



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Identification, molecular characterization, and application of a novel virus isolated from mosquito larvae in Okushiri Island, Japan [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Kurnia, Yudistira Wahyu
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第12433号
Issue Date	2016-09-26
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/63751
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Yudistira_Wahyu_Kurnia_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（農学）	氏 名	Yudistira Wahyu Kurnia
審査担当者	主査	教授	伴戸 久徳
	副査	教授	増田 税
	副査	准教授	浅野真一郎
	副査	講師	中原 健二
	副査	助教	佐藤 昌直

学位論文題名

Identification, molecular characterization, and application of a novel virus isolated from mosquito larvae in Okushiri Island, Japan

（北海道奥尻島において蚊幼虫から分離された新規ウイルスの同定、性状解析および利用）

本論文は、英文 69 頁、図 11、表 4、主要部分は 2 章からなり、参考論文 2 編が付されている。蚊類は公衆衛生上最も影響の大きな害虫の 1 つであり、マラリアやデング熱、チクングニア熱、日本脳炎、そして黄熱病など多くの重篤な感染症の病原体を媒介する。蚊媒介感染症への対策としては病原体媒介昆虫である蚊の防除が極めて重要である。蚊の防除を展開するに当たり、他の害虫防除と同様に IPM（総合的病害虫管理）の概念のもと、化学的防除法に代わる環境負荷の低い生物的防除手法の充実が環境保護の観点から強く望まれる。現在、昆虫特異的ウイルスの利用は、生物的防除資材として最も重要な選択肢の 1 つと考えられているが、蚊の防除に利用できる十分なウイルスが分離されていないのが現状である。

本研究は、このような現状に鑑み、野外の蚊幼虫からの新規ウイルス（奥尻ウイルス）の分離・性状調査、ならびにその利用に向けた基盤構築を目的として行われたものである。本論文は、北海道奥尻島において採集した蚊幼虫からの新規ウイルス分離とその性状解析結果を第 1 章に、そのウイルスの遺伝情報機能解析と利用のための基盤構築の成果を第 2 章にまとめたものである。

1) 奥尻ウイルスの分離同定と性状解析

北海道奥尻島で採集したヤブカ (*Aedes*) 幼虫サンプルから、ウイルスの分離を試みた。サンプル抽出液をヤブカ由来の培養細胞 C6/36 細胞に接種したところ、細胞病変効果 (CPE) を示すものが存在した。最も強く細胞病変を示した培養細胞の培養液を電子顕微鏡で観察したところ大量のウイルス様粒

子が確認できた。このウイルス様粒子を精製し、再び C6/36 に接種したところ、同様の強い CPE が観察されたことから、これを奥尻ウイルスと命名し、さらに詳しく調査した。ウイルス粒子は、直径 50-70nm のほぼ球状であり、9,704 塩基からなる一本鎖 RNA を含んでいた。この RNA をクローニングし、塩基配列を解析したところ、5' 末端にはおそらく Cap 構造が存在し、3' 末端にはポリ A 尾部を有するポジティブ鎖であることが判明した。また、本 RNA には 3 つの主要 ORF (open reading frame 1, 2, および 3) が存在し、それぞれ 268 kDa, 45 kDa, 22 kDa のウイルスタンパク質がコードされていた。ORF1 にコードされるアミノ酸配列には、methyltransferase domain, Ftsj-like methyltransferase domain, helicase domain そして RNA-dependent RNA polymerase domain が含まれており、これらの機能を有するウイルス非構造タンパク質がコードされていると考えられた。一方、ORF2 と ORF3 にコードされるアミノ酸配列には膜貫通領域や糖鎖の付加部位の存在が予想され、ウイルスの構造タンパク質がコードされている可能性が示唆された。これらの配列をもとに本ウイルスの進化系統解析を行ったところ、本ウイルスは現在提案されている新規の昆虫特異的ウイルスグループである Negevirus に属し、植物ウイルスとも近い関係を有することが判明した。

2) 感染性cDNAの構築と奥尻ウイルスを用いた外来遺伝子の発現

奥尻ウイルスゲノム情報の機能解析と本ウイルスを用いた蚊の防除資材や遺伝子発現ベクターの開発のために極めて重要である感染性 c DNA の構築を試みた。まず、断片化されてクローニングされたウイルス RNA を連結させ、完全長 c DNA を構築した。つぎに、これを *in vitro* 転写させて得られた RNA を C6/36 細胞に導入したところ、ウイルス粒子を感染させた場合と同様の CPE が観察されるとともに、感染性ウイルス粒子が得られ、奥尻ウイルスの感染性 c DNA クローンを得ることが出来たと結論した。次に、本ウイルス RNA の ORF3 を蛍光タンパク質遺伝子 (*gfp*) に置き換えた組換えウイルス RNA を作製した。本ウイルス RNA は、単独で *gfp* は発現できるが感染性粒子は産生出来なかった。しかし、この RNA を野生型のウイルス RNA と同時に導入することで、感染性組換えウイルス粒子を得ることが可能であった。

以上、本研究では奥尻島で採集した蚊幼虫から新規 Negevirus を分離し、遺伝情報解析と進化系統学的解析を加えた。また、本ウイルスの感染性 cDNA とそれを利用した外来遺伝子発現システムの構築に成功した。これらの成果は、現在詳細が不明な Negevirus の生態とウイルスゲノム機能の解析、および本ウイルスの利用開発に向けて道を開くものとして高く評価できる。

よって、審査員一同は、Yudistira Wahyu Kurnia が博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。