

氏 名 田中 徹

授与した学位 博士

専攻分野の名称 学 術

学位授与番号 博甲第4648号

学位授与の日付 平成24年 9月27日

学位授与の要件 自然科学研究科 バイオサイエンス専攻

(学位規則第5条第1項該当)

学位論文の題目 ハイポウイルス多機能性タンパク質 p29 によるマイコレオウイルスゲノム再編成

論文審査委員 教授 鈴木 信弘 准教授 園田 昌司 准教授 且原 真木

学位論文内容の要旨

ゲノム再編成はRNAをゲノムにもつウイルスの進化、多様性の推進力の一つである。Sun & Suzuki. (2008)は、世界で初めて誘導可能なレオウイルスのゲノム再編成の *in vivo* 実験系を確立した。すなわち、2種のウイルス、マイコレオウイルス 1 (MyRV1)とハイポウイルス 1 (CHV1)が糸状菌宿主 (クリ胴枯病の病原糸状菌 *Cryphonectria parasitica*) に混合感染すると、MyRV1 のゲノム再編成 (S6 セグメントの倍加、S10 セグメントの内部欠失)が高頻度で誘発され、それがCHV1 にコードされた多機能性タンパク質 p29 によって誘導されることを発見した。MyRV1 はレオウイルス科の構成員で、2重殻粒子を形成し、ゲノムに 11 本の 2 本鎖 RNA (S1-S11)をもつ。一方、CHV1 は粒子を作らない 1 本鎖 RNA ウイルスで、ゲノム再編成を誘導する p29 は 12.7 kb のゲノム中の ORF A にコードされる。本研究では、1)CHV1 p29 によって、MyRV1 S6、S10 以外のセグメントにも再編成が誘導される可能性、2) 誘導される場合、ゲノム再編成を受けたセグメントのウイルス複製・病徴発現への影響、3)CHV1 p29 によるゲノム再編成誘導の分子機構、を明らかにすることを目的とした。

本研究により、CHV1 p29 発現クリ胴枯病菌 (Twp29)で、S1、S2 および S3 にゲノム再編成 (ORF が約 1.5 倍に伸長)が生じ(S1L、S2L および S3L)、しかも S10 に内部欠失が入ったセグメント (S10ss)を持つ変異株 (MyRV1/S1L+S10ss、MyRV1/S2L+S10ss および MyRV1/S3L+S10ss)が得られた。これらゲノム再編成株の性状解析の結果、伸長した ORF が in-frame に連結されており、予想されるサイズの mRNA および巨大化したタンパク質 (VP2L、VP3L)がそれらの感染菌系中に検出された。野生型ウイルスに比べ、ゲノム再編成株は共に穏やかな病徴を引き起こすことが示された。また、CHV1 p29 の MyRV1 ゲノム再編成誘導活性には、1) CHV1 p29 のプロテアーゼ活性は不要であるが、病徴決定 (孢子・色素形成低下)領域は必要であることを明らかにした。また、糖鎖が付加される CHV1 p29 の Asn-151 が、MyRV1 ゲノム再編成に必須であることを示唆するデータを得た。さらに、CHV1 p29 と相互作用する MyRV1 VP9 の細胞内局在を解析した。その結果、VP9 発現菌 (MyRV1 非感染下) では細胞質にスポット状で存在したが、MyRV1 感染下では細胞質で大きなパッチ状の分布パターンを示した。

この研究では、MyRV1 ゲノム再編成が CHV1 p29 によって誘導されるという現象の再現性を確認、ゲノム再編成誘導によるレオウイルスのゲノム機能の解析、多機能性 p29 の MyRV1 ゲノム再編成誘導に必要な領域の同定につながった。今後、CHV1 p29 と MyRV1 VP9 の相互作用機構を解析し、ゲノム再編成誘導の分子機構の更なる解明、ゲノム再編成を利用した MyRV1 ゲノムセグメントのさらなる機能解析を進める必要がある。

論文審査結果の要旨

ゲノム遺伝子再編成はRNAをゲノムにもつウイルスの進化、多様性の推進力の一つである。Sun & Suzuki. (2008) は、世界で初めて誘導可能なレオウイルスのゲノム遺伝子再編成の *in vivo* 実験系を確立した。すなわち、2種のウイルス、マイコレオウイルス1 (MyRV1)とハイポウイルス1 (CHV1)の混合感染糸状菌宿主(クリ胴枯病の病原糸状菌 *Cryphonectria parasitica*)で、MyRV1のゲノム再編成(S6セグメントの倍加、S10セグメントの内部欠失)が高頻度で誘導され、それがCHV1にコードされた多機能性タンパク質 p29によって誘導されることを発見した。MyRV1はレオウイルス科の構成員で、2重殻粒子を合成し、ゲノムに11本の2本鎖RNA(S1-S11)をもつ。一方、CHV1は粒子を作らない1本鎖RNAウイルスで、ゲノム再編成を誘導する p29は12.7 kbのゲノム中のORF Aにコードされる。田中氏の研究により、CHV1 p29発現形質転換クリ胴枯病菌(Twtp29)で、MyRV1 S6、S10以外のS1、S2およびS3にゲノム再編成(ORFが約1.5倍に伸長)が生じ(S1L、S2LおよびS3L)、しかもS10に内部欠失が入ったセグメント(S10ss)を持つ変異株(MyRV1/S1L+S10ss、MyRV1/S2L+S10ssおよびMyRV1/S3L+S10ss)が得られた。これらゲノム再編成株の性状解析の結果、伸長したORFがin-frameに連結されており、予想されるサイズのmRNAおよび巨大化したタンパク質(VP2L、VP3L)がそれらの感染菌系中に検出された。野生型ウイルスに比べ、ゲノム再編成株は共に穏やかな病徴を引き起こすことが示された。また、CHV1 p29のMyRV1ゲノム再編成誘導活性には、1) CHV1 p29のプロテアーゼ

活性は不要であるが、病徴決定(胞子・色素形成低下)領域は必要であることを明らかにした。さらに、CHV1 p29と相互作用するMyRV1 VP9の細胞内局在を解析した。その結果、VP9発現菌(MyRV1非感染下)では細胞質にスポット状で存在したが、MyRV1感染下では細胞質で大きなパッチ状の分布パターンを示した。

この研究では、MyRV1ゲノム再編成がCHV1 p29によって誘導されるという現象の再現性を確認、ゲノム再編成誘導によるレオウイルスのゲノム機能の解析、多機能性 p29のMyRV1ゲノム再編成誘導に必要な領域の同定につながった。田中氏は博士号に値する上記のような十分な研究成果を挙げ、またその過程で十分な研鑽を積んだことを学位論文審査員として認める。