



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_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 関口真理

審査担当者 主査 准教授 佐藤昌直
副査 教授 浅野眞一郎
副査 教授 奥山正幸

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

本論文は、図 18、表 12、文献 79 を含む頁数 115、および頁数 11 の付録、表を含む和文論文であり、参考論文 1 編が添えられている。

関口真理氏はカイコ核多角体病ウイルス *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) の膜融合タンパク質 GP64 について、宿主個体でのウイルス増殖に関する役割、北海道大学で分離された BmNPV H4 株の GP64 アミノ酸配列に着目し、遺伝学的・ウイルス学的な研究を展開した。GP64 研究において個体レベルでのウイルス増殖への影響、進化学的観点での研究は極めて限定的で未開拓の研究領域である。本提出論文では、H4 株と標準株 T3 株の GP64 に存在する 6 箇所のアミノ酸多型 A30Δ、L99M、G158S、Y172H、V181I、R191K 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 アミノ酸多型が膜融合活性に与える影響

膜融合活性とアミノ酸多型の関係を細胞学的にまず評価し、アミノ酸多型を組み合わせた GP64 変異体発現 BmN 細胞でのシンシチウム形成 pH、シンシチウム内核数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/A30Δ,G158S,Y172H,V181I,R191K} の膜融合活性が高かった。GP64^{T3/Y172H} は低 pH 依存性の GP64 の構造変化を引き起こす pH センサーの機能に関わる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可能性を提案した。

2. GP64 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

次に作製 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、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/Y172H,V181I}、BT3/GP64^{T3/A30Δ,G158S,Y172H,V181I,R191K} のプラークの面積が T3 株コントロールウイルスと比較して大きく、膜融合活性とプラークの面積の中央値には正の相関を見出した。培養細胞でのウイルス増殖に関しては、H4 系統ゲノム・GP64 に H172Y を持つ変異体 BH4/GP64^{H4/H172Y} のみが H4 株コントロールウイルスと比較して 100 分の 1 と顕著に低い増殖を示すことを明らかにした。

3. GP64 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 種類をカイコ 5 齢幼虫へ接種し、ウイルスの増殖を比較した。コントロールウイルスより増殖が低下した変異体は 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することを明らかにした。GP64 変異によるウイルス増殖の違いとカイコの生存時間の相関を調べたところ、Y172H をもつウイルス BT3/GP64^{T3/Y172H}、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く、カイコで

のウイルス増殖が高いと生存時間が短くなることを見出した。

関口氏はこれらを総合して議論し、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する緩衝効果を持つこと、カイコでのウイルス増殖と培養細胞での膜融合活性には弱い負の相関があり、膜融合活性の向上とカイコでの増殖の減少、生存時間延長との関連を指摘した。これらの実験・解析結果、考察は、GP64 による感染カイコにおけるウイルス量・生存時間の調節によって BmNPV はカイコを宿主とした生活環に適応した仮説を提唱するものであり、独創性が高い。

よって、審査員一同は、関口真理氏が博士（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。