

[別紙2]

## 論文審査の結果の要旨

氏名 勝間 進

節足動物のみを宿主とするバキュロウイルスは、大きさ 90-180 kbp の環状 2 本鎖 DNA をゲノムとし、130-150 の遺伝子をもつ。バキュロウイルスのサブグループの一つである核多角体病ウイルス (nucleopolyhedrovirus: NPV) は、感染末期に多角体と呼ばれる包埋体を形成する。多角体は、ウイルスゲノム上にコードされたポリヘドリン遺伝子 (*polh*) により作られた分子量約 31,000 のタンパク質であるポリヘドリンの 12 量体が立方格子状に結晶配列化したもので、多数のウイルス粒子 (occlusion derived virus; ODV) を極めて安定な状態で包埋し、ウイルスの個体から個体への感染の単位となる。

多角体は、感染宿主が死亡した後、宿主体外に飛散し、自然界で NPV が伝播する単位となる。NPV が宿主に感染後、これらの過程を確実に進行させるためには、数々のステップを経なければならず、感染後期においては、*polh* を選択的に高発現することが必要であり、合成されたポリヘドリンを速やかに核へ輸送する仕組み、その後の ODV の包埋を伴う結晶化を成立させる機構が不可欠である。最終的には、多角体を感染個体外に放出させるために、感染個体を溶解させるプロセスも必要となる。

本研究は、多角体及び ODV 形成に異常をもつ *Bombyx mori* NPV (BmNPV) を用いて、上記の各ステップにおける多角体及び ODV の形成に関与する遺伝子領域の同定を試み、ウイルスの本質的機能を解明したもので、3 章からなる。

### 第一章 多角体形態変異株の分子生物学的解析

多角体の形態変異株 6 株を単離し、分子生物学的解析を行った。解析した変異株すべての *polh* に塩基置換が認められ、そのうちの 5 株の変異は翻訳領域に、残りの 1 株の変異はプロモーター領域におこっていた。翻訳領域における塩基置換はすべてアミノ酸置換を伴うものであった。組換えウイルスの作出の結果、すべての株の形態変異は、*polh* における変異のみが原因であり、多角体の結晶化と形態形成がポリヘドリンの 1 次構造に大きく依存することが明らかになった。また、遺伝子解析の結果、ポリヘドリンの結晶化と、ODV とポリヘドリンの相互作用には直接関係がないことが明らかになり、多角体の結晶化が ODV を結晶核としなくても正常に行われることが示唆された。また、多角体非形成株を解析した結果、*polh* プロモーターのコア領域の 1 塩基が置換することで、*polh* の転写がほぼ完全に阻害されていることが判明した。

## 第二章 ポリヘドリンの細胞内局在機構の解析

典型的な多角体を形成しない BmNPV 変異株を 5 株を単離し、生化学的分画実験をした結果、これらのウイルスが産生するポリヘドリンが、核と細胞質の両方に存在することを明らかにした。マーカーレスキュー（相補性）実験により、その形態変異の原因が *polh* の変異によるものであることを明らかにしたが、そのアミノ酸置換は既知の核移行シグナル配列（NLS）に起こってはいなかった。これは、NLS 以外に核移行に関与するアミノ酸残基を特定した最初の例であり、ポリヘドリンの核移行が NLS のみによる単純な機構によるものではないことを示している。また、これらの変異のすべてが *polh* の NLS よりも C 末端側でおこっていることから、この領域がポリヘドリンの核移行に重要な役割を果たしているという新知見を得た。結晶化に関与するアミノ酸残基と核移行に関与するアミノ酸残基が共通していることを示している。

## 第三章 多角体形成数、及びエンベロープ形成に関与する BmNPV 遺伝子の機能解析

ODV の形成が不完全である変異株 5 株を単離し、原因と考えられる候補遺伝子の塩基配列を決定した結果、多角体形成数の減少に関与する *fp* (few polyhedra) にアミノ酸置換を伴う塩基置換を見出し、*fp* における変異の構造解析から *fp* の機能異常は多角体形成よりも ODV 形成の方により大きく影響することを組換えウイルスを作出して明らかにした。

これらのウイルスを昆虫個体に経皮感染させたところ、変異株に感染した個体では、死亡後の虫体溶解が起こらず、その阻害の程度は多角体の形成数が少ない変異株ほど大きかった。また、*fp* が正常で、*polh* のみを欠損させたウイルスを感染させたところ、野生株の感染時と同様に死後の溶解が起こったことから、感染個体の溶解は多角体の産生と直接関係しているのではなく、*fp* 産物の働きによるものであることが明らかになった。*fp* はウイルスの経口感染に必須の遺伝子であり、ウイルスの水平伝播には必要不可欠な遺伝子であることを明らかにした。

以上要するに、本研究は、突然変異誘起剤を用いて作出した BmNPV 変異株を用いて、NPV の生存戦略の最大の特徴である多角体、及び ODV 形成に関与する遺伝子領域を同定し、バキュロウイルスの本質的機能を解明したものであり、学術上また応用上きわめて価値あるものである。よって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。