HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	新型家蚕濃核病ウイルス(BmDNV-2)の増殖機構に関する研究
Author(s)	早川, 徹
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第3889号
Issue Date	1996-03-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3112013
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/51313
Type	doctoral thesis
File Information	000000297205.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

新型家蚕濃核病ウイルス（BmDNV-2）の増殖機構に関する研究

早川 衛

新型家蚕濃核病ウイルス(BmDNV-2)の増殖機構に関する研究

早川　徹

謝辞

本稿を草するにあたって、数々の御指導ならびに御助言をいただき、さらに本論文の御校閲をいただいた北海道大学農学部応用分子昆虫学講座教授飯塚敏彦博士、助教授伴戸久徳博士に厚く御礼申し上げます。

また、本論文の御校閲と適切な御助言を賜りました北海道大学農学部遺伝子制御学講座教授三上哲夫博士、植物ウイルス病学・菌学講座教授上田一郎博士に御礼申し上げます。

ならびに、本研究を遂行するに当たり御助言・御協力を賜りました北海道大学農学部応用分子生物学講座助手浅野真一郎博士、同講座助手佐原健氏、ウイルスDNAの塩基配列等で情報を提供してくださいました信州大学繊維学部蚕遺伝疫学講座助教授中垣雅雄博士、実験材料等の供与を賜りました北海道大学農学部農場養蚕部技官各位、応用分子昆虫学講座学生各位に心から御礼申し上げます。

新型家蚕濃核病ウイルス(BmDNV-2)の増殖機構に関する研究

第Ⅰ章　緒論　－1

第Ⅱ章　研究史　－4

第Ⅲ章　家蚕の新型濃核病ウイルス(BmDNV-2)の複製機構
目的　－7
材料と方法　・ウイルスと宿主昆虫　－8
・ウイルスDNAの抽出　－8
・複製中間体検出用プライマーの作製　-10
・PCRとサザンブロットハイブリダイゼーション　-10
結果　・ウイルスDNA　-12
・PCR法を用いたウイルス複製中間体の解析　-13
考察　-16

第Ⅳ章　BmDNV-2のゲノム構造解析
目的　-19
材料と方法　・ウイルスDNAのクローンおよびシーケンシング　-19
結果　・VD2の塩基配列　-20
・VD2の遺伝子構造解析　-20
・ORFの周辺領域　-26
・BmDNV-2DNAの末端領域における２次構造の予測　-28
考察　-28

第Ⅴ章　ウイルスタンパク質のコード領域の同定と機能解析

目的 -31

材料と方法 ・ウイルス、宿主昆虫、および抗血清 -31

・ウイルス特異的 poly(A)$^+$RNAの抽出と
ノーザンブロットハイブリダイゼーション -32

・リバースPCRとサザンブロットハイブリダイゼーション -33

・λgt11 cDNA ライブラリーの構築とスクリーニング -33

・シーケンシング -35

・プライマーエクステンション -35

・ウイルス構成タンパク質発現プラスミドの構築と発現 -36

・SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)と
イムノブロットアッセイ -36

・ウイルス非構成タンパク質発現プラスミドの構築と
一過性発現系 -38

・プラスミドDNAの培養細胞への導入と
ルシフェラーゼアッセイ -38

結果 ・感染細胞におけるウイルス遺伝子の発現 -41

・ウイルス構成タンパク質遺伝子の同定 -47

・ウイルス非構成タンパク質の機能 -49

考察 -51

第Ⅵ章　総合考察 -60

第Ⅶ章　要約 -64

第Ⅷ章　英文要約 -66

第Ⅰ章　緒論

一般的に線状１本鎖DNAをゲノムとして含む小形球状ウイルスはパルボウイルス科(*Parvoviridae*)に分類される。この科のウイルスはDNAをゲノムとして持つウイルスの中で最も小型のウイルスとして知られており、ウイルスの複製は宿主細胞因子やヘルパーウイルスなどに依存している(Tennant and Hand, 1970; Atchson *et. al.*, 1965; Buller *et. al.*, 1981)。*Parvoviridae* は宿主域と増殖特性により *Parvovirus, Dependovirus, Densovirus*の３つの属に細分される(Siegle *et. al.*, 1985)。*Parvovirus*と *Dependovirus*は脊椎動物を宿主とするウイルスのグループでり、前者が自律的増殖可能であるのに対し、後者はその増殖にアデノウイルスやヘルペスウイルスなどヘルパーウイルスが必要である。一方、*Densovirus*は無脊椎動物を宿主とする自律的増殖可能なウイルスのグループである。*Densovirus*に属するウイルスは標的組織細胞の核でのみ増殖し、感染細胞をフォイルゲン染色すると核が濃く染まるところから一般的にDensonucleosis virus(濃核病ウイルス,DNV)と呼ばれている。DNVはハチミツガ(*Galleria mellonella*)から初めて分離されて以来(Meynadier *et. al.*, 1964; Kurstak, 1972)、ここ約 25年で様々な昆虫種より20種以上のDNVが分離されている(Tijssen and Arella, 1991)。

カイコにおけるDNV、家蚕濃核病ウイルス(*Bombyx mori* Densonucleosis virus;BmDNV)はカイコに濃核病(軟化病の一種)を引き起こすウイルスである。BmDNVは、1968年、長野県伊那地方の違作農家から初めて分離され、当初、軟化病ウイルス(Infectious flacherie virus;IFV)伊那株として報告された(清水, 1975)。その後、このウイルス粒子の形態や感染細胞での組織病理学的な増殖像(渡辺ら, 1976)、核酸の性状(川瀬・姜, 1976)などが明らかになり、伊那株がFamily *Parvoviridae* genus *Densovirus*に属することが判明した。（以下 *Parvoviridae*に属するウイルスをパルボウイルスと呼ぶ。）

伊那株は約５キロベース(kb)の一本鎖DNAをウイルスゲノムとして持ち、＋鎖と－鎖をそれぞれ別々の粒子中に含む小形球状ウイルスである(Bando, *et. al.*, 1990; Nakagaki and Kawase, 1980)。伊那株 DNAの末端領域には154ヌクレオチドの回文配列を含む225ヌクレオチドの逆方向反復配列が存在しており、この末端構造は パルボウイルスゲノムの末端構造と類似していた(Bando *et. al.*, 1987)。哺乳類のパルボウイルスゲノムは、その末端構造が重要な役割を演ずる独特な複製機構、すなわち“セルフプライミング・ヘアピントランスファー”機構により複製することが報告されている(Tattersal and Ward, 1976; Lusby *et. al.*, 1980; Berns and Hauswirth, 1984; Hauswirth, 1984; Ozawa *et. al.*, 1986; Cotomore and Tattersall, 1994; Hong *et. al.*, 1994)。昆虫のパルボウイルスにおいても、伊那株におけるウイルスゲノムの末端構造、および粒子中のゲノムDNAにおける末端構造の存在様式を解析した結果から、同様の様式でDNA複製が行われる事が示唆されている(Bando *et. al.*, 1987)。

一方1980年、山梨県の違作農家で軟化病症状を呈する病蚕より分離されたウイルスは、主として組織病理学的観察結果からDNVに分類され、BmDNV(山梨株)として報告された。しかし伊那株と山梨株は血清学的性状が異なることから同族異種のウイルスと考えられ、前者はBmDNV-1、後者をBmDNV-2と呼ばれる様になった(渡部ら, 1986)。しかしその後、BmDNV-2(家蚕濃核病ウイルス, 山梨株)についての研究が進むにつれて、本ウイルスがBmDNV-1(家蚕濃核病ウイルス, 伊那株)を初めとするパルボウイルスとは異なる性状を持つことが明らかになってきた。すなわちBmDNV-2は２種の１本鎖DNA(VD1;6.6kb, VD2;6.1kb)をウイルスゲノムとして持ち、＋鎖と－鎖をそれぞれ別の粒子中に含む(Bando *et. al.*, 1992)。また、ゲノムDNAの末端領域にはパルボウイルス一般に見られるような大きなヘアピン構造は存在しない。パルボウイルスの複製においては、末端のヘアピン構造が極めて重要な役割を演じており、このようなゲノムDNAの末端構造の違いはDNAの複製機構の違いを示していると考えられ、本ウイルス

がこれまでに知られているパルボウイルスとは異なる新しいタイプのウイルスである可能性が考えられた(Bando, *et. al.*, 1992)。

一方、これらのBmDNV(家蚕濃核病ウイルス)は、厳格な宿主・組織特異性を示す事が判明した。すなわち、BmDNV-1は日本種のカイコのみに、そしてBmDNV-2は中国種のカイコのみに感染し、他の昆虫から分離されたほとんどのDNVが体内の様々な組織で増殖する(Kawase, 1985)のに対して、中腸皮膜の円筒細胞の核でのみ増殖する(前田・渡部, 1978)。これらの事からBmDNVは、ウイルス増殖における宿主、あるいは組織特異性を考える上で極めて興味深い研究材料であるといえる。

そこで本研究では、上記のように様々な興味深い特徴を有する新しいタイプの昆虫ウイルスであるBmDNV-2(家蚕濃核病ウイルス, 山梨株)について、その増殖機構を明らかにする目的で以下の解析を行った。まず第Ⅱ章では、これまでのカイコのDNV研究の歴史をまとめた。次に第Ⅲ章ではPCR法を用いて複製型ウイルスDNAの構造を解析することにより、本ウイルス(BmDNV-2)ゲノムの複製機構について考察した。第Ⅳ章では本ウイルスゲノム、特にVD2の塩基配列の決定を行い、その遺伝子構造を明らかにした。さらに第Ⅴ章では培養細胞を用いた一過性発現系により、ウイルスゲノムDNAにコードされるタンパク質の機能を解析した。最後に第Ⅵ章において以上の結果を基に本ウイルスの増殖機構、および宿主特異性について総合的な考察を行った。

第Ⅱ章　研究史

30年程前まではカイコに軟化病を引き起こすウイルスとして Infectious flacherie virus(IFV)のみが知られていた(山崎ら,1960)。IFVはウイルスゲノムとしてRNAを有する直径約26±2nmの球状ウイルスで(鮎沢,1972; Kawase *et. al.*,1974)、増殖は中腸皮膜盃状細胞の細胞質で起こることが明らかになっている(井上・鮎沢 1972)。

一方、1968年に長野県伊那地方の違作農家において採取された軟化病蚕から分離されたウイルスは、その感染蚕の病徴や品種によるウイルス感受性の違い、また中腸皮膜の組織学的病変像などがIFVとは明らかに異なっていた。清水(1975)は、これが従来の軟化病ウイルスとは異なるウイルスによるものと推定して、このウイルスを仮に軟化病ウイルス（伊那株）として報告した。その後、伊那株感染中腸組織の電子顕微鏡観察や組織化学的観察から、伊那株は直径約21nmの球状ウイルスであり、中腸皮膜の円筒細胞の核内で増殖すること、またその際に顕著なDNA合成を伴うことなどが明らかにされた(渡部ら，1976; 前田・渡部，1978)。また精製ウイルス粒子あるいは粒子より抽出した核酸のアクリジンオレンジ染色やホルマリンによる吸光度変化などの解析結果から、ウイルス粒子には１本鎖DNAが含まれていることが示唆された(川瀬・姜，1976; 姜ら，1978)。さらにウイルス粒子から抽出した核酸の電子顕微鏡観察およびアガロースゲル電気泳動法による解析から、伊那株はウイルスゲノムとして線状１本鎖DNAを含むことが明らかにされた(Nakagaki and Kawase, 1980)。この様な 軟化病ウイルス(伊那株)の特徴はIFVの特長とは大きく異なるもので、現在、このウイルスはパルボウイルス科(Family *Parvoviridae*)デンソウイルス(DNV)属(genus *Densovirus*)に分類され、家蚕濃核病ウイルス(*Bombyx mori* DNV, BmDNV)と呼ばれている。

BmDNV(伊那株)はDNVの中ではもっとも研究の進んだウイルスの１つである。BmDNV(伊那株)は約5000ヌクレオチドの１本鎖DNA(＋鎖と－鎖をそれぞれ別の

粒子に含む)をゲノムとして持つウイルスで(Bando, *et. al.*, 1990; Nakagaki and Kawase, 1980)、ゲノムDNAの全塩基配列も既に決定されている(Bando *et. al.*, 1987, 1990)。そのゲノムDNAの末端には225ヌクレオチドの逆方向反復配列が存在しており、その反復配列には154ヌクレオチドの回文配列が含まれている(Bando *et. al.*, 1990)。このような、ゲノム末端領域における回文配列はパルボウイルス一般に共通する構造であり、ウイルスDNAの複製に重要な役割を果たすことが報告されているが、BmDNV(伊那株)においても哺乳類のパルボウイルスと同様に末端構造に依存したゲノムDNA複製機構が存在している事が推定されている(Bando *et. al.*, 1990)。

BmDNV(伊那株)のゲノムDNAには３つのopen reading frame(ORF)が存在している(Bando *et. al.*, 1987)。その内大きな２つのORF(ORF1, 2)は同じ鎖(＋鎖)上に存在し、それぞれ非構成タンパク質、構成タンパク質をコードする領域と考えられている。また、もう１つの小さいORF(ORF3)はORF1および2の存在する配列とは相補的な配列(－鎖)上に存在しており(Bando *et. al.*, 1987)、現在そこにコードされているウイルスタンパク質について、発現は確認されておらず、ほとんど何も明らかにされていない。

1980年代になって、中国（鎮江）(Iwashita and Chun, 1982)、山梨県(関・岩下, 1983)、長野県佐久地方(Kurihara, *et. al.*, 1984)で軟化病による違作が相次いで発生し、病理組織学的所見から濃核病と診断された。違作農家から採集された病蚕より分離されたウイルスは、それぞれ家蚕濃核病ウイルス(中国株)、(山梨株)および(佐久株)と呼ばれ、いずれも物理化学的にはDNVの特徴を有していた。しかし、これらのウイルスに対する様々な蚕品種の感受性や血清学的性状は伊那株とは明らかに異なっていた。一方でこれらの新しく分離されたウイルスはお互いに物理化学的、病理組織学的特徴が類似していた。そこで伊那株をカイコ濃核病ウイルス１型(*Bombyx mori* denso nucleosis virus type 1;BmDNV-1)とし山梨株、佐久株そして中国株をカイコ濃核病ウイルス２型(BmDNV-2)と命名する事が提言された(渡部ら, 1986)。

しかし、その後BmDNV-2について行われた分子生物学的研究から、このウイルスがBmDNV-1とは異なるタイプのウイルスであることが明らかになって来た。BmDNV-2は直径22±0.5nm、沈降係数102Sの球状ウイルスで、BmDNV-1と類似しているが(Nakagaki and Kawase, 1980)、２種類の１本鎖DNA(VD1;6.6kb, VD2;6.1kb)をウイルスゲノムとして持ち、その＋鎖と－鎖を別々の粒子中に含んでいる(Bando *et. al.*, 1992)。さらにパルボウイルスに見られるようなゲノム末端の回文構造が本ウイルスゲノムには存在しない事が明らかになり、本ウイルスはパルボウイルスとは異なる複製機構を有する、これまでに報告の無い全く新しいタイプのウイルスである可能性が示唆された(Bando *et. al.*, 1992)。

第Ⅲ章　家蚕の新型濃核病ウイルス(BmDNV-2)の複製機構

目的

一般に線状１本鎖DNAゲノム(約5.0kb)を有する小形球状ウイルスはパルボウイルスに分類される。パルボウイルスゲノムDNAの一次構造解析はこれまでに様々なウイルスで行われている(Astell *et.al.*,1979; Deiss *et.al.*,1990; Lusby *et.al.*,1980; Sahli *et.al.*,1985)。パルボウイルスのゲノムDNA両末端には回文構造を含む大きな逆方向反復配列が存在するが、その回文構造により形成されるヘアピン構造がパルボウイルスの複製機構において重要な役割を演じていることが示された(Tattersal and Ward, 1976; Lusby *et.al.*,1980; Berns and Hauswirth,1984; Hauswirth,1984; Ozawa *et.al.*,1986; Cotomore and Tattersall,1994; Hong *et.al.*,1994)。

BmDNV-1についてもウイルスDNAの一次構造はすでに明らかにされており、末端にはパルボウイルスと同様に、回文構造を含む大きな逆方向反復配列が存在している(Bando *et.al.*,1990)。さらにウイルス粒子中のウイルスDNAの末端構造が詳細に解析され、ほ乳類のパルボウイルスでゲノムDNAの複製機構として示された“セルフプライミング・ヘアピントランスファー”機構がBmDNV-1の複製過程でも働いている可能性の高いことが報告されている(Bando *et.al.*,1990)。しかしBmDNV-2(山梨株)にはそのような構造は存在していない。すなわち末端領域に大きな逆方向反復配列は存在するが、その配列内にパルボウイルスで見られるような大きな回文配列は存在せず、末端がヘアピン構造をとる可能性は低いと考えられる(Bando *et.al.*,1992)。この事はBmDNV-2におけるゲノムの複製機構がパルボウイルスとは異なっていることを示唆しているが、現在のところ本ウイルスのDNA複製様式に関する具体的な知見は全く得られていない。またBmDNV-1など他のパルボウイルスの複製様式とは異なっていると言う直接的な証拠も得られていない。

本章ではBmDNV-1とBmDNV-2におけるゲノムDNAの複製機構の相違を明らかにする目的で、感染細胞中に存在する複製中間体の解析を行った。すなわち、ウイルスゲノムDNAがパルボウイルスで言われている複製機構(セルフプライミング・ヘアピントランスファー)により複製した場合、閉環状末端構造を有する複製中間体(RIDNA : replicative intermediate DNA)が産生されるはずである(Fig.1)。そこで、BmDNV-1およびBmDNV-2感染細胞において、この閉環状末端構造を有するウイルスゲノムDNAの複製中間体が存在しているか否かをPCR法を用いて解析した。

材料と方法

ウイルスと宿主昆虫

BmDNV-1とBmDNV-2としては北海道大学農学部応用分子昆虫学研究室で継代保存しているBmDNV-1(伊那株)、およびBmDNV-2(山梨株)を供試ウイルス株として用いた。BmDNV-1は日本種カイコの、そしてBmDNV-2は中国種カイコの中腸のみに感染し、その逆では感染は全く認められない。そこでBmDNV-1、BmDNV-2の部分精製ウイルスを、それぞれのウイルスの感受性蚕品種である日124、および支124に経口投与し、感染昆虫を得た。

ウイルスDNAの抽出

ウイルスDNAはBmDNV-1,BmDNV-2共に精製ウイルス粒子、およびウイルス感染中腸より抽出した。まず感染中腸からウイルス粒子をNakagaki and Kawase(1980)の方法に従って精製し、ウイルス粒子からのDNA抽出はBando *et. al.* (1990)の方法に準じて行った。一方、感染中腸よりウイルスDNAを抽出するために、まず感染４日目の幼虫より中腸組織を摘出し、約５倍量のTE buffer(10mM Tris-HCl,1mM EDTA; pH8.0)中で組織を磨砕した。そして磨砕液に0.1mg/mlとなるように proteinase K(WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRY LTD.)

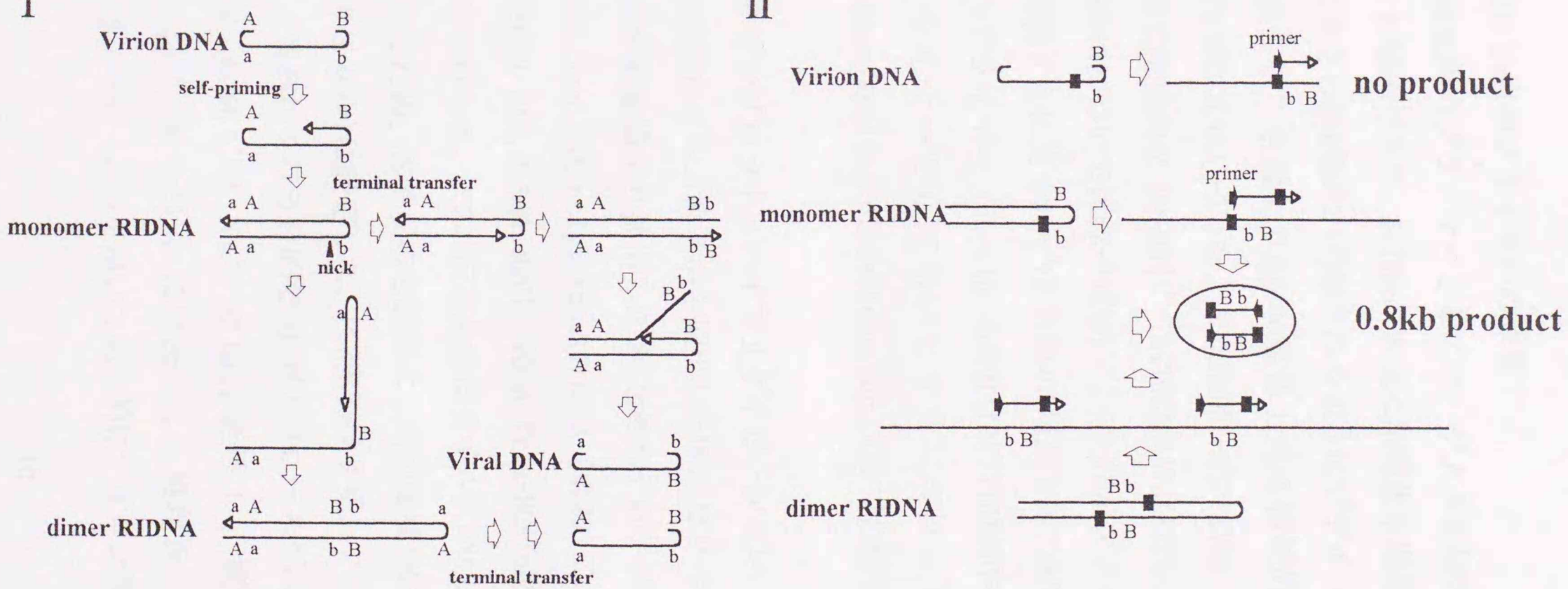


Fig.1 Terminal structure, tentative replication mechanism and strategy for detection of replicative intermediate with closed terminal structure.

I : Tentative mechanism for parvovirus DNA replication.

II : Strategy for detection of RI(replicative intermediate)DNA with closed terminal structure.

▉ : target sequence of primer

を加え、37℃、４時間消化した。proteinase K処理により透明になった中腸磨砕液をフェノール抽出し、DNAはエタノール沈殿を行うことで回収した。

複製中間体検出用プライマーの作製

RIDNA検出用のプライマーとしては、ゲノム末端の逆方向反復配列より内側の配列に相補的であり、RIDNAの末端に閉環状末端構造がある場合にのみPCRで一定の大きさのDNA断片が増幅されるようにデザインした。すなわち、BmDNV-1では＋鎖の３’末端より約400塩基上流に相補的なプライマー,INA-2(5’-TACGTAGTCTTCGTCAAAT-3’)を、またBmDNV-2ではVD2 －鎖の３’末端から約600塩基上流に相補的な 02-P3(5’-TATTGCACAATGTATTA-3’)を合成した(Fig.2)。さらにBmDNV-2については02-P3以外に、02-P3がプライマーとして機能し得るか否かを解析する目的で02-P3より約400塩基下流の配列に相補的で、かつ方向が逆向きのプライマー,YⅡ-1(5’-GTCTGCCATTTTGTATG-3’)を合成した(Fig.2)。これらプライマーとして用いたオリゴヌクレオチドは ABI 373A DNA synthesizer(Applied Biosystems,Inc.,CA)で合成した。

PCR とサザンブロット・ハイブリダイゼーション

PCRは精製ウイルス粒子から抽出したDNA(ビリオンDNA)、およびウイルス感染幼虫の中腸組織より抽出したDNAをそれぞれテンプレートとして行った。反応は 2.5U Taq DNA polymerase(TAKARA SHUZO CO.,LTD.)を含むPCR reaction buffer(50mM KCl,2.5mM $MgCl_2$,10mM Tris-HCl(pH8.3).0.02% geratin,0.25mM dNTPs)中で行った。PCRの反応条件はウイルスDNAの末端領域における２次構造形成を防ぐため、伸長反応を通常より高い温度(92℃;１分,55℃;１分,80℃;30秒 45サイクル)に設定した。PCR産物はサザンブロット・ハイブリダイゼーションによる解析を行う目的で 0.8%アガロースゲルで分離した後、アルカリ溶液(0.5M NaOH,1.5M NaCl)で15分変性し、続いて中和溶液(1M Tris-HCl(pH7.5),1.5M NaCl)に15分浸した。処理後のDNA断片は Bio-Rad TRANS BLOT^{TM}(Bio-Rad Lab.)を用いて電気的にナイロン膜上にトランスファーし、続

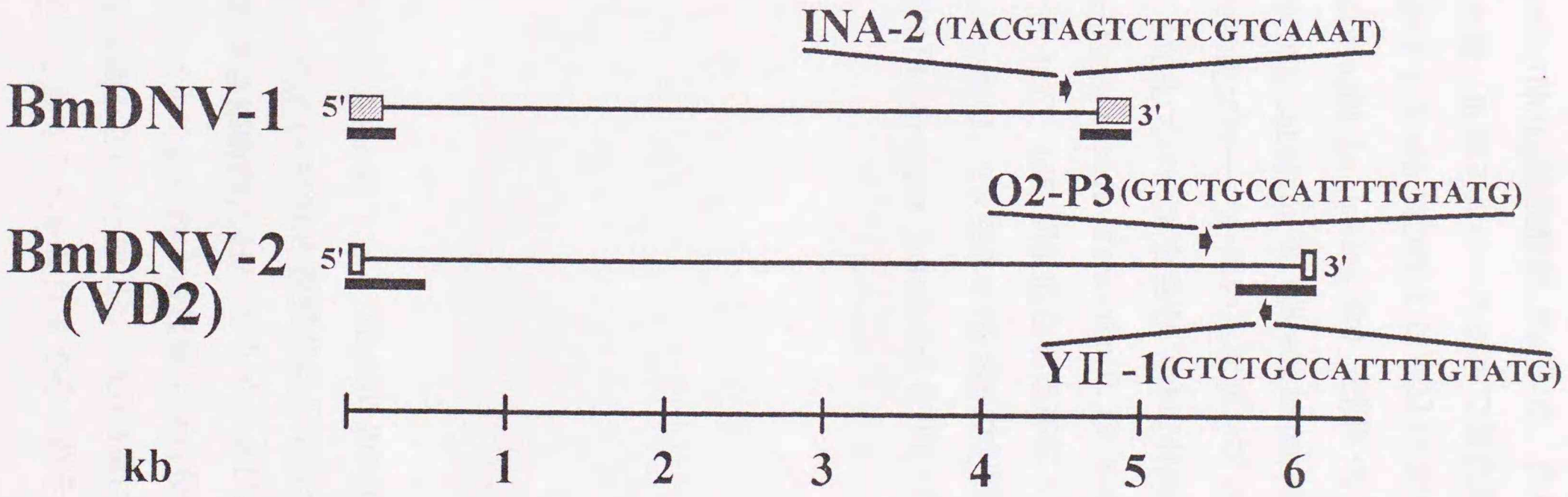


Fig.2 Terminal structures and primer sequences for detection of the replicative intermediates with the closed terminal structure.

: primer
: inverted terminal repeat
: palindromic sequence of BmDNV-1
: common terminal sequence of BmDNV-2

いてウイルスDNAプローブとのハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションのプローブとしては、それぞれのウイルスの末端配列を制限酵素で切り出した断片をディゴキシジェニン(DIG)でラベルしたものを用いた。具体的には、BmDNV-1DNAは制限酵素 *Bgl*Ⅱで、またBmDNV-2DNAは制限酵素 *Xho*I で十分消化した後、0.8%アガロースゲルで消化断片を分離し、ウイルスDNAの末端部分(BmDNV-1:0.4kb,BmDNV-2:0.4kb)に対応するDNA断片をゲルからGeneclean kit(Bio101,La Jolla, Ca) を用いて抽出精製した。プローブDNAのDIG標識は DIG DNA Labeling Kit(Boehringer Mannheim)を用いて行った。PCR産物に対するDIG化プローブを用いたサザンブロットハイブリダイゼーションは 50ng/mlの DIG化プローブを含む hybridization buffer(50% formamide,5×SSC,2% purified casein fraction,0.1% sodium N-lauroyl sarcosinate, 0.02% SDS)中で 42℃、16時間反応させる事により行った。DIG化プローブと反応させたナイロン膜は、2×SSC,0.1% SDSで１回、0.2×SSC,0.1% SDSで２回洗浄した後、CSPD(Boehringer Mannheim)を用いてウイルス特異的配列の検出を行った。

結果

ウイルスDNA

感染中腸細胞からBmDNV-1およびBmDNV-2の複製中間体(RIDNA)を抽出する時期、すなわち、ウイルスDNAの複製が盛んに行われている時期を知る目的で、ウイルス感染中腸細胞内におけるウイルスDNA量の経時的変化を調査した。BmDNV-1、BmDNV-2をそれぞれ４令起蚕に経口接種し、その後１ー６日目までの感染幼虫中腸組織からDNAを抽出し、全DNA量に占めるウイルスDNAの割合を調査したところ、少なくとも６日目までその割合は増加していた(未発表)。そこ

で本実験ではウイルス感染後４日目の幼虫中腸より抽出したDNAを用いて解析を進めた。

PCR法を用いたウイルス複製中間体の解析

BmDNV-1、およびBmDNV-2のゲノム末端に存在する逆方向反復配列よりも内側に設定したプライマー(Fig.2)を用いたPCRにより、これらのウイルスのRIDNA末端構造を解析した。もしBmDNV感染幼虫から抽出したDNA中に、パルボウイルスゲノムの複製過程で考えられるような閉環状末端構造を持つRIDNAが存在していれば、Fig.1に示すようにRIDNAのhead-to-head,tail-to-tailに連結した配列に起因するDNA断片が増幅されるはずである。そしてこの様な閉環状末端構造はRIDNAにのみ存在し、ビリオンDNAには存在しないはずである。そこでまず、BmDNV-1のビリオンDNA、および感染中腸組織より抽出したDNAを用いてそれぞれPCRを行った結果、感染中腸組織より抽出したDNAをテンプレート(鋳型)とした場合においてのみ約0.8kbのウイルス特異的なDNA断片が増幅され、ビリオンDNAを鋳型とした場合にはPCR産物は認められなかった(Fig.3)。この増幅されたDNA断片は、PCRに用いたプライマーの位置から増幅が期待される閉環状末端構造の大きさと一致し、“セルフプライミング・ヘアピントランスファー”機構による複製過程で生じるRIDNAから増幅されたものと考えられた。

一方BmDNV-2についても同様にPCRを行った結果、精製粒子、およびウイルス感染中腸組織のいづれから抽出したDNAをテンプレートとした場合においても、閉環状末端構造を有するRIDNAの存在を示すようなDNA断片は増幅されなかった(Fig,4)。そこで、合成プライマー,02-P3が実際にPCRのプライマーとして機能し得るかどうかを確認する目的で、もう１つの合成プライマー,YII-1を用いて、両者間に挟まれる領域のPCRによる増幅を試みた(Fig.2)。その結果、ビリオンDNA、感染中腸DNA、いづれをテンプレートとした場合においても、期待される約0.4kbのウイルス特異的DNA断片が増幅された(Fig.4)。また、YII-1プライマーのみを用いてPCRを行った場合には、DNA断片の増幅は認められなかった(Fig.4)。

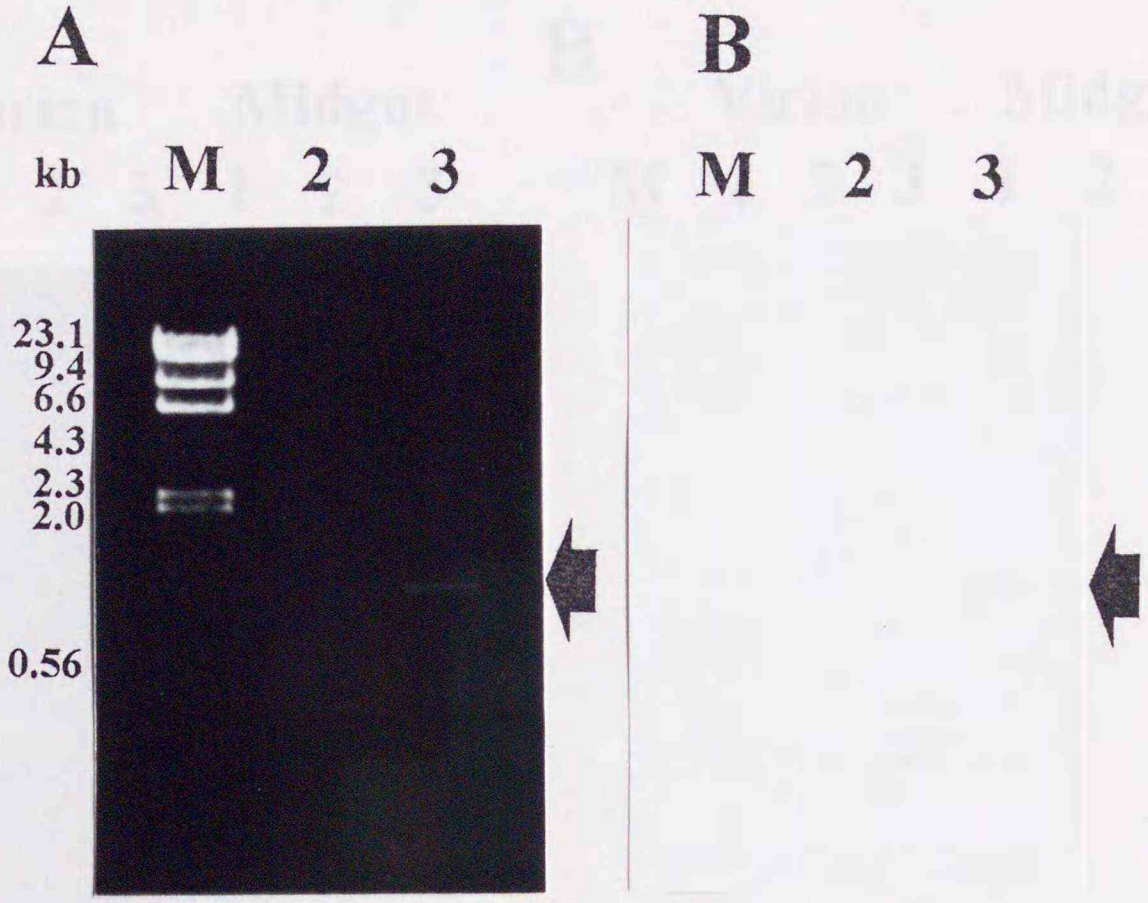


Fig.3 Analysis of BmDNV-1 replicative intermediate DNA.

A : Agarose gel electrophoresis of PCR products
B : Southern blot hybridization
LaneM : λ-*Hin* dIII DNA
Lane2 : virion DNA
Lane3 : DNA extracted from infected midgut

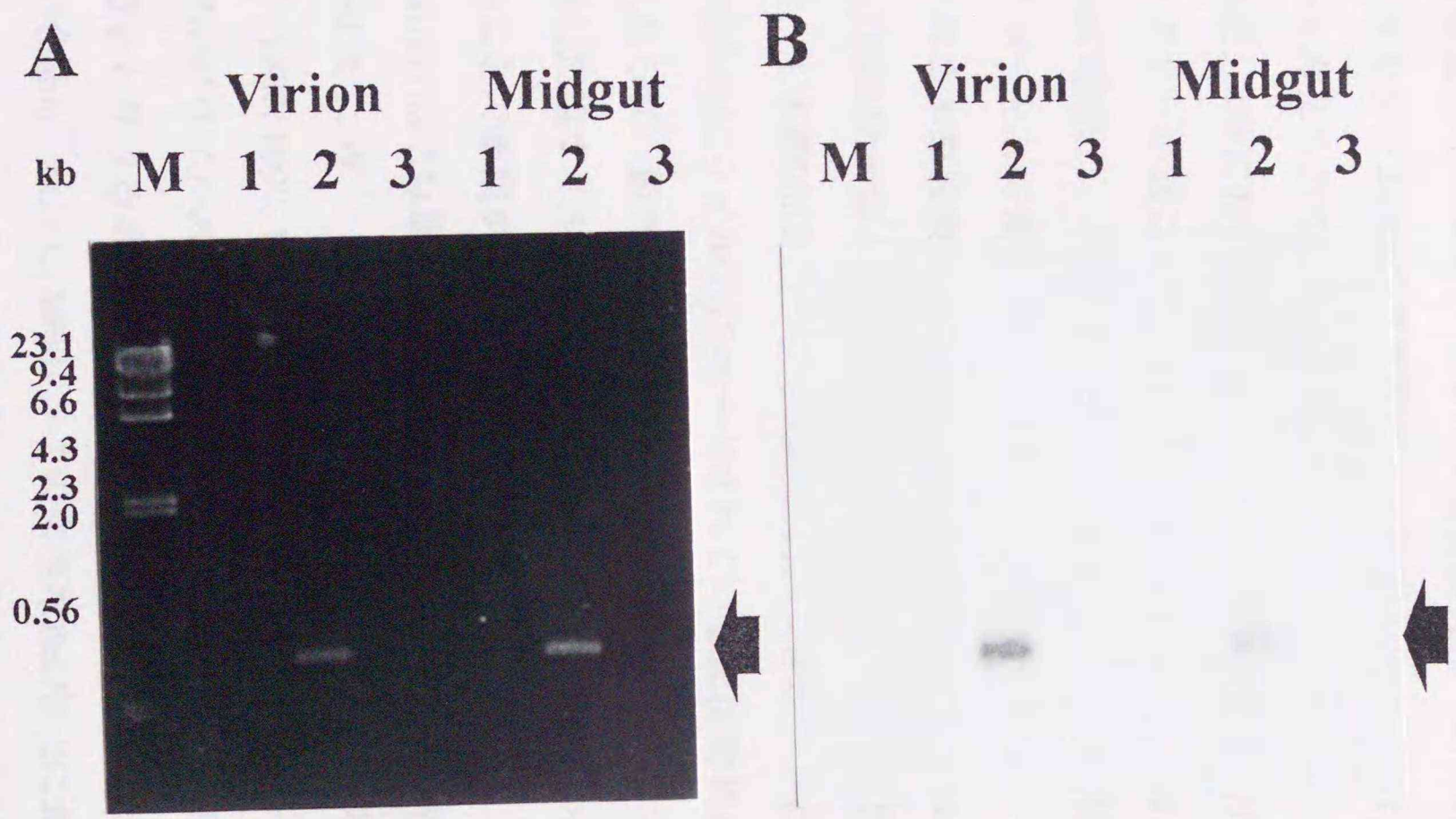


Fig.4 Analysis of BmDNV-2 replicative intermediate DNA.

A : Agarose gel electrophoresis of PCR products

B : Southern blot hybridization

LaneM : λ-*Hin* dIII DNA

Lane1 : PCR products by Y11-1 primer only
Lane2 : PCR products by Y11-1 + O2-P3 primers
Lane3 : PCR products by O2P3 primer only

考察

パルボウイルスはゲノムDNAの両末端領域に逆方向反復配列が存在しており、その反復配列の末端に存在する回文配列はヘアピン構造を形成する。このゲノム末端構造からパルボウイルスの複製機構は Cavalier-Smith(1974)が真核細胞のクロモソームDNAの複製機構として提唱した hairpin transfer modelと類似すると考えられていた(Tattersll and Ward,1976; Lusby *et.al.*,1980)。そして最近、AAVにおいて*in vitro* replicationの系を用いて実際にヘアピントランスファーが起こっていることが証明された(Hong and Berns,1994)。ウイルスDNAの複製は、Fig.1に示したようにゲノムDNA末端のヘアピン構造部分がプライマーとして働くことによりDNA合成が開始し、その結果、モノマーとダイマーの２本鎖複製中間体(replicative intermediate:RI)DNAが形成される。これらRIDNAは一方の末端においてhead-to-head,あるいはtail-to-tail型に連結され、１本鎖DNAが自ら折りたたまれた大きなヘアピン構造を形成している。RIDNAはさらにウイルスにコードされている部位特異的ニッケースによりニックが入れられ、新たに生じた 3'-OHから再びDNA合成が開始し、子ウイルスDNAに転移した親ウイルスDNA末端配列を鋳型として親ウイルスDNAの末端構造が再生することで複製が完了する。

*Densovirus*に分類される家蚕濃核病ウイルス(BmDNV)においても、BmDNV-1、BmDNV-2共にゲノムDNAの一次構造はすでに決定されており(Bando *et.al.*,1987,1990,1992; 本論文第Ⅳ章; Nakagaki *et.al.*,未発表)、BmDNV-1ではパルボウイルスと同様にゲノム末端の逆方向反復配列内において、ヘアピン構造をとりうるが、BmDNV-2の逆方向反復配列内にはそのような構造は見られない(Bando *et.al.*,1992)。このようなBmDNV-2におけるゲノムDNA末端構造の違いはウイルスDNAの複製機構の違いと考えられるが、末端の逆方向反復配列内に存在する非常に短い相補配列を利用してセルフプライミングを行う可能性も考えられ、BmDNV-2においてパルボウイルスとは異なる複製機構が存在す

ると言う直接的証拠はまだ示されていない。また、これまでにBmDNV-1を初め、他の昆虫パルボウイルスにおいてその“セルフプライミング・ヘアピントランスファー”機構による複製中間体としての閉環状末端構造を検出、あるいはその存在を証明したという報告もない。そこで本実験ではまずBmDNV-1においてPCRを用いた複製中間体の検出方法を確立し、次にBmDNV-2のRIDNAの構造をBmDNV-1と比較することで両者の複製機構の異同を解析した。RIDNAに存在する閉環状末端構造を１種類のウイルス特異的なプライマーを用いたPCR法で検出する事を試みた。解析はウイルスゲノム末端における高次構造の形成を防ぐため、Taq polymeraseによるDNA伸張反応の条件を極力厳しくした。その結果、本方法を用いて、BmDNV-1においては感染中腸から抽出したDNAを鋳型とした場合、パルボウイルス型のRIDNAが存在した場合に増幅が予想される約0.8kbのDNA断片が増幅された。この結果はBmDNV-1がパルボウイルス同様の機構、すなわち末端のヘアピン構造を利用した“セルフプライミング・ヘアピントランスファー”機構でDNA複製を行っていることを示唆している。一方、BmDNV-2においてはそのようなDNA断片は増幅されなかった。この原因として、検出に用いたプライマー,02-P3が何らかの原因でプライマーとして機能しなかった可能性も考えられたが、別のプライマー,YⅡ-1を用いたPCR実験からこの実験条件において末端検出用プライマー.02-P3がPCRのプライマーとして機能し得ることが示された。この事から、BmDNV-2のゲノム複製過程においては、少なくとも末端の逆方向反復配列内での相補配列を利用したヘアピン構造によるプライミングで生じるRIDNAは存在しない可能性が高いと考えられる。

以上、本章ではPCR法を用いてウイルスゲノムの複製中間体(RIDNA)の構造について調査したが、その結果BmDNV-1感染細胞に閉環状末端構造を持つRIDNAが存在していることが判明した。これは昆虫のパルボウイルスにおいて、閉環状末端構造を有する複製中間体の存在を示した初めての例である。この事はBmDNV-1のDNA複製において、哺乳類のパルボウイルスと同様の機構が働いていることを強く示唆するものである。一方、BmDNV-2において同様の構造は検出されなかった。この結果はBmDNV-2がパルボウイルスとは異なるDNA複製機構を

有するというゲノム構造解析から導かれた推定を強く支持するものである。現在、本ウイルスが如何なる様式でゲノムDNAの複製を行っているか明らかではないが、一般にDNAの合成はDNA　polymeraseによりなされ、全てのDNA polymeraseはDNA伸張反応に 3'-OH末端を必要とする。よって本ウイルスを含めた全てのDNAウイルスの複製には何らかのプライマーが必要である。プライマーの種類としてはRNAプライマーが最も一般的であるが、ウイルスにおいてはRNA以外にもアデノウイルスやバクテリオファージφ29, CP-1, PRD1のようにタンパク質をプライマーとするもの(Bamford and Mindich, 1984; Garcia *et. al.*, 1986; Hermoso and Salas, 1980; Lichy *et. al.*, 1981) や、パルボウイルスのようにDNAをプライマーとするものが存在している。本ウイルスがBmDNV-1や他のパルボウイルスとは異なり、複製開始においてセルフプライミングを行わないならば、他の方法でプライマーを用意せねばならない。その場合、プライマー合成、あるいはプライマーの結合のためのシグナルが本ウイルスのゲノム上に存在しているはずである。既に述べたように、本ウイルスは2組の相補的DNAをウイルスゲノムとして有しているがそれらの末端には53ヌクレオチドの共通末端配列(common terminal sequence)が存在している。この配列はウイルスDNA(VD1, VD2)が共通の機構で複製するために保存されている可能性も考えられ、今後、BmDNV-2のDNA複製機構を解明する上で、このDNA末端に存在する53ヌクレオチドの共通末端配列の機能に解析が待たれる。

第IV章　BmDNV-2のゲノム構造解析
－VD2の構造解析－

目的

現在、直鎖状１本鎖DNAを含む小形球状ウイルスはパルボウイルスに分類される。しかし、BmDNV-2は１本鎖のDNAゲノムを２組持っている事やゲノムの末端においてもパルボウイルスで見られるような大きな回文構造が存在しないこと、そして前章において示した結果等から、本ウイルスはパルボウイルスとは異なる新しいタイプのウイルスであると考えられる。しかし本ウイルスの増殖機構に関する分子レベルでの知見はほとんど無いと言ってよい。その大きな理由の１つには、本ウイルスの増殖機構を解析するのに利用可能な感受性培養細胞系が確立されていないことが挙げられる。一方、本ウイルスのゲノムは２種類(VD1,VD2)あるものの、その大きさは各々6.6kb,6.1kbと小さく、その構造解析は比較的容易と考えられる。そこで、ウイルス遺伝子上に存在する情報の解析から増殖機構の解明にアプローチする目的で、ここではウイルスDNA(VD2)の塩基配列を決定し、その遺伝子構造を解析した。

材料と方法

ウイルスDNAクローンおよびシーケンシング

BmDNV-2ゲノム(VD2)の塩基配列を決定するために、VD2の全体を含むクローンpY1171(Bando *et. al.* 1992)をその配列中に存在する適当な６塩基認識の制限酵素で消化し、いくつかのサブクローンを構築した。同時にpY1171をExonucleaseⅢおよび mung bean nucleaseで消化し(Henikoff 1984)、一連のdeletionクローンを作成した。

作成したサブクローンおよびdeletionクローンのシーケンシングは Sanger *et. al.* (1977) の方法に従い、T7 DNA polymerase(US Biochemical Corp., Cleveland, OH) と［α-^{35}S］dATP(Dupont, NEN research Products, Boston, MA) を用いたダイデオキシ法で行った。またG+C含量が高く、塩基配列を解析し難い領域については反応溶液中に7-deaza GTP(US Biochemical Corp., Cleveland, OH) を加え、またT7 DNA polymeraseの代わりに *Taq* DNA polymerase(US Biochemical Corp., Cleveland, OH)を用いることにより解析した。シーケンシングにプライマーが必要な場合には第Ⅲ章で用いた DNA synthesizer(Applied Biosystems, Inc., CA)で合成した。

シーケンスデータの解析は SDC-GENETYX program(Software Development Co., Ltd.)およびDNASIS DNA sequence analysis system(Hitachi Software Engineering America, Ltd.)を用いて行った。

結果

VD2の塩基配列

クローンpY1171に含まれるBmDNV-2 VD2全領域のシーケンスを Fig.5に示した。BmDNV-2のVD2は全体で6031塩基長であった。ゲノムDNA末端400塩基のG+C含有率は41%と非常に高く、一方、中央部分については26%とむしろA+T-richであった(Fig.6)。この末端領域におけるG+C-richな状態はゲノムDNAの末端領域における高次構造(Fig.7)の安定化に役立つと考えらた。

VD2の遺伝子構造解析

ウイルスタンパク質のコード領域について解析するために、VD2の＋鎖と－鎖の配列についてopen reading frame(ORF)の存在を調査した。その結果、Fig.5とFig.6に示す通りゲノムDNAの中央部分において２つの大きなORFの存在

```
   1 GTGTGTGTATACTGGGGCGGTATTGAGCGAGGCGGTACTCGCCATCTCTCCTATCTTATCTAATCTAATATATCTGTCTCGCTCACTCTTTAGCAAAACC
 101 CCATAAGAGTGAAAGAGACAAAAGAAAAACTGACTTATACCGCCCTGATAGCGGAGATAAGGCTGTTTTATCATAGGCTGCCTTCGCGATCAAGATCTAC
 201 GTCAGTGATAAGAGACTTTGAAATTTTTGTCTGTCATTTTGTATGAAAATTTGCAAATATCCAATAGCAGCCTCGACAGATACCGCCTGGGAGGGTCTTG
 301 ATCGAAGTTGGTGATGTCACAAGCGCCGAATACCGCCTAGATAACGGAGCTTATCGCAACATTCTCGAGGCTGCATTCGAGCTATTTTAAGGAGGCGGTA
 401 CTCGAGTTTGTTATTGTTAATATATATTAAATATGACTAAGTAATATATAAGTAACCCATTAAGAGTAAAATGATAAAGGGTAATCTATCAAGAGGAGG
 501 GGCGCTAGATTGTCGATATCAACCTAATTAAAATTTATTTCAAGGGTAAATGTACCAGGTAAACATAAATTATAAAAGATATTTATAAGTATTATCATATT
 601 AAAATAGtatcagtTAtatcagtTTATCATATAGTATATAAATAAATTATCTGGTAAAATTATTAGTATTCAATATGAATTTAAAGGGGTTATACGTATT
                                                                   M  N  L  K  G  L  Y  V  F    9
 701 TTGCGCTGTTATAACAGCAATAAATTCTTTATCACAATCTGATCTTATTCAAATACGCGAATTAATTGAAACTAATATAATTCGATTATCTAAAACTTTT
       C  A  V  I  T  A  I  N  S  L  S  Q  S  D  L  I  Q  I  R  E  L  I  E  T  N  I  I  R  L  S  K  T  F   42
 801 AATGGTGATATTTCAACTATAAATAATTTTTATAGAATTTTAGTGAGTGTTTTTGAATTATTTAATGATCTACTTGTGGAATTAGATACTCCTGCAGTGA
       N  G  D  I  S  T  I  N  N  F  Y  R  I  L  V  S  V  F  E  L  F  N  D  L  L  V  E  L  D  T  P  A  V   75
 901 GCAATCAACTACAATTATTCGAAGATGAAGATACTGTCCCAAATGATTGTTTAGGTATTGTTGGTCAAATGTTAATCGAATATACAGATATACCCAATGA
       S  N  Q  L  Q  L  F  E  D  E  D  T  V  P  N  D  C  L  G  I  V  G  Q  M  L  I  E  Y  T  D  I  P  N  D  109
1001 TGGATCTTTAACATATCTAAATATTGGAACTATAAGTAGTTTAACTGTTACTTTAGATAATCAGTTATATTTAATATTAACTGTTATATATAACAATGGA
       G  S  L  T  Y  L  N  I  G  T  I  S  S  L  T  V  T  L  D  N  Q  L  Y  L  I  L  T  V  I  Y  N  N  G   142
1101 AGAGAGACAATACAAGAAGTACATAATACAGGATCGCCAACAATAGTAATTGATTTTTACGAGATAAAACATAATAATACCTTTCAAGAGGTAAAAACAT
       R  E  T  I  Q  E  V  H  N  T  G  S  P  T  I  V  I  D  F  Y  E  I  K  H  N  N  T  F  Q  E  V  K  T   175
1201 CAATTTATTATGTTAATTTCATTAACTTTGTACTAGAATATACTGTACATGAAATAGAAGATATTATTGTCACAAGAAATATAAACAGATACAATCAATG
       S  I  Y  Y  V  N  F  I  N  F  V  L  E  Y  T  V  H  E  I  E  D  I  I  V  T  R  N  I  N  R  Y  N  Q  W  209
1301 GTCTACACAACAAAGATCAAGATCAAGAATTGCATTTATTCAACAAGAAGCTATAGATCCAGATATTAGAAATGAACAATTACAAGAAAGTGCTATTTTA
       S  T  Q  Q  R  S  R  S  R  I  A  F  I  Q  Q  E  A  I  D  P  D  I  R  N  E  Q  L  Q  E  S  A  I  L   242
1401 GCAAAACTACATGATGCTGCAGATACATTGGAATATTATGGCATTAGTTTTCTAAGAGAATATTATATAGCTTATTTTCAATATACTATATATGCAGAAA
       A  K  L  H  D  A  A  D  T  L  E  Y  Y  G  I  S  F  L  R  E  Y  Y  I  A  Y  F  Q  Y  T  I  Y  A  E   275
1501 CTCAAAAATTAGATCCAGAATTTTATGATGATCCTTTAGAAAAGAATGTTATTTATATAAATAGAATTGTACAAGCTTTATGGAGGCAAGTAGAGTTAGC
       T  Q  K  L  D  P  E  F  Y  D  D  P  L  E  K  N  V  I  Y  I  N  R  I  V  Q  A  L  W  R  Q  V  E  L  A  309
1601 GCCTCGTTATGCTCAAGAAGCTAAACCTGAAGGATTATTATATCCTAGTGTAGTTCAAGATTTATTTGTTCAATTTAGACCTTTTATTAGAGGTTCAATT
       P  R  Y  A  Q  E  A  K  P  E  G  L  L  Y  P  S  V  V  Q  D  L  F  V  Q  F  R  P  F  I  R  G  S  I   342
1701 CCGTCTGCTGCAGTTCAATTAAATCCTATTTCAACTACTGTTCAATGTATAACTAGAGGCCCGACTAGTGCTATTGGAGCATTAAATTGTGTTCAAAATC
       P  S  A  A  V  Q  L  N  P  I  S  T  T  V  Q  C  I  T  R  G  P  T  S  A  I  G  A  L  N  C  V  Q  N   375
1801 CATTACAAACTGTATATACTTATCCCCAAGATTTACGAACAATTGATGTTGGGGATATAACTATTAATTTAGAGCCAAATCAATATATTATATTAAGATT
       P  L  Q  T  V  Y  T  Y  P  Q  D  L  R  T  I  D  V  G  D  I  T  I  N  L  E  P  N  Q  Y  I  I  L  R  L   409
1901 AAGAATAATTTCCACCGGTAATTGTAATTTTCAATGGACTGTAAGACAACTTAATATAAACTTCTTTTGCTCTTCATGTTCTGGACCAAATTTAATATGT
       R  I  I  S  T  G  N  C  N  F  Q  W  T  V  R  Q  L  N  I  N  F  F  C  S  S  C  S  G  P  N  L  I  C   442
2001 TTAGAATCAAATAATAGATATAATAATCGTGCTAGTGCACTTAACGATTATAGTTTTGATATGAATAATATAGAAGTATATGACGCCTATTATGTAAATG
       L  E  S  N  N  R  Y  N  N  R  A  S  A  L  N  D  Y  S  F  D  M  N  N  I  E  V  Y  D  A  Y  Y  V  N   475
2101 AAGGAATTTCAAGTGCAATTTATGATTTAAATCCTACAGGACAGTTAATTATTAATACAAGACTTAGACAACGATTATTTGTGCTTCAAACACCTTCAGT
       E  G  I  S  S  A  I  Y  D  L  N  P  T  G  Q  L  I  I  N  T  R  L  R  Q  R  L  F  V  L  Q  T  P  S  V   509
2201 AGCAGAATATACTATTAACGGAGTAACAAGACCTGTAATTAAATTTAATAATATTCAATTTAATTTGGGAACTATATTTTTAAGTAATAGAGATATATGT
       A  E  Y  T  I  N  G  V  T  R  P  V  I  K  F  N  N  I  Q  F  N  L  G  T  I  F  L  S  N  R  D  I  C   542
2301 GCAACTTTTGTTCAAACAGCAACATTGGTAACTCCTAGATGTGATAATACTTATGATTGGAATTATTTATTTAATATACCAGGAAATTCATTGGCAACTG
       A  T  F  V  Q  T  A  T  L  V  T  P  R  C  D  N  T  Y  D  W  N  Y  L  F  N  I  P  G  N  S  L  A  T   575
2401 GAACTGGAGTAAAAGTATGTAATAATTTACCATTCAGATTTGGAGTTCAAAGATGTCCATGGGGTCCTAGTGCGTTATTACCTAGATATAATTTTGCTTG
       G  T  G  V  K  V  C  N  N  L  P  F  R  F  G  V  Q  R  C  P  W  G  P  S  A  L  L  P  R  Y  N  F  A  W   609
2501 GATGAATATTATTGATCAATTACAGGAATTAAATATGTTTAATGTAACTTCATTCCAATATATTAATTTTAGATATAATTATAACACTGAAAGAATTTTA
       M  N  I  I  D  Q  L  Q  E  L  N  M  F  N  V  T  S  F  Q  Y  I  N  F  R  Y  N  Y  N  T  E  R  I  L   642
2601 ACTAATGCTCCTATCGCATCTTATAATAGTGCTATTGATGACTTAGCTCAATTAATTATTGATGAAGGTAATAGATTAGATGCTTTAGAAGATAGAGTTG
       T  N  A  P  I  A  S  Y  N  S  A  I  D  D  L  A  Q  L  I  I  D  E  G  N  R  L  D  A  L  E  D  R  V   675
2701 AACGTATAGAAGATTATATTATTGAAAGTTCAAAAATAACTATTTGGGATGTATTAAATATTGCAACTAACCTTTATGATGTAGCAGGAATTATAAGAGA
       E  R  I  E  D  Y  I  I  E  S  S  K  I  T  I  W  D  V  L  N  I  A  T  N  L  Y  D  V  A  G  I  I  R  D  709
2801 TAGCGCTAAACTTATAAGAACCGCAAGTAATCAAGCTCGCAAAAGTTTAAGGGGTTCTTTTAAACAAAATAATGTTGCATTTGATATTGGAAATAAAATA
       S  A  K  L  I  R  T  A  S  N  Q  A  R  K  S  L  R  G  S  F  K  Q  N  N  V  A  F  D  I  G  N  K  I   742
```

Fig.5 Nucleotide sequence of the cloned VD2 in the positive sense for ORF1 and the amino acid sequences of the putative polypeptides corresponding to ORF1 and 2.

Dotted (fine) region : TATA-box, polyadenylation signals
Underline : Sp1 binding consensus sequence
Double underline : homologous sequence to the transcription factor binding site of *Bombyx mori*
Dotted (coarse) region : CAAT-box
Waved line : repeat sequence
Striped region : Cys-X-X-Cys motif

```
2901 GATAGTTTAACTAGAGTTACAAGAAATAATCAATTTAATCCTGTAGAAGCTATTAATTATGGTAGTATTTATGATACTATACATGGTTTTAGAAAAACTT
     D  S  L  T  R  V  T  R  N  N  Q  F  N  P  V  E  A  I  N  Y  G  S  I  Y  D  T  I  H  G  F  R  K  T   775
3001 CTATTTCAAATCCAACAATAAGAAATAGTAATTTAGATAATATTATAACTCCAAGAGTATTACATGATAATAATTTTAACTTGCCTTTAACAAGTCTAGA
     S  I  S  N  P  T  I  R  N  S  N  L  D  N  I  I  T  P  R  V  L  H  D  N  N  F  N  L  P  L  T  S  L  D   809
3101 TGTAAAAGATTTAATTAATACTAATAATGTAATATCTATGACCACTCAAAAGAGTTTTATGGATAGGTTAAGAGATCCTAAAACAGGAACTAATGGAGAT
     V  K  D  L  I  N  T  N  N  V  I  S  M  T  T  Q  K  S  F  M  D  R  L  R  D  P  K  T  G  T  N  G  D   842
3201 ATAATGCCTTATGGAGTTGTAGAAACTTTAGCATCTCCTATAGAACAATTAGGACCCTTAGGAAAATTTGGATATAACAGAGATATAAGTAATCCATCAC
     I  M  P  Y  G  V  V  E  T  L  A  S  P  I  E  Q  L  G  P  L  G  K  F  G  Y  N  R  D  I  S  N  P  S   875
3301 TTAGTAATTTTAATACTAATAGTAAATCTACATATTTATTCCATACAAGTGTAAGAACTAAAAGTTTTGAGTTGGATATTAATAATAAGTGGGTCTTTAG
     L  S  N  F  N  T  N  S  K  S  T  Y  L  F  H  T  S  V  R  T  K  S  F  E  L  D  I  N  N  K  W  V  F  S   909
3401 TACAAGATATTCTGGAATAGGAGAACCAAGCGTATTAGGAGCTACAACTATGCCTCATCAAATAAAAGTAGGATATTTAAAAATAGAATATGATCTTAAA
     T  R  Y  S  G  I  G  E  P  S  V  L  G  A  T  T  M  P  H  Q  I  K  V  G  Y  L  K  I  E  Y  D  L  K   942
3501 GCAGGAACTGGTAATACTGTAAGTTTAACAAGACGTAATTGGAACCAAGTATATAAAAATGATGTTGAAACATATACTGAACTTGATATTGATAATTTAT
     A  G  T  G  N  T  V  S  L  T  R  R  N  W  N  Q  V  Y  K  N  D  V  E  T  Y  T  E  L  D  I  D  N  L   975
3601 TTAAAGCTTTTAGTAGTTCTAAAACTTACAGAGAAAGACAAAACGAATCTACTGATTGGAAATGGTTATATATTAGTTTTGCAGCAGAACAAAAATATAA
     F  K  A  F  S  S  S  K  T  Y  R  E  R  Q  N  E  S  T  D  W  K  W  L  Y  I  S  F  A  A  E  Q  K  Y  N  1009
3701 TCAAAGAAAAGTTATCCAAACACAACCTATTGCTAATCCTTTATATTTAAAATTTATGGATAGATTATTTGATATTAATTTTAGGGATGGAAGATTATCA
     Q  R  K  V  I  Q  T  Q  P  I  A  N  P  L  Y  L  K  F  M  D  R  L  F  D  I  N  F  R  D  G  R  L  S  1042
3801 GGATTTAAGTATAATTTATTAAATCAAAATTGTCAAACATTCGCAAAAACACAATCACAATTATTAACTAGAGGTATAACTAATGTACAAATTAATGATC
     G  F  K  Y  N  L  L  N  Q  N  C  Q  T  F  A  K  T  Q  S  Q  L  L  T  R  G  I  T  N  V  Q  I  N  D  1075
3901 AGGGATTATTAGGATTTTTAGAAAATTATAAACAAATAGCTAGAAGAGAATTTAGTTTAAGTTCAGGAATGACTGAAACATCTTGGGGTTCTACATCATT
     Q  G  L  L  G  F  L  E  N  Y  K  Q  I  A  R  R  E  F  S  L  S  S  G  M  T  E  T  S  W  G  S  T  S  F  1109
4001 TGTTGTAAGAGCTCTAGAATATTCTAAATCAAATATTTGTTACTATGCAAAAATAAATAATATGTCAAGTAATATAAAAATTAAAAAGAATAGATATAGT
     V  V  R  A  L  E  Y  S  K  S  N  I  C  Y  Y  A  K  I  N  N  M  S  S  N  I  K  I  K  K  N  R  Y  S  1142
4101 ATTTTAGATAAAACATATAAAAATGATAATACTATTAGAACTGTAATCTGTACTTAATAATATATCTAGAGGACATTTCAAAGTTAATTTATTTTATATC
     I  L  D  K  T  Y  K  N  D  N  T  I  R  T  V  I  C  T                                               1160
4201 TAGAGGTTATTTGAAGGTTAATTTGTTTACAATAAATATTTTTATCAATAAATATTTTATCATAAAGATTATTTTTTAATCATATAATCCATTTAAACCT
4301 TAAATGCTATATAAAGATAAATTTTATCTGCAGATAAATTTATTATTATGTTACTATCTAAATGTAACAGTTGCGCTAAATGTGCTGCTAATAAAGCATT
4401 AAATACTGCTTTATTACAAGAGAAAAATAAAGAAAAAGAATCCAAGAAATTAGAAAAAATAATTGCTGATCAATATATTGCTGCTGAATTAAGAACAAAA
4501 GGATATTATGGACCAAAGAAATAAATATGAAATTCTCGCTGCTAAACAAGAAGAAAATAGAAAATTGAGATATGAATTAGCAAGAAAACAGCGTGAGGAA
4601 ATGACAAGAAAAGAAATTGAAAAACTCAAAAGAATTGAGAAACAACGTATAGAAAATGAAAATAGAGTGCTAGAATTAGAAATTATAAATAATGTAAATA
4701 ATACAAAATATAAATATTAAAATATTTATTATGTTTTATTTAATAACACAAAATATTTTAAAATATTTTTATTCAGAATCATTAATTGATTCTAAACAAA
                                                                                    E  S  D  N  I  S  E  L  C  F   212
4801 ATAATGTAGTTAAAGTAAATAATGGTGTATATTTACAATCATAGCACCAATAATCATTATTCAATATATAATAAAAATAATCTGTATAATGAAGTAAAGT
     L  T  T  L  T  F  L  P  T  Y  K  C  D  Y  C  W  Y  D  N  N  L  I  Y  Y  F  Y  D  T  Y  H  L  L  T   179
4901 CGGATTATCACTAAAATCACAAGTATAATAGTAATCATTTGAATTGTTATTTATAACTATACCATTATCAAAACAGTTTCTACATATATACCACATAGTT
     P  N  D  S  F  D  C  T  Y  Y  Y  D  N  S  N  N  N  I  V  I  G  N  D  F  C  N  R  C  I  Y  W  M  T   147
5001 TTAGGCCATCCATTAAAGTTTCTATCATTAAATTCTTCTGTAGATAAATTTTCAATATCTTCCATTCTTTTATTTCTTATATATCTATAACGCTTGAAAA
     K  P  W  G  N  F  N  R  D  N  F  E  E  T  S  L  N  E  I  D  E  M  R  K  N  R  I  Y  R  Y  R  K  F  I   113
5101 TCATACTAGATTCACCCCAATCAGGATATGTTGTTCTATTATCCAATTTCCATAGCTTCATATATATTTCTAATAATTCATATAATGGTTTAGGTAATTT
     M  S  S  E  G  W  D  P  Y  T  T  R  N  D  L  K  W  L  K  M  Y  I  E  L  L  E  Y  L  P  K  P  L  K   80
5201 ATATCCTTTACTCCAATTCCATGAATCAAACACAGAATCCCACTTATAAATTTTTCTTATTAATTGATCTTCTTTAACTTCTTGTTTTATATCGGCCTCT
     Y  G  K  S  W  N  W  S  D  F  V  S  D  W  K  Y  I  K  R  I  L  Q  D  E  K  V  E  Q  K  I  D  A  E    47
5301 TGATCTTTGATACATACAGGCAATTTATTCCACTCTTTGGATAATTTCTCACGATATGGTATAAATGCTTTATAAGCATAAAATGACAATCCTTTTGGTT
     Q  D  K  I  C  V  P  L  K  N  W  E  K  S  L  K  E  R  Y  P  I  F  A  K  Y  A  Y  F  S  L  G  K  P  E    13
5401 CACAAGATGGTTTATGTAAATCGGTTAAACGTAACATATTGCACAATGTATTAAATTCAAATAAATTAATAATCTAAAGTGCTGTATTTATATGTAAGAT
     C  S  P  K  H  L  D  T  L  R  L  M                                                                     1
5501 AAACTTAGGTTGATATCAACAATCTAGCGCACCTCCTCTTGATAGATTACCCTTTATCATTTTACTCTTAATGGGTTACTTATATATTACTTAGTCATAT
5601 TTAATATATATTAACCAATAACAAACTCGAGTACCGCCTCCTTAAAATAGCTCCAATGCAGCCTCGAGAATGTTGCGATAAGCTCCGTTATCTAGGCGGT
5701 ATTCGGCGCTTGTGACATCACCAACTTCGATCAAGACCCTCCCAGGCGGTATCTGTCGAGGCTGCTATTGGATATTTGCAAATTTTCATACAAAATGGCA
5801 GACAAAAATTTCAAAGTCTCTTATCACTGACGTAGATCTTGATCGCGAAGGCAGCCTATGATAAAACAACCTTATCTCCGCTATCAGGGCGGTATAAGTC
5901 AGTTTTTCTTTTGTCTCTTTCACTCTTATGGGGTTTTGCTAAAGAGTGAGCGAGACAGATATATTAGATTAGATAAGATAGGAGAGATGGCGAGTACCGC
6001 CTCGCTCAATACCGCCCCAGTATACACACAC
```

Fig.5 (Continued)

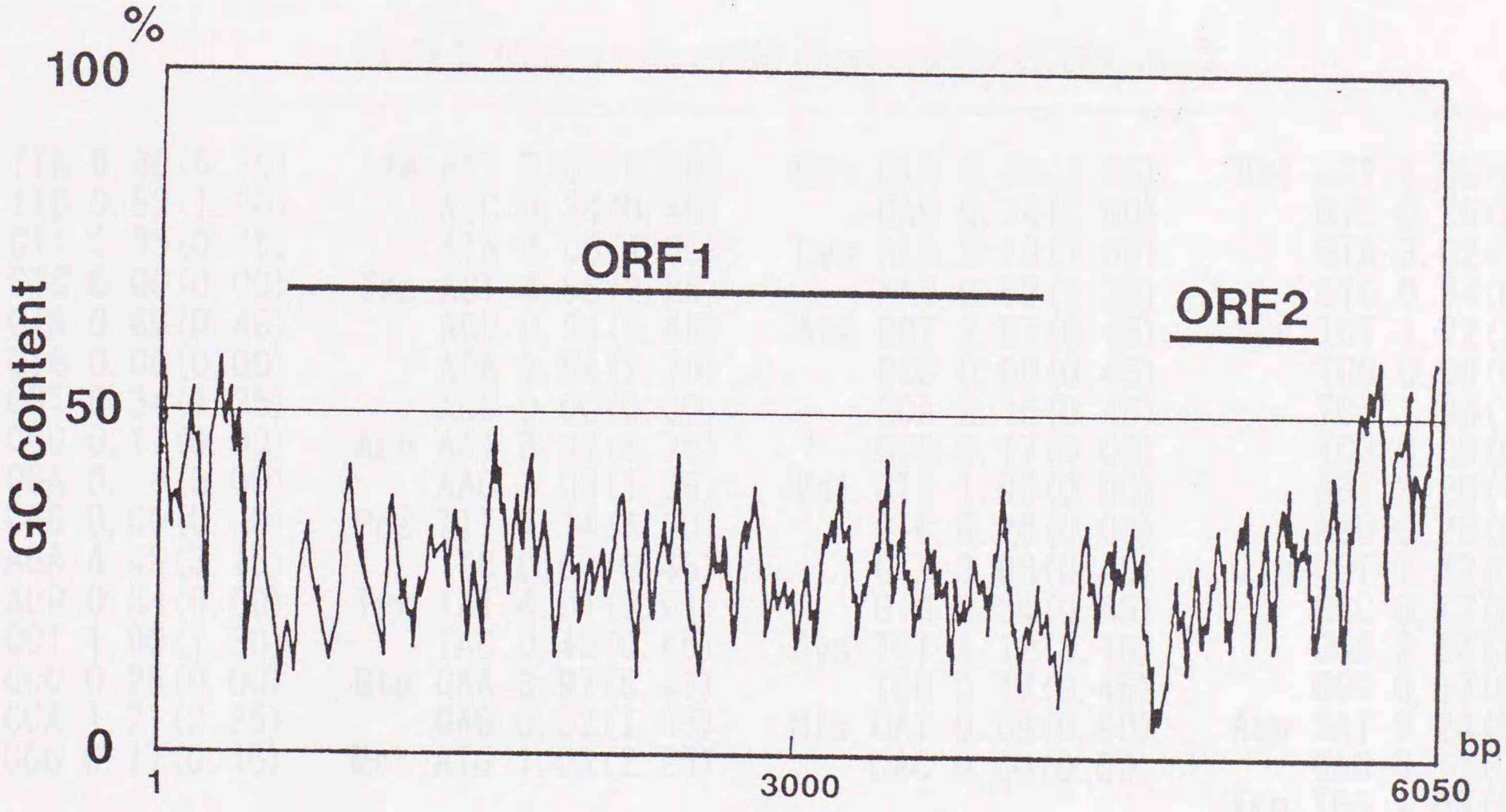


Fig.6 GC content distribution diagram of the nucleotide sequence of VD2.

Table 1. Codon usage (%) observed for ORF1 and 2

Leu	TTA	6.90 (6.76)	Ile	ATT	5.34 (1.80)	Gln	CAA	4.74 (1.35)	Val	GTT	1.90 (0.90)
	TTC	0.52 (1.80)		ATC	0.34 (0.45)		CAG	0.34 (0.00)		GTC	0.26 (0.00)
	CTT	0.95 (0.45)		ATA	4.05 (4.05)	Lys	AAA	3.19 (7.66)		GTA	3.02 (0.45)
	CTC	0.00 (0.00)	Tre	ACT	4.66 (2.25)		AAG	0.52 (1.35)		GTG	0.34 (0.45)
	CTA	0.69 (0.45)		ACC	0.34 (0.45)	Ala	GCT	2.07 (0.45)	Ser	TCT	1.72 (2.25)
	CTG	0.00 (0.00)		ACA	2.84 (2.70)		GCC	0.09 (0.45)		TCC	0.09 (0.45)
Arg	CGT	0.34 (1.35)		ACG	0.00 (0.00)		GCA	2.16 (0.45)		TCA	1.90 (1.80)
	CGC	0.17 (0.00)	Asn	AAT	8.97 (6.76)		GCG	0.17 (0.00)		TCG	0.09 (0.00)
	CGA	0.26 (0.00)		AAC	1.03 (1.35)	Val	GTT	1.96 (0.90)		AGT	3.20 (1.35)
	CGG	0.00 (0.00)	Phe	TTT	4.14 (4.50)		GTC	0.26 (0.00)		AGC	0.26 (0.00)
	AGA	4.48 (3.15)		TTC	0.60 (0.45)		GTA	3.06 (0.45)	Gly	GGT	1.12 (0.90)
	AGG	0.34 (0.00)	Tyr	TAT	4.91 (9.01)		GTG	0.34 (0.45)		GGC	0.17 (0.00)
Pro	CCT	1.90 (1.80)		TAC	0.43 (0.45)	Cys	TGT	1.12 (3.15)		GGA	2.84 (1.35)
	CCC	0.26 (0.00)	Glu	GAA	3.97 (5.41)		TGC	0.17 (0.45)		GGG	0.17 (0.00)
	CCA	1.21 (2.25)		GAG	0.52 (1.35)	His	CAT	0.69 (0.90)	Asp	GAT	5.24 (8.11)
	CCG	0.17 (0.45)	Met	ATG	1.03 (2.25)		CAC	0.00 (0.00)		GAC	0.17 (0.00)
									Trp	TGG	1.03 (4.05)

Values in parentheses are the codon usages for ORF2

が明らかになった。大きな方のORF(ORF1)は3513塩基で構成されており、最初のATGコドン(675-677)より上流に33塩基の非翻訳領域を含んでいた。もしORF1から転写されたmRNAがスプライシングを受けずに、かつKozack(1986)の提唱した規則に従って最初の ATGコドンから翻訳されたとすると 1160アミノ酸、133kDaのタンパク質がコードされていることになる。一方、小さい方のORF(ORF2)はORF1とは相補的なDNA鎖上に存在しており、36塩基の非翻訳領域を含めて702塩基で構成されていた。ORF2から転写されるmRNAがスプライシングを受けずかつ最初のATGから翻訳されたとすると222アミノ酸、27kDaのタンパク質がコードされていることになる。ORF1,ORF2の翻訳開始コドンのすぐ上流には４塩基から成る共通配列(CAAT)が存在していた。これはショウジョウバエの遺伝子など、昆虫の翻訳開始コドンのすぐ上流に見られる共通配列(C/AAAC/A)に類似していた(Cavener,1987)。ORF1,ORF2の塩基配列より推定されるアミノ酸配列について解析した結果、これらORF間のコドン利用率は大きく異なっていた(Table 1)。また疎水性アミノ酸と親水性アミノ酸の比率はORF1では(44:25)であるのに対してORF2では(37:39)と大きく異なっており、ORF1,ORF2の塩基配列から推定されるタンパク質の物理化学的な性状がそれぞれ異なっていることを示していた(Fig.6)。一方これらタンパク質の等電点は、共にpH5.0-5.5と類似したものであった。またORF2の塩基配列より推定されるアミノ酸配列上２カ所に Zinc finger DNA-binding motif(Berg,1988)に類似した配列(Cys-X-X-Cys)が存在していた(Fig.5)。

VD2にコードされるタンパク質の機能を推定する目的で EMBLデータベースを利用したアミノ酸配列ホモロジー検索を行った。しかしVD2に存在するORFの塩基配列から推定されるアミノ酸配列は、既に報告されているタンパク質のアミノ酸配列と有意な相同性を示さなかった。

ORFの周辺領域

VD2に存在しているORFが遺伝子として機能しているかどうかを調査するため、ORF周辺領域の転写に関与すると考えられるシグナル配列についての検索を試みた。

まずORF1の翻訳開始コドンの上流約50塩基には無脊椎動物における cap site sequence(ATCAGTTA; nts 609-616,ATCAGTTTA; nts 618-626)が存在していた(Fig.5)。さらに30塩基上流には TATA box様配列(TATAAA; nts 570-575)が存在していた(Fig.5)。その他にも遺伝子の転写制御に影響を与えると考えられている CAAT box(GGPyCAATCT)と類似した配列(CAAT; nts 261-265, (complementary strand) nts 375-379,413-417)がORF1上流域に存在していた(Fig.1)。またこのようなシグナル配列(TATA box; nts 5577-5589, CAAT box; nts 5766-5770, (complementary strand) nts 5614-5618, 5652-5656)はORF2の上流域においても観察された(Fig.1)。一方これらORFの下流域にはpolyadenylation signal(AATAAA)に類似した配列を含む A+T-richな繰り返し配列(ORF1 AATAAATATTTTTCAT; nts 4227-4242, AATAAATATTTTATCAT; nts 4244-4260, ORF2 AATAAAAATATTTTAAAAT; nts 4770-4752, AATAAATATTTTAATAT; nts 4727-4711)が存在していた(Fig.5)。ORF2のすぐ下流には別にもう１つpolyadenylation signal(AATAAA; nts 4734-4711)が存在していた(Fig.1)。このORF下流の繰り返し配列は polyadenylation signalの他にも小さな回文配列(AAAATATTTT)を含んでおりこれらORFからの転写の終結に関与している可能性が考えられた。その他にもカイコの転写因子結合部位(Suzuki and Suzuki, 1988)である AATTTAATTTや ATTTATTTに類似した短い A+T richな配列(nts 532-539, 5465-5458)や、いくつかのハウスキーピング遺伝子、ウイルスの初期遺伝子の上流域に存在する G+C-rich motif(Alberts *et.al.*, 1989)と類似した配列、そしてSV40の初期遺伝子(Gidoni *et.al.*,1994)やヘルペスウイルスのチミジンカイネース遺伝子(McKnight and Kingsbury,1982)、細胞性のハウスキーピング遺伝子(Alberts *et.al.*,1989)のような解析の進んでいる遺伝子

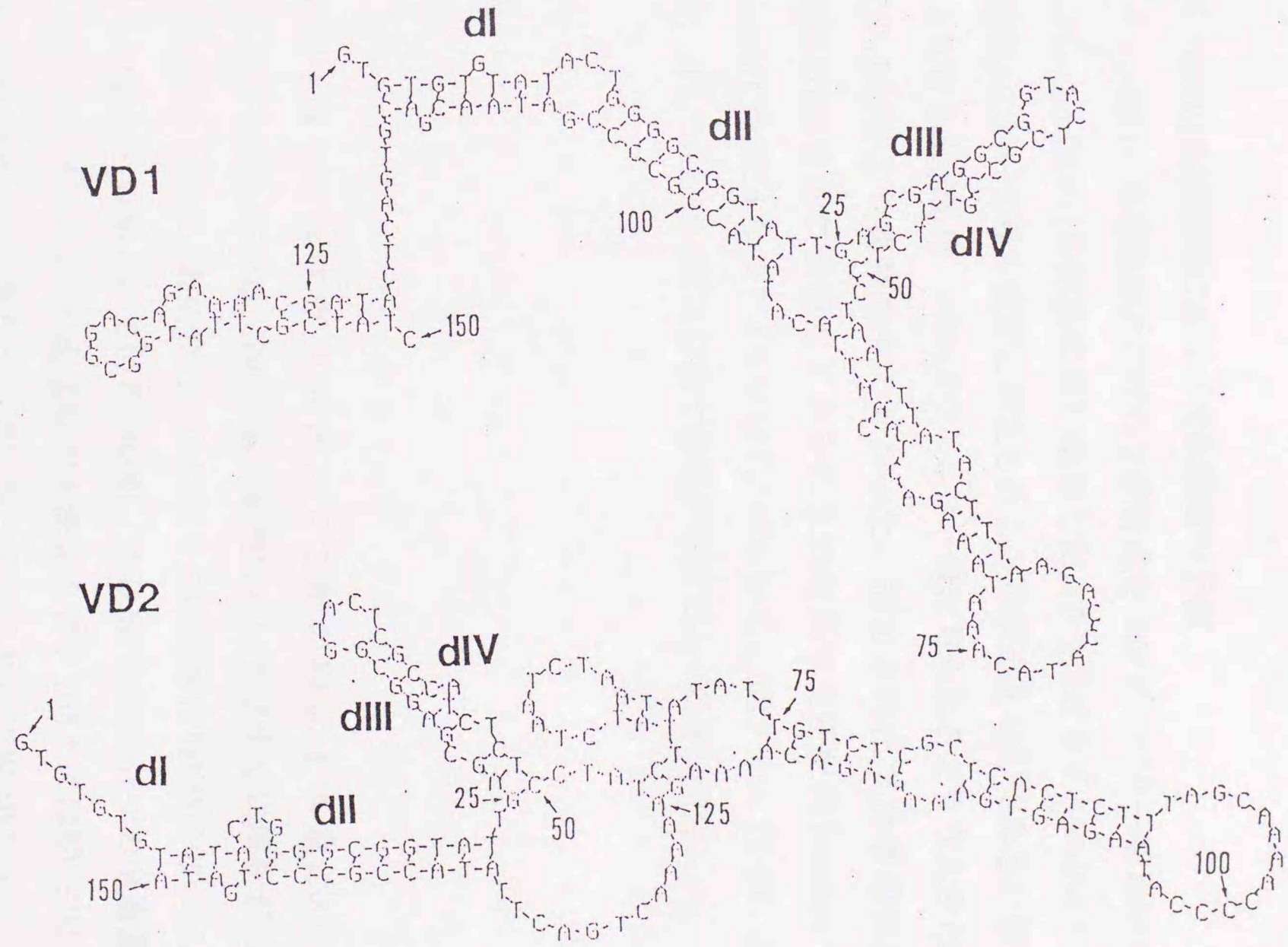


Fig.7 Predicted secondary structure of the terminal regions of VD1 and VD2.

d Ⅰ: structural domain Ⅰ (nts 1-11)

d Ⅱ: structural domain Ⅱ (nts 12-23)

d Ⅲ: structural domain Ⅲ (nts 24-37)

d Ⅳ: structural domain Ⅳ (nts 38-53)

のプロモーター領域に見られるSp1 binding motif (G/TG/AGGC/AGG/TG/AG/A G/T and reversed sequence)がORFの上流域に存在していた(Fig.5)。特にORF1の上流域にはバキュロウイルスの初期遺伝子のプロモーター領域で共通して見られる(TATA/CAGT)(Blissard and Rohrman,1990)が存在していた(Fig.5)。

BmDNV-2DNAの末端領域における２次構造の予測

ウイルスDNAの末端領域における２次構造をコンピューターを用いて、Zuker and Stiegler(1981)の方法に従い推定した。Fig.7はウイルスDNAの末端領域(150塩基)において最も安定と考えられる２次構造を示してある。解析の結果推定された２次構造は、パルボウイルス一般に見られるような大きなヘアピン構造ではなくより複雑なものであった。推定された２次構造において、VD1,VD2のDNA末端に共通してみられる53塩基の共通配列(common terminal sequence;CTS)は４つのドメイン(dⅠ, nts 1-11; dⅡ, nts 12-23; dⅢ , nts 24-37; dⅣ, nts 38-53)に分割する事が可能であった(Fig.7)。

考察

BmDNV-2はウイルスゲノムとして２組の線状１本鎖DNA(VD1,6.6kb; VD2,6.1kb)を持っている。VD1の塩基配列についてはすでに解析が行われており(Nakagaki *et,al.*,未発表)、VD1には４つの大きなORF(VD1ORF1,2,3,4)が存在していることが示されている(私信)。本研究ではBmDNV-2の全塩基配列を明らかにする目的で、VD2の塩基配列を決定した。VD2上には約133kDa(p133)と27kDa(p27)のタンパク質をコードし得る２つの大きなORFが存在していた。これらORFの周辺領域には真核細胞内において転写に必要と考えられているシスのエレメント様配列がそれぞれ機能し得ると考えられる位置に存在しており、宿主細胞の RNA polymeraseⅡがこれらORFからの転写に関与していることを強

く示唆していた。またTable 1に示した通り、ORF1とORF2の間でコドン利用率(アミノ酸組成)は大きく異なっていたが、これらORF間でコドン選択パターンは極めて類似していた。現時点において、塩基配列のデータのみから、これらORFがBmDNV-2感染細胞内で実際に発現しているか否かを論ずるのは困難であるが、もし細胞内におけるタンパク質の翻訳が、tRNAの量とコドンの選択性に強い相関関係を持つとすれば(Ikemura, 1982)、これらの遺伝子は実際に機能している事を示唆している。この点については次章でその発現が確認された。

ところで、BmDNV-2のウイルス粒子は６つの構成タンパク質(VP1, 46.5kDa; VP2, 49kDa; VP3, 51kDa; VP4, 53kDa; VP5, 118kDa; VP6, 120kDa)で構成されている。これら構成タンパク質の内、主要な４つの構成タンパク(VP1, VP2, VP3, VP4)は、ペプチドマップやその他疫学的な解析から共通のアミノ酸配列を含んでいることが示されている(私信)。またVP4のＮ末端がペプチドシーケンスされた結果、そのアミノ配列はVD1ORF2の塩基配列から推定されるアミノ酸配列に含まれており、このORFに４つ(VP1, VP2, VP3, VP4)の主要構成タンパク質がコードされていることが示唆された(Nakagaki *et. al.*, 私信)。他の２つの高分子構成タンパク質(VP5, VP6)がコードされる場所については現在のところまだ不明であるが、VD2に存在する２つのORFの内、ORF1についてはその大きさから考えてこれらのタンパク質をコードしている可能性は残されている。いずれにしても、この結果はVD2の情報のみでウイルス粒子を構成することは不可能であることを意味している。

ところで、BmDNV-2の増殖において２種のDNA(VD1, VD2)が実際に必要であると考えると、ゲノム末端に53塩基の共通末端配列が存在していることも説明しやすい。すなわち、全ての分節ゲノムを持つDNAウイルスは、ウイルスの粒子中に含まれるレプリカーゼやエンキャプシデーションの認識部位として、それぞれのDNAにおいて共通配列を含んでいるはずだからである。そこで、この共通末端配列の重要性をさらに詳しく調査するためにZuker and Stiegler(1981)が提唱した方法でゲノム末端における２次構造を推測した。その結果、ゲノム末端150塩基においてFig. 7に示したような複雑な構造が予測でき、特に末端の

共通配列(CTS)は４つの構造的領域dI(nts 1-11),dII(nts 12-23),dIII(nts 24-37),dIV(nts 38-53)に分割できた。この領域(CTS)において、Sp1タンパク質結合部位様配列(SBC)はdIIIとdIVによって形成されるステムループ構造上に存在し、また別のSBCを含むdIVがやはり共通末端配列よりも内側のSBCとステム構造を形成する。このSBCは遺伝子の転写に関与すると考えられるシグナルであるが、他の動物ウイルスや細胞において実際に機能している転写シグナルの多くは複製開始点の近傍に存在しており、両者の機能発現は様々な点で関連しあっている。この事からも本ウイルスの共通末端配列(CTS)がウイルス遺伝子の転写および複製に重要な役割を果たすことが推測される。

以上、現時点でBmDNV-2の２種のウイルスゲノム(VD1:Nakagaki *et.al.*,未発表; VD2:本論文)の一次構造は決定され、その結果ORFの大きさや位置、そしてウイルス遺伝子の発現制御に関わると考えられる配列などが明らかになった。一方、主要構成タンパク質(VP1-4)がVD1のORF2にコードされている可能性が示唆されたものの、ゲノム上にコードされていると考えられる他のウイルスタンパク質の機能に関しては全く不明のままである。本ウイルスの増殖機構を明らかにするためにはさらにこれらのウイルスタンパク質の発現、および機能について解析することが不可欠である。

第V章　ウイルスタンパク質のコード領域の同定と機能解析

目的

これまでに述べたようにBmDNV-2のゲノムDNAの全塩基配列が決定され(Bando *et. al.*, 1992; Nakagaki *et. al.*, 未発表; 本論文IV章)、本ウイルスは今までに報告された線状１本鎖DNAウイルス(パルボウイルス)とは大きく異なった遺伝子構造を持つ全く新しいタイプのウイルスである事が判明した。また第III章において行ったウイルスゲノムの複製中間体の解析結果、および第IV章で行った遺伝子構造解析の結果は、本ウイルスがパルボウイルスとは異なる様式でDNA複製を行っていることを示唆していた。この様な新型ウイルスの増殖機構は如何なるものか現在全く不明である。また、遺伝子構造は明らかになったものの、ゲノムにコードされているウイルスタンパク質の機能についてはほとんど明らかにされていない。

そこで本実験では感染細胞におけるウイルス遺伝子の発現を調査すると共に、前章までで明らかになった遺伝子構造を基にウイルスゲノムにコードされるタンパク質の機能について解析した。

材料と方法

ウイルス、宿主昆虫、および抗血清

BmDNV-2のウイルス粒子は感受性カイコ(中国種:支124)に感染させた後、Nakagaki and Kawase (1980)の方法に従って精製した。次に、100μgのウイルス精製ウイルス粒子をPBSに懸濁させ、フロイントアジュバントと結合させた後、モルモットに筋肉注射した。そしてモルモット体内で抗血清が作られるま

で、この操作を２週間おきに４回繰り返した。モルモット体内における抗血清の力価は免疫前と免疫４回後３日目のモルモット血清を用いてテストした。すなわち、ポリスチレン製の96穴培養プレートの各穴底面を１μgの精製ウイルス粒子でコートし、スキムミルクでブロックした後、BSAを含むPBSで希釈した抗血清と反応させた。２次抗体としてはペルオキシダーゼを結合させたモルモットIgGに対するウサギのIgG(Organon Teknika Corp.)を用いた。その結果、抗BmDNV-2抗血清の力価は免疫４回３日目の血清では204,800であった。次にVD20RF1にコードされるタンパク質に対する抗体を作製する目的で、塩基配列から推定されるアミノ酸配列のＣ末端側の親水性領域(amino acid number 980-997;SSKTYRERQNESTDWKW)を合成し、 keyhole limpet hemocyanin(KLH)と 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride(EDC)カップリング法(Williams and Ibrahim, 1981)を用いて結合させた。そして以下、ウイルス粒子に対する場合と同様の手順で合成ペプチドに対する抗血清を作製した。得られた抗合成ペプチド抗血清の力価は102,400であった。

ウイルス特異的 poly(A)$^{+}$RNAの抽出とノーザンブロット・ハイブリダイゼーション

ウイルスmRNAは感染４日目のウイルス感染幼虫(支124)の中腸組織よりQuick Prep^{R} Micro mRNA Purification Kit(Pharmacia Biotech)を用いて抽出、精製した。具体的にはウイルス感染幼虫の中腸組織(約100mg)を guanidinium thiocyanateと N-lauroyl sarcosineを含む溶液中で磨砕した後、磨砕液にOligo(dT)-celluloseを加え、poly(A)$^{+}$RNAを特異的に吸着させた後、吸着したpoly(A)$^{+}$RNAを抽出回収した。

精製したpoly(A)$^{+}$RNA(２μg)は変性後、ホルムアルデヒドを含む１％変性アガロースゲルで分離し、ナイロンメンブレンにキャピラリー法を用いてトランスファーした。ノーザンブロット・ハイブリダイゼーションのプローブは、ウイルスDNAを含むクローンpY1066,pY1171(Bando *et. al.*, 1992)より切り出したものを用いた。メンブレン上のウイルス特異的mRNAは［α^{-32}P］

(110Tbp/mmol, Amersham)でラベルしたウイルスDNA(VD1,VD2)をプローブに用いて検出した。

リバースPCRとサザンブロット・ハイブリダイゼーション

VD2より転写されるmRNAの検出はRT-PCRとサザンブロット・ハイブリダイゼーションを組み合わせた方法で行った。プライマーは第Ⅲ章で用いたDNA synthesizer(Applied Biosystems,Inc.,CA)で合成した。感染中腸から抽出したpoly(A)$^+$RNAを鋳型にしてOligo(dT)$_{20}$-M4 adaptor primerを用いて逆転写反応を行った後、BmDNV-2ゲノムDNA中に存在する５つのORFに特異的なプライマー 1105(ATGATAAGAAAGCCAT; nts 6286-6271), 1205(ATGGGTAGAGTACTTG; nts 473-488), 1405(ATGGCATTCAACGCTC; nts 310-325), 2105(ATGAATTTAAAGGG; nts 675-688),2205(ATGTTACGTTTAACCG; nts 5437-5422)の１つと M4プライマーをそれぞれ組み合わせてPCRを行った。プライマーの位置はFig.8に示した。増幅したcDNA断片は0.8%アガロースゲル電気泳動で分離した後、キャピラリー法でナイロンメンブレン上にトランスファーした。メンブレン上のウイルス特異的cDNA断片はDIGラベルしたウイルスDNAをプローブに用いたサザンブロット・ハイブリダイゼーションにより検出した。

λgt11 cDNA ライブラリーの構築とスクリーニング

２本鎖cDNAは Gubler-Hoffmann(1983)の方法に従って合成した。合成したcDNA断片はその末端に*Eco* RIアダプターを付加した後、λgt11ベクター(Stratagene)中に挿入した。そしてファージ粒子へのパッケージングは Gigapack^{R}Ⅱ Gold Packaging Extracts(Stratagene)を用いて行い、作製したλgt11 cDNA ライブラリーのイムノスクリーニングは精製ウイルス粒子に対する抗BmDNV-2抗血清を用いて行った。スクリーニングにより得られた陽性クローンのインサートDNAは pBluescriptⅡ SK$^-$(Stratagene)の*Eco* RIサイトにサブクローニングした。

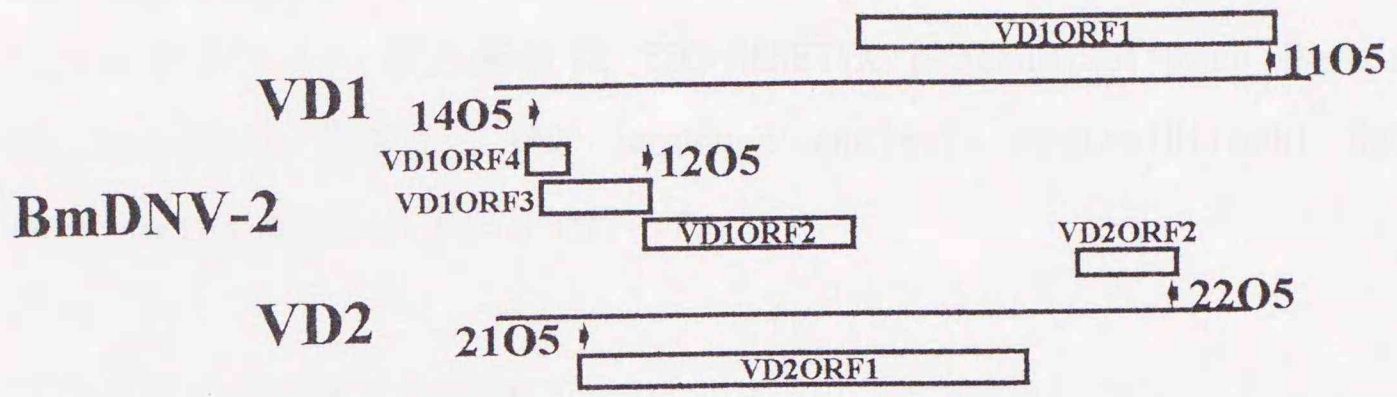


Fig.8 Genome organization of BmDNV-2 and the primers for RT-PCR analysis.

1105 : 5'-ATGATAAGAAAGCCAT-3'
1205 : 5'-ATGGGTAGAGTACTTG-3'
1405 : 5'-ATGGCATTCAACGCTC-3'
2105 : 5'-ATGAATTTAAAGGG-3'
2205 : 5'-ATGTTACGTTTAACCG-3'

シーケンシング

ウイルス特異的cDNAのシーケンシングは Sanger *et. al.* (1977)の方法に従い、T7 DNA polymerase(US Biochemical Corp.,Cleveland,OH)と［α $^{-35}$S］dATP(Dupont,NEN Research Products,Boston,MA)を用いたダイデオキシ法で行った。G+C contentが高く、塩基配列を解析し難い領域については反応溶液中に7-deaza GTP(U.S. Biochemical Co.)を加え、T7 DNA polymeraseの代わりに *Taq* DNA polymerase(U.S. Biochemical Co.)を用いることにより解析した。シーケンシングのプライマーはDNA synthesizer(Applied Biosystems, Inc.,CA)で合成した合成オリゴヌクレオチドを用いた。

シーケンスデータの解析は SDC-GENETYX program(Software Development Co.,Ltd.)およびDNASIS DNA sequence analysis system(Hitachi Software Engineering America,Ltd.)で行った。

プライマーエクステンション

VD10RF3,4を含む転写産物を解析するためにプライマーエクステンションを行った。プライマーエクステンションのプライマーにはORF3と4の共通部分に相補的な合成オリゴヌクレオチドext34(5'-GGAGATGAGATGTTCGATATCAGCG-3';nts 555-531)(Fig.15)を用いた。まずext34をT4 polynucleotide kinase (Takara Shuzo Co.,Ltd.)と［γ $^{-32}$P］ATP(Dupont,NEN Research Products, Boston, MA)を用いて末端ラベルした。次に5ngの末端ラベルしたプライマーを2μgのウイルスmRNAと 40℃,45分アニーリングさせた後、0.5μgのハイブリッドRNAを反応溶液中(24mM Tris-HCl,pH8.3,16mM $MgCl_2$,8mM DTT,0.4mM dATP,0.4mM dCTP,0.4mM dTTP,0.8mM dGTP,3U AMV reverse transcriptase)中で、50℃,45分反応させ、プライマーを伸張させた。反応産物は 8Mの尿素を含む 8%アクリルアミドゲル電気泳動で分離し、乾燥させた後、X線フィルムを用いて検出した。

ウイルス構成タンパク質発現プラスミドの構築と発現

ウイルスゲノム上の大きなORF(VD10RF1,VD10RF2)にコードされるタンパク質を発現させるためにまず、VD10RF1の3'末端側領域を特異的なプライマーである D1015E(5'-GAGGCCTTTAGAGATAC-3'; nts 4390-4374) と D1013S(5'-GGTCACCACCAATGCG-3'; nts 2828-2843)(Fig.9)を用いたPCRで増幅した。同様にVD20RF1の3'末端側領域も２種類の特異的プライマーD2015E (5'-GGTAATAGATTAGATG-3' ; nts 2667-2682)とD2013S(5'-ACATTTAGCGCAACTG-3' ; nts 4383-4368)(Fig.9)を用いて増幅した。VD10RF1とVD20RF1の３'末端側領域をバクテリアでの発現ベクター pMAL C2(Promega)のクローニングサイトに挿入し、マルトース結合タンパク質とウイルスタンパク質の融合タンパク質発現プラスミドを構築した(Fig.9)。融合タンパク質は、プラスミドを導入した大腸菌(Dh5α)の培養液(OD_{600}:0.4-0.5)に最終濃度0.3mMとなるように IPTGを加え、37℃,６時間振とう培養を行うことで発現させた。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)とイムノブロットアッセイ

大腸菌ペレットを10倍量の蒸留水に懸濁し、超音波破砕機を用いて十分に細胞を破壊した後、等量のサンプルバッファー(125mM Tris-HCl, 2% SDS, 100mM dithiothreitol, 25% sucrose, 0.005% bromophenol blue)を加えた。混合液は沸騰水で 5分変性させた後、SDS-ポリアクリルアミドゲル(7.5%ゲル)電気泳動を行った。アクリルアミドゲル上で分離したタンパク質は Bio-Rad Transblot cell^{TM}(Bio-Rad Lab.)を用いて、85V、２時間、電気的にニトロセルロースメンブレン上へトランスファーした。タンパク質をトランスファーしたニトロセルロース膜は 0.02% Tween 20を含む燐酸緩衝液(PBS/T)で簡単に洗浄した後、３%スキムミルクを含む PBS/T中に室温で２時間浸した。スキムミルクで抗体の膜への非特異的結合をブロックしたニトロセルロース膜は、次に１%抗BmDNV-2精製ウイルス粒子抗血清、あるいは抗合成ペプチド抗血清を含む PBS/Tに室温で約30分浸し、続いてペルオキシダーゼを結合させた２次抗体と反応させた。

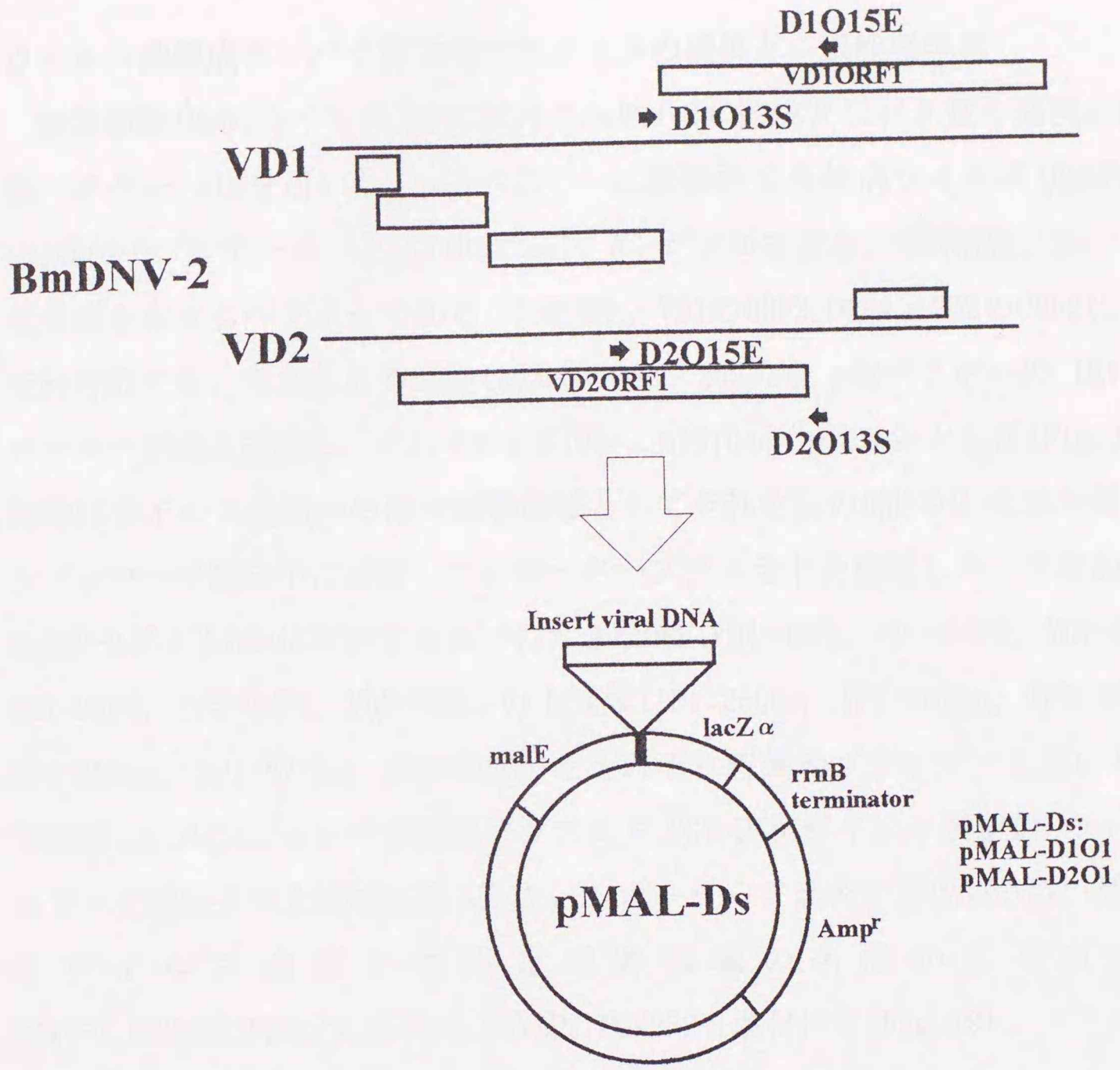


Fig.9 Fusion protein expression plasmids(pMAL-Ds).

D1O15E : 5'-GAGGCCTTTAGAGATAC-3'
D1O13S : 5'-GGTCACCACCAATGCG-3'
D2O15E : 5'-GGTAATAGATTAGATG-3'
D2O13S : 5'-ACATTTAGCGCAACTG-3'

膜上のタンパク質に結合した２次抗体は 4-chloro-1-naphthol を含む methanol/PBS(1:4)にニトロセルロース膜を浸すことで発色検出した。

ウイルス非構成タンパク質発現プラスミドの構築と一過性発現系

培養細胞(BmN;カイコ由来)におけるBmDNV-2非構成タンパク質の発現には発現ベクター pISを用いた。pISベクターは家蚕核多角体病ウイルス(BmNPV)のIE1遺伝子プロモーターと SV40の poly Aシグナルを含み、BmN細胞において高発現能を有するベクターである(未発表)。VD1のORF3,ORF4とVD2のORF2にそれぞれ対応すると考えられるcDNA(103c, 104c, 202c)を pISベクターの IE1プロモーター下流に連結し、それぞれpIS103c, pIS104c, pIS202cとした(Fig.10)。同時にウイルス遺伝子の推定制御領域としてそれぞれのORFの上流域を蛍のルシフェラーゼ遺伝子に連結したレポータープラスミドを構築した。すなわち、BmDNV-2ゲノムDNAに存在する６つの大きなORF(VD1-ORF1, VD1-ORF2, VD1-ORF3, VD1-ORF4, VD2-ORF1, VD2-ORF2)の上流域(1P1:256bp, 1P2:201bp, 1P3:472bp, 1P4:309bp, 2P1:674bp, 2P2:594bp)をそれぞれ特異的プライマーを用いたPCRで増幅し、ルシフェラーゼ発現プラスミド PGV-P(東洋インキ製造㈱)のルシフェラーゼ遺伝子の上流域に挿入した。レポータープラスミド(PGVs)は、挿入したウイルス遺伝子の推定制御領域の名前からそれぞれPGV1P1,PGV1P2,PGV1P3,PGV1P4,PGV2P1,PGV2P2と名付けた(Fig.10)。

プラスミドDNAの培養細胞への導入とルシフェラーゼアッセイ

細胞(BmN)は10%牛血清を含む極東TC-100培地(極東製薬工業㈱)で培養した。プラスミドの培養細胞への導入は LipofectAMINE^{TM} Reagent(GIBCO BRL)を用いて行った(Fig.11)。10μgのプラスミドとLipofectAMINEの複合体を含むTC100培地を1×10^6-3×10^6個の単層培養細胞の培養液に加え、26℃、約18時間保温する事で複合体を細胞に取り込ませた。そしてプラスミド-LipofectAMINE複合体を含む培養液を10%牛血清を含む TC-100培地に置き換えた後、さらに72時間培養した。

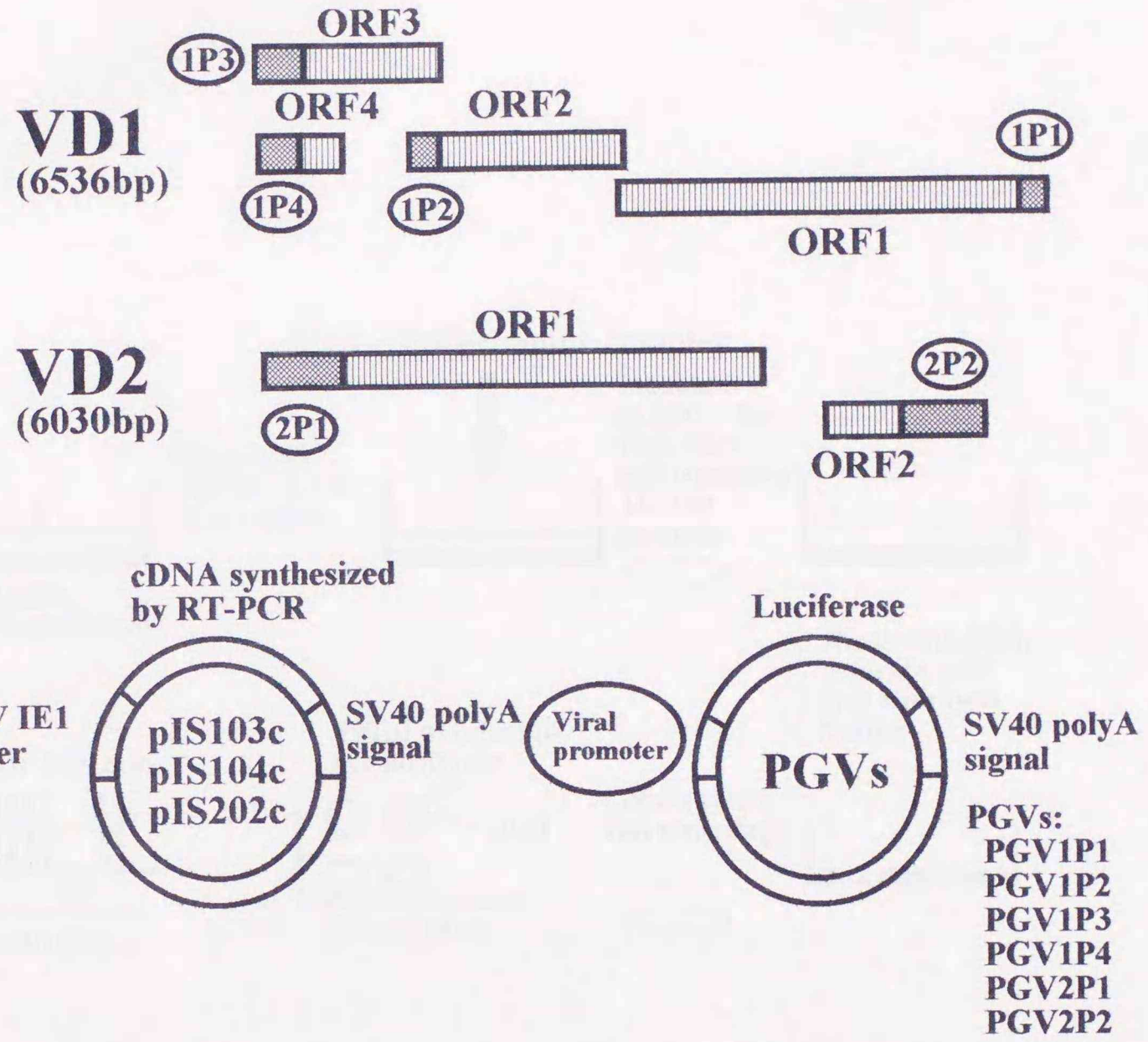


Fig.10 Construction of viral protein expression plasmids and reporter plasmids.

: viral protein coding region

: tentative regulatory promoter region

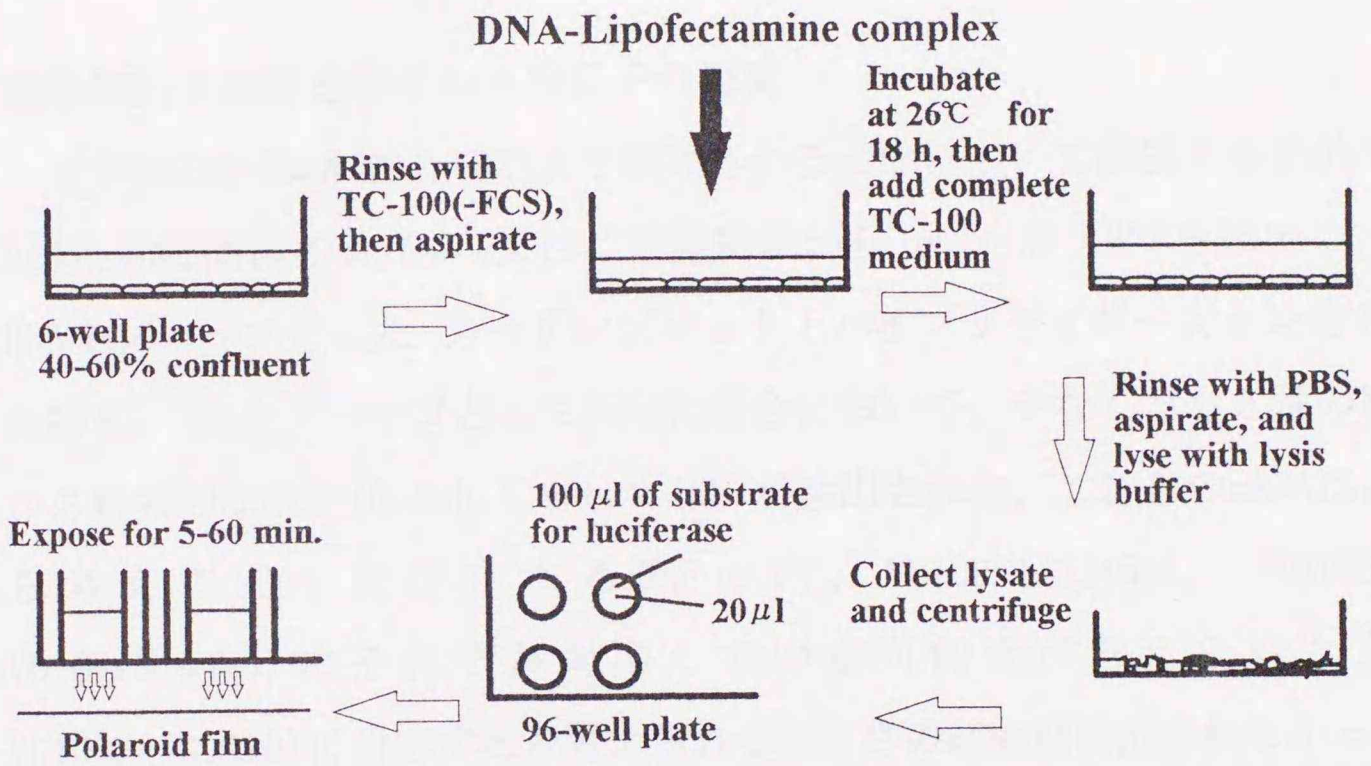


Fig.11 Diagram of procedure for luciferase assay.

72時間後、回収した細胞に 100μ1の細胞溶解液(東洋インキ製造㈱)を加え細胞を溶解させた。細胞内に発現されたルシフェラーゼは、細胞溶解液20μ1に100μ1の基質(ルシフェリン)溶液(東洋インキ製造㈱)を加えたときの発光を、ポラロイドフィルム(667,612)を感光させることにより検出した。

結果

感染細胞におけるウイルス遺伝子の発現

まずBmDNV-2DNA(VD1,VD2)より転写されるmRNAについて解析する目的で、BmDNV-2感染96時間後のカイコ(支124)中腸組織から poly(A)$^+$RNAを抽出し、ウイルスDNAをプローブとした ノーザンブロット・ハイブリダイゼーションを行った。その結果、VD1をプローブとして用いた場合において、少なくとも３種の明瞭なウイルス特異的なmRNA(3.6kb,1.6kb,1.1kb)が検出された。これらのmRNAは、大きさから考えてVD１に存在するORFの内、VD1ORF1(3345b), VD1ORF2(1497b), VD1ORF3(948b)にそれぞれ対応している可能性が考えられた(Fig.12)。VD1ORF4(0.4kb)に対応すると考えられる大きさのmRNAは検出されなかった。一方、VD2をプローブとして用いた場合、長時間露光してもVD2に存在するORFの大きさに相当する位置にはわずかなシグナルが検出されるのみであった(Fig.12)。ノーザンブロット・ハイブリダイゼーションで検出できなかったものについては、発現していないかもしくはその蓄積量が極めて少ないことが考えられる。そこでORFに特異的なプライマー(1105,1205,1405,2105,2205)を用いたRT-PCRとサザンブロット・ハイブリダイゼーションを組み合わせることでmRNAの検出感度を高めることを試みた。それぞれのORFからのmRNAに対応するPCRにより増幅した後、ウイルスDNAをプローブとしたサザンブロットハイブリダイゼーションによりcDNA断片を解析した結果、BmDNV-2のゲノムDNAに存在している５つのORFにそれぞれほぼ一致す

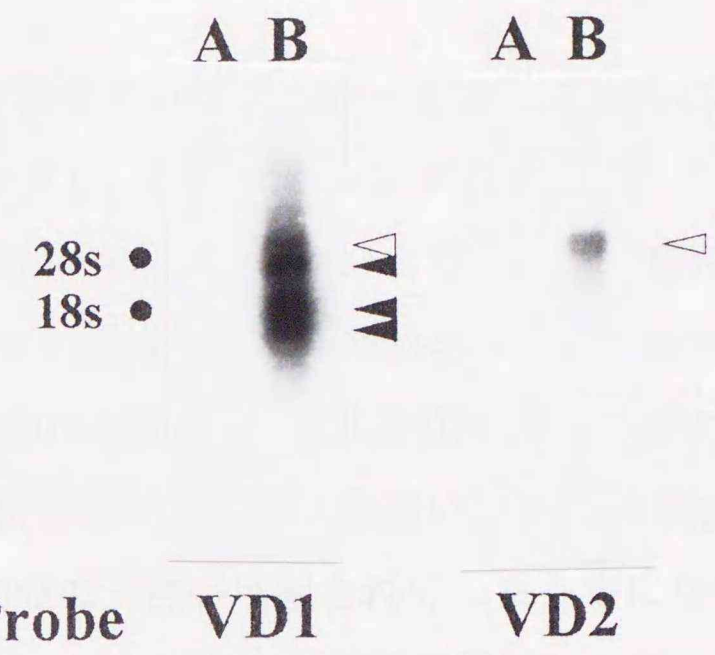


Fig.12 Northern blot analysis of BmDNV-2 mRNA.

A : rRNA from Cos cells as a molecular marker
B : mRNA extracted from BmDNV-2-infected midgut
◄ : viral specific polyA$^+$ RNA
◁ : viral genome DNA?, see text

る大きさのcDNA断片(VD1ORF1:3.4kb; VD1ORF2:1.5kb; VD1ORF4:0.4kb; VD2ORF1: 3.6kb; VD2ORF2: 0.7kb)が検出された(Fig.13)。そしてそれ以外にもVD1ORF1特異的プライマー(1105)ではより低分子の位置(約1.5kb付近)に不明瞭なシグナルが検出され、またVD1ORF4特異的プライマー(1405)を用いた場合にも1.1kbの位置にウイルスDNAとハイブリダイズする強いシグナルが検出された(Fig.13)。この結果は少なくともBmDNV-2が感染した細胞内において、転写量に差はあるもののVD1,VD2双方からmRNAが転写されていることを示している。

ところでVD1ORF4に特異的なプライマーを用いた場合に検出されたcDNA断片(1.1kb)をクローニングし、シーケンシングした結果、このcDNAクローンにはORF4の開始コドンからORF3の終止コドンまでの全ての配列が含まれていた。すなわち、ORF4に対応するmRNAは下流のORF3をも含んだ形で転写されていることになる。そうするとVD1のORF3から転写されるmRNAに対するcDNAを得る目的でVD1ORF3の最初のATGを含むプライマーを用いてcDNAを増幅したとしても、このVD1ORF4に対応するcDNAの一部が増幅されてしまう事になり、ORF3,ORF4の領域から転写されるmRNAについてはより詳細な解析が必要となった。そこでこのORF3,ORF4の共通部分に特異的なプライマー(ext34)を用いたプライマーエクステンション法により、この領域から転写されるmRNAの転写開始点を解析した。その結果、ウイルス感染中腸より抽出したpoly(A)$^+$RNAに特異的な２種のシグナルが検出された(Fig.14)。シグナルはそれぞれプライマーの５’側より266nts,241nts上流に位置しており、266nts上流から始まるmRNAはVD1ORF4に対応するウイルスタンパク質をコードしていると考えられる(Fig.15)。一方、241nts上流から始まるmRNAはORF4の翻訳開始コドン(ATG)の直後から転写され、最初の翻訳開始コドンがORF3の開始コドンである事からVD1ORF3に対応するウイルスタンパク質をコードしていると考えられた(Fig.15)。

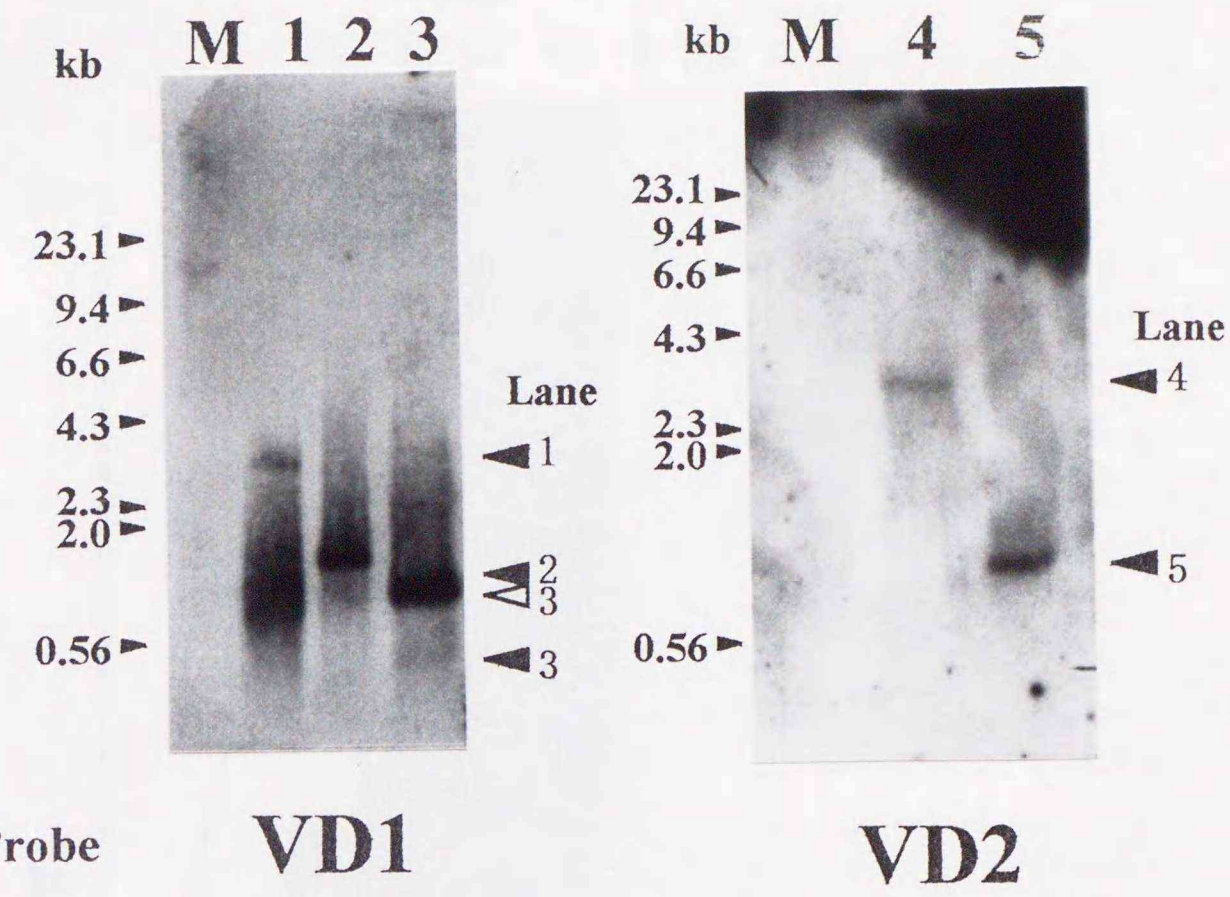


Fig.13 Detection of viral mRNA by RT-PCR.

Lane M : λ -*Hin* d III DNA
Lane 1 : 11O5, Lane 2 : 12O5, Lane 3 : 14O5,
Lane 4 : 21O5, Lane 5 ; 22O5 ;virus specific primers
◀ : cDNA against viral mRNA
◁ : cDNA against viral mRNA with bicistronic structure

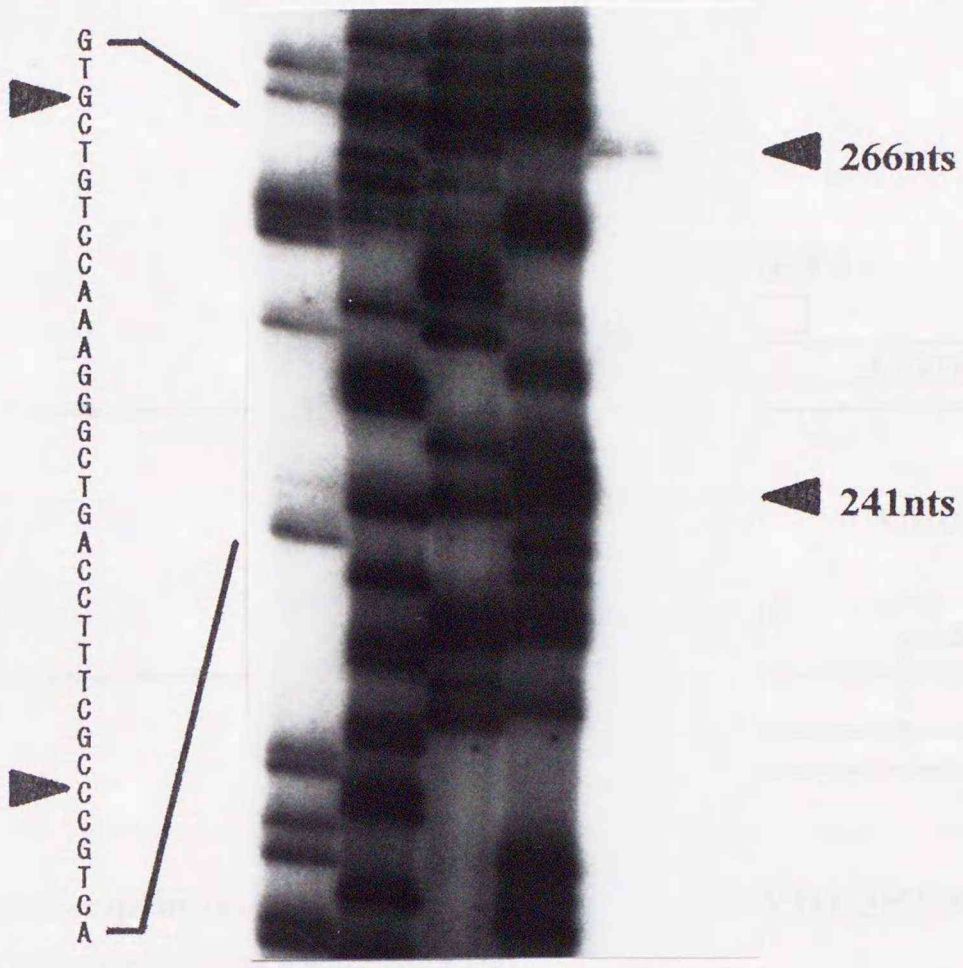


Fig.14 Primer extension analysis of mRNAs from VD1ORF3 and ORF4.

M13 : Sequence ladder of M13 phage DNA
Lane 1 : mRNA from BmDNV-2 infected midgut
Lane 2 : mRNA from uninfected midgut

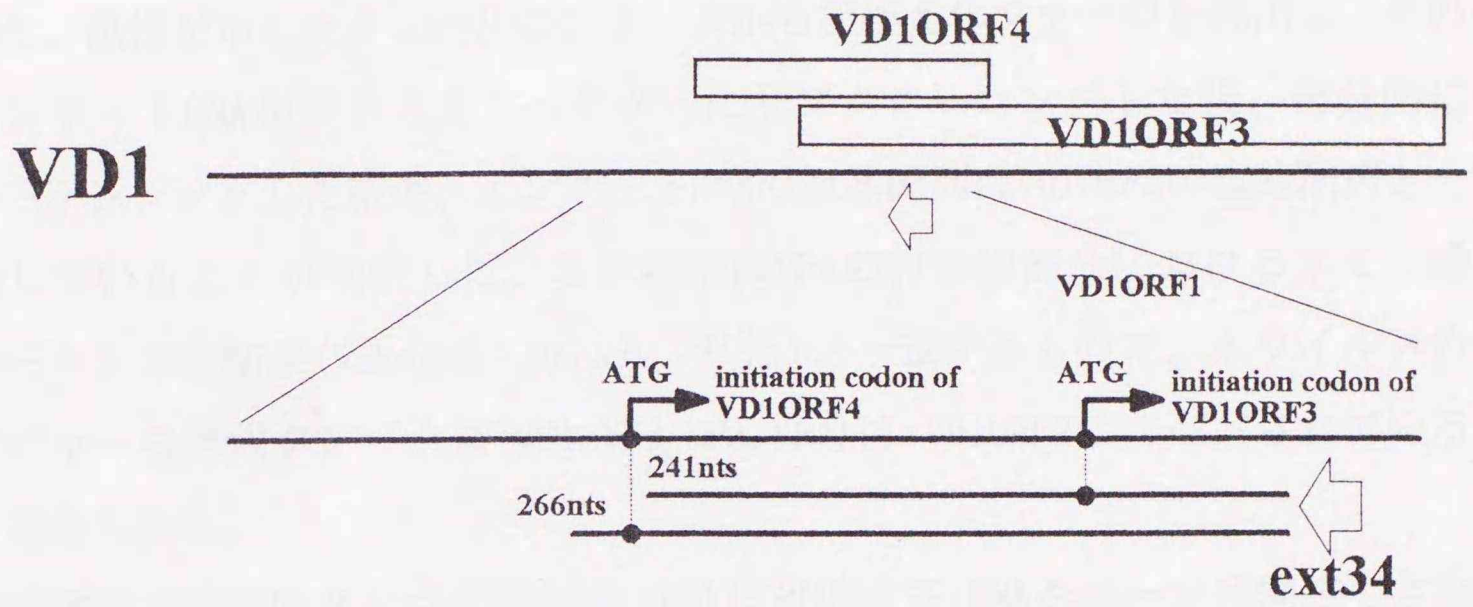


Fig.15 Transcriptional start sites of mRNAs from VD1ORF3 and ORF4 region.

● : initiation codon for translation(ATG).

ウイルス構成タンパク質遺伝子の同定

本実験で用いた抗BmDNV-2抗血清のウイルス構成タンパク質に対する反応性を調査した結果、本血清はウイルスを構成する６つの構成タンパク質(VP1;46.5kDa, VP2;49kDa, VP3;51kDa, VP4;53kDa, VP5;118kDa, VP6;120kDa) 全てと反応することが示された(Fig.16)。そこでまず本抗血清を用いて、ウイルス構成タンパク質をコードしている遺伝子の同定を試みた。まずBmDNV-2感染細胞から抽出したpoly(A)$^+$RNAに対してλgt11 cDNAライブラリーを作製し、本抗血清を用いてイムノスクリーニングを行ったところ、数個の陽性プラークを得た。陽性を示したクローンのプラークから組換え体ファージを抽出し、そのインサートDNAをプラスミドベクターにサブクローニングした後、部分的にシーケンシングした結果、インサートDNAの塩基配列はVD1ORF2の塩基配列と一致していることが判明した。この結果はVP4のＮ末端部分におけるアミノ酸シーケンスの結果(Nakagaki *et.al.*, 私信)と一致するもので、本ウイルスのメジャーな構成タンパク質(VP1, VP2, VP3, VP4)は VD1ORF2にコードされていると考えられる。

本実験では構成タンパク質(VP5, VP6)に対応するcDNAクローンは同定できなかったので VP5, VP6については大腸菌の発現系を利用してそのコード領域の同定を試みた。VP5, VP6はその分子量がそれぞれVP5;118kDa, VP6;120kDaであり、ウイルスゲノム上のORFにコードし得るタンパク質の分子量を考えるとVD1ORF1(128kDa)とVD2ORF1(133kDa)にそれらのタンパク質がコードされている可能性が強い。つまり、VP5およびVP6が宿主細胞由来でないとするとこれらのタンパク質はVD1のORF1かVD2のORF1のどちらか一方、もしくは各々にコードされていると考えられる。この点を明らかにするためにVD1ORF1とVD2ORF1のＣ末端側配列を pMAL C2ベクター (Promega)に連結し(VD1ORF1:pMALD101, VD2ORF1:pMAL-D201)(Fig.9)、大腸菌において発現させた。その結果、SDS-ポリアクリルアミドゲルで分離するとそれぞれウイルスタンパク質がMaltose-binding protein(MBP:42kDa)との融合タンパク質として発現された場合に期待される位置、すなわち約100kDaの大きさの位置にコントロールでは存在しないバンドと

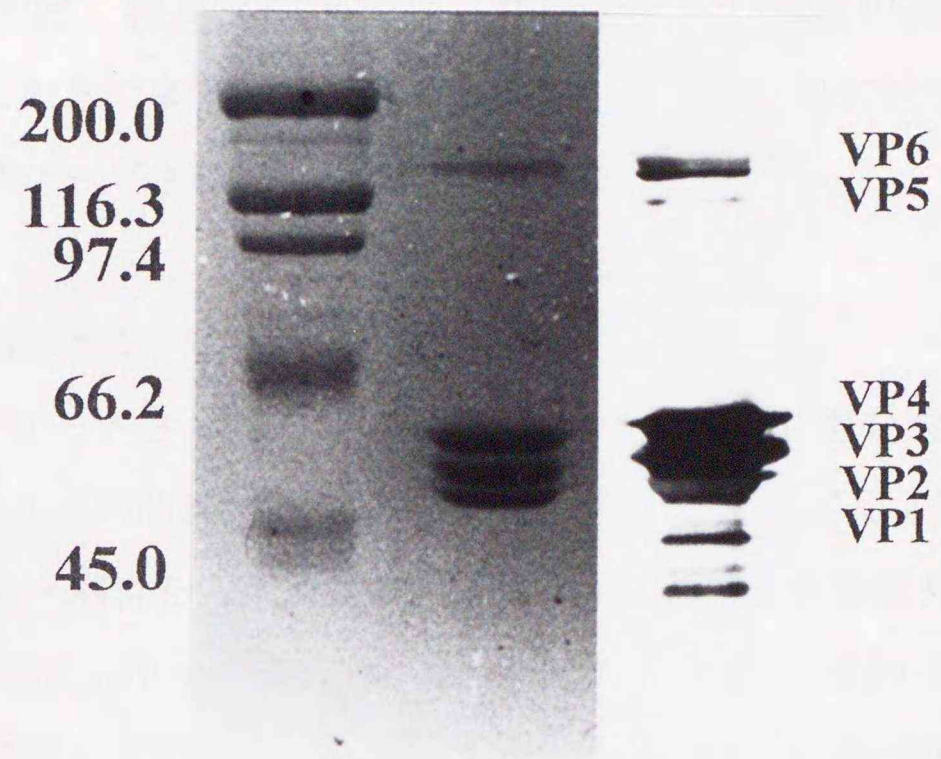


Fig.16 SDS-PAGE and immunoblot analysis of viral structural proteins.

A : SDS-PAGE
B :immuno blot analysis using the antiserum against purified virus
Lane1 : molecular weight marker
Lane2,3 : purified virion

して観察された(Fig.17)。次に分離した融合タンパク質をニトロセルロース膜上にトランスファーし、抗BmDNV-2抗血清を用いた イムノブロットハイブリダイゼーションで解析した結果、感染中腸から抽出したタンパク質には明瞭なシグナルが認められるもののこれらの融合タンパク質と抗血清との反応は認められなかった(Fig.17)。一方、抗BmDNV-2抗血清と反応しなかったpMAL-D201発現産物は、抗合成ペプチド抗血清を用いたイムノブロット・ハイブリダイゼーションにおいては、特異反応が認められ融合タンパク質の発現が確認された(Fig.17)。これらの事からVD1のORF1、およびVD2のORF1にはウイルスの非構成タンパク質がコードされていると考えられた。

ウイルス非構成タンパク質の機能

BmDNV-2にコードされている非構成タンパク質の機能を推定する目的で、VD1ORF3,4,そしてVD2ORF1,2の塩基配列より推定されるアミノ酸配列について、コンピューター解析を行った。その結果、VD1ORF3の塩基配列より推定されるアミノ酸配列に NTP-binding motief(Gly-X-X-X-X-Gly-Lys-Thr/Ser-X-X-X-X-Ile/Leu)が存在していた(Nakagaki *et.al.*, 私信)。また VD2ORF2の塩基配列より推定されるアミノ酸配列については、２カ所に Zinc finger DNA-binding motief(Berg,1988)に類似した配列(Cys-X-X-Cys)が存在していた。前者はNTPアーゼが共通に有しているモチーフであり、後者はタンパク質のDNA認識結合部位に認められるモチーフの１種である。すなわち、これらのモチーフを有するタンパク質はDNA認識や遺伝子発現制御に関わるタンパク質である可能性がある。そこで本実験ではこれらORF由来のタンパク質がウイルス遺伝子の発現制御に関与する可能性を調査する目的で、これらウイルスタンパク質がウイルスプロモーターにどのような影響を及ぼすかを調査した。すなわち、VD1ORF3やVD1ORF4、そしてVD2ORF2に対応するウイルスタンパク質を発現するプラスミド(pIS103c, pIS104c, pIS202c)とウイルス遺伝子の推定制御領域を含むレポータープラスミド,pGVs(Fig.10)をBmN細胞に co-transfectionし、形質転換細胞中でレポータープラスミドから発現されたルシフェラーゼ活性を調査した。



Fig.17 SDS-PAGE and Immuno blot analysis.

A : SDS-PAGE

B : immuno blot analysis using the antiserum against purified virus

C : immuno blot analysis using the antiserum against synthetic peptide

⬅ : fusion protein

LaneM : molecular weight marker
Lane1 : pMAL C2
Lane2 : pMAL-D1O1
Lane3 : pMAL-D2O1

まず、各々のレポータープラスミド(pGVs)を単独で導入した場合、全ての細胞においてルシフェラーゼ活性を検出することはできなかった。しかし、レポータープラスミド(pGVs)とウイルス遺伝子発現プラスミドを同時に導入した場合、いくつかの組み合わせにおいてレポータープラスミドからのルシフェラーゼの発現が観察された。すなわち、VD1のORF3やORF4にコードされるタンパク質の発現プラスミド(pIS103c, pIS104c)は主要構成タンパク質の制御領域を含むレポータープラスミド(pGVs)と一緒にBmN細胞に導入したときにのみ、ルシフェラーゼの発現が検出された(Fig.18)。一方、VD2のORF2発現プラスミド(pIS202c)を一緒にBmN細胞へ導入した場合は、自分自身の制御領域を組み込んだものを含めて全てのレポータープラスミドからルシフェラーゼの発現が認められた(Fig.18)。

考察

これまでに述べてきたように、本ウイルスとBmDNV-1を含む他のパルボウイルスとは、遺伝子構造、DNA複製機構などにおける様々な違いが明らかとなってきた。また、両者はウイルスゲノム上の遺伝子構成においても大きく異なっていた。すなわち、パルボウイルスではゲノムDNAの中央部分に２つの大きなORFが存在しており、３’側には構成タンパク質(VP)が、５’側には非構成(NS)タンパク質がコードされている(Astell and Ward,1983; Aatell *et.al.*,1986; Carlson *et.al.*,1985; Rhaode Ⅲ,1983; Shade *et.al.*,1985; Srivastava and Berns,1983)(Fig.19)。一方、BmDNV-2ではVD1には４つの、VD2には２つの大きなORFが存在している(本論文第Ⅳ章, Nakagaki *et.al.*,未発表)。この様な本ウイルスのユニークな遺伝子構造および遺伝子構成は、その独特の増殖様式を反映していると考えられるが、現在、増殖様式については全く不明といって良く、ゲノムにコードされるウイルスタンパク質の機能についても明らかではない。

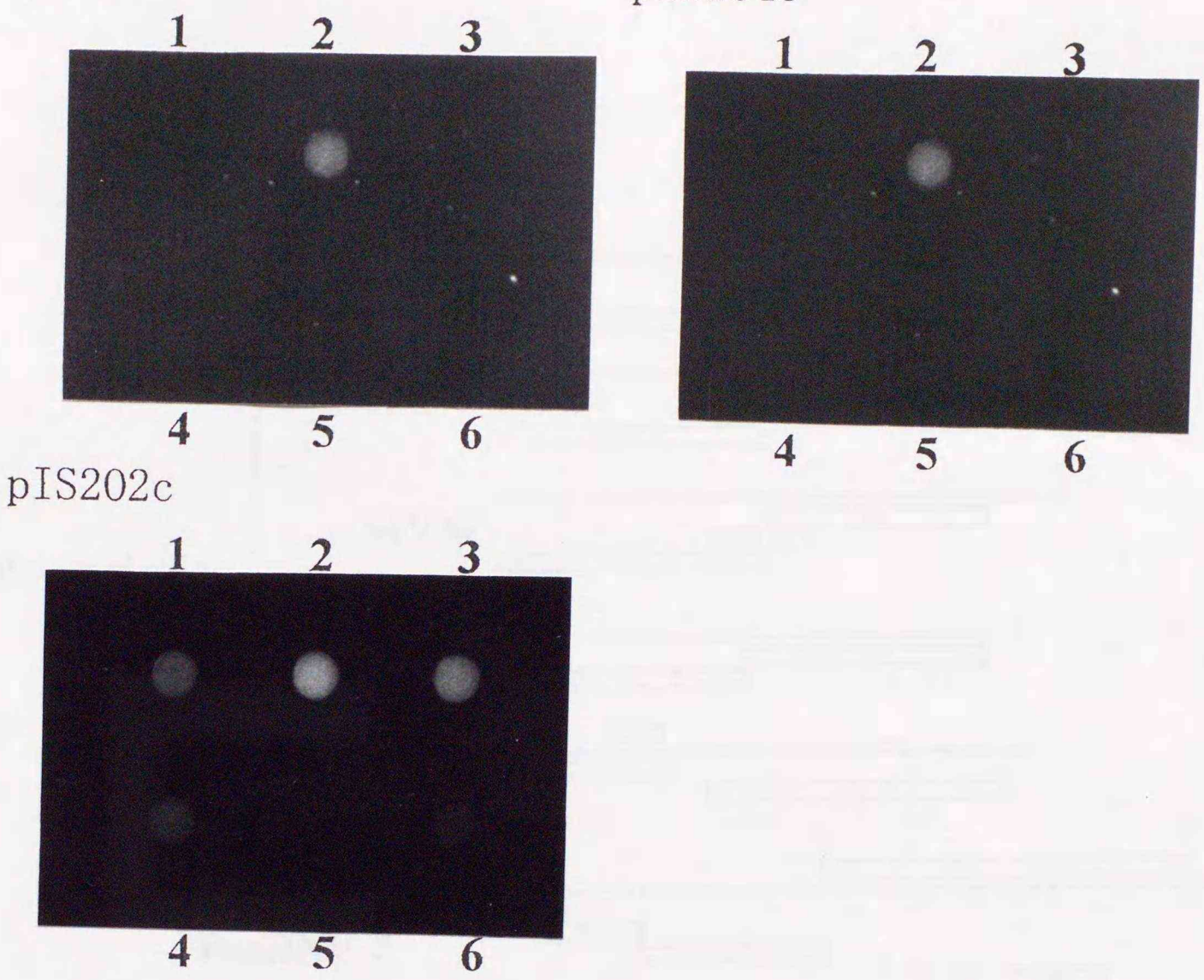


Fig.18 Transactivation of viral promoters by the tentative viral regulatory proteins
1 : pGV1P1, 2 : pGV1P2, 3 : pGV1P3, 4 : pGV1P4, 5 : pGV2P1, 6 : pGV2P2

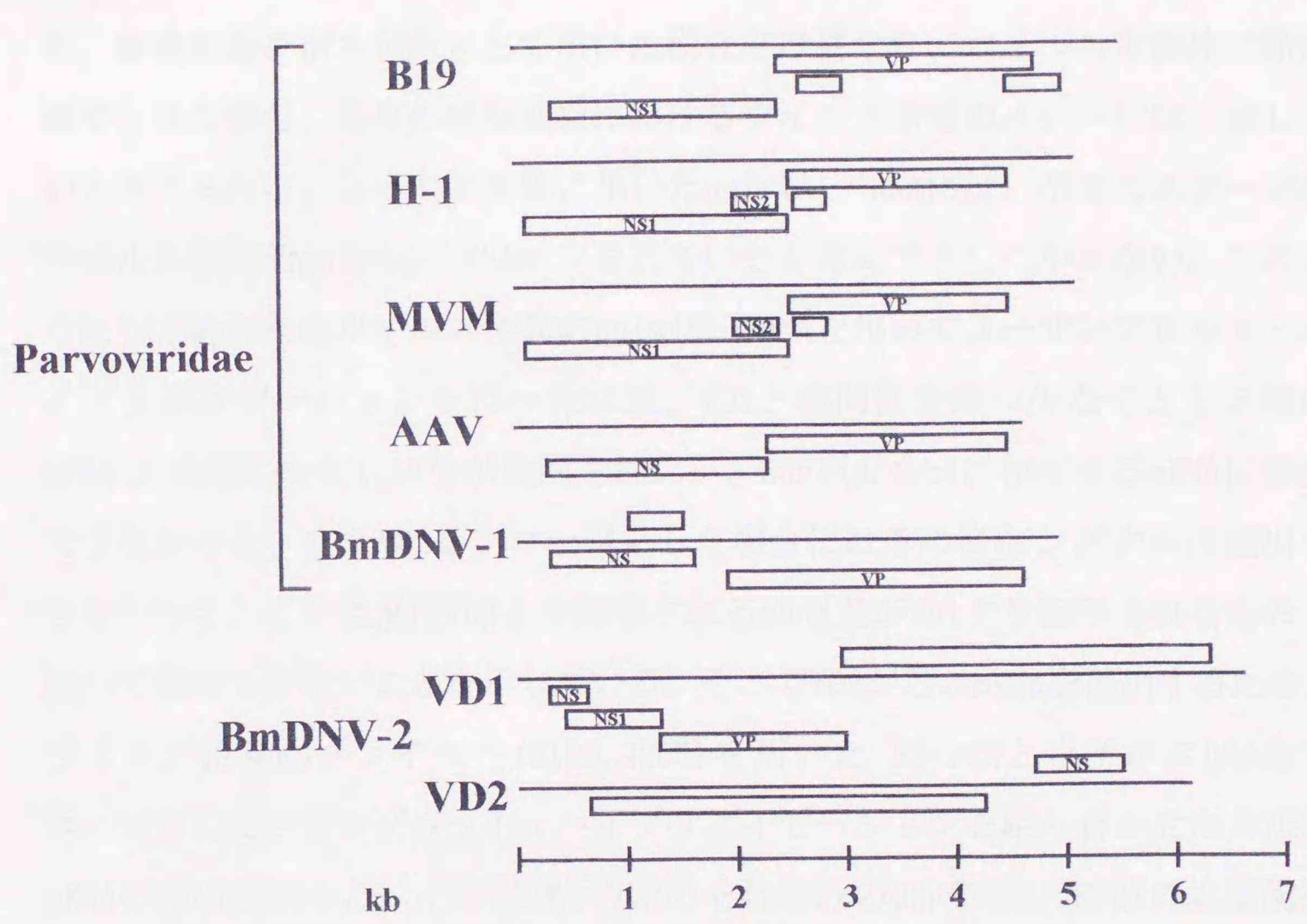


Fig.19 Genome organization of Parvovirus and BmDNV-2.

そこで本研究ではウイルスの増殖機構に関わる情報をウイルスゲノムにコードされるタンパク質の機能を解析することにより得る目的で、ウイルスゲノム(VD1,VD2)にコードされるウイルスタンパク質についてさらに解析を進めた。

ウイルスタンパク質の同定と機能解析を行う前にまずBmDNV-2DNA(VD1,VD2)より転写されるmRNAについての解析を行う目的で、poly(A)$^+$RNAをウイルス感染４日目(第Ⅲ章で行ったウイルスDNAの抽出実験から、この時期、中腸細胞においてウイルスDNAは盛んに合成されている)の感染幼虫の中腸組織から抽出した。培養細胞を宿主細胞として用いた場合とは異なり、ウイルスを個体に経口感染させた場合、各々の感染細胞におけるウイルス増殖のステージは一致しないと考えられる。よって本実験に用いたpoly(A)$^+$RNAには、全てのステージのウイルス特異的poly(A)$^+$RNAが含まれていると考えてさしつかえない。このようにして得られたウイルス特異的poly(A)$^+$RNAを用いてノーザンブロット・ハイブリダイゼーションを行った結果、VD1と相同性を持つ少なくとも３種のmRNA(3.6kb,1.6kb,1.1kb)が検出されたが、ORF4(0.4kb)に相当するmRNAは検出できなかった。またVD2をプローブとした場合にはその様なシグナルは検出できなかった。この結果はVD2より転写されるmRNA量がVD1より転写されるものと比べて極めて少ないことを示している。そこでVD2からのmRNAを検出するため、ウイルス特異的プライマー(2105,2205)を用いた RT-PCRとウイルスDNAをプローブとしたサザンブロット・ハイブリダイゼーションを組み合わせた方法でmRNAの検出を試みた。その結果、VD2のそれぞれのORF(ORF1,ORF2)の塩基配列から予想される大きさのcDNA断片が検出され、転写量に差はあるものの、BmDNV-2DNAに存在するそれぞれのORFに対応するmRNAが確かに転写されていることが判明した。

ところでVD1プローブを用いたノーザンブロット・ハイブリダイゼーションで検出できなかったORF4に相当するmRNAを検出するために、やはりVD1ORF4特異的プライマー(1405)を用いたRT-PCRとこれに続くサザンブロット・ハイブリダイゼーションにより検出を試みた結果、目的の位置にバンドが検出されはしたもののさらに高分子のバンドが主要な増幅産物として検出された。このcDNA

をクローンニングし、シーケンシングを行った結果、VD10RF4の開始コドンからVD10RF3の終止コドンまでの全ての塩基配列を含んでおり、構造的にはバイシストロニックであった。しかしこのような真核細胞のmRNAの場合、機能的にはモノシクトロニックであり、VD10RF4に対応するウイルスタンパク質のみが翻訳されるはずである。もしVD10RF4から主にこの様な形でmRNAが転写されるのだとすると、ノーザンブロット・ハイブリダイゼーションの結果において、ORF4の大きさに対応する低分子のウイルス特異的mRNAが検出できず、代わりにVD10RF3＋VD10RF4とほぼ一致する大きさのmRNA(1.1kb)が検出されたことが説明できる。そうすると逆にVD10RF3については、たとえRT-PCRで検出したとしてもこの構造上バイシストロニックなVD10RF4の一部を増幅した結果である可能性が残され、別の方法で対応するmRNAが転写されているかどうかを明らかにすることが必要となった。そこでこの領域から転写されるmRNAの5'末端(転写開始点)をプライマーエクステンション法を用いて解析したところ、VD10RF3に対応するmRNAは、VD10RF4に対応するmRNAの転写開始点より26nts下流から開始しており、mRNAの大きさはほとんど変わらないことが明らかになった。つまりVD1をプローブとしたノーザンブロット・ハイブリダイゼーションで検出された３種のmRNA(3.6kb, 1.6kb, 1.1kb)の内、1.1kbのmRNAについてはVD10RF3と4の２種類のORFに対するmRNAに対応していることが考えられる。また、VD10RF1と2についてはそれぞれ3.6kb, 1.6kbのmRNAと大きさがほぼ一致しており、各々対応すると思われるが、今後さらにそれぞれの領域の配列をプローブにしたノーザンブロット・ハイブリダイゼーションなどにより確認する必要が考えられた。

ところでVD1, VD2をプローブとした場合において、いずれの場合にも約６kbの位置にシグナルが検出された(Fig.12)。しかし、本実験で用いたpoly(A)＋RNAをOligo(dT)-celluloseを用いて精製を繰り返した結果、このシグナルは他のシグナルと比べて特異的に弱くなっていった。この事は、約６kbに認められたシグナルがpoly(A)配列を持たない分子であることを示唆している。現在、この高分子のシグナルは単鎖状である本ウイルスゲノムが、mRNAの精製の過程

で混入したものである可能性が高いと考えられ解析中であるが、詳細は不明である。

ウイルスDNAにコードされるタンパク質の解析は、ウイルス構成タンパク質がコードされている遺伝子の所在について解析する事から始めた。BmDNV-2感染幼虫の中腸から抽出した poly(A)$^+$RNAに対して作成したλgt11cDNAライブラリーをイムノスクリーニングした結果、抗BmDNV-2抗血清と反応するクローンを得た。陽性クローンから得られた組換え体ファージのインサートDNAを部分的にシーケンシングした結果、その塩基配列はVD1ORF2と一致することが明らかになった。この結果と本ウイルスの４つの主要構成タンパク質(VP1, VP2, VP3, VP4)のペプチドマップやVP4のＮ末端のアミノ酸解析の結果(第Ⅳ章、考察参照)から、これら４つの主要構成タンパク質はVD1のORF2にコードされていると考えられる。λgt11cDNAライプラリーのイムノスクリーニングの結果、ウイルス粒子中では量的に少ない構成タンパク質であるVP5 VP6を発現するようなcDNAクローン、すなわちVD1ORF2以外の配列を持ったcDNAクローンは得られなかった。VP5(118kDa)とVP6(120kDa)は、その分子量から考えてVD1ORF1かVD2ORF1にコードされている可能性が高いと考えられた。そこで大腸菌を用いてウイルス構成タンパク質の発現を行い、ウイルス粒子に対する抗血清との反応性を調べたが、いずれのORFにコードされているタンパク質も抗BmDNV-2抗血清との反応性は認められなかった。この結果はVP5, VP6が宿主細胞由来である可能性を示唆しており、今後さらにその確認が必要であろう。

次にウイルスの非構成タンパク質(NS)の機能について調査を行った。BmDNV-2にコードされている非構成タンパク質の機能を推定する目的で、コンピューター解析を行った結果、VD1ORF3の塩基配列より推定されるアミノ酸配列にNTP-binding motiefの存在が明らかになった。この NTP-binding motiefはパルボウイルスのNS1でも見られる構造であり、特にH-1(ラットを宿主とするパルボウイルスの一種)などではこの構造がNS1の核移行に重要な役割を果たすことが示唆されている(Nuesch and Tattersall, 1993)。またパルボウイルスのNS1についてはいくつかのウイルスで詳細な研究がなされており、AAV(ヒトの

細胞から分離されたパルボウイルスの一種)のNS1にはヘリカーゼ活性やニッケース活性があるなどウイルスDNAの複製に関与していることが示されている(Im and Muzyczka, 1990; Snyder *et. al.*, 1990)。MVM(マウスを宿主とするパルボウイルスの一種)においてもNS1はヘリカーゼ活性やATPase活性を持ち(Wilson *et. al.*, 1991)、ウイルスRIDNAにおけるDNAの切断、再結合を触媒すると共に(Cotomore and Tattersall, 1986, 1992; Cotomore *et. al.*, 1992)、ウイルスDNAの5'末端に共有結合することが示されている(Cotomore and Tattersall, 1989)。パルボウイルスのNSはこの様にウイルスDNAの複製に関与する以外にもH-1では構成タンパク質遺伝子のプロモーターを(RhodeⅢ, 1985)、B19ではNS1のプロモーターをトランスにアクティベートする事が示されている(Doerig *et. al.*, 1990)。 本ウイルスのVD10RF3にコードされるウイルスタンパク質(p37:ORFから推定される分子量が約37,000であるウイルスタンパク質)におけるNTP-binding motiefの存在は、p37がNS1と同様な機能を持つ事を意味する可能性がある。また VD20RF2の塩基配列より推定されるアミノ酸配列についても、２カ所に Zinc finger DNA-binding motiefに類似した配列が存在しており、VD20RF2にコードされるウイルスタンパク質(p27)も同様にウイルスの制御タンパク質である可能性が考えられた。実際、本研究においてp37とp27の両方にウイルスプロモーターに対するトランスアクティベーション活性が認められ、これらがウイルスの増殖過程において、ウイルスプロモーターに対してトランスアクティベーターとして働く可能性が示唆された。さらにVD10RF4に対応するmRNA(1.1kb)を発現させた場合にも、VD10RF2のプロモーターがアクティベートされることが判明し、この構造上バイシストロニックなmRNAから発現すると推定されるp14もp27やp37同様構成タンパク質遺伝子のプロモーターに対してトランスアクティベーション活性を有すると考えられる。しかし、これらのタンパク質がトランスに発現をアクティベートするウイルス遺伝子の種類や、その程度に差が認められ、これらの遺伝子の発現制御がかなり複雑なものであることが推定される。また本研究ではレポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を用い、またその検出にポラロイドフィルムを用いた。本手法による検

出感度は極めて高いと言うわけではなくさらに感度の高い方法を用いることにより新たな発現制御活性が明らかとなる可能性は十分に考えられる。例えば、これらの制御特性を有するタンパク質の発現される順序や、同時に複数存在していた場合の活性などは、今後の問題である。また、実際のウイルスの増殖過程で機能している制御経路については、一過性発現系による解析結果が必ずしも反映していない可能性も完全には否定できず、ウイルス増殖を指標としたウイルスタンパク質の機能解析が今後必要と思われる。

以上、本実験でウイルスタンパク質の機能解析を行った結果、VD1のORF1、およびVD2のORF1にコードされているウイルスタンパク質の機能については今のところ不明であるが、それ以外のウイルスタンパク質についてはその機能の少なくとも一部が明らかになった(Fig.20)。さらに、本ウイルスの構成タンパク質がVD1にのみコードされている事やVD2にコードされるp27がVD1に存在する全ての遺伝子のプロモーター領域をアクティベートする事実は、本ウイルスの２組の１本鎖ゲノムDNA上に存在する遺伝情報が、増殖過程において、共に必要であることを強く示唆する結果であった。

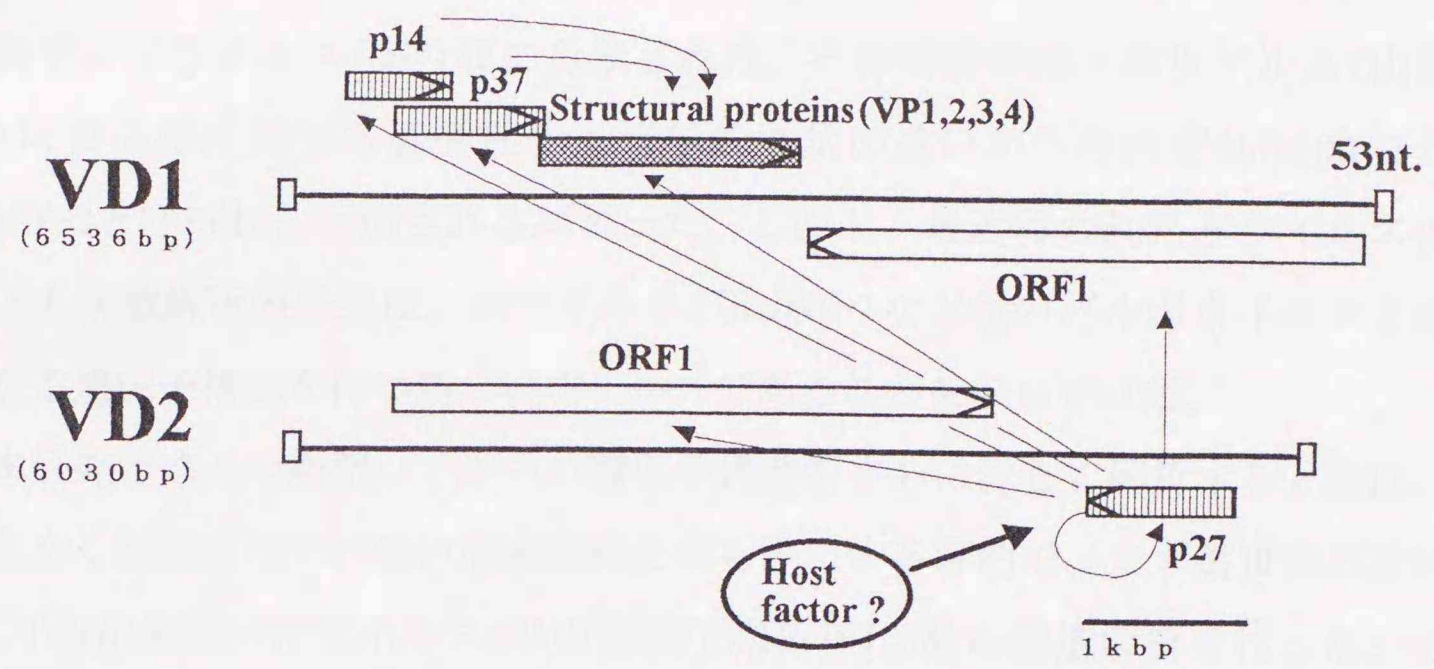


Fig.20 Trans-regulation of the BmDNV-2 gene.

: regulatory protein

: structural proteins

: function unknown

: transactivation of expression

第VI章　総合考察

家蚕濃核病ウイルス山梨株は２組の線状１本鎖DNAをウイルスゲノムとして持つ小形球状ウイルスである。当初、本ウイルスは特に組織病理学的な観察結果が、すでに報告されていた伊那株と類似していたこと、また、線状１本鎖DNAをウイルスゲノムとして球状ウイルス粒子に含むことから、パルボウイルス科デンソウイルス(DNV)属に分類された。その後伊那株と本ウイルス(山梨株)は蚕品種に対する感受性や血清学的性状の違いからそれぞれBmDNV-1とBmDNV-2と呼ばれ、区別されるに至った。しかし、最近行われた本ウイルスのゲノム構造解析の結果は、本ウイルスがBmDNV-1など他のパルボウイルスとは異なる遺伝子構造を持つ新しいウイルスであることを示していた。

本研究ではこの新型ウイルスの遺伝子構造をさらに詳しく解析すると共に、現在全く解明されていない増殖機構を明らかにする目的で、まず第III章において、PCR法を用いたウイルスDNAの複製中間体(RIDNA)の構造解析を行った。その結果、BmDNV-1では他のパルボウイルスの複製中間体(RIDNA)で観察されるような head-to-head, tail-to-tail型の閉環状末端構造が検出されたが、本ウイルスにおいてそのような分子は検出できなかった。この結果はBmDNV-2がパルボウイルスの“セルフプライミング・ヘアピントランスファー”機構とは異なる機構でDNAを複製する可能性を強く示唆している。現在のところBmDNV-2がどのような複製様式を採るのか詳細は不明であるが、ウイルスDNAの複製開始には何らかのプライマーが必要であり、プライミングに必要なシスエレメントがVD1,VD2に共通して存在している事が推定される。こういった意味でVD1とVD2の末端に共通して存在している53塩基の共通末端配列(CTS)は、これらのゲノムDNAが共通の機構で複製、あるいは粒子中にパッケージされるためのシグナルとして重要な機能を有する可能性がある。また本ウイルスは２種のゲノムを持つウイルスであるが、それぞれの大きさは6.6kb,6.1kbと小さく、その一次構造の決定は比較的容易である。そこで第IV章では、ウイルス遺伝子上に存

在する情報の解析から増殖機構の解明にアプローチする目的で、VD2の塩基配列を決定し、その遺伝子構造の解析を行った。一方、時を同じくして信州大学と当研究室の共同研究グループによりVD1の塩基配列も決定された。その結果、BmDNV-2の２種のウイルスゲノム(VD1,VD2)の全一次構造が決定されたことになり、ウイルスに存在しているORFの大きさや位置、そしてウイルス遺伝子の発現制御に関わると考えられる配列などが明らかになった。しかし、そこにコードされるタンパク質の機能については主要構成タンパク質のコード領域は示唆されたのみで、その他のウイルスタンパク質については依然不明のままであり、本ウイルスの増殖機構を理解する上で、ウイルスタンパク質の発現および機能についてさらに解析する必要が考えられた。そこで第Ｖ章では感染細胞におけるウイルス遺伝子の発現を追うと共に、ウイルスDNAの一次構造を基にウイルスタンパク質発現プラスミドを構築し、培養細胞における一過性の発現系を用いて、ウイルスにコードされるタンパク質の機能解析を試みた。その結果、VD1ORF1とVD2ORF1にコードされている大きなウイルスタンパク質を除いたウイルスタンパク質について少なくともその機能の一部が明らかになった。この結果を他のパルボウイルスと比較すると、BmDNV-2の遺伝子構造はパルボウイルスと明らかに異なっていた。しかし、ゲノム上で構成(VP)タンパク質のコード領域がゲノムDNAの3'側に存在しており、5'側には非構成タンパク質(NS)タンパク質がコードされている点や、5'側にあるＮＳタンパク質のアミノ酸配列中にNTP-binding motiefが存在しているなどの点において特に、VD1とパルボウイルスゲノムの構造上の類似性も認められる。本ウイルスとBmDNV-1や他の、パルボウイルスとの進化・分類学上の関連性については、昆虫ウイルスと哺乳類のウイルスとの関係を考える上でも興味深い課題である。

ところで本ウイルスについての分子生物学的知見が極めて少ない理由の１つに、ウイルスに感受性のある培養細胞系が確立されていないことが挙げられる。そしてこの事はウイルスの増殖機構の解析においても大きな障害となっており、今後さらに解析を進めるためには感受性細胞株の確立が大きな課題である。すでに述べたように、BmDNV-2は厳密な宿主・組織特異性を持っているが、感受

性細胞を樹立する事により、宿主特異性の決定に関与する因子を解明するも可能であると考えられる。多くの場合、ウイルスに対する感受性を決定する大きな要因として細胞表面に存在するウイルス粒子に対するレセプターの問題が挙げられる。しかし、本ウイルスにおいてはその感受性を決定している因子は少なくとも細胞レセプターのみではないと考えられる。なぜなら本ウイルスゲノムDNAをカイコ由来の培養細胞(BmN)へトランスフェクションした場合にもウイルス遺伝子の発現は認められず、BmDNV-2のプロモーターを含むレポータープラスミドを単独でBmN細胞に導入してもそれぞれのプロモーター活性は検出できなかった。この事は本研究で用いたBmN細胞の様な非感受性細胞においては、本ウイルスが細胞内に進入しても、ウイルス遺伝子の発現は起こらず、増殖もできないことを意味している。逆に、本ウイルスが特定の宿主あるいは組織において増殖できるか否かは、標的細胞にウイルス遺伝子の発現を可能にする因子が存在するか否かによって決まっているのかもしれない。また本ウイルスの遺伝子発現は宿主細胞の因子のみならず、ウイルス自身がコードする複数の遺伝子産物によっても複雑に制御されていることが本研究の第Ⅴ章の結果から推定される。しかし、ここで注目に値するのは、Fig.18に示したように、VD2ORF2にコードされているウイルスタンパク質(p27)が、非感受性細胞において自分自身(VD2ORF2)のプロモーターを含めた全てのウイルスプロモーターをアクティベートすることができるという事実である。このことは、p27が本ウイルスの増殖過程において１つのトリガーとして働いている可能性を示している。つまり、本ウイルスが増殖できるか否かは進入した細胞内でp27を発現できるか否にかかっている可能性が示唆されたことになる。もしそうだとすると、p27のプロモーターをトランスにアクティベートする細胞因子が存在するかどうかで、本ウイルスに対する宿主および組織特異性が決まっていることになり、p27を恒常的に発現しているような培養細胞を作出すれば本ウイルスを増殖させることが可能であろう。その場合、そういった細胞因子はおそらく感受性培養細胞の樹立無しでも同定可能であると考えられる。これまでに、昆虫でウイルスの感受性の決定に関与する因子が同定された例はない。しかし、ウイルス

農薬の利用拡大や新しいウイルス農薬の開発が進められている現状に鑑み、安全性の面からも、より効果的なウイルス農薬の開発のためにも、昆虫ウイルスの増殖機構、あるいはその特異性を決定する細胞因子の解析は、今後、ますます重要になると考えられる。

第Ⅶ章　　要約

家蚕濃核病ウイルス（山梨株：BmDNV-2）は、ゲノムとして線状１本鎖DNA(VD1,VD2)を含む小型球状ウイルスであるが、その遺伝子構造について不明な点が多く、また増殖機構については全く判っていない。本研究ではBmDNV-2の増殖機構を解明する目的で、まずDNA複製機構についての解析を行った。また同時にウイルスの増殖機構を解明する目的で、ウイルスゲノムDNAの一次構造解析、またゲノム上にコードされているウイルスタンパク質の機能解析を行った。

これらの研究の結果、本ウイルスは今までに報告されている他の線状１本鎖DNAウイルス(パルボウイルス)とは全く異なった遺伝子構造を持つ新しいタイプのウイルスであることが判明した。まず、DNA複製機構の解析については、BmDNV-2感染中腸細胞内において、末端に閉環状構造を持つ様な複製中間体(RIDNA)は検出されず、本ウイルスがBmDNV-1など他のパルボウイルスとは異なるDNA複製機構を有する事が示唆された。また、ウイルスゲノムDNAの一次構造解析により、本ウイルスの２種のウイルスゲノム(VD1:Nakagaki *et.al.*,未発表; VD2:本論文)の一次構造は決定され、ゲノムDNA上に存在するORFの大きさや位置、そしてウイルス遺伝子の発現制御に関わると考えられる配列などが明らかになった。ウイルスゲノムDNAの塩基配列を基に、ウイルスタンパク質の機能解析を行った結果、ウイルスDNAに存在する６つのORFに対応するウイルスタンパク質の内、VD1ORF2には主要構成タンパク質がコードされていた。またVD1ORF3とVD1ORF4にコードされているウイルスタンパク質(p37,p14)は共に主要構成タンパク質遺伝子のプロモーターをアクティベートし、VD2ORF2にコードされているウイルスタンパク質(p27)はウイルスのゲノム上に存在する全てのプロモーターをアクティベートすることが示された。VD1ORF1とVD2ORF1にコードされているウイルスタンパク質の機能については現在不明であり、今後さらに解析を進める必要がある。以上、本研究により、家蚕濃核病ウイルス(山梨株:BmDNV-2)は動物・植物ウイルスを通してこれまでに報告のない新しいタイプのウイルスであることが明らかとなった。

また、ウイルスにコードされる１つの制御タンパク質(p27)がウイルス遺伝子発現の鍵となるタンパク質である可能性が示され、本ウイルスの宿主、および組織特異性を決定している分子機構を理解する上で極めて重要な知見を与えた。

第Ⅷ章　　英文要約

Studies on the *Bombyx* densonucleosis virus type 2, a new type of single stranded DNA virus with a bi-partite genome.

Bombyx mori denso nucleosis virus (Yamanashi isolate;BmDNV-2) is a small spherical virus containing two sets of complementary single-stranded linear DNA(VD1,VD2), probably in separate capsids. Previous studies on BmDNV-2 implied that the BmDNV-2 is, unlike parvoviruses, a new type of single-stranded DNA virus with a bi-partite genome. In this study, to elucidate the nature of BmDNV-2, the viral DNA replication mechanism, genome organization and function of viral proteins were investigated. Analysis of the replicative intermediates (RI) of the viral DNA suggested the self-priming and hairpin-transfer model for parvovirus replication could not be applied to the replication of BmDNV-2. Nucleotide sequencing studies of the genomic DNAs showed that, unlike BmDNV-1 and the other parvoviruses, the BmDNV-2 terminal sequences did not contained the large palindromic sequence which could form a stable hairpin structure. This was confirme by the secondary structure prediction using a computer analyses program. These results also suggested that the BmDNV-2 had a unique replication mechanisms other than the self-priming and hairpin-transfer mechanism.

Furthermore, the sequence analyses elucidated that the BmDNV-2 genome contained 6 major open reading frames (ORFs), 4 ORFs in VD1 and 2 in VD2. Immunochemical studies demonstrated that the major four viral structural proteins (VP1,2,3 and 4) were encoded in the ORF2 of VD1. However, the localization of the information for VP5 and 6 could not be specified in this study, implying the possibility that these proteins were took in the virion from the host cells. Followingly, the functions of the nonstructural proteins (NSPs) were investigated by transient expression assay using the luciferase as a reporter. The results from the series of the co-transfection experiments of viral protein expression plasmids and

reporter plasmids demonstrated the transactivation of viral promoters by the NSPs. The NSPs, p37 and p14 which were encoded in ORF3 and4 of VD1, respectively, transactivated the tentative promoter sequence for the major structural protein gene, suggesting that these proteins were concerned in the regulation of the expression of structural proteins. In addition, p27 which was an NSP encoded in VD2 could transactivate all of the viral promoters implying that p27 is a key regulatory protein in the BmDNV-2 replication.

In conclusion, this study elucidated the genome structure and the genome organization of the BmDNV-2. The results strongly suggested that the BmDNV-2 is a new type of single-stranded DNA virus with a unique replication mechanism which was different from those of parvoviruses. Furthermore, the functional analyses of the viral proteins suggested that the viral gene expression was regulated in the complicated manner by the proteins encoded in viral DNAs. And, p27 will be a key regulatory protein in the replication of the BmDNV-2 and may be one of the factor concerning in the determination of the host specificity.

参考文献

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Waston, J. D. (1989) Molecular biology of the cell, 2nd ed. Garland, New York, pp551-612.

Astell, C. R., Smith, M., Chow, M. B. and Ward, D. C. (1979) Structure of the 3' hairpin termini of four rodent parvovirus genomes: nucleotide sequence homology at origins of DNA replication. Cell 17:691-703.

Astell, C. R., Thomson, M., Merchlinsky, M. and Ward, D. C. (1983) The complete DNA sequence of minute virus of mice, an autonomous parvovirus. Nucleic Acids Res. 11:999-1018.

Astell, C. R., Gardiner, M. and Tattersall, P. (1986) DNA sequence of the lymphotropic variant of minute virus of mice, MVM(i), and its comparison with the DNA sequence of the fibrotropic prototype strain. J. Virol. 57:656-659.

Atchson, R. W., Casto, B. C. and Hammon, H. M. (1965) Adenovirus-associated defective virus particles. Science 149:754-756.

鮎沢千尋 (1972) 蚕のウイルス性軟化病に関する研究 I. ウイルスの精製と２・３の性状. 日蚕雑 41:338-344.

Bamford, D. H. and Mindich, L. (1984) Characterization of the DNA-protein complex at the termini of the bacteriophage PRD1 genome. J. Virol. 50:309-315.

Bando, H., Kusuda, J., Gojobori, T., Maruyama, T. and Kawase, S. (1987) Organization and nucleotide sequence of a densovirus genome imply a host-dependent evolution of parvoviruses. J. Virol. 61:553-560.

Bando, H., Choi, H., Ito, H. and Kawase, S. (1990) Terminal structure of a densovirus implies a hairpin transfer replication which is similar to the model for AAV. Virology 179:57-63.

Bando, H., Choi, H., Nakagaki, M. and Kawase, S. (1992) Structural analysis on the single-stranded genomic DNAs of the virus newly isolated from silkworm: the DNA molecules share a common terminal sequence. Arch. Virol. 124:187-193.

Bando, H., Hayakawa, T., Asano, S., Sahara, K., Nakagaki, M. and Iizuka, T. (1995) Analysis of the genetic information of a DNA segment of a new virus from silkworm. Arch. Virol. 140:1147-1155.

Berg, J. (1988) Proposed structure for the zinc-binding domains from transcription factor ⅢA and related proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85:99-102.

Berns, K. I. and Hauswirth, W. W. (1984) Adeno-associated virus DNA structure and replication. In "The Parvoviruses" (K. I. Berns, Ed) pp. 1-31. Plenum, New York.

Blissard, G. W. and Rohrman, G. F. (1990) Baculovirus diversity and molecular biology. Annu. Rev. Entmol. 35:127-155.

Buller, R. M., Janik, J. E., Sebring, E. D. and Rose, J. E. (1981) Herpes simplex virus type 1 and 2 completely help adonovirus-associated virus replication. J. Virol. 40:241-247.

Carlson, J., Rushlow, K., Maxwell, I., Maxwell, F., Winston, S. and Hahn, W. (1985) Cloning and sequence of DNA encoding structural proteins of the autonomous parvovirus feline panleukopenia virus. J. Virol. 55:574-582.

Cavalier-Smith, T. (1974) Palindromic base sequences and replication of eukaryotic chromosome ends. Nature(London) 250:467-470.

Cavener, D. R. (1987) Comparison of the consensus sequence flanking translational start sites in *Drosophila* and vertebrates. Nucleic Acids Res. 15:1353-1361.

Cotmore, S.F. and Tattersall, P. (1986) The NS-1 polypeptide of the autonomous parvovirus MVM is a nuclear phosphoprotein. Virus Res. 4:243-250.

Cotmore, S.F. and Tattersall, P. (1989) A genome-linked copy of the NS1 polypeptide is located on the outside of infectious parvovirus particles. J. Virol. 63:3902-3911.

Cotmore, S.F. and Tattersall, P. (1992) In vivo resolution of circular plasmids containing concatemer junction fragments from minute virus of mice DNA and their subsequent replication as linear molecules. J. Virol. 66:420-431.

Cotmore, S.F., Nuesch, J.P.F. and Tattersall, P. (1992) In vitro excision and replication of 5' telomeres of minute virus of mice DNA from cloned palindromic concatemer junctions. Virology 190:365-377.

Cotmore, S.F. and Tattersall, P. (1994) An asymmetric nucleotide in the parvoviral 3' hairpin directs segregation of a single active origin of DNA replication. EMBO J. 13:4145-4152.

Deiss, V., Tratschin, J-D., Weits, M. and Siegl, G. (1990) Cloning of the human parvovirus B19 genome and structural analysis of its palindromic termini. Virology 175:247-254.

Doerig, C., Hirt, B., Antonietti, J.P. and Beard, P. (1990) Nonstructural protein of parvoviruses B19 and minute virus of mice controls transcription. J.Virol. 64:387-396.

Garicia, P., Hermoso, J.M., Garcia, J.A., Garcia, E., Lopez, R. and Salas, M. (1986) Formation of a covalent complex between the terminal protein of pneumococcal bacteriophage Cp-1 and 5'-dAMP. J.Virol. 58:31-35.

Gidoni, D., Dynan, W.S. and Tjian, R. (1994) Multiple specific contacts between a mammalian transcription factor and its congnate promoters. Nature 312:409-413.

Gubler, U. and Hoffmann, B. J. (1983) A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. Gene 25:263-269.

Hauswirth, W. W. (1984) Autonomous parvovirus DNA structure and replication. In "The Parvoviruses" (K. I. Berns, Ed) pp. 129-152. Plenum, New York.

Henikoff, S. (1984) Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. Gene 28:351-369.

Hermoso, J. M. and Salas, M. (1980) Protein p3 is linked to the DNA of phage f29 through a phosphoester bond between serine and 5'-dAMP. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:6425-6428.

Hong, G., Ward, P. and Berns, K. I. (1994) Intermediates of adeno-associated virus DNA replication in vitro. J. Virol. 68:2011-2015.

Ikemura, T. (1982) Correlation between the abundance of yeast transfer RNAs and occurrence of the respective codons in protein genes. J. Mol. Biol. 158:573-597.

Im, D. S. and Muzyczka, N. (1990) The AAV origin binding protein Rep68 is an ATP-dependent site-specific endonuclease with DNA helicase activity. Cell 61:447-457.

井上元・鮎沢千尋 (1972) 蚕のウイルス性軟化病に関する研究 II. 蛍光抗体法による病蚕中腸皮膜組織の観察. 日蚕雑 41:345-348.

Iwasita, Y. and Chun, C. Y. (1982) The ultrastructure and functioning of insect cells (Akai, H., King, R. C. and Morohoshi, S., Eds.) pp. 161-164 Soc. Insect Cells, Japan.

姜錫権・中垣雅雄・清水孝夫・川瀬茂実 (1978) 軟化病ウイルス(伊那株) の純化とウイルス核酸の性状について. 日蚕雑 47:39-46.

Kawase, S., Suto, C., Ayuzawa, C. and Inoue, H. (1974) Chemical properties of infectious flacherie virus of the silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera:Bombycidae) J. Appl. Entomol. Zool. 9:100-101.

川瀬茂実・姜錫権 (1976) 蚕の軟化病ウイルス(伊那株)の核酸について. 日蚕雑 45:87-88.

Kawase, S. (1985) Pathology associated with densoviruses. (K. Maramorosh and K. E. Sherman Eds.) pp. 197-231. Viral insecticides for biological control. Academic Press, Inc., London.

Kozak, M. (1986) Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosome. Cell 44:283-292.

Kurihara, Y., Watanabe, H., Maeda, S. and Shimizu, T. (1984) Chemical characteristics of a previously undescribed densonucleosis virus isolated from the silkworm, *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Jpn. 53:33-40.

Kurstak, E. (1972) Small DNA densonucleosis virus(DNV). Adv. Virus Res. 17:207-241.

Lichy, J. M., Horwitz, M. S. and Hurwitz, J. (1981) Formation of a covalent complex between the 80,000-dalton adenovirus terminal protein and 5'-dCMP in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2678-2682.

Lusby, E., Fife, K. H. and Berns, K. I. (1980) Nucleotide sequence of the inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA. J. Virol. 34:402-409.

前田進・渡部仁 (1978) カイコにおける濃核病ウイルス感染の蛍光抗体法による観察. 応動昆 22:98-101.

McKnight, S. L. and Kingsbury, R. (1982) Transcriptional control signals of a eukaryotic protein-coding genes. Science 217:316-324.

Meynadier, G., Vago, C., Plantevin, G. and Atger, P. (1964) Virose d'umtype habituel chez le Lepidoptere, *Galleria mellonella* L. Rev. Zool. Agr. Appl. 63:207-209.

Nakagaki, M. and Kawase, S. (1980) DNA of a new parvo-like virus isolated from the silkworm, *Bombyx mori*. J. Invertebr. Pathol. 35:124-133.

Nuesch, J. P. F. and Tattersall, P. (1993) Nuclear targeting of the parvoviral replicator molecule NS1:Evidence for salf-association prior to nuclear transport. Virology 196:637-651.

Ozawa, K., Kurtzman, G. and Young, N. (1986) Replication of the B19 parvovirus in human bone marrow cell cultures. Science 233:883-886.

Rhaode, S. L., III. and Paradiso, P. R., (1983) Parvovirus genome:nucleotide sequence of H-1 and mapping of its genes by hybrid-arrest translation. J. Virol. 45:173-184.

Rhaode, S. L., III. (1985) Nucleotide sequence of the xoat protein gene of canine parvovirus. J. Virol. 54:630-633.

Sahli, R., McMaster, G. K. and Hirt, B. (1985) DNA sequence comparison between two tissue-specific variants of the autonomous parvovirus, minute virus of mice. Nucleic Acids Res. 13:3617-3632.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467.

関宏夫・岩下嘉光（1983）山梨県の農家から分離した濃核病ウイルスの病理組織学的特徴と病原性　日蚕雑 52:400-405

Shade, R. O., Blundell, M. C., Cotmore, S. F., Tattersall, P. and Astell, C. R. (1986) Nucleotide sequence and genome organization of human parvovirus B19 isolated from the serum of a xhild during aplastic crisis. J. Virol. 58:921-936.

清水孝夫　(1975) 伊那市の農家の病蚕から分離した軟化病ウイルスの病原性. 日蚕雑44:45-48.

Siegle, G., Bates, R. C., Berns, K. I., Carter, B. J., Kelly, D. C., Kurstak, E. and Tattersall, P. (1985) Characteristics and taxonomy of parvoviridae. Intervirology 23:61-73.

Snyder, R. O., Samulski, R. J. and Muzyczka, N. (1990) In vitro resolution of covalently joined AAV chromosome ends. Cell 60:105-113.

Srivastava, A., Lusby, E. W. and Berns, K. I. (1983) Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. J. Virol. 45:555-564.

Suzuki, T. and Suzuki, Y. (1988) Interaction of composite protein complex with the fibroin enhancer sequence. J. Biol. Chem. 263:5979-5986.

Tattersal, P. and Ward, D. C. (1976) Rolling hairpin model for replication of parvovirus and linear chromosomal DNA. Nature(London) 263:106-109.

Tennant, R. W. and Hand, R. E. (1970) Requirement for cellular synthesis for Kilham rat virus replication. Virology 42:1054-1063.

Tijissen, P. and Arella, M. (1991) *Parvoviridae*. Structure and replication of densonucleosis virus. (Adams, J. R. and Bonami, R., Eds.) pp. 41-54. Atlas of invertebrate viruses. CRC Press, Boca Raton.

渡部仁・前田進・松井正春・清水孝夫 (1976) 家蚕中腸皮膜における軟化病ウイルス(伊那株)の増殖について. 日蚕雑 45:29-34.

渡部仁・川瀬茂実・清水孝夫・関宏夫 (1986) カイコ濃核病ウイルスの血清学的異同　日蚕雑 55:75-76.

Williams, A. and Ibrahim, I. (1981) A new mechanism involving cyclic tautomers for the reaction with nucleophiles of the water-soluble peptide coupling reagent 1-Ethyl-3-(-(domethylamino)propyl)carbodiimidine(EDC). J. A. C. S. 103:7090-7095.

Wilson, G. M., Jindal, H. K., Yeung, D. E., Chen, W. and Astell, C. R. (1991) Expression of minute virus of mice nonstructural protein in insect cells: purification and identification of ATPase and helicase activities. Virology 185:90-98.

山崎　寿・酒井栄一・下平睦夫・山田たけを (1960) :長野蚕糸報 61:1-28.

Zuker, M. and Stiegler, P. (1981) Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. Nucleic Acids Res. 9:133-148.

inches 1 2 3 4 5 6 7 8

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

Kodak Gray Scale

C Y M

© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19