綜 説

昆虫核多角体病ウイルス

——最近の研究から——

河 原 畑 勇

九州大学農学部生物的防除研究施設

(受付: 昭和59年 8月21日)

I. は じ め に

昆虫核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis viruses of insects) は二重鎖 DNA を持つ代表的な無脊椎動物ウイルスで、バキュロウイルス科 (Baculoviridae) サブグループ A 群に属する¹⁾。核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus: NPV) のクリプトグラムは D/2: 80-100/8-15: U or U₀/E: I/0 で、昆虫類以外には甲殻類から記録されているが²⁾、ここでは昆虫類を宿主とする NPV のみを取扱うことにする。

NPV に関する研究は1960年代までは *in vivo* での研究が大部分であったが、1970年代になって昆虫細胞培養技術の急速な進歩により、*in vitro* 系による研究の急激な発展が見られるようになった³⁾。1973年 Hink and Vail⁴⁾がイラクサキンウワバ *Trichoplusia ni* の培養細胞⁵⁾上に北米産のキンウワバの一種から分離された *Autographa californica* NPV⁶⁾ のブラック形成に成功したのを契機に、NPV 研究の加速度的発展がはじまったことは誰もが認めていることである。

この綜説は NPV の最近の研究を中心に、昆虫培養細胞と NPV の系における、ブラック検定、ウイルスクローニング、NPV の変異株、NPV DNA の制限酵素による切断、physical map、NPV DNA の転写物および翻訳物、血清学にふれ、昆虫核多角体病ウイルスを理解するうえでの一助になればと紹介を試みた。

また、培養細胞における昆虫病原性ウイルスの感染と増殖については Grandos³⁾、昆虫病原性ウイルスの核酸および構造蛋白については Harrap and Payne⁷⁾、バキュロウイルスの *in vivo* および *in vitro* における増殖

については Kelly⁸⁾、の綜説があるので参照されたい。

II. 昆虫の種類と核多角体病ウイルス

現在地球上に生存している昆虫の種類数はいまだ十分に解明されていないが、これまでに記載された種の総数は約80万種であるといわれている⁹⁾。NPV が記録された昆虫は鱗翅目(チョウ、ガの類; 種類数約10万)から326種、双翅目(ハエ、アブの類; 種類数約12万)から21種、膜翅目(ハチ、アリの類; 種類数約10万)から26種、脈翅目(クサカゲロウの類; 種類数1万以下)から2種、毛翅目(トビケラの類; 種類数1万以下)から1種、鞘翅目(コガネムシ、タマムシの類; 種類数約35万)から4種、計380種にすぎない¹⁰⁾。NPV の多くは、鱗翅目昆虫で比較的個体数の多い種類の幼虫から多く記録されているが、このような昆虫は害虫であることが多く、異常発生の際に NPV に感染した個体が発見されたりすることと関係があると考えられる。農林業の重要害虫を宿主とする NPV は害虫防除のための重要天敵微生物として注目され、研究が進められている。現在米国ではタバコガの一種 *Heliothis zea* の NPV が微生物殺虫剤として登録市販されている。このほか、マイマイガの *Lymantria dispar* NPV、ドクガの一種で米国西海岸の針葉樹林の害虫の *Orygia pseudotsugata* NPV などが有力な微生物天敵として研究されている。わが国ではハスモンヨトウ *Spodoptera litura* の NPV が岡田¹¹⁾によって研究され実用化試験が行われた。

III. ビリオンの性状

NPV は宿主細胞の核内に多角体 (polyhera, polyhedral inclusion body, occlusion body ともいう) を形成する。この多角体は結晶状の多角体蛋白 (polyhedrin: ポリヘドリン) によって包埋 (occlusion) された桿状

Nuclear Polyhedrosis viruses of insects by Takeshi KAWARABATA Institute of Biological Control, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812, Japan

〒812 福岡市東区箱崎6-10-1

のビリオン (occluded virus: OV) を含んでいる。また, NPV は多角体に包埋されている OV 粒子の形態およびその量的差異によりサブタイプにわけられている。OV のエンベロープ内に2~10数本の桿状粒子束 (bundle) を内蔵した OV を多数含む多角体を形成するものをサブタイプ M(multi-capsids) NPV, またエンベロープ内に1本の桿状粒子を内蔵した OV を最も多く含む多角体を形成するものを S(single-capsid)NPV としている¹⁾。MNPV の OV にもエンベロープ内に1本の桿状粒子を内蔵した粒子が必ず少量存在している。また, SNPV の OV にも少量ではあるがエンベロープ内に複数の桿状粒子を内蔵した粒子が見られる。したがって MNPV および SNPV ともビリオンのサイズは, エンベロープ内に1本の桿状粒子を内蔵した OV を測定して決定され, $200\sim 400\times 40\sim 60\text{nm}^{\text{1)}$ である (図1; 図2)。

宿主昆虫(主に幼虫)により食下された多角体は消化管内の高アルカリ条件下で溶解し, 消化管内に放出された OV は中腸の細胞に感染する。感染した宿主の細胞からは体腔内に OV とは形態および機能の異なる, 多角体には包埋されない性質のウイルス粒子 (nonoccluded virus: NOV; plasma membrane budded nonoccluded virus: PMB-NOV; BV; extracellular virus: EV) が放出される (図3)。

OV は多角体に包埋されたのち, 宿主と同世代の個体および後代の個体との間 (interindividual) における NPV の伝播に関与する。一方, NOV は感染した宿主内部の細胞間 (intercellular) における感染の伝播に関与している。

多角体をアルカリで溶解し, しょ糖密度勾配遠心法で精製したカイコガ *Bombyx mori* NPV の OV と NOV

図1 多角体をアルカリ溶液で処理してえられた各種 NPV occluded virus (OV) のしょ糖密度勾配遠心沈降パターン。Single-capsid virion (sv) より下方に形成されたバンドはすべて multi-capsid virion のバンドである。Bm SNPV: カイコガ *Bombyx mori* SNPV; Mn MNPV: オビカレハ *Malacosoma neustria* MNPV; Sl MNPV: ハスモンヨトウ *Spodoptera litura* MNPV; Ls MNPV: アワヨトウ *Leucania separata* MNPV; Hc MNPV: アメリカシロヒトリ *Hypantria cunea* MNPV; La MNPV: マイマイガ *Lymantria dispar* MNPV; Mb MNPV: ヨトウガ *Mamestra brassicae* MNPV; Gm MNPV: ハチミツガ *Galleria mellonella* MNPV。

図 2 カイコガ *Bombyx mori* SNPV の occluded virus (OV). 典型的な single-capsid virion.

図 3 カイコガ *Bombyx mori* SNPV の nonoccluded virius (NOV). Plasma membrane 出芽の際に獲得した envelope が脱落したと推定される粒子 (カイコガ幼虫体液中より分離).

図4 昆虫培養細胞に感染した核多角体病ウイルス. A: *Spodoptera frugiperda* sf21AE II 細胞に形成されたハスモンヨトウ *Spodoptera litura* MNPV の感染による多角体. B: *Spodoptera frugiperda* sf21AE II 細胞上に形成されたシロモンヤガ *Amathes c-nigrum* MNPV のブラック. 容器の直径=17mm. Neutral red 染色.

を多量に含むカイコガ幼虫感染体液上清を直接カイコガ幼虫に飲ませて接種したところ、OV が感染力を示したのに対し、NOVによる感染はほとんど成立しなかった¹²⁾. 一方、OV と NOV を幼虫に注射¹²⁾ または昆虫培養細胞に接種¹³⁾した場合は、OV および NOV による感染がそれぞれ成立したが、NOV の感染力が OV よりはるかに高く、*in vivo* で 100 倍以上¹²⁾、*in vitro* では 1,000 倍以上¹³⁾ の差であった。また、抗 NOV 血清が NOV よびを OV を中和したのに対し、抗 OV 血清は NOV を中和しなかった¹²⁾¹³⁾。また *in vitro* では抗 OV 血清による OV の中和が見られた¹³⁾が、*in vivo* では抗 OV 血清による OV の中和は明瞭に認められなかった¹²⁾。このように OV と NOV には抗原的に差異が認められる。

また、OV と NOV はそれぞれ形態の異なるエンベロープに包まれ、OV ではエンベロープと内部の桿状粒子が強く結合しているのに対し、NOV ではエンベロープと内部の桿状粒子の結合は緩やかである。一方、OV がエンベロープを核内で獲得するのにに対し、NOV は感染細胞から出芽の際にエンベロープを獲得し、ペプロマー構造を持つ¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾。

IV. 昆虫培養細胞とブラック形成

昆虫の株化細胞として最初に確立されたのは Grace¹⁸⁾ の *Antheraea eucalypti*(鱗翅目: ヤママユガ科) 細胞系であった。昆虫株化細胞の数はその後急激に増加し、1972年までに84株¹⁹⁾、1976年には 総計114株²⁰⁾、1979年

には総計185株²¹⁾に達している。しかし、昆虫の細胞では初代培養では宿主の NPV 感受性が維持されているようであるが²¹⁾²²⁾、株化細胞では感受性が変化し、*in vivo* で感染する NPV がほとんど増殖しない場合も多い。

昆虫病原性ウイルスの昆虫株化細胞におけるブラック形成は1973年、イラクサキンウワバ *T. ni* (鱗翅目: ヤガ科)の成虫卵巣由来の株化細胞 TN-368⁵⁾と、*T. ni*と同じキンウワバ亜科の *Autographa californica* から分離された NPV との組合せではじめて成功した⁴⁾。*A. californica* NPV は *in vivo* でも *T. ni* に強い感染力を持っているが⁶⁾、NPV として例外的ともいえるほど広い宿主域を持ち、ヤガ科のほかキバガ科、メイガ科の昆虫にも感染する²³⁾²⁴⁾²⁵⁾。

昆虫培養細胞系における NPV のブラック形成(図4)が比較的良好な NPV と細胞の組合せを表1、に示した。ブラック検定とブラック純化が可能な系は、主に *A. californica* MNPV グループ (*A. californica* MNPV, *T. ni* MNPV, *R. ou* MNPV, *G. mellonella* MNPV) と *T. ni* TN-368 および *S. frugiperda* 細胞系、*S. frugiperda* MNPV グループ (*S. frugiperda* MNPV, *S. exigua* MNPV, *S. exempta* MNPV) と *S. frugiperda* 細胞系、また SNPV では *H. zea* SNPV と *H. zea* 細胞系に限定されているようである。

Hink and Vail⁴⁾ は寒天 および アガロース重層が *T. ni* 細胞系 TN-368 に障害を生じさせたため、半流動ではあるが、細胞障害を生じないメチルセルロース重層を採用し初期のブラック検定に多く使用された²⁶⁾²⁷⁾²⁸⁾¹⁴⁾²⁹⁾

表 1

文 献	核多角体病ウイルス	昆虫培養細胞	容 器	重 層 (overlay)	ブ ラ ッ ク 染 色	PFU/TCID ₅₀
Hink and Vail (1973) ⁴⁾	<i>Autographa californica</i> MNPV (キンウワバの一種)	<i>Trichoplusia ni</i> TN-368 (イラク サキンウワバ)	60×15 mm PPD ^{a)}	0.6% MC ^{c)}	neutral red	
Kundson and Tinsley(1974) ²⁶⁾	<i>Spodoptera frugiperda</i> MNPV (ハスモンヨトウの近 縁種)	<i>Spodoptera frugiperda</i> (ハスモンヨトウ の近縁種)	Leighton			0.7
Ramoska et al. (1975) ²⁷⁾	<i>A.californica</i> MNPV	<i>T. ni</i> TN-368	60×15 mm PPD	0.6% MC	neutral red	
Volkman and Summers (1975) ²⁸⁾	<i>A.californica</i> MNPV	<i>T. ni</i> TN-368	35mm PPD	0.9% MC		
Summers and Volkman (1976) ¹⁴⁾	<i>A.californica</i> MNPV <i>Rachiplusia ou</i> MNPV (キンウワバの 一種)	<i>T. ni</i> TN-368 <i>T. ni</i> TN-368	30mm PP ^{b)} 30mm PP	0.9% MC 0.9% MC	neutral red neutral red	
Potter et al. (1976) ²⁹⁾	<i>T. ni</i> MNPV	<i>T. ni</i> TN-368	35mm PPD	0.9% MC	neutral red	0.6
Volkman et al. (1976) ¹³⁾	<i>A.californica</i> MNPV <i>A.californica</i> MNPV <i>R. ou</i> MNPV	<i>T. ni</i> TN-368 <i>S. frugiperda</i> <i>T. ni</i> TN-368	30mm PP 30mm PP 30mm PP	0.9% MC 0.9% MC 0.9% MC	neutral red neutral red neutral red	
Hink and Strauss (1976) ³⁰⁾	<i>A. californica</i> MNPV	<i>T. ni</i> TN-368	60×15 mm PPD	0.6% MC	neutral red	
Wood(1977) ³¹⁾	<i>T. ni</i> MNPV	<i>T. ni</i> TN-368	Multiwell	1.5% AR ^{e)}		0.38-0.60
Brown and Fau- lkner(1977) ³²⁾	<i>A.californica</i> MNPV <i>T. ni</i> MNPV	<i>S. frugiperda</i> <i>S. frugiperda</i>	35mm PPD 35mm PPD	1.5% AR 1.5% AR	neutral red, neutral red,	
Brown and Fau- lkner(1978) ³³⁾	<i>A.californica</i> MNPV <i>A.californica</i> MNPV	<i>S. frugiperda</i> <i>Manduca sexta</i> (スズメガの一種)	35mm PPD 35mm PPD	1.5% AR 1.5% AR	INT INT	0.47-0.66 0.50-5.69
Lee and Miller (1978) ³⁴⁾	<i>A.californica</i> MNPV	<i>S. frugiperda</i>	60×15 mm	0.5% AR	neutral red	
Smith and Su- mmers(1978) ³⁵⁾	<i>A.californica</i> MNPV	<i>T. ni</i> TN-368	35mm PPD	1.5% AR		
Knudson(1979) ³⁶⁾	<i>A.californica</i> MNPV <i>Spodoptera exigua</i> MNPV (ハスモンヨト ウの近縁種) <i>Spodoptera exempta</i> MNPV (ハスモンヨト ウの近縁種) <i>T. ni</i> MNPV	<i>S. frugiperda</i> <i>S. frugiperda</i> <i>S. frugiperda</i> <i>S. frugiperda</i>	60×15 mm PPD 60×15 mm PPD 60×15 mm PPD 60×15 mm PPD	0.5% AR 0.5% AR 0.5% AR 0.5% AR	neutral red neutral red neutral red neutral red	0.69
Yamada and Maramorosch (1981) ³⁷⁾	<i>Heliothis zea</i> SNP (タバコガの一種)	<i>Heliothis zea</i> IPLB-1975 (タバコガの一種)	60×15 mm PPD	1.0% AR	neutral red	
Croizier and Quiot(1981) ²⁵⁾	<i>A.californica</i> MPVN <i>Galleria mellonella</i> MNPV (ハチミツガ)	<i>Bombyx mori</i> (カイコガ) <i>Bombyx mori</i>	35mm PPD 35mm PPD	1.5% MC 1.5% MC		
Knell and Sum- mers(1981) ³⁸⁾	<i>Spodoptera frugiperda</i> MNPV	<i>S. frugiperda</i>	35mm PPD	1.5% AR		
Fraser and Hink (1981) ³⁹⁾	<i>G. mellonella</i> MNPV <i>G. mellonella</i> MNPV	<i>T. ni</i> TN-368 <i>S. frugiperda</i>	60×15 mm PPD 60×15 mm PPD	0.6-0.9% MC 0.6-0.9% MC	neutral red neutral red	

- a) Plastic Petri dish.
- b) Plactic plate.
- c) Methyl-cellulose.
- d) Agarose.
- e) 2-*p*-iodophenyl-3-*p*-nitrophenyl-5-phenylterazolium chloride.

13)³⁰⁾。メチルセルローズ重層は半流動体であるため取扱にはアガロースの場合と異なる注意が必要であるが、昆虫細胞と同温度 (25~27°C) の重層を加えることが可能なため、温度ショックが防止できること、また前日に調製保存が可能で、アガロース重層よりブラック形成効率が高い長所があげられている³⁹⁾。

しかしアガロース重層による NPV のブラック検定が成功してからは³¹⁾、主にアガロース重層が採用されている³²⁾³³⁾³⁴⁾³⁵⁾³⁶⁾³⁷⁾²⁵⁾³⁸⁾。

ブラックカウント用にニュートラルレッドが多く用いられているが、昆虫細胞では、二次重層により細胞の器壁面からの剝離が起きやすいので、一次重層にニュートラルレッドを加えておく方法がとられている³⁶⁾。また PFU と TCID₅₀ の比は最高 0.6~0.7 程度の値が得られている²⁶⁾²⁹⁾³¹⁾³³⁾³⁶⁾。

ここで当研究室で行っている NPV のブラック検定法を簡単に紹介しておきたい。培養容器内の細胞をピペティングまたはラバーポリスマンで培養液中に浮遊させる。昆虫の細胞はトリプシン処理により活性に重大な影響を受けるので、トリプシンは使用できない。つぎに細胞浮液をプラスチックペトリ皿に約 10⁵ 細胞/cm² となるよう加え、室温で 1 時間静置する。定着した細胞が剝離しないよう上清をアスピレーションで除去する。ただちに NPV 浮遊液 (感染培養上清または感染幼虫体液が多く用いられる) を器壁面に沿って加え吸着を行う。通常、27°C、60 分吸着後、洗浄し、アガロース重層を加えて 27°C で 5~10 日培養後実体顕微鏡下でブラックカウントしている。

V. NPV の遺伝子型変異株 (variant)

NPV の DNA を制限酵素で切断し、アガロース電気泳動後の DNA 切断片パターンから NPV 野生株間の遺伝子型の差異が明瞭に確認できることが Miller and Dawes⁴¹⁾ によって昆虫ウイルスでは最初の例として発表された。*A. californica* MNPV, *Orygia pseudotsugata* (鱗翅目: ドクガ科) MNPV, *Heliothis zea* (鱗翅目: ヤガ科) NPV の DNA を *Eco* RI, *Hin* dIII, *Sal* I で切断した断片の電気泳動パターンから 3 種の DNA 間の遺伝子型が明瞭に区別された。また、*A. californica* MNPV と *T. ni* MNPV の制限酵素断片の電気泳動パターンを比較した結果、*T. ni* MNPV は *A. californica* MNPV に非常に近縁で、別個の NPV ではあるが *A. californica* NPV の遺伝子型変異株 (genotypic va-

riant) として位置づけられた⁴²⁾⁴³⁾。

Smith and Summers³⁵⁾ は *A. californica* MNPV (野生株) を *T. ni* 細胞系 TN-368 細胞でブラック純化した 11 のウイルスクローンの DNA を制限酵素で切断し、アガロース電気泳動を行い、*Eco* RI の切断片パターンから遺伝子型変異株 I 型 (E1, E2, E3, S4, S5, M1, M2, M4), II 型 (S2, M3), III 型 (S1) に型別した。I 型の E2 は典型的な野生型で、*A. californica* の代表的クローンとして標準株化されている。Lee and Miller³⁴⁾ は *A. californica* NPV を *S. frugiperda* 細胞上でブラック純化してえた 12 のウイルスクローンの DNA を制限酵素で切断後、そのアガロース電気泳動パターンで 5 群にわけた。典型的な野生型の L1 も E2 と共に *A. californica* MNPV の標準株の一つとなっている。

また、*A. californica* MNPV のクローンを *T. ni* 幼虫で 2~5 代継代後、幼虫から多角体をあつめ、アルカリ処理後精製した OV から DNA を抽出し、制限酵素で切断した切断片のパターンの変化を検討したが、遺伝子型の変化は認められなかった³⁴⁾。また遺伝子型から 5 群に型別された *A. californica* MNPV クローンを型別にそれぞれ 1 株ずつえらび、*T. ni* 幼虫に多角体の経口接種により型別の病原性を比較したが各遺伝子形と野生株との間に有意な差異は認められなかった⁴⁴⁾。Brown et al.⁴⁵⁾ は *S. frugiperda* 細胞を 33°C の高温培養に耐えうるよう順化させ、33°C でブラックを形成した *A. californica* MNPV をブラック純化し HR3 を選抜した。HR3 は E2 および L1 と *Hin* dIII 切断片に差異があることで区別される⁴⁶⁾。Tiya et al.⁴⁷⁾ も *A. californica* MNPV を *S. frugiperda* 細胞でブラック純化した株と野生株 (非ブラック純化) の制限酵素による切断片パターンから、野生株が複数の遺伝子変異株を含んでいることを確めた。

A. californica MNPV の遺伝子型変異株は *Diparopsis watersi* (鱗翅目: ヤガ科) から分離されている⁴⁸⁾。

R. ou (鱗翅目: ヤガ科) MNPV の由来を異にする 2 野生株 wt-1, および wt-2 を *T. ni* 細胞系 TN-368 でブラック純化した *R. ou* MNPV R1 (wt-2 由来) は制限酵素切断片パターンから *A. californica* MNPV と明瞭な差異が認められた。一方、wt-1 由来 3 株のうち R9 は *A. californica* MNPV の遺伝子型変異株、また AR7 および AR8 は *A. californica* MNPV E2

と *R. ou* MNPV R1 の自然生の組換型と判断された⁴⁹⁾.

ハチミツガ *Galleria mellonella* (鱗翅目: メイガ科) はミツバチの巣, 羊毛等を食害するという特化した食性を持っている. しかし *G. mellonella* MNPV の制限酵素切断片のアガロース電気泳動による分析の結果は, *G. mellonella* MNPV が *A. californica* MNPV の遺伝子型変異株で, E2 とは *Xho* I および *Bam* HI 切断点に差異があり, また挿入 (insertion) が2カ所ある点で区別された⁴³⁾.

S. frugiperda MNPV は北米で分離されて以来, 数カ所で継代されている. そこで由来の明らかな *S. frugiperda* MNPV を継代している, アメリカ (2研究室), 英国 (1研究室), オランダ (1研究室) の継代株間の遺伝子型を制限酵素切断片パターンで比較した⁵⁰⁾. この *S. frugiperda* MNPV はジョージア→メリーランド→英国→オランダの順に伝わったことが確認されている. *S. frugiperda* 細胞系でブラック純化を試みたが, ジョージア株と英国株は1回ブラックをひろった後から増殖不良となり, ブラック純化できなかった. 一方, メリーランド株とオランダ株はそれぞれ $\frac{6}{20}$ と $\frac{7}{20}$ がブラック純化された. *Eco* RI による切断片パターンで5型に型別されたが, ジョージア株中には B2 (野生型) と B1 が65%, メリーランド株では75%, 英国株では4%の割合で含まれていた. 一方, オランダ株から得られた D5, D6, D7 株のうちでは D7 (野生型) が優勢であった. 実験室継代は NPV ポピュレーション内の遺伝子型変異株の勢力関係の変化を加速すると推定された⁵⁰⁾. 北米各地で分離された *S. frugiperda* MNPV 野生株から DNA を抽出し, 制限酵素による切断片パターンの比較から, 二群にわけられた⁵¹⁾.

NPV の地理的変異株 (geographic variant) については, ヨトウガ *Mamestra brassicae* MNPV⁵²⁾, ハスモンヨトウの近縁種 *Spodoptera littoralis* MNPV⁵³⁾, カブラヤガの一種 *Agrotis segetum* NPV⁵⁴⁾, とキンウワバ亜科の *Pseudoplusia includens* SNPV, *T. ni* SNPV, *Syngrapha selecta* SNPV⁵⁵⁾ について野生株 (非クローン) の DNA を制限酵素で切断し, 切断片のアガロース電気泳動パターンを比較し, 地理的変異株がその遺伝子型により型別された.

また Gettig and McCarthy⁵⁶⁾ はタバコガの近縁 (*Heliothis* spp.) 4種から分離された10株の野生株 NPV DNA の制限酵素切断片アガロース電気泳動パターンから SNPV と MNPV には共通な切断片が少数で, その遺伝子型には明瞭な差異がみられた. また SNPV グループではグループ内で高い相同性が見られた. オオタバガ *H. armigera* には MNPV と SNPV があるが, 両

者の遺伝子型にはかなりの差異が見られ, 別の NPV であることが確認された⁵⁷⁾.

In vivo で成立したと推定される *A. californica* MNPV と *R. ou* MNPV の組換型 (recombinant)⁴⁹⁾, また *in vitro* での混合感染により *A. californica* MNPV E2 と *R. ou* MNPV R1 の組換型⁵⁸⁾ および *A. californica* MNPV と *G. mellonella* MNPV の組換型²⁵⁾ ウイルスが分離されている.

VI. NPV の突然変異株 (mutant)

Hink and Vail⁴⁾ は *A. californica* MNPV のブラックに, 核内に多数の多角体が形成された細胞で構成された MP (many polyhedra) ブラックと核内に少数 (≦10多角体/細胞) しか多角体が形成されない細胞で構成された FP (fair polyhedra) ブラックが見られることをはじめて報告した. また, FP ブラック形態突然変異株は *G. mellonella* MNPV³⁹⁾ および *T. ni* MNPV²⁹⁾ から発見された. FP 変異株の形成した多角体の多くは OV を含まないが, ごく少数の OV または不完全なウイルス粒子を含む場合が多い⁴⁾²⁹⁾³⁹⁾. FP 変異株は NPV の *in vitro* 継代を3~4回反復した後に検出されたが, *in vivo* でも FP 変異株が存在していることが確認された³⁹⁾⁵⁹⁾. また FP 変異株を含む試料を *In vivo* 継代した結果 FP 変異株の割合が減少した⁵⁹⁾. ウイルス増殖能力に関しては, FP 変異株は MP 変異株と同様で, 特に欠損は見られないが, NOV 産生開始時間が MP 変異株より早い³⁹⁾²⁹⁾.

FP 突然変異株の発生機構について, Miller and Miller⁶⁰⁾ は *A. californica* MNPV FP 変異株のゲノムの 86.4~86.6 マップ単位 (map unit) に宿主 (*T. ni* 細胞系) DNA の中程度反復配列と相同な DNA の挿入が起っていること, この挿入がショウジョウバエ *Drosophila* の *copia* like element に類似していることを指摘し, 宿主 DNA との組換による挿入が FP を発生させていることを示唆した. Fraser et al.⁶¹⁾ は *A. californica* MNPV およびその遺伝子型変異株である *G. mellonella* MNPV は宿主 (*T. ni* 細胞系) の DNA と組換を起こし, その部位が *A. californica* MNPV では *Hin* dIII-I 切断片, また *G. mellonella* MNPV では *Hin* dIII-J 切断片にあること, 宿主由来の DNA の挿入は 0.28~0.8 kb (kilo base) の中程度反復配列で *Alu* フェミリーが主で, その結果 FP が発生することを示唆した. また FP から復帰突然変異により MP 変異株が出現することも確認した⁶¹⁾.

A. californica MNPV E2 を *T. ni* 細胞系 TN-368 に高 MOI (multiplicity of Infection) で接種 (10

PFU/細胞) し、3日間隔で同様に継代を30回行ったのち、20のMP プラックをひろい、プラック純化した。20株のうち7株に親株と異なる *Eco* RI 切断パターンを持つものがあった。これらの継代突然変異株 (serial passage mutant) はウイルスゲノムの一部の反復配列の重複に起因し、MP 表現型に additional DNA sequence を持った遺伝子型があることが確認された。またこの additional DNA sequence は *A. californica* MNPV E2 の DNA に相同性が認められたが、宿主 DNA とは相同性が認められなかった⁶²⁾。

突然変異誘起剤による処理で NPV の ts 変異株⁴⁵⁾⁶³⁾ ⁶⁴⁾、多角体形態変異株⁶⁴⁾⁶⁵⁾、がえられた。

Brown et al.⁴⁵⁾ は NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) 存在下で *S. frugiperda* 細胞系に形成された *A. californica* MNPV のプラック 567 をひろい、高温 (33°C) および通常温度 (25°C) で *S. frugiperda* 細胞系と培養し、27株の ts 突然変異株を得た。この中には 33°C で多角体形成および NOV 産生のできない ts NOV 変異株、NOV は産生するが多角体形成が抑制される ts 多角体変異株が含まれていた。また相補性試験の結果、5群にわけられた。

Lee and Miller⁶³⁾ は *A. californica* MNPV を NTG および BUdR (5-bromo-2'-deoxyuridine) 処理後、高温 (32.5°C) と通常温度 (23.5°C) で ts 変異株を選抜した。NTG 処理で11株、BUdR で5株の ts 変異株がえられ、相補性試験の結果15群にわけられた。また Duncan and Faulkner⁶⁴⁾ は 33°C でプラック形成する力の強い、*A. californica* MNPV HR3 を BUdR で処理し、ts 変異株計12株を得ている⁴⁵⁾。

MNPV の多角体形態変異株で感染細胞の核に大型の多角体を1個だけ形成するもの2株⁶⁵⁾の多角体には少数のOVしか包埋されていなかった。また、Duncan and Faulkner⁶⁴⁾ は異常な形態の多角体を産生する多角体形態変異株と多角体非形成変異株を1株得た。Brown and Faulkner⁶⁶⁾ は ts 多角体非形成変異株を分離した。この株は 33°C では多角体を形成しない。

Ⅶ. NPV DNA の性状

1. NPV DNA のホモロジー

Spodoptera 属 (鱗翅目: ヤガ科) 4種の昆虫から分離された MNPV 間には Hybridization 法で測定した結果、その DNA には15~75% 程度のホモロジーが見られた⁶⁷⁾²⁶⁾。一方、*Orygia pseudotsugata* (鱗翅目: ドクガ科) の MNPV と SNPV 間にはわずか1%の相同性しか認められていない⁶⁸⁾。SNPV グループと MNPV グループ間の DNA のホモロジーは一般に1%か

それ以下であるとされる⁶⁹⁾⁷⁰⁾。しかし、MNPV グループ内でも *A. californica* MNPV と *O. pseudotsugata* MNPV は1%程度のホモロジーしか認められなかった⁷¹⁾⁷²⁾。一方、*A. californica* MNPV と *R. ou* MNPV、また *H. armigera* MNPV と *M. brassicae* MNPV 間には強いホモロジーが見られた⁷⁰⁾⁷²⁾。

Smith and Summers⁷²⁾ は Southern blot hybridization 法でポリヘドリン遺伝子をコードしている、*A. californica* MNPV の *Eco* RI-I 切断片と他の NPV の DNA 間に強い塩基配列の相同性を見出した。また *A. californica* MNPV の *Eco* RI-L, -M 切断片にも他の NPV の DNA と強い相同性のある結果がえられた。また NPV の感染の後期にポリヘドリンと共に多量に生成する10K蛋白をコードしている *A. californica* MNPV の *Eco* RI-P 切断片⁷³⁾ と他の3種の MNPV DNA 間にも強い塩基配列の相同性のあることが示された⁷²⁾。

2. NPV の DNA による昆虫培養細胞のトランスフェクション

塩化カルシウム法による昆虫培養細胞を NPV の DNA でトランスフェクションした結果、NPV の NOV の *in vitro* での宿主域と NPV のインタクトな DNA の宿主域はほぼ完全に一致した⁷⁴⁾⁷⁵⁾。*A. californica* MNPV の DNA によりトランスフェクションの成立した細胞系は *T. ni* 細胞系 TN-368⁷⁴⁾⁷⁷⁾、*S. frugiperda* 細胞系⁶¹⁾⁷⁴⁾⁷⁶⁾⁷⁷⁾、*Manduca sexta* (鱗翅目: スズメガ科) 細胞⁷⁴⁾、*Malacosoma disstria* (鱗翅目: カレハガ科) 細胞系⁷⁴⁾ である。このほか *R. ou* MNPV の DNA と *T. ni* 細胞系 TN-368⁷⁴⁾、*T. ni* MNPV の DNA と *T. ni* 細胞系 TN-368⁷⁵⁾ および *S. frugiperda* 細胞系⁷⁵⁾ でトランスフェクションが成立した。

しかし、*A. californica* MNPV の DNA は塩化カルシウム法では *T. ni* 細胞系 TN-368 にトランスフェクションが成立せず、DEAE-デキストラン法で成功した⁷⁷⁾。

また、トランスフェクションのブースターとして DM-SO (Dimethyl sulfoxide)⁷⁴⁾⁷⁵⁾⁷⁶⁾ およびグリセロール⁷⁷⁾ が使用されている。

最近では1種類のインタクト DNA だけではなく、昆虫培養細胞をインタクトな NPV の DNA と DNA の制限酵素切断片、または2種類のインタクトな NPV の DNA どうしの組合せによりコトランスフェクションし、組換え型 NPV を選抜する方法が、ts マーカーレスキュー法⁷⁸⁾、ポリヘドリン遺伝子に挿入または欠損を持った *A. californica* NPV の組換え型の作製⁷⁹⁾、インターフェロン遺伝子を組込んだ組換え型 *A. californica* の作製⁸⁰⁾、*E. coli* の β -ガラクトシダーゼ遺伝子を組込んだ

組換型 *A. californica* NPV の作製⁸¹⁾に使われている。

3. NPV DNA の physical map

Miller and Dawes⁸¹⁾は *A. californica* MNPV L1 の DNA physical map を *Bam* HI, *Xma* I, *Eco* RI, *Hin* dIII 切断片地図で作製した。また制限酵素切断片から得られた L1 の分子量は $87.6 \pm 0.8 \times 10^6$ ダルトン (Da) であった。また *A. californica* MNPV L9 と *T. ni* MNPV DNA の physical map も同時に作製された。Smith and Summers⁴³⁾は *A. californica* MNPV E2 DNA の *Sma* I, *Kpn* I, *Bam* HI, *Sac* I, *Xho* I, *Eco* RI 切断片の physical map を作製した。また *A. californica* MNPV の S1, M3, S3 および R9 (*R. ou* wt-1 由来), そのほか *T. ni* MNPV, *G. mellonella* MNPV DNA の physical map を作製した。また, *A. californica* MNPV の近縁種 *R. ou* MNPV R1 の physical map と, *A. californica* MNPV E2 と *R. ou* MNPV R1 の連関地図が作られた⁴⁹⁾。⁵⁸⁾

突然変異誘起剤処理でえられた *A. californica* MNPV の ts 変異株の mutation site のマッピングも行われている⁶⁶⁾⁷⁸⁾。

このほか *A. californica* MNPV-1.2²⁵⁾, *A. californica* MNPV HR3⁴⁶⁾ の physical map が作製されたが, L1 および E2 とは明瞭な差異が見られた。

G. mellonella MNPV は Gershenson⁸²⁾に由来しているがアメリカで継代された *G. mellonella* MNPV⁴³⁾ とフランスで継代された *G. mellonella* MNPV²⁵⁾ の physical map が作製されたが, わずか *Bam* HI 切断片パターンが異なるのみであった。このほか *A. californica* MNPV E2 の継代変異株の repeated baculovirus DAN sequence の挿入位置⁶²⁾, および HR3 上に発見された 5 カ所の interspersed homologous region がマッピング⁸³⁾された。

Vlak and Smith⁸⁴⁾は *A. californica* MNPV の統一的 physical map を作製し, map の基点 (ゼロポイント) をポリヘドリン遺伝子を含む *Eco* R-I 切断片の 5' 末端にした physical map を提案した。

A. californica MNPV とその遺伝子型変異株以外の NPV では *S. frugiperda* MNPV⁸⁵⁾ および SNPV グループからはじめて *H. zea* SNPV⁸⁶⁾ の physical map が作製された。*H. zea* SNPV の *Xho* I—F 断片が *A. californica* MNPV E2 の *Hin* dIII—F 切断片 (ポリヘドリンの 3' 末端配列を含む) ハイブリダイズしたので, *H. zea* SNPV の physical map のゼロポイントは *Xho* I—F 切断片にしてある。

4. NPV DNA の形態とサイズ

NPV の OV または NOV から抽出された DNA 試料には cc (covalently closed) DNA の nc (nicked circular) DNA が混在している。量的には nc DNA が cc DNA より多く, cc DNA の量は 50% 以下である⁴⁷⁾。⁷⁵⁾ cc DNA および nc DNA はトランスフェクションにより, 昆虫培養細胞に感染するが cc DNA は nc DNA と同程度⁷⁵⁾, または 4 倍高い⁴⁷⁾ 感染力を示した。nc DNA が cc DNA より多い理由についてはよくわかっていない。

NPV DNA の分子量については電子顕微鏡, 光学的方法, 超遠心法, 電気泳動法等, 多様な方法で測定されている⁷⁾。代表的な NPV 9~12 種の DNA を制限酵素切断片法で測定した結果, $73 \sim 93 \times 10^6$ ダルトン³⁵⁾, また $96 \sim 163 \text{Kbp}$ ⁷²⁾ の値がえられているが, 研究者, 測定法により多少の差異がみられる。

VIII. ポリヘドリン遺伝子

A. californica MNPV ゲノム (約 130Kbp)⁴⁶⁾⁷²⁾ のコードする多数の遺伝子 (75 $\leq$)⁵⁸⁾⁸⁸⁾ のなかで, 現在最もその性状が解明されているのは, ポリヘドリン (多角体蛋白) 遺伝子であろう。ポリヘドリン遺伝子がウイルスゲノムにコードされているか, 宿主の染色体にコードされているかについては, ごく最近まで, 明確な解答にえられなかった。

Van der Beek et al.⁸⁹⁾は *A. californica* MNPV 接種 24 時間後 (p. i.: post inoculation) の *S. frugiperda* 細胞系の細胞質中の poly(A)+RNA を抽出し, hybridization selection 法で *A. californica* NPV DNA と結合する poly(A)+RNA をあつめた。これらの poly(A)+RNA の *in vitro* 翻訳物中にはポリヘドリンと同じ 30K 蛋白が含まれていた。また翻訳物に抗ポリヘドリンを血清を加え, 免疫沈降法でえられたポリペプチドは 30K のものだけであった。このようにして, ポリヘドリンが NPV によりコードされていることがはじめて確認された。

Summers et al.⁵⁸⁾は *A. californica* MNPV S1 と *R. ou* MNPV の組換型 AR のポリヘドリン, ウィルス構造蛋白, 制限酵素切断片の分析結果を *A. californica* MNPV の physical map⁴³⁾ と対比しつつ検討し, ポリヘドリン遺伝子が *A. californica* MNPV S1 では *Eco* RI—I 切断片上に, *R. ou* MNPV R1 では *Eco* RI—G または Q 切断片にあることを推定した。

Adang and Miller⁹⁰⁾は *A. californica* MNPV L-1 のポリヘドリン遺伝子がウィルス DNA の *Hind* III—V および *Eco* RI—I 切断片にすくなくとも一部分または全体がコードされているとした。また, *A. californica*

MNPV を接種した *S. frugiperda* 細胞系では 24 p.i. に最も優勢に発現するウイルスゲノムの領域が 3 カ所あり、それぞれポリヘドリン (30~33K), 39K および 10K ポリペプチドとして検出される⁹¹⁾。また 27 p.i. の宿主細胞の細胞質中に存在する poly(A)+RNA の約 1/4 はポリヘドリン遺伝子の転写物で占められていた⁹⁰⁾。

Carstens⁹²⁾は *A. californica* MNPV HR3 の NTG 処理でえられた多角体形態変異株 M5 および M5 の復帰変異株 M5R (野生型と同じ多角体を産生する) の DNA の *Eco* RI-I 切断片を比較した。M5 では *Eco* RI-I 切断片 (約 7300bp)⁹³⁾が HR3 より 400bp ほど大となっていた。また、M5 のポリヘドリンは 33,000 ダルトンで、HR3 および MR5 のポリヘドリン (34,000 ダルトン) より 1,000 ダルトンほど分子量が減少していた。

A. californica MNPV 感染後期 *S. frugiperda* 細胞中にはポリヘドリンが大量に蓄積していたが、48 p.i. に宿主細胞の細胞質中の poly(A)+RNA を抽出すると、1,200b (base) と 630b の poly(A)+RNA が全体の 90% 以上を占めていた。これらの mRNA はポリヘドリンと 10K 蛋白のものであった。また、ポリヘドリン遺伝子には intervening sequence は存在せず、ポリヘドリン mRNA の 5' 末端は *Hin* dIII-F 切断片に、3' 末端は *Hin* dIII-V にあって、*Eco* RI-I 切断片 (7,300bp) の 5' 末端から 3,990bp~5,200bp にマッピングされた⁹³⁾。

Rhoel et al.⁹⁴⁾は *A. californica* MNPV 感染後期 (30~40 p.i.) の *S. frugiperda* 細胞の細胞質からえられた poly(A)+RNA の大部分が 1,400base と 750base の RNA で、1,400b RNA の *in vitro* 系翻訳物がポリヘドリンと同じ 33,000 ダルトン蛋白であること、またこの 33,000 ダルトンの翻訳物とポリヘドリンを V8 プロテアーゼで部分消化したパターンが同一であったことから 1,400b RNA をポリヘドリン mRNA と同定した。

ポリヘドリン遺伝子を含む *Eco* RI-I 切断片を 5' 末端から 4,630bp の位置で *Kpn* I で切断し、5' 末端および 3' 末端の両方向に欠損を人工的に作り、プラスミド pBR325 でクローニングした。この切断片とインタクトウイルス DNA で *S. frugiperda* 細胞系をコトランスフェクションし、多角体非形成変異株で組換型ウイルスをえた。多角体非形成変異株の実験から、ポリヘドリン遺伝子は NOV の産生に全く影響しないことが確認された⁷⁹⁾。

全体で 1143 bp のポリヘドリン遺伝子を完全に含んだ塩基配列が Hoof van Iddekinge et al.⁹⁵⁾によって決定された。*A. californica* MNPV E2 のポリヘドリンコード領域は ATG ではじまり、TAA で終る総数 732 bp で構成され、この塩基配列から総数 224 のアミ

ノ酸一次配列が決定され、分子量は 28,872 ダルトンであった。ポリヘドリンの翻訳開始点 (ATG の A を +1) から 58 bp 上流に転写開始点があった。また翻訳開始点の 78 および 110 bp 上流に "TATA" および "CAAT" box に相当する "TATCAATAT" および "TAATT-AAAAT" があつたほか、-128 と -142 に "CACAACT" の反復配列も見られた。また *A. californica* MNPV のポリヘドリン mRNA は 58 base の翻訳されないリーダー部分を持つことも明らかにされた。

また、翻訳開始点 (+1) から +255 までのポリヘドリン遺伝子の塩基配列が決定された *A. californica* MNPV L-1 の結果⁸¹⁾は *A. californica* MNPV E2 の結果⁹⁵⁾と完全に一致している。

A. californica MNPV E2 のポリヘドリンのアミノ酸配列をすでは全配列の決定されているカイコガ *B. mori* SNPV⁹⁶⁾および一部が決定されている *O. pseudotsugata* MNPV⁹⁷⁾のポリヘドリンと比較した結果、高い相同性が認められた。

A. californica MNPV E2 と *B. mori* SNPV 間には 84% の相同性が認められ、NPV のポリヘドリン遺伝子が強い保守的性格を持っていることが示唆された⁸⁰⁾。

このほか *O. pseudotsugata* MNPV のポリヘドリン遺伝子が *in vivo* 系から出発した試料をもとに研究がすすめられている⁹⁸⁾。

一方、ポリヘドリンの N 末端構造の一部が決定されている鱗翅目 (3)、双翅目 (1)、および膜翅目 (1) の NPV について、系統進化的に考察し、双翅目昆虫を宿主とするグループが最も早い時期に分岐し、つぎに膜翅目昆虫を宿主とするもの、最後に鱗翅目昆虫を宿主とするグループが分岐したと考えられ、MNPV と SNPV の分化が最も新しい年代と推定されている⁹⁷⁾。このようにポリヘドリン遺伝子は NPV グループの分子進化を研究するうえで、今後重要な手がかりを提供することが大いに期待される⁹⁷⁾。

ポリヘドリン遺伝子およびそのプロモーター部分、転写および翻訳開始点の塩基配列の決定⁹⁵⁾は *A. californica* MNPV を expression vector とし利用する方面に大きく貢献する契機になった。*A. californica* MNPV E2 のポリヘドリン遺伝子は *A. californica* MNPV E2 の増殖に必須でなく⁷⁹⁾、異種 DNA を挿入できる理想的領域であり、感染後期に最大限に表現される遺伝子であることから強力なプロモーターの存在も予想される。また多角体形成は変異株の選抜の際のマーカーとしてもすぐれた特徴である⁸⁰⁾⁸¹⁾。

Smith et al.⁸⁰⁾はヒトインターフェロン (IFN- β) の遺伝子を *A. californica* MNPV E2 のポリヘドリン翻

訳リーディングフレーム内 および 翻訳開始点より -58 にある転写開始点の上流に挿入した組換え型 *A. californica* MNPV E2 (IFN- β) をコトランスフェクションで作製した。その結果 “TATA” 配列から 19 base 下流に IFN- β 遺伝子を挿入した組換え型 *A. californica* NPV に感染した *S. frugiperda* (鱗翅目: ヤガ科) 細胞から最も高いインターフェロン活性が検出された。感染細胞には多角体は形成されなかったが、NOV の産生量および経過は正常であった。この場合 10^6 個の *S. frugiperda* 細胞から 5×10^6 unit (約 $10 \mu\text{g}$ 相当) のインターフェロンが産生された。

一方, Pennock et al.⁸¹⁾ は *E. coli* の β -galactosidase 遺伝子をポリヘドリン遺伝子のポリヘドリン 5' 末端コード領域に挿入した *A. californica* MNPV L-1 (β -gal) を *S. frugiperda* 細胞に感染させ、酵素基質を加えたアガロース重層下で青色のブラックが形成されるのを観察した。また β -galactosidase の合成は宿主細胞による temporal control を受けていることが強く示唆された。

XI. NPV ゲノムの複製および転写・翻訳物

A. californica MNPV DNA の *S. frugiperda* 細胞における合成は感染 5～6 時間後から開始され⁹⁹⁾、感染 13～18 時間後に最高に達し以降急激に低下する⁴⁷⁾⁹⁹⁾。

一方、新たな NOV の感染細胞からの放出は、感染 8～24 時間後におこり¹⁰⁰⁾、多角体の形成と OV の多角体への包埋は DNA 合成および NOV 放出の減少と同調して開始される¹³⁾⁴⁷⁾。

NPV DNA の転写・翻訳物の研究も *A. californica* MNPV と *S. frugiperda* 細胞の系ではじめて報告された⁹⁹⁾。多角体の形態形成の見られる感染後期 (24 hp. i.) に感染細胞の細胞質から、poly(A)+RNA を抽出し、hybridization selection でえられた NPV ゲノムの転写物をコムギ胚芽無細胞系で翻訳し、翻訳物中にポリヘドリンと同様の性状の物質が生成していることを明らかにした。同様に、*A. californica* MNPV 感染後期の *S. frugiperda* 細胞の細胞質から抽出した RNA から poly(A)+RNA をオリゴ (dT) セルロースカラムで調製した。一方、同一試料をウイルス DNA との hybridization selection でウイルス指令 RNA をとり、両者の *in vitro* 翻訳物を比較したが、翻訳物のポリペプチドパターンに差異がみられず、感染後期の細胞質 poly(A)+RNA はほとんどがウイルスの指令する RNA であった¹⁰¹⁾。また感染後期の細胞質 poly(A)+RNA はウイルスゲノムの全領域にわたって hybridization した¹⁰¹⁾⁸⁸⁾。

Smith et al.⁸⁸⁾ は *A. californica* MNPV 感染初期

(3～6h p. i.) および後期 (24h p. i.) の *S. frugiperda* 細胞の細胞質 RNA から、ウイルス DNA との hybridization selection でウイルス mRNA を選別後、*in vitro* 系で翻訳した。感染 4 時間後の細胞から 5 種類、感染 21 時間後の細胞から 19 種類のポリペプチドが翻訳された。これらの翻訳物のマップが *A. californica* MNPV DNA の physical map 上にはじめて作製された。また Esche et al.¹⁰²⁾ は感染初期の 4 種類、感染後期の 21 種類のポリペプチドの翻訳地図 (translation map) を作製した。Adang and Miller⁹⁰⁾ は *A. californica* MNPV 感染後期の *S. frugiperda* 細胞から poly(A)+RNA をとり、逆転写して cDNA を合成し、プラスミド pBR 322 でさらに cDNA をクローニングした。cDNA とウイルス DNA の制限酵素切断片の hybridization でウイルスゲノムの転写領域を決定し、後期翻訳物 11 種類のポリペプチドの翻訳地図を作製した。

A. californica MNPV ゲノムには感染 24 時間後に、転写活性の特に高い領域が 3 カ所あり、それぞれ 33K (ポリヘドリン)、39K、10K ダルトンのポリペプチドがその翻訳物としてえられる⁷³⁾⁹¹⁾。感染 27 時間後には感染細胞の細胞質中の poly(A)+RNA の 1/4 がポリヘドリン mRNA であった⁹⁰⁾。感染のさらに後期 (30～48h p. i.) になると最も多量に感染細胞の細胞質中に存在するウイルスゲノムの転写・翻訳物はポリヘドリン mRNA (1.2～1.4Kb) と 10K 蛋白 mRNA (0.63～0.75Kb)、およびポリヘドリン (33K) と 10K 蛋白であった⁷³⁾⁹⁴⁾。10K 蛋白は ³⁵[S] メチオニンでラベルされず、ポリヘドリン産生に付随して合成されている⁹⁴⁾。

感染初期の *A. californica* MNPV ゲノムの転写領域は、感染 0.5～2.5 時間後にはすでにゲノムのほぼ全域にひろがっていた。また感染 7.5 時間後には、後期に転写活性の高い領域 (ポリヘドリン遺伝子および 10K 蛋白遺伝子) の活動はまだ不活発であった⁹⁹⁾。

Rhoel et al.¹⁰³⁾ は criss-cross DNA-RNA hybridization 法で *A. californica* MNPV の感染後期転写物の転写地図 (transcription map) をはじめて作製した。また Lübbert and Doerfler¹⁰⁴⁾ は *A. californica* MNPV の感染初期転写物 11 種類、後期転写物 90 種類を *A. californica* MNPV の *Eco* RI 切断片の physical map 上にマッピングした。またウイルス RNA のスプライシングを明確に示す証拠はえられなかった。Rhoel and Faulkner¹⁰⁵⁾ は *A. californica* MNPV 感染細胞におけるウイルスゲノムの転写物を 6 時間おきに 48 時間後までの経過を分析し、ウイルスの指令する RNA のほとんどの種類が感染 12～24 時間後までに検出されること、また最も大量に転写される 0.6Kb mRNA と 2.8Kb mRNA

A のピークはそれぞれ感染 12~18 時間後および感染 12~48 時間後であった。また *A. californica* MNPV の DNA の physical map と関連したウイルスゲノムの転写・翻訳地図が作製された。

また *A. californica* MNPV が *S. frugiperda* 細胞中に産生する、ウイルス指令 RNA のキャップ構造にはキャップ 1 ($m^7G_{ppp}X_{mp}Y_p$) とキャップ 0 ($m^7G_{ppp}X_p$) があること、またキャップは poly(A)+RNA にも non-poly(A)+RNA にも存在していることがわかった。

X. NPV が産生する酵素

A. californica MNPV に感染した *S. frugiperda* 細胞、また *H. zea* NPV に感染した *H. zea* 幼虫に細胞核内の RNA ポリメラーゼ II を完全に阻害する量の α -アミニチンを投与すると、RNA 合成が 20~25% 減少した。一方、 α -アミニチン投与は NOV の産生にほとんど影響が見られなかった。また、大部分のウイルスゲノムの転写には RNA ポリメラーゼ II 以外の α -アミニチン抵抗性を持った酵素が関与している可能性が示唆された¹⁰⁷⁾。*A. californica* MNPV に感染した *S. frugiperda* 細胞核内におけるウイルス指令 RNA 合成は、感染 8 時間後までは 5 μ g/ml の α -アミニチンに感受性であったが、感染 24 時間後には完全にアミニチン抵抗性を示した。またウイルスゲノムの感染後期転写物に由来すると考えられる、宿主のものとは異なる性状の RNA ポリメラーゼも検出されている¹⁰⁸⁾。

Wang and Kelly¹⁰⁹⁾は *T. ni* MNPV に感染した *S. frugiperda* 細胞から 126,000ダルトンの DNA ポリメラーゼを分離した。この DNA ポリメラーゼは非感染細胞からは検出されず、その活性は aphidicolin および [E]-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine triphosphate により阻害されたが bromovinyl deoxyuridine により阻害を受けない初期蛋白であった。

A. californica MNPV の OV と NOV にはプロテインキナーゼ活性があり、主としてセリンとスレオニンが磷酸化を受ける。しかし、チロシンの磷酸化されたホスチロシンは検出されなかった¹¹⁰⁾。

XI. NPV の構造蛋白

NPV の構造蛋白およびポリヘドリン蛋白の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により、11~25種類のウイルス構造蛋白と、1種類のポリヘドリン蛋白が検出されている⁷⁾。また、昆虫培養細胞で増殖の良好な NPV では *in vitro* でラベルしたウイルス構造蛋白その他を SDS-PAGE で一次元電気泳動後、オートラジオグラフにより NOV の構造蛋白 35 種類¹¹¹⁾、

また感染細胞内の ICPS (infected cell specific protein) は 22~35 種類が検出されている¹⁰⁰⁾¹¹³⁾¹¹⁴⁾¹¹⁵⁾。最近では western blot-ラジオイムノアッセイおよび western blot-ELISA がウイルス構造蛋白の研究に利用されるようになった¹¹²⁾¹¹⁶⁾¹¹⁷⁾¹¹⁸⁾。また、イムノアッセイに利用される抗体もモノクローナル抗体の利用¹¹⁸⁾¹¹⁹⁾へと急速に変化している。このほか等電点電気泳動と SDS-PAGE を組合わせた二次元電気泳動法によるウイルス構造蛋白およびポリヘドリンの研究もはじめられている¹²⁰⁾。NPV の糖蛋白は 4~11 種類が検出されている¹²¹⁾¹²²⁾。また、NOV のペプロマー構造には糖蛋白があり、NOV の産生は tunicamycin の影響を強く受けるが、OV は産生およびその機能に tunicamycin の影響を受けない¹²¹⁾¹²²⁾。OV の 42K 糖蛋白のグリコシレーションは tunicamycin の影響を受けない¹²¹⁾。

OV およびヌクレオカプシド構造蛋白の二次元電気泳動で *A. californica* MNPV の OV から 81 種類、ヌクレオカプシドから 64 種類のポリペプチドが検出された、また *Lymantria dispar* (マイマイガ) MNPV の OV から 95 種類のポリペプチドが検出された。また OV のエンベロープ構造蛋白と推定される 11 種類の高分子ポリペプチドも見られた¹²⁰⁾。

MNPV と SNPV グループ間のウイルス構造蛋白の差異を Western blot-ラジオイムノアッセイで検討した結果、同グループ内では比較的類縁関係が強いが¹¹⁶⁾ グループ間では弱く¹¹²⁾、MNPV グループと SNPV グループは明瞭に区別された¹¹⁶⁾。

A. californica MNPV の OV および NOV には特異性のある蛋白があり、OV の抗原性の強い 46K 構造蛋白は抗 NOV 血清と反応せず、また NOV の抗原性の強い 48K 構造蛋白も抗 OV 血清と反応しない。しかし、OV と NOV には両方の抗血清に共通して反応する 5 種類の蛋白がある¹¹⁹⁾。また OV と NOV の構造蛋白とポリヘドリンに血清学的関係がある¹¹⁹⁾ とする見解、と否定的見解¹¹²⁾がある。

XII. モノクローナル抗体の利用

Roberts and Naser¹²³⁾は *A. californica* MNPV の OV に対するモノクローナル抗体をはじめて報告した。*A. californica* MNPV の OV 抗原と反応するハイブリドーマ抗体を産生する 4 株がえられたが、これらの抗体には NOV 中和作用は認められなかった。また 1 株は OV の 42K 蛋白と反応したが、免疫拡散で沈降線は形成されなかった。一方、Hoffmann and Faulkner¹¹⁸⁾は *A. californica* MNPV の NOV およびポリヘドリン、*Choristoneura fumiferana* トウヒノシントメハマキ

(鱗翅目：ハマキガ科) MNPV のポリヘドリンを抗原としてハイブリドーマ抗体を調製した。計34株のハイブリドーマからNOVと反応する28株、NOV 中和抗体産生株4、沈降抗体産生株4、抗ポリヘドリン抗体産生株6と*S. frugiperda* 細胞と強く反応する抗体を産生する1株がえられた。また強い中和作用のある抗体を産生する1株はNOVのペプロマーと強く反応した¹²²⁾。

ハイブリドーマ抗体を使用した結果、*A. californica* MNPV HR3 のOVとNOV、*A. californica* MNPV HR3 と *A. californica* MNPV m-5 (多角体形態突然変異株) のNOV、*A. californica* MNPV HR3 と *C. fumiferana* MNPV のNOVが明瞭に区別できるようになった¹¹⁸⁾。また、OVとNOVの共通抗原の一つが42Kポリペプチド¹¹³⁾¹²⁵⁾であることも確認された¹¹⁸⁾。

MNPVとSNPVのポリヘドリンには強い相同性が認められている⁹⁵⁾。ポリヘドリンをSDS-PAGEで分析するとmajor proteinは1種類しか検出されないのが普通である。しかし、二次元電気泳動で分析すると分子量(31K)は同一であるが等電点(pH 5.3~6.2)の異なる6種類のポリペプチドに分離した¹²⁰⁾。*A. californica* MNPVに対するハイブリドーマ抗体は、他のNPVのポリヘドリンと交差反応したが、そのスペクトラムはハイブリドーマ抗体ごとに差異が見られた。これは、NPVの種類によって、ポリヘドリンに特異抗原と共通抗原があり、モノクローナル抗体を使用すれば、その識別が可能になってきたことを示唆している¹¹⁸⁾。

XIII. ELISA

Kelly et al.¹²⁶⁾は*Heliothis armigera* オオタバコガ(鱗翅目：ヤガ科)SNPVのOV抗原を抗OV抗血清によるマイクロプレート使用直接法でELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) によるはじめての検出を報告した。この方法で*H. armigera* SNPVのOVは*Spodoptera*のMNPVグループおよび*Neodiprion sertifer* マツノキハバチ(膜翅目：ハバチ科)SNPVのOVと容易に区別が可能であった。マイクロプレート法によりNPVウイルス抗原の*in vivo*および*in vitro*の宿主細胞からの経時的検出¹²⁶⁾、異種昆虫および脊椎動物培養細胞におけるNPV感染の可能性の検討¹²⁷⁾¹²⁸⁾、また最近ではNPVの構造蛋白、ポリヘドリンの比較¹¹⁵⁾¹¹⁸⁾、近縁な宿主から分離されたNPVの類縁関係¹²⁹⁾の研究がすすめられた。また、この方面でもポリクローナル抗体からモノクローナル抗体の利用へと急速に変化しつつあることが強く感じられる。

XIV. おわりに

昆虫核多角体病ウイルスの現状を中心に紹介したが、最近のNPV研究が昆虫の培養細胞を利用した系に基礎研究の中心を移してきているのが目立っている。特に*A. californica* MNPVと*S. frugiperda*細胞の系が多用されているのが特徴ともいえる。これは植物ウイルスの研究がタバコモザイクウイルスを中心に展開してきたのと似た状況にあると見ることもできよう。紹介したように、NPVも昆虫細胞培養の利用も、まだほんの一部に手がつけられたにすぎない。地球上で最大の種類数を持った生物群、昆虫を宿主とするNPVの研究の発展は今後の大きな課題になると考えられる。また、NPV研究の応用的側面の一つに、NPVによる害虫防除の研究があり、世界各国で研究が強力に推進されていることも最後に付記しておきたい。

文 献

- 1) Matthews, R. E. F.(1982): Intervirology, **17**, 1.
- 2) Couch, J. A. (1974): Nature (London), **247**, 229.
- 3) Granados, R. R.(1977): Adv. Virus Res., **20**, 189.
- 4) Hink, W. F. and Vail, P. V.(1973): J. Invertebr. Pathol., **22**, 168.
- 5) Hink, W. F. (1970): Nature (London), **226**, 466.
- 6) Vail, P. V., Sutter, G., Jay, D. L., and Gough, D. (1971): J. Invertebr. Pathol., **17**, 383.
- 7) Harrap, K. A. and Payne, C. C.(1979): Adv. Virus Res., **25**, 237.
- 8) Kelly, D. C.(1982): J. Gen. Virol., **63**, 1.
- 9) Southwood, T. R. E.(1978): In "Diversity of Insect Faunas"(eds.L.A.Mound and N. Waloff) pp. 19-40. Blackwell Scientific Publications, London.
- 10) Martignoni, M. E. and Iwai, P. J. (1981): In "Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1981" (H. D. Burges ed.), pp. 897-911. Academic Press, London.
- 11) 岡田齊夫 (1977): 中国農業試験場報告, E, 第12号, 1~66.
- 12) Kawarabata, T. and Aratake, Y. (1978): J. Invertebr. Pathol., **31**, 329.
- 13) Volkman, L. E., Summers, M. D. and Hsieh, C. -H.(1976): J. Virol., **19**, 820.
- 14) Summers, M. D. and Volkman, L. E.(1976): J. Virol., **17**, 962.
- 15) Adams, J. R., Goodwin, R. H. and Wilcox, T. A.(1977): Biol. Cell., **28**, 261.
- 16) Kawamoto, F., Suto, C., Kumada, N. and Ko-

- mada, N. and Kobayashi, Y. (1977) : *Microbiol. Immunol.*, **21**, 255.
- 17) Granados, R. R. and Lawler, K. A. (1981) : *Virology*, **108**, 297.
 - 18) Hink, W. F. (1972) : In "Invertebrate Tissue Culture" (ed. C. Vago), Vol. **2**, p. 363. Academic Press, New York.
 - 19) Hink, W. F. (1976) : In "Invertebrate Tissue Culture" (ed. K. Maramorosch), pp. 319-369. Academic Press, New York.
 - 20) Hink, W. F. (1980) : In "Invertebrate System In Vitro" (eds. E. Kurstak, K. Maramorosch and A. Dübendorfer), pp. 553-578. Elsevier North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
 - 21) Vago, C. and Bergoin, M. (1963) : *Entomopathologia*, **8**, 253.
 - 22) Vaughn, J. L. and Faulkner, P. (1963) : *Virology*, **20**, 484.
 - 23) Vail, P. J., Jay, D. L. and Hink, F. W. (1973) : *J. Invertebr. Pathol.*, **22**, 231.
 - 24) Harper, J. D. (1976) : *J. Invertebr. Pathol.*, **27**, 275.
 - 25) Croizier, G. and Quiot, J. M. (1981) : *Ann. Virol. (Inst. Pasteur)*, **132 E**, 3.
 - 26) Knudson and Tinsley (1974) : *J. Virol.*, **14**, 934.
 - 27) Ramoska, W. A., Stairs, G. R. and Hink, W. F. (1975) : *Nature (London)*, **253**, 628.
 - 28) Volkman, L. E. and Summers, M. C. (1975) : *J. Virol.*, **16**, 1630.
 - 29) Potter, K. N., Faulkner, P. and Mackinnon, E. A. (1976) : *J. Virol.*, **18**, 1040.
 - 30) Hink, W. F. and Strauss, E. M. (1976) : In "Invertebrate Tissue Culture" (eds. E. Kurstak and K. Maramorosch), pp. 369-374. Academic Press, New York.
 - 31) Wood, H. A. (1977) : *J. Invertebr. Pathol.*, **29**, 304.
 - 32) Brown, M. and Faulker, P. (1977) : *J. Gen. Virol.*, **36**, 361.
 - 33) Brown, M. and Faulkner, P. (1978) : *Appl. Environ. Microbiol.*, **36**, 31.
 - 34) Lee, H. H. and Miller, L. K. (1978) : *J. Virol.*, **27**, 754.
 - 35) Smith, G. E. and Summers, M. D. (1978) : *Virology*, **89**, 517.
 - 36) Knudson, D. L. (1979) : *Intervirology*, **11**, 40.
 - 37) Yamada, K. and Maramorosch, K. (1981) : *Arch. Virol.*, **67**, 187.
 - 38) Knell, J. D. and Summers, M. D. (1981) : *Virology*, **112**, 190.
 - 39) Fraser, M. J. and Hink, W. F. (1982) : *Virology*, **117**, 366.
 - 40) Vaughn, J. L., Goodwin, R. H., Tompkins, G. J. and McCawley, P. (1977) : *In Vitro*, **13**, 213.
 - 41) Miller, L. K. and Dawes, K. P. (1978) : *Appl. Environ. Microbiol.*, **35**, 411.
 - 42) Miller, L. K. and Dawes, K. P. (1978) : *Appl. Environ. Microbiol.*, **35**, 1206.
 - 43) Smith, G. E. and Summers, M. D. (1979) : *J. Virol.*, **30**, 828.
 - 44) Andrews, R. E. Jr., Spence, K. D. and Miller, L. K. (1980) : *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**, 932.
 - 45) Brown, M., Crawford, A. M. and Faulkner, P. (1979) : *J. Virol.*, **31**, 190.
 - 46) Cochran, M. A., Carstens, E. B., Eaton, B. T. and Faulkner, P. (1982) : *J. Virol.*, **41**, 940.
 - 47) Tija, S. T., Carstens, E. B. and Doerfler, W. (1979) : *Virology*, **99**, 399.
 - 48) Croizier, G., Amargier, A., Godse, D. -B., Jacquemard, P. and Duthoit, J. -L. (1980) : *Cot. Fib. Trop.*, **25**, 415.
 - 49) Smith, G. E. and Summers, M. D. (1980) : *J. Virol.*, **33**, 311.
 - 50) Knell, J. D. and Summers, M. D. (1981) : *Virology*, **112**, 190.
 - 51) Loh, L. C., Hamm, J. J., Kawanishi, C. and Huang, E. -S. (1982) : *J. Virol.*, **44**, 747.
 - 52) Brown, D. A., Evans, H. F., Allen, C. J. and Kelly, D. C. (1981) : *Arch. Virol.*, **69**, 209.
 - 53) Kislev, N. and Edelman, M. (1982) : *Virology*, **119**, 219.
 - 54) Allaway, G. P. and Payne, C. C. (1983) : *Arch. Virol.*, **75**, 43.
 - 55) Billimore, S. L. (1983) : *Virology*, **127**, 15.
 - 56) Gettig, R. R. and McCarthy, W. J. (1982) : *Virology*, **117**, 245.
 - 57) Monroe, J. E. and McCarthy, W. J. (1984) : *J. Invertebr. Pathol.*, **43**, 32.
 - 58) Summers, M. D., Smith, G. E., Knell, J. D. and Burand, J. P. (1980) : *J. Virol.*, **34**, 693.
 - 59) Hink, W. F. and Strauss, E. M. (1976) : *J. Invertebr. Pathol.*, **27**, 49.
 - 60) Miller, D. W. and Miller, L. K. (1982) : *Nature (London)*, **299**, 562.
 - 61) Fraser, M. J., Smith, G. E. and Summers, M. D. (1983) : *J. Virol.*, **47**, 287.
 - 62) Burand, J. P. and Summers, M. D. (1982) : *Virology*, **119**, 223.
 - 63) Lee, H. H. and Miller, L. K. (1979) : *J. Virol.*, **31**, 240.
 - 64) Duncan, R. and Faulkner, P. (1982) : *J. Gen. Virol.*, **62**, 369.
 - 65) Brown, M., Faulkner, P., Cochrane, M. A. and Chung, K. L. (1980) : *J. Gen. Virol.*, **50**, 309.
 - 66) Brown, M. and Baulkner, P. (1980) : *J. Gen. Virol.*, **48**, 247.
 - 67) Kelly, D. C. (1977) : *Virology*, **76**, 468.
 - 68) Rohrmann, G. F., McParland, R. H., Martignoni, M. E. and Beaudreau, G. S. (1978) : *Virology*, **84**, 213.
 - 69) Jurkovičová, M., Van Touw, J. H., Sussenbach, J. S. and Ter Schegget, J. (1979) : *Virology*, **93**, 8.

- 70) Jewell, J. E. and Miller, L. K. (1980) : J. Gen. Virol., **48**, 161.
- 71) Rohrmann, G. F., Martignoni, M. E. and Beaudreau, G. S. (1982) : J. Gen. Virol., **62**, 137.
- 72) Smith, G. E. and Summers, M. D. (1982) : Virology, **123**, 393.
- 73) Smith, G. E., Vlak, J. M. and Summers, M. D. (1983) : J. Virol., **45**, 215.
- 74) Burand, J. P., Summers, M. D. and Smith, G. E. (1980) : Virology, **101**, 286.
- 75) Kelly, D. C. and Wang, X. (1981) : Ann. Virol. (Inst. Pasteur), **132 E**, 247.
- 76) Carstens, E. B., Tija, S. T. and Doerfler, W. (1980) : Virology, **101**, 311.
- 77) Potter, K. N. and Miller, L. K. (1980) : J. Invertebr. Pathol., **36**, 431.
- 78) Miller, L. K. (1981) : J. Virol., **39**, 937.
- 79) Smith, G. E., Fraser, M. J. and Summers, M. D. (1983) : J. Virol., **46**, 584.
- 80) Smith, G. E., Summers, M. D. and Fraser, M. J. (1983) : Mol. Cell. Biol., **3**, 2156.
- 81) Pennock, G. D., Shoemaker, C. and Miller, L. K. (1984) : Mol. Cell. Biol., **4**, 394.
- 82) Miller, L. K. and Dawes, K. P. (1979) : J. Virol., **29**, 1044.
- 83) Gershenson, S. M. (1957) : Doklady Akad. Nauk S. S. S. R., **113**, 1161.
- 84) Cochran, M. A. and Faulkner, P. (1983) : J. Virol., **45**, 961.
- 85) Vlak, J. M. and Smith, G. E. (1982) : J. Virol., **41**, 1118.
- 86) Loh, L. C., Hamm, J. J. and Huang, E. -S. (1981) : J. Virol., **38**, 922.
- 87) Knell, J. D. and Summers, M. D. (1984) : J. Gen. Virol., **65**, 445.
- 88) Smith, G. E., Vlak, J. M. and Summers, M. D. (1982) : J. Virol., **44**, 199.
- 89) Van der Beek, C. P., Saaier-Riep, J. D. and Vlak, J. M. (1980) : Virology, **100**, 326.
- 90) Adang, M. J. and Miller, L. K. (1982) : J. Virol., **44**, 782.
- 91) Vlak, J. M. and van der Krol, S. (1982) : Virology, **123**, 222.
- 92) Carstens, E. B. (1982) : J. Virol., **43**, 809.
- 93) Smith, G. E. and Summers, M. D. (1983) : J. Virol., **45**, 215.
- 94) Rhoel, D. Z., Cochran, M. A. and Faulkner, P. (1983) : Virology, **124**, 357.
- 95) Hooft van Iddekinge, B. J., Smith, G. E. and Summers, M. D. (1983) : Virology, **131**, 561.
- 96) Kozlov, E. A., Levitina, T. L., Gusak, N. M. and Serebryani, S. B. (1981) : Bioorg. Khim., **7**, 1008.
- 97) Rhormann, G. F., Pearson, M. N., Baily, T. D., Becker, R. R. and Beaudreau, G. S. (1981) : J. Mol. Evol., **17**, 329.
- 98) Rhormann, G. F., Leisy, D. J., Chow, K. -C., Pearson, G. D. and Beaudreau, G. S. (1982) : Virology, **121**, 51.
- 99) Erlandson, M. A. and Carstens, E. B. (1983) : Virology, **126**, 398.
- 100) Carstens, E. B., Tija, S. T. and Doerfler, W. (1979) : Virology, **99**, 386.
- 101) Vlak, J. M., Smith, G. E. and Summers, M. D. (1981) : J. Virol., **40**, 762.
- 102) Esche, H., Lübbert, H., Siegman, B. and Doerfler, W. (1982) : Eur. Mol. Biol. Org. J., **1**, 1629.
- 103) Rhoel, D. Z., Cochran, M. A. and Faulkner, P. (1984) : J. Gen. Virol., **64**, 809.
- 104) Lübbert, H. and Doerfler, W. (1984) : J. Virol., **50**, 497.
- 105) Rhoel, D. Z. and Faulkner, P. (1984) : J. Virol., **50**, 739.
- 106) Jun-Chuan, Q. and Weaver, R. F. (1982) : J. Virol., **43**, 234.
- 107) Grula, M. A., Buller, P. L. and Weaver, R. F. (1981) : J. Virol., **38**, 916.
- 108) Fuchs, L. Y., Woods, M. S. and Weaver, R. F. (1983) : J. Virol., **48**, 641.
- 109) Wang, X. and Kelly, D. C. (1983) : J. Gen. Virol., **64**, 2229.
- 110) Miller, L. K., Adang, M. J. and Browne, D. (1983) : J. Virol., **46**, 275.
- 111) Vlak, J. M. (1979) : J. Invertebr. Pathol., **34**, 110.
- 112) Smith, G. E. and Summers, M. D. (1981) : J. Virol., **39**, 125.
- 113) Dobos, P. and Cochran, M. A. (1980) : Virology, **103**, 446.
- 114) Wood, H. A. (1980) : Virology, **102**, 21.
- 115) Maruniak, J. E. and Summers, M. D. (1981) : Virology, **109**, 25.
- 116) Knell, J. D., Summers, M. D. and Smith, G. E. (1983) : Virology, **125**, 381.
- 117) Naser, W. L. and Miltenburger, H. G. (1983) : J. Gen. Virol., **64**, 639.
- 118) Hoffman, A. W. and Faulkner, P. (1983) : Virology, **125**, 432.
- 119) Volkman, L. E. (1983) : J. Virol., **46**, 221.
- 120) Singh, S. P., Gudauskas, R. T., and Harper, J. D. (1983) : Virology, **125**, 370.
- 121) Stiles, B. and Wood, H. A. (1983) : Virology, **131**, 230.
- 122) Volkman, L. E., Goldsmith, P. A., Hess R. T. and Faulkner, P. (1984) : Virology, **133**, 354.
- 123) Roberts, P. L. and Naser, W. (1982) : FEMS Microbiol. Lett., **14**, 79.
- 124) Volkman, L. E. and Falcon, L. A. (1982) : J. Econ. Entomol., **75**, 868.
- 125) Summers, M. D. and Smith, G. E. (1978) : Virology, **84**, 390.
- 126) Kelly, D. C., Dewards, M. L., Evans, H. F. and Robertson, J. S. (1978) : J. Gen. Virol., **40**, 465.

- 127) Langridge, W. H. R., Granados, R. R. and
Greenberg(1981): J. Gen. Virol., **54**, 443.
- 128) McCarthy, W. J. and Henshal, L. S. (1983):
J. Invertebr. Pathol., **41**, 401.
- 129) Brown, D. A., Allen, C. J. and Bignell, G.
N. (1982): J. Gen. Virol., **62**, 375.