

学 位 論 文 題 名

新型家蚕濃核病ウイルス（BmDNV-2）の増殖機構に関する研究

学位論文内容の要旨

家蚕濃核病ウイルス (*Bombyx mori* densonucleosis virus ; BmDNV) はカイコに軟化病を引き起こし、養蚕農家に大きな経済的ダメージを与えるウイルスである。本ウイルスは線状 1 本鎖 DNA をウイルスゲノムとして持つ小形球状ウイルスである。歴史的には伊那株や山梨株を初めとするいくつかの株が分離されており、それぞれ共通の性状を示すことから、パルボウイルス科デンソウイルス (DNV) 属に分類されて来た。また一方で、伊那株と山梨株は蚕品種に対する感受性や血清学的性状の違いからそれぞれ BmDNV-1 と BmDNV-2 と呼ばれ、区別されるに至った。しかし、近年の Bando, *et. al.* (1992) の報告から、BmDNV-2 が BmDNV-1 など他のパルボウイルスとは異なる遺伝子構造を持つことが明らかになり、BmDNV-2 が新しいタイプのウイルスである可能性が示唆された。

本研究では BmDNV-2 の遺伝子構造をより詳しく解析し、本ウイルスがパルボウイルスとは異なる新型ウイルスであることを明らかにすると共に、本ウイルスの増殖機構の詳細をも明らかにしたので以下に報告する。

1. 新型家蚕濃核病ウイルス (BmDNV-2) の複製機構

パルボウイルスのゲノム DNA の末端領域には大きなヘアピン構造を形成し得る回文配列が存在している。ゲノム DNA の複製はこのヘアピン構造をプライマーとして開始し、一方の末端に閉環状構造を有する複製中間体を生産する。

本研究ではこのパルボウイルスに特徴的な複製中間体に注目し、PCR 法を用いた複製中間体の構造解析を行った。すなわち、ウイルス感染細胞内における複製中間体の構造を、BmDNV-1 と BmDNV-2 で比較することにより両者の DNA 複製機構の異同を解析した。

その結果、BmDNV-1 では他のパルボウイルスの複製中間体で観察されるような末端の閉環状構造が検出されたが、BmDNV-2 においてそのような分子は検出できなかった。この結果は BmDNV-2 がパルボウイルスとは異なる機構で DNA を複製する事を示しており、本ウイルスがこれまでに報告のない新しいタイプのウイルスであることを強く示唆していた。

2. BmDNV-2 のゲノム構造解析

本ウイルスは2種のゲノム(VD1, VD2)を持つウイルスであるが、それぞれの大きさは6.6kb, 6.1kbと小さく、その一次構造の決定は比較的容易である。

本研究ではウイルス遺伝子上に存在する情報の解析から増殖機構の解明のアプローチする目的で、VD2の塩基配列を決定し、その遺伝子構造の解析を行った。一方、時を同じくして信州大学と当研究室の共同研究グループによりVD1の塩基配列も決定された。

その結果、BmDNV-2の2種のウイルスゲノム(VD1, VD2)の全塩基配列が決定されたことになり、ウイルスに存在しているORFの大きさや位置、そしてウイルス遺伝子の発現制御に関わると考えられる配列などが明らかになった。

3. BmDNV-2におけるウイルスタンパク質のコード領域同定と機能解析

ウイルスDNAにコードされるウイルスタンパク質の機能については主要構成タンパク質のコード領域が示唆されたのみで、その他のウイルスタンパク質については依然不明のままであり、本ウイルスの増殖機構を理解する上で、ウイルスタンパク質の発現及び機能についてさらに解析する必要性が考えられた。

そこで本研究では、感染細胞におけるウイルス遺伝子の発現を追うと共に、ウイルスDNAの塩基配列を基にウイルスタンパク質発現プラスミドを構築し、培養細胞における一過性の発現系を用いて、ウイルスにコードされているタンパク質の機能解析を試みた。

その結果、ゲノム上に存在する全てのORFからmRNAの転写が認められ、発現量に差はあるものの、VD1, VD2共にウイルス感染細胞内において発現していることが明らかになった。またこれらORFにコードされているウイルスタンパク質についても、ゲノム上に存在する6つのORFの内、VD1ORF1とVD2ORF1を除く4つのORFにコードされているウイルスタンパク質について、少なくともその機能の一部が明らかになった。すなわち、VD1ORF2には主要構成タンパク質がコードされていた。そしてVD1ORF3とVD1ORF4にコードされているウイルスタンパク質(p37, p14)は共に主要構成タンパク質遺伝子のプロモーターをアクティベートし、VD2ORF2にコードされているウイルスタンパク質(p27)は調べた限りにおいてウイルスゲノム上に存在する全てのプロモーターをアクティベートすることが示され、これら3つのウイルスタンパク質はウイルスの制御タンパク質であることが示された。

以上、ウイルスの複製中間体の構造解析からBmDNV-2は動物・植物ウイルスを通して、これまでに報告のない新しいタイプのウイルスであることが明らかになった。しかし、一方において、ゲノム上で構成タンパク質のコード領域がゲノムDNAの3'側に存在しており、5'側には非構成タンパク質がコードされている点や、5'側にあるこの非構成タンパク質のアミノ酸配列中に NTP-binding motifが存在しているなどの点において特に、VD1とパルボウイルス

ゲノムの構造上の類似性も認められた。本ウイルスとBmDNV-1や他のパルボウイルスとの進化・分類学上の関連性については、昆虫ウイルスと哺乳類のウイルスとの関係を考える上でも興味深い課題と考えられた。

ところで、BmDNV-2は厳密な宿主・組織特異性を持っているため、現在、ウイルスに感受性のある培養細胞系は確立されていない。よって、感受性細胞を樹立することにより、宿主特異性の決定に関与する因子を解明する事が可能であると考えられる。本実験では、本ウイルスゲノムDNAをカイコ由来の培養細胞に導入し、ウイルス遺伝子の発現について検討を行ったが、その発現は認められず、BmDNV-2のプロモーターを含むレポータープラスミドを単独で培養細胞に導入してもそれぞれのプロモーター活性は検出できなかった。しかし、VD2ORF2にコードされているウイルスタンパク質(p27)が非感受性細胞において自分自身(VD2ORF2)のプロモーターを含めた全てのウイルスプロモーターをアクティベートすることができるという事実は、このp27が本ウイルスの増殖過程において1つのトリガーとして働いている可能性を示している。つまり、本ウイルスが増殖できるか否かは進入した細胞内でp27を発現できるか否かにかかっている可能性が示唆されたことになる。

以上のことから、本ウイルスの遺伝子発現は宿主細胞の因子のみならず、ウイルス自身がコードする複数の遺伝子産物によっても複雑に制御されていることが明らかになった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 飯 塚 敏 彦

副 査 教 授 上 田 一 郎

副 査 教 授 三 上 哲 夫

副 査 助 教 授 伴 戸 久 徳

学 位 論 文 題 名

新型家蚕濃核病ウイルス (BmDNV-2) の増殖機構に関する研究

本論文は、総頁数75頁、表1、図20からなる和文論文で、他に参考論文4編が添えられている。

家蚕濃核病ウイルス (*Bombyx mori* densovirus ; BmDNV) はカイコに軟化病を引き起こし、養蚕農家に大きな経済的ダメージを与えるウイルスである。本ウイルスは線状1本鎖DNAをウイルスゲノムとして持つ小形球状ウイルスである。歴史的には伊那株や山梨株を初めとするいくつかの株が分離されており、それぞれ共通の性状を示すことから、パルボウイルス科デンスウイルス (DNV) 属に分類されて来た。また一方で、伊那株と山梨株は蚕品種に対する感受性や血清学的性状の違いからそれぞれBmDNV-1とBmDNV-2と呼ばれ、区別されるに至った。しかし、近年の Bando, *et. al.* (1992) の報告から、BmDNV-2がパルボウイルスとは異なる新しいタイプのウイルスである可能性が示唆された。

本研究ではBmDNV-2の遺伝子構造をより詳しく解析し、本ウイルスがパルボウイルスとは異なる新型ウイルスであることを明らかにすると共に、本ウイルスの増殖機構の詳細をも明らかにしたので以下に報告する。

1. 新型家蚕濃核病ウイルス (BmDNV-2) の複製機構

パルボウイルスのゲノムDNAの末端領域には大きなヘアピン構造を形成し得る回文配列が存在している。ゲノムDNAの複製はこのヘアピン構造をプライマーとして開始し、一方の末端に閉環状構造を有する複製中間体を生産する。

本研究ではこのパルボウイルスに特徴的な複製中間体に注目し、PCR法を用いた複製中間体の構造解析を行った。その結果、BmDNV-1では他のパルボウイルスの複製中間体で観察されるような末端の閉環状構造が検出されたが、BmDNV-2においてそのような分子は検出できなかった。この結果はBmDNV-2がパルボウイルスとは異なる機構でDNAを複製する事を示しており、本ウイルスがこれまでに報告のない新しいタイプのウイルスであることを強く示唆していた。

2. BmDNV-2のゲノム構造解析

本ウイルスは2種のゲノム(VD1, VD2)を持つウイルスであるが、それぞれの大きさは6.6kb, 6.1kbと小さく、その一次構造の決定は比較的容易である。

本研究ではウイルス遺伝子上に存在する情報の解析から増殖機構を解明するため、VD2の塩基配列を決定した。一方、時を同じくして信州大学と当研究室の共同研究グループによりVD1の塩基配列も決定されたため、BmDNV-2の2種のウイルスゲノム(VD1, VD2)におけるORFの大きさや位置、ウイルス遺伝子の発現制御に関わると考えられる配列などが明らかになった。

3. BmDNV-2におけるウイルスタンパク質のコード領域同定と機能解析

本研究では、感染細胞におけるウイルス遺伝子の発現を追うと共に、ウイルスDNAの塩基配列を基にウイルスタンパク質発現プラスミドを構築し、培養細胞における一過性の発現系を用いて、ウイルスにコードされているタンパク質の機能解析を試みた。その結果、ゲノム上に存在する6つのORFからmRNAの転写が認められ、発現量に差はあるものの、VD1, VD2共にウイルス感染細胞内において発現していることが明らかになった。またこれらORFにコードされているウイルスタンパク質についても、その機能の一部が明らかになった。すなわち、VD1ORF2には主要構成タンパク質がコードされていた。そしてVD1ORF3とVD1ORF4にコードされているウイルスタンパク質(p37, p14)は共に主要構成タンパク質遺伝子のプロモーターをアクティベートし、VD2ORF2にコードされているウイルスタンパク質(p27)は調べた限りにおいてウイルスゲノム上に存在する全てのプロモーターをアクティベートすることが示され、これら3つのウイルスタンパク質はウイルスの制御タンパク質であることが示された。

BmDNV-2は厳密な宿主特異性を有している。本研究では、カイコ由来の培養細胞に、本ウイルスゲノムを導入してウイルス遺伝子発現の検討を行った。その結果、VD2ORF2にコードされているウイルスタンパク質(p27)が非感受性細胞においてVD2ORF2のプロモーターを含めた全てのORFプロモーターをアクティベートすることが明らかとなった。この事は、本ウイルスの遺伝子発現が宿主細胞の因子のみならず、ウイルス自身がコードする複数の遺伝子産物によっても制御されていることを示した。

以上のように本研究は新しいタイプの昆虫ウイルスの発見を行ったのみならず、カイコのウイルス病防除への可能性をも示す研究となった。よって審査員一同は、最終試験の結果と合わせて、本論文の提出者早川徹は、博士(農学)の学位を受けるに十分な資格があるものと認定した。