

# 論文審査の結果の要旨

氏名 早川 豪人

ウイルスの生存戦略において、感染時期に合わせ時期特異的に必要なタンパク質を発現することは重要である。本論文は、ジェミニウイルス科クルトウイルス属ウイルスのゲノム複製中間体DNAのウイルス鎖にコードされ感染後期にはたらく遺伝子群に着目し、その発現活性化に関わる遺伝子がウイルスゲノムの相補鎖にコードされるC1遺伝子であることを明らかにし、さらにはその活性化に関与するウイルス鎖遺伝子プロモーターのシス配列を明らかにしたものであり、クルトウイルス属ウイルスの感染機構の解明に大きく貢献するものである。

本論文は5章から成り、第I章は緒言、第II章はBSCTVのV鎖mRNAの転写様式の解析、第III章はV鎖遺伝子発現を活性化させるウイルスタンパク質の特定、第IV章はV鎖遺伝子の転写活性化に関与するシス配列の特定、第V章は統合考察となっている。

第I章では、研究の背景と目的を概観した。植物DNAウイルスであるジェミニウイルスは、マストレウイルス属、ベゴモウイルス属、クルトウイルス属、トポクウイルス属の4属に分類される。ウイルスゲノムは環状1本鎖DNAであり、塩基長は約3 kbで、植物の核内で2本鎖環状の複製中間体となる。ウイルス遺伝子は、ウイルス鎖(V鎖)と相同なmRNA (V鎖mRNA)上と、V鎖の相補鎖(C鎖)と相同なmRNA (C鎖mRNA)上にそれぞれコードされる。ジェミニウイルスは、V鎖mRNAに粒子形成や細胞間移行など感染後期に必要なタンパク質をコードし、C鎖mRNAにウイルスゲノムの複製や宿主細胞の細胞周期調節など感染初期に必要なタンパク質をコードする。ゲノム上には遺伝子をコードしていない遺伝子間領域があり、この領域がV鎖、C鎖それぞれの遺伝子発現を調節している。*Beet severe curly top virus* (BSCTV)を含むクルトウイルス属では、V鎖遺伝子発現の活性化機構は未解明であった。そこで本研究では、BSCTVのV鎖遺伝子の発現を活性化するウイルスタンパク質の同定と、発現活性化に関与するシスエレメントの特定を行った。

第II章では、BSCTVのV鎖遺伝子の発現機構を解析した。そのためには、各遺伝子のプロモーター配列を特定する必要があるが、各V鎖mRNAの転写開始点は不明であった。5'-RACE法を用いた解析の結果、V1, V2, V3-mRNAすべてに転写開始点が見いだされた。

第III章では、まず、V鎖遺伝子発現を活性化する遺伝子がウイルスゲノム上にコードされることを明らかにした。次いで、V鎖遺伝子上流配列にFlucを接続したコンストラクト(レポーター)と、各C鎖遺伝子をそれぞれ発現するコンストラクト(エフェクター)を作製し、エレクトロポレーション法を用いてタバコ培養細胞(BY-2)プロトプラストへ共導入し、Fluc活性を16時間後に測定した。その結果、エフェクターとしてC1発現コンストラクトを共導入した場合にのみ、ネガティブコントロールであるGUS発現コンストラクトを共導入した場合と比較してFluc活性が有意に上昇した。一方、BSCTVとは別のウイルスである*Cauliflower mosaic virus* の35Sプロモーター配列をつないだFlucコンストラクトでは、C1による遺伝子発現の活性化は認められず、C1による遺伝子発現はBSCTVのプロモーター配列特異的であることが示唆された。さらに、この遺伝子発現の活性化がmRNA蓄積量の上昇によるものであること、mRNAを安定化させるRNAサイレンシング抑制能がC1には無くC1はV鎖mRNAの転写レベルを増大させる可能性が高いことを示した。

第IV章では、各V鎖遺伝子上流配列に共通するV3の上流配列について、C1による転写活性化に関与する塩基配列の特定を試み、V3の上流配列5'末端側から約50 bp以内にシスエレメントがあることが示唆された。C1は、複製に関与するタンパク質として同定されたが、V3遺伝子上流配列に含まれる遺伝子間領域にはC1が結合する塩基配列が2種類存在する。すなわち、ローリングサークル型のウイルスゲノム複製の起点となるoriを含むステムループ構造を形成する塩基配列、そのステムループ構造の5'末端上流近傍に存在するタンデムリピート配列である。以上の塩基配列のうち、それぞれ1種類を欠失したV3上流配列にFlucをつないだコンストラクトを作製し、C1共導入によるFluc活性の活性化を測定した結果、いずれもV鎖遺伝子上流配列の転写活性化に必要であった。

第V章では、C1による転写活性化に関与する宿主因子に関する考察、ジェミニウイルスの進化に関する考察等を行った。

なお、本論文の研究内容は、宇垣正志、鈴木匡、平塚和之、小倉里江子各氏との共同研究であるが、論文提出者が主体となって実験のデザイン、実験の実施、結果の解釈、既存の知見との比較考察を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。