

氏 名	し 四 方 正 光
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 甲 第 201 号
学位授与の日付	平成11年7月26日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科 機能科学専攻
学位論文題目	核多角体病ウイルス温度感受性変異株の毒性に関する研究
審 査 委 員	(主査) 教 授 松 本 継 男 教 授 宗 川 吉 汪 教 授 渡 邊 隆 夫 教 授 清 水 進

論 文 内 容 の 要 旨

カイコ (*Bombyx mori*) やヤガ科の一種 (*Autographa californica*) の核多角体病ウイルス (それぞれ BmNPV と AcMNPV と略す) は、ウイルス増殖によって宿主細胞を破壊する細胞致死毒性を有する。本論文では、この病毒性の発現とウイルス増殖との関連を解析した。先ず、温度感受性変異株をそれぞれのウイルスから作出し、許容温度と非許容温度で示すそれら変異株の性状と温度感受性を規定する変異遺伝子を明確にした。つぎに、増殖が抑制される非許容温度で宿主に及ぼす影響を調査することにより、ウイルス増殖に必須の遺伝子が宿主への毒性にも関与することを明らかにした。

第一章では、作出した温度感受性変異株の変異遺伝子について、変異領域を特定するために有用なコスミドライブラリーを各ウイルスゲノムについて作成した。BmNPV ではゲノム DNA の全領域にわたって、また、AcMNPV ではゲノム DNA の 90% をカバーするライブラリーを構築した。そして、得られたコスミドライブラリーを使用して、簡便な方法で制限酵素地図が作成されることを示した。

第二章では、BmNPV より分離した非許容温度で増殖が抑制される温度感受性変異株 ts-S1 の性状解析と、ウイルス増殖が抑制される環境下での培養細胞やカイコに及ぼす毒性を検討した。その結果、ts-S1 は、許容温度の 25℃ では野生株同様に増殖するが、非許容温度の 33℃ ではウイルス DNA 複製は行いが出芽型ウイルスの産出が抑制されるとともにポリヘドリンの発現抑制による多角体非形成の表現型をもつことを明らかにした。さらに温度感受性を規定している変異遺伝子が、ウイルス late 遺伝子の発現において RNA ポリメラーゼとして機能する *late expression factor (lef)*-8 遺伝子であることを同定した。ウイルス増殖が抑制される 33℃ での宿主への影響について、培養細胞では感染細胞の増殖は抑制されるが、溶解性感染とならず細胞が壊死するまでウイルスが保持される不稔感染となることを明らかにする一方、カイコ個体でも ts-S1 の増殖は抑制され、感染力が激減することによって毒性が顕著に低下することを明らかにした。また、ts-S1 接種カイコを一定期間 33℃ で飼育した後 25℃ での飼育を継続した場合、25℃ で斃死するに十分なウイルス量を接種したにも関わらず、発病を免れ成虫になる個体が生じることが判明した。25℃ に移行したときの生存率は、接種ウイルス濃度に反比例し、33℃ での飼育期間に比例した。発病を免れた個体におけるウイルス DNA の消長をポリメラーゼ連鎖反応法 (Polymerase Chain Reaction; PCR) で確認したところ、33℃ の飼育期間中に接種ウイルスが個体より消滅していた。これらの結果は、*lef*-8 遺伝子が培養細胞や個体におけるウイルス複製に必須であることを示し、培養細胞の溶解性や個体の病原性に関与することを示唆するものである。

第三章では、AcMNPV より分離した非許容温度で出芽型ウイルスの産出のみが抑制される温度感受性変異株 ts-BD1 について、その性状解析と非許容温度で ts-BD1 が非感染細胞に及ぼす影響について検討した。

その結果、ts-BD1は27℃では野性株様の表現型を示すが、非許容温度の33℃では多角体は形成されるが出芽型ウイルスの産出が完全に抑制される表現型をもつことを明らかにするとともに、この表現型を規定する変異がヌクレオカプシドの核外移行に関与する*gp41*遺伝子にあることを同定した。一方、ts-BD1感染細胞と非感染細胞を33℃で共存させたところ、ts-BD1感染細胞でのみに多角体が形成され非感染細胞は正常に増殖した。このことは、ウイルス増殖が完了する過程でも出芽型ウイルスの産出が抑制されることで、ts-BD1が非感染細胞に対してはいかなる影響も与えないことを示している。これらの事実は、*gp41*遺伝子が毒性に関与し、非許容温度においてts-BD1のすべての遺伝子の発現産物は感染細胞だけに影響を与えることを示唆する。

論文審査結果の要旨

バキュロウイルスの病毒性に関与する遺伝子の探索は、ウイルスの複製機構の解明や害虫防除における微生物資材や有用物質生産系のベクターとしての基本的情報を提供する。

本論文は、BmNPVおよびAcMNPVの病毒性を、温度感受性変異株を作出・選抜することにより検討し、ゲノムDNAライブラリーによるレスキューテストおよびDNAシーケンスから、病毒性を左右する遺伝子としてRNAポリメラーゼ遺伝子 (*lef-8*) および構造タンパク質遺伝子 (*gp41*) を、その変異遺伝子としてそれぞれ同定している。さらに、*lef-8*遺伝子に関してカイコによる生物検定を行い、その病毒性がウイルス量 (遺伝子コピー数) と非許容温度下における飼育期間に依存し、感染離脱する個体の出現を発見している。これは、バキュロウイルスRNAポリメラーゼ遺伝子が昆虫培養細胞および昆虫個体における病毒性に関わる遺伝子として最初に実証したものである。

申請者は、すでに以下に示す8編の公表論文 (うち6編がレフェリー制) を有しており、そのうち筆頭著者となっている3編*が本論文の骨子で、博士論文として十分な内容を備えていると判定される。

1. M. Shikata, H. Shibata, M. Sakurai, Y. Hashimoto and T. Matsumoto (1998): The ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus alters the moulting and metamorphosis of a non-target insect, the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera, Bombycidae). *Journal of General Virology* 79, 1547-1551.
2. M. Sakurai, M. Shikata, Y. Sano, Y. Hashimoto and T. Matsumoto (1998): Virulence of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus infection of non-permissive cultured cells of the silkworm, *Bombyx mori*. *The Journal of Sericultural Science of Japan* 67, 211-266.
- 3*. M. Shikata, Y. Hashimoto, Y. Sano and T. Matsumoto (1998): Construction of a cosmid library and physical mapping of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus genome. *Microbiologica* 21, 259-262.
- 4*. M. Shikata, Y. Sano, Y. Hashimoto and T. Matsumoto (1998): Isolation and characterization of a temperature-sensitive mutant of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus for a putative RNA polymerase gene. *Journal of General Virology* 79, 2071-2078.
- 5*. M. Shikata, M. Nakagawa, Y. Sano, T. Matsumoto and Y. Hashimoto (1998): Effect of rearing at non-permissive temperature on silkworm larvae infected with temperature-sensitive *lef-8* mutant of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Acta virologica* 42, 285-292.
6. M. Sakurai, M. Shikata, Y. Sano, T. Matsumoto and Y. Hashimoto (1999): Phenotypic characterization of ts mutants of the *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) nucleopolyhedrovirus. *Applied Entomology and Zoology* 34, 129-138.
7. 橋本義文、四方正光、中川眞由美、梁瀬徹、松本継男 (1997) : 家蚕核多角体病ウイルスの弱毒化に関する研究、蚕糸科学研究所彙集 45、51-80.
8. 橋本義文、四方正光、桜井真紀子 (1998) : バキュロウイルス、ウイルス 48、51-57.