

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 伊藤 克彦

カイコ濃核病ウイルスには 1 型と 2 型が存在し、いずれも養蚕上の被害をもたらす 1 本鎖 DNA ウイルスである。興味深いことに、カイコの系統の中には、ウイルスの接種量をどれだけ増やしても全く感染しない完全抵抗性（非感受性）を示すものがあり、交配実験の結果から、これらの抵抗性が、優性や劣性の遺伝子によって支配されることが明らかになっている。濃核病ウイルス 1 型に対する完全抵抗性遺伝子は *nsd-1* と *Nid-1* が、2 型に対する抵抗性遺伝子は *nsd-2* と *nsd-Z* が、それぞれ報告されている。しかし、これらの抵抗性遺伝子は単離、同定に至っておらず、その遺伝子本体については未知であった。

近年カイコのゲノム解析が進んだため、形質変異の原因遺伝子をポジショナルクローニングで単離することが可能になってきた。本研究は、カイコ濃核病ウイルスの感染機構と完全抵抗性遺伝子との関係を明らかにすることを目的として、2 種類の濃核病ウイルスに対する宿主の抵抗性遺伝子の単離と機能解析に取り組んだものである。

1. カイコ濃核病ウイルス 2 型抵抗性遺伝子 *nsd-2* の単離と機能証明

カイコゲノム情報と分子マーカーによる連鎖地図情報を利用し、遺伝子の存在領域を第 17 連鎖群上の約 400 kb 内に限定した。そして、この領域内で、抵抗性のカイコにのみ約 6 kb 長の欠失が存在することを明らかにし、さらに、欠失領域上で候補遺伝子を発見した。抵抗性カイコの ORF は、ゲノム上の欠失の影響を受けて、転写領域の 5 分の 3 を欠いていた。

この遺伝子がコードするアミノ酸配列の相同性検索を行ったところ、感受性カイコの完全型の遺伝子産物は、昆虫の中腸内腔側の細胞膜に存在するアミノ酸トランスポーターに約 80% の相同性を示した。膜タンパク質予測プログラム SOSUI によって、本遺伝子の翻訳アミノ酸配列の 2 次構造を予測したところ、感受性系統の遺伝子産物は、細胞膜を 12 回貫通するタンパク質であると推定されたのに対し、抵抗性系統の遺伝子産物は、遺伝子内の欠失により、先頭部分の 3 回の膜貫通構造のみを有していることが推定された。さらに、種々の組織における遺伝子発現を調べたところ、本遺伝子の mRNA は中腸のみで発現していた。これらの結果から、本遺伝子産物は、中腸の細胞膜上で機能しており、その構造の違いがウイルス感染性に関与していると推測された。

本遺伝子が、ウイルス抵抗性の原因遺伝子として機能していることを実証するために、piggyBac ベクターを用い、感受性遺伝子 ; +^{*nsd-2*} の候補遺伝子を *nsd-2/nsd-2* のカイコ系統に導入した形質転換カイコを作出した。導入した遺伝子の発現を、GAL4/UAS システムで制御した。形質転換カイコにウイルスを接種し、ウイルスに対する感受性を調査した結果、GAL4 によって導入遺伝子を発現させたカイコだけが濃核病に感染し、顕著な病状を呈した。以上の結果から、単離した遺伝子がカイコ濃核病ウイルス 2 型抵抗性遺伝子 *nsd-2* であるこ

とを証明した。

2. カイコ濃核病ウイルス 1 型抵抗性遺伝子 *nsd-1* の単離と機能解析

前項と同様の方法により、*nsd-1* の候補領域を第 21 連鎖群の 400 kb 内に絞り込み、その領域内に 1 つの候補遺伝子を発見した。この遺伝子は、ウイルスの標的組織である中腸で特異的に発現しており、さらに、ウイルス抵抗性と感受性カイコ間で、ORF 内に 2 箇所のアミノ酸の置換が存在していた。ウイルス感受性系統では、例外なく片方のアミノ酸置換がアルギニン残基で保存されていた。さらに SOSUI で解析したところ、このアルギニン残基は、ウイルスと接触する中腸内腔側に位置すると予測された。

この候補遺伝子のコードするアミノ酸配列は、SOSUI により、1 回貫通型の膜タンパク質であると推定された。そこで、大腸菌で本遺伝子を発現させ、得られた組換えタンパク質を用いて抗体を作成した。その抗体を用いた中腸切片の免疫染色において、中腸の円筒細胞の膜表面が強く染色された。この結果は、濃核病ウイルスが円筒細胞特異的に感染することと符合していた。

以上要するに、本研究はカイコの濃核病抵抗性遺伝子 *nsd-2* および *nsd-1* のポジショナルクローニングに成功するとともに、それら遺伝子の構造等から濃核病ウイルスの感染機構や宿主の抵抗性機構を考察したものである。これらの成果は、抵抗性蚕品種の育成などの応用へ展開できる可能性があり、また一方では昆虫ウイルスの感染機構解明へ向けて新たな切り口を開いたものである。このように、本論文は学術上、応用上、重要な知見を明らかにしているため、審査委員一同は、博士(農学)の学位論文として価値があるものと認めた。