

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 石川 一也

植物ウイルスの大部分はプラスセンス 1 本鎖 RNA ウイルスであるが、近年マイナスセンス 1 本鎖 RNA ウイルスによる農作物への被害が拡大している。マイナスセンス 1 本鎖 RNA ウイルスでは遺伝子操作系が確立されていないため、ウイルス性状や遺伝子機能の多くが未解明である。しかし、これらのウイルスを適切に診断・同定し、防除法を構築するためには、その性状を解明し、ウイルス遺伝子がコードするタンパク質の個々の機能を解明することが重要である。

イチジクモザイク病は世界中で発生が確認されている病気であり、本病に感染すると果実の収量が減少する。本病の病原は永らく未同定であったが、2009 年にマイナスセンス 1 本鎖 RNA ウイルスである fig mosaic virus (FMV) が病原であると同定された。FMV は 4 本に分かれたゲノム RNA を有し、*Emaravirus* 属に属すると考えられるが、*Emaravirus* 属ウイルスの性状や遺伝子機能に関する知見は極めて限られている。本研究では FMV を日本国内で初めて検出・報告し、ゲノムにコードされるタンパク質のウイルス細胞内感染環における機能を中心に調べ、FMV の性状の一端を明らかにした。

1. 我が国で初めての FMV 検出

イチジクモザイク病は日本国内においてもその発生が確認されているが、病原である FMV はこれまで検出されていない。2010 年に島根県出雲市のイチジク圃場において葉にモザイクや退緑などの症状が確認され、FMV の感染が疑われた。そこで、これらのイチジクより RNA を抽出し FMV 特異的なプライマーを用い RT-PCR を行ったところ、核酸の特異的な増幅が認められた。増幅した核酸は既報の FMV の配列と高い同一性を示したことから、これらのイチジクに FMV が感染していることが示された。本研究は日本国内における FMV の初報告であり、病原の和名をイチジクモザイクウイルスと命名した。

2. 新規ゲノム RNA セグメント「RNA5」、「RNA6」の発見

国内で初めて FMV を検出した後に、全ゲノム解読を行うために各ゲノムセグメント全長の増幅を行った。FMV の 4 本のゲノムセグメントの両末端に保存される共通の 13 塩基の配列に合うプライマーを用いて RT-PCR を行い、全ゲノムセグメントを一度の反応で増幅することを試みた。その結果、予想に反し、4 本の既報のゲノムセグメントに加えて、2 本の RNA 断片が増幅され、これらの塩基配列は既報のいかなる配列とも相同性を示さなかった。これら 2 本の RNA に対し、両方の極性の RNA を検出するプローブで FMV 感染 RNA に対しノーザンブロット解析を行うと、双方の極性の鎖が検出

され、これらの RNA 種は感染植物内で複製することが示唆された。また、国内外より収集した 14 の FMV 分離株からもこれらの RNA が検出された。以上の結果より、これらの RNA 種は FMV の新規ゲノムセグメントであると考えられ、「RNA5」「RNA6」と命名した。

3. 移行タンパク質の同定

植物ウイルスは宿主植物への全身感染を成立させるために、細胞間を繋ぐ通路である原形質連絡を通過し細胞間を移行する。一般に植物ウイルスは細胞間移行を促進するタンパク質、移行タンパク質 (MP) をコードするが、FMV においては移行タンパク質が未報告であった。FMV の RNA4 にコードされるタンパク質 p4 は既報のいかなる配列とも相同性を示さない機能不明のタンパク質であるが、p4 の細胞内局在を調べると多くの植物ウイルスの MP と同様に原形質連絡に局在した。さらに、p4 が細胞間移行能を欠失した他種ウイルスの細胞間移行を促進する活性があることを示した。以上より、p4 が FMV の移行タンパク質であることが示された。

4. ヌクレオキャプシドプロテインの細胞内動態の解析

FMV の RNA3 にコードされるタンパク質は、近縁他種ウイルスとの配列相同性から、ゲノム RNA と結合し粒子を構成するヌクレオキャプシドプロテイン (NP) であると推察されていた。しかし、*Emaravirus* 属ウイルスにおいて NP の機能が実際に検証された例はないため、NP の RNA 結合能と細胞内局在を調べた。その結果、NP の RNA 結合能がゲルシフト法により確認され、感染細胞内では ER の近傍に凝集体を形成し、その一部は ER 膜を収奪し粒子を形成していることを明らかにした。また、NP を一過的に発現させた細胞では NP の凝集体はアクチン-ER 網に沿って動いていることが分かった。さらに、NP の凝集体は ER 近傍の細胞質ゾルに局在しており、ER の動きにより発生する細胞質ゾルの流れに沿って動いていることが示された。これらの結果から、NP の凝集体は粒子形成を行うために ER の近傍に局在し、ER 周辺の細胞質ゾルに伴って細胞内を移行すると考えられた。

本研究により、我が国で発生した FMV を初めて報告するとともに、FMV の基本的性状とタンパク質の細胞生物学的な機能に関して複数の重要な知見が得られた。本研究の成果は、農業上重要な意味を持つとともに、ウイルス学的にも、実験系の整備されていない新規のウイルスについて明らかにした価値の高い知見であると考えられる。以上より、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。