

学 位 論 文 題 名

家蚕伝染性軟化病ウイルス (IFV) の遺伝子構造
ならびに増殖機構に関する研究

学位論文内容の要旨

本論文は、総頁数99頁、表2、図21からなる和文論文で、他に参考論文3編が添えられている。

家蚕伝染性軟化病ウイルス (Infectious flacherie virus: IFV) は、カイコ (*Bombyx mori*) に対し致死性の高い軟化病を引き起こし、養蚕業に多大な経済的損失を与える病原ウイルスである。本ウイルスは線状一本鎖RNAをゲノムとして有する小型球状ウイルスである。これまでに明らかにされた物理化学的諸性状から、本ウイルスは分類学上ピコルナウイルス科 (Picornaviridae) に属すると考えられている。現在までのところ、ピコルナウイルス科に属するといわれる昆虫特異的RNAウイルスは数多く報告されているが、そのゲノム構造に関する分子生物学的知見は乏しく、それらウイルスの分類学上の位置づけも確定していない。本研究では、IFVの全ゲノム構造を明らかにし、動植物に広く分布している類似ウイルスとの類縁関係ならびに本ウイルスの遺伝子発現調節機構に関する解析を行ったので、以下にその概要を述べる。

1. 家蚕伝染性軟化病ウイルス (IFV) ゲノムの遺伝子構造解析

家蚕伝染性軟化病ウイルス (IFV) のゲノム構造を解明し、哺乳類のピコルナウイルスや植物のピコルナ様ウイルスと比較することを目的として、本ウイルス遺伝子のcDNAクローニングならびにその塩基配列の解析を行った。その結果、本ウイルスは3'末端側のポリA配列を除いて9650塩基からなるゲノムを有し、ゲノム上には9255塩基 (3085アミノ酸残基) より構成される一つの長大なオープンリーディングフレーム (ORF) が存在することが判明した。このことにより、IFVが哺乳

類のピコルナウイルスと同様にポリプロテインプロセッシング (polyprotein processing) によるウイルス蛋白質産生機構を有していることが明らかとなった。また、アミノ酸配列の解析から、本ウイルスの構成蛋白質はVP3-VP4-VP1-VP2の順にポリプロテインのN末端側にコードされていることが判明し、さらに最もN末端側にはピコルナウイルスのL蛋白質に相当すると考えられるコード領域が認められた。一方、IFVのポリプロテインのC末端側には、ピコルナウイルスの2C蛋白質 (RNAヘリカーゼ)、3C蛋白質 (プロテアーゼ) および3D蛋白質 (RNA依存性RNAポリメラーゼ) 等、ウイルスの複製に必須な蛋白質との間で、アミノ酸配列の相同性の高い領域が存在していた。加えて、これらの相同配列は、IFVと哺乳類のピコルナウイルスのゲノム上で同一の順序で存在しており、このことからこれら相同配列が共通の機能に関わる蛋白質領域であることが強く示唆された。また、IFVの構成蛋白質間のポリプロテイン上の切断部位およびその前後のアミノ酸配列の特徴は、カルジオウイルス属の場合と類似していることが判明し、この特徴に基づいてポリプロテイン上の切断部位を推定したところ、IFVは少なくとも12種の蛋白質をコードしていることが示唆された。さらに、RNA依存性RNAポリメラーゼについて分子系統樹を作製したところ、IFVは哺乳動物のピコルナウイルスよりも植物のピコルナ様ウイルスに属するセキウイルス科 (*Sequiviridae*) やコモウイルス科 (*Comoviridae*) のウイルスに近縁である可能性が示唆された。以上の解析により、動・植物のピコルナ (様) ウイルスが昆虫特異的RNAウイルスと共通の起源を持つ可能性が考えられた。

2. IFVの翻訳開始機構に関する解析

動植物のピコルナ (様) ウイルスゲノムの5' 末端には、キャップ構造は存在せず、代わりにVPgと呼ばれる小型のウイルス性蛋白質が共有結合している。これらウイルスゲノムからの翻訳開始は、ゲノム5' 末端側の非翻訳領域 (5' NCR) 内に存在する機能領域の働きによりキャップ構造非依存的に行われることが知られている。IFVは同様のVPgを付加した5' 末端構造を有するが、先に行った遺伝子構造の解析結果から、IFVの5' 非翻訳領域は哺乳類のピコルナウイルスと比較してかなり短く、また植物のピコルナ様ウイルスに特徴的な塩基組成の偏りもなく、これらピコルナ (様) ウイルスとの間で構造的な類似性は認められなかった。そこで、IFVの蛋白質合成調節機構について明らかにする目的で、無細胞翻訳系なら

びに培養細胞を用いた一過性発現系により、翻訳開始段階における5' NCRの機能について調査した。IFVの5' NCRをレポーター遺伝子上流に連結させたRNAを *in vitro* で作製し、無細胞翻訳系にて翻訳させたところ、レポーター遺伝子の発現量の増加が認められた。また、同様の系によるキャップ構造依存的翻訳の競合阻害実験の結果から、IFVの5' NCRをもつRNAはキャップ類似体による競合阻害の効果が弱いことが明らかとなった。さらに、培養細胞を用いた一過性発現系においても、IFVの5' NCRによる蛋白質発現量の増加が観察された。以上の結果により、IFVの5' NCRは、植物のピコルナ様ウイルスで報告されているようなキャップ構造非依存的翻訳活性化能をもつことが示唆された。また、IFVの5' NCRを介して2つの遺伝子が直列に並んだジシストロニックRNAを作製し、無細胞翻訳系にて翻訳させたところ、IFVの5' NCRの下流に位置する2番目のシストロンからの翻訳がキャップ構造非依存的に行われることが判明した。このことから、IFVの5' NCRは、動植物のピコルナ(様)ウイルスで認められているInternal ribosomal entry site (IRES) 様活性を持つことが示唆された。これらの結果を総合すると、本ウイルスゲノム5' NCRの機能上の特徴は、動物のピコルナウイルスよりもむしろ植物のピコルナ様ウイルスに類似していることが判明した。しかし、本ウイルスと植物のピコルナ様ウイルスとの間で5' NCRの構造を比較したところ、哺乳類のピコルナウイルスと比べて短いという点を除けば、構造上の共通性は認められなかった。こうしたことから、IFVの5' NCRには、他のピコルナ(様)ウイルスとは違った、本ウイルス特有のゲノム翻訳機構が存在していることが推定された。

以上のように、本研究は、IFVの遺伝子のクローニングと塩基配列の解析を行い、昆虫のピコルナ様ウイルスとしては初めて全遺伝子構造を決定した。さらに、本ウイルスと哺乳類および植物のピコルナ(様)ウイルスのゲノム構造上の異同を明らかにし、これらウイルスの分子進化学的な類縁関係について指摘した。また、IFVの5' NCRを用いた一連の解析により、昆虫のピコルナウイルスにおいても、翻訳促進活性ならびにIRES様活性を有する機能領域がゲノムの5' NCRに存在することを初めて明らかにした。

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

家蚕伝染性軟化病ウイルス (IFV) の遺伝子構造 ならびに増殖機構に関する研究

本論文は、総頁数 99 頁、表 2、図 21 からなる和文論文で、他に参考論文 3 編が添えられている。

家蚕伝染性軟化病ウイルス (Infectious flacherie virus: IFV) は、カイコ (*Bombyx mori*) に対し致死性の高い軟化病を引き起こし、養蚕業に多大な経済的損失を与える病原ウイルスである。本ウイルスは線状一本鎖 RNA をゲノムとして有する小型球状ウイルスであり、その物理化学的諸性状から、分類学上ピコルナウイルス科 (Picornaviridae) に属すると考えられている。本研究では、IFV の全ゲノム構造を明らかにし、動植物の類似ウイルスとの類縁関係ならびに本ウイルスの遺伝子発現調節機構に関する解析を行ったので、以下にその概要を述べる。

1. 家蚕伝染性軟化病ウイルス (IFV) ゲノムの遺伝子構造解析

家蚕伝染性軟化病ウイルス (IFV) のゲノム構造を解明するため、本ウイルス遺伝子の cDNA クローニングならびにその塩基配列の解析を行った。その結果、本ウイルスは 3' 末端のポリ A 配列を除いて 9650 塩基からなるゲノムを有し、ゲノム上には 9255 塩基 (3085 アミノ酸残基) より構成される一つの長大なオープンリーディングフレーム (ORF) が存在することが判明した。また、アミノ酸配列の解析から、本ウイルスの構成蛋白質は VP3・VP4・VP1・VP2 の順に 4 つの蛋白質が N 末端側にコードされていることが判明した。IFV のポリプロテインの C 末端側には、ピコルナウイルスの 2 C 蛋白質 (RNA ヘリカーゼ)、3 C 蛋白質 (プロテアーゼ) および 3 D 蛋白質 (RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ) と相同なウイルスの複製に必須な蛋白質がピコルナウイルスの蛋白質と同一の順序で存在していた。IFV の構成

蛋白質間のポリプロテイン上の切断部位およびその前後のアミノ酸配列の特徴は、カルジオウイルス属の場合と類似していることが判明し、この特徴に基づいてポリプロテイン上の切断部位を推定したところ、IFVは少なくとも12種の蛋白質をコードしていることが示唆された。さらに、RNA依存性RNAポリメラーゼについて分子系統樹を作製したところ、IFVは哺乳動物のピコルナウイルスよりも植物のピコルナ様ウイルスに属するセキウイルス科(Sequiviridae)やコモウイルス科(Comoviridae)のウイルスに近縁であることが推定された。以上、ゲノムおよび遺伝子構造の解析から、本昆虫特異的RNAウイルスは、動植物のピコルナ(様)ウイルスと共通の起源を持つことが示唆された。

2. IFVの翻訳開始機構に関する解析

動植物のピコルナ(様)ウイルスゲノムの5'末端には、キャップ構造は存在せず、代わりにVPgと呼ばれる小型のウイルス性蛋白質が共有結合している。これらウイルスゲノムからの翻訳開始は、ゲノム5'側の非翻訳領域(5'NCR)内に存在する機能領域の働きによりキャップ構造非依存的に行われることが知られている。IFVは同様にVPgを付加した5'末端構造を有するが、IFVの5'NCRは哺乳類のピコルナウイルスと比較して短く、また植物のピコルナ様ウイルスとの間でも構造的な類似性は認められなかった。そこで、無細胞翻訳系ならびに培養細胞を用いた一過性発現系により、翻訳開始段階における5'NCRの機能について調査した。その結果、IFVの5'NCRによる蛋白質発現量の増加が観察され、本配列が植物のピコルナ様ウイルスで報告されているようなキャップ構造非依存的翻訳活性化能をもつことを示していた。また、IFVの5'NCRを介して2つの遺伝子が直列に並んだジストロニックRNAを作製し、無細胞翻訳系にて翻訳させたところ、IFVの5'NCRの下流に位置する2番目のシストロンからの翻訳がキャップ構造非依行的に行われることが判明した。このことから、IFVの5'NCRは、動植物のピコルナ(様)ウイルスで認められているInternal ribosomal entry site(IRES)様活性を持つことが示唆され、本ウイルスゲノム5'NCRの機能上の特徴は、動物のピコルナウイルスよりもむしろ植物のピコルナ様ウイルスに類似していることが判明した。

以上のように、本研究は、昆虫のピコルナ様ウイルスとしては初めて全遺伝子構造を決定したものであり、これにより本昆虫ウイルスと動植物のピコルナ(様)ウイルスのゲノム構造上の異同が明らかとなった。さらに、IFVの5'NCRを用いた一連の解析により、昆虫のピコルナウイルスにおいても、翻訳促進活性ならびにIRES様活性を有する機能領域がゲノムの5'NCRに存在することが初めて明らかとなった。得られた新知見は、学術的な貢献のみならず、養蚕業への貢献も大であり、高く評価できる。

よって審査員一同は、伊澤晴彦が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。