

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 大前 奈月

植物パラレトロウイルスは、2本鎖環状 DNA をゲノムとし、ゲノム DNA 全長に相当するプレゲノム RNA の転写と、プレゲノム RNA のゲノム DNA への逆転写という特異な過程を経て複製する植物ウイルスの一グループである。本論文は、宿主植物がこのウイルスの感染をどのようにして抑制しているか、そして、逆にウイルスはその抑制機構をどのように回避しているか、を明らかにする目的で、ウイルスゲノム DNA のメチル化に特に着目して解析を行ったものである。

第1章では、植物パラレトロウイルスであるカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) を、その宿主であるカブ (*Brassica rapa*) に接種し、感染が成立して CaMV が到達した上位葉において、細胞核内に存在する CaMV ゲノム DNA のシトシン (C) メチル化を解析した。その結果、解析したほぼすべての CaMV ゲノム DNA 分子において、プロモーター領域、転写領域のいずれも、CG、CHG、CHH (ただし H = A or C or T) 配列の C が高度にメチル化されていた。CaMV ゲノム DNA を試験管内で人為的にメチル化すると転写活性が失われたことから、高度にメチル化された感染植物核内の CaMV ゲノムでは、転写活性が失われていることが示唆された。

第2章では、CaMV ゲノムのメチル化の機構を解析した。CaMV 感染植物から small RNA を単離し、その配列を解析し、CaMV ゲノムに由来する small RNA の数量と対応するゲノム領域を明らかにした。その結果、ゲノムのほぼ全長から small RNA が一定のレベルで生成されていること、それらには転写ジーンサイレンシング (TGS) に関わることが知られている 5' 末端が A である small RNA が高頻度で見られることが明らかになった。よって、CaMV ゲノムのメチル化はこれらの small RNA により誘導される TGS により行われることが示唆された。一方、CaMV ゲノムからの主たる転写物であるプレゲノム RNA の 5' 非翻訳領域からは大量の small RNA が生成されており、これはその RNA 領域が二本鎖構造を形成することが原因であった。

第3章では、CaMV 感染植物における CaMV 由来の転写物の量と、その転写機構を解析した。第1章から、感染植物の核内で CaMV ゲノムは高度にメチル化されており、それらからの転写はおこらないと予想される。そこで、実際に感染植物における CaMV 由来の転写物を定量したところ、感染後期においても継続して CaMV ゲノムの転写物が検出され、ウイルスの感染

も拡大していた。植物パラレトロウイルスは、感染細胞核内でゲノム DNA のほぼ全長に相当するプレゲノム RNA を転写し、それを細胞質に移行させ、封入体という構造物の中でゲノム DNA へと逆転写し、外被タンパク質と結合させて、新生ウイルス粒子を構築する。そこで、CaMV 粒子中にパッケージされているゲノム DNA のメチル化レベルを解析したところ、まったくメチル化を受けていなかった。

以上から、植物によるパラレトロウイルス感染の抑制機構として、small RNA を介した TGS によりウイルスゲノム DNA をメチル化し、転写活性を失わせる機構が重要であることが明らかになった。動物ウイルスと比較して、植物ウイルスには DNA をゲノムとするものがきわめて少ない。これは、動物細胞が CG 配列のみをメチル化するのに対し、植物細胞は CG 配列に加えて CHG、CHH 配列もメチル化できる強力なメチル化機構を有しているからかもしれない。また、植物は、TGSに加えて、ウイルス由来の転写物を small RNA に分解し、それに対応するウイルス RNA を切断する転写後ジーンサイレンシング (PTGS) の機構を有することも報告されている。

これらの抑制機構に対し、パラレトロウイルスは以下のような戦略で対抗していることが示唆された。媒介昆虫により植物の細胞核内に運び込まれたウイルス粒子は、その外被タンパク質のはたらきにより、ウイルスゲノム DNA を植物の核内に運び入れる。核内のウイルスゲノムは植物の有する強力なメチル化機構によりやがてメチル化され、転写が抑制されてしまう。そこで、パラレトロウイルスは、多くの他の DNA ウイルスのように DNA の状態のまま核内で複製を行うのではなく、メチル化を受ける前に速やかに大量のプレゲノム RNA を転写し、それを細胞質で逆転写し、メチル化フリーのゲノム DNA を合成し、ウイルス粒子を形成し、それらを核内に再移行させることで転写活性のあるゲノムを核内に継続的に供給していると考えられた。一方、プレゲノム RNA の 5' 非翻訳領域からは大量の small RNA が生成されていたが、これらは PTGS の機構を飽和させ、その活性を低下させるはたらきがあることが示唆された。

以上のように、本論文は、パラレトロウイルスと宿主植物との複雑な相互作用の一端を明らかにしたものであり、ウイルスと宿主の共進化に新たな視点を与えるとともに、パラレトロウイルスの防除にも貢献しうるものと評価された。なお、本論文の大部分は、宇垣正志、鈴木匡との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

よって本論文は、博士（生命科学）の学位請求論文として合格と認められる。