

論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻

平成 10 年度博士課程 入学

氏名 岩永将司

指導教官 小林正彦

論文題目 カイコ核多角体病ウイルスによる宿主制御に関する研究

バキュロウイルスは節足動物に特異的に感染するウイルスで、核内で増殖し、多角体または顆粒体と呼ばれる包埋体を多量に形成する。バキュロウイルスは、野外での保存性に優れた包埋体に包含される包埋ウイルス (ODV) と、宿主内での感染に必須の出芽ウイルス (BV) という異なる二段階の形態をとり、迅速な感染を果たすことができる。一般に、バキュロウイルスは 130~180 の遺伝子をもつとされ、その中には宿主の細胞周期を制御する遺伝子や、宿主昆虫を死後に溶解する遺伝子など、宿主を細胞レベルから個体レベルで制御している遺伝子の存在が明らかにされているが、半数近い遺伝子の機能については未だ明らかになっていない。

一方、バキュロウイルスの主な宿主である鱗翅目昆虫は、完全変態によってその発育階梯の目的に適応した形態を形成することができる。特に蛹化期には、幼虫組織が崩壊され、成虫原基が著しい成長を遂げる。この幼虫組織の崩壊は再現性を持って観察されることから、programmed cell death と定義できる。programmed cell death は、その過程の違いによってアポトーシスとネクローシスとに分類されるが、変態期に崩壊する代表的な組織である幼虫脂肪体組織は、アポトーシスによって崩壊するものと推測されている。

本研究は、バキュロウイルスの一種であるカイコ核多角体病ウイルス (BmNPV) の宿主制

御機構について、ウイルス感染が蛹化期の脂肪体崩壊を阻止するという現象を中心に、解明を試みたものである。

1. BmNPV 感染によるカイコ蛹化期脂肪体崩壊阻止の解析

カイコの脂肪体の崩壊が BmNPV によって阻止されるかどうかを調べるため、蛹化直後のカイコ蛹に BmNPV を接種し、脂肪体の様子を観察した。その結果、BmNPV の感染は蛹化後 48-72 時間で脂肪体の崩壊を阻止することが明らかになった。また、BmNPV の感染を経時的に行った場合（蛹化前 48、24 時間、蛹化後 0 時間、24 時間）、どの場合にも蛹化後 48 時間で脂肪体崩壊阻止が観察された。しかし、蛹化後 48 時間において BmNPV を感染させた場合には、24 時間後の蛹化後 72 時間に崩壊阻止が観察された。これらのことから、脂肪体の崩壊阻止にはウイルス感染後少なくとも 24 時間を必要とするものと考えられた。更に、脂肪体の崩壊はゲノム DNA のラダー化を伴うアポトーシスによるもので、ウイルスの感染はこのゲノム DNA のラダー化までを阻止することが分かった。バルスラベルアッセイからは、ウイルスの感染は低く抑えられていた蛹の脂肪体のタンパク質合成能を復帰させていることが分かった。BmNPV は、アポトーシスの阻止因子である *p35* を持つことが知られているが、興味深いことに *p35* の欠損株 *Bmp35D* の感染によっても脂肪体の崩壊は確認された。これはウイルス感染による脂肪体の崩壊阻止が一つの遺伝子産物の結果ではなく、より複雑な機構に基づくことを示唆した。

次に、蛹化期脂肪体の programmed cell death の機構について総合的な解析を試みた。まず、ウイルス感染カイコ蛹脂肪体の cDNA ライブラリーを作製し、ランダム DNA シークエンス解析から得られた EST (Expressed Sequence Tag) を構築した。得られたクローンの相同性検索の結果、蛹化期脂肪体は遺伝子発現の 4.5%を種々のプロテアーゼが占める異常な状態にあることが明らかになった。これらは programmed cell death による脂肪体崩壊の直接的要因になっていると考えられたので、バキュロウイルスはこの様な異常な状況でも感染し、なおかつ増殖を果たしていることが示唆された。更に、ウイルスによる脂肪体崩壊阻止に関わる宿主側因子を同定する為、differential display (DD) 法及び cDNA サブトラクション法を用いた。その結果、ガン細胞で特異的に発現する protein OS-9 や、protein D53 の相同遺伝子の発現が抑制され、抗バクテリア活性を持つヘモリンの相同遺伝子の発現は促進されていることが明らかになるなど、ウイルスによる宿主遺伝子の発現制御が確認された。しかし、多くのクローンについては既知遺伝子に相同性が認められていなく、さらに解析を進めることで脂肪体崩壊やウイルスによる崩壊阻止機構について理解が得られるものと考えられた。

2. BmNPV 遺伝子欠損株を用いた蛹化期脂肪体崩壊阻止機構の解析及び *orf68* 遺伝子の解析

脂肪体崩壊阻止に関わるウイルス側因子を同定する為、62 種類の BmNPV の遺伝子欠損株を蛹化直後のカイコに感染し、脂肪体崩壊の様子を観察した。その結果、BmNPV の *orf68* の欠損株 (BmD68) が脂肪体崩壊阻止に著しい遅延をもたらすことがわかった。そこで、BmD68 の感染能力を個体・細胞レベルにおいて調べた。個体レベルではウイルスの半数致死量 (LD_{50}) と半数致死時間 (LT_{50}) を解析した結果、BmD68 の LD_{50} は野生株と同程度であったが LT_{50} には著しい遅延が認められた。また二次感染に働く BV の増殖曲線を細胞系で調べた結果、BmD68 の BV 増殖は野生株に比べて著しい遅延が観察され、この BV の増殖の遅延が脂肪体崩壊阻止の遅延に結びついたものと考えられた。遺伝子解析の結果、*orf68* は感染後 12 時間よりバキュロウイルスの後期遺伝子発現モチーフから転写される典型的な後期遺伝子であることが明らかになった。これは ORF68 がウイルスゲノム DNA の複製には無関係で、他の段階の BV の増殖において何らかの機能を果たしていることを示唆する。そこで、BV の attachment、entry、budding について解析を行った結果、BmD68 には entry 及び budding の能力の低下が認められた。更に ORF68 の抗体を作製しウェスタン解析を行った結果、ORF68 は BV のエンベロープタンパク質であることが分かった。これは、*orf68* の欠損が BV の entry 及び budding に影響を与えたという結果を強く支持した。更に、ORF68 には何らかの翻訳後修飾がなされている可能性の示唆や核膜の核内側に凝集している様子の観察は、ORF68 が BV の tegument としてキャプシドの核内外輸送や細胞質移行に関与していることを示すものであった。

3. BmNPV 感染による BmN 細胞での宿主遺伝子発現制御の網羅的解析

バキュロウイルスによる宿主制御機構をより詳細に解析するために、培養細胞を用いたサブトラクションを行った。その結果、多様なクローンがウイルスの感染によって発現の制御を受けていることが判った。中には、細胞周期に関わる CDK7 や、哺乳類でのウイルス感染後に見られる CTL (cytotoxic T lymphocyte) による感染細胞溶解などの毒性を阻害する serpin など、非常に興味深いクローンが多数得られた。また、既知の遺伝子に相同性の認められないクローンも多数得られ、ウイルスが制御する宿主側の遺伝子発現が多岐に渡ることが推測された。今後詳細な研究を行うことで、ウイルスの果たす宿主制御が包括的に理解されることが考えられた。

本研究では、主に鱗翅目昆虫の特徴である変態期の programmed cell death とウイルス感染という異なる現象を実験的に組み合わせることにより、バキュロウイルスによる宿主制御につい

て新たな知見を得ることができた。それにより、バキュロウイルスが多様な宿主制御を行うウイルスであり、感染遂行のために複雑な宿主制御機構を構築していることが示唆されたが、今後は、現在進んでいるカイコの EST や BAC のデータベース等を利用することで、さらに多くの情報を得ることができると考えられる。これらを利用した BmNPV によるカイコに対する宿主制御機構の更なる解明は、ヒトなど免疫系が複雑な為宿主制御機構が解明し難い分野の研究に対しても、新たな発展をもたらすものであると期待できる。