氏　　名	**櫻井 真紀子**
学位(専攻分野)	博　　士（学術）
学位記番号	博甲第２６０号
学位授与の日付	平成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規程第３条第３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	**異種バキュロウイルスの同時感染による遺伝子産物の機能上の補完に関する研究**
審査委員	(主査) 教　授　松本　継男 教　授　宗川　吉汪　　教　授　山本　雅敏 助教授　森　　肇

論文内容の要旨

カイコ核多角体病ウイルス（BmNPV）の温度感受性変異株を作出し、その性状を解析するとともに、作出した変異株と *Autographa californica* 核多角体病ウイルス（AcMNPV）をカイコ培養細胞および個体に同時感染させ、ウイルスの増殖や組換え体ウイルスの出現などについて調査することにより、ウイルスの遺伝子発現産物が異種ウイルスの複製機能に補完的現象を示すことを新しく見出すとともに、ウイルス進化に関する新知見を加えた。本論文は第一章（第一部、第二部）および第二章（第一部、第二部）より構成されている。

第一章は、許容温度（25℃）では野生株と同様に増殖するが、非許容温度（33℃）では増殖が阻害される BmNPV の温度感受性変異株（ts-S2、ts-S3 および ts-S4）を作出し、各変異株の 33℃における性状を BmN4 細胞で調査した結果をまとめた。なかでも変異株 ts-S2 は、33℃でウイルス DNA 複製、出芽型ウイルス（BV）産生、および多角体タンパク質の合成が阻害される変異株で、その温度感受性を規定している変異領域は、遺伝子 *dnahel* にあることを明らかにした。*dnahel* は推定 DNA ヘリカーゼ遺伝子とされる初期遺伝子の一つで、ウイルス DNA 複製に必須の遺伝子であり、この遺伝子に変異があるために 33℃でのウイルス増殖が阻害されたものと推察した。また 4 齢起蚕に ts-S2 を接種して 33.5℃で飼育することにより、個体においてもこの温度感受性が維持されていることを明らかにした。

第二章は ts-S2 と AcMNPV を、カイコ培養細胞と個体にそれぞれ同時感染させ、その感染特性をまとめた。まず、AcMNPV を宿主外細胞 BmN4 に感染させたところ、BV 産生は認められなかったがウイルス DNA 合成や感染細胞に対する病毒性は認められた。これは、AcMNPV のウイルス DNA 複製に必須の遺伝子が BmN4 細胞内で発現し、正常に機能していることを示唆するものであった。AcMNPV の宿主域を規定する遺伝子として *p143* が知られているが、本遺伝子はウイルス DNA 複製にも必須の遺伝子であるにもかかわらずウイルス DNA 合成が行われたことは、BmN4 細胞内では *p143* はウイルス DNA 合成以後のウイルス複製に必須の機能が損なわれていることを推測させた。

次に、AcMNPV 初期遺伝子の発現産物が、BmNPV のウイルス複製への関与について、ts-S2 と AcMNPV を BmN4 細胞に同時感染させて調べたところ、33℃では ts-S2 の増殖は認められたが、AcMNPV の増殖は認められなかった。また同時感染により温度感受性を喪失した組換え

体ウイルスは検出されなかった。この事実は、ts-S2 の変異遺伝子である *dnahel* の代わりに、AcMNPV の相同な遺伝子 *p143* の発現産物によってウイルスの増殖が可能となったと推測した。また AcMNPV の *p143* は BmN4 細胞ではウイルス DNA 合成以降の機能が損なわれていることから、この同時感染による ts-S2 の増殖は、ウイルス DNA 合成の段階では AcMNPV の *p143* の発現産物により、またそれ以降は ts-S2 の *dnahel* の発現産物を用いてウイルスの複製が行われたものと推測された。従来、２種類の異種ウイルスの同時感染には、ウイルスの干渉により増殖が阻害されることが報告されているが、本実験では異種ウイルスを同時感染させても、ウイルスの増殖には干渉を受けないという新知見が得られた。

さらに、4 齢起蚕に ts-S2 と AcMNPV を同時接種して 33.5℃で 7 日間飼育して検証したところ、ts-S2 の単独接種に比べ、AcMNPV との同時接種では ts-S2 の病毒性が約 3 万倍高くなった。また同時接種により温度感受性を喪失した組換え体ウイルスも若干出現した。今日まで個体に比べて培養細胞に、組換え体ウイルスの出現頻度が高いとされているが、本実験では個体でのみに組換え体ウイルスが確認された。これは宿主域を異にする異種ウイルス間では、培養細胞より個体に組換え体ウイルスが出現しやすい状態にあるものと推測されるとともに、単独感染では増殖不可能な個体に２種類の異種ウイルスを同時感染させると、増殖不可能な環境下でウイルス間の組換えにより増殖可能となる因子を獲得して、増殖可能なウイルスへと変化するものと推測された。

論文審査の結果の要旨

昆虫に起病性を示すバキュロウイルスの病毒性を解析することは、ウイルスの複製機構の基本的究明に寄与するばかりでなく、害虫防除や有用物質生産用ベクターとしての微生物資材の利用に重要な情報を提供する。本論文はカイコ核多角体病ウイルス（BmNPV）の病毒性の発現機序の解明のために、温度感受性変異株を作出し、また異種ウイルス（AcMNPV）との同時感染という独創的な実験系を導入することにより、病毒性の獲得に補完的機能が形成されるとした新知見を明らかにしている。

先ず、作出した変異株がウイルス増殖の初期遺伝子の発現に欠損をもつ変異株であることを明らかにする一方、異種ウイルスが異種宿主細胞内でも初期遺伝子の発現は容易に起こることを見出し、ついで変異株が異種ウイルスとの共存下で病毒性発現を回復する事を発見した。また混合感染した宿主内に組み換え体ウイルスが形成されることを見出し、自然界におけるウイルスの進化についても言及している。申請者が見出したこれら新しい知見は、宿主昆虫におけるバキュロウイルスの感染像の解析に重要な話題となる。

申請者はすでに以下に示す４編の論文を公表（内３編レフェリー制）しており、筆頭筆者とする２編（いずれもレフェリー制）を申請論文の骨子としてまとめている。

1. 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: 211-216.
2. M. Shikata, H. Shibata, M. Sakurai, Y. Sano, Y. Hashimoto and T. Matsumoto (1998): The ecdysteroid UDP-glucosyl transferase gene of *Autographa californica*

nucleopolyhedrovirus alters the molting and metamorphosis of a non-target insect, the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera, Bombycidae). *Journal of General Virology* 79: 1547-1551

3. 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.

M. Sakurai, M. Shikata, Y. Sano, T. Matsumoto and Y. Hashimoto (1999): Phenotypic characterization of ts mutants of the *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Applied Entomology and Zoology* 34: 129-138.