

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 宮下 脩平

植物病原ウイルスの大半はプラス鎖 RNA をゲノムとする。一般的に RNA ウイルスは DNA ウイルスに比べて変異の蓄積すなわち進化速度が早い。RNA ウイルスゲノム上にコードされた RNA 依存性 RNA ポリメラーゼが塩基変異の校正機能を持たないことが RNA ウイルスの進化速度が早い理由の一つとされている。また植物ウイルスの集団はその生活環のいくつかの段階において遺伝的ボトルネックに遭遇することも知られている。例えば、ウイルスの宿主植物体内での全身移行や媒介昆虫による伝搬に際しては、極めて限られた数のウイルスが移行や伝染に関与するとされる。一方、植物ウイルス感染の初期における原形質連絡利用した細胞から細胞への移行（細胞間移行）段階では、遺伝的ボトルネックの存在は予想されても実際の解析はこれまでなされていない。本論文では、植物 RNA ウイルスの細胞間移行における遺伝的ボトルネックの存在を実験的に示し、植物 RNA ウイルスの進化における意義を数理モデルにより検討した。さらに遺伝的ボトルネックの発生機構についての検討を行った。

第 1 章の緒論に続き、第 2 章ではムギ類萎縮ウイルス (*Soil-borne wheat mosaic virus*, SBWMV) の細胞間移行における遺伝的ボトルネックについて述べられている。SBWMV は 2 分節性のプラス鎖 RNA ウイルスである。RNA2 の外被タンパク質遺伝子およびその関連タンパク質遺伝子を、核局在化シグナルを付加した蛍光タンパク質 YFP 遺伝子および CFP 遺伝子に置換した RNA2 ベクターを作製し、RNA1 と共にコムギ及び *Chenopodium quinoa* の葉に機械的接種を行なった。その結果、いずれの場合でも大半の箇所では YFP と CFP 両方の蛍光が混在して観察されたが、2 種類の蛍光は混在状態から感染域の拡大に伴って分離し、7-9 回の細胞間移行で殆どの細胞がどちらか一方の蛍光を示すようになった。この現象は、2 種類の RNA2 ベクター間で感染領域の分離が起こったことを示しており、隣接細胞で感染を成立させるウイルスゲノム数が非常に少なく、細胞間移行において細胞内ウイルス集団に対する遺伝的ボトルネックが存在することを示している。*C. quinoa* においては、1 回目および 2

回目の細胞間移行後の混合感染細胞と単独感染細胞の数を数え、遺伝的ボトルネックの大きさの推定に用いた。その結果、最初の混合感染細胞から1回目と2回目の細胞間移行における遺伝的ボトルネックの大きさは、それぞれ  $5.97 \pm 0.22$  および  $5.02 \pm 0.29$  と計算された(最尤推定値±標準誤差)。

第3章では細胞間移行における遺伝的ボトルネックによるウイルスの適応的な進化の促進に関して数理モデルを作成し検討している。翻訳されるゲノムRNAに翻訳と共役して *cis* に働く遺伝子や因子では細胞間移行における遺伝的ボトルネックは選択速度に寄与しないが、ゲノムに対して *trans* に働く遺伝子や因子では細胞間移行における遺伝的ボトルネックが適応的なゲノムと適応的でないゲノムを確率的に分離することで、選択を機能させている可能性を示した。さらに第4章では第1章で取り上げたムギ類萎縮ウイルスでの遺伝的ボトルネック発生機構を検討し、RNA2間の塩基配列相同性がボトルネックに関与する可能性を示し、RNA1とRNA2の間には遺伝的ボトルネックは存在しないことを明らかにした。

第5章では、単一RNAゲノム性トバモウイルス属ウイルスを材料とし、遺伝的ボトルネック発生機構に関する検討と数理モデルの提案をしている。さらに、第6章では、トバモウイルスの細胞感染における遺伝的ボトルネック発生様態を解析している。

第7章の総合考察では、本論文を総括し今後の展望が述べられている。

以上、本研究では植物RNAウイルスの進化の一因である遺伝的ボトルネックに関し、ウイルスの細胞間移行における遺伝的ボトルネックの存在を明らかにし、それを数理モデル化した。本研究の成果は、植物RNAウイルスの進化を理解する上で有効である共に、ウイルス病の効率的な防除に利用されることが期待され、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。