

氏 名	池 田 敬 子
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 甲 第 229 号
学位授与の日付	平成 13 年 3 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	Molecular characterization of the <i>Bombyx mori</i> cytoplasmic polyhedrosis virus (カイコの細胞質多角体病ウイルスの分子生物学的特性)
審 査 委 員	(主査) 教 授 古 澤 壽 治 教 授 小 田 耕 平 教 授 清 水 進 助教授 杉 村 順 夫 助教授 森 肇

論 文 内 容 の 要 旨

カイコ細胞質多角体病ウイルス(*Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus, BmCPV)は、レオウイルス科に属し、分節した、10本の二本鎖RNAセグメントからなるゲノムを有する。本ウイルスは中腸皮膜の円筒細胞の細胞質に感染しウイルス封入体である多角体を細胞質に形成する。多角体の形状などによって9つの系統が分離されているが、この形状を決定する要因はBmCPVの10番目のセグメントによってコードされている多角体タンパク質(ポリヘドリン)の変異によるものであると推定される。多角体には多数のウイルス粒子が包埋されており、紫外線などからウイルスを保護し、その中に包埋したウイルスの感染力を長い間保持するのに働いている。多角体が昆虫に食下されると、アルカリ性の中腸内腔の消化液によって多角体は溶解し、包埋されていたウイルス粒子が放出され、感染が起こる。本研究ではこの多角体タンパク質に着目し、多角体の形状、多角体へのウイルス粒子の包埋、同タンパク質遺伝子の発現について研究を行った。

本論文は、4つの章から構成されている。

第1章ではBmCPVについてこれまでの研究の背景について述べた。

第2章では、BmCPVが感染細胞における多角体の形成場所や形状の違いによって野生型(H)と8つの変異系統に分けられていることから、ポリヘドリン遺伝子の変異とこのような多角体の形状の違いの関係を解明した。これまでの研究から、野生型を含む4系統(H, A, C1, C2)のポリヘドリン遺伝子の解析が行われ、C末端に-Arg-Leu-Leu-Valからなる4つのアミノ酸を余分に持つ変異系統では核にも多角体を形成することがわかっている。本研究では新たに針状もしくはピラミッド状の多角体を形成する3系統(B, B2, P)からポリヘドリン遺伝子のcDNAクローニングを行い、塩基配列の決定、アミノ酸配列の推定を行った。さらに、多角体の形態に特徴のある変異系統のアミノ酸を比較し、さらに人工的に変異を導入することにより、ポリヘドリンのアミノ酸配列と多角体の形状との関係を明らかにした。これにより、ポリヘドリン遺伝子のN末端側が多角体の形状すなわちポリヘドリンの結晶方向を決定し、C末端側が多角体の形成すなわちポリヘドリン分子同士の会合に関与していることが明らかにされた。

第3章では、多角体にウイルス粒子が包埋されるメカニズムの解明を行った。BmCPVの外殻タンパク質の一つであり4番目のセグメントにコードされているviral capsid protein 3 (VP3)のcDNAクローニングおよび塩基配列の決定を行った。その結果、セグメント4は3259塩基からなり、VP3は1057個のアミノ

酸からなっていることがわかった。このVP3と緑色蛍光タンパク質からなるキメラタンパク質をBmCPVの多角体タンパク質とともに発現させたところ、得られた多角体にこのキメラタンパク質が包埋され、さらにこの多角体をアルカリ溶液 (pH11.0)で処理したところ、多角体が溶解し、中に包埋されていたキメラタンパク質の放出が見られた。このようにして、ウイルス粒子が多角体へ包埋されるにはBmCPVの外殻タンパク質であるVP3が深く関与していることが明らかとされた。また、このVP3は植物レオウイルスと高い相同性を示したことから、昆虫のレオウイルスが多くの植物レオウイルスのプロトタイプであることが初めて示された。

第4章では、ポリヘドリン遺伝子の発現機構を解明した。このポリヘドリンはウイルスの感染後期に大量に発現される。このmRNAは5'末端にCap構造を持つが、3'末端にポリAテールを持たない、しかし、3'非翻訳領域にステム・ループ構造が存在することを見出した。そこで、このステム・ループの機能を明らかにするために、ステム・ループ構造によるレポーター遺伝子の翻訳効率への影響を調べた。その結果、このステム・ループ構造は翻訳効率とともに翻訳の時間をも調節していることがわかった。すなわちこのステム・ループ構造がシスエレメントとして翻訳機構のプログラムの一部を担っているものが解明された。

第5章では、以上のようなBmCPVの分子レベルでの研究成果を踏まえて、今後、多角体が外来タンパク質を包埋するためのカプセルとして利用できるなど、多角体の新規用途への道を拓くことができることを示した。

論文審査の結果の要旨

本論文は、カイコ細胞質多角体病ウイルス(*Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus, BmCPV)の多角体を構成するタンパク質であるポリヘドリンの分子レベルでの解析、多角体にウイルス粒子が包埋されるメカニズムの分子レベルでの解析、さらにポリヘドリン遺伝子の発現機構を解明した。本研究成果により、BmCPVの多角体が他の外来タンパク質を包埋することのできるタンパク質性のカプセルとして応用できる可能性を示した。これにより、様々なタンパク質を多角体の中に包埋することにより、そのタンパク質が持つ機能を長期間安定な状態で保持することができること、またタンパク質のX線結晶解析に応用できるなど、タンパク質工学分野に貢献するものと考えられる。

なお、申請者は査読制度のある学会誌に次の2編の論文を発表し、いずれも申請者が筆頭著者である。

I. 本学位論文作成の基礎となった学術論文

1. K. Ikeda, H. Nakazawa, R. Alain, S. Belloncik, and H. Mori

Characterization of natural and induced polyhedrin gene mutants of *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis viruses

Archives of Virology 143:241-248 (1998)

2. K. Ikeda, S. Nagaoka, S. Winkler, K. Kotani, H. Yagi, K. Nakanishi, S. Miyajima, J. Kobayashi, and H. Mori

Molecular characterization of *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus genome segment 4

Journal of Virology 75:988-995 (2001)

II. 参考論文

1. 森 肇・中沢 裕・池田敬子

細胞質多角体病ウイルスと結晶性封入体タンパク質

ウイルス 第48巻第1号: 81-88頁 (1998)