



Title	膜融合タンパク質GP64のアミノ酸多型とカイコ核多角体病ウイルスの増殖・病原性に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	関口, 真理
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第15297号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89554
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Sekiguchi_Mari_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称： 博士（農学）

氏名 関 口 真 理

学位論文題名

膜融合タンパク質 GP64 のアミノ酸多型とカイコ核多角体病ウイルスの増殖・病原性に関する研究

適応進化とは変異獲得と自然選択を通じて生存環境に適応的となる進化を指す。ウイルスの適応進化研究では、適応進化への膜融合タンパク質の関与が報告されている。ウイルスの膜融合タンパク質は、ウイルスの宿主細胞への侵入に必須な役割を持ち、様々なウイルスにおいて膜融合活性がウイルス増殖に影響を与えることが知られている。カイコ核多角体病ウイルス *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV)においても、膜融合タンパク質 GP64 は宿主細胞のレセプターとの結合、膜融合、出芽を担う、ウイルスの生活環に必須な遺伝子である。北海道大学で分離された BmNPV H4 株と標準株 T3 株の GP64 には 6 箇所のアミノ酸多型 A30 Δ 、L99M、G158S、Y172H、V181I、R191K が存在する。GP64 を T3 株と H4 株で交換したキメラウイルスの増殖が細胞およびカイコで変化することが先行研究で示された。また、これらアミノ酸残基の 1 つである 172 番目のチロシンを T3 型から H4 型アミノ酸残基置換した GP64^{T3/Y172H}を持つ BmNPV である BT3/GP64^{T3/Y172H} は、T3 株 (BT3 control virus) と比較してカイコ幼虫個体での増殖が低く、感染カイコの生存時間も長くなることが示されていた。172 番目のチロシンは T3 を含むほぼ全ての BmNPV 系統で保存されているが、172 番目のチロシンはカイコに感染する BmNPV に特異的な変異であり、H4 株が持つヒスチジンは祖先型である。これらの結果から、BmNPV の祖先ウイルスがカイコへの適応する過程で H172 から Y172 へと GP64 が変異した可能性が示唆された。

本研究では、GP64 のこれらのアミノ酸多型について、膜タンパク質としての機能からウイルス・感染個体の表現型までを総合的に評価し、各アミノ酸多型の生物学的意義を検討した。

1. GP64 のアミノ酸多型が膜融合活性に与える影響

タンパク質レベルの機能解析として、膜融合活性とアミノ酸多型の関係を評価した。アミノ酸多型を組み合わせた GP64 変異体を発現するプラスミドを BmN 細胞に導入し、シンシチウム形成 pH、シンシチウム内核数の 2 指標を膜融合活性として定量し、比較した。どちらの指標においても、T3 系統型 GP64 にアミノ酸置換 Y172H を含む変異体 GP64^{T3/Y172H}、GP64^{T3/L99M,Y172H}、GP64^{T3/Y172H,V181I}、GP64^{T3/A30 Δ ,G158S,Y172H,V181I,R191Y} の膜融合活性が高かった。近縁ウイルスでの研究により、T3 系統型 GP64 の 172 番目に相当するヒスチジン残基は低 pH 依存性の GP64 の構造変化を引き起こす pH センサーの機能が報告されており、GP64^{T3/Y172H} では 172 番目のアミノ酸がチロシンからヒスチジンへと置換され、ヒスチジン残基の数が増加したことで GP64 の pre-fusion 構造の安定性が低下し、膜融合活性が高くなったと推測される。また、GP64^{H4/M99L} の膜融合活性は H4 系統の GP64 変異体の中で一番高かった。L99M と Y172H は GP64 の膜融合に重要な領域である fusion loop に存在し、L99M と Y172H の間には相互作用があると考えられた。

2. アミノ酸多型が培養細胞でのウイルス増殖に与える影響

ウイルスの培養細胞での増殖効率の 1 つの指標として、プラークサイズがある。本研究で作製した GP64 変異体ウイルス 17 種類について感染後 96 時間後のプラーク面積を測定した。その結果、T3 系統のゲノムおよび GP64 に Y172H をもつ組み合わせウイルス BT3/GP64^{T3/Y172H}、

BT3/GP64^{T3/L99M,Y172H}、BT3/GP64^{T3/A30Δ,G158S,Y172H,V181I,R191K} のプラークの面積が BT3 control virus と比較して大きかった。また、膜融合活性とプラークの面積の中央値には正の相関が見られ、膜融合活性が高くなると、プラークサイズが大きくなることが示唆された。

次に培養細胞でのウイルス増殖について評価した。MOI=1 の濃度でウイルスを細胞に接種し、培養上清中のウイルスゲノムコピー数を qPCR で測定した。GP64 変異ウイルス 17 種類の増殖の結果をまとめると、BH4/GP64^{H4/H172Y} のみが BH4 control virus と比較して 100 分の 1 と顕著に低い増殖を示したが、それ以外の供試変異ウイルスは BT3 control virus と同等かそれより低い増殖を示し、増殖に有意な差は見られなかった。培養細胞でのウイルス増殖と膜融合活性には正の相関が見られ、膜融合活性が高いとウイルスの増殖が高いことが示唆された。

3. アミノ酸多型がカイコ個体でのウイルス増殖、ウイルス感染カイコの生存時間に与える影響

GP64 変異ウイルス 17 種類を、5 齢起蚕の血体腔に 100 PFU の濃度で注射し、経時的に体液を採取、体液中のウイルスゲノムコピー数を qPCR で測定し、ウイルスの増殖を比較した。BT3 control virus より増殖が低かった変異体は BT3/GP64^{T3/Y172H} のみであり、特に感染後 48 時間で 0.018 倍と有意に増殖が減少した。

GP64 変異によるウイルス増殖の違いが、カイコの生存時間に影響を与えるかを調べるため、ウイルスを注射したカイコの死亡時刻を記録し、生存時間解析を行った。BT3 control virus と比較して、BT3/GP64^{T3/Y172H} が感染したカイコの生存時間が最も長く、次いで BT3/GP64^{T3/L99M,Y172H}、BT3/GP64^{T3/Y172H,V181I}、BT3/GP64^{T3/A30Δ,G158S,Y172H,V181I,R191K} の感染カイコの生存時間が長かった。カイコでのウイルス増殖とウイルス感染カイコの生存時間の結果をまとめると、Y172H を持つウイルスの生存時間は長くなる傾向があり、その他のアミノ酸多型を持つと生存時間が短くなる傾向があった。またウイルス増殖と生存時間には弱い負の相関が見られ、カイコでのウイルス増殖が高いと生存時間が短くなった。

これらを総合すると、H4 系統が持つ Y172H 以外の 5 つのアミノ酸多型は、Y172H 置換によるカイコにおけるウイルスの増殖低下、感染カイコの生存時間延長の効果に対し、それを緩衝していることが示された。また、カイコでのウイルス増殖と GP64 の膜融合活性には弱い負の相関がみられ、膜融合活性が高くなると、カイコでの増殖が減少する傾向があった。Y172 はカイコに感染する BmNPV の系統では高度に保存されており、また祖先型の H172 を持たせたウイルス感染カイコの生存時間が長くなったことから、GP64 の変異を通じてカイコを宿主とした生活環に有利な変異として Y172 が選択されたと考えられる。ウイルス感染カイコの生存時間が長くなった場合は、病原性の低下により子孫ウイルスを伝搬する前に、周囲のカイコが蛹化し、次の個体への感染の機会を逸する可能性が高い。したがって、ウイルス感染カイコの生存時間は BmNPV の祖先ウイルスにとってカイコを宿主とした生活環に影響する形質であり、GP64 はその適応進化を駆動する重要な因子であると結論づけた。

以上をまとめると、本研究は、①GP64 の Y172H アミノ酸置換が培養細胞での膜融合活性の上昇、プラークサイズを増加だけでなく、カイコ個体でのウイルス増殖能の低下、感染カイコの生存時間の延長にも大きく影響し、②H4 系統が持つその他の 5 つのアミノ酸多型は、Y172H をもつウイルスのカイコでの増殖低下、感染カイコの生存時間延長の効果に対し、それを緩衝する形で相加的・相乗的な効果を持つことを明らかにした。更に③アミノ酸多型によって変化する表現型の間では、培養細胞での膜融合活性とカイコ個体でのウイルス増殖・生存時間に相関を見出し、細胞レベルでの表現型と個体レベルでの表現型の関連を明らかにした。

これらの結果から BmNPV 祖先ウイルスのカイコへの適応進化の 1 つのシナリオとして、膜融合活性に影響する GP64 の変異が、個体レベルでのウイルス増殖、感染カイコの生存時間の調節につながり、カイコへの適応度の向上につながった変異が選択されたことを提案する。