

## 論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻  
平成 16 年度博士課程 進学  
大門 高明  
指導教員 嶋田 透 教授

### 論文題目： **Functional and evolutionary studies on baculovirus chitinases**

(バキュロウイルスのキチナーゼの機能と進化に関する研究)

バキュロウイルスは大型の二本鎖 DNA ウィルスで、主に鱗翅目昆虫を宿主とする昆虫病原ウィルスである。遺伝子数はおおよそ 80~150 であり、進化の過程で大規模な遺伝子の獲得と喪失が起きてきたと考えられている。バキュロウイルスは細胞レベル・個体レベルで高度な宿主制御を行う。バキュロウイルス感染細胞では宿主遺伝子の発現抑制やアポトーシスの阻止が観察され、組織・個体レベルでは脱皮ホルモンの不活化による脱皮阻害、徘徊行動の誘発、死亡宿主の液状化などが観察される。また、バキュロウイルスのもう 1 つの特徴として、宿主ゲノムと物理的に親密であることが挙げられる。バキュロウイルスは宿主細胞の核内で自身のゲノムを複製するが、その際にしばしば宿主由来の転移因子が転移することが知られている。

以上のことから、私は、バキュロウイルスによる高度な宿主制御を可能とした要因の 1 つが、遺伝子水平転移による宿主遺伝子の獲得(gene capture)ではないかと考えた。そこで、バキュロウイルス、およびカイコのゲノム情報を利用して、バキュロウイルスが宿主から獲得したと考えられる遺伝子を探索した。その結果、バキュロウイルスがコードするキチナーゼ遺伝子(*v-chiA*)がその候補として同定された。本研究では、*v-chiA* の獲得がバキュロウイルスの適応進化にどのように貢献したかを解明することを目的として、*v-chiA* とその宿主ホモログの機能解析および比較解析を行った。

## 1. *v-chiA* の宿主ホモログ *BmChi-h* の構造と機能

カイコゲノム情報（全ゲノムショットガンシーケンス、および大規模 EST データベース）およびバキュロウイルスゲノム情報を利用し、鱗翅目昆虫バキュロウイルス間で保存された遺伝子を探索した結果、カイコの新規キチナーゼ遺伝子 *BmChi-h* を発見した。

*BmChi-h* は腸内細菌科の細菌がコードするキチナーゼ (*Serratia marcescens chiA* など) やバキュロウイルスがコードするキチナーゼ (*v-chiA*) と非常に高い相同性を示した。*v-chiA/BmChi-h* ホモログをコードする生物は非常に限られており、真核生物では鱗翅目昆虫のみであり、ウイルスでは鱗翅目昆虫を宿主とするバキュロウイルスのみであった。系統解析の結果、*v-chiA* は宿主あるいは細菌からの遺伝子水平転移の産物であることが示唆された。

酵素学的性質を調べた結果、*BmCHI-h* はエキソ型の基質選好性を示すキチナーゼであることが明らかになった。発現解析の結果、*BmChi-h* mRNA は脱皮期に特異的に発現し、キチン分解が行われる組織において特に強く発現することが明らかになった。また、免疫染色の結果、*BmCHI-h* は脱皮液・気管・脱皮の際に脱ぎ捨てられる古いクチクラといった、キチン分解が起きる部位に局在することが明らかになった。この発現パターンは、昆虫に普遍的に存在するエンド型キチナーゼと良く一致したことから、両者が協奏的に働いてキチン分解が行われるものと考えられる。また、*BmChi-h* ホモログは広範囲の鱗翅目昆虫においても高度に保存されていた。従って、*BmChi-h* ホモログは鱗翅目昆虫に普遍的に存在し、脱皮期の外骨格分解に利用されることが示唆された。

## 2. *v-chiA* と *BmChi-h* の比較解析

バキュロウイルスの感染個体では死亡後に組織が崩壊し、体がどろどろに液状化する。ところが *v-chiA* を欠損させると宿主の液状化は起きず、体がいわばミイラ化する。また、バキュロウイルスがコードするシステインプロテアーゼ遺伝子 (*v-cath*) 欠損ウイルスでも死亡後の液状化が起こらない。これらのことから、宿主の液状化は *v-chiA* と *v-cath* の協奏的な働きによって引き起こされると考えられる。この宿主液状化は、環境中への効率的なウイルス放出に貢献していると考えられている。

カイコ核多角体病ウイルス *BmNPV* がコードする *v-chiA* (*BmNPV chiA*) と *BmChi-h* の比較解析を行うために、*v-chiA* を欠損させて *BmChi-h* を導入した組換え *BmNPV* (*Chi-h/v-chiAD*) を作成した。*BmNPV CHIA* と *BmCHI-h* の性状比較の結果、*BmNPV CHIA* はアルカリ条件でも高い活性を保持する一方で、*BmCHI-h* は活性を失うことが明らかになった。また、*BmNPV CHIA* は細胞内に局在するが、*BmCHI-h* は速やかに細胞外へ分泌されることが明らかになった。また、この差

はV-CHIAのC末端に保存されるKDELモチーフの有無によって生じることが明らかになった。さらに、感染細胞内のシステインプロテアーゼ活性および死亡宿主の病徴を観察したところ、*BmChi-h*は*BmNPV chiA*の欠損を補償できず、*Chi-h/v-chiAD*感染において、感染細胞内のカテプシン活性が低下し、死亡宿主の液状化も観察されなかった。以上から、*BmNPV chiA*には宿主ホモログが持たない固有の性質（アルカリ適応・細胞内局在・宿主液状化能）が存在することが示唆された。

### 3. 宿主液状化における *v-chiA* の役割

従来、バキュロウイルス感染における *v-chiA* の主な役割は宿主のクチクラの分解であると考えられてきた。すなわち、システインプロテアーゼである V-CATH が宿主組織を溶解し、キチナーゼである V-CHIA が外骨格を分解することで液状化が引き起こされる、というモデルである。ところが、オートグラファ核多角体病ウイルス (*Autographa californica* NPV: AcMNPV) の *v-chiA* 欠損ウイルスに感染した細胞内や宿主液体中では、V-CATH のフォールディングに異常が起き、細胞内で不溶化してしまう現象が報告され、V-CHIA が V-CATH のフォールディングにおいてシャペロンとして機能するのではないか、という仮説が提案された。この仮説を検証するために、*v-chiA* 欠損 *BmNPV* における V-CATH のフォールディングを観察したところ、AcMNPV と同様に V-CATH が不溶化することが明らかになった。さらに、V-CATH のフォールディングにおける V-CHIA の果たす役割を明らかにするために、*v-chiA* の活性部位に変異を導入した組換え *BmNPV* (103ChiAmut) を作成した。103ChiAmut に感染した細胞では V-CATH は不溶化したままであり、宿主の液状化も観察されなかった。また、N-結合型糖鎖の合成阻害によっても V-CATH は不溶化した。以上から、V-CHIA と V-CATH の相互作用には N-結合型糖鎖が介することが示唆された。また、*Chi-h/v-chiAD* ウイルスが宿主を液状化できない理由として、シャペロン様活性はバキュロウイルスのキチナーゼに固有の性質であり、その宿主ホモログには存在しない性質である、ということが推察された。

### 4. *Granulovirus chitinase* の機能解析

鱗翅目昆虫バキュロウイルスは核多角体病ウイルス (NPV) と顆粒病ウイルス (GV) という2つの属に分類されている。*v-chiA* はほとんど全ての NPV にコードされているが、一方で、GV では一部のウイルスのみが *v-chiA* をコードしており、その機能は明らかにされていない。そこで、GV キチナーゼの機能解析および NPV キチナーゼとの比較解析を行うため、*BmNPV chiA*

をコドリング顆粒病ウイルス (*Cydia pomonella* GV: CpGV) *chiA* に置換した組換え BmNPV (103CpGV)を作成した。機能解析の結果、CpGV CHIA はキチン分解活性を持つこと、NPV の V-CHIA と同様にエキソ型の基質先行性を示すこと、発現後速やかに細胞外へ分泌されることが明らかになった。CpGV CHIA は KDEL モチーフを持たないため、この配列の有無によって V-CHIA の分泌性が決定されると考えられる。さらに、103CpGV に感染した宿主は死亡後に液状化すること、103CpGV に感染した細胞では BmNPV CATH のフォールディングが正常に行われることが判明した。このことから、GV キチナーゼも V-CATH のフォールディングにおいてシャペロンとして機能することが示唆された。シャペロン様活性という V-CHIA の持つ特異な性質は、バキュロウイルス間で広く保存される祖先的な形質であり、この性質は NPV と GV との分岐前に生じたものであると考えられる。

以上、本研究では、*v-chiA* の機能解析およびその宿主ホモログとの比較解析により、*v-chiA* が細胞性生物からの gene capture の産物であること、*v-chiA* が宿主ホモログには存在しないユニークな性質を持つことを明らかにした。この V-CHIA に見られる特異な機能は、gene capture 後にバキュロウイルスの系統で起きた、V-CHIA の機能的改変の結果であると推察される。*v-chiA* は膜翅目や双翅目を宿主とするバキュロウイルスに存在しないことから、NPV と GV の分岐前に、鱗翅目バキュロウイルスに *v-chiA* が転移したのと考えられる。

バキュロウイルスは *v-chiA* 以外にも 30-40 種類の宿主ホモログをコードしており、その中にはごく最近の gene capture の産物と思われる遺伝子も存在する。本研究によって、環境中からの新規遺伝子の獲得を狙い、獲得後にはその遺伝子を改変して宿主制御に利用する、というバキュロウイルスの生存戦略の一端を明らかにすることができた。