡がったのに対して、mCP1 では拡がりが著しく抑制された。以上の結果から、mCP1 は野生型の PIAMV および mCP2 と比較してアミノ末端領域の 14 aa を欠失したことにより、ウイルスの拡がりが抑制され、その結果病原性が低下したと考えられた。

## 2.2 トランス相補実験を用いたウイルスの細胞間移行に関する解析

細胞間移行における CP アミノ末端領域の細胞間移行における機能について詳細な解析を試みた。まず、CP 遺伝子を欠失させ GFP 遺伝子を導入した変異ウイルス PIAMV-GFP $\Delta$ CP を作製し、同時に CP を一過的に発現させ GFP 蛍光の拡がりにより細胞間移行を判定するトランス相補実験系を構築した。CP アミノ末端領域の 14 aa あるいは 5 aa を欠失した CP14 $\Delta$ 、CP5 $\Delta$  を一過的に発現させたところ、GFP 蛍光の拡がり認められず PIAMV-GFP $\Delta$ CP の細胞間移行は相補されなかった。また、PIAMV-GFP $\Delta$ CP とともに CP14 $\Delta$  を一過的に発現させウイルス粒子を精製したのち電子顕微鏡を用いて観察したところ、野生型の PIAMV と同様のひも状のウイルス粒子が観察された。以上の結果より、CP アミノ末端領域はウイルス粒子形成に必須ではないが、細胞間移行に重要であると考えられた。次に、アラニンスキヤニング変異導入により、細胞間移行に重要なアミノ酸残基の同定を試みた。その結果、CP アミノ末端領域の 5 aa のうち特に 3 番目のロイシン残基が細胞間移行に重要であることが示唆された。

PIAMV の CP アミノ末端領域の細胞間移行における機能が、普遍性を有する可能性について検討を行った。PIAMV にもっとも近縁な種である tulip virus X (TVX) およびタイプ種である potato virus X (PVX) の CP アミノ酸配列を PIAMV と比較し、PIAMV の CP アミノ末端領域 14 aa に該当する TVX の CP と PVX の CP のそれぞれのアミノ末端領域と CP14 $\Delta$  を融合タンパク質として発現するキメラ CP (TV-CP、PV-CP) を作製した。その結果、TV-CP は細胞間移行を相補したが、PV-CP は細胞間移行を相補できなかった。以上のことから、CP アミノ末端領域の機能は近縁なウイルス種間において高度に保存されている可能性が考えられた。

以上を要するに、本研究では 2 種類の *Flexivirus* 科ウイルスの遺伝子構造を明らかにし、細胞間移行を含むウイルスの感染過程において重要な機能を持つ個々のタンパク質の系統関係について議論を行った。また、*Flexivirus* 科ウイルスの細胞間移行における外被タンパク質の機能について解析を行い、細胞間移行において重要なアミノ酸残基を特定した。当該アミノ酸残基が他のウイルス因子あるいは宿主因子との相互作用に重要であると考えられたことから、本研究の成果は他のウイルスの細胞間移行にも共通した CP の機能を明らかにする端緒となる可能性があり今後の展開が期待される。以上のように本研究の成果は、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文が博士（農学）に値するものと認めた。