

バキュロウイルスの多角体形成機構に関する
分子生物学的研究

勝 間 進

序論		1
第一章	多角体形態変異株の分子生物学的解析	
	1. 緒言	7
	2. 材料と方法	9
	3. 結果	
	3-1. 各変異株の特徴	16
	3-2. <i>polh</i> の塩基配列の解析	19
	3-3. 変異型 <i>polh</i> をもつ組換えウイルスの作成	24
	3-4. 超遠心法による多角体内のウイルス粒子量の検定	25
	3-5. 変異株の経口感染力の検定	25
	3-6. 変異ポリヘドリンの生化学的性質の検討	26
	4. 考察	30
第二章	ポリヘドリンの細胞内局在機構の解析	
	1. 緒言	36
	2. 材料と方法	38
	3. 結果	
	3-1. 変異株の特徴	41
	3-2. ポリヘドリンの細胞内局在	44
	3-3. マーカーレスキュー法によるゲノム上の変異領域の同定	44
	3-4. 塩基配列の決定による変異部位の同定	46
	4. 考察	49
第三章	多角体形成数、および包埋ウイルス形成に関与する バキュロウイルス遺伝子の機能解析	
	1. 緒言	52
	2. 材料と方法	55
	3. 結果	
	3-1. 経口感染力の検定	61
	3-2. 多角体形成数の調査	62
	3-3. 出芽型ウイルス (BV) の増殖	62
	3-4. <i>polh</i> の解析	66

3-5. 超遠心法による多角体内のODV量の検定	66
3-6. 変異株の原因遺伝子の候補選択	67
3-7. ODV特異的タンパク質遺伝子 <i>odv-e66</i> の解析	68
3-8. 変異株の <i>fp</i> のクローニング、および塩基配列の決定	71
3-9. <i>fp</i> 欠損株(Bm25KD)の作成、および解析	77
3-10. Bm25KDを用いた変異型 <i>fp</i> をもつ組換えウイルスの作成	77
3-11. <i>fp</i> の変異と多角体数の関係	79
3-12. 変異株における <i>polh</i> 転写量の検討	79
3-13. 感染幼虫個体における <i>fp</i> の機能解析	80
4. 考察	84
総合考察	92
摘要	107
謝辞	112
引用文献	114

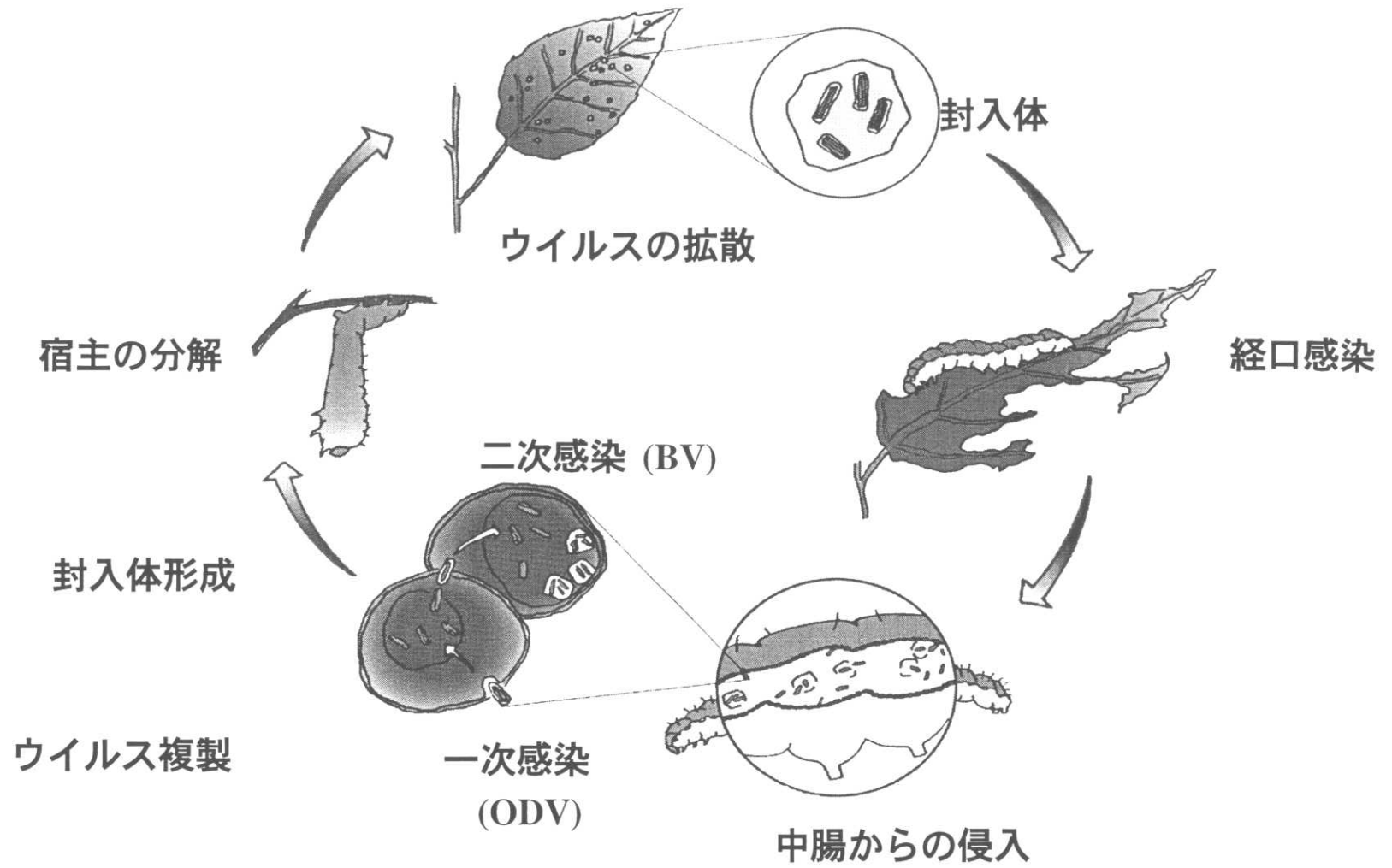
序論

ウイルスは、核酸とそれを取り囲むタンパク質の殻から構成される。自身でリボゾームなどのタンパク質合成工場をもたないため、宿主の核、または細胞質において、宿主がもつエネルギー生産系やタンパク質合成系を用い、ゲノムの複製を行い増殖する。ウイルスには細胞内に侵入すると直ぐに増殖を開始するものや、しばらく細胞内に潜伏し、ある刺激がきっかけで増殖を始め、病原体として宿主細胞を侵すものもある。ウイルスはいったん外界に曝されると、紫外線などによってウイルスゲノムが損傷を受け、複製能力を失ってしまう。このように核酸の周りにタンパク質がコートされただけの存在であるウイルスは、自然界では通常安定に保持されることが難しいと考えられる（前田, 1993）。

節足動物、特に昆虫を宿主とするウイルスであるバキュロウイルスは、ウイルスとしては非常に大きい 120-180kb の環状 2 本鎖 DNA をゲノムとして持ち、その中には 120-150 の遺伝子を含むと考えられている。バキュロウイルス科は核多角体病ウイルス（Nucleopolyhedrovirus: NPV）属と顆粒病ウイルス（Granulovirus: GV）属という 2 つのサブグループから構成される。バキュロウイルスをはじめとする昆虫ウイルスの特徴の一つに、ウイルス粒子を含んだ包埋体と呼ばれる構造物を感染末期に大量に形成することがあげられる。NPV が形成する多角体（polyhedron）

は、光学顕微鏡下でも観察できるほど大きい結晶であるのに対し、GV が形成する顆粒体 (granule) と呼ばれる包埋体はその名の通り、電子顕微鏡下でしか観察することができないほど微小である。また、その大きさに比例して、多角体はその中に多数のウイルス粒子を含むいわばウイルスのアパートのような構造をとるのに対し、顆粒体はその中にウイルス粒子を一つしか含まない一軒家のような構造をとるという特徴もある。これらの包埋体は、ウイルス粒子を極めて安定な状態で包埋し、自然界の様々な不活性化因子から、ウイルス粒子を何十年もの間、安定に保持する役目を果たしている (Rohrmann, 1986; Grasela, *et al.*, 2002)。また、包埋体はウイルスの水平伝播の単位として機能しているため、ウイルスの野外での生存には必須の構造体である。NPV や GV 以外にも昆虫ウイルスにはスフェロイジンを産生するエントモポックスウイルスなど、包埋体を形成するウイルスが存在し、この包埋体を形成するというバキュロウイルスの戦略が、昆虫ウイルスに特異的な生存手段となっているといえる。

バキュロウイルスのもう一つの大きな特徴は、ウイルス感染サイクルに、構造 (構成タンパク質) が異なる 2 種類のウイルス粒子が形成されることである。一つは、昆虫個体から昆虫個体へ一次感染が広がる際に働く包埋型ウイルス (occlusion derived virus; ODV) といわれるものであり、一方、細胞間の二次感染の際に機能するウイルス粒子は出芽型ウイルス (budded virus; BV) と呼ばれる。



核多角体病ウイルス (NPV) の感染サイクル

それぞれのウイルス粒子は、それぞれの感染経路に特化した構造をとっている (Keddie, *et al.*, 1989; Engehald, *et al.*, 1994)。たとえば、通常の条件下では、ODV は昆虫培養細胞には感染性をもたず、BV は昆虫に食下されても感染性をもたないことが知られている (Volkman & Summers, 1977; Volkman, *et al.*, 1976; Okazaki, H *et al.*, 1995; Furuta, 1972; Furuta, *et al.*, 2001)。NPV の感染サイクルは、宿主昆虫が多角体を食下することによって開始される。食下された多角体は、中腸内のアルカリ性の消化液によって速やかに溶解され、包埋されていた ODV が露出され、それが囲食膜を通過して、中腸細胞、もしくは体腔内の脂肪体細胞などに感染する (一次感染)。次に一次感染によって細胞内で増殖したウイルスは BV を細胞外に大量に放出する。BV は GP64 と呼ばれる糖タンパク質で先端が覆われており、宿主細胞への吸着が効率よく行われるような構造をとっている (Whitford, *et al.*, 1989)。中腸細胞から体腔内に放出された BV は、体液の循環によって宿主の様々な組織に感染するが、鱗翅目昆虫、たとえばカイコの場合、ウイルスは主として脂肪体で増殖する。このような BV による感染を二次感染と定義している。感染末期になると、NPV は大量の多角体を感染細胞核内に形成し、感染細胞から放出された多角体で感染個体の体液が白濁するほどになる。その後、ウイルスが合成するシステインプロテアーゼ (Ohkawa *et al.*, 1994) とキチナーゼ (Hawtin *et al.*, 1997) などの作用により、感染個体が溶解し、多角体が野外に放出される。

多角体は何十年も野外の劣悪な環境に耐える強固な構造をとっており、通常の条件では、溶解して ODV が外界に曝されることはない。新たな宿主昆虫に食下されたとき、多角体は腸管内のアルカリプロテアーゼにより溶解し、ODV が放出され、次代のウイルス増殖を引き起こす感染サイクルが開始される。

NPV が形成する多角体は、分子量約 31,000 のポリヘドリンと呼ばれるタンパク質の 12 量体が立方格子状に配列し、結晶化したものである。ポリヘドリン遺伝子 (*polh*) はすでに多くの NPV において決定されており、その高発現プロモーターを利用した外来遺伝子発現系は遺伝子工学の基礎的な方法として広く用いられている (Maeda *et al.*, 1985; Maeda, 1989; Choudary *et al.*, 1995)。バキュロウイルスの研究は、ヤガ科の一種である *Autographa californica* に感染する NPV (AcNPV) を中心に進められている。1994 年に AcNPV の約 130kb にわたる全ゲノム配列が決定されて以来、多くのバキュロウイルスにおいて全ゲノム配列が決定され、遺伝子欠損株の作成による遺伝子機能解析が推し進められている (Ayres *et al.*, 1994; Ahrens *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2001; Gomi *et al.*, 1999; Hashimoto *et al.*, 2000; Hayakawa *et al.*, 1999; Kuzio *et al.*, 1999; Ijkel *et al.*, 1999)。AcNPV においては、多角体形態変異株もいくつか分離され、多角体の形成機構に関する分子生物学的研究がなされている (Brown *et al.*, 1980; Duncan and Faulkner, 1982; Duncan *et al.*, 1983; Carstens *et al.*, 1986;

Carstens *et al.*, 1987; Carstens *et al.*, 1992)。しかしながら、バキュロウイルスの最大の特徴である包埋体の形成とそれに伴う ODV の包埋機構は、ほとんど明らかにされていない。NPV を例に挙げると、

「どのような機構で NPV は短時間に大量のポリヘドリンを合成するのか。」

「いかにして効率よく大量のポリヘドリンを核に輸送するのか。」

「どのような機構でポリヘドリンが ODV を包埋しながら結晶化するのか。」

「包埋される ODV 数は何によって規定されているのか。」

「形成される多角体の形態、および数は何によって制御されているのか。」

という数々の未解決の問題が存在する。

本研究では、多角体形成、および ODV の包埋機構の一端を明らかにするために、突然変異誘起剤を用いて作出した *Bombyx mori* NPV (BmNPV) 変異株を分子生物学的手法を用いて解析し、これらの機構に関与する新たな遺伝子領域を特定し、多角体形成のメカニズムをより明らかにすることを目的とした。

第1章

多角体形態変異株の分子生物学的解析

1. 緒言

バキュロウイルスに属する核多角体病ウイルスは昆虫に感染し、感染細胞核内に多数のウイルス粒子を含む多角体といわれる包埋体を形成する。多角体の主成分は、ポリヘドリンと呼ばれるウイルス由来のタンパク質である。ポリヘドリンは感染末期に高発現し、核内で結晶化する。自然界において、多角体は様々な要因によるウイルス粒子の不活化を妨げる働きをしている。多角体は、昆虫に食下されると、中腸内のアルカリ条件下で溶解し、ウイルス粒子が露出し、感染が成立する。ポリヘドリン遺伝子 (*polh*) は多くの NPV においてクローニングされ、塩基配列が決定されているが、それらのアミノ酸配列はウイルス間でかなり良く保存されていることが明らかになっている (Zanotto *et al.*, 1993)。

代表的な NPV である AcNPV においては、いくつかの多角体形態変異株が分離され、研究されている。ある変異株 M5 は、感染細胞核内に正六面体状の多角体を 1 つのみ形成する (Brown *et al.*, 1980)。この変異株のポリヘドリンには一カ所アミノ酸置換が起こっていることが示されている (Carstens *et al.*, 1986)。一方、感染細胞核内に多数の非結晶化多角体を形成する変異株 M29 においては、

84 番目のアミノ酸がフェニルアラニンからロイシンへ置換していることが判明している (Carstens *et al.*, 1987)。また、多角体非形成変異株 M276 と M934 も *polh* 内の変異が形態変異の原因であることが明らかになっている (Carstens *et al.*, 1992)。

AcNPV 以外のウイルスに関しては、*polh* の詳しい解析はほとんど行われていない。近年、野口らによって、カイコ核多角体病ウイルス (BmNPV) の変異株の作出がなされている (Noguchi, 1990; Noguchi, 1991; Noguchi, 1995)。変異株の 1 つである #24 株は、多角体を形成することができない株である。ノザンプロット解析により、この変異株感染細胞では *polh* がほとんど発現していないことが明らかになっており、その原因が *polh* プロモーターの 1 塩基置換であると推測されている (Shimada *et al.*, 1994)。しかし、この変異が多角体形態変異の原因になっているかどうかは確認されていない。

本章では、新たに単離された 4 つの BmNPV 多角体変異株とすでに報告されている 2 つの BmNPV 多角体形態変異株を分子生物学的手法を用いて解析し、原因となる遺伝子変異領域を同定することを目的とした。

2. 材料および方法

2-1. 培養細胞、ウイルスおよび昆虫

BmN (BmN-4) 細胞は、東京大学で継代されている株を用い、10% 牛胎児血清 (FBS) 添加 TC-100 培地で継代した。ウイルスは野生株として K 株 (Noguchi, 1990)、および T3 株 (Maeda *et al.*, 1985) を用いた。ウイルス増殖は、すべて BmN 細胞に感染させることで行った。ウイルス感染は、25°C で 1 時間吸着させることで行い、プラーク法によってウイルスの感染力価を決定した (Maeda, 1989)。カイコ幼虫 (鐘音) は人工飼料にて 27°C で飼育した (Choudary *et al.*, 1995)。

2-2. 変異株の単離、およびウイルスの増殖

すべての変異株 (6 株) は、野口博士が BmNPV を突然変異誘起剤 (5-bromo-2'-deoxyuridine) 処理し、その後プラーク法によって単離したものである。変異株#24 は、多角体非形成変異株である (Shimada *et al.*, 1994)。変異株#128 は温度感受性変異株として報告されている株である (Noguchi, 1995)。変異株#126、#136 株はポリヘドリンの結晶化が起こらない変異株である。変異株#211、#220 はそれぞれ不定形、および正六面体の多角体を形成する変異株である。すべてのウイルスはストックを 3 回プラーク純化した後、実験に供試した。多角体の性状に関しては、ウイルス感染 BmN 細

胞を光学顕微鏡下で観察した。電子顕微鏡観察は、埼玉県農業試験場の野口洋子博士によって行われた。ウイルスの増殖率はプラーク法によって検定した。

2-3. ウイルス DNA の精製

ウイルス感染後の培養上清 20-50 ml を 40%ショ糖溶液に重層した後、55,000 g で 30 分間遠心してウイルス粒子を沈殿させた。ウイルス粒子は適量の TE Buffer (10 mM Tris-HCl, pH7.6, 1 mM EDTA) にサスペンドした後、1/10 量の 10 % SDS と 1/20 量の 20 mg/ml プロテアーゼ K 溶液を加え、56°C で 1 時間反応させた。反応後に、水飽和フェノールで 3 回、フェノール/クロロホルム混液(1:1、水飽和) で 2 回、クロロホルムで 2 回順次抽出して水層を得、これをウイルスゲノム DNA 溶液として 4°C で保存した。

2-4. PCR 法による *polh* の増幅

野生株と変異株の *lef-2* から *p78/83 (orf1629)* の領域を、PCR 法によって増幅した。PCR プライマーの設計は GenBank に登録されている BmNPV T3 株の配列 (GenBank: L33180) を基に行った。プライマーの配列は以下の通りである。

NP1: 5'- CCGTATGTACAGGAAGAGGT -3'

CB2: 5'- CAACCCTTGTTTGAACCAA -3'

PCR 産物は 1%アガロースゲルで分離、精製した後、pGEM-T ベク

ター (Promega)、または pBluescriptSKII+ ベクター (Stratagene) にクローニングした。クローン化した DNA を含むプラスミドは、大量精製した後、ジデオキシ法にて塩基配列を決定した。

2-5. 組換えウイルスの作成

組換えウイルスの作成は、300 ng のウイルスゲノム DNA と 1 μ g のプラスミド DNA をリン酸カルシウム法 (Maeda *et al.*, 1985) で BmN 細胞にコトランスフェクトすることによって行った。ウイルスのゲノム DNA には K 株、または制限酵素 *Bsu36I* で直鎖状にした変異型ウイルス BmNPV-abb (Zhou *et al.*, 1998) 由来のゲノム DNA を用いた。プラスミド DNA には上述の塩基配列決定に用いたプラスミド、および PCR 産物を小型化トランスファーベクター pBm31 に組み込んだものを用いた。小型化ベクター pBm31 は、*polh* を含む BmNPV T3 株の *HpaI* 断片の *polh* の領域をトランスファーベクター pBm050 のリンカー部と置き換え、プラスミドにクローニングしたものである (Katsuma *et al.*, unpublished data; Ko *et al.*, 2000)。コトランスフェクション後 4 日目の培養上清を用いてプラーク法を行い、組換えウイルスを単離した。

2-6. 多角体の精製

SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)、およびウエスタンブロッティングには、ウイルス

感染培養細胞より調製した粗精製標品を用いた。BmN 培養細胞に MOI = 10 でウイルスを感染させ、96 時間後に細胞を回収した。超音波破碎後、PBS で 2 回洗浄し、そのペレットを粗精製標品として使用した。

経口感染実験には、感染幼虫体液より精製した多角体を用いた。5 齢 1-2 日目のカイコ幼虫を氷水に 5 分間浸し、仮死状態にしたのち、培養細胞で増殖させたウイルス液 (1×10^8 pfu/ml のウイルス液を $10 \mu\text{l}$ ずつ) を注射し、接種 4-5 日後に体液を腹脚より回収した。低速遠心で上清を除いた後、滅菌水、および 1% SDS で沈殿がきれいになるまで 2-3 回洗浄し、これを精製多角体標品とした。

2-7. SDS-PAGE

多角体粗精製標品に等量のアルカリ液 (50 mM Na_2CO_3 、100 mM NaCl) を加えて多角体を溶解し (25°C、45 分)、10,000 g で 5 分間遠心し、上清を回収した。その上清 $200 \mu\text{l}$ に等量の 2x SDS サンプルバッファーを加え、合計 $400 \mu\text{l}$ とし、100°C、3 分間煮沸した。それを 15 %のポリアクリルアミドを含むゲルを用いて、電気泳動を行った (30 mA、150 分)。その後、染色液 (0.025 % Coomassie Brilliant Blue R-250、7 % 酢酸、50 % メタノール) に入れ一晩染色し、背景が抜けるまで脱色液 (7 % 酢酸、25 % メタノール) に浸し、7 %酢酸中で保存した。ゲルは濾紙上に乗せて、減圧加温で乾燥させ、フィルム状にした。

2-8. RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) による *polh* 転写量の定量

野生株、および変異株の *polh* 転写量を RT-PCR によって定量した。ウイルス感染 36 時間後の BmN 細胞より total RNA を定法により精製した (Shimada *et al.*, 1994)。10 μ g の total RNA を Superscript II (GIBCO BRL) 存在下で 42°C、2 時間逆転写し、フェノール/クロロホルム混液 (1:1、水飽和) で抽出した。この溶液を希釈し、鋳型 cDNA として 15-25 サイクル PCR を行い、その後、電気泳動にて発現量を定量した。

2-9. ウェスタンブロッティング

SDS-PAGE で展開したゲルと濾紙、およびニトロセルロース膜 (0.45 micron) をブロッティングバッファー (0.1 M Tris-0.192 M Glycine、20 % メタノール) 500 ml に 30 分間浸した。その後、あいだに空気が入らないようにゲルとニトロセルロース膜を密着させ、濾紙並びに電極にバッファーを添加し、ホライズプロット装置を用いて、8-11V で 90 分通電した。膜に転写されたゲル中のタンパク質を、抗原抗体反応で検出した。乾燥させたニトロセルロース膜を、5 % のスキムミルクを含む PBS でブロッキングした後、1 次抗体と反応させた。1 次抗体は、多角体タンパク質に対する抗血清として得られた抗ポリヘドリン抗体を、5 % のスキムミルクを含む PBS で 1/3000

に希釈して使用した (Shimada *et al.*, 1994)。30 分間反応させた後、T-PBS (0.05 % Tween20-PBS) で 5 分間、4 回洗浄した。その後、2 次抗体として抗家兎免疫グロブリンヤギ抗体・西洋ワサビパーオキシダーゼ複合体を 1 次抗体と同様に 1/3000 に希釈し、30 分間反応させた。T-PBS で 5 分間、3 回、PBS で 5 分間、1 回洗浄した後、発色反応を行った。5 分間、発色反応溶液 (15 mg 4-Cl-1-naphtol / 5 ml メタノール溶液と 15 μ l H₂O₂ / 25 ml PBS 溶液とを使用直前に混ぜたもの) に浸して反応させた後、滅菌水で発色を停止させ、風乾した。

2-10. 経口感染力の検定

経口感染力は、段階希釈した精製多角体を滴下した人工飼料をカイコ幼虫に与えることで検定した (Noguchi, 1995; Katsuma *et al.*, 1999a)。多角体濃度は血球計算盤を用いて測定し、1 x 10⁵ polyhedra/ml から 1 x 10⁹ polyhedra/ml までの濃度で実験を行った。各希釈系列には 20 個体の 2 齢幼虫を使用し、アッセイは少なくとも 2 回行った。

2-11. 超遠心法による多角体内のウイルス粒子量の検定

多角体の中にウイルス粒子が含まれているかを超遠心によって検定した。10⁸-10⁹個の多角体にアルカリ液 (50 mM Na₂CO₃, 100 mM NaCl) を加えて溶解し、30-60 %の密度勾配をつけたショ糖溶液上

に重層し、18,000 rpm で1時間、swing rotor (SW50.1: Beckman) を用いて遠心した。遠心後、ウイルス粒子のバンドが、見られるかどうかを判定することで多角体内にウイルス粒子が含まれるかどうか検定した。

2-12. 2次構造予測

ポリヘドリンの2次構造予測は、解析ソフト DNASIS (Hitachi) 上で Chou and Fasman の方法によって行った (Carstens *et al.*, 1986)。

3. 結果

3-1. 各変異株の特徴

野口は突然変異誘起剤 (5-bromo-2'-deoxyuridine) 処理によって、数多くの BmNPV 変異株を単離している。これらの変異株のうち、多角体の形態変異株 6 株を単離し、分子生物学的解析を行った。解析した変異株 6 株の内訳は、多角体が不定形で形成数も多様である 1 株 (#211 株)、多角体が正 6 面体状を呈する変異株 1 株 (#220 株)、多角体の結晶化が阻害された 2 株 (#126 株、および #136 株)、多角体内に包埋型ウイルス (occlusion derived virus; ODV) を全く包埋しない変異株 1 株 (#128 株)、および多角体非形成変異株 1 株 (#24 株) である (Table 1)。

光学顕微鏡による観察では、#211 株は核内に様々な大きさの多角体を多数形成した (Fig. 1E)。また、#220 株では正六面体状の多角体を少数 (10 個程度) 核内に形成することが明らかになった (Fig. 1F)。#220 株の形成する多角体数、および大きさは感染細胞によって様々であり、巨大な多角体を 1 個だけ核内に形成する細胞も存在した (Fig. 1F)。一方、#126 株、および #136 株感染細胞はともに多角体様の小片を核、細胞質に形成していた (Fig. 1B, D)。#128 株は温度感受性株として報告されている株であるが、ウイルス増殖中の温度に関わらず、多角体内に ODV を含まないことが明らかになっている (Noguchi, 1995)。光学顕微鏡による観察では、

Table 1. Characterization of polyhedron mutants of BmNPV

Virus	localization of polyhedrin	Viral occlusion	Crystallization of polyhedrin	Morphology of polyhedra by light microscopy
wild-type	+	+	+	normal polyhedra
#24	-	-	-	no polyhedra
#126	+/-	-	-	no polyhedra
#128	+	-	+	normal polyhedra
#136	+/-	-	-	no polyhedra
#211	+	+	+	irregularly shaped or small polyhedra
#220	+	+	+	cuboidal polyhedra

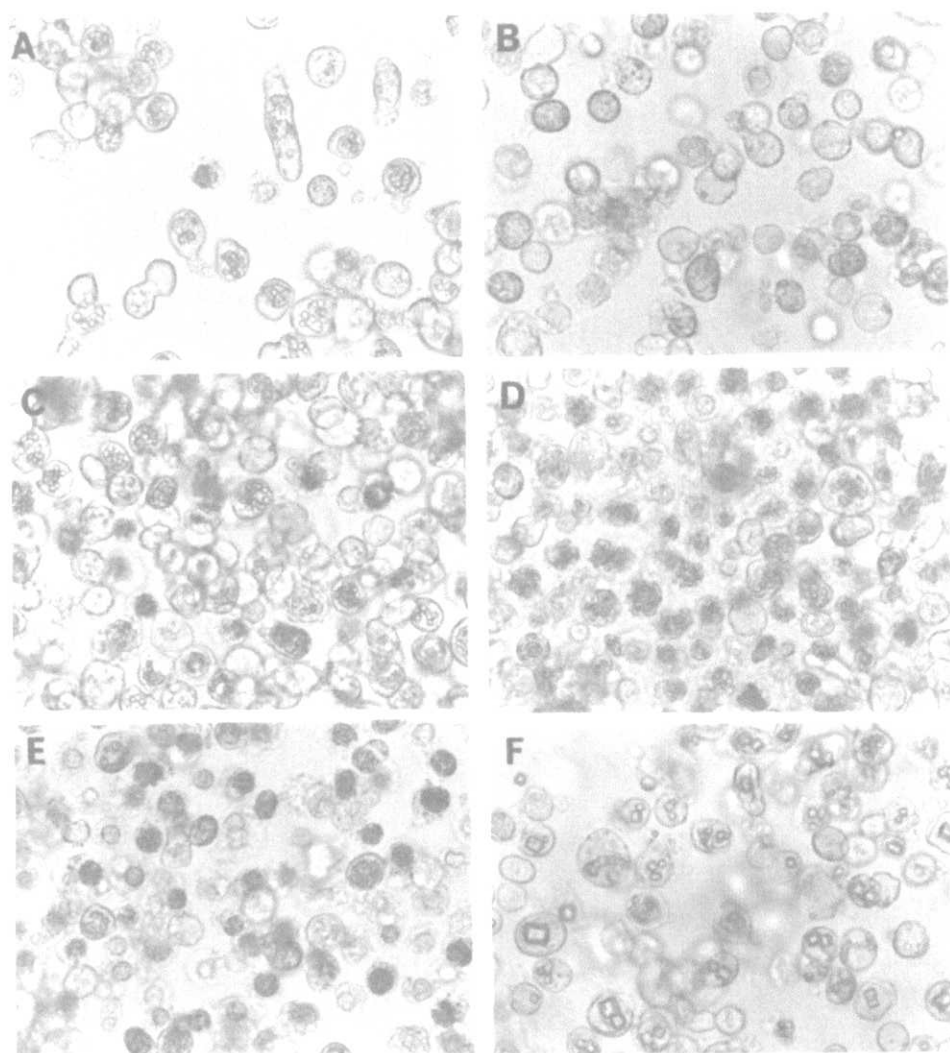


Figure 1. 野生株、および多角体形態変異株感染BmN細胞の光学顕微鏡観察
ウイルスをMOI=10でBmN細胞に感染させ、72時間後に光学顕微鏡下で観察した。
(A) 野生株 (K株) (B) #126株 (C) #128株 (D) #136株 (E) #211株 (F) #220株

野生株 (K 株、および T3 株) が形成する多角体と形態、大きさ、形成数において顕著な差異は認められなかった (Fig. 1C)。#24 株感染細胞には、多角体、および多角体様の小片は認められず、ウイルス感染による細胞変性のみが認められた。

野口博士による電子顕微鏡観察によって、#211 株が形成する多角体には結晶構造が存在し、その中にウイルス粒子 (ODV) を包埋していることが明らかになった (Fig. 2E, F)。#220 株が産生する多角体にも結晶構造が存在し、中に ODV を包埋することが確認できたが、その数は野生株と比較して極めて少数であった (1/3 以下) (Fig. 2G)。#126 株、および#136 株感染細胞においては、多角体様小片のほとんどが核に局在しており、その程度は#136 株の方が大きいことが判明した (Fig. 2B, C, D)。また、これらの変異株が産生する多角体様小片には結晶構造が認められないことも明らかになった (Fig. 2B, C, D)。#136 株が形成する多角体様小片は ODV と凝集体を形成していることから、この多角体様小片が野生株の多角体タンパク質と同様に ODV と親和性を保持していることが考えられた (Fig. 2C, D)。また、#128 株感染細胞においては、この株が産生する多角体内に ODV を全く含まないことが確認され、また、多角体の大きさが野生株よりも若干大きいことが判明した (Fig. 2H)。

3-2. *polh* の塩基配列の解析

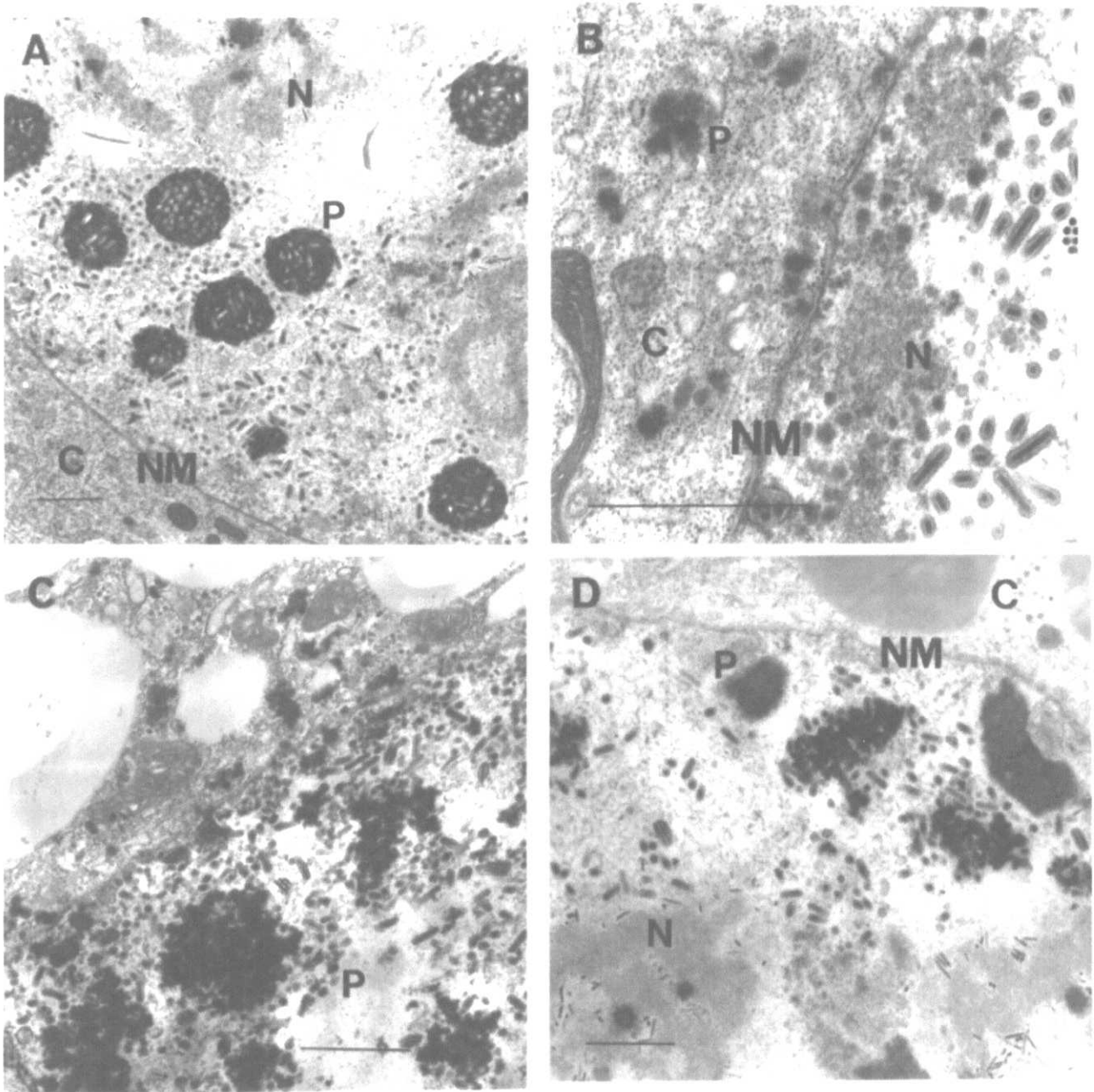


Figure 2. 野生株、および多角体形態変異株感染カイコ脂肪体の電子顕微鏡観察
 ウイルスを5齢カイコ幼虫に経皮感染させ、4日後の脂肪体を電子顕微鏡観察した。
 電子顕微鏡観察は野口洋子博士によって行われた。
 (A) 野生株 (K株) (B) #126株 (C) #136株 (D) #136株 scale bars = 1 μ m

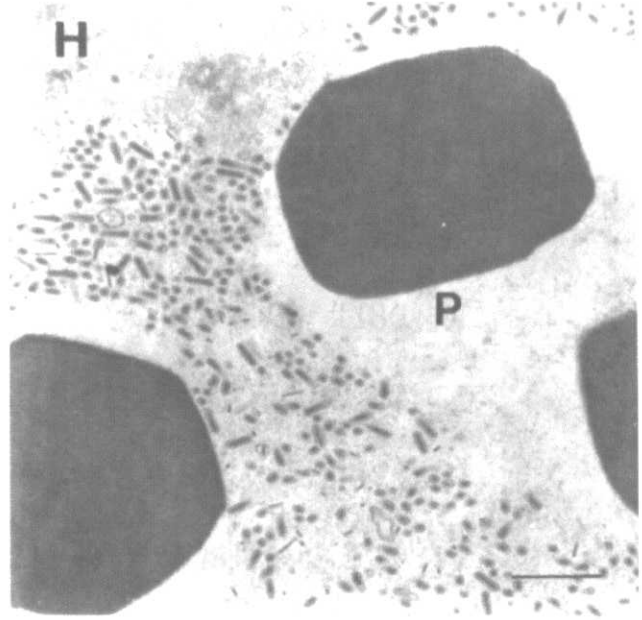
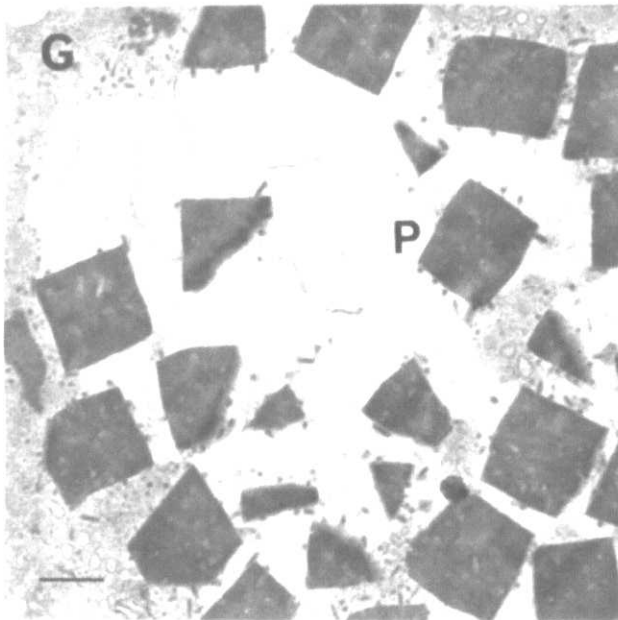
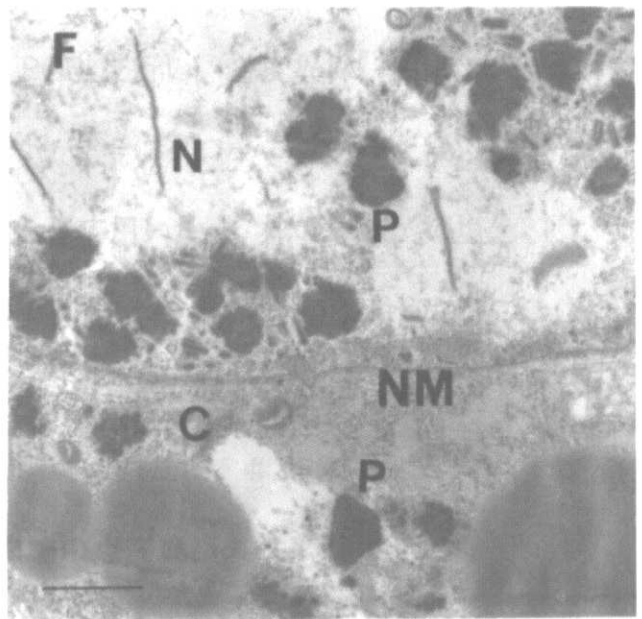
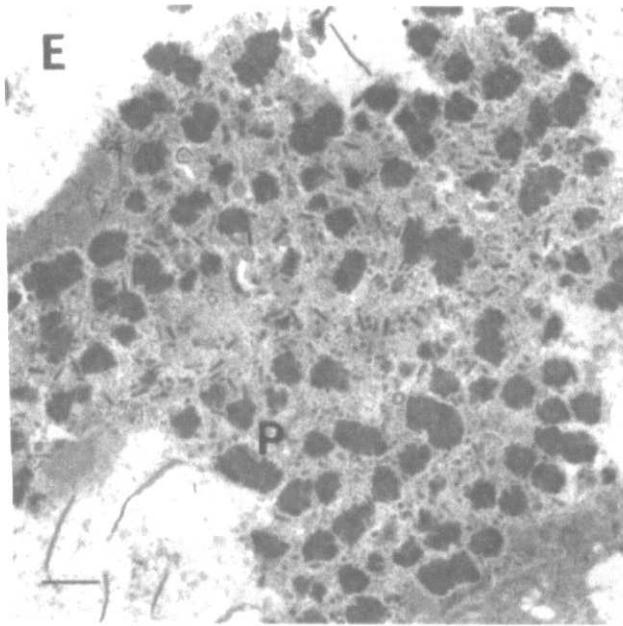


Figure 2-continued.

(E) #211株 (F) #211株 (G) #220株 (H) #128株

変異株が示す多角体の形態変異の原因が *polh* 自体の変異によるものであると仮定し、各変異株の *polh* の塩基配列の解析を行った。プライマーNP1、および CB2 を用いて PCR を行い、各変異株、および K 株の *polh* を増幅し、プラスミドベクターにクローニングした後、各々の塩基配列を決定した。野生株として用いた K 株の *polh* の塩基配列は T3 株 (GenBank: L33180) と同一であった (Shimada *et al.*, 1994)。変異株 #126, #128, #136, #211, および #220 には翻訳領域内にアミノ酸置換を伴う点変異が認められたが、#24 株には、すでに報告されているプロモーター領域の点変異以外に変異は認められなかった (Shimada *et al.*, 1994; Ooi *et al.*, 1989)。ポリヘドリンが結晶化しない変異株 #126 と #136 の *polh* には各々一カ所のアミノ酸置換を伴う塩基置換が起こっていた。#126 株においては、533 番目の塩基が G から T に置換しており、これによって 178 残基目のシステインがチロシンに置換していた (Fig. 3)。また、#136 株においては、421 番目の C が T に置換することにより、141 番目のアミノ酸がロイシンからフェニルアラニンへと変異していた (Fig. 3)。様々な大きさの多角体を形成する #211 株の *polh* には G から A への点変異が 430 番目の塩基において起こっており、その結果、144 番目のグルタミン酸がリジンに置換していた (Fig. 3)。正六面体状の少数の多角体を核内に形成する #220 株の *polh* には、アミノ酸置換を伴う 2 カ所の点変異が認められた。それらは、172 番目の G が A に、665 番目の T が C に置換された変異であり、それによって 58

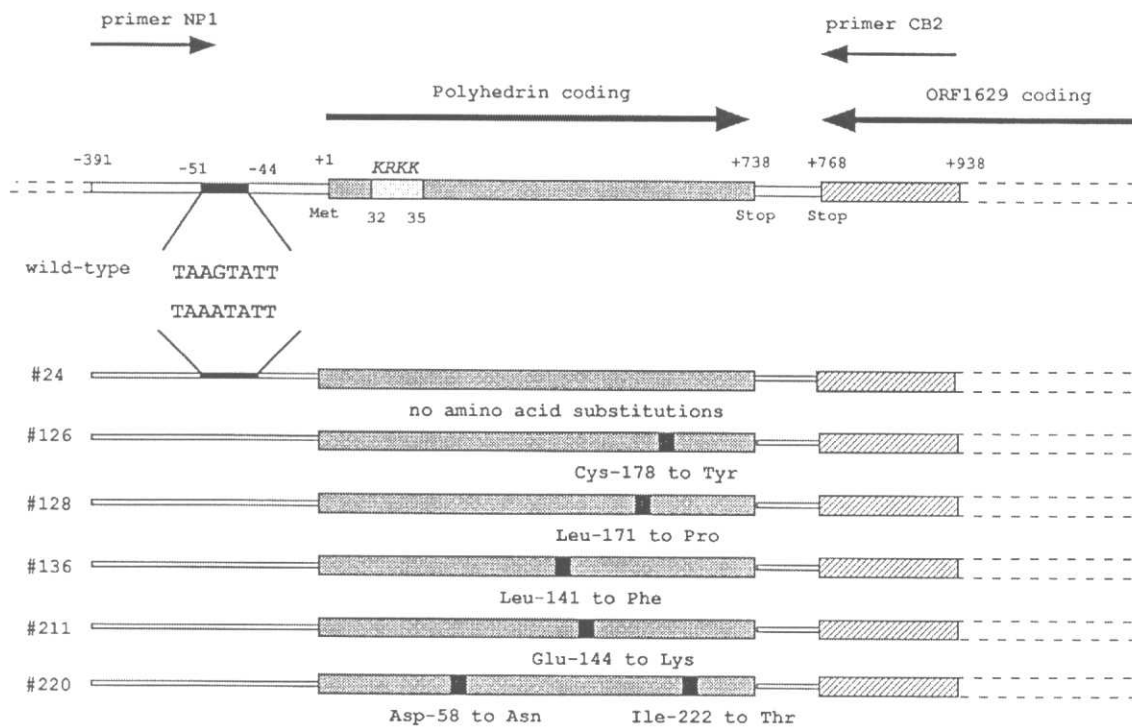


Figure 3. 野生株、および変異株の*polh*領域の構造

変異株で見出されたアミノ酸置換はそれぞれの遺伝子の下に記した。
*polh*プロモーターのコア配列である8塩基TAAGTATTも図中に記した。

番目のアミノ酸がアスパラギン酸からアスパラギンに、222 番目のイソロイシンがスレオニンに置換していた (Fig. 3)。多角体内に ODV を含まない #128 株の *polh* は、512 番目の塩基が T から C に置換しており、これによって 171 番目のロイシンがプロリンに置換していた (Fig. 3)。

3-3. 変異型 *polh* をもつ組換えウイルスの作成

polh に存在する点変異が多角体の形態変異の直接の原因であるかどうか調べるために、変異株の *polh* をもつ組換えウイルスを作成した。線状化した BmNPV-abb のゲノム DNA と変異株の *polh* を含むプラスミド DNA を BmN 細胞にコトランスフェクションし、変異株の *polh* をもつ組換え型ウイルスを作出した。光学顕微鏡下で多角体の形態変異の確認が可能である #126, #136, #211, #220 については、組換えウイルスはすべて変異株の形態を示したことから、同定した *polh* 内の変異のみが多角体の形態変異の原因であることが判明した。#220 株に関しては、翻訳領域内に 2 つのアミノ酸置換が存在したが、各々の変異をもつ組換えウイルスを作成した結果、222 番目の変異が多角体の形態変異の原因であることが明らかになった。また、#24 株の *polh* をもつ組換えウイルスは多角体非形成であったため、プロモーターのコア部分における 1 塩基置換 (-48 番目の G が A に置換) が多角体非形成の原因であることが確認できた。#128 株の *polh* をもつ組換えウイルスは、光学顕微鏡による観察では野生

株と区別は不可能であった。この組換えウイルスの解析は以下にあげる超遠心法、および経口感染実験によって行った。

3-4. 超遠心法による多角体内のウイルス粒子量の検定

多角体内に包埋されているウイルス粒子（ODV）の量を検定するために、30-60 %の密度勾配をつけたショ糖溶液上にアルカリ処理した多角体液を重層し、超遠心後、ウイルス粒子のバンドが観察できるかどうか検討した。野生株ははっきりとバンドが確認できたが、#220 株、および#220 株の *polh* をもつ組換えウイルス由来の多角体溶液からは薄いバンドしか認められなかった。また、#128 株、および#128 株の *polh* をもつ組換えウイルス由来の多角体溶液からはウイルスのバンドは認められなかった。以上の結果から、#220 株では、多角体遺伝子の変異により、形態が正六面体状となるだけでなく、多角体数が減少し、多角体内に包埋される ODV 数も少なくなっていることが示唆された。また、#128 株においては、多角体の形態、および形成数は野生株と大差ないものの、171 番目のロイシンがプロリンに置換することで多角体内に ODV をほとんど包埋できないような結晶構造をとっていることが判明した。

3-5. 変異株の経口感染力の検定

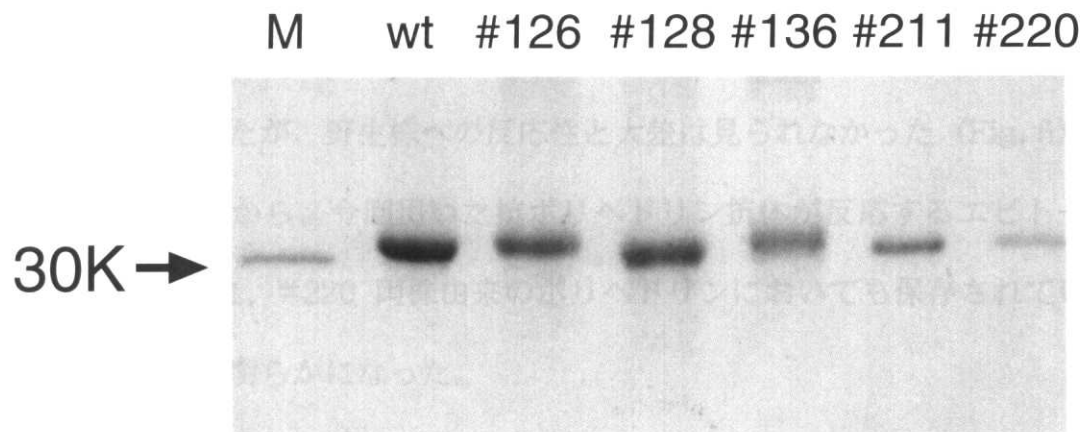
野生株、#128 株、および#128 株の *polh* をもつ組換えウイルスの経口感染力を検定した。各ウイルス感染細胞より精製した多角体標

品を段階希釈し、それらを滴下した人工飼料を2齢カイコ幼虫に供試した。野生株K株のLC₅₀(50%致死濃度)は8.5 x 10⁶ polyhedra/mlであったが、#128株由来の多角体は10⁹ polyhedra/mlの濃度で与えても核多角体病で致死する個体は出現しなかった。また、#128株の *polh* をもつ組換えウイルス由来の多角体も同様に経口感染力を持たなかった。以上のことから、#128株に起こっているポリヘドリン内のアミノ酸置換は経口感染力を完全に消失させる変異であることが判明した。

3-6. 変異ポリヘドリンの生化学的性質の検討

アミノ酸置換によるポリヘドリンの生化学的性質の変化を検討するために、それぞれの変異株由来のポリヘドリンを精製し、SDS-PAGEに供した(#24株を除く)。その結果、#126株、および#136株由来ポリヘドリンは、移動度が野生株由来のものと比較して遅くなり、#128株由来のものは、野生株由来のものと比較して移動度が若干早くなる傾向にあった(Fig. 4A)。また、#220株については、ポリヘドリンの産生量が野生株よりもかなり少ないことが判明した(Fig. 4A)。この原因が *polh* の転写量低下によるものかどうか検討するために、それぞれの変異株感染細胞の *polh* の発現量をRT-PCRで調査した。その結果、同じ very late gene である *p10* と同様に *polh* の転写量も野生株と比較して大差が認められなかった(Fig. 4B)。以上のことから、ポリヘドリンの産生量の低下は転写レベルではな

A



B

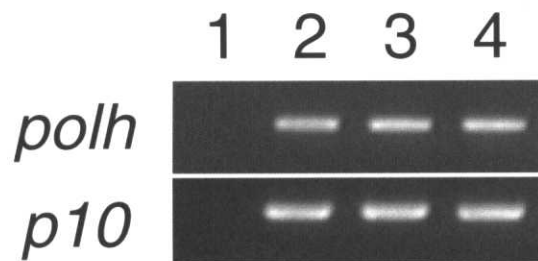


Figure 4. 野生株、および変異株感染細胞におけるポリヘドリンの発現

(A) 各ウイルス感染細胞よりポリヘドリンを精製し、SDS-PAGEによって比較した。

(B) RT-PCRによって、変異株における*polh*の転写量を定量した。

同時に、コントロールとして、同じvery late geneである*p10*の転写量を定量した。

lane 1, negative control (逆転写なし), lane 2, 野生株, lane 3, #211株, lane 4, #220株

く、翻訳レベルで起こっている可能性が示唆された。#211 株、および#220 株においては、抗ポリヘドリン抗体を用いて抗体反応性を調査したが、野生株への反応性と大差は見られなかった (Fig. 5)。このことから、今回用いた抗ポリヘドリン抗体が反応するエピトープが#211、#220 両株由来のポリヘドリンにおいても保存されていることが明らかになった。

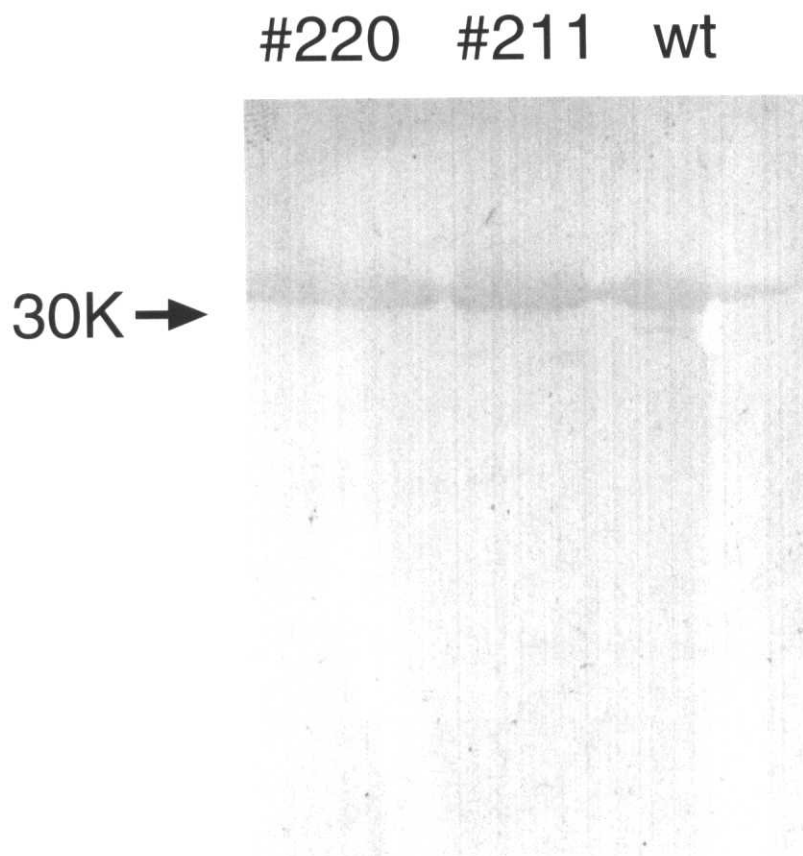


Figure 5. 抗ポリヘドリン抗体を用いたウエスタンブロッティング
ウイルス感染細胞よりポリヘドリンを精製し、SDS-PAGEによって展開後、
抗ポリヘドリン抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。

4. 考察

AcNPV においては、いくつかの多角体形態変異株が分離され、その形態変異の原因が *polh* における変異であることが示されている。しかし、解析されている変異株の数は限られており、また、AcNPV 以外のバキュロウイルスにおける変異株の解析のほとんど報告されていない。本研究では、突然変異誘起剤の投与によって BmNPV 変異株を単離し、その形態変異の原因となっている遺伝子領域を探索することで、多角体の形態形成の分子機構の解明を試みた。

多角体非形成株である#126 株、および#136 株は、以前に報告されている多角体非形成株#24 株とは異なる形質を示した。ノザンブロット解析によって、#24 株感染カイコ脂肪体において、*polh* mRNA を検出することができなかったが (Shimada *et al.*, 1994)、#126 株、および#136 株感染細胞においては、SDS-PAGE によってポリヘドリンが産生されていることが示された (Fig. 4)。#24 株は、プロモーター部位の点変異によって多角体非形成になっていることが組換えウイルスの作成によって明らかになったが、#126 株、および#136 株は、ポリヘドリン内のアミノ酸置換が典型的な多角体の形成を阻害している原因であることが判明した。#126 株、および#136 株の形質はポリヘドリン小片を多数感染細胞内に形成する AcNPV 変異株 M276 (Carstens *et al.*, 1992) の形質に類似している。この変異株の *polh* には、C 末端に 229 塩基の宿主由来の配

列が挿入されており、それが形態変異の原因となっている (Carstens *et al.*, 1992)。一方、#126 株、および#136 株はそれぞれポリヘドリンの 178、および 141 残基目にアミノ酸置換を持っており、それが形態変異の原因となっている。これらの変異株のポリヘドリンは、結晶化しないだけでなく核移行も一部阻害されている。Jarvis ら (Jarvis *et al.*, 1991) によって、ポリヘドリンの 32-35 残基目に存在する KRKK という塩基性残基のクラスターが、ポリヘドリンの核移行シグナル (NLS) であると同定されている。彼等は、通常では核へ移行しないレポータータンパク質とポリヘドリンの様々なフラグメントを連結した融合タンパク質を用いて、ポリヘドリンの細胞内局在を研究しているが、この中にポリヘドリンの NLS は保存されているが、核移行が完全ではない融合タンパク質を見出した。その解釈として、それらの融合タンパク質では NLS がうまく機能しない様な状態に埋め込まれた高次構造をとっている可能性をあげている。#126 株、#136 株、および AcNPV M276 のポリヘドリンも、NLS が保存されているにもかかわらず、核移行が完全ではないことから、同じように NLS が機能しない様な高次構造をとっている可能性が考えられる。ポリヘドリンの核移行については、第 2 章でさらに多くの変異株を用いて詳しく解析することにする。

#211 株には 144 残基目に 1 アミノ酸置換が存在し、それが感染細胞核内に不定形の多角体を形成する原因となっている。2 株の AcNPV 変異株、M29 と M937 は、感染細胞核内に多数のポリヘ

ドリンからなる小片を形成する点で#211 株と類似している。しかしながら、#211 株と異なり、これらの AcNPV 変異株が産生するポリヘドリン小片には結晶構造が存在しない。以上のことから、#211 株と AcNPV 変異株 M29、および M937 の多角体形成機構は異なるものであると考えられる。

#220 株は正六面体状の少数の多角体を核内に形成するが、このように正六面体状の多角体を形成する AcNPV は数株報告されている。Carstens らによって報告されている変異株 M5 は、感染細胞核内に正六面体状の多角体を 1 つのみ形成する。この変異株のポリヘドリンには一カ所アミノ酸置換が起こっていることが示されている (Carstens *et al.*, 1986)。また Lin らによっても、同じように感染細胞核内に正六面体状の多角体を 1 つのみ形成する変異株が報告されている (Lin *et al.*, 2000)。両株とも多角体内に ODV をほとんど含まないことが示されている。本研究で解析した#220 株も、電子顕微鏡観察、および超遠心法により多角体内に通常の 1/3 程度しか ODV を含まないことが明らかになっているが、その減少の程度は上記の AcNPV 変異株と比較すると少ない。また、AcNPV 変異株は感染細胞核内に多角体を 1 つだけ形成するのに対して、#220 株は 1-10 個程度の不確定数の多角体を形成する (Fig. 1F)。これらのことから、#220 株のポリヘドリンに起こっている変異は、AcNPV 変異株に起こっている変異よりも多角体形成に対する影響が少ないと考えられる。また、BmNPV 野生株 (K 株、および T3 株) を BmNPV

が semi-permissive な培養細胞 I.30 に感染させると、ほとんどの細胞は多角体を形成しないが、低頻度で形成される多角体は#220 株様の正六面体を呈する (Katsuma *et al.*, unpublished data)。また、ノザンブロット、および RT-PCR 解析により、BmNPV 感染 I.30 細胞では、*polh* の発現が BmNPV 感染 BmN と比較して 1/10 程度であることも判明している (Katsuma *et al.*, unpublished data)。これらのことから、ポリヘドリンの発現が低いレベルのときにも正六面体状の多角体を形成しやすいと考えられる。実際、#220 株の場合も、感染細胞より精製できるポリヘドリンの量は野生株と比較して著しく少ない (Fig. 4A)。#220 株の *polh* のプロモーター領域には変異が認められないこと、また、#220 株における *polh* の転写量が野生株と大差がないこと (Fig. 4B) をあわせて考えると、ポリヘドリン内のアミノ酸置換が *polh* の転写量ではなく、ポリヘドリンの翻訳を制御している可能性が示唆された。以上のことから、結果としてポリヘドリンの合成量が少ない場合に正六面体状の多角体を形成しやすいのではないかと考えられる。

#128 株は結晶構造を持つ多角体を形成するが、その中に ODV を全く含まない変異株である。このようなバキュロウイルス変異株の単離は、現在まで報告がない。最近、NPV の発現システムを使って *Trichoplusia ni* 顆粒病ウイルス (TnGV) のグラニューリン遺伝子を発現した論文が報告されている (Eason *et al.*, 1998, Zhou *et al.*, 1998)。*polh* のかわりにグラニューリン遺伝子を発現する組換え

AcNPV、および BmNPV は、ODV を含まない包埋体を形成する。論文内では、ODV と包埋体の相互作用が重要であることが示唆されているが、#128 株感染細胞内においてもポリヘドリン内に存在する1つのアミノ酸置換によって、ODV とポリヘドリンの相互作用が阻害されている可能性がある。多角体に結晶構造を持つ#128 株が ODV を包埋しない一方で、ポリヘドリンが結晶構造を持たない#136 株のポリヘドリンが ODV と親和性を保持していることが野口博士による電子顕微鏡観察により明らかになっている (Fig. 2C,D)。以上の結果から、ポリヘドリンの結晶化と、ODV とポリヘドリンの相互作用には直接関係がないことが判明した。また、ODV が包埋されなくても多角体が結晶化することから、多角体の結晶化が ODV を結晶核としなくても正常に行われることが明らかになった。

Carstens ら (Carstens *et al.*, 1986) は正六面体の多角体を形成する変異株 M5 のポリヘドリンの2次構造予測を行い、その構造が野生株のポリヘドリンと大きく異なっていることを報告している。しかしながら、本研究で解析した変異株のポリヘドリンの2次構造予測を Chou and Fasman の方法で行った結果、野生株のものとは大きな違いは認められなかった。この結果は、多角体の形態変異をもたらすアミノ酸置換が、ポリヘドリンの2次構造に大きく影響していない可能性を示している。変異株のアミノ酸置換は、バキュロウイルス間で非常に保存されている残基で起こっていることから (Zanotto *et al.*, 1993)、これらのアミノ酸は、ポリヘドリンが

正常な結晶化を行うために必須な残基、すなわち、ポリペプチドの3次、または4次構造に関わる残基であると考えられる。

第2章

ポリヘドリンの細胞内局在機構の解析

1. 緒言

バキュロウイルスが感染後期に大量に産生する多角体と呼ばれる包埋体は、ウイルスがコードする *polh* の遺伝子産物が結晶化したものである。ポリヘドリンは細胞質で大量に合成された後、核へと移行し結晶化する。Jarvis ら (Jarvis *et al.*, 1991) は、通常では核へ移行しないレポータータンパク質とポリヘドリンの様々なフラグメントを連結した融合タンパク質を用いてポリヘドリンの細胞内局在を研究している。その結果、30-57 番目の配列が核移行に重要であることを見出したが、核に安定に存在するためにはより大きな領域である 30-110 番目のアミノ酸配列が必要であることが分かった。また、この領域とオーバーラップする 19-110 番目までの配列が多角体の結晶化にも必須であると報告している。彼らはこの領域に存在する KRKK という塩基性残基のクラスターを核移行シグナルとして同定した。実際、この配列に変異を導入すると細胞質に大きな六面体の結晶を形成したことから、この配列が核移行には必須であるが、結晶化には必要でないことが明らかになった。

また、最近、TnGV のグラニューリン遺伝子を NPV ベクター系で発現した研究がなされ、その細胞内局在が調べられている (Zhou *et*

al., 1998; Eason *et al.*, 1998)。グラニューリン遺伝子を発現する組み換えウイルスは、核と細胞質の両方に六面体の包埋体を少数形成した。ところがグラニューリンの 1-87 番目のアミノ酸とポリヘドリンの 84-245 番目のアミノ酸を融合した遺伝子を発現させると、すべての包埋体が核に形成された。この結果は、ポリヘドリンの 84-245 番目のアミノ酸残基中に核移行に関与する部位が存在することを示唆していると考えられる。

現在までに、AcNPV においていくつかの多角体形態変異株が単離されているが、核移行シグナル以外に核移行に関与するアミノ酸残基を同定できてはいない。そこで本研究では、ポリヘドリンの核移行が正常ではない変異株を用いて、核移行に関与している遺伝子領域を探索することを目的とした。

2. 材料、および方法

2-1. 培養細胞、およびウイルス

BmN (BmN-4) 細胞は、理化学研究所分子昆虫学研究室で継代されてる株を用い、10% 牛胎児血清 (FBS) 添加 TC-100 培地で継代した。ウイルスは野生株として K 株 (Noguchi, 1990)、および T3 株 (Maeda *et al.*, 1985) を用いた。ウイルス増殖は、すべて BmN 細胞に感染させることで行った。ウイルス感染は、25°C で 1 時間吸着させることで行い、プラーク法によってウイルスの感染力価を決定した (Maeda, 1989)。

2-2. 変異株の単離

変異株 #103、#110、#153 の 3 株は、野口博士が突然変異誘起剤 (5-bromo-2'-deoxyuridine) を用いて作成したウイルスストックより純化したものである。ウイルスストックを用いてプラーク法を行い、光学顕微鏡下で多角体を形成せず、プラークが褐色を呈するものを同定し、3 回ウイルス純化を行った。変異株 pVS-2 および K270-3 はカリフォルニア大学デービス校において、BmNPV を用いた発現ベクターの作成の際に単離された変異株であり、同様に多角体を形成せず、プラークが褐色を呈する株である。これらのウイルスも 3 回プラーク純化した後、実験に供試した。電子顕微鏡観察は、カリフォルニア大学デービス校 Zhou 博士によって行われた。

2-3. マーカーレスキュー法による変異領域の同定

コトランスフェクションはリポフェクチン試薬 (GIBCO BRL) を用いて行った。実験条件は試薬の添付プロトコルに従った。トランスフェクションには 300 ng のウイルスゲノム DNA と 1 μ g のプラスミド DNA を用いた。マーカーレスキューに用いたプラスミドは野生株の T3 株のゲノムライブラリー (Maeda and Majima, 1990) よりサブクローニングしたものと、下で記載する PCR 産物をサブクローニングしたものを用いた。マーカーレスキューの検定はプラーク法によって多角体形成プラークが出現するかどうかで行った。

2-4. *polh* 領域の塩基配列の決定

ウイルス粒子は、ウイルス感染細胞上清より精製した。ウイルスゲノム DNA は、ウイルス粒子より定法によって精製した (第 1 章参照)。野生株と変異株の *lef-2* から *p78/83 (orf1629)* の領域は、PCR 法によってサブクローニングした。PCR プライマーの設計は GenBank に登録されている BmNPV T3 株の配列 (GenBank: L33180) を基に行った。プライマーは第 1 章で設計した NP1 と CB2 を用いた。PCR 産物は 0.7% アガロースゲルで分離、精製した後、pGEM-T ベクター (Promega) にサブクローニングした。塩基配列の決定は定法に従って行った (第 1 章参照)。

2-5. ポリヘドリンの細胞内局在の解析

感染細胞の核と細胞質との分離には、Jarvis らの方法 (Jarvis *et al.*, 1991; Jarvis *et al.*, 1992) を改変したものをを用いた。BmN 細胞を 6 well プレートに 10^6 cells / well で植え、ウイルスを MOI=5 で感染させた。感染 48 時間後に細胞を回収し、氷冷した TBN-Basic buffer (10mM Tris-HCl [pH6.5], 140mM NaCl, 3mM MgCl₂) で洗浄した。細胞のペレットを氷冷 TBN-basic buffer でサスペンドした後、等量の 1% NP-40 / TBN buffer を加え、混合した。氷上で 10 分間放置した後、900 x g で 5 分間遠心し、その上清を回収し、終濃度 0.1N となるように NaOH を加え、細胞質画分とした。ペレットとなっている核画分を 0.5% NP-40 / TBN buffer で 1 回洗浄し、細胞質画分のコンタミネーションを取り除いた。その後、等量の RIPA buffer (50mM Tris-HCl [pH8.0], 100mM NaCl, 3mM MgCl₂, 1% (V/V) NP-40) と終濃度 0.1N となるように NaOH を加えた。25 gauge needle にこの溶液を通すことでゲノム DNA を寸断し、900 g で 10 分間遠心した上清を核画分とした。SDS-PAGE は第 1 章の方法に準じた。核、および細胞質に存在するポリヘドリン量は NIH image program (National Institutes of Health, Bethesda, MD) を用いて定量化した。

3. 結果

3-1. 変異株の特徴

ポリヘドリンの核移行が正常ではない変異株 5 株の解析を行った。その内訳は、突然変異誘起剤 (5-bromo-2'-deoxyuridine) を用いて作成したウイルスが 3 株、BmNPV を用いた発現ベクターのスクリーニング時に単離された変異株 2 株である。光学顕微鏡による観察では、変異剤誘起による 3 株 (#103 株、#110 株、#153 株)、および組換えウイルス作成時にカリフォルニア大学において単離された 2 株 (PVS-2、K270-3) に差異は認められなかった。すべての変異株は、多角体を形成せず、細胞全体にポリヘドリン由来と考えられる小片が充満していた (Fig. 6)。細胞全体にポリヘドリン様物質が分布していることから、これらの変異株においてはポリヘドリンの核移行が正常に行われていないことが示唆された。第 1 章において解析した変異株 #126 株、および #136 株感染細胞もこれらの変異株と類似した光学顕微鏡像を示したが、これら 2 株の方がポリヘドリンの凝集塊が大きく、核への分布の割合も大きかった (Fig. 1, Fig. 6)。カリフォルニア大学 Zhou 博士による電子顕微鏡観察の結果、これらの変異株が産生するポリヘドリンは細胞質、核両方に存在し、結晶化していないことが明らかになった (Fig. 7)。また、これら 5 株の変異株が産生するポリヘドリンは、ODV と凝集塊を形成していないことが明らかになった (Fig. 7)。

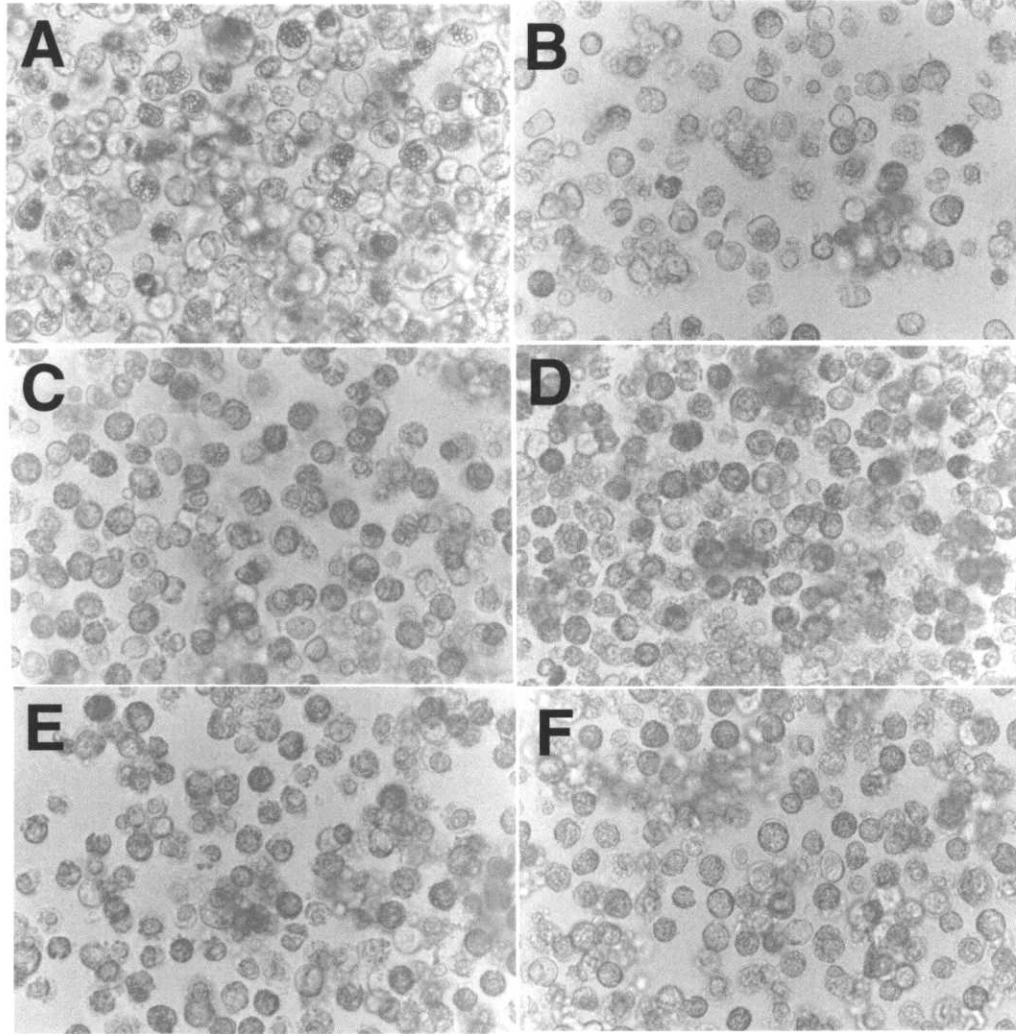


Figure 6. 野生株、および多角体形態変異株感染BmN細胞の光学顕微鏡観察
ウイルスをMOI=10でBmN細胞に感染させ、72時間後に光学顕微鏡下で観察した。
(A) BmNPV T3株 (B) #103株 (C)#110株 (D)#153株 (E)PVS-2株 (F) K270-3株

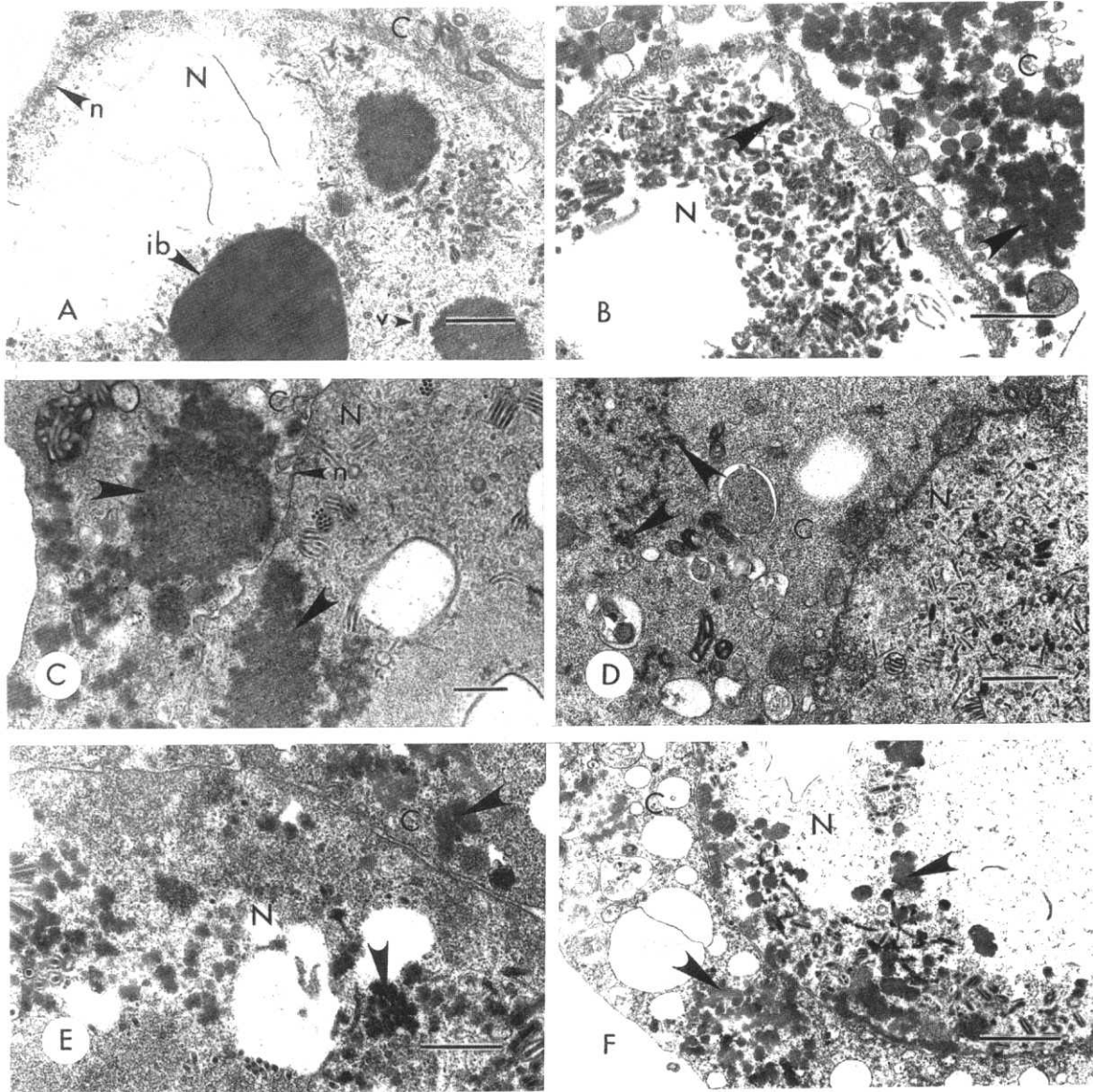


Figure 7. 野生株、および多角体形態変異株感染BmN細胞の電子顕微鏡観察
 ウイルスをBmN細胞に感染させ、72時間後に電子顕微鏡観察した。
 ポリヘドリンは→で示した。核 (N)、細胞質 (C)、核膜 (n)、封入体 (ib)、ODV
 (v) も図中に表示した。電子顕微鏡観察はZhou博士によって行われた。
 (A) 野生株 (T3株) (B) PVS-2株 (C) K270-3株 (D) #103株 (E) #110株 (F) #153株
 scale bars = 1 μ m (A, B, D, F) or 500 nm (C, E)

3-2. ポリヘドリンの細胞内局在

光学顕微鏡、および電子顕微鏡観察の結果より、変異株のポリヘドリンは核にも細胞質にも存在することが明らかになった。これらの分布を半定量的に調べるために、ウイルス感染細胞の核と細胞質を分離し、それぞれの画分に含まれるポリヘドリンを SDS-PAGE によって同定し、NIH image によりそのバンドを半定量的に解析した。野生株である T3 株感染細胞は、核分画のみにポリヘドリンが存在した (Fig. 8)。また、K270-3 感染細胞においては、約 80% のポリヘドリンが核に存在したが、その SDS-PAGE 上の移動度は野生株のものよりかなり速い移動度であった (分子量としては 27-28kDa) (Fig. 8)。PVS-2 感染細胞核内には、約 75% のポリヘドリンが分布していた。また、突然変異誘起剤投与により分離された 2 株、#110 株、および #153 株感染細胞においては、核分画にそれぞれ 56%、および 36% のポリヘドリンが存在した。以上の結果より、変異株間においても、ポリヘドリンの細胞内局在についてはかなりの差が存在することが判明した。

3-3. マーカーレスキュー法によるゲノム上の変異領域の同定

変異株のポリヘドリンの核移行阻害の原因となっている変異領域を同定するために、マーカーレスキュー法による相補性検定を行った。すなわち、BmN 細胞に変異株のゲノム DNA と野生株 (T3 株) のゲノムライブラリー (プラスミド DNA、または PCR 増幅断片: Maeda

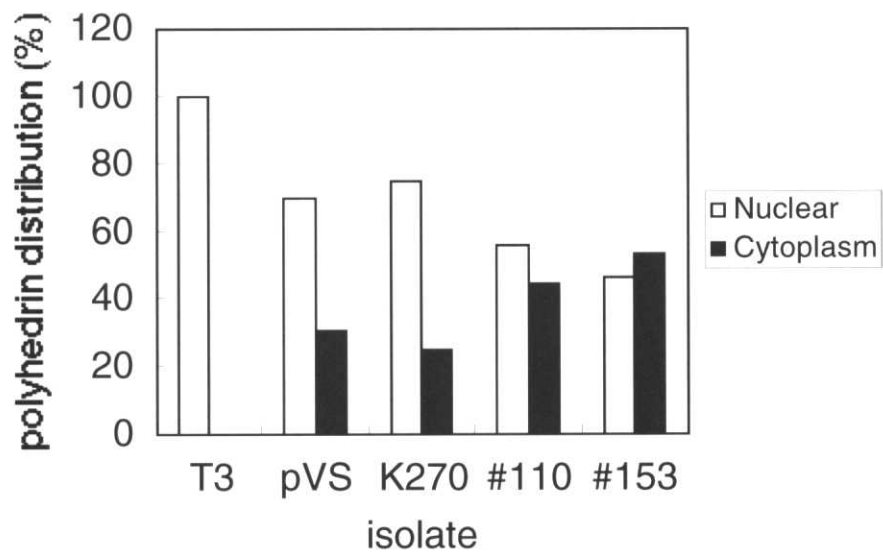
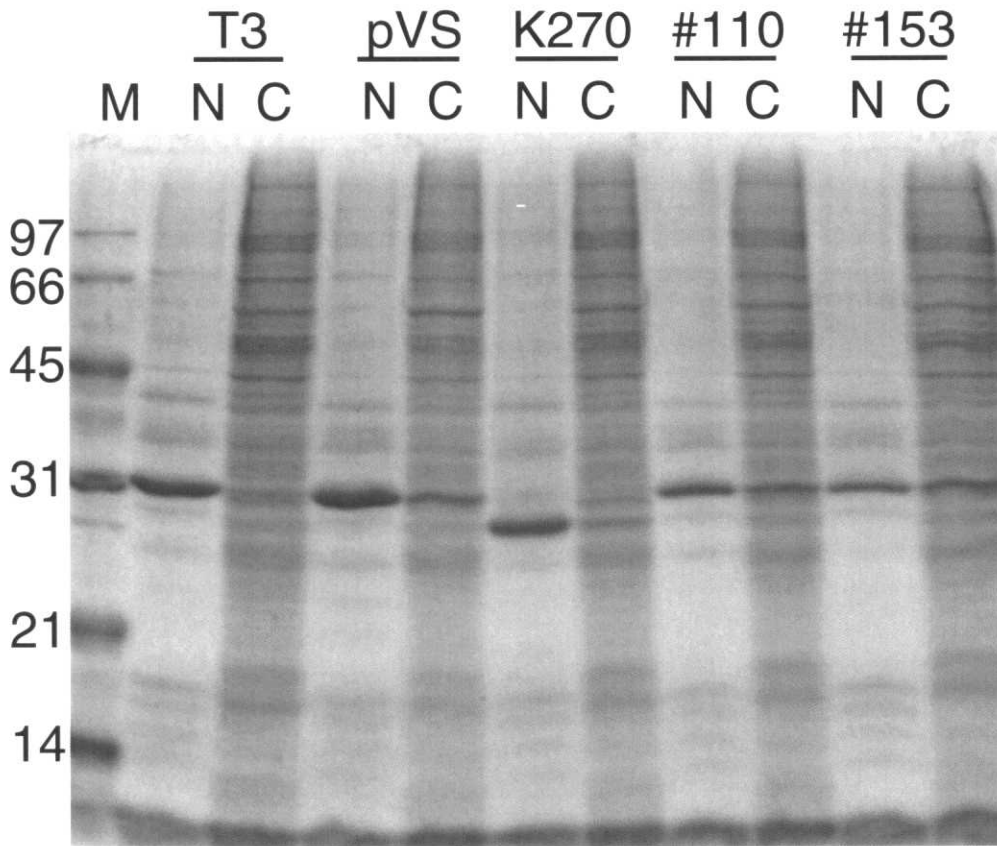


Figure 8. BmNPV感染BmN細胞におけるポリヘドリンの細胞内局在
 ウイルス感染細胞を核 (N) と細胞質 (C) に分画し、それぞれをSDS-PAGEに供した。
 ポリヘドリンの量をNIH imageによって定量したグラフを下段に表示した。

and Majima, 1990) をコトランスフェクションし、野生株と同様の形態をもつ多角体が形成される DNA 領域を探索した。その結果、すべての変異株の形質は 3.5 kb の *HpaI* fragment (Fig. 9A) をコトランスフェクションすることによって相補された。この断片は、*polh*、および *orf1629* (p78/83) の全領域を含むものであった。また、*HpaI* 断片とオーバーラップする 4.0 kb の *HindIII* K 断片 (Maeda and Majima, 1990) は相補率が高くないものの、すべての変異株の形質をレスキューすることができた (Fig. 9)。*orf1629* (p78/83) の一部を *HpaI* 断片と共有する *HindIII* L 断片 (Maeda and Majima, 1990) は全く相補することができなかった。プライマー NP1 と CB2 を用いた PCR によって増幅した DNA 断片 [*lef-2* から p78/83 (*orf1629*) の領域] は、相補率が高くないもののやはり変異株の形質を相補した。また、Fig. 9A に示す *NdeI*-*SphI*、並びに *XbaI*-*BamHI* 断片を用いたより詳細なマーカーレスキューの結果、PVS-2、および K270-3 の変異領域はそれぞれ *polh* の nt 594-nt 938 (345 bp)、および nt 148-nt 594 (446 bp) の領域に存在することが明らかになった。

3-4. 塩基配列の決定による変異部位の同定

相補性検定実験において、*polh* 領域のみが変異株の形態変異の原因となっていることを見出した。この領域に存在する変異を同定するために、第 1 章と同様の方法を用いて *polh*、およびその周辺領域を

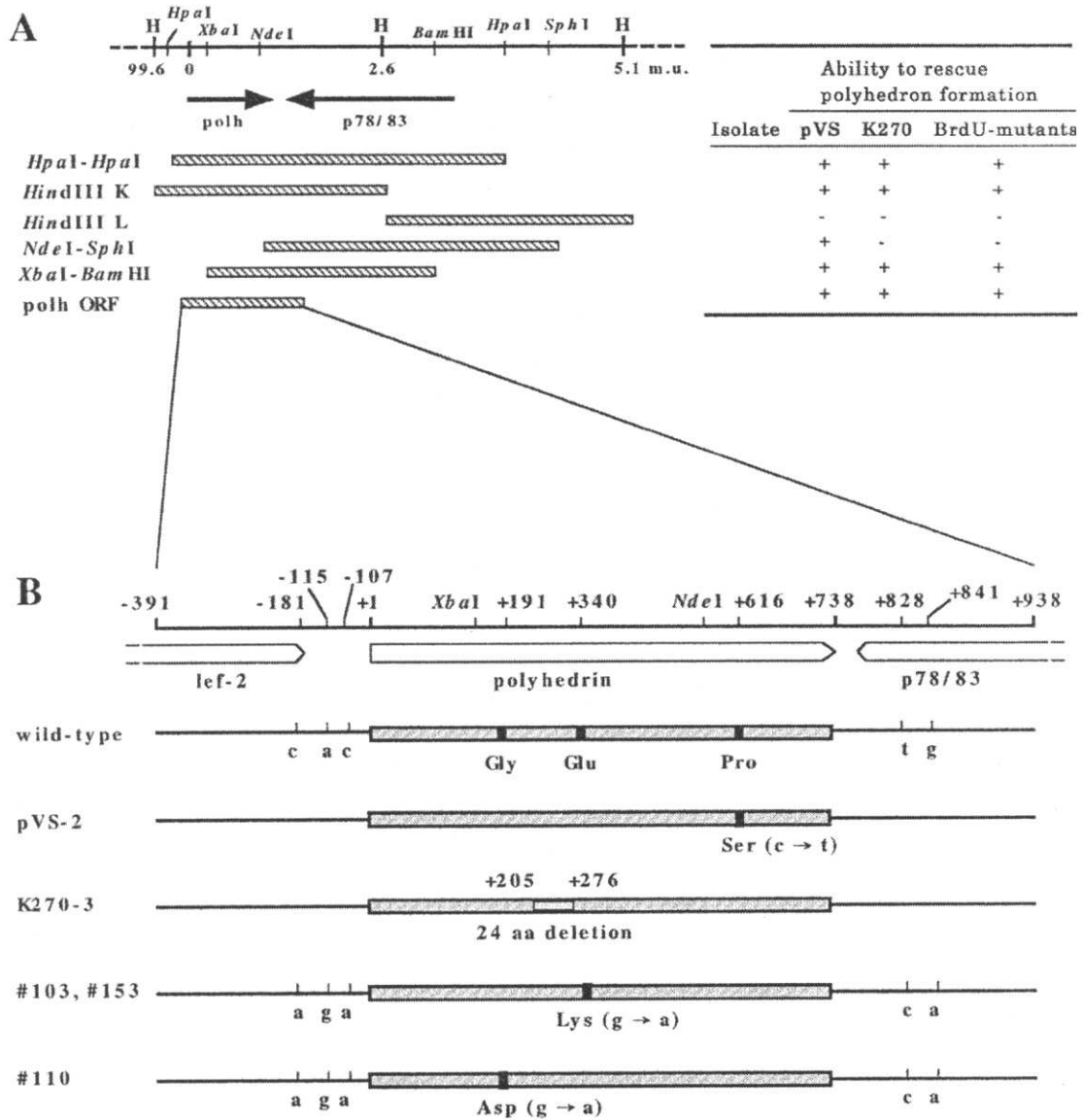


Figure 9. 多角体の形態変異に関与するアミノ酸残基の同定

(A) 相補性検定（マーカーレスキュー）による原因領域の同定をBmNPVゲノムライブラリー、およびPCR増幅断片を用いて行った。左図に使用した遺伝子断片とそのゲノム上の位置を表示した。右表には、相補性検定の結果を記した。+は多角体が形成されたことを示し、-は形成されなかったことを示す。

(B) 野生株と変異株の*polh*領域における比較。アミノ酸置換や欠失は翻訳領域の下に示した。

クローニングし、塩基配列の決定を行った。その結果、すべての変異株の *polh* 内に変異が認められた。PVS-2 には 616 番目の塩基が C から T に置換しており、その結果、206 番目のアミノ酸がプロリンからセリンに変化していた (Fig. 9B)。また、K270-3 の *polh* は 205 塩基目から 276 塩基目まで 72 塩基の欠失が起こっており、その結果 24 アミノ酸残基短くなった約 28kDa のポリヘドリンが合成されることが明らかになった (Fig. 9B)。これは Fig. 8 で示した SDS-PAGE の結果を支持するものである。#103 株、および#153 株の *polh* には 340 塩基目の G が A に置換するという同一の塩基置換が起こっていた。この塩基置換によって、114 番目のアミノ酸がグルタミン酸からリジンに置換していた (Fig. 9B)。また、#110 株は、*polh* 内に 191 塩基目が G から A になる変異を保持しており、その結果、64 番目のグリシンがアスパラギン酸に変化していた (Fig. 9B)。

4. 考察

Jarvis ら (Jarvis *et al.*, 1991) はポリヘドリンの核移行に必須な配列が 32-35 番目の KRKK という塩基性のアミノ酸クラスターであると報告している。しかし、ポリヘドリンにおいてその領域以外に核移行に関与するアミノ酸残基は同定されていない。本章では、多角体非形成変異株 5 株を単離し、それらが産生するポリヘドリンが核と細胞質の両方に存在することを明らかにした。また、相補性検定実験により、その形態変異の原因が *polh* の変異によるものであることを明らかにしたが、そのアミノ酸置換は既報の NLS に起こってはいなかった。これは、NLS 以外に核移行に関与するアミノ酸残基を特定した最初の例であり、ポリヘドリンの核移行が NLS のみによる単純な輸送機構によるものではないことを示している。

報告されている AcNPV の多角体形態変異株のうち、M276 のみが本章で解析した BmNPV 変異株と類似の形態変異を示す株である (Carstens *et al.*, 1992)。この変異株の *polh* には、C 末端に 229 塩基の宿主由来の配列が挿入されており、それが形態変異の原因となっている。一方、最近 NPV の発現システムを使って TnGV のグラニューリン遺伝子を発現した研究が報告されている (Eason *et al.*, 1998, Zhou *et al.*, 1998)。ポリヘドリンのかわりにグラニューリンを発現する組換え AcNPV、および BmNPV は、核と細胞質の両方に六面体の包埋体を少数形成した。ところがグラニューリンの 1-87 番

目のアミノ酸とポリヘドリンの 84-245 番目のアミノ酸を融合した遺伝子を発現させると、すべての包埋体が核に形成された。この結果と前述の AcNPV M276 株の解析結果とをあわせると、ポリヘドリンの 84-245 番目のアミノ酸残基中に核移行に関与する部位が存在すると考えられる。興味深いことに、本章で解析した 5 株のうち 4 株の変異がこの領域で起こっており、第 1 章で解析した #126 株、および #136 株の変異もこの領域に起こっていた。これらの結果は、ポリヘドリンのこの領域（84-245 番目のアミノ酸残基）がポリヘドリンの核移行に重要な役割を果たしていることを強く示唆している。

ウイルス感染細胞の核と細胞質を分画して SDS-PAGE を行った結果、ポリヘドリンの細胞内局在は、変異株間においてもかなりの差があることが明らかになった。K270-3 はその *polh* 内に 72 塩基の大きな欠失をもっているにもかかわらず、ポリヘドリンの約 80% が核に存在した。一方、この欠失領域の近傍に 1 アミノ酸置換のみが起こっている #103 株、#110 株、および #153 株が産生するポリヘドリンは、約 50% しか核分画に存在しなかった (Fig. 8)。これら 3 株のアミノ酸置換は、ポリヘドリンの高次構造形成に重要な残基であり、アミノ酸置換によってその構造が著しく変化することにより、通常のような核移行が妨げられていると考えられる。一方、電子顕微鏡観察によって、解析した 5 つの変異株が産生するポリヘドリンには結晶構造が見られないことが明らかになった。このことは、結晶化に関与するアミノ酸残基と核移行に関与するアミノ酸残

基が共通していることを示している。これらのアミノ酸残基はポリヘドリンの高次構造を取る上で非常に重要な残基であり、ポリヘドリンの構造変化によって、核移行、さらには結晶化まで阻害されていると考えられる。

Carstens ら (1992) は、ポリヘドリンの配列上にいくつかの機能ドメインとシグナルモチーフが含まれていると推定している。本章で得られた研究結果は、この仮説を支持するものである。ポリヘドリンの核移行、および結晶化機構は、いくつかのドメインによって制御を受けていることが明らかになった。興味深いのは、核移行と結晶化に関与するアミノ酸残基が共通していることである。ポリヘドリン内に存在する機能ドメインは、1つの機能だけではなく、様々な機能を司っているのかもしれない。

第3章

多角体形成数、および包埋ウイルス形成に関与する

バキュロウイルス遺伝子の機能解析

1. 緒言

バキュロウイルスの大きな特徴の一つは、ウイルス感染サイクルに、構造（構成タンパク質）が異なる 2 種類のウイルス粒子が形成されることにある。一つは、昆虫個体から昆虫個体へ一次感染が広がる際に働く包埋型ウイルス（occlusion derived virus; ODV）であり、一方、細胞間の二次感染の際に機能するウイルス粒子は出芽型ウイルス（budded virus; BV）と呼ばれる。双方のウイルス粒子のキャプシド構造は共通であると考えられており、それ以外の充填物質、およびエンベロープ構造にそれぞれの感染経路に特化した構造が存在する。ヌクレオキャプシドは、主に 39 kDa の major capsid protein (Thiem and Miller, 1989)、ウイルスゲノム DNA と DNA 結合タンパク質 (Maeda *et al.*, 1991; Tweeten *et al.*, 1980; Wilson *et al.*, 1987) の複合体からなる。キャプシド末端に局在する P78/P83 (ORF1629) も同定されており、ウイルスの増殖に必須なコンポーネントであることが判明している (Possee *et al.*, 1991; Vialard and Richardson, 1993)。その他にも、キャプシド関連のタンパクが数種同定されている (Muller *et al.*, 1990; Lu and

Carstens, 1992)。

BV はエンドサイトーシスによって、宿主細胞に吸着、侵入する。BV のエンベロープには、糖タンパク質である GP64 (GP67) が存在し (Whitford *et al.*, 1989; Monsma and Blissard, 1995; Blissard and Wenz, 1992)、ウイルスの 2 次感染に必須であることが明らかになっている (Monsma *et al.*, 1996)。一方、ODV は、感染宿主の中腸上皮細胞に融合によって侵入する (Granados and Lawler, 1981)。この融合に関与する BV の GP64 に相当するタンパク質は同定されていないが、ODV エンベロープに存在する機能未知タンパク質は多数同定されている (p25, Russell and Rohrmann, 1993; ODV-E56, Braunagel *et al.*, 1994; ODV-E66, Hong *et al.*, 1994; ODV-E18, Braunagel *et al.*, 1996a, b; ODV-E35, Theilmann *et al.*, 1996; P74, Faulkner *et al.*, 1997)。ODV の主要糖タンパク質である GP41 はウイルス粒子の tegument 構造に局在することが知られており、キャプシドの侵入過程において重要な働きをしていると考えられている (Whitford and Faulkner, 1992a, b)。しかしながら、ODV と多角体の相互作用に関与する因子についての研究はほとんど報告されていない。

埼玉県農業試験場の野口博士は、突然変異誘起剤を用いて多数の BmNPV 変異株を作出している (Noguchi, 1990; Noguchi, 1991; Noguchi, 1995)。その中には、ODV の形成が不完全で、その結果、多角体に ODV が包埋されることがなく、経口感染力をもたない変

異株が存在する (Noguchi, unpublished data; Noguchi, 1990; Katsuma *et al.*, 1999b)。第 3 章では、これらの変異株を用いて多角体、およびエンベロープ形成、またそれに伴う ODV の多角体への包埋機構に関わる遺伝子領域を同定することを試みた。

2. 材料、および方法

2-1. 培養細胞、ウイルス、および昆虫

BmN (BmN-4) 培養細胞 (Maeda *et al.*, 1985) は、理化学研究所分子昆虫学研究室で継代されている株を使用した。培養条件等は第 1 章の方法に準じた。突然変異誘起剤を用いた変異株の分離には、野生株として K 株 (Noguchi, 1990) を使用し、遺伝子欠損ウイルス作成の際には野生株として T3 株 (Maeda *et al.*, 1985) を用いた。*polh* 欠損ウイルスである BmPolhD3 とシステインプロテアーゼ遺伝子欠損ウイルスである BmCysPD (Ohkawa *et al.*, 1994) は、昆虫個体での感染実験に用いた。BmPolhD3 は、制限酵素 *Bsu36I* で線状化した BmNPV-*abb* ゲノム DNA と pBm31 をコトランスフェクションすることにより作成した (Katsuma *et al.*, 1999b)。*odv-e66* (AcNPV *odv-e66* 相同遺伝子) 欠損ウイルス (BmE66D) はカリフォルニア大学デービス校において作成されたものを使用した (Ohkawa and Maeda, 1998)。すべてのウイルス増殖は BmN 細胞によって行った。カイコ幼虫 (鐘音) は人工飼料にて 27°C で飼育した (Choudary *et al.*, 1995)。埼玉県 の 2 農家で採取した NPV 感染カイコから精製した多角体 (12 個体分) よりゲノム DNA を抽出し、*odv-e66* の遺伝子多型解析に用いた。

2-2. 変異株の単離

変異株#15 株、および#16 株は、1990 年に野口博士によってエンベロープ非形成株として単離された株であり (Noguchi, 1990)、それを 3 回プラーク純化したものを実験に供試した。変異株#115 株、#119 株、および#162 株は、エンベロープ非形成株として単離した未発表の変異株であり、これらも 3 回プラーク純化したものを実験に供試した(Katsuma *et al.*, 1999b)。電子顕微鏡観察は、カリフォルニア大学デービス校 Zhou 博士によって行われた。

2-3. 変異株の増殖性の解析

野生株、および変異株の BmN 細胞における増殖性は、BV を MOI=10 で BmN 細胞に接種した後、継時的に培養上清を 100 μ l ずつ回収し、それをプラーク法によって測定することによって行った (第 1 章参照)。

2-4. 多角体内の ODV 量の解析

多角体の精製法、および経口感染実験の方法については第 1 章に準じた。また、超遠心法による多角体内の ODV 量の検定も第 1 章に準じた。

2-5. 変異株の多角体形成数の解析

多角体形成数の計測は、光学顕微鏡下で少なくとも 300 個の感染細胞を位相をずらしながら観察することで行った。

2-6. *polh* の解析

変異株の *polh* は第 1 章と同様、PCR 法によってクローニングし、塩基配列の決定を行った。組換えウイルスの作製法も第 1 章に準じた。

2-7. *odv-e66* の解析

野生株 (K 株、および T3 株)、および変異株 (#15 株, #16 株, #115 株, #119 株, #162 株) の *odv-e66* は PCR 法によってクローニングした。*odv-e66* 全長を増幅する PCR プライマー EJ4-1、EJ4-2、変異部位を増幅する PCR プライマー EJ4-3、EJ4-4 は以下のように設計した。

EJ4-1: 5'-ATGTACAGTCCAGAATTTGG-3'

EJ4-2: 5'-GGCGAAGAAATCGACACTGT-3'

EJ4-3: 5'-GGTGCCTATTAAATAGTAGC-3'

EJ4-4: 5'-TTCAGCTTTTTGGCTAAACG-3'

PCR 産物は 2%アガロースゲルで分離、精製した後、pGEM-T ベクター (Promega) にサブクローニングした。このインサートはさらに短い DNA 断片としてプラスミドベクターにサブクローニングした後、ジデオキシ法にて塩基配列を決定した。

2-8. 変異型 *odv-e66* を持つ組換えウイルスの作成

変異株由来の *odv-e66* 遺伝子を持つウイルスは、BmE66D を用いて作成した。コトランスフェクションはリン酸カルシウム法によって行い、1 μg の BmE66D のゲノム DNA と 3 μg の変異株由来 *odv-e66* を含むプラスミドを用いた。X-Gal 存在下 (400 $\mu\text{g}/60\text{ mm dish}$) プラーク法によって白色を呈するプラークを組換えウイルスと同定した。BmE66D の LacZ が変異株の *odv-e66* と組換わったかどうかは、単離したウイルスをプライマー EJ4-1 と EJ4-2 によって PCR-genotyping することによって確認した。

2-9. 25K FP 遺伝子 (*fp*: few polyhedra) の解析

ウイルスゲノム DNA の調製は第 1 章に準じた。野生株 (K 株、および T3 株)、および変異株 (#15 株, #16 株, #115 株, #119 株, #162 株) の 25K FP 遺伝子 (*fp*) は PCR 法によって増幅した。PCR に用いたプライマーは以下の通りである。

FP1: 5'-CTTGGTAGCTATATGTGTCG-3'

FP2: 5'-CACTTTAAATTCTTCATTGG-3'

PCR 産物は 1%アガロースゲルで分離、精製した後、pGEM-T ベクター (Promega) にサブクローニングし、ジデオキシ法にて塩基配列を決定した (Sanger *et al.*, 1977)。

2-10. *fp* 欠損 BmNPV (Bm25KD) の作成

fp を含む 4.4 kb の *EcoRI-HindIII* 断片 (nt 41356-44787; GenBank

acc. No. L33180) を BmNPV T3 株よりプラスミドベクターにクローニングした。そのゲノムフラグメントをさらに制限酵素 *ApaI* と *Pf1MI* で消化し、klenow フラグメントで平滑末端化した。そこにプラスミド pLacZ [*Drosophila melanogaster* hsp70 プロモーターの下流に β -galactosidase 遺伝子を連結したものをクローン化したプラスミド (Kamita *et al.*, 1993)]を *Bam*HI-*Xba*I で消化し、平滑末端化して得られた断片をライゲーションした。*fp* 欠損ウイルス (Bm25KD) は、このプラスミドと BmNPV T3 株のゲノム DNA を BmN 細胞にコトランスフェクションすることで作成した。つまり、コトランスフェクション後のウイルス上清を用いてプラーク法を行い、X-Gal 存在下 (400 μ g / 60 mm dish) で青色のプラークを選択し、プラーク純化を行った。コトランスフェクションはリン酸カルシウム法によって行った。実際に、目的の位置に LacZ カセットが挿入されているかどうかは、PCR 法、およびサザンブロット法で確認した (Kamita *et al.*, 1993)。

2-11. Bm25KD を用いた変異株のマーカーレスキュー実験

変異株由来の *fp* を持つウイルスは、Bm25KD を用いて作成した。コトランスフェクションはリン酸カルシウム法によって行い、1 μ g の Bm25KD のゲノム DNA と 3 μ g の変異株の *fp* を含むプラスミドを用いた。組み換えウイルスの選択は上記の *odv-e66* の場合と同様に行った。単離したウイルスは上述の PCR プライマー FP1 と FP2

で PCR-genotyping することによって相同組換えを確認した。

2-12. RT-PCR による *polh*、および *p10* の転写量解析

第 1 章に記載の方法と同様に行った。

2-13. *In vivo* における *fp* の機能解析

5 齢 1-2 日目のカイコ幼虫を氷水に 5 分間浸し、仮死状態にしたのち、培養細胞で増殖させたウイルス液 (1×10^8 pfu/ml のウイルス液を 10 μ l ずつ) を接種し、その後、人工飼料にて飼育した。死亡後 42 時間 (感染後約 8 日) の虫体溶解の程度の検定は写真撮影後に行った。

3. 結果

野口博士によって単離された変異株#15 株、および#16 株は当初、多角体の形態が不定である株として分類された。その後の電子顕微鏡観察によって、これらの株において、ODV のエンベロープ形成がうまく行われていないことが判明した (Noguchi, 1990; Noguchi, 1991)。また、その後、新たに分離された 3 変異株、#115 株、#119 株、および#162 株に関しても同様の電子顕微鏡像が得られた。また、カリフォルニア大学デービス校 Zhou 博士による電子顕微鏡観察の結果、これら 5 株の多角体には ODV がほとんど包埋されていないことも明らかになった (Katsuma *et al.*, 1999b)。それらの結果を踏まえて、まずこれらの変異株の特徴付けを詳細に行うことから開始し、さらに候補となる遺伝子領域の解析を行った。

3-1. 経口感染力の検定

#15 および#16 株が産生する多角体の経口感染力については、野口によって報告されている。その結果から#15 株、および#16 株の LC_{50} は野生株 (K 株) よりも 10^4 倍高く、これらの株にはほとんど経口感染力がないことが示されている (Noguchi, 1990)。今回新たに#115 株、#119 株、および#162 株の経口感染力の検討を行った。その結果、最高濃度 (10^9 polyhedra/ml) の多角体数でも 20% 程度の個体しか死亡しなかったため、 LC_{50} は算出できなかったが、野

生株の LC_{50} の値から、少なくともこれらの変異株の LC_{50} が野生株よりも 10^3 倍高いことが分かった。この際、変異株感染により死亡した 20%程度の個体も多角体形成数が少なく、また死亡後の虫体の溶解も起こらないものが多く、これらがウイルス感染によって死亡したか否かは確認できなかった。以上の結果より、これら 5 つの変異株は程度に多少の差があるものの、ほとんど経口感染力をもたないことが明らかになった。

3-2. 多角体形成数の調査

5 つの変異株、および 2 つの野生株 (K 株、および T3 株) の BmN 細胞における多角体形成数について検討した。その結果、#115 株、#119 株、および #162 株は野生株と比較して、多角体形成数が著しく少なかった (Table 2, Fig. 10)。一方、#15 株、および #16 株は多角体形成数が野生株よりも少ないものの、大きな差ではなかった (Table 2, Fig. 10)。

3-3. 出芽型ウイルス (BV) の増殖

培養細胞における変異株の BV の増殖を調べるため、感染細胞から放出された BV をプラークアッセイにより定量し、BV の増殖曲線を作成した。その結果、変異株と野生株の増殖に有意な差は認められなかった。しかし、#115 株、#119 株、並びに #162 株は BV の増殖が野生株よりも少し高い傾向にあった (Fig. 11)。

Table 2. Percent of cells containing polyhedra

Isolate	polyhedra per cell		
	0-10	10-20	>20
K	43	15	42
T3	36	12	52
#15	56	23	21
#16	68	16	16
#115	88	9	3
#119	81	12	7
#162	82	10	7
25KD	93	5	2

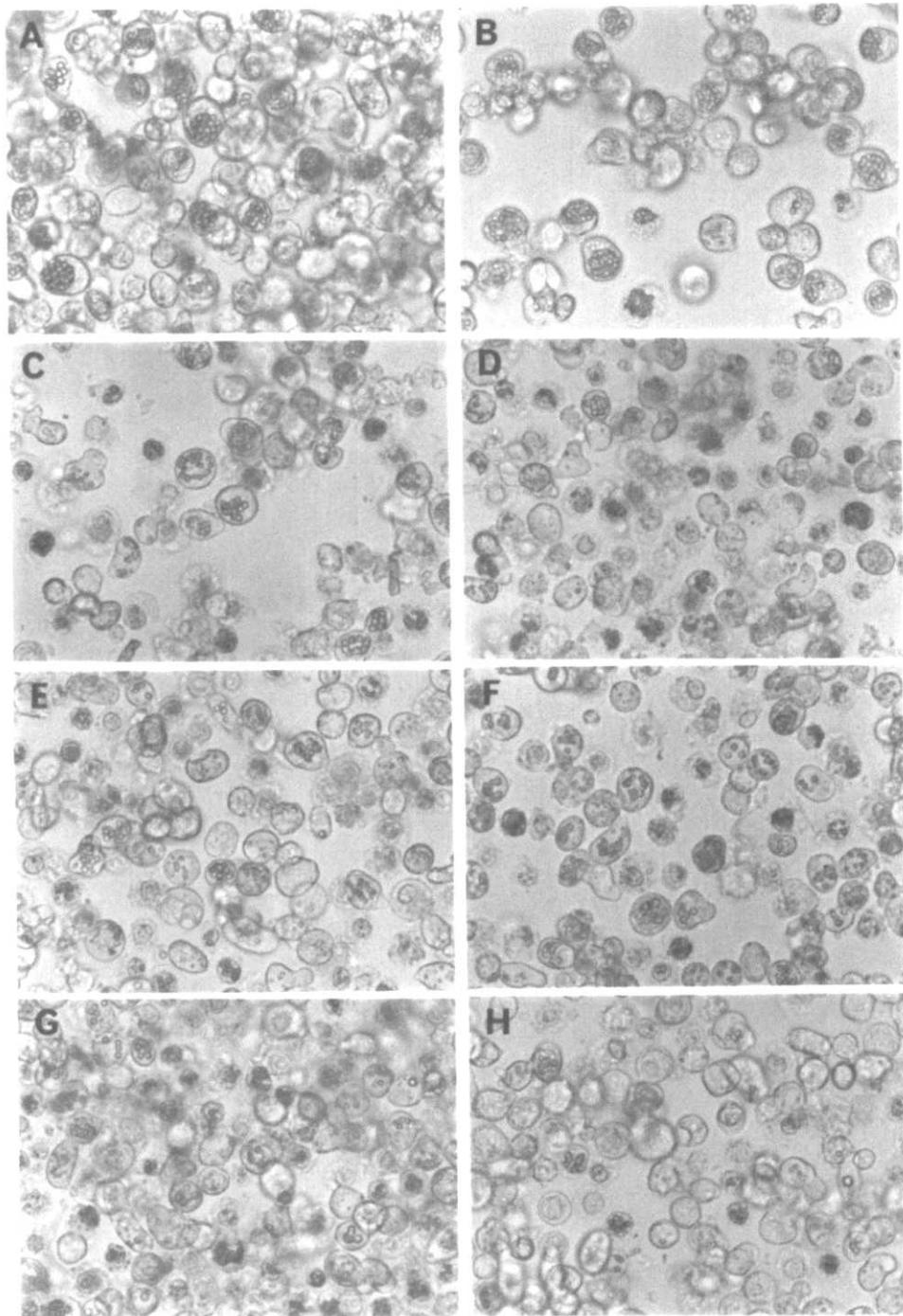


Figure 10. 野生株、および多角体形態変異株感染BmN細胞の光学顕微鏡観察
 ウイルスをMOI=10でBmN細胞に感染させ、72時間後に光学顕微鏡下で観察した。
 (A) 野生株 (K株) (B) 野生株 (T3株) (C) #15株 (D) #16株 (E) #115株 (F) #119株
 (G) #162株 (H) Bm25KD (*fp*欠損株)

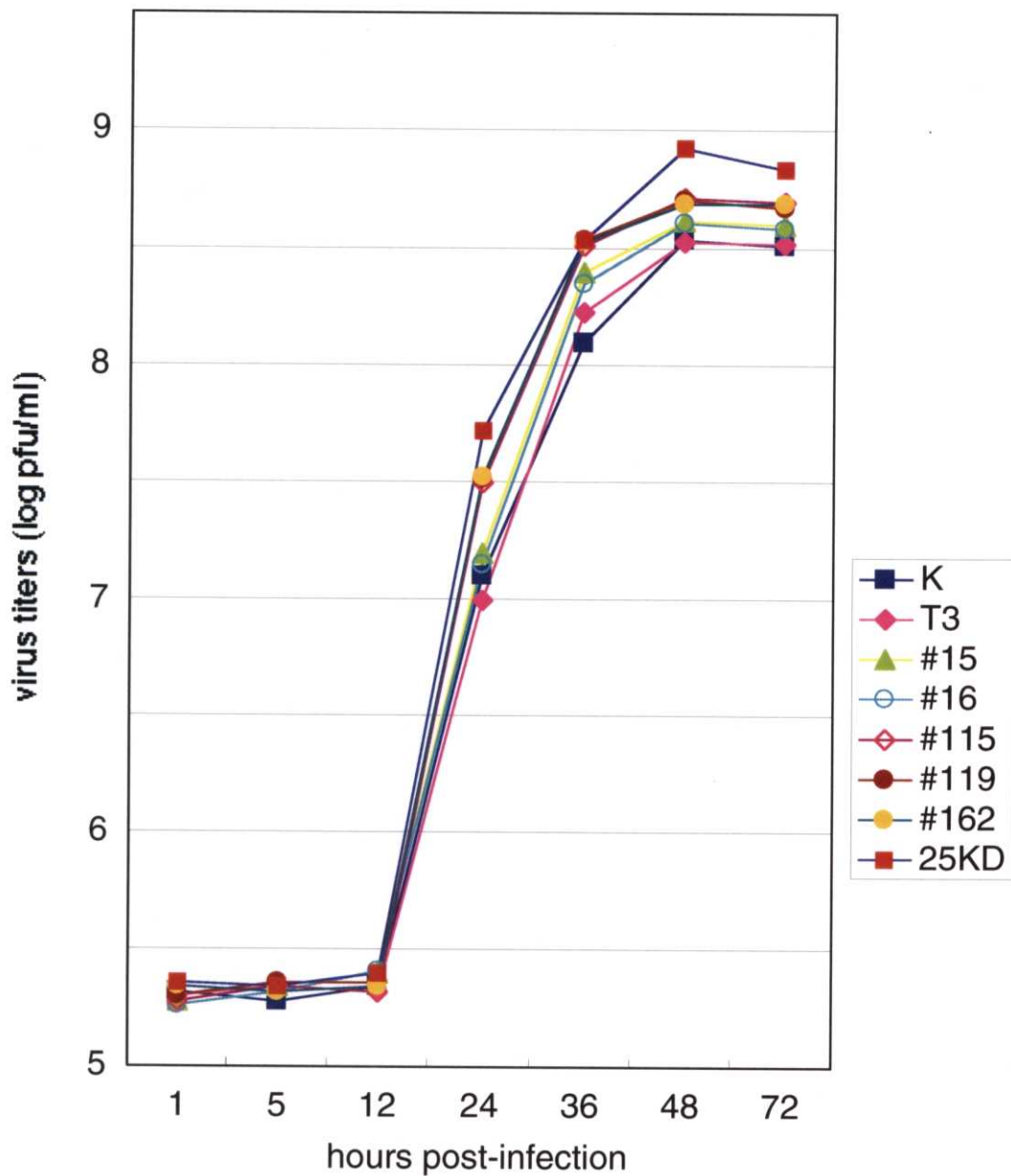


Figure 11. 培養細胞における出芽型ウイルス（BV）の増殖
 ウイルス感染細胞培養上清を経時的に採取し、放出BV量をプラークアッセイにより定量し、増殖曲線を作成した。

3-4. 多角体遺伝子の解析

第 1 章、第 2 章と同じストラテジーで変異株 5 株の *polh* をクローニングし、塩基配列を決定した。その結果、#16 株にのみ 3 箇所アミノ酸置換を伴う塩基置換を同定した。その 3 箇所のアミノ酸置換は 71、96、219 番目のアミノ酸に起こっており、それぞれロイシンがフェニルアラニンに、アルギニンがヒスチジンに、グルタミン酸がバリンに置換していた。これらのアミノ酸置換が及ぼす影響を検討するために、その変異 *polh* をもつ組換えウイルスを相同組換えにより作成し、その多角体の形態を調査した。その結果、多角体のかたちには若干の変化が認められたが、多角体形成数は野生株と同等であった。以上のことから、#16 株においては、少なくとも多角体形成数に関して、*polh* 内の変異は関係がないと考えられた。多角体の OV 包埋異常について、#16 株の *polh* に認められたアミノ酸変異が関係しているか否かは以下の超遠心法による解析によって行った。

3-5. 超遠心法による多角体内の ODV 量の検定

多角体内に包埋されている ODV 量を検定するために、密度勾配をつけたショ糖溶液上にアルカリ処理した多角体液を重層し、超遠心後、ウイルス粒子のバンドが観察できるかどうか検討した（第 1 章参照）。野生株ははっきりとバンドが確認できたが、5 株の変異株由来の多角体溶液からはウイルスのバンドは認められず、変異株の多

角体には ODV がほとんど包埋されていないことが判明した。また、#16 株の *polh* をもつ組換えウイルス由来の多角体を用いて同様の実験を行ったところ、野生株より薄いものの ODV のバンドがはっきりと確認できた。この結果から、#16 株のポリヘドリン内の変異は ODV の包埋には関与しない変異であることが明らかになった。

3-6. 変異株の原因遺伝子の候補選択

これらの変異株の研究を行っている際、カリフォルニア大学デービス校の前田博士の研究室で経口感染に関与する BmNPV 遺伝子がいくつか同定された。その中の遺伝子の 1 つ *ej-4* は AcNPV で報告されている ODV 特異的遺伝子 *odv-e66* (Hong *et al.*, 1994) のホモログであり、この遺伝子を欠損させると多角体の経口感染力が消失した (Ohkawa and Maeda, 1998)。この遺伝子は、ODV 特異的遺伝子であることから、変異株の ODV エンベロープ異常の原因となっている可能性が考えられた。また、AcNPV において、その欠損より多角体数が減少する遺伝子として同定されている *fp* (few polyhedra) (Beames and Summers, 1989) は多角体形成数に関与する遺伝子としてそれまでに唯一報告のあるものであり、この遺伝子も変異株の原因遺伝子となっている可能性が考えられた。以上のことから、変異株の原因遺伝子の候補としてこの 2 つの遺伝子を解析することにした。

3-7. ODV 特異的タンパク質遺伝子 *odv-e66* の解析

LacZ 挿入型 *odv-e66* 欠損株 (BmE66D) はカリフォルニア大学前田博士より供与していただいた。最初にこのウイルスの多角体形成数、および BV 増殖の程度を調べたが、野生株と大差は認められなかった。次に変異株の *odv-e66* に変異があるかどうか調べるために、K 株、および 5 つの変異株の *odv-e66* をクローニングし、塩基配列を決定した。その結果、5 つの変異株には共通して 18 塩基の挿入配列 (6 アミノ酸残基相当 : SNNSNN) が存在した (Fig. 12, Fig. 13)。この配列は、近接する配列とほぼ同一の配列であることから、duplication によって生じたものであると考えられた (Fig. 12, Fig. 13)。他にも 3 塩基からなる欠失やアミノ酸置換が認められたが、すべての株に共通の変異はこの部位のみであった。この挿入配列が形態変異の原因であるか否かを調べるために、#115 株由来の *odv-e66* をもつ組換えウイルスの作成を試みた。#115 株由来 *odv-e66* を含むプラスミド DNA と *odv-e66* 欠損ウイルスである BmE66D のゲノム DNA をコトランスフェクションし、プラーク法によって白色を呈するプラークを組み換えウイルスと同定した。この組換えウイルスの 2 齢幼虫に対する経口感染力を調べたところ、野生株 (K 株) の LC_{50} (50%致死濃度) が 8.1×10^6 polyhedra/ml であるのに対して、変異株の LC_{50} は 7.3×10^6 polyhedra/ml であった。また、多角体形成数も野生株と大差なく、この挿入配列は変異株の形態変異と直接関係がないことが判明した。BmNPV は株間において遺伝

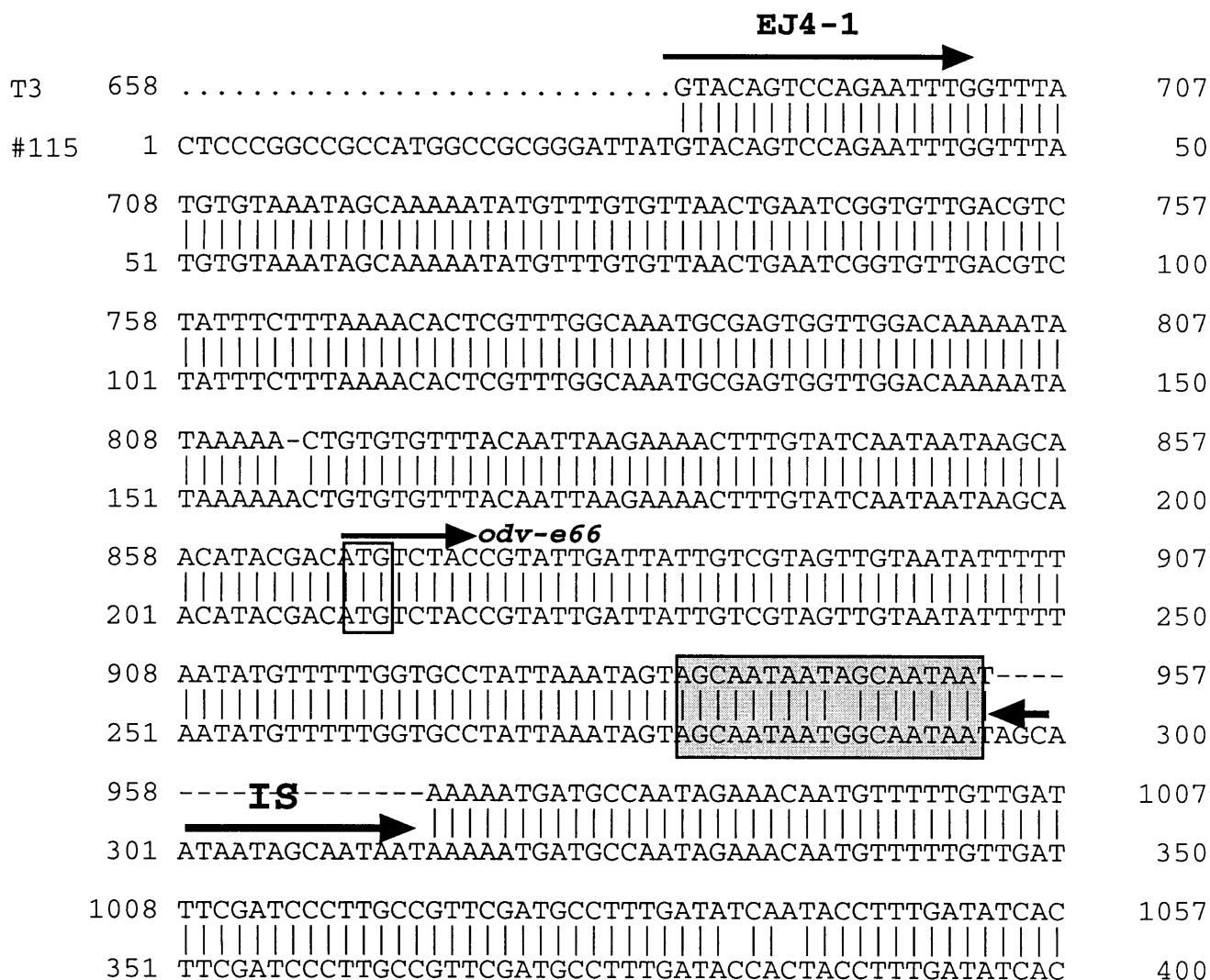


Figure 12. 野生株と変異株のodv-e66の比較.
T3株と#115株のodv-e66の塩基配列の一部をアライメントした。
挿入配列 (IS) はすべての変異株で共通に認められた。網掛けbox
で示している配列が、挿入配列とほぼ (17/18) 相同であることが
分かる。

子の多型が見られることが報告されている (Hu *et al.*, 1994; Hong *et al.*, 2000)。そこで変異株に共通に見出された *odv-e66* の挿入配列が遺伝子多型によるものであるか検討するために、埼玉県農家より採取した BmNPV 感染カイコより調整したウイルスゲノム DNA を用いて、多型のある部分を挟み込むように *odv-e66* 断片を増幅した。その結果、野生型、および変異型の遺伝子がともに増幅されたことから、野外の BmNPV には両方のタイプの遺伝子型が存在することが明らかになった (Fig. 14)。以上のことから、この *odv-e66* にみとめられた挿入配列は遺伝子多型によるものであると考えられた。

3-8. 変異株の *fp* のクローニング、および塩基配列の決定

変異株の形態変異の原因が *fp* の変異によるものか調べるために、野生株、および変異株 5 株の *fp* の遺伝子クローニングを行った。クローニングのために使用した PCR プライマーの設計は、既にデータベース上に公開されていた BmNPV T3 株の全塩基配列をもとに行った (GenBank acc#L33180, Gomi *et al.*, 1999)。プライマー FP1、および FP2 を用いて、K 株、および変異株 5 株の *fp* を PCR によって増幅した。その結果、すべての変異株において、野生株である K 株の *fp* と同じサイズの PCR 産物が得られた (約 1.2 kb)。このことから、AcNPV の *fp* 変異株で報告されているような *fp* 領域における大きな遺伝子欠失は起こっていないことが判明した。これらの増

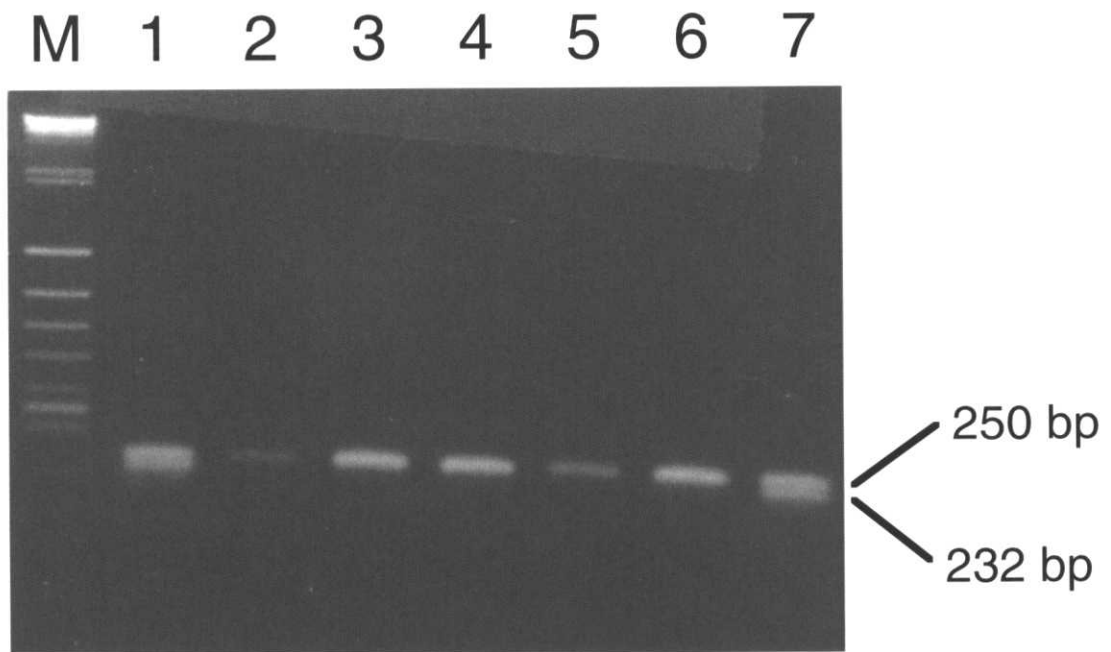


Figure 14. PCRによる *odv-e66* の genotyping.

odv-e66 における遺伝多型をプライマー EJ4-3、および EJ4-4 を用いた PCR によって調査した。250bp の増幅断片が挿入配列を含むもの、232bp の増幅断片は野生株 (T3 株または K 株) の *odv-e66* を鋳型とした場合に増幅される断片である。

M, DNA marker; lane 1, T3 株+#115 株; lane 2, #15 株;
lane 3, #16 株; lane 4, #115 株; lane 5, #119 株; lane 6, #162 株;
lane 7, 埼玉県にて採取した野外 BmNPV

幅産物をクローニングし、塩基配列の決定を行った。その結果、野生株として用いた K 株の *fp* はデータベース上の T3 株の *fp* の配列と同一であった。BmNPV の *fp* は 214 アミノ酸残基からなり、その配列はアミノ酸レベルで AcNPV、および LdNPV の *fp* と非常に高い相同性があった (Fig. 15; Beames and Summers, 1989; Bischoff and Slavicek, 1997)。変異株の *fp* にはすべて塩基置換、または 1 塩基挿入が存在し、その結果、すべての変異株の FP にアミノ酸置換が起こっていることが判明した (Fig. 16, Fig. 17)。

#15 株、および #16 株の *fp* には、それぞれ 4 個、および 3 個の塩基置換が認められた。双方の株で共通に起こっていた 254 番目の塩基置換 (C→T) のみが、85 残基目のセリンをフェニルアラニンに変えるアミノ酸置換を引き起こしていた (Fig. 16, Fig. 17)。

#115 株、および #119 株の *fp* には 7 個、および 6 個の塩基置換が存在した (Fig. 16)。それらの塩基置換のうち、両株で起こっていた 315 番目の C から T への置換は、トリプトファンをコードするコドンを終止コドンに変化させており、その結果、#115 株、および #119 株の *fp* は、104 アミノ酸からなる短いタンパク質をコードすることが明らかになった (Fig. 17)。226 番目の A から G への塩基置換も 76 番目のアスパラギンからアスパラギン酸へのアミノ酸置換を引き起こしていたが、それ以外の塩基置換はアミノ酸置換を伴うものではなかった (Fig. 16, Fig. 17)。

#162 株の *fp* には 4 個の塩基置換と 1 箇所の 1 塩基挿入が認められた。226、323、366 番目の塩基に

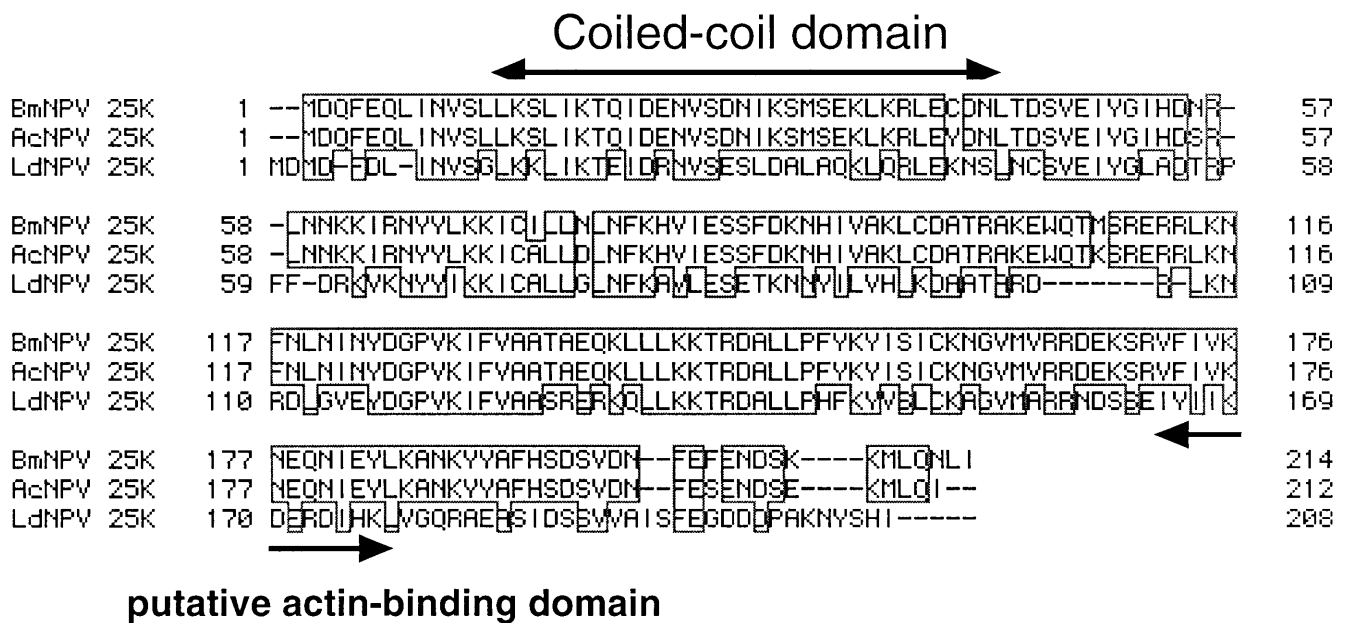


Figure 15. バキュロウイルス間でのFPの相同性.

BmNPVのFPと報告されているAcNPV、およびLdNPVのFPのアライメントを行った。Braunagelら (Braunagel *et al.*, 1999) によって推定されている2つのドメインについても表示した。

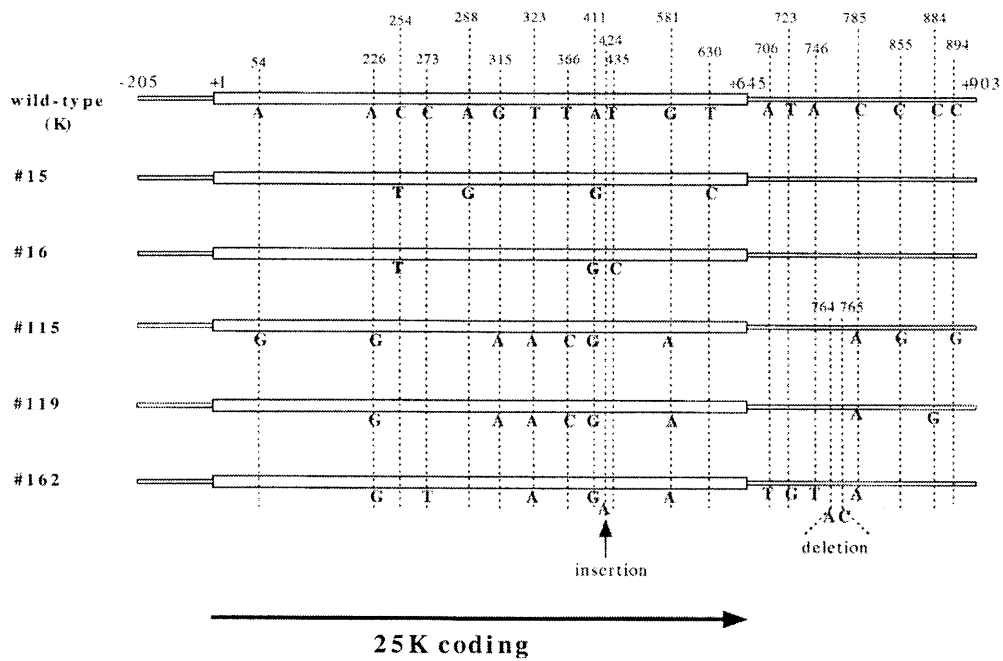


Figure 16. 変異株のfpにおける塩基置換.

塩基配列の解析により、変異株のfpに存在する塩基置換を見出した。塩基の位置はfpの翻訳開始1塩基目を+1として表示している。挿入塩基、および欠失についても表示した。

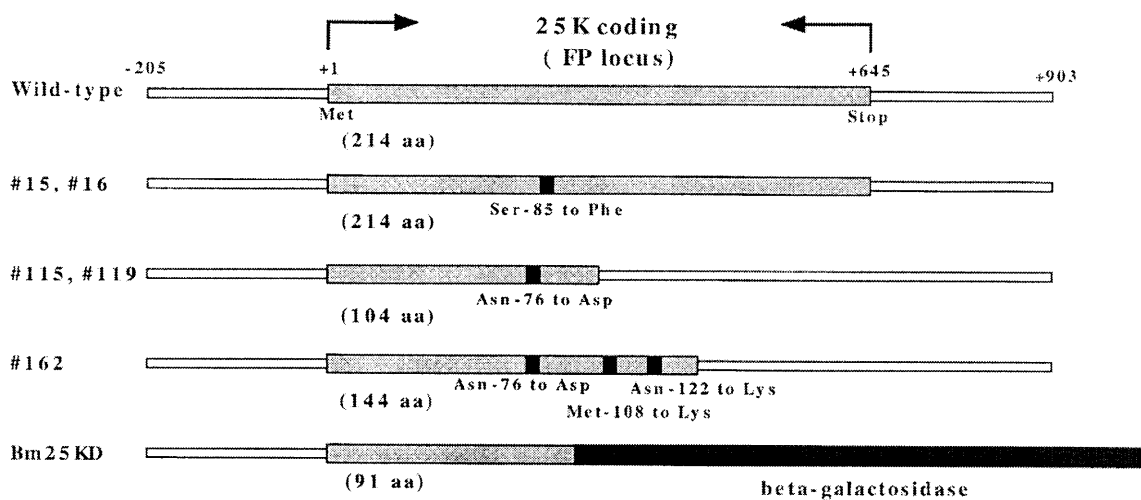


Figure 17. 野生株、および変異株のFPの構造.

塩基配列より推定される変異株のFPの構造を示した。また、LaZの挿入により人為的にfpを破壊したBm25KDについても同様に示した。それぞれの変異株に生じているアミノ酸置換、およびコードすると考えられるFPのアミノ酸残基数を翻訳領域の下に表示した。

においてそれぞれ A→G、T→A、T→C の塩基置換が起こっており、その結果 76、108、122 残基目のアミノ酸がそれぞれアスパラギンからアスパラギン酸、メチオニンからリジン、アスパラギンからリジンに置換していた (Fig. 16, Fig. 17)。それに加えて、424 塩基目の A の 1 塩基挿入が終止コドンを形成し、144 アミノ酸からなる短いタンパク質をコードすることが明らかになった (Fig. 16, Fig. 17)。

3-9. *fp* 欠損株 (Bm25KD) の作成、および解析

fp の機能解析、および変異型 *fp* をもつ組換えウイルスを作成するために、LacZ カセット挿入による *fp* 欠損 BmNPV (Bm25KD) の構築を行った (Fig. 17)。組換えウイルスの作成は、*fp* 領域に LacZ カセットを挿入したプラスミドと BmNPV T3 株のゲノム DNA をコトランスフェクトすることによって行った。LacZ カセットの *fp* 領域への挿入は PCR 法、およびサザンプロットによって確認した。Bm25KD 感染細胞は著しく多角体形成数が減少しており (野生株の約 1/4)、その程度は解析対象の 5 つの変異株以上であった (Table 2)。また、BV 増殖の程度は有意ではないものの、#115 株、#119 株、および #162 株と同様、野生株よりも少し高い傾向にあった (Fig. 11)。

3-10. Bm25KD を用いた変異型 *fp* をもつ組換えウイルスの作成

変異株の *fp* に見出した変異が、実際の形態変異の原因になっている

かどうか確認するために、変異型 *fp* をもつ組換えウイルスの作成を行った。BmN 細胞に変異型 *fp* を含むプラスミド DNA と Bm25KD のゲノム DNA をコトランスフェクションした。変異型 *fp* をもつ組換えウイルスの選択は、プラークアッセイにて白プラークを選択することにより行った。その結果、単離できた変異型 *fp* をもつ組換えウイルスは、変異型 *fp* が由来する変異株と同様の表現型を呈した。また、野生株の *fp* を Bm25KD に組み込むコントロール実験を行ったところ、その組換えウイルスは野生株の形質を示したため、この実験の有効性が確認された。これらの結果から、多角体の形成数に関しては *fp* に起こっている変異が唯一の原因であることが明らかになった。次に、変異型 *fp* をもつ組換えウイルスが産生する多角体が ODV を包埋しているかどうか検討するために、経口感染実験と超遠心法による多角体内の ODV 量の検定を行った。経口感染実験の結果、最高濃度 (10^9 polyhedra/ml) の多角体数でもほとんどの個体が死亡しなかった。また、超遠心法による解析の結果、野生株でははっきりとバンドが確認できたが、変異型 *fp* をもつ組換えウイルス由来の多角体溶液からはウイルスのバンドは認められなかった。これらのことから、変異型 *fp* をもつ組換えウイルスは、もとの変異株同様、経口感染力がなく、また多角体内に ODV も含まないことが判明した。以上の結果から、変異株が示す多様な形態変異は、すべて *fp* における変異が原因であることが明らかになった。

3-11. *fp* の変異と多角体数の関係

光学顕微鏡観察により、5 つの変異株、変異株の *fp* をもつ組換えウイルス 5 株、および 2 つの野生株 (K 株、T3 株) の多角体形成数について比較した。産生する多角体数によって、これらの株は以下の 4 つのグループに分けることができた。(1) 野生株 K 株、および T3 株 (多角体形成数が 1 感染細胞あたり 30 個以上) (2) #15 株、または #16 株由来の *fp* をもつ BmNPV。すなわち、FP の 85 番目のアミノ酸がセリンからフェニルアラニンに置換している BmNPV (多角体形成数が 1 感染細胞あたり 20-30 個) (3) #115 株、#119 株、および #162 株由来の *fp* をもつ BmNPV。すなわち、FP の途中で終止コドンが存在し、104、または 144 アミノ酸の短い FP をもつ BmNPV (多角体形成数が 1 感染細胞あたり 10 個) (4) Bm25KD。LacZ 挿入により 91 残基の短い FP をもつ BmNPV (多角体形成数が 1 感染細胞あたり 10 個以下)。これらの結果より、多角体の形成数はアミノ酸置換の程度、もしくは発現される機能型 FP の大きさに依存していると考えられる。

3-12. 変異株における *polh* 転写量の検討

AcNPV においては、*fp* の変異によって *polh* の転写量が減少することが示されている。また、その際、同じ very late gene である *p10* の転写量には影響がないことも示されている (Harrison and Summers, 1995; Harrison *et al.*, 1996)。本研究で解析した FP 変

異株においてもこの現象が当てはまるかどうか確かめるために、野生株、および変異株の *polh* の転写産物蓄積量を RT-PCR によって定量した (Fig. 18)。その結果、FP に 1 アミノ酸置換をもつ #15、#16 両株においては、転写産物蓄積量はほとんど変わらなかったのに対して、通常よりも短い FP を産生する #115、#119、および #162 株においては、転写量の明らかな減少が認められた。また、*fp* に LacZ を挿入したウイルスである Bm25KD は、*polh* の転写量がもっとも顕著に減少していた。*polh* の転写量の減少は、多角体数の形成数の減少と一致していることから、*fp* の変異による多角体形成数の減少は、*polh* 転写量の低下によるものであると考えられた。

3-13. 感染幼虫個体における *fp* の機能解析

fp の *in vivo* における機能を調べるために、変異株感染幼虫における病態を調査した。5 つの *fp* 変異株、Bm25KD、および野生株を 5 齢 1 日目のカイコ幼虫に経皮接種したところ、接種したすべての個体が 5-6 日目に死亡した。*fp* 変異株と野生株の間に死亡までの時間については差は認められなかった。しかしながら、野生株 (K 株、および T3 株) と *fp* 変異株には死後の感染個体の溶解の程度に大差が存在した。野生株感染個体は、死後 24 時間以内に色がメラニゼーションによって褐色、黒色と変化し、体内が液状化し、皮膚組織に張りもなくなる (Fig. 19)。しかし、*fp* 変異株感染個体の溶解の程度は野生株と比較して著しく小さく、その程度は変異株間において

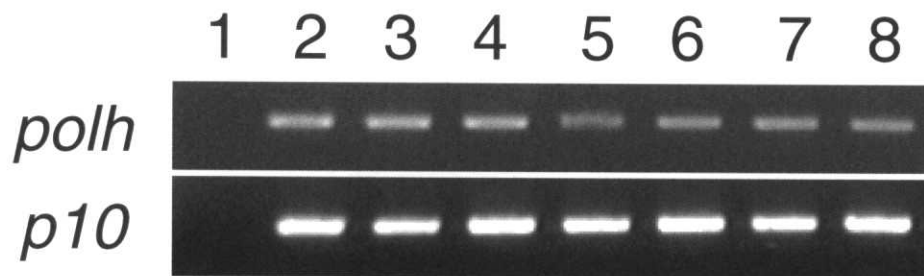
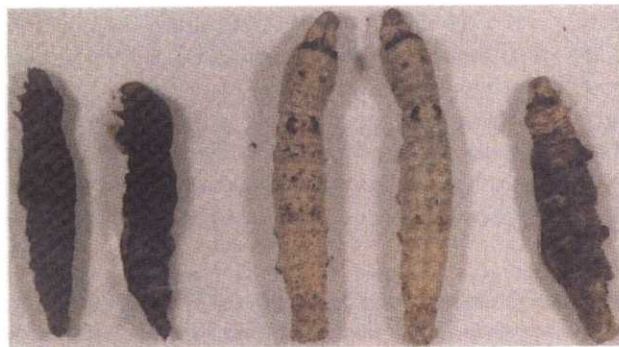


Figure 18. 野生株、および変異株感染細胞におけるポリヘドリンの発現
 RT-PCRによって、変異株における*polh*の転写量を定量した。同時に、
 コントロールとして、同じvery late geneである*p10*の転写量を定量した。
 lane 1, negative control (逆転写なし)、lane 2, 野生株、lane 3, #15株、
 lane 4, #16株、lane 5, Bm25KD、lane 6, #115株、lane 7, #119株、lane 8, #162株



#15 #16 #115 #119 #162



Wt PolhD 25KD CPD 25KD/CPD



#15R #115R #119R #162R

Figure 19. fp変異株感染カイコにおける死後の溶解阻害.

野生株、および変異株を5齢1日目に経皮接種し、感染8日後（死後約42時間）それぞれのウイルスに感染して死亡した個体の様子を写真撮影した。Wt, 野生株、PolhD, *polh*欠損株、25KD, Bm25KD、CPD, システインプロテアーゼ欠損株、R, *fp*以外は野生株の遺伝子構造をもつ組換えウイルス。

も差異が認められた (Fig. 19)。Bm25KD 感染個体のメラニゼーション、および溶解の程度は最も少なく、外観では生存個体とは区別ができない程であった (Fig. 19)。感染個体の溶解阻害の程度は、産生多角体数の減少の程度、および *fp* の機能欠失の程度と相関していた。すなわち、以下の順で感染個体の溶解阻害の程度が大きかった ([]内はコードする *fp* 産物の特徴を示す)。(1) Bm25KD [91 アミノ酸] (2) #115 株、#119 株、#162 株 [104 アミノ酸 (#115 株、#119 株)、144 アミノ酸 (#162 株)] (3) #15 株、#16 株 [214 アミノ酸、1 アミノ酸置換] (4) K 株、T3 株 [214 アミノ酸、野生株]。また、変異型 *fp* をもつ組換えウイルス (#15R 株、#115R 株、#119R 株、#162R 株; *fp* 以外は野生型の遺伝子を持つ) も元の変異株と同様の溶解阻害を示したことから、感染個体の溶解阻害には *fp* のみが関与していることが示された。

感染個体の溶解が多角体産生量と直接関係しているか調べるために、*polh* 欠損ウイルスである BmPolhD3 を同様に感染させ、感染個体の溶解程度を検定した。その結果、感染個体の死亡後の体色変化 (メラニゼーション) および溶解の程度は野生株感染時と差異が認められなかった (Fig. 19)。この結果から、死後の感染個体の溶解は、多角体の産生量とは直接関係が無い事が明らかになった。

4. 考察

本研究で解析した変異株は当初、多角体形態、およびエンベロープ形成異常株として単離されたものである。その後、詳細な観察により、5株のうち3株は野生株と比較して著しく多角体形成数が少ないことが判明した。このような、多岐にわたる変異の原因遺伝子を同定するため、*polh*、経口感染に関与していることが示唆されていた *odv-e66*、および多角体形成数に関与していることが示唆されていた *fp* の3遺伝子について解析を行った。*polh* に変異をもつ株は#16株1つであったが、この変異が形態変異の原因ではないことが、組換えウイルスの作成により明らかになった。次に *odv-e66* に変異があるか調査したところ、すべての変異株に共通な挿入配列が存在した。しかし、組換えウイルスの作出により、この変異は、変異株が示す形態異常の原因ではないことがあきらかになった。この挿入配列は直ぐ近傍の配列とほぼ同じ配列であり、duplication によって起こった変異であることが考えられた。この *odv-e66* における挿入配列は、変異剤投与によりウイルス複製中に短期間で duplication が起こったというよりも、むしろ変異株の元株である K 株に挿入配列をもった株が混入しており（十分にクローン化されていなかった）、それが親株となって変異株が誕生したと考えた方が良いと思われる。その根拠として、埼玉県より採取した野外 BmNPV 株にもこの挿入配列をもつ株が存在したことがあげられる (Fig. 14; 野生株として

用いた K 株も埼玉県より採取した株からクローン化したものである)。本研究第 2 章における実験過程で、多角体の下流に位置する *orf1629* において K 株と T3 株にプロリン残基の挿入など、3 塩基単位の挿入をいくつか同定している (Katsuma *et al.*, unpublished data)。また、*p10* においては BmNPV の株間において翻訳領域の長さが異なることも報告されており、BmNPV には広く遺伝子多型が存在していると考えられる (Hu *et al.*, 1994; Hong *et al.*, 2000)。BmNPV の宿主であるカイコの生態から考えると、BmNPV は他の NPV と比較して、地域隔離が起こりやすいと考えられ、地域で特異的な多型性が生まれると考えられる。以上、解析した *polh*, *odv-e66* には変異が存在したものの、それは形態変異の原因ではないことが判明した。しかしながら、3 つ目の候補遺伝子であった多角体形成数に関与する遺伝子 *fp* に変異が存在し、それが形態変異の原因であることが明らかになった。

AcNPV (Harrison and Summers, 1995)、*Galleria mellonella* NPV (GmNPV) (Wang *et al.*, 1989)、および LdNPV (Bischoff and Slavicek, 1996) の培養細胞における連続無希釈継代は、高頻度に多角体形成数の少ない FP 変異株を産生することが知られている。AcNPV をはじめとするバキュロウイルスの FP 変異株は、すべて *fp* 領域に挿入、または欠失が起こっていることが報告されている。本研究で解析した BmNPV 変異株 5 株もすべて *fp* 領域に変異を持っており、その変異のみが変異形質の原因となってい

ることが明らかになった。これらの結果から、報告されている AcNPV の研究と同様、BmNPV において *fp* が多角体形成数や ODV 形成不全などの多様な変異を引き起こす原因遺伝子であることが判明した。

BmNPV 変異株のうち、#15 株、および#16 株の *fp* は同一のアミノ酸配列であった。#115 株、および#119 株の *fp* も同一のアミノ酸配列をもっていた (Fig. 17)。しかしながら、どの変異株も、塩基配列という点では同一ではなかった (Fig. 16)。以上のことから、これらの変異株には中間体として同じ塩基置換をもつ変異株が存在し、このウイルスからさらに派生して誕生したウイルスであると考えられる。#162 株の *fp* には、塩基置換のみではなくアデニン (A) の 1 塩基挿入が生じており、これによって *fp* の途中で終止コドンが形成されていた (Fig. 17)。LdNPV においては、DNA の複製中のエラーによってこのような変異が起き、FP 変異株を形成することが報告されている。本研究で解析した#162 株における 1 塩基挿入も、このようなメカニズムで生じた可能性が高い。

#15 株、および#16 株の *fp* で認められるセリンからフェニルアラニンへの 1 アミノ酸置換が、程度は低いものの FP 形質を示すことは、*fp* が機能的に重要な遺伝子であることを示唆している。また、Fig. 15 から分かるように、この 85 番目のセリンはバキュロウイルス間で保存されている残基であり、*fp* の機能に重要な役割を果たしていると考えられる。このアミノ酸置換は、*polh* の発現に大きく影響せず、多角体形成数に関しても野生株と比較して著しい減

少をもたらす変異ではない (Table 2, Fig. 18)。しかしながら、野口、Zhou 両博士による電子顕微鏡観察によると、ODV エンベロープの形成不全は短い *fp* 産物を合成する変異株と同程度であることから、*fp* の機能異常は多角体形成よりも ODV 形成の方により大きく影響していると考えられる。AcNPV において報告されている FP 変異株の *fp* は、欠失や挿入により本来よりも短い *fp* 産物が合成されたり、プロモーター領域の変異によって *fp* の発現量が減少する事で形態変異が引き起こされているが、完全に *fp* が欠失したウイルスは報告されていない。このことから、完全に *fp* の機能を欠失したウイルスは生存性が低い可能性が考えられる。また、完全に *fp* を破壊した組換えウイルスを作成することで、*fp* のさらなる機能が見いだせると考えられる。

FP 形質、すなわち多角体形成数の減少は、*fp* の機能欠損による *polh* の発現量低下に起因すると報告されていることから (Harrison and Summers, 1996)、*fp* はバキュロウイルスの very late gene の発現に直接関与する *vlf* (very late factor) の一つである可能性が考えられる (McLachlin and Miller, 1994; Todd *et al.*, 1996)。しかしながら、*fp* は Miller らのグループが構築した一過性発現によるアッセイ系では *vlf* として同定されていない (McLachlin and Miller, 1994; Todd *et al.*, 1996)。また、*fp* はもう一つの very late gene である *p10* の発現には影響しないことも報告されている (Harrison and Summers, 1996)。これらのことは、本研究で解析

した BmNPV *fp* 変異株においても確認することができた (Fig. 18)。以上のことから、*fp* は very late gene 共通のプロモーターのみにはたっていないのではなく、*polh* の制御に関与する他のメカニズムをもつと考えられる。AcNPV において現在までに同定されている *vlf* は *vlf-1* だけである (McLachlin and Miller, 1994)。BmNPV において *vlf-1* の欠損株の作成が試みられているが、成功していないことから (Gomi *et al.*, 1997)、この遺伝子はウイルスの増殖に必須の遺伝子であり、感染後期だけでなく感染初期にも機能していることが考えられる。*fp* も同じように、感染の色々なステージで機能して、様々な遺伝子の発現に影響しているのかもしれない。

fp の機能欠損は、感染培養細胞、および感染個体において、多角体形成数の現象だけではなく、さらに複雑な現象を引き起こすことが明らかになった。本研究では新たに *fp* が宿主の死後溶解に関わっているという驚くべき結果が得られた。このような現象は、システインプロテアーゼ遺伝子 (*v-cath*) 欠損ウイルス (BmCysPD, Ohkawa *et al.*, 1994)、またはキチナーゼ (*chitinase*) 欠損ウイルス (Hawtin *et al.*, 1997) 感染個体で起きる事が報告されているため、Bm25KD (*fp* 欠損) と BmCysPD (*v-cath* 欠損) の比較実験、および相補性実験を行った。カイコ 5 齢幼虫に BmCysPD を継皮接種したところ、既報通り死後の溶解が起こらなかった (Fig. 19; Ohkawa *et al.*, 1994)。しかしながら、詳細な観察の結果、これら 2 種の欠損ウイルスの溶解阻害にはわずかな違いが認められた。

BmCysPD に感染し死亡した個体の皮膚は、Bm25KD 感染個体の皮膚よりも、より透明感があった (Fig. 19)。このことは、ウイルス感染した表皮細胞の溶解や剥離の程度に差があるためであると考えられる。また、BmCysPD と Bm25KD を共感染させたところ、野生株感染時と同様な典型的な死後溶解を示したことから、共感染により感染個体内でそれぞれの遺伝子が相補されうることが明らかになった (Fig. 19)。AcNPV では、*v-cath* と *chitinase* がウイルス感染昆虫の溶解に関わっていることが示されている (Hawtin *et al.*, 1997)。*v-cath*、および *chitinase* 欠損ウイルス感染個体は、ともに死後数日間、溶解することなくインタクトな状態を保つ。本研究によって、*fp* を感染宿主の死後溶解に関与する新たな遺伝子として同定することができた。*fp* は、*polh* の発現だけでなく、*v-cath* や *chitinase* の発現も制御することによって、宿主の死後溶解を調節しているのかもしれない。

Zhou 博士による *fp* 変異株感染個体脂肪体における電子顕微鏡観察の結果は、野口博士による観察結果とほぼ一致した。すなわち、*fp* 変異株感染細胞においては、形態が正常でない少数の多角体が形成され、その中にはほとんど ODV は含まれていなかった (Fig. 20B)。また、ODV のエンベロープもほとんどが異常な形態を呈していた。新しい知見としては、変異株感染細胞の基底膜が感染後期になっても、野生株感染細胞のように分解されずインタクトな状態で残っていることであった (Fig. 20C)。この事実は上記の *fp* 変異

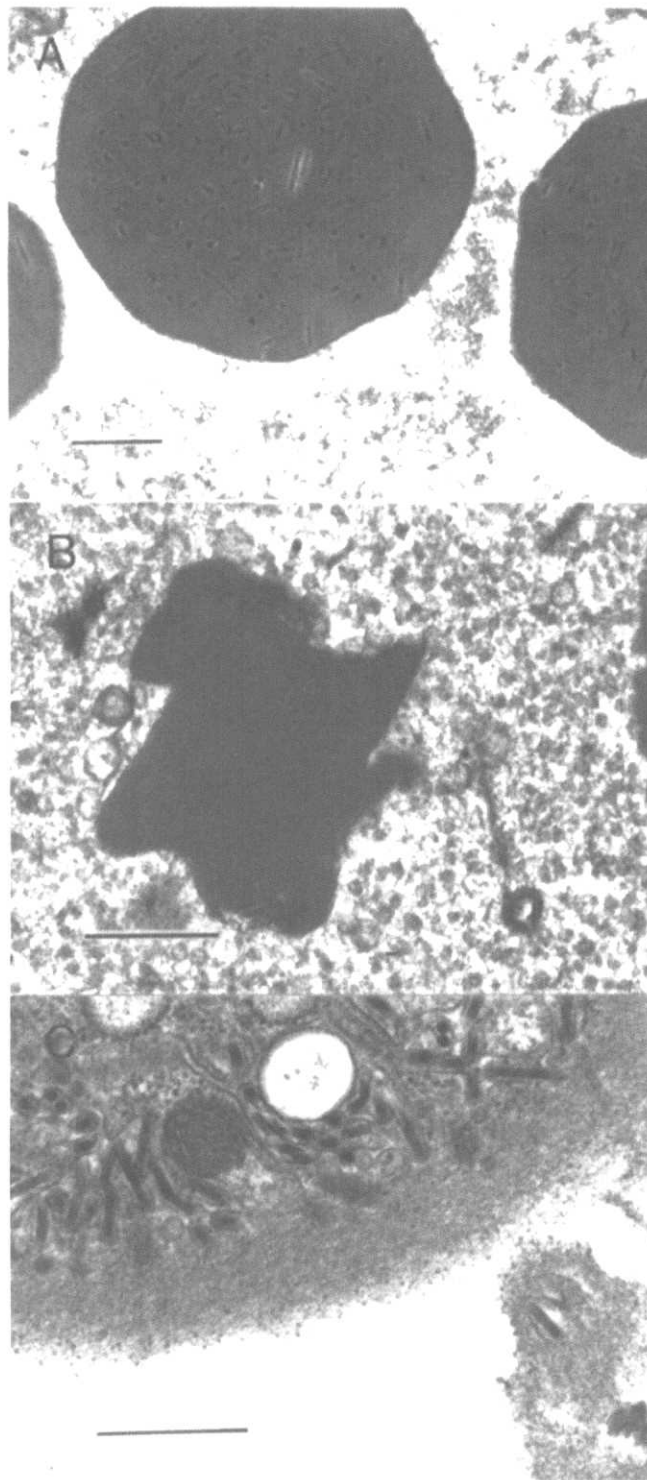


Figure 20. 野生株、および変異株感染カイコ脂肪体の電子顕微鏡観察。野生株の産生する多角体はODVを包埋しているのに対して (A)、変異株 (#115株) が形成する多角体は形態が異常であり、ODVがほとんど包埋されていないことが分かる (B)。また、変異株感染細胞においては基底膜がインタクトな状態で残っており、破壊されていないことが観察される (C)。これらの電子顕微鏡観察はZhou博士によるものである。scale bars = 500 nm.

株感染個体の溶解阻害という現象を説明しうる観察結果であると言える。すなわち、変異型 *fp* を持つウイルスは感染した際に細胞の基底膜などの細胞内構造を破壊することができず、その結果、感染個体の溶解を引き起こすことができないと考えられる。

本章では、BmNPV 変異株を用いて *fp* が様々な形態変異の原因となっていることを明らかにした。多角体数の減少、ODV エンベロープの形成不全、宿主の死後溶解の阻害といった本研究で見出された *fp* の異常が引き起こす現象は、すべてウイルスの水平伝播に関わる現象である。AcNPV における *fp* の機能解析は、ほとんどが培養細胞を用いた *in vitro* の系で行われてきたが、本研究の結果から考えると、昆虫個体を用いた *in vivo* の実験が *fp* の機能をより深く理解するのに必要であると考えられる。

総合考察

NPV の感染サイクルにおける特徴は、感染末期に多角体とよばれる構造体を大量に感染細胞核内に形成することと、BV、および ODV とよばれるそれぞれの感染経路に特化した 2 種類のウイルス粒子を形成することである。本研究では、突然変異誘起剤を用いて BmNPV の多角体、および ODV 形態変異株を作出し、その形態の詳細な解析と変異の原因となっている遺伝子領域を同定することで、多角体とそれに包埋される ODV の形成機構について解析を行った。本研究の結果をまとめたものを Fig. 21 に示し、以下に概説する。

ポリヘドリンは NPV が感染後期に合成する最終産物であり、それが ODV を包埋しながら結晶化したものが多角体である。ポリヘドリンの合成は、ウイルスが宿主細胞内に侵入、感染した後、初期遺伝子、後期遺伝子を次々に発現し、ウイルスが細胞を完全に支配した状態でのみ行うことができる。多角体は、ウイルスの 1 次感染に必須であるため、その大きさや数はウイルスの生存に密接に関わってくる。多角体が大きすぎると、死亡個体から放出された多角体が物理的に遠くまで飛散することができないため、ウイルスの伝播には不適當であり、また、多角体が小さすぎると、中に包埋できる ODV の量が制限され、ウイルス感染の効率が落ちてしまう。すなわち、NPV が通常の条件で形成する多角体の形態は、これらの条件を満たしているものであると考えられる。多角体は通常正 20 面体構造

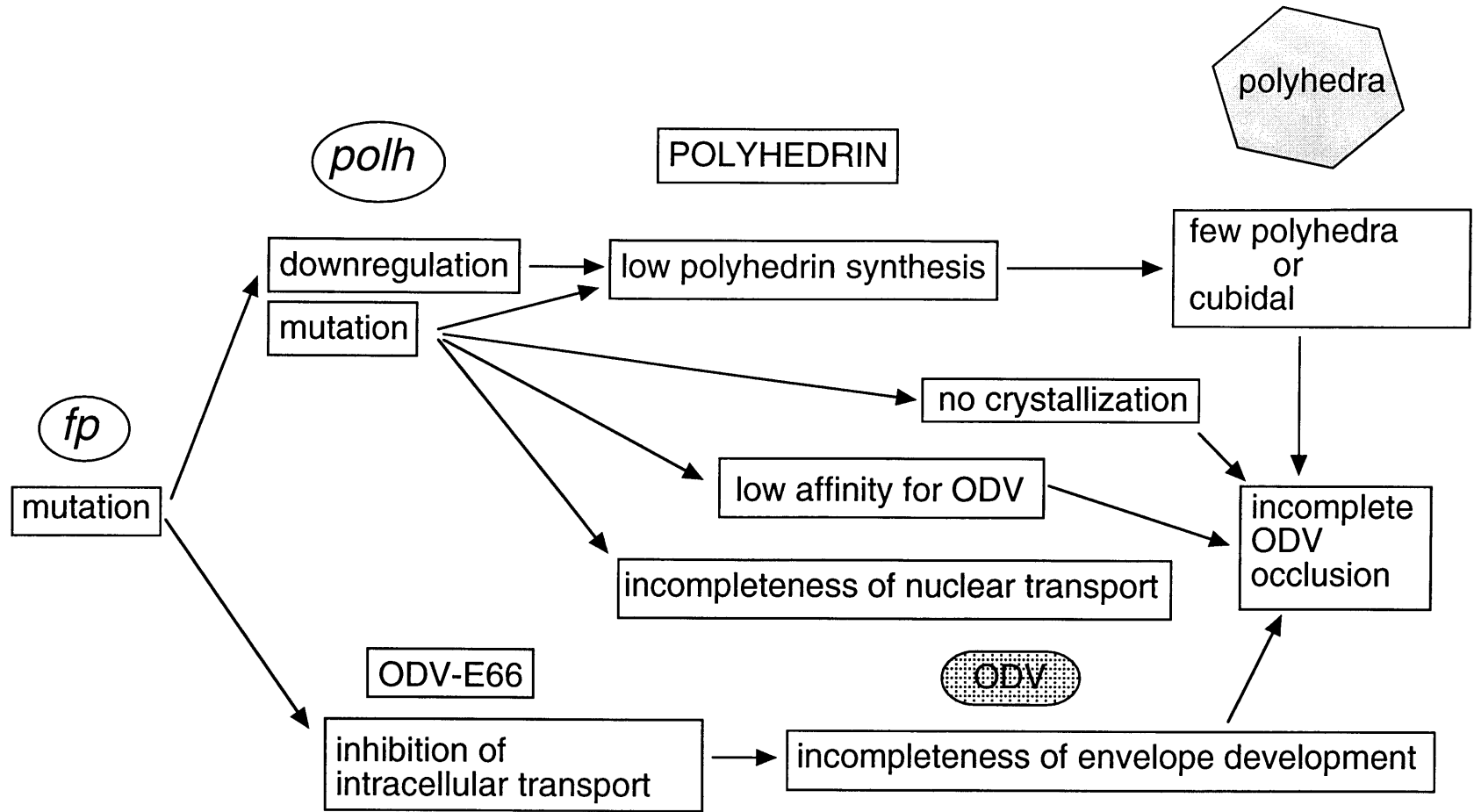


Figure 21. 多角体の形成数、およびODV包埋機構に関する因子の連関図

をとる。本研究第 1 章で解析した#211 株、および#220 株はそれぞれ不定形、および正 6 面体状の多角体を形成したが、その大きさは野生株のものと著しく異なっていた (Fig. 1, 2)。これらの変異株のポリヘドリンにはアミノ酸置換が存在し、組換えウイルスの作成によって、それらの置換が形態変異の原因となっていることが判明した。これらの結果から、多角体の大きさ、および形はポリヘドリンのアミノ酸配列によって規定されていると考えられる。バキュロウイルスのもう 1 つのサブグループである GV は、NPV が産生する多角体よりもかなり小さい顆粒体とよばれる包埋体を形成する。顆粒体はグラニュリンとよばれるタンパク質を主成分としているが、その 1 次配列はポリヘドリンと相同性が高い (Rohrmann, 1986; Zanotto *et al.*, 1993)。Maeda らのグループは、アミノ酸の 1 次配列が顆粒体の大きさを決定しているかどうか調べるために、NPV の *polh* のかわりにグラニュリン遺伝子を導入した NPV を作製し、どのような包埋体が形成されるかを調査した。その結果、この組換え NPV は核、および細胞質に正六面体状の多角体よりも巨大な包埋体を形成した (Zhou *et al.*, 1998)。この結果は、顆粒体の大きさがグラニュリン以外のウイルス、または宿主由来の因子によって制御されている可能性を示している。以上の結果をあわせると、バキュロウイルスの包埋体の大きさは、基本的にはアミノ酸配列の 1 次構造によって規定されるが、それ以外の因子の影響も受けて最終的に決定されるものであると考えられる。

多角体はウイルスの水平伝播の単位となっているが、その中に ODV が含まれなければ、感染は成立しない。そのため、多角体形成過程における ODV の包埋はウイルスの野外での伝播にとって非常に重要である。その際、ポリヘドリンと ODV の親和性が重要であると考えられる。本研究において解析した BmNPV 変異株のうち、多角体は結晶化するが、ODV の包埋が一部、あるいは完全に阻害されている株は 7 株存在した。このうち、5 株は *fp* の変異による ODV 形成不全、および *polh* の転写異常が原因であったが、他の 2 株はポリヘドリンにおけるアミノ酸置換が原因であった。#128 株は野生株とほぼ同様の大きさ、形を呈する多角体を形成するが、その中に ODV を全く含まない変異株である (Fig. 1, 2)。#128 株のポリヘドリンは、171 番目のロイシンがプロリンに置換しているが、組換えウイルスの作成により、この変異によって多角体内に ODV を包埋できないような結晶構造をとっていることが判明した。また、#220 株は正六面体状の多角体を形成する株であるが、この株もポリヘドリン内に存在するアミノ酸置換によって形態変異がおこっている。この株の多角体には通常の 1/4 程度の ODV しか包埋できないことが明らかになっている (Fig. 1, 2)。これらの結果から、ポリヘドリンの 1 次配列は、多角体の形や大きさだけでなく、ODV の包埋にも強く関与していると考えられる。また、ODV を全く包埋しない 128 株の多角体が結晶構造を持つことから、ODV の包埋と結晶化とは直接関係がないことが判明した。多角体に結晶構造を持つ #128 株が

ODV を包埋しない一方で、ポリヘドリンが結晶構造を持たない#136株のポリヘドリンが ODV と親和性を保持していることが電子顕微鏡観察により明らかになっている (Fig. 2C, D; Katsuma *et al.*, 1999b)。以上の結果から、ポリヘドリンの結晶化と、ODV とポリヘドリンの相互作用には直接関係がないこと、すなわちポリヘドリンの結晶化が ODV を結晶核として行われていないことが判明した。

核と細胞質間の物質輸送は核膜に存在する穴である核膜孔を介して行われている。この穴はどんな物質でも通過させるわけではない。これまでの研究で、核膜孔は直径 9 nm (球状タンパク質の場合、約 40-60 kDa) 以下の物質を単純拡散で通過させるが、それより大きな物質は通さないことが分かっている。ところが、核膜孔ははるかに大きな分子でも通過させることから、細胞には巨大分子を能動的、および選択的に輸送する機構が備わっていることが分かる。この能動的、および選択的核膜孔通過には、輸送シグナルと輸送装置が必要である (Gorlich and Mattaj, 1996; Nigg, 1997)。最も早く発見された輸送シグナルは、細胞質から核への輸送 (核移行) をつかさどる核移行シグナル (NLS) である。この NLS は、核膜孔より小さな大きさのタンパク質にも存在することが判明しており、タンパク質を選択的、および積極的に核輸送する機構の一つであると考えられる。もっとも研究されている NLS は、simian virus 40 (SV40) がもつ large tumor antigen (SVT) に存在するアミノ酸配列 PKKKRKV である (Kalderon *et al.*, 1984a; Kalderon *et al.*, 1984b;

Lanford and Butel, 1984)。この SVT のように、ほとんどの NLS は塩基性アミノ酸に富んだ短い配列である。近年、長らくの間謎であった NLS を認識し、輸送を担う NLS 受容体が見い出された。塩基性 NLS をもつタンパク質は、importin α/β とよばれるヘテロ 2 量体に認識され、ヘテロ 3 量体となり核膜孔に結合する。その後、GTPase である Ran や Ran 結合分子 NTF2 (nuclear transport factor 2) の存在下で温度、およびエネルギー依存的に核膜孔を通過する。Jarvis ら (Jarvis *et al.*, 1991) は、バキュロウイルスが感染後期に大量に発現し、その後すみやかに効率良く核に移行するポリヘドリンにも核移行シグナルがあると考え、その同定を試みた。通常では核へ移行しないタンパク質 (β -galactosidase、および β -glucuronidase) とポリヘドリン断片を連結した融合タンパク質を用いてポリヘドリンの細胞内局在を調査し、その結果、30-57 番目の配列が核移行に重要であることを見出した。また、彼らはこの領域に存在する KRKK という塩基性残基のクラスターを核移行シグナルとして同定した。実際、この配列に変異を導入すると細胞質に大きな六面体の結晶を形成したことから、この配列が核移行には必須であるが、結晶化には必要でないことが明らかになった。現在までに、多数のポリヘドリン、およびグラニュリンの 1 次構造が明らかになっているが、それらの NLS 近傍の配列をアライメントしたものを Fig. 22 に示す。NPV の NLS は 4 アミノ酸中 3 アミノ酸以上が塩基性残基であり、しかもそれが K (リジン) と R (アルギニン) から構成

	30		40
Bombyx mori NPV	NA	KRKK	HLIEH
Autographa californica NPV	NA	KRKK	HFAEH
Malacosoma neustria NPV	NA	KRKK	NAAEH
Helicoverpa armigera NPV	NA	KRKK	HLEEH
Archips cerasivoranus NPV	KS	KRKK	HLLEH
Buzura suppressaria NPV	NA	KRKK	HEIEH
Choristoneura fumiferana NPV	NA	KRKK	HLLEH
Ecotropis obliqua NPV	NA	KRKK	HQLEH
Heliothis armigera NPV	NA	KRKK	HLEEH
Antheraea pernyi NPV	KP	KRKK	HLVEH
Orgyia pseudotsugata NPV	NA	KRKK	HQIEH
Hyphantria cunea NPV	NA	KRKK	HLLEH
Perina nuda NPV	NA	KRKK	HLLEH
Heliothis zea NPV	NA	KRKK	HLEEH
Anticarsia gemmatalis NPV	NA	KRKK	HLLEH
Leucania separata NPV	NA	NRKK	HFIEH
Mamestra configurata NPV	NA	NRKK	HFIEH
Perina nuda NPV	NA	NRKK	HFIEH
Spodoptera litura NPV	NA	KRKH	DALER
Spodoptera littoralis NPV	NA	KRKH	DALER
Spodoptera frugiperda NPV	NA	KRKE	HLALH
Spodoptera exigua NPV	NA	KRKE	HLLQH
Lymantria dispar NPV	QA	KRQK	HLEQH
Porthetria dispar NPV	QA	KRQK	HLQEE
Wiseana signata NPV	NA	KRRK	HEEEQ
Mamestra brassicae NPV	NA	NRKR	HYIEH
Attacus ricini NPV	NA	KAKK	HLVEH
Agrotis segetum NPV	NA	KRKQ	HLIEH
Trichoplusia ni GV	DV	RHKE	ELIRE
Xestia c-nigrum GV	DV	RHKE	ELIRE
Cryptophlebia leucotreta GV	DV	RRKK	DRIRE
Cydia pomonella GV	DV	RRKK	DRIRE
Choristoneura fumiferana GV	DV	RHKK	DRIRE
Agrotis segetum GV	DV	RRKD	RRISE
Pieris brassicae GV	DV	KHKK	DRLRE

Figure 22. ポリヘドリン、およびグラニューリンのNLSのアライメント

される。GV については、同じように 4 アミノ酸中 3 アミノ酸以上が塩基性残基であるが、必ずしも K と R で構成されているわけではない。最近の報告によると、TnGV のグラニューリンは NPV の発現システムにおいて核、および細胞質に存在することが明らかになっている (Eason *et al.*, 1998, Zhou *et al.*, 1998)。このことは、TnGV の NLS は RHKE であるが、この 3 つの塩基性残基を含む配列が核移行に十分でないことを示している。また、NPV は核に多角体を形成しないと ODV を包埋できないため、ポリヘドリンが核移行することは必須の条件であるが、一方、GV の場合、感染後期の早い時期に核膜を破壊してしまうためグラニューリンの核移行が完全でなくとも GV の生存に不都合がないのかもしれない。今後、NLS に結合し、大量のポリヘドリンを核にすみやかに輸送する分子の同定を行うことで、ポリヘドリンの核移行についてさらに詳しい機構を解明できるものと思われる。

一方で、1992 年に Carstens らによって報告された AcNPV 変異株 M276 は、ポリヘドリンの NLS に変異をもたないにも関わらず、ポリヘドリンの核移行が一部阻害される株であった (Carstens *et al.*, 1992)。この変異株の *polh* には、C 末端に 229 塩基の宿主由来の配列が挿入されており、それが形態変異の原因となっていることが組換えウイルスの作成によって明らかになったが、彼らは核移行が一部阻害された原因を NLS がポリヘドリンの構造変化によって内側に埋め込まれた状態となり、機能しにくくなっているのであろうと考

察している。また、最近のポリヘドリン/グラニューリン融合タンパク質の細胞内局在解析から、ポリヘドリンの 84-245 番目のアミノ酸残基中に核移行に関与する部位が存在することを示唆したデータが得られている (Eason *et al.*, 1998)。これらの結果をあわせると、NLS はポリヘドリンの核移行には必須であるが、十分ではなく、他の領域、特に NLS より後半の領域に核移行に関与する新たな領域が存在することが考えられる。実際、本研究で解析した BmNPV 変異株のうち、一部でもポリヘドリンの核移行が阻害された株は 8 株存在し、そのどの株も NLS には変異をもたず、その変異は NLS より後半の領域、ポリヘドリンの 64-206 番目のアミノ酸残基におこっていた (Fig. 23)。解析したこれら 8 株のポリヘドリンの核移行の阻害の程度は多岐にわたっていたが、もっとも阻害の程度が大きかったのは #103 株、#110 株、および #153 株の 3 株であり、60%以上のポリヘドリンが細胞質に存在した (Fig. 8)。#103 株、#110 株、および #153 株に生じたアミノ酸置換は、ポリヘドリンの核移行に大きな影響を与える変異であると考えられるため、NLS に変異をもつウイルスとともに、ポリヘドリンの核移行機構の研究において有用なツールになると考えられる。また、興味深いことに、核移行が一部でも阻害された 8 株のうち、7 株のポリヘドリンはその結晶化も阻害されていた (Fig. 23)。このことは、核移行と結晶化に重要な役目を果たすアミノ酸残基が共通していることを示している。これらのアミノ酸はポリヘドリンの立体構造形成に非常に重要な役目

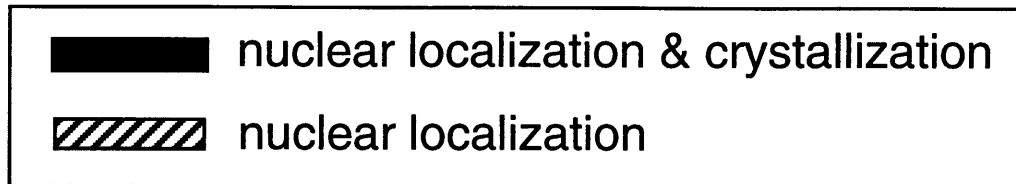
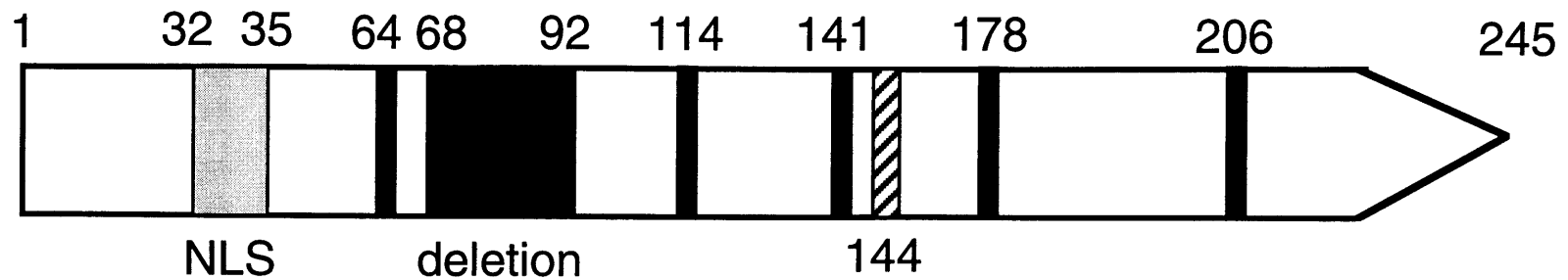


Figure 23. 核移行、および結晶化に関わるアミノ酸残基の分布

をはたしており、アミノ酸が置換することで立体構造が大きく変化する可能性が考えられる。その結果として、結晶構造をとれなくなるのと同時に、核移行に関与する因子との相互作用も阻害されているのかもしれない。しかしながら、Jarvis ら (Jarvis *et al.*, 1991) が報告した NLS に変異を導入した NPV は細胞質に結晶構造をもつ包埋体を形成したことから、核に局在することと結晶化は直接の関係はないと考えられる。

本研究で解析した変異株のうち、多角体形成数が減少していた株は、正 6 面体の多角体を形成する #220 株と *fp* に変異をもつ 5 株であった。#220 株は感染細胞核内に 1-10 個の多角体を形成するが、SDS-PAGE の結果、合成されているポリヘドリンは野生株と比較して著しく減少していた (Fig. 4A)。また、RT-PCR による解析の結果、*polh* 転写量には野生株との間にほとんど差異がないことが明らかになった (Fig. 4B)。一方、AcNPV に *Spodoptera frugiperda* NPV の *polh* を導入し発現させたところ、野生株の AcNPV と比較して 4 分の 1 程度しか合成されないことも報告されている (Gonzalez *et al.*, 1989)。以上のことは、ポリヘドリン内のアミノ酸置換がそれ自身の翻訳量に影響を与えていることを示している。バキュロウイルス発現系を用いて外来遺伝子産物を発現させた場合、ある種のタンパク質に関しては大腸菌など他の発現系の方が多量に活性のあるものができる場合がある。その際、バキュロウイルス発現系では外来遺伝子の転写には問題がなく、多量に mRNA は合成されていることが

示されている（前田，1993）。このように、バキュロウイルスにおける遺伝子の転写は、その1次構造にあまり依存しないで行われるが、タンパク質の翻訳に関してはアミノ酸の1次構造が極めて重要であると考えられる。

AcNPV においては、*fp* の機能欠損によって *polh* の転写量が減少することが示されている。このことが多角体形成数の減少の直接の原因である。また、その際、同じ very late gene である *p10* の転写量には影響がないことも示されている（Harrison and Summers, 1996）。本研究で解析した BmNPV 変異株においても *fp* は明らかに2つの very late gene のうち *polh* の転写を選択的に制御していることが分かった（Fig. 18）。最近、新たな *fp* のターゲットとして *odv-e66* が報告された（Braunagel *et al.*, 1999）。この報告によると、*fp* 変異株感染細胞では、*odv-e66* の転写は正常に行われるものの、その遺伝子産物である ODV-E66 の核移行の時間が遅延し、さらにその量が著しく減少する。この結果は、*fp* 変異株の ODV 形成異常の原因が、*fp* 変異による ODV-E66 の輸送異常に起因することを強く示唆している。また、それは *odv-e66* 欠損 BmNPV に経口感染応力がほとんどないことから裏付けられる（Ohkawa & Maeda, 1998）。

以上、AcNPV、および本研究の BmNPV における結果から、*fp* のターゲットとして *polh*、および *odv-e66* が同定された。*fp* の機能欠損は、感染培養細胞、および感染個体において、複雑な現象

を引き起こすため、*fp* には、さらなるターゲット分子が存在すると考えられる。本研究では新たに *fp* が宿主の死後溶解に関わっているという驚くべき結果が得られた。このような現象は、システインプロテアーゼ遺伝子 (*v-cath*) 欠損ウイルス (BmCysPD, Ohkawa *et al.*, 1994)、またはキチナーゼ (*chitinase*) 欠損ウイルス (Hawtin *et al.*, 1997) 感染個体で起きる事が報告されている。本研究により、*fp* を感染宿主の死後溶解に関与する第 3 の遺伝子として同定することができた。また、*fp* は、*polh* の発現だけでなく、*v-cath* や *chitinase* の発現も制御することによって、宿主の死後溶解を調節しているのかもしれない。

これまで、*fp* の機能解析は培養細胞における研究がほとんどであった。*fp* の欠損はこのような培養細胞における *in vitro* の系では、致死性ではなく、欠損ウイルスを作製することは比較的容易である。実際、AcNPV、GmNPV、および LdNPV の培養細胞における連続無希釈継代は、高頻度に多角体形成数の少ない FP 変異株を産生することが知られている (Kumar and Miller, 1987; Wang *et al.*, 1989; Bischoff and Slavicek, 1996)。AcNPV をはじめとするバキュロウイルスの FP 変異株の多くは、*fp* 領域に宿主ゲノム由来のトランスポゾンが挿入されており、この領域が宿主配列の挿入のホットスポットとなっていることも示されている (Cary *et al.*, 1989; Wang *et al.*, 1989; Wang and Fraser, 1993)。このことは、宿主側の攻撃標的として *fp* が格好の遺伝子であることを示している。本研

究における BmNPV 変異株の解析の結果、*fp* はウイルスの 1 次感染に必須の遺伝子であることが明らかになった。すなわち、*fp* の欠損は、多角体数の減少、ODV の形成不全、およびそれに伴う ODV の多角体への包埋阻害、宿主個体の死後溶解の阻害など *in vitro* ではウイルスの増殖になんら影響を与えないが、NPV の野外での生存には必須の機能に異常をもたらす。宿主がトランスポゾンによって *fp* の機能を欠損させることは、宿主によるウイルスに対する一種の防御機構であると考えられ、宿主側が *fp* をウイルスがもつ最も重要な key molecule であると認識している証拠であると言える。NPV においては、遺伝子欠損株の作成により様々な遺伝子の機能が解析されているが (Gomi, 1999)、*in vitro* での機能欠損が可能である、すなわちウイルスの複製に関与しない遺伝子で、*fp* のようにウイルス感染が引き起こす様々な現象に関わる多機能分子は他には見い出されていない。特に、ポリヘドリンと ODV エンペロープタンパク質以外に、1 次感染に重要な働きをしている分子は報告されていない。*fp* の機能をさらに解析することで、バキュロウイルスの宿主昆虫への 1 次感染に関する新たな機構を明らかにできるかも知れない。

以上、本研究は BmNPV 変異株を用いて、多角体の形成、および多角体への ODV の包埋機構について解明を試みたものである。バキュロウイルス、特に NPV においては、ゲノム構造の解明がほぼ終了し、遺伝子機能の解析に焦点が移行しつつある。本研究で用いた BmNPV においては、網羅的な遺伝子欠損株の作成が行わ

れており、136 の推定遺伝子のうち約半数が *in vitro* での欠損が可能であることが判明している (Gomi, 1999)。欠損できない遺伝子のほとんどは、ウイルスの複製や 2 次感染に関与するものであると考えられる。一方、バキュロウイルスの最大の特徴である包埋体形成とそれに包埋されている ODV を用いた個体から個体への 1 次感染に関わる遺伝子は、*in vitro* での欠損が通常可能であると考えられる。これらの遺伝子はバキュロウイルス特有の機能をもっていると考えられ、これらの遺伝子欠損株の昆虫個体での表現系を調査することで、さらに深くバキュロウイルスの感染戦略を解明することができるものと思われる。包埋体を形成するためには、感染細胞核内で大量に包埋体タンパク質を合成しなければならず、多大なエネルギーを要し、一見無駄のように見える。しかし、自然界で長い年月をかけて淘汰されてきたことを考えると、包埋体形成はバキュロウイルスにとって最も適した生存戦略であり、この仕組みを分子レベルで解析することはバキュロウイルスの本質的機能の解明に繋がるものと思われる。

摘要

バキュロウイルスは、節足動物のみを宿主とするウイルスであり、大きさ 90-180 kbp の環状 2 本鎖 DNA をゲノムとしている。その中には、130-150 の遺伝子が含まれていると考えられている。バキュロウイルスには、核多角体病ウイルス (nucleopolyhedrovirus: NPV) と顆粒病ウイルス (granulovirus: GV) という 2 つのサブグループがあり、ともに感染末期になると多角体、あるいは顆粒体と呼ばれる包埋体を形成する。多角体は多数のウイルス粒子を極めて安定な状態で包埋し、ウイルスの水平伝播の単位となっている。この包埋体は、主に分子量約 31,000 のポリヘドリンと呼ばれるタンパク質の 12 量体が立方格子状に配列し、結晶化したものである。ポリヘドリンをコードする遺伝子 (*polh*) はウイルスゲノム上に存在し、その一次構造は多くの NPV において既に決定されている。バキュロウイルスの 1 つ *Autographa californica* NPV (AcNPV) においては、数種の多角体形態変異株が単離されており、その解析が報告されている。また、遺伝子工学的手法により、核移行シグナルと思われる配列の同定もなされている。しかし、ポリヘドリンは古くより研究されてきたにもかかわらず、その高次構造はもとより、結晶化機構、細胞内局在機構、ウイルス粒子包埋機構、発現調節機構など不明な点がほとんどである。

本研究は、突然変異誘起剤投与により作出したバキュロウイルス

多角体形態変異株を用いて、多角体の形態、形成数、結晶化、細胞内局在、並びにウイルス粒子包埋機構について、それらに關与する遺伝子領域の同定を試みたものである。

1. 多角体形態変異株の分子生物学的解析

多角体の形態変異株 6 株を単離し、分子生物学的解析を行った。単離した変異株 6 株の内訳は、多角体の結晶化が阻害された 2 株、多角体が不定形である 1 株、多角体が正 6 面体状を呈する変異株 1 株、多角体内に包埋型ウイルス (ODV) を全く包埋しない変異株 1 株、および多角体非形成変異株 1 株であった。解析した変異株すべての *polh* に塩基置換が認められ、そのうち多角体を形成した 5 株の変異は翻訳領域に、多角体非形成の 1 株の変異はプロモーター領域におこっていた。変異株の *polh* を導入した組換えウイルスを作出した結果、すべての株の形態変異は、*polh* における変異のみが原因であることが明らかになった。翻訳領域における塩基置換はすべてアミノ酸置換を伴うものであったことより、多角体の形態形成がポリヘドリンの 1 次構造に大きく依存することが判明した。正 6 面体状の多角体を形成する変異株は、多角体形成数が少なく、多角体内に通常の 1/3 程度しか ODV を含んでいなかった。この変異株のポリヘドリンには 58 番目と 222 番目の 2 箇所アミノ酸置換が起きていた。多角体内に ODV を全く包埋しない変異株は、野生株が形成する多

角体と形態、大きさ、形成数において顕著な差異は認められなかったが、この株ではポリヘドリンの 171 番目のロイシンがプロリンに置換することによって、多角体内に ODV を全く包埋しなくなっていることが判明した。一方、多角体の結晶化が阻害されている変異株 2 株のうち、ポリヘドリンの 141 番目のロイシンがフェニルアラニンに置換したものはポリヘドリンと ODV の親和性を保持していたが、178 番目のシステインがチロシンに置換したものでは親和性が認められなかった。これらの結果から、ポリヘドリンの結晶化は、ODV との相互作用と直接関係せず、多角体の結晶化が ODV を結晶核としなくても正常に行われることが示唆された。また、多角体非形成株を解析した結果、この株においては、*polh* プロモーターのコア領域の 1 塩基のみが置換することで、*polh* の転写がほぼ完全に阻害されていることが明らかになった。

2. ポリヘドリンの細胞内局在機構の解析

ポリヘドリンの核移行が不完全な変異株 5 株を解析することでポリヘドリンの核移行に関与する新たな領域を同定することを試みた。まず、ウイルス感染細胞のタンパク質を生化学的に分画することで、野生株感染細胞ではポリヘドリンがほぼ 100%核内に存在するが、変異株感染細胞では 10-60%ものポリヘドリンが細胞質に存在し、核に移行していないことを明らかにした。マーカーレスキュー法に

よって変異領域を特定したところ、*polh* 領域に変異が存在することが判明した。塩基配列の決定により、これらの変異はポリヘドリンの核移行配列 (NLS) として同定されている配列以外の場所で起こっていた。これらの変異は主にポリヘドリンの C 末端側に存在し、C 末端領域がポリヘドリンの核移行に重要であるという初めての知見を得ることができた。また、既知の NLS は、ポリヘドリンの核移行に必要なが十分でないことが明らかになった。一方、これらの変異株が産生するポリヘドリンには結晶構造が認められないことから、ポリヘドリンの核移行に必須のアミノ酸残基と結晶化に必須なアミノ酸残基が共通していることが判明した。

3. 多角体形成数、およびエンベロープ形成に関与するウイルス遺伝子の機能解析

ODV 形成不全株 5 株の遺伝子解析を行い、多角体形成数の減少に関与することが知られている *fp* に変異を見出した。また、BmNPV *fp* をクローニング、構造解析を行い、*fp* 欠損株 (Bm25KD) を作成した。Bm25KD を用いた組換えウイルスの作成の結果、変異株に認められた *fp* の変異が ODV 形成不全をはじめとするすべての形態異常の原因であることが判明した。*fp* の *in vivo* での機能を調べるために、これらのウイルスを昆虫個体に経皮感染させたところ、変異株に感染した個体は野生株に感染したものとは異なり、死亡後の虫体溶解が起こらず、その阻害の程度は多角体の形成数が少ない変異株

ほど大きかった。死後溶解の程度と多角体の産生量との関係を調べるために *fp* がインタクトで、*polh* を欠損させたウイルスを感染させたところ、野生株の感染時と同程度、死後溶解が起こった。この結果から、感染個体の溶解阻害は多角体の産生と直接関係しているのではなく、*fp* 産物の機能欠損によるものであることが明らかになった。感染個体の溶解にはウイルスがコードするシステインプロテアーゼ (*v-cath*) が関与していることが知られているため、*fp* が *v-cath* の発現に関与している可能性が示唆された。また、変異体の多角体を用いた経口感染実験の結果、*fp* はウイルスの経口感染に必須の遺伝子であり、ウイルスの水平伝播には必要不可欠な遺伝子であることが判明した。

以上、要するに本研究は、BmNPV 変異株 16 株を解析し、多角体の大きさ、形成数、結晶化などの形態、ポリヘドリンの核移行、および ODV の多角体への包埋機構に関与する遺伝子領域を同定し、バキュロウイルスがもつ包埋体を介したウイルス伝播機構の一端を明らかにしたものである。

謝辞

本研究を遂行するにあたり東京大学大学院農学生命科学研究科昆虫遺伝研究室小林正彦教授、嶋田透助教授、同大学新領域創成科学研究科資源生物創成学研究室永田昌男教授、および元理化学研究所分子昆虫学研究室主任研究員前田進博士から丁寧な御教示と細やかな御心遣いをいただきました。心より御礼申し上げます。

本研究は東京大学農学部、および理化学研究所分子昆虫学研究室にて行われました。私が本研究の材料となっているバキュロウイルスを研究テーマに選んだのは、前田進博士との出会いがきっかけでした。バキュロウイルスの分子生物学的研究を進める上での実験系がほとんどなかった東京大学において、その系を立ち上げることができたのは博士の御指導のおかげです。また、研究テーマとして変異株の解析を進めて下さったのも博士でした。理化学研究所での1年間の国内留学の際、同じ研究室で博士の直接の指導を受けたことは、現在の私の研究生活において大きな財産となっております。博士は志半ばにして急逝されましたが、博士の偉大な業績の一部として、本研究成果が博士への感謝の意となれば幸いです。

埼玉農業試験場野口洋子博士には、本研究を始めるきっかけとなった変異株を提供していただき、また、電子顕微鏡観察等の実験においても数々のご協力をいただきました。ここに深く感謝いたします。また、常日頃から暖かい励ましや助言をいただいた東京大

学昆虫遺伝研究室（現東レ株式会社）岩永将司博士、並びに理化学研究所分子昆虫学研究室今井典子博士に厚く御礼申し上げます。ここには記載できませんが、私が東京大学、および理化学研究所在籍中お世話になりました両研究室の皆様、ならびに Zhou 博士をはじめとする共同研究先であるカリフォルニア大学デービス校前田研究室の皆様に御礼申し上げます。

最後になりましたが、本論文の作成に対して暖かい理解と応援をしていただいた両親、並びに妻子に深く感謝いたします。

参考文献

1. Ayres M. D., Howard S. C., Kuzio J., Lopez-Ferber M. and Possee R. D. The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 202, 586-605, 1994.
2. Ahrens C. H., Russell R. L., Funk C. J., Evans J. T., Harwood S. H. and Rohrmann G. F. The sequence of the *Orgyia pseudotsugata* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus genome. *Virology* 229, 381-399, 1997.
3. Beames B. and Summers M. D. Location and nucleotide sequence of the 25K protein missing from baculovirus few polyhedra (FP) mutants. *Virology* 168, 344-353, 1989.
4. Bischoff D. S. and Slavicek J. M. Characterization of the *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus 25K FP gene. *J Gen Virol* 77, 1913-1923, 1996.
5. Bischoff D. S. and Slavicek J. M. Phenotypic and genetic analysis of *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus few polyhedra mutants: mutations in the 25K FP gene may be caused by DNA replication errors. *J Virol* 71, 1097-1106, 1997.
6. Blissard G. W. and Wenz J. R. Baculovirus gp64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion. *J Virol* 66, 6829-6835, 1992.

7. Braunagel S. C., Elton D. M., Ma H. and Summers M. D. Identification and analysis of an *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus structural protein of the occlusion-derived virus envelope: ODV-E56. *Virology* 217, 97-110, 1996a.
8. Braunagel S. C., He H., Ramamurthy P. and Summers M. D. Transcription, translation, and cellular localization of three *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus structural proteins: ODV-E18, ODV-E35, and ODV-EC27. *Virology* 222, 100-114, 1996b.
9. Braunagel S. C., Burks J. K., Rosas-Acosta G., Harrison R. L., Ma H. and Summers M. D. Mutations within the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus FP25K gene decrease the accumulation of ODV-E66 and alter its intranuclear transport. *J Virol* 73, 8559-8570, 1999.
10. Brown N., Faulkner P. and Chung K.L. Characterization of two morphology mutants of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus with large cuboidal inclusion bodies. *J Gen Virol* 50, 309-316, 1980.
11. Carstens E. B., Krebs A. and Gallerneault C. E. Identification of an amino acid essential to the normal assembly of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus polyhedra. *J Virol* 158, 684-688, 1986.
12. Carstens, E.B., Lin-bai, Y., and Faulkner, P. A point mutation in the polyhedrin gene of a baculovirus, *Autographa californica* MNPV, prevents crystallization of occlusion bodies. *Virology* 68, 901-905,

1987.

13. Carstens, E.B., Williams, G.V., Faulkner, P., and Partington, S. Analysis of polyhedra morphology mutants of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: molecular and ultrastructural features. *J Gen Virol* 73, 1471-1479, 1992.
14. Cary L. C., Goebel M., Corsaro B. G., Wang H. G., Rosen E. and Fraser M. J. Transposon mutagenesis of baculoviruses: analysis of *Trichoplusia ni* transposon IFP2 insertions within the FP-locus of nuclear polyhedrosis viruses. *Virology* 172, 156-169, 1989.
15. Chen X., IJkel W. F., Tarchini R., Sun X., Sandbrink H., Wang H., Peters S., Zuidema D., Lankhorst R. K., Vlak J. M. and Hu Z. The sequence of the *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus genome. *J Gen Virol* 82, 241-257, 2001.
16. Choudary P.V., Kamita S.G. and Maeda S. Expression of foreign genes in *Bombyx mori* larvae using baculovirus vectors. In "Methods in Molecular Biology - Baculovirus Expression Protocols" (CD Richardson, Ed), pp 243-264. Humana Press, Totowa, NJ, 1995.
17. Duncan R. and Faulkner P. Bromodeoxyuridine-induced mutants of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus defective in occlusion body formation. *J Gen Virol* 62, 369-373, 1982.
18. Duncan R., Chung K. L. and Faulkner P. Analysis of a mutant of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus with a defect in the

- morphogenesis of the occlusion body macromolecular lattice. *J Gen Virol* 64, 1531-1542, 1983.
19. Eason J.E., Hice R.H., Johnson J.J. and Federici B.A. Effects of substituting granulin or a granulin-polyhedrin chimera for polyhedrin on virion occlusion and polyhedral morphology in *Autographa californica* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus. *J Virol* 72, 6237-6243, 1998.
 20. Engelhard E. K., Kam-Morgan L. N., Washburn J.O. and Volkman L. E. The insect tracheal system: a conduit for the systemic spread of *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3224-3227, 1994.
 21. Faulkner P., Kuzio J., Williams G. V. and Wilson J. A. Analysis of p74, a PDV envelope protein of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus required for occlusion body infectivity *in vivo*. *J Gen Virol* 78, 3091-3100, 1997.
 22. Furuta Y. The infectivity-value of polyhedra and nonoccluded virus in hemolymph collected from silkworm larvae infected with BmNPVs. *Acta Sericologica* 82, 33-40, 1972.
 23. Furuta Y., Mitsuhashi W., Kobayashi J., Hayasaka S., Imanishi S., Chinzei Y. and Sato M. Peroral infectivity of non-occluded viruses of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus and polyhedrin-negative recombinant baculoviruses to silkworm larvae is drastically enhanced

- when administered with *Anomala cuprea* entomopoxvirus spindles. *J Gen Virol* 82, 307-312, 2001.
24. Gomi S., Zhou C. E., Yih W., Majima K. and Maeda S. Deletion analysis of four of eighteen late gene expression factor gene homologues of the baculovirus, BmNPV. *Virology* 230, 35-47, 1997.
 25. Gomi S., Majima K. and Maeda S. Sequence analysis of the genome of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *J Gen Virol* 80, 1323-1337, 1999.
 26. Gomi S. Analysis of deletions of 136 open reading frames in the *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus genome. *Molecular and biological analysis of the Bombyx mori nucleopolyhedrovirus (BmNPV) genome.* pp57-77. Nagoya Univ. Doctoral Thesis.
 27. Gonzalez M. A., Smith G. E. and Summers M. D. Insertion of the SfMNPV polyhedrin gene into an AcMNPV polyhedrin deletion mutant during viral infection. *Virology* 170, 160-175, 1989.
 28. Gorlich D. and Mattaj I. W. Nucleocytoplasmic transport. *Science* 271, 1513-1518, 1996.
 29. Granados R. R. and Lawler K. A. *In vivo* pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection. *Virology*, 108, 297-308, 1981.
 30. Grasela J. J., McIntosh A. H., Ignoffo C. M. and Goodman C. L. Insect cells and their potential as stabilization barriers for DNA of multiple and single nucleopolyhedroviruses against ultraviolet-B-simulated

- sunlight inactivation. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 38, 173-177, 2002.
31. Harrison R. L. and Summers M. D. Mutations in the *Autographa californica* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus 25 kDa protein gene result in reduced virion occlusion, altered intranuclear envelopment and enhanced virus production. *J Gen Virol* 76, 1451-1459, 1995.
 32. Harrison R. L., Jarvis D. L. and Summers M. D. The role of the AcMNPV 25K gene, "FP25," in baculovirus polh and p10 expression. *Virology* 226, 34-46, 1996.
 33. Hashimoto Y., Hayakawa T., Ueno Y., Fujita T., Sano Y. and Matsumoto T. Sequence analysis of the *Plutella xylostella* granulovirus genome. *Virology* 275, 358-372, 2000.
 34. Hawtin R. E., Zarkowska T., Arnold K., Thomas C. J., Gooday G. W., King L. A., Kuzio J. A. and Possee R. D. Liquefaction of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected insects is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes. *Virology* 238, 243-253, 1997.
 35. Hayakawa T., Ko R., Okano K., Seong S. I., Goto C. and Maeda S. Sequence analysis of the *Xestia c-nigrum* granulovirus genome. *Virology* 262, 277-297, 1999.
 36. Hong H. K., Woo S. D., Choi J. Y., Lee H. K., Kim M. H., Je Y. H. and Kang S. K. Characterization of four isolates of *Bombyx*

- mori* nucleopolyhedrovirus. *Arch Virol* 145, 2351-2361, 2000.
37. Hong T., Braunagel S. C. and Summers M. D. Transcription, translation, and cellular localization of PDV-E66: a structural protein of the PDV envelope of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 204, 210-222, 1994.
 38. Hu N. T., Lu Y. F., Hashimoto Y., Maeda S. and Hou R. F. The p10 gene of natural isolates of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus encodes a truncated protein with an M(r) of 7700. *J Gen Virol* 75, 2085-2088, 1994.
 39. IJkel W. F., van Strien E. A., Heldens J. G., Broer R., Zuidema D., Goldbach R. W. and Vlak J. M. Sequence and organization of the *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome. *J Gen Virol* 80, 3289-3304, 1999.
 40. Jarvis, D.L., Bohlmeyer, D. A., and Garcia, A., Jr. Requirements for nuclear localization and supramolecular assembly of a baculovirus polyhedrin protein. *Virology* 185, 795-810, 1991.
 41. Jarvis D.L, Bohlmeyer D.A. and Garcia A. Jr. Enhancement of polyhedrin nuclear localization during baculovirus infection. *J Virol* 66, 6903-6911, 1992.
 42. Kalderon D., Richardson W. D., Markham A. F. and Smith A. E. Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature* 311, 33-38, 1984a.

43. Kalderon D., Roberts B. L., Richardson W. D. and Smith A. E. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 39, 499-509, 1984b.
44. Kamita S. G., Majima K. and Maeda S. Identification and characterization of the p35 gene of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus that prevents virus-induced apoptosis. *J Virol* 67, 455-463, 1993.
45. Katsuma S., Noguchi Y., Zhou C.E., Kobayashi M. and Maeda S. Characterization of the 25K FP gene of the baculovirus *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus: implications for post-mortem host degradation. *J Gen Virol* 80, 783-791, 1999a.
46. Katsuma S., Noguchi Y., Shimada T., Nagata M., Kobayashi M. and Maeda S. Molecular characterization of baculovirus *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus polyhedron mutants. *Arch Virol* 144, 1275-1285, 1999b.
47. Katsuma S., Deng D. X., Zhou C. L., Iwanaga M., Noguchi Y., Kobayashi M. and Maeda S. Identification of novel residues involved in nuclear localization of a baculovirus polyhedrin protein. *Virus Genes* 3, 233-240, 2000.
48. Keddie B. A., Aponte G. W. and Volkman L. E. The pathway of infection of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in an insect host. *Science* 243, 1728-1730, 1989.
49. Ko R., Okano K. and Maeda S. Structural and functional analysis of the

- Xestia c-nigrum* granulovirus matrix metalloproteinase. *J Virol* 74, 11240-11246, 2000.
50. Kumar S. and Miller L. K. Effects of serial passage of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in cell culture. *Virus Res* 7, 335-349, 1987.
51. Kuzio J., Pearson M. N., Harwood S. H., Funk C. J., Evans J. T., Slavicek J. M. and Rohrmann G. F. Sequence and analysis of the genome of a baculovirus pathogenic for *Lymantria dispar*. *Virology* 253, 17-34, 1999.
52. Lin G. Y., Zhong J. and Wang X. Z. Abnormal formation of polyhedra resulting from a single mutation in the polyhedrin gene of *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *J Invertebr Pathol* 76, 13-19, 2000.
53. Lu A. and Carstens E. B. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the p80 gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: a homologue of the *Orygia pseudotsugata* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 190, 201-219, 1992.
54. 前田進. 昆虫ウイルスとバイオテクノロジー. サイエンスハウス社. 1993.
55. Maeda S., Kamita S. G. and Kataoka H. The basic DNA-binding protein of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus: the existence of an additional arginine repeat. *Virology* 180, 807-810, 1991.

56. Maeda S., Kawai T., Obinata M., Fujiwara H., Horiuchi T., Saeki Y., Sato Y. and Furusawa M. Production of human alpha-interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nature*, London 315, 592-594, 1985.
57. Maeda S. and Majima K. Molecular cloning and physical mapping of the genome of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosisvirus. *J Gen Virol*, 71, 1851-1855, 1990.
58. Maeda S. Expression of foreign genes in insects using baculovirus vectors. *Annu. Rev. Entomol.* 34, 351-372, 1989.
59. McLachlin J. R. and Miller L. K. Identification and characterization of *vlf-1*, a baculovirus gene involved in very late gene expression. *J Virol*, 68, 7746-7756, 1994.
60. Monsma S. A. and Blissard G. W. Identification of a membrane fusion domain and an oligomerization domain in the baculovirus GP64 envelope fusion protein. *J Virol* 69, 2583-2595, 1995.
61. Monsma S. A., Oomens A. G. and Blissard G. W. The GP64 envelope fusion protein is an essential baculovirus protein required for cell-to-cell transmission of infection. *J Virol*, 70, 4607-4616, 1996.
62. Muller R., Pearson M. N., Russell R. L. and Rohrmann G. F. A capsid-associated protein of the multicapsid nuclear polyhedrosis virus of *Orgyia pseudotsugata*: genetic location, sequence, transcriptional mapping, and immunocytochemical characterization. *Virology* 176,

- 133-144, 1990.
63. Nigg E. A. Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature* 386, 779-787, 1997.
 64. Noguchi, Y. Isolation and characterization of variants of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *Jpn Appl Entomol Zool* 34, 279-282, 1990.
 65. Noguchi, Y. Electron microscopic investigations on the multiplication of the variants of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *J Seric Sci Jpn* 60, 302-309, 1991.
 66. Noguchi, Y. Isolation and characterization of temperature sensitive mutants of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus and their multiplication in a cell line and larvae of *Bombyx mori*. *J Seric Sci Jpn* 64, 230-236, 1995.
 67. Ohkawa T., Majima K. and Maeda S. A cysteine protease encoded by the baculovirus *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *J Virol* 68, 6619-6625, 1994.
 68. Ohkawa T. and Maeda S. Characterization of baculovirus genes involved in the process of oral infectivity. *Annual Meeting of American Society for Virology*, Abstract, W18-2, 114, 1998.
 69. Okazaki, H., Kanaya, T., Nishimura, S., Ogawa, K. and Watanabe, H. Peroral inoculation of baculovirus vector to the silkworm, *Bombyx mori*, treated with a low temperature. *J Seric Sci Jpn* 64, 504-508.

70. Ooi B. G., Rankin C. and Miller L. K. Downstream sequences augment transcription from the essential initiation site of a baculovirus polyhedrin gene. *J Mol Biol* 210, 721-736, 1989.
71. Possee R. D., Sun T. P., Howard S. C., Ayres M. D., Hill-Perkins M. and Gearing K. L. Nucleotide sequence of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis 9.4 kbp EcoRI-I and -R (polyhedrin gene) region. *Virology* 185, 229-241, 1991.
72. Rohrmann G. F. Polyhedrin structure. *J Gen Virol* 67, 1499-1513, 1986.
73. Russell R. L. and Rohrmann G. F. A 25-kDa protein is associated with the envelopes of occluded baculovirus virions. *Virology* 195, 532-540, 1993.
74. Shimada, T., Chan, I.-C., Noguchi, Y., Nagata, M. and Kobayashi, M. Structural and functional abnormality of the polyhedrin gene in a polyhedron-deficient mutant of the *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *J Seric Sci Jpn* 63, 353-360, 1994.
75. Theilmann D. A., Chantler J. K., Stewart S., Flipsen H. T., Vlak J. M. and Crook N. E. Characterization of a highly conserved baculovirus structural protein that is specific for occlusion-derived virions. *Virology* 218, 148-158, 1996.
76. Thiem S. M. and Miller L. K. Identification, sequence, and transcriptional mapping of the major capsid protein gene of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J Virol*

63, 2008-2018, 1989.

77. Todd J. W., Passarelli A. L., Lu A. and Miller L. K. Factors regulating baculovirus late and very late gene expression in transient-expression assays. *J Virol* 70, 2307-2317, 1996.
78. Tweeten K. A., Bulla L. A. and Consigli R. A. Characterization of an extremely basic protein derived from granulosis virus nucleocapsid. *J Virol* 33, 866-876, 1980.
79. Vialard J. E. and Richardson C. D. The 1,629-nucleotide open reading frame located downstream of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus polyhedrin gene encodes a nucleocapsid-associated phosphoprotein. *J Virol* 67, 5859-5866, 1993.
80. Volkman L. E., Summers M. D. and Hsieh C. H. Occluded and nonoccluded nuclear polyhedrosis virus grown in *Trichoplusia ni*: comparative neutralization comparative infectivity, and in vitro growth studies. *J Virol* 19, 820-832, 1976.
81. Volkman L. E. and Summers M. D. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: comparative infectivity of the occluded alkali-liberated, and nonoccluded forms. *J Invertebr Pathol* 30, 102-103, 1977.
82. Wang H. H., Fraser M. J. and Cary L. C. Transposon mutagenesis of baculoviruses: analysis of TFP3 lepidopteran transposon insertions at the FP locus of nuclear polyhedrosis viruses. *Gene* 81, 97-108, 1989.
83. Wang H. G. and Fraser M. J. TTAA serves as the target site for TFP3

- lepidopteran transposon insertions in both nuclear polyhedrosis virus and *Trichoplusia ni* genomes. *Insect Mol Biol* 1, 109-116, 1993.
84. Whitford M., Stewart S., Kuzio J. and Faulkner P. Identification and sequence analysis of a gene encoding gp67, an abundant envelope glycoprotein of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J Virol* 63, 1393-1399, 1989.
85. Whitford M. and Faulkner P. A structural polypeptide of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus contains O-linked N-acetylglucosamine. *J. Virol* 66, 3324-3329, 1992a.
86. Whitford M. and Faulkner P. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of a gene encoding gp41, a structural glycoprotein of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J Virol* 66, 4763-4768, 1992b.
87. Wilson M. E., Mainprize T. H., Friesen P. D. and Miller L. K. Location, transcription, and sequence of a baculovirus gene encoding a small arginine-rich polypeptide. *J Virol* 61, 661-666, 1987.
88. Zanutto P. M., Kessing B. D. and Maruniak J. E. Phylogenetic interrelationships among baculoviruses: evolutionary rates and host associations. *J Invertebr Pathol* 62, 147-164, 1993.
89. Zhou C.E., Ko R., and Maeda S. Polyhedron-like inclusion body formation by a mutant nucleopolyhedrovirus expressing the granulin gene from a granulovirus. *Virology* 240, 282-294, 1998.