

博士論文

バキュロウイルスにおける長鎖非コード RNA の
機能解析

石原 玄基

目次

序論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 4

図表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 11

第1章 バキュロウイルスにおける機能性 lncRNA の探索

緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 14

材料と方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 18

結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 23

考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 29

図表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 34

第2章 バキュロウイルスの経口感染に必須な lncRNA の機能解析

緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 57

材料及び方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 61

結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 71

考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 89

図表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 97

総合考察	131
図表	140
摘要	145
謝辞	152
引用文献	154

序論

昆虫ウイルスの一種であるバキュロウイルスは、ゲノムとして 80~180 kbp の環状二本鎖 DNA を有する。バキュロウイルスはウイルス感染末期においてウイルス粒子を封入する結晶構造（封入体）を形成する特徴があり、封入体の性状の違いによりさらに核多角体病ウイルス（nucleopolyhedrovirus; NPV）と顆粒病ウイルス（granulovirus; GV）に分けられる（Rohmann. 2013）。NPV と GV が産生する封入体をそれぞれ多角体（occlusion body, OB）および顆粒体と呼ぶ。また、感染する宿主昆虫の違いから 4 つの属に大別されており、鱗翅目昆虫に感染する NPV はアルファバキュロウイルス属、鱗翅目昆虫に感染する GV はベータバキュロウイルス属、膜翅目昆虫に感染する NPV はガンマバキュロウイルス属、双翅目昆虫に感染する NPV はデルタバキュロウイルス属、と分類されている（Jehle et al. 2006）。

バキュロウイルスには、包埋ウイルス（occlusion-derived virus; ODV）と出芽ウイルス（budded virus; BV）という構造の異なる二種類のウイルス粒子が存在し（図 1）、それぞれライフサイクルにおける役割が異なっている。また、ODV 粒子の中に含まれるヌクレオキャプシドの数によって、一つのヌクレオキャプシ

ドを有する single NPV (SNPV) と複数のヌクレオキャプシドを有する multiple NPV (MNPV) に分類される。NPV 感染では、宿主である昆虫が OB を食下すると、中腸で分泌されるアルカリ性の消化液により OB が溶解し、包埋されていた多数の ODV が中腸内に放出される。放出された ODV は中腸の円筒細胞に吸着し、自身のエンベロープと細胞膜の間で膜融合を引き起こし細胞内へと侵入することで感染が始まる (一次感染) (図 2)。その後、MNPV では、BV がウイルスの複製を伴わない経路で、中腸細胞の基底膜側から放出されると考えられている。中腸細胞内へ侵入した複数のキャプシドが細胞内を移動し、一部のキャプシドが核へ移行し、細胞間の移行に必須な構造タンパク質 (GP64) をコードする遺伝子を発現する。その後、産生されたタンパク質が中腸基底膜側の細胞膜へ移行すると、中腸細胞へ侵入した残りのキャプシドの一部が、エンベロープを被って感染性のウイルスとなり、細胞外へ放出される (図 3)。細胞外へ放出された BV は、血球や脂肪体など他の組織の細胞膜に吸着した後、エンドサイトーシスにより細胞質に侵入することで新たな感染を成立させる。このように、感染細胞から産生される BV は、細胞間感染に利用され、宿主個体全身に感染を広げていく (二次感染)。そして、感染末期には、ODV が封入された OB がほとんどの組織で大量に形成され、やがて宿主昆虫は死に至る。致死した宿主は、ウイルスの有するカテプシンやキチナーゼ (Ohkawa et al. 1994, Hawtin et al.

1995) の作用により表皮が溶解し、増殖した OB は自然環境中へと放出される。OB は非常に強固な構造をしているため、不良環境下においても長期間に渡りウイルス粒子を維持することが可能である。昆虫の体外へと拡散した OB は、新たな宿主昆虫に食下されることで、他個体への感染が成立する (図 2) (Blissard et al. 1989, Rohman 2013)。

バキュロウイルスは自身の増殖・伝播を効率よく行うために、非常に複雑な宿主制御を行う。例えば、エクダイソン UDP グルコース転移酵素 (ecdysteroid UDP-glucosyltransferase; EGT) を発現することで、脱皮ホルモンであるエクダイソンを不活化する。その結果、バキュロウイルスは宿主昆虫の脱皮・変態を抑制し、致死までの時間の延長することで、ウイルス産生を増大させる (O'Reilly and Miller. 1989)。一方、P35 タンパク質は、ウイルス感染時のアポトーシスによる宿主の生体防御をカスパーゼの阻害により打破し、ウイルスの増殖を可能にする (Clem et al. 1991)。また、EGT や脱リン酸化酵素 (protein tyrosine phosphatase; PTP) は感染後期におけるワンダリング行動の誘起に関与することが知られており、結果として OB の広範囲への拡散につながると考えられている (Hoover et al. 2011, Kamita et al. 2005)。バキュロウイルスがこのような複雑な宿主制御を行うためには、ウイルス遺伝子の厳密な時空間的発現制御機構の存在

が不可欠である。バキュロウイルスの遺伝子は主に転写レベルで制御されており、感染後の発現タイミングから、初期遺伝子、後期遺伝子、および最後期遺伝子の三段階に大別されている。感染初期に転写される初期遺伝子は、宿主の RNA ポリメラーゼ II によって認識される初期プロモーター配列 (CAGT / CATT) から転写が行われる (Pullen and Friesen. 1995, Xing et al. 2005, Blissard et al. 1989)。後期及び、最後期遺伝子は後期プロモーター配列 (TAAG) を持ち、late expression factor-8 (LEF-8)、LEF-9、LEF-4、P47 の複合体から成るウイルス由来の RNA ポリメラーゼによって認識され、転写が行われる (Guarino et al. 1998, Yang and Miller. 1999)。プロモーター配列と RNA ポリメラーゼの違いによる大まかなウイルス遺伝子の発現調節機構は明らかになっているが、同じプロモーター配列を持つ遺伝子間でどのようにして異なる発現制御が達成されるのか、現時点ではほとんど未解明である。

これまで、バキュロウイルスの網羅的遺伝子発現解析は、DNA マイクロアレイ (Iwanaga et al. 2004) や Expressed Sequence Tag (EST) 解析 (Nobiron et al. 2003) によって行われてきた。しかし、これらの手法では、転写される遺伝子断片の種類は判明するものの、各転写物を転写開始点 (5'端) から poly (A)末端 (3'端) までの“転写ユニット”として同定することができなかった。近年行われた

Autographa californica multiple NPV (AcMNPV) 感染細胞を用いた RNA シークエンシング (Chen et al. 2013) や、私の研究室で行われたカイコ核多角体病ウイルス (*Bombyx mori* NPV; BmNPV) を感染させたカイコ卵巣由来培養細胞である BmN4 細胞由来完全長 cDNA ライブラリーを用いたトランスクリプトーム解析 (Katsuma et al. 2011) により、ウイルスゲノム由来の転写産物が“転写ユニット”として網羅的に同定された。この BmNPV 感染細胞を用いたトランスクリプトーム解析の結果、ウイルス感染時には配列から推定される Open Reading Frame (ORF) の数をはるかに超える数の転写ユニットが存在し、その中には 5 個以上の ORF を含む非常に長いユニット (約 8 kb) や既報の ORF を含まないユニットが存在することが明らかとなった。後者に関しては、バキュロウイルスでほとんど報告がない長鎖非コード RNA (long non-coding RNA; lncRNA)、あるいは短いペプチドをコードすることが推測された。

これまでに報告されている動物ウイルスゲノム由来の機能性非コード RNA は、その多くがマイクロ RNA (miRNA) である。例えば、Simian virus 40 の *miR-S1* は、ウイルス感染後期に転写され、ウイルスのガン誘導因子である初期遺伝子の T 抗原遺伝子の mRNA と相補性により結合し、その発現を抑制する。宿主の免疫機構に認識されるウイルスの T 抗原タンパク質の産生を減少させることで、

ウイルス感染細胞を宿主 T 細胞の貪食作用から回避させていると考えられている (Sullivan et al. 2005)。また、Epstein-barr virus (EBV) の *miR-BART2* は、ウイルスの DNA ポリメラーゼである BALF5 遺伝子のアンチセンス鎖から転写されており、*miR-BART2* との相補性によって *BALF5* mRNA 発現が抑制される。EBV は潜在感染時に *miR-BART2* を低レベルに発現することで *BALF5* の発現を制御し、不要なウイルスゲノムの複製を抑制することで潜在感染を維持していると考えられている (Barth et al. 2008)。ウイルスゲノム由来の機能性 lncRNA における知見としては、約 160 塩基の adenovirus *VA1 noncoding RNA* と、約 170 塩基の EBV がコードする *EBER1*、*EBER2* が報告されている。*VA1 noncoding RNA* は、宿主の RNA ポリメラーゼ III によって転写され、poly(A) tail を持たない RNA である。ステムループ構造を取ることによって宿主の PROTEIN KINASE R (PKR) と結合し、翻訳開始因子 eIF2 α のリン酸化を介した翻訳阻害を抑制することで、インターフェロンによる宿主防御を阻害することが報告されている (Kitajewski et al. 1986, Ma and Mathews. 1996, McKenna et al. 2007)。また、pre-miRNA の移行に係る Exportin 5 との相互作用や二本鎖 RNA 切断活性をもつ Dicer の基質になることで、宿主の RNA サイレncing による生体防御を回避していることも知られている (Maran and Mathews. 1988, Lu and Cullen 2004)。*EBER* も *VA1 noncoding RNA* と同様、RNA ポリメラーゼ III によって転写され、ステムループ構造を取る

ことで PKR に結合し、最終的に宿主細胞のアポトーシスを抑制していると考えられている (Owen et al. 2010, McKenna et al, 2007)。BmNPV ゲノムから転写される非コード RNA は、これらに比べて長いものが多く、新たなクラスのウイルス由来 lncRNA である可能性が高い (Katsuma et al. 2011)。

本研究では、トランスクリプトームデータから同定された BmNPV 由来 lncRNA に関して、lncRNA 欠損ウイルスを作成し、培養細胞およびカイコ幼虫を用いた性状解析を行った。その結果、3 種類の機能性 lncRNA を見つけることに成功した。第 1 章では、変異ウイルスの作成とそれを用いたスクリーニング、および多角体産生量に関与する lncRNA の発見に関して報告する。第 2 章では、経口感染に必須である 2 種類の lncRNA の同定と機能解析について取りまとめた。最後に総合考察として、バキュロウイルスの lncRNA のウイルス感染における機能について考察した。

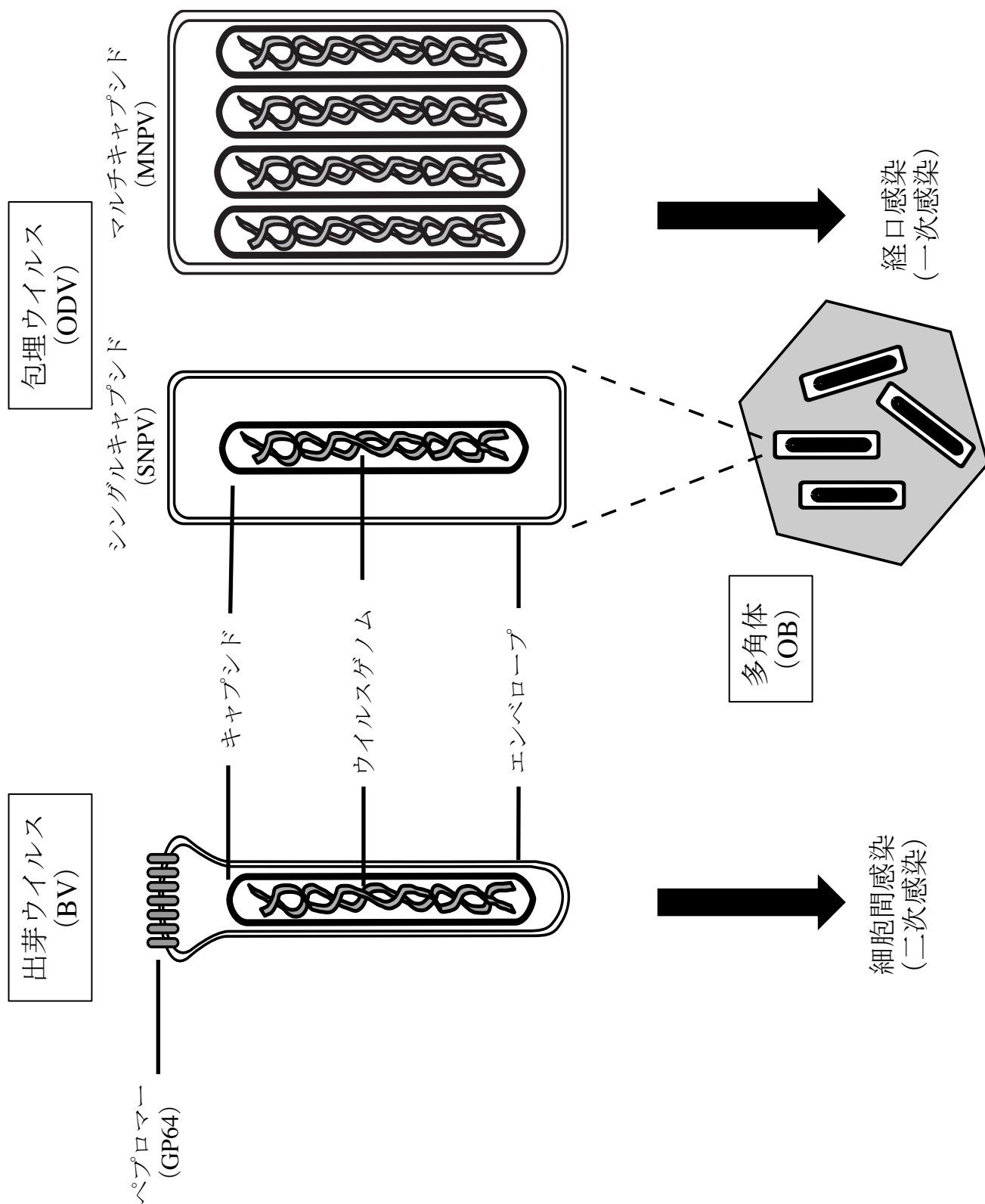


図1：核多角体病ウイルスが産生する2種類のウイルス粒子の構造

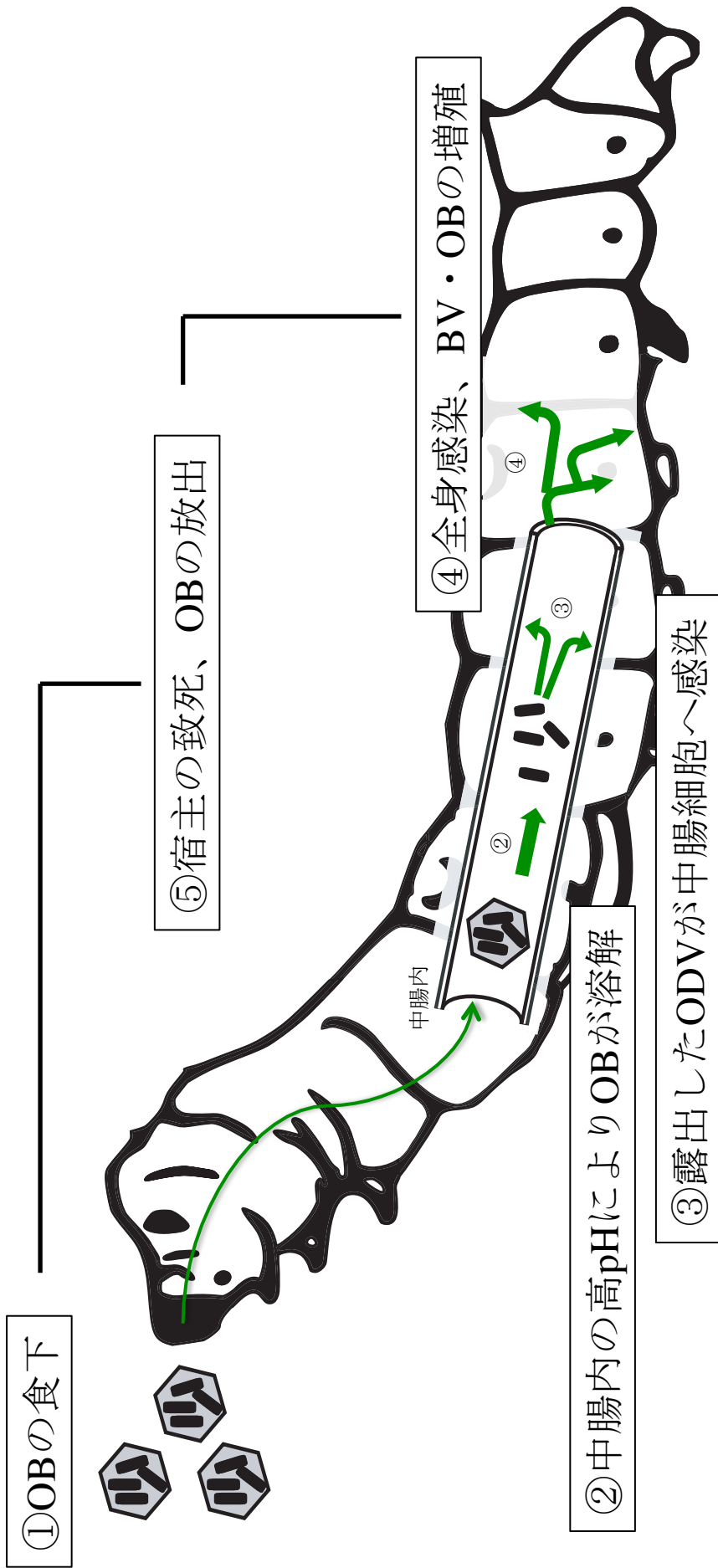


図2：核多角体病ウイルスのライフサイクル

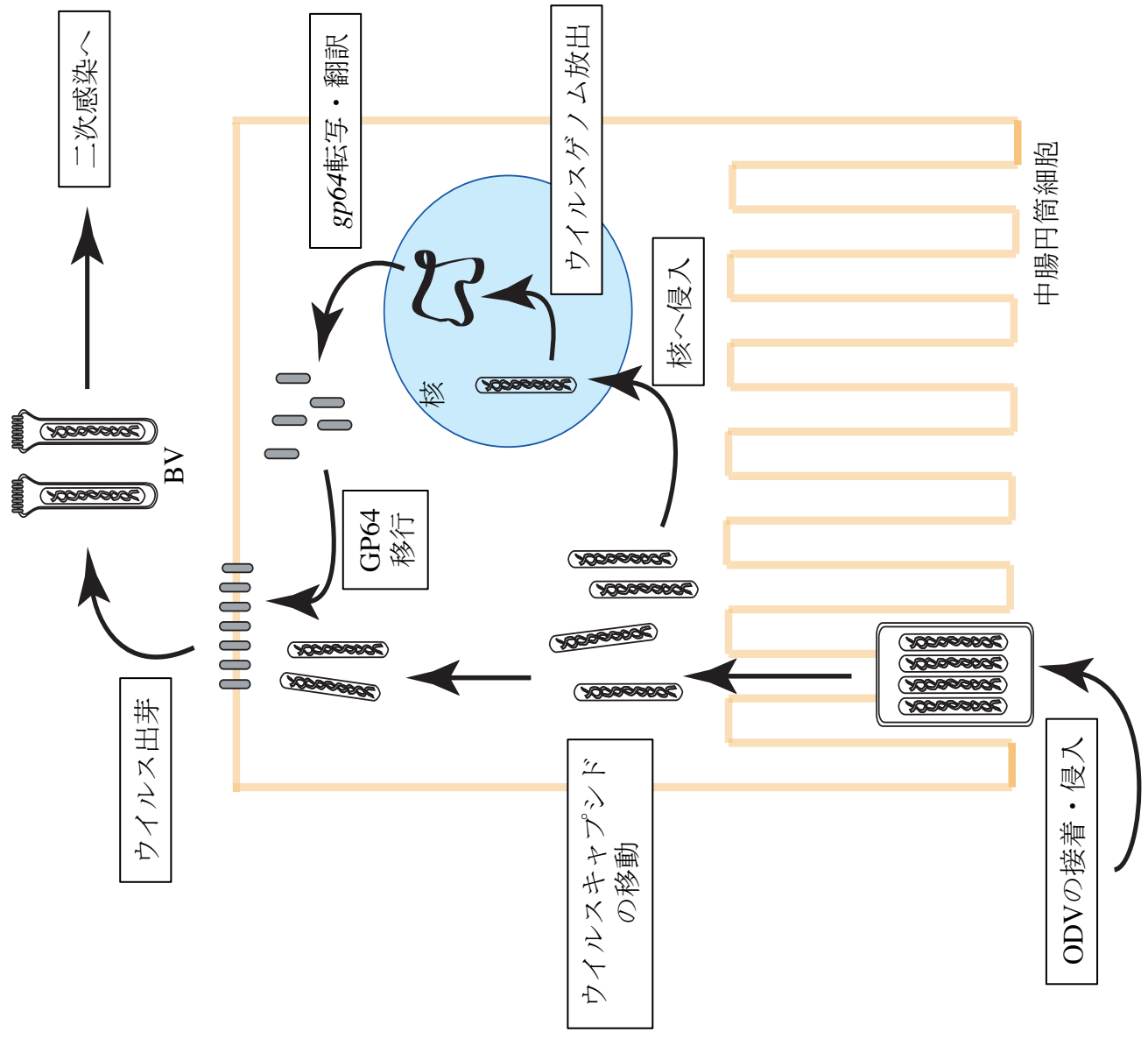


図3：MNPVの中腸細胞内における感染経路モデル

第1章 バキュロウイルスにおける機能性 lncRNA の探索

緒言

カイコを宿主とするカイコ核多角体病ウイルス (BmNPV) は、アルファバキュロウイルス属に属するウイルスであり、136 個の ORF を含む 128,413 bp のゲノム DNA を有する大型 DNA ウイルスである (Gomi et al. 1999)。BmNPV の各遺伝子の機能解析については、遺伝子破壊カセットを個々の ORF に挿入した欠損ウイルスライブラリーの作成 (Ono et al. 2012) をはじめ、多くの研究が進められており、バキュロウイルスの中ではタイプ種である AcMNPV の次に研究が進んでいるウイルスである。

私の研究室では、BmNPV 感染 BmN 細胞から調製した mRNA を用いて、オリゴキャッピング法により完全長 cDNA ライブラリーを作成し、5' 末端および 3' 末端を約 1 万クローンずつシーケンスすることにより、BmNPV 感染細胞から 4,679 個のウイルスゲノム由来の転写ユニットを網羅的に同定することに成功している (Katsuma et al. 2011)。詳細なデータ解析の結果、ウイルス感染時には推定 ORF の数をはるかに超える数の転写ユニットが存在し、その中には lncRNA か短いペプチドをコードする可能性があるものが存在した (図 4)。

現在までに報告されているウイルス由来の機能性非コード RNA は、その多くが miRNA である。近年、バキュロウイルスにおいても、ウイルス遺伝子や宿主遺伝子を標的にした miRNA が報告されている (Singh et al. 2010, Singh et al. 2012, Zhu M et al. 2013, Singh et al. 2014)。BmNPV がコードする *bmnpv-miR-1* は、宿主の *Ras-related nuclear protein (ran)* 遺伝子と配列相補性を持ち、RNA サイレンシングによって *ran* mRNA の減少を誘導する。Ran は、Exportin-5 を介した核から細胞質へ小分子 RNA の移行に関与することで、宿主の生体防御に寄与することが知られている。*bmnpv-miR-1* は、*ran* の発現を低下させることで、結果的にウイルス増殖を促進させる (Singh et al. 2012)。また、*bmnpv-miR3* は、ウイルスの DNA 結合タンパク質をコードする *p6.9* を含む 8 個の後期遺伝子と相補性を持つ miRNA である。*bmnpv-miR3* のウイルス感染初期での発現が、この時期における後期遺伝子の発現抑制を誘導することで、宿主による免疫機構を回避していると考えられている (Singh et al. 2014)。AcMNPV ゲノムから転写されている *acmnpv-miR-1* は、ODV 粒子の構造タンパクをコードする *odv-e25* 遺伝子と相補性がある配列を持ち、*odv-e25* mRNA の発現を抑制することで BV 産生を減少させ ODV 形成を増進していることが示されている (Zhu M et al. 2013)。

1 kb を超えるようなウイルス由来の lncRNA としては、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus; KSHV) の産生する 1.1 kb の *PAN RNA* と呼ばれる lncRNA が知られている。KSHV は、溶解感染時に転写活性化因子である *orf50* を最初期遺伝子として発現するが、この遺伝子を含む溶解感染遺伝子領域をヘテロクロマチン修飾することで発現を抑制し、潜伏感染を維持している。*PAN RNA* はヒストン H3 脱メチル化酵素と結合し、溶解感染遺伝子領域のヘテロクロマチン修飾を減少させる。その働きにより、溶解感染関連遺伝子群の発現を誘導し、KSHV の潜伏感染から溶解感染への感染様式の移行を誘導していることが報告されている (Borah et al. 2011, Rossetto and Pari. 2012, Rossetto et al. 2013)。しかし、DNA ウイルスの感染時に転写される poly(A) が付加された mRNA 様の lncRNA の機能に関する報告は、*PAN RNA* 以外にはほとんど無いのが現状である。

バキュロウイルスについては、AcMNPV においてポリヘドリン遺伝子 (*polh*) mRNA の転写を欠損させることで、*polh* 領域から転写されている 3.2 kb のアンチセンス lncRNA の転写量が増加すること報告されているが (Ooi and Miller. 1990)、この lncRNA 自身の機能は不明である。そこで、本章では、バキュロウイルスゲノムから転写される機能性 lncRNA を探索し、その機能を明らかにする

ことを目的として、最初に lncRNA のプロモーターノックアウトウイルス (PKO
ウイルス) を作成し、それらを用いた表現型スクリーニングを行った。

材料と方法

供試昆虫、細胞、ウイルス

供試したカイコ幼虫はF1品種である錦秋×鐘和であり、人工飼料にて飼育した。

BmN (BmN-4) 細胞は 10%ウシ胎児血清 (FBS) を添加した TC-100 培地にて 26°Cで継代培養した。感染実験にはコントロールウイルスとして BmNPV T3 株 (Maeda, 1984) 及び BmhEPS1 (Kang et al. 1998) を用いた。コントロールウイルスは PKO ウイルスの構築に使用した親ウイルスに対応して使い分けた。

KO1AS1、KO1AS2、KO1AS3、KO1AS123 は BmhEPS1 を親ウイルスとして用いて構築したため、これらを用いた感染実験については BmhEPS1 をコントロールとして使用した。その他の PKO ウイルスに対しては T3 株をコントロールウイルスとして使用した。コントロールウイルス及び変異導入ウイルスは、プラークアッセイ法にて感染力価を測定し、その後感染実験に使用した。培養細胞を用いた感染実験は multiplicity of infection (MOI) = 5 で行った。カイコ幼虫への皮下注射感染実験は、5 齢起蚕幼虫に一頭あたり 50 μ l の 1×10^7 plaque forming unit (PFU) / ml の BV を含む TC-100 培地を接種した。

PKO ウイルスの構築

PKO ウイルスを構築するために、表 2 に記したプライマーを用いて BmNPV T3 株のウイルス DNA から PCR 法によって目的プロモーター領域を含む遺伝子断片を獲得し、pcDNA3.1 (-) ベクター (Invitrogen) へクローニングした。*polh* 領域に対しては、BmNPV ゲノム DNA -579 から 2,996 塩基の領域がクローニングされた pBh-EPS1 プラスミド (Kang et al. 1998) を用いた。次に構築した遺伝子断片を含むプラスミドに対して、KOD-plus-Mutagenesis Kit (TOYOBO) を用いて lncRNA 候補転写ユニットのプロモーター配列に対して点変異を導入することで、組換えトランスファーベクターを作成した。PKO ウイルスは、トランスファーベクターと制限酵素 *Bsu36I* にて直鎖化した遺伝子欠損 BmNPV (表 1) のゲノム DNA をコトランスフェクションすることで作成した。コトランスフェクション 7 日後の培養上清を用いたプラークアッセイを行い、X-gal 選抜によって白色を呈するプラークを組換えウイルスとして純化した。純化した PKO ウイルスは、ウイルスゲノム DNA を抽出し、変異導入部位を PCR 増幅し DNA シーケンシングすることで変異導入を確認した。また、リバータントウイルス (復帰ウイルス) は PKO ウイルスのゲノム DNA と、対応するゲノム領域を持つプラスミド (Maeda et al. 1990) をコトランスフェクションすることで作成した。リバータントウイルスは、プラークアッセイを行う際に X-gal 選抜によるカラーセレクションが出来ないことから、1 ウイルス当たり約 40 個のプラークを純化

し、スクリーニングした。単離したリバータントウイルスは、ウイルスゲノム DNA を抽出し、復帰させた変異導入部位を PCR 増幅し、DNA シークエンシングすることでプロモーター配列の復帰を確認した (表 2)。本章で使用したプライマーのリストは表 3 に、作成したプラスミドのリストは表 4 に記した。

BV 産生量の測定

培養細胞における BV 産生量は、コントロールウイルス、および PKO ウイルス感染 96 時間後の BmN 細胞上清を回収し、プラークアッセイにより測定した。

感染カイコ幼虫における BV 産生量は、コントロールウイルス、および PKO ウイルス感染 96 時間後のカイコ幼虫の体液を回収し、0.22 μm シリンジフィルターによる滅菌処理を行った後に、プラークアッセイにより測定した。

感染細胞における OB 産生量、および感染カイコ幼虫における OB 放出量の測定

感染細胞における OB 産生量は、コントロールウイルス、および PKO ウイルス感染 96 時間後の BmN 細胞を回収し、1% SDS にて細胞を溶解した後、血球計算盤 (NanoEnTek) を用いて測定した。感染カイコ幼虫の体液における OB 放出量は、コントロールウイルス、および PKO ウイルス感染 96 時間後のカイコ幼

虫の体液を回収し、体液中の OB 数を血球計算盤 (NanoEnTek) で測定することで行った。

感染カイコ幼虫の半数致死時間 (median survival time;LT₅₀) の測定

各ウイルスのカイコ幼虫に対する LT₅₀ は、コントロールウイルス、および PKO ウイルス感染カイコ幼虫 20 個体の死亡数を 6 時間おきに測定することで算出した。

統計解析

得られたデータの統計解析は統計解析ソフト Prism 5 (GraphPad) を用いて行った。BV 産生量、OB 産生量、及び OB 放出量は、一元配置分散分析と Tukey-Kramer 検定による多重検定比較を行い、コントロールウイルスと PKO ウイルスにおけるデータを比較した。感染カイコ幼虫の LT₅₀ は、Gehan-Breslow-Wilcoxon 検定によって、コントロールウイルスと PKO ウイルスにおけるデータを比較した。

ノーザンブロッティング

コントロールウイルス、および PKO ウイルス感染後 0, 6, 12, 24, 48, 72 時間の BmN 細胞から total RNA を調製した。total RNA は各レーン 3 µg ずつ、1.2 %ホ

ルマリン変性ゲルと MOPS バッファーにて (25 mM MOPS, 5 mM sodium acetate, and 2 mM EDTA) 電気泳動した。泳動した RNA は Model 785 vacuum blotter (Bio-Rad) を用いて、Amersham HyboundTM -N⁺ (GE healthcare) にトランスファーを行い、UV クロスリンクによって固定した。センス鎖、アンチセンス鎖の RNA を検出するため、DIG Oligonucleotide Tailing Kit, 2nd generation (Roche) を用いて DIG ラベリングしたオリゴヌクレオチドプローブ (表 5) を作成し、プロトコルに従ってハイブリダイゼーションと検出反応を行った。

結果

PKO ウイルスの構築

最初に、BmNPV感染BmN細胞から作成した完全長cDNAライブラリーを用いた網羅的なトランスクリプトーム解析の結果得られた配列情報の内 (Katsuma et al. 2011)、ORFを完全には含まない新規の転写ユニットの中から、バキュロウイルスの初期プロモーター配列 (CAGT / CATT)、または後期プロモーター配列 (TAAG) から転写されている非コードRNAユニット、つまり不完全な逆転写産物がクローニングされた結果ではないことが確認されたユニットを選抜した。その結果、100種408個の転写ユニットがlncRNA候補配列として得られた (表6)。次に、各lncRNAのウイルス感染時における機能解析を行うため、それぞれの転写開始点に変異導入することで、プロモーター活性を失活させたPKOウイルスの構築を行った。lncRNAの多くはセンスRNAのORF内に転写開始点 (プロモーターモチーフ) を持つため、PKOウイルスを作成する場合、センスRNAのORFのアミノ酸配列に変異を与えずに、プロモーター活性のみを欠失させる変異を導入する必要がある。

BmNPV *orf97*である *pif-1* 領域から発現する lncRNA に対する PKO ウイルス (KO97AS5) の構築を例にして、PKOウイルスの作例手順を説明する (図5)。ト

ランスクリプトーム解析の結果から、*pif-1*領域にはタンパク質をコードする mRNAと5種のアンチセンスRNAが転写されていることが示されている (Katsuma et al. 2011)。KO97AS5は、5種のアンチセンスlncRNAのなかで1.2 kb (93,758–92,462 bp) と最も長いものを欠失させたPKOウイルスである (図5)。*pif1*変異導入プラスミドは、*pif1*領域を含む遺伝子断片 (90,977–95,568 bp) をPCR法で増幅した後、pcDNA3.1 (-) ベクターへクローニングし、構築したプラスミドをpcDNA-*pif1*と命名した。次に*pif1*領域から転写されている最も長いアンチセンスRNAのプロモーター配列に対して、PIF-1タンパク質のアミノ酸配列に変化させずにlncRNAの転写を欠失させるためにTAAG→TTAAという塩基置換を導入し、完成したプラスミドをpmKO97AS5と命名した。*pif1*領域に対する*lacZ*カセット挿入による遺伝子欠損ウイルスは、*pif1*領域内 (92,753–94,011 bp) に*lacZ*カセット挿入が挿入されたプラスミドとBmNPV T3株のウイルスゲノムをコトランスフェクションことによる相同組換え法で作成した。得られた*pif-1*欠損ウイルスはBm97Dと命名した。pmKO97AS5とBm97Dウイルスゲノムを*Bsu36I*で消化し直鎖化したゲノムDNAを用いたコトランスフェクションを行った後、プラークアッセイ法にて白色プラークを純化し、変異導入ウイルスを得た。このような手順を繰り返すことで、バキュロウイルス由来のlncRNAを欠失したウイルスを合計22個構築した (表1)。

本研究では、PKOウイルス構築の際に用いた*lacZ*カセット挿入ウイルスのうち、*pif1*領域を欠失したBm97Dと*cg30*領域を欠失したBm71Dについては新たに作成し、他の*lacZ*カセット挿入ウイルスは先行研究にて作成されたウイルスを用いた（表1）。今回作成した*pif-1*欠損ウイルスであるBm97Dについては、他のウイルスで報告されているように経口感染力が消失していることを確認した（表7）（Ohkawa et al. 2005）。BmNPVの*cg30*については、その性状が研究実施時に報告されていなかったことから、Bm71Dや点変異導入ウイルスなど用いて性状解析を行った。その結果、CG30が核タンパク質であること、およびその欠損によって培養細胞やカイコ幼虫におけるウイルス増殖が低下することを明らかにした。また、CG30がもつRING fingerモチーフがカイコ幼虫におけるOB産生に関与することを発見した（Ishihara et al. 2013）。

PKO ウイルスの培養細胞における性状解析

BmNPV 感染細胞におけるウイルス由来 lncRNA の機能を調査するため、PKO ウイルスと BmN 細胞を用いた性状解析を行った。T3、BmhEPS1、PKO ウイルスは BmN 細胞へ MOI = 5 で感染させた。BmN 細胞は感染 96 時間後に回収し、BV 産生量と OB 産生量を測定した。その結果、すべての PKO ウイルスにおいて BV 産生量が、コントロールウイルスと同程度であった（図 6）。OB 産生量は、BmNPV

orf122 (*Bm122*) 領域から転写されているアンチセンス lncRNA を欠失した KO122AS のみ統計的に有意に低下し、他の PKO ウイルスにおいては同程度であった (図 7)。

KO122AS における OB 産生量の減少が、ウイルスゲノム内の他の場所に偶発的に起こった変異の影響ではないことを確認するため、KO122AS を元にリバータントウイルス KO122ASR を作成した。T3、KO122AS、KO122ASR を用いて BmN 細胞における OB 産生量を調査した結果、KO122ASR 感染細胞において OB 産生量が復帰したことから、*orf122* 領域から転写されているアンチセンス lncRNA が培養細胞における OB 産生に寄与していることが明らかになった (図 11)。

PKO ウイルスのカイコ幼虫における性状解析

次に、カイコ幼虫におけるウイルス由来 lncRNA のウイルス感染への影響を調査するため、カイコ 5 齢起蚕幼虫を用いた性状解析を行った。T3、BmhEPS1、PKO ウイルスはカイコ幼虫へ 1 匹あたり 1×10^5 PFU のウイルス液を皮下感染させた。カイコ幼虫から感染 96 時間後に体液を回収し、BV 産生量と OB 放出量を測定した。その結果、感染 BmN 細胞における結果と同様、すべての PKO ウイルスにおいて BV 産生量がコントロールウイルスと同程度であった (図 8)。OB

産生量においても、KO122AS のみ統計的に有意に低下し、他の PKO ウイルスにおいては同程度であった (図 9)。KO122ASR を用いてカイコ幼虫における OB 産生量を調査した結果、OB 産生量が T3 と同程度であったことから、*orf122* 領域から転写されているアンチセンス lncRNA が培養細胞、カイコ幼虫のどちらにおいても OB 産生に寄与していることが示唆された (図 11)。

lncRNA の病原性への関与を調査するため、PKO ウイルス感染カイコ幼虫の致死時間を調査し、LT₅₀ を計測した。その結果、コントロールウイルスと比較して、有意に LT₅₀ が異なる PKO ウイルスは存在しなかった (図 10)。

ノーザンブロットィングによる lncRNA、およびそれに対応するセンス mRNA の発現解析

lncRNA のノックアウトが対応するタンパク質コード mRNA に対して影響を与えているかどうかを調査するため、いくつかの PKO ウイルスに関してオリゴヌクレオチドプローブを用いたノーザンブロットィングを行い、センス RNA とアンチセンス RNA を個別に検出した。その結果、KO97AS5 感染細胞においては変異導入により目的のアンチセンス RNA が欠失していることが確認された。また、センス RNA における mRNA の発現量は T3 と同程度であった (図 12)。

KO122AS 感染細胞においては、変異導入による目的のアンチセンス RNA の欠失をはっきりと確認できなかった (図 13)。これは、T3 感染細胞内においても該当するサイズの特異的なシグナルが検出できなかったことから、lncRNA の発現量がノーザンブロッティングの検出限界以下であった可能性や、目的の lncRNA が近傍領域から転写されている他の転写産物と同程度の長さであったことにより特異的なシグナルが検出できなかったと考えられた。一方、センス RNA における mRNA の発現量は T3 や KO122ASR と比較し、顕著に減少していることが判明した (図 13)。KO1AS2 感染細胞では、アンチセンス RNA の転写がノーザンブロッティングの検出限界以下に消失していたが、センス RNA の転写に対して影響は見られなかった (図 14)。KO63AS 感染細胞においては、アンチセンス RNA の転写がノーザンブロッティングの検出限界以下に消失し、センス RNA の転写の遅延が認められた (図 15)。

考察

現在までに、アデノウイルス *VAI noncoding RNA* やヘルペスウイルス *KSHV* の *PAN RNA* を含め、数種のウイルスがゲノムから機能性 *lncRNA* を転写することが報告されているが、それらがどのようにウイルス感染に寄与しているのかについては、ほとんど明らかになっていない (Cox and Sullivan. 2014)。バキュロウイルスにおいては、唯一 *polh* 領域から転写されている 3.2 kb の *lncRNA* が報告されている。AcMNPV の *polh* 転写欠損株を用いた解析から、*polh* mRNA の転写がこのアンチセンス *lncRNA* の発現を抑制していることが示されているが、この *lncRNA* の機能は不明である (Ooi and Miller. 1990)。私の研究室で行われた BmNPV 感染 BmN 細胞から作成した完全長 cDNA ライブラリーの網羅的なトランスクリプトーム解析により、*lncRNA* を含むウイルスゲノム由来の転写ユニットが網羅的に同定された。私は、このトランスクリプトーム情報から、100 種 408 個の転写産物を *lncRNA* 候補転写ユニットとして選抜した (表 6)。次に、これらの *lncRNA* 候補の中から機能性 *lncRNA* を探索するため、それぞれの転写ユニットのみ欠失させた PKO ウイルスを 22 個作成し、培養細胞およびカイコ幼虫における性状解析を行った (表 1)。その結果、*Bm122* 領域から転写されているアンチセンス *lncRNA* が、センス RNA のタンパク質をコードする mRNA 発現の制御と OB 産生に寄与していることが示唆された (図 11、13)。

KO122AS は、培養細胞、およびカイコ幼虫のどちらにおいても、BV 産生量には影響が見られないが、OB 産生量は約 50%に低下した (図 11)。ノーザン解析の結果、KO122AS 感染細胞において、*Bm122* mRNA の転写が著しく減少していた (図 13)。バックミドを使用した解析により、*Bm122* 欠損ウイルスは単一細胞にのみ感染が起こることから、*Bm122* が細胞間感染に必須なタンパク質であることが明らかになっている (Ono et al. 2012)。また、*Bm122* オーソログである AcMNPV *orf146* (*Ac146*) 産物はウイルス粒子の構造タンパク質であり、BV 産生に必須であることが判明している (Dickison et al. 2012)。ノーザン解析の結果から、KO122AS は *Bm122* 遺伝子のノックダウンと同様の表現型を示していると言える。*Bm122* の欠損では BV の産生異常が生じるが、*Bm122* mRNA の減少では、BV 産生は変化せず OB 産生だけが減少していると考えられた。

近年、バキュロウイルスゲノムにコードされている miRNA が、ウイルス自身の遺伝子発現や宿主遺伝子の発現抑制に関与していることが報告されている。

AcMNPV においては、ウイルス遺伝子 *odv-e25* と完全に一致した配列を持つ miRNA である *miR-1* が *odv-e25* mRNA の発現を抑制することで、BV 産生を減少させ ODV 形成を増進していることが報告されている (Zhu M et al. 2013)。また、

BmNPV においては、*in silico* 解析により miRNA 配列の探索が行われた (Singh et al. 2010)。アンチセンス Locked Nucleic Acid (LNA) を用いた解析によって、そのうちのひとつである *bmnpv-miR3* が DNA 結合タンパク質である P6.9 を含む後期遺伝子の発現を抑制していることが示された (Singh et al. 2014)。本研究で作成した PKO ウイルスにおいて欠失した lncRNA には、Singh らが探索した miRNA 配列を含んではおらず、これらが miRNA 前駆体として転写され、機能している可能性は低いと考えられる。本研究の結果から、*Bm122* や *Bm63* 領域から転写されている lncRNA を欠失するとセンス mRNA 発現の減少や遅延を引き起こすことが判明した (図 13、15)。この結果は、バキュロウイルスゲノムから転写される lncRNA の一部が、miRNA による遺伝子発現制御とは異なり、転写干渉や mRNA の安定性向上等のプロセスによってウイルス遺伝子の厳密な発現制御に寄与している可能性を示している。

本章の結果から、バキュロウイルスゲノムから転写される lncRNA のなかには、感染細胞におけるウイルス遺伝子の複雑かつ正確な発現制御の達成に寄与する RNA が存在することがわかった。今回作成した PKO ウイルスは、プロモーターモチーフにより選抜した lncRNA 候補の約 1/5 の数に相当するものであり、バキュロウイルス lncRNA の全貌を解明するためには、残りの lncRNA 候補に関して

も解析をおこなう必要がある。しかしながら、反復配列である homologous region (hr) の近傍から転写されている lncRNA や、必須遺伝子の配列内にプロモーター配列が座乗している lncRNA においては、通常の相同組換えを用いた PKO ウイルスの構築が極めて困難である。バキュロウイルスの必須遺伝子の解析には、大腸菌内でトランスポゼースを利用して組換えウイルスを構築するバックミドシステムが広く用いられている。今後はバックミドを用いた必須遺伝子領域の PKO ウイルスの作成も検討する必要があると考えられる。バックミドを用いた変異導入は組換えバックミドの効率的な選抜のため、目的遺伝子領域に抗生物質耐性遺伝子カセットを挿入することで行われる。遺伝子カセットが複数領域にまたがって転写されている長い転写ユニットをコードする配列に含まれてしまう可能性や、遺伝子カセットが近傍領域の転写開始点付近に挿入されることにより転写ユニットの発現プロファイルに影響する可能性が考えられることから、バックミドシステムを用いた PKO ウイルスの作成と表現型の評価は慎重に行う必要が有るだろう。

最近、マウスを宿主とする murine gammaherpesvirus 68 (MHV68) の機能未知の、複数 ORF にまたがる長い転写産物の解析が報告された (Canny et al. 2014)。Canny らは、複雑に込み入った転写産物の中で、ターゲットとなる転写産物のみが転

写している配列に対して siRNA を設計し、目的転写産物の特異的ノックダウンを行うことで機能解析を行った。今後は、PKO ウイルスの構築が困難な領域に対し同様の戦略を用いることで、さらに多くの機能性 lncRNA が発見されるであろう。

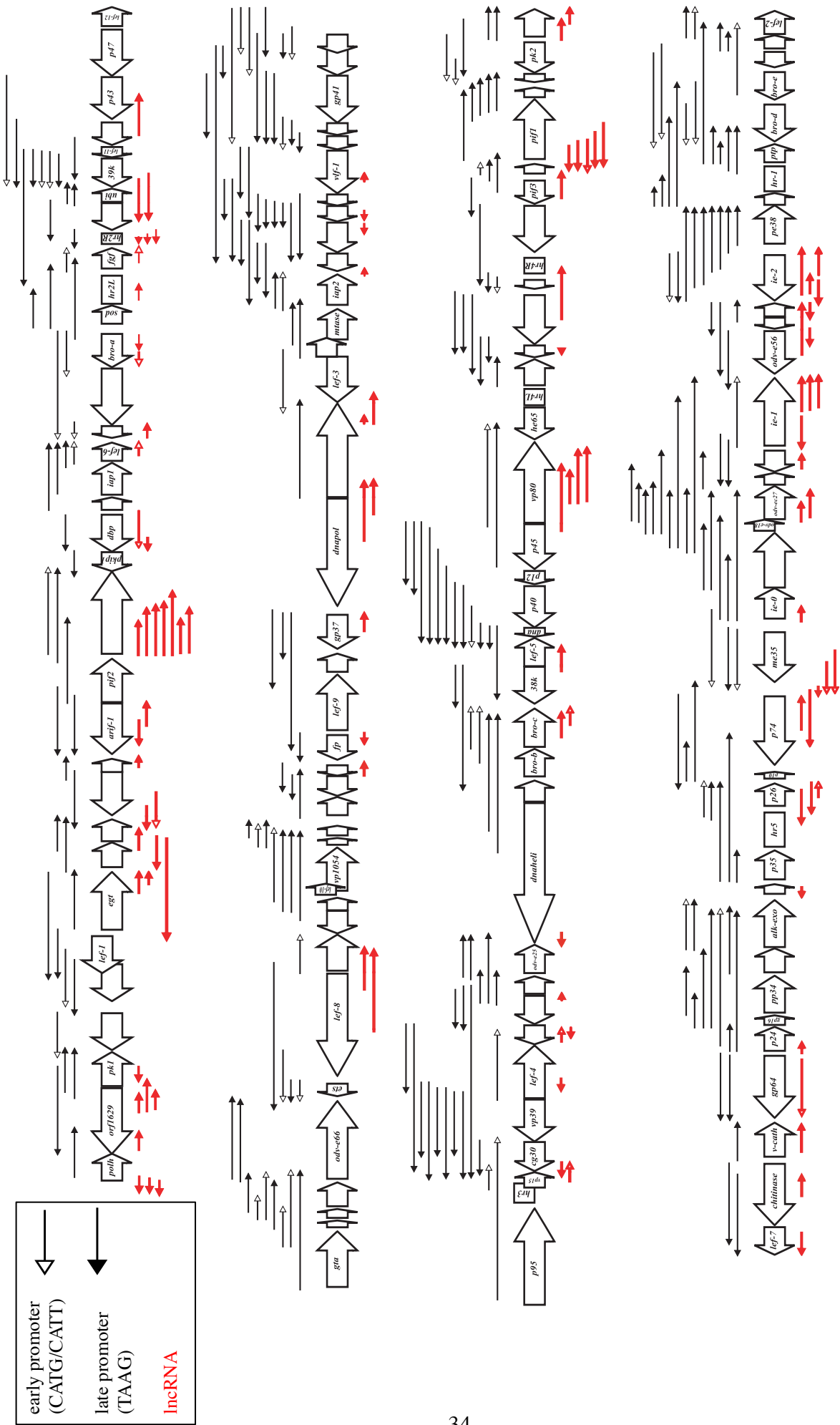


図4：BmNPVゲノムから産生される転写ユニット
 白抜き印は太い矢印は予測されるORFを示している。黒矢印はmRNAを含む完全なORFをコードしている転写ユニットを示し、矢頭が白抜き印のもの（初期プロモーターから、塗りつぶされたものは後期プロモーター）を示す。赤矢印はIncRNA候補転写ユニットを示す。

表1：構築したPKOウイルスリスト

ウイルス名	対応するORF	IncRNA (start-stop)	変異導入したプロモーター配列	用いた lacZ 挿入ウイルス ^a
KO1AS1	1	40-128413	TAAG→TACG (39A→C)	BmNPV-abb (1)
KO1AS2	1	81-128413, 128415	TAAG→TCAA (81A→C, 79G→A)	BmNPV-abb (1)
KO1AS3	1	207-128413, 128415	TAAG→TCAA (207A→C, 205G→A)	BmNPV-abb (1)
KO1AS123	1		3 つすべての <i>polh</i> アンチセンスプロモーターに変異導入	BmNPV-abb (1)
KO9AS1	6, 7, 8, 9	8908-5993, 7861, 8259	TAAAG→TAGG (8907A→G)	Bm9D (2)
KO9AS2	7, 8, 9	9028-7916	TAAAG→TAGG (9027A→G)	Bm9D (2)
KO52AS	52	47195-47486	TAAAG→TATG (17196A → T)	Bm52D (2)
KO63AS	63	58401-58821	TAAAG→AAGA (58400T→A, 58403A→G, 58404G→A)	Bm60D (2)
KO71S	71	66851-66627	TAAAG→CAAA (66852T→C, 66849G→A)	Bm71D(3)
KO88S2	88	83522-84635, 85289	TAAAG→AAAA (83521T→A, 83524G→A)	Bm89D(2)
KO88S3	88	83657-85297	TAAAG→CAAA (83656T→C, 83659G→A)	Bm89D(2)
KO95AS	95	91564-91930, 91996	TAAAG→TATG (91565A→T)	Bm95D(4)
KO97AS3	97	92948-92416	CAGT→CTGT (92948A→T)	Bm97D
KO97AS5	97	93758-92462	TAAAG→TTAA (93758A→T, 93756G→A)	Bm97D
KO97AS1-5	97		5 つ全ての <i>pifl</i> アンチセンスプロモーターに変異導入	Bm97D
KO105S	105	101420-99727, 99749, 99828	CAGT→CAAT (101419G→A)	Bm106D(2)
KO122AS	122	116428, 116429-116882	TAAAG→AAGA (116427T→A, 116429A→G, 116430G→A)	Bm121D (2)
KO124AS	124, 125, 126	119112-120584	TAAAG→TATG (119113A→T)	Bm124D(4)
KO126AS	126	120663-120301	TAAAG→GAAG (120664T→G)	Bm127D (5)
KO127AS1	127	120881-122180	TAAAG→TCAA (120881A→C, 120883G→A)	Bm127D (5)
KO127S	127	121099-120617, 120619, 120622	TAAAG→CAAA (121100T→C, 121097G→A)	Bm127D (5)
KO127AS3	127	121420-122185, 122187	TAAAG→TATG (121421A→T)	Bm127D (5)

^a 参考文献 (1): Kang et al. 1998. (2): Katsuma et al. 2012. (3): Ishihara et al. 2013. (4): Kamita et al. 2005. (5): Gomi et al. 1997.

表2：作成したリバータントウイルスのリスト

revertant virus	plasmid name	plasmid cloned site (T3 genome)
KO1ASR1	pUC-EcoE	126616-8732
KO1ASR2	pUC-EcoE	126616-8732
KO1ASR3	pUC-EcoE	126616-8732
KO1ASR123	pUC-EcoE	126616-8732
KO9ASR1	pUC-PstG	7065-14896
KO9ASR2	pUC-PstG	7065-14896
KO63ASR	pUC-PstD	52136-64335
KO95ASR	pUC-PstB	79744-96695
KO97ASR3	pUC-PstB	79744-96695
KO97ASR5	pUC-PstB	79744-96695
KO97ASR1-5	pUC-PstB	79744-96695
KO105SR	pUC-BamF	99520-103501
KO122ASR	pUC-HindC	110820-127899
KO124ASR	pUC-HindC	110820-127899
KO126ASR	pUC-HindC	110820-127899
KO127ASR1	pUC-HindC	110820-127899
KO127SR	pUC-HindC	110820-127899
KO127ASR3	pUC-HindC	110820-127899

表3-1：第一章で使用したプライマーリスト

name	sequence	purpose
T3-8041 BamHI F	aaggatccggacgttcaaaggcgaaaac	cloning
T3-9520 HindIII R	ttaagcttgcactctacttgaacaccgac	
T3-44650 EcoRV F	gatatcttgtgttatagtcacggatttggcctccaacgtgttccctc	
T3-49064 Kpn R	ggtaccgatttgtcaataatcgggtcaattcaacgccgacaaaag	
T3-54494 Nhe F	gctagcaagtcgggtggttgcgctcgctcaaaattattgacaaaac	
T3-59530 Xba R	tctagacgacatgatgggtggctataacaacacgacgagcaac	
T3-65413 Xho F	ctcagttgtcattgcctcttttcacgacgctgtctggagcatggg	
T3-69274 Kpn R	ggtaccggccatcttgtcaatcaacgtgggtcagcggcacgaatg	
T3-81998 EcoRV F	ggcggcttctcgtgttgcgacatgttggccagtg	
T3-87376 Kpn R	ggtacctggtgctggtagcaaacatttgcctttgagttggtgtttgc	
T3-90068 Xho F	ctcgagaattttacgtgtaaacacgatcacagcacttcgtag	
T3-93022 Kpn R	ggtaccacgttgaatcttcgtacatgttaagctg	
T3-90977 Nhe F	gctagcctatacaaatggccaagcattcggaatgcac	
T3-95568 EcoRI R	gaattcgcgataaattgtatgtatatagggcgtgggagctcg	
T3-99711 Nhe F	gctagcctgcagtcatttattaatctctcgtctatttggacataatc	
T3-104032 HindIII R	aagcttgaacgggtcagtaattgtgagaactttatttgtaaatcg	
T3-113998 Xba F	tctagataataatatactaccgccacccttctaacgcaaag	
T3-117502 HiindIII R	aagcttgcacagcttgaattgtgcttttctgtatttaggcttc	
T3-117498 Nhe F	gctagctgtgcaacccttgagcagacaattaatcacaac	
T3-121145 Kpn R	ggtacccaaatgttttgcagcgtagttcatcagattttc	
T3-119487 Xba F	tctagagtatgccactcctgctactttcaagggtc	
T3-122536 Kpn R	ggtaccttctacgcatttgatagcgcctctcc	

表3-2：第一章で使用したプライマーリスト

name	sequence	purpose
mKO1AS1 F	atcgggctacgtacgtgtacgacaata	mutagenesis
mKO1AS1 R	tattgtcgtacacgtacgtacgcccgatgg	
mKO1AS2 F	aaacttgggctgtttgatcaaaaacgcc	
mKO1AS2 R	cttggcggtttgatcaaacagcccaag	
mKO1AS3 F	gcaaaaacccaaaattgaccttttaaaag	
mKO1AS3 R	ctttaaaaagggtcaattttgggtttgc	
mKO9AS1 F	agtgccatattcaggctac	
mKO9AS1 R	gcctgaatataggcactatc	
mKO9AS2 F	acaatgccctacgtcatcgg	
mKO9AS2 R	gacgtagggcattgtgtac	
mKO52AS F	cggcgctcgggaatgttacg	
mKO52AS R	cgtgccgaatgcatacaaatcagtc	
mKO63AS F	ccgctattgtaaagattgctgctcaataatg	
mKO63AS R	cgtgcccttacaaaaagtgcccaaatatgaatcac	
mKO71S F	gttttagccgcaagtttgcgtaatcatc	
mKO71S R	gccagattgagtaacgaaaacaaagtttatcaataaaaatattg	
mKO88S2 F	aacgttatccaagtattacaacgagacgac	
mKO88S2 R	ttacaaaacgacagccatacgaacacattg	
mKO88S3 F	cgatagtttataaacaagcggaagagtgttac	
mKO88S3 R	gtaacactctccgctttgttaataaactatcg	
mKO95AS F	ftcccgtatcgtccaccaagtctctg	
mKO95AS R	cgccgagccatatctatgcaac	
mKO97AS1 F	caactgtcccgtgggctgc	
mKO97AS1 R	caatcttcgtacatgttfaactgcgtaacaag	
mKO97AS2 F	agaagcctactgcttggctttggatc	
mKO97AS2 R	cccgtcgaattaactctctgttcttg	
mKO97AS3 F	tgcagttgcttacggccggac	
mKO97AS3 R	caaaagagcgaacctgttcaagttcgg	
mKO97AS3-2F	acagaaacaggttcgctctttgtgcagttgcttac	
mKO97AS3-2R	ttcgccaacaaccacacaccgtgtgg	
mKO97AS4 F	caatcgacaaaaggtgtcaacggaatcaac	
mKO97AS4 R	gatggtgaaaaagccgtccccttg	
mKO97AS5 F	gtcatgcttcttccaggcgtagg	
mKO97AS5 R	gaccgagaagtgtactttctttaaataatataatcc	
mKO105S F	attgagcatctatataccgaccgctatttg	
mKO105S R	gtactagtaaatcaatcataccaaggcttc	
mKO122AS F	actgacacgttcccacattatcataaatccttg	
mKO122AS R	gcattttataataatcttcaaaaatgtcgcgcgc	
mKO124AS F	attgtttggcccgcaggaagatc	
mKO124AS R	catgtgcatcgaaccatactcgtttag	
mKO126AS F	caacacttcaggtttagacatctcaatag	
mKO126AS R	ctattgagatgtctaaacctgaagtgttg	
mKO127AS1 F	gttcgtgtttcaacatagcgtagtgc	
mKO127AS1 R	gcgactacgctatgttgaaacacgaac	
mKO127S F	caacacttcaggtttagacatctcaatag	
mKO127S R	ctattgagatgtctaaacctgaagtgttg	
mKO127AS3 F	cgtggactatatcgggagacc	
mKO127AS3 R	ccaaggtctcccgatatagtccac	

表3-3：第一章で使用したプライマーリスト

name	sequence	purpose
t3 7567 R	catggtaaaactggtcgccatcatg	sequencing
t3 7495 F	gtttattacgcaaggcggactacaatcg	
t3 8436 R	catctgaccactccaaagtatttccaatg	
t3 8315 F	gcatttgcaaaatttgctaaggaaaaagaacg	
t3 9296 F	cggttaattattttacgggtagacagctattaac	
t3 10418 R	cgtttgtaaatcaactaaatcttggcgttctac	
t3 45704 F	gtaaaagtgtgtggcgccgac	
t3 45825 R	tgctctggaaacagaaactcagagg	
t3 47112 F	ctgttgaacatgtattgcgctgtgg	
t3 47186 R	cgtgccgaatgcttacaatcag	
t3 48614 R	cgcaccgccaatagcatatacg	
t3 55571 F	cacatattcggattattgcatatcatcaaccaac	
t3 55710 R	gacgagccaacatgtcaacgac	
t3 56928 F	gaacggctcgtcgacaaaaatgc	
t3 57031 R	tgtacgttagcaaagagaccaacatgaaag	
t3 58206 F	tacaacaacgattctcccgacgaac	
t3 58358 R	gaatcacgaatcttccgcaagcac	
t3 66467 F	ggcgtaaaggcgatcaagaatgaac	
t3 66560 R	ggctatcgtttaaagcgactgattg	
t3 67796 F	catgatgtcactccttctatcggg	
t3 67886 R	cgccacgtgtataattgacgaaacg	
t3 83405 F	ccgccgagggtatcgtc	
t3 83508 R	gccatacgaacacattgtatcgc	
t3 84841 F	gctaaactgtacaatctcgatcatattg	
t3 84953 R	gatgagaaagcgtttgtcactgttacc	
t3 86219 F	agcgttgcttactgtgcctgtatc	
t3 86362 R	cgagtaaaattctacgtgtaacgcacg	
t3 91520 F	caccgtgtccaaattcatattcagcc	
t3 91601 R	cagagacttggtagcagatacg	
t3 92202 F	cagtgttaattgaagggtcagatgtgtg	
t3 92324 R	ttgtcactagtgtattctaaactttccaacacttc	
t3 94570 F	gtcttcgtgtttgtgtaaggctctcg	
t3 94717 R	gattatcctgctgtttgtcgtggc	
t3 100947 F	gtttcaccaactcttgcctttgacc	
t3 101083 R	tttgcctatgtgggtatcaggc	
t3 102266 F	caatactagtggcatgtacgaatctatgg	
t3 102386 R	cgaatcgtgttatttgaagttgctcaac	
t3 103443 R	tcagttttgtctgtcggtctcg	
t3 115397 F	gccgtggtgttagcacattagc	
t3 115478 R	gcttgtgcattagtctcagtgaccac	
t3 116893 R	tcaattfatactgccctaatggcgaacac	
t3 118872 F	gcataataacaatgggagttggtgcg	
t3 119002 R	gcccatcattatgatgataggcgc	
t3 120522 R	gtaactctaactatgattataccgacacacatg	
t3 120745 F	actcggccacctgcttacg	
t3 120815 R	gggc aaatcgtgatttgaagaatttacc	
t3 122067 R	tgcttgacaagtcccttactactattg	
pcDNA F	atcaatggcggtgatagcggtttg	
pcDNA R	gcattgcctgctattgtcttccaatc	

表4：第一章で作成したしたプラスミドリスト

plasmid name	vector	primers set
pcDNA-bm9	pcDNA3.1(-)	T3-8041 BamHI F/ T3-9520 HindIII R
pcDNA-gp37	pcDNA3.1(-)	T3-44650 EcoRV F/ T3-49064 Kpn R
pcDNA-vlf1	pcDNA3.1(-)	T3-54494 Nhe F/ T3-59530 Xba R
pcDNA-cg30	pcDNA3.1(-)	T3-65413 Xho F/ T3-69274 Kpn R
pcDNA-vp80	pcDNA3.1(-)	T3-81998 EcoRV F/ T3-87376 Kpn R
pcDNA-pif3	pcDNA3.1(-)	T3-90068 Xho F/ T3-93022 Kpn R
pcDNA-pif1	pcDNA3.1(-)	T3-90977 Nhe F/ T3-95568 EcoRI R
pcDNA-gp64	pcDNA3.1(-)	T3-99711 Nhe F/ T3-104032 HindIII R
pcDNA-bm122	pcDNA3.1(-)	T3-113998 Xba F/ T3-117502 HindIII R
pcDNA-odve56	pcDNA3.1(-)	T3-117498 Nhe F/ T3-121145 Kpn R
pcDNA-ie2	pcDNA3.1(-)	T3-119487 Xba F/ T3-122536 Kpn R
pmKO1AS1	pBm-EPS1	mKO1AS1 F/ mKO1AS1 R
pmKO1AS2	pBm-EPS1	mKO1AS2 F/ mKO1AS2 R
pmKO1AS3	pBm-EPS1	mKO1AS3 F/ mKO1AS3 R
pmKO1AS123	pBm-EPS1	mKO1AS1 F/ mKO1AS1 R, mKO1AS2 F/ mKO1AS2 R, mKO1AS3 F/ mKO1AS3 R
pmKO9AS1	pcDNA-bm9	mKO9AS1 F/ mKO9AS1 R
pmKO9AS2	pcDNA-bm9	mKO9AS2 F/ mKO9AS2 R
pmKO52AS	pcDNA-gp37	mKO52AS F/ mKO52AS R
pmKO63AS	pcDNA-vlf1	mKO63AS F/ mKO63AS R
pmKO71S	pcDNA-cg30	mKO71S F/ mKO71S R
pmKO88S2	pcDNA-vp80	mKO88S2 F/ mKO88S2 R
pmKO88S3	pcDNA-vp80	mKO88S3 F/ mKO88S3 R
pmKO95AS	pcDNA-pif3	mKO95AS F/ mKO95AS R
pmKO97AS3	pcDNA-pif1	mKO97AS3 F/ mKO97AS3 R
pmKO97AS5	pcDNA-pif1	mKO97AS5 F/ mKO97AS5 R
pmKO97AS1-5	pcDNA-pif1	mKO97AS1 F/ mKO97AS1 R, mKO97AS2 F/ mKO97AS2 R, mKO97AS3 F/ mKO97AS3 R, mKO97AS3-2F/ mKO97AS3-2R, mKO97AS4 F/ mKO97AS4 R, mKO97AS5 F/ mKO97AS5 R
pmKO105S	pcDNA-gp64	mKO105S F/ mKO105S R
pmKO122AS	pcDNA-bm122	mKO122AS F/ mKO122AS R
pmKO124AS	pcDNA-odve56	mKO124AS F/ mKO124AS R
pmKO126AS	pcDNA-ie2	mKO126AS F/ mKO126AS R
pmKO127AS1	pcDNA-ie2	mKO127AS1 F/ mKO127AS1 R
pmKO127S	pcDNA-ie2	mKO127S F/ mKO127S R
pmKO127AS3	pcDNA-ie2	mKO127AS3 F/ mKO127AS3 R

表5：本研究で使用したオリゴヌクレオチドプローブリスト

probe name	sequence	position
polh S	cacaattctgattacttcgtggggcacgtagcttcttcccacctaaga	420-468
polh AS	tcaaatcccaagatgtgtataaaccaccaaactgccaaaaaatgaaaac	128172-128220
egt S	gatgaataacatttattgacgtaactaaaagtgtgctatatgattc	7906-7951
egt AS	gaatcatatagcacacttttagttacgtcaataaatgttattcattc	7906-7951
orf8,9 S	gaaccggcgactattttcataaactatgactcgcggaccaaacgctgcc	8615-8663
orf9 AS	ggcagcgtttggtcgcgagtcatagtttatgaaaatagtcgccggttc	8615-8663
gp37 S	cactaatcgggaataataaccgctgtcgtaaccttggcaaaaacg	47383-47427
gp37 AS	caatataaatgttttaaagatgaaatttttattggccccacaatggcgataacattcc	47218-47276
vlf-1 S	gtgcccaattccaacggtttcattttgatgttggtagcgtgtattacgactgc	58552-58605
vlf-1 AS	gcagtcgtaataacacgctcaacaacatcaaaatgaaaccgttggaaattggcac	58552-58605
cg30 S	gatagtagtagcgtttgtgatacatttatatgattgtaattgtgtg	66744-66789
vp80 S	ctcgtcggcagtgtagcgcggttgtagtctctgtcctgatcgggtgtaag	83960-84010
pif3 S	gaaaatgtgaagcaagcccagtgccgggatcgcattctatcaagtccg	91649-91695
pif3AS	cggacttgatagaatgcgatcccgcactgggcttgcttcacattttc	91649-91695
pif1 S	gattattatttcggacggcgggtcaatgagcggcacgcccgtgttg	92648-92693
pif1 S-2	gtgttggggttacacgatcgggcgcttctcgatccaaagccaagcagtag	92867-92917
pif1 AS	acaacacgggcgtgccgctcattgaaccgccgtccgaaataataatc	92647-92693
gp64 S	cttcgacgcgtgtgttgggatccagcagcctccgttgtag	101118-101158
orf122 S	cacgtacgtcctcgtgtcccgttcaaggacgggtgttatcgacctag	116692-116739
orf122 AS	ctgaggtcgataacaccgtccttgaacgggacacgaggagcgtacgtg	116692-116739
odv-e56 S	gtagataattgatagccccggctgatatctgttgtttccaaggttgcg	119785-119832
orf126 S	cggaaaatgtactccaattggctctgtaaacgcaactgaactcgtcgtcgaatc	120408-120461
orf126 AS	gattcagacgacgagttcagttgcgttaacagaccaattggagtacattttccg	120408-120461
ie2 S	ctaaaagctcacgccaatgctgtttgatggaatcccggttacgaatgagg	121018-121067
ie2 AS	cctcattcgtaacgggattccatcaaacagcattggcgtgagcttttag	121018-121067
ie2 AS2	gaaagtgtggatcgtgcttctcagcagtagaccagaatagcattgcgtcgg	121504-121552
let-7	tactatacaacctactacctca	

表6-1：選抜した長鎖非コードRNA候補転写ユニット

対応するORF	lncRNAの向き ^a	lncRNA (start-stop)	プロモーター配列	完全長cDNAライブラリー中のコピー数
1-polh	AS	40-128413	TAAG	1
1-polh	AS	81-128413, 128415	TAAG	15
1-polh	AS	207-128413, 128415	TAAG	2
2-orf1629	AS	770-1107	TAAG	2
2-orf1629, 3	S/AS	2013-2375,3213	TAAG	2
2-orf1629	S	2069-2375	TAAG	2
3-pk1	AS	2834-2622	TAAG	18
7-egt	S	7237-7955	TAAG	1
7-egt	S	7769-7955	TAAG	8
8,9	S	8507-9215,9329,9334	TAAG	4
6,7,8,9	AS	8908-5993,7861,8259	TAAG	3
7,8,9	AS	9028-7916	TAAG	1
9,10	AS/S	9555-9116,9165,9363	TAAG	3
9,10	AS/S	9860-9161	CATT	1
11	S	10689-10813	TAAG	1
12-arif1	AS	11587-12323	TAAG	4
12-arif1	S	11747-10848	TAAG	3
13,14	S	13503-14456,14940,15039,15177,15576	TAAG	5
13,14	S	13538-,14477,14940	TAAG	2
14	S	15152-15624	CAGT	1
16	S	16512-16171	TAAG	1
19	S	18652-19084	CAGT	1
20	AS	19153-19372	TAAG	3
22-broa	S	21094-20835	CAGT	2
22-broa	S	21752-20871	TAAG	1
	S	22574-23100	TAAG	2
24-vfgf	S	23635-23993	CATT	3
hr2r		24100-23930	TAAG	3
hr2r		24199-23930,23982	TAAG	5
hr2r		24307-23930,23982	TAAG	12
25	S	25163-24014,24016	TAAG	13
27-39k	S	25518-25299	TAAG	7
27-39k	S	25644-25299	TAAG	1
29,30	AS	26823-27840	TAAG	1
39,40	AS/S	36101-38669	TAAG	1
39,40	AS/S	38089-38724	TAAG	1
48	AS	43252-43527	TAAG	1
49-fp25k	S	44356-44090	TAAG	2
52-gp37	AS	47195-47486	TAAG	3
53,54	AS/S	50021-51187	TAAG	1
54	S	50438-51187	TAAG	3
54	S	52240-52389	TAAG	1
54,55	S/AS	52240-53016	TAAG	1
no orf	S	56160-56384	TAAG	3
60	S	57492-57051	TAAG	4
60,61	S	57838-57453	TAAG	1
63-vlf1	AS	58401-58821	TAAG	3
70,71	S/S/AS	66540-66824	CAGT	1
71-cg30	S	66851-66627	TAAG	10
70,71	AS/S	67268-66625	CATT	1

表6-2：選抜した長鎖非コードRNA候補転写ユニット

対応するORF	lncRNAの向き ^a	lncRNA (start-stop)	プロモーター配列	完全長cDNAライブラリー中のコピー数
73-lef4	AS	68894-68653	TAAG	5
74	AS	70014-70425	CAGT	2
74	S	70456-70103	TAAG	4
76	S	71539-71766	TAAG	24
78-dnaheli	S	72717-72458	TAAG	2
81	S	77623-78600	TAAG	1
81	S	77924-78643	CATT	1
82,83	AS/S	79294-80011,80027,80188	TAAG	3
82-38k	S	79652-78860,78872,78875,79490	TAAG	40
87,88	AS/S	83206-85178	TAAG	1
88-vp80	S	83522-84635,85289	TAAG	2
88-vp80	S	83657-85297	TAAG	10
91	S	87781-87607	TAAG	3
92,93	AS	88237-89799	TAAG	1
95-pif3	AS	91564-91930,91996	TAAG	13
97-pif1	AS	92849-92419	TAAG	1
97-pif1	AS	92871,92999-92413	TAAG	3
97-pif1	AS	92948-92416	CAGT	1
97-pif1	AS	93334-92456	TAAG	3
97-pif1	AS	93758-92462	TAAG	3
101	S	95448-96196	TAAG	9
101	S	95609-96104,96232	TAAG	10
102-lef7	S	97024-96357	CAGT	3
103	AS	97564-98531	TAAG	1
105-gp64	S	101420-99727,99749,99828	CAGT	10
106-p24	S	101526-101786,101796	TAAG	9
113-p26	S	108141-108477	CATT	1
113-p26	AS	108344-107424	TAAG	1
113-p26	AS	108467-107690	TAAG	3
115	AS	109518-110746	TAAG	1
115	S	110923-108879	TAAG	1
	AS	110923-110762	TAAG	2
116	S	111464-110764	CATT	1
116	S	111860-110800,110991	CAGT	2
117-exon0	S	112570-112873	TAAG	6
120-odvec27	S	115142-115800,115838	TAAG	11
120-odvec27	S	115261-116001	TAAG	1
122	AS	116428,116429-116882	TAAG	3
122,123	S/AS	118103-116906	TAAG	1
123-ie1	S	118371-118823	TAAG	2
123-ie1	S	118491-118823	TAAG	7
123-ie1	S	118575-118823	TAAG	5
124-odve56,125,126	AS/AS/S	119112-120584	TAAG	4
124-odve56	S	119978-119656	TAAG	2
126	AS	120663-120301	TAAG	2
127-ie2	AS	120881-122180	TAAG	1
127-ie2	AS	120984-121284	TAAG	4
127-ie2	S	121099-120617,120619,120622	TAAG	3
127-ie2	AS	121420-122185,122187	TAAG	6
129	AS	124035-123389,123396	TAAG	2

^alncRNAの向き: SはmRNAに対して正向き、ASは逆向きの転写産物であることを示している。空欄はORFではないintergenicな領域からの転写産物を示している。

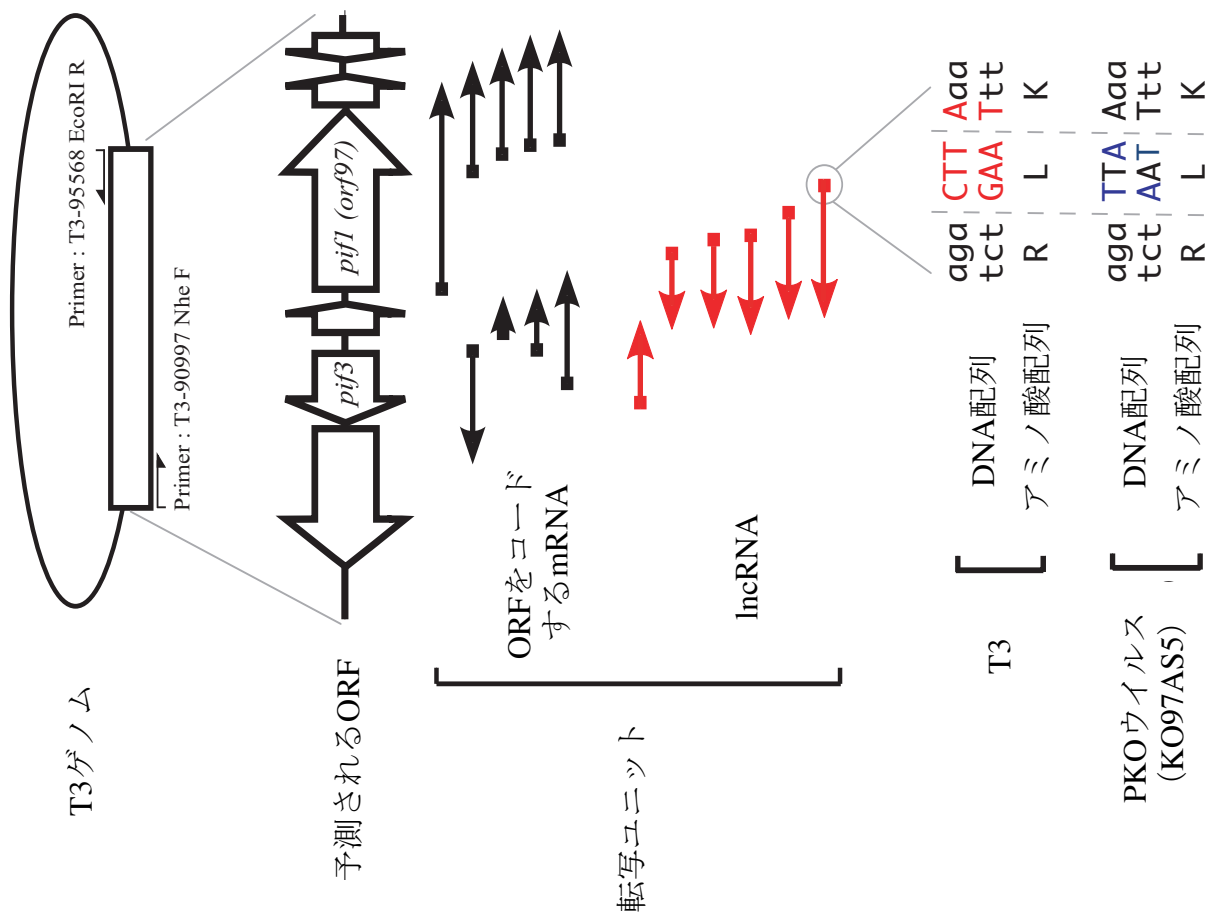


図5 : PKOウイルスの作成スキーム (KO97AS5を例として)
 PKOウイルスの作成手順をKO97AS5を例として示す。KO97AS5は*pif1*領域から転写される一番長いアンチセンスlncRNAを欠失したウイルスである。プロモーター配列TAAGへの変異は、PIF-1タンパク質のアミノ酸配列を変化させないようにTAAAと導入し、目的のlncRNAを欠失させた。(Ishihara et al., 2015. Appl Entomol Zool. DOI 10.1007/s13355-014-0317-4.を改変使用)

表7：Bm97Dの経口感染力

virus	7 dpi LC ₅₀	95% Confidence Intervals	
		Lower	Upper
T3	5.5×10^4	3.1×10^4	8.8×10^4
Bm97D	$> 1.0 \times 10^8$		

*pif-I*領域に*lacZ*遺伝子カセットを挿入したBm97Dを用いて経口感染力の調査を行った。その結果、既報の*pif-I*領域欠損ウイルスと同様に経口感染力が消失した。

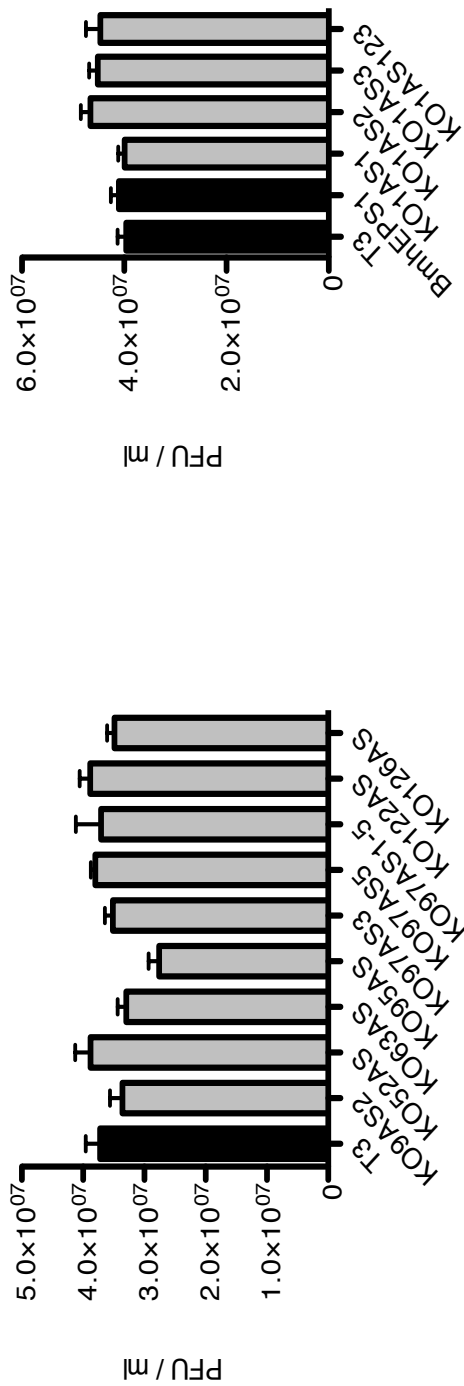


図6：PKOウイルス感染BmN細胞におけるBV産生量
 コントロールウイルス、およびPKOウイルスをBmN細胞に感染させ、4日後にBV産生量を測定した。感染実験は各ウイルス5反復を行い、一元配置分散分析とTukey-Kramer検定による多重検定比較を行い、コントロールウイルスとPKOウイルスにおけるデータを比較した。

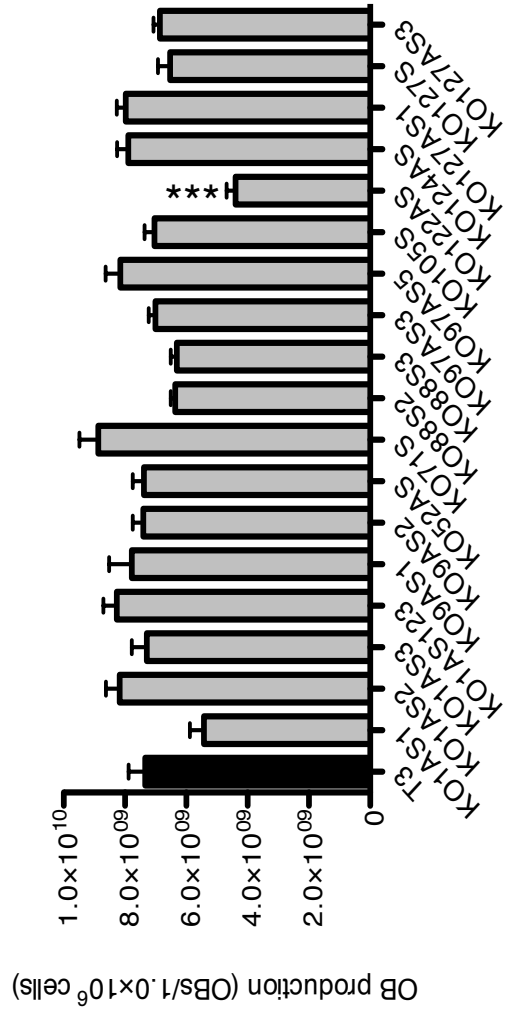
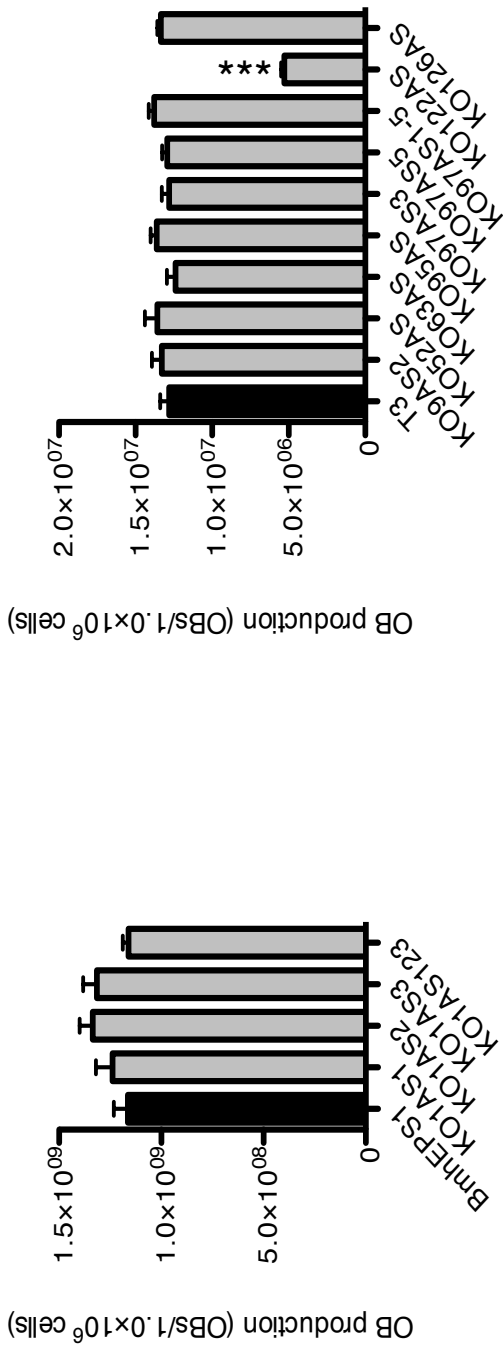


図7：PKOウイルス感染BmN細胞におけるOB産生量
 コントロールウイルス、およびPKOウイルスをBmN細胞に感染させ、4日後にOB産生量を測定した。感染実験は各ウイルス5反
 復行い、一元配置分散分析とTukey-Kramer検定による多重検定比較を行い、コントロールウイルスとPKOウイルスにおけるデー
 タを比較した。***はP値<0.001を示している。各グラフは独立して行った実験を示している。

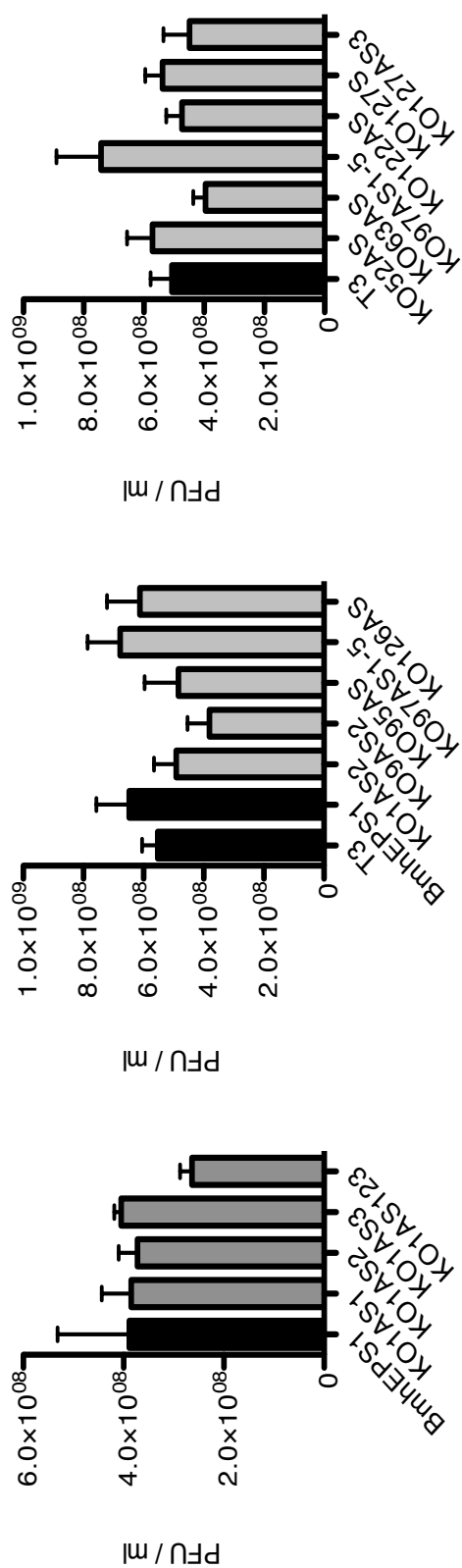


図8：PKOウイルス感染カイコ幼虫におけるBV産生量
 コントロールウイルス、およびPKOウイルスをカイコ5齢幼虫に感染させ、4日後に体液中のBV産生量を測定した。感染実験は各ウイルス5頭のカイコを用いて行った。一元配置分散分析とTukey-Kramer検定による多重検定比較を行い、コントロールウイルスとPKOウイルスにおけるデータと比較した。各グラフは独立して行った実験を示している。

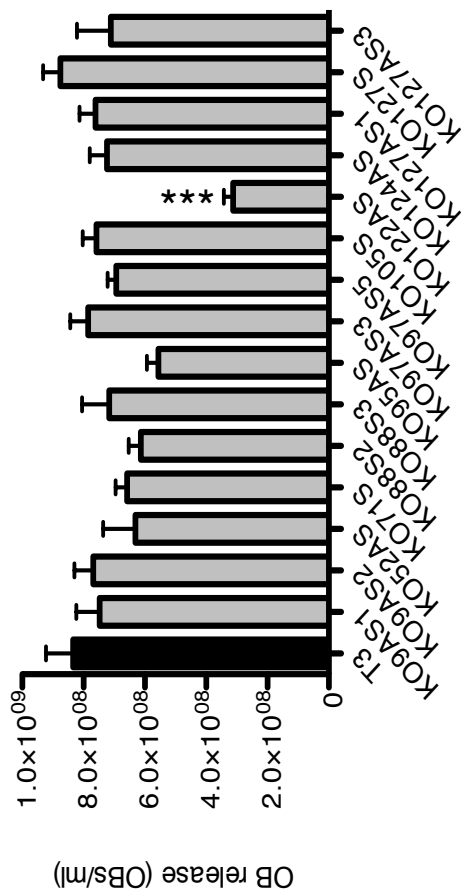
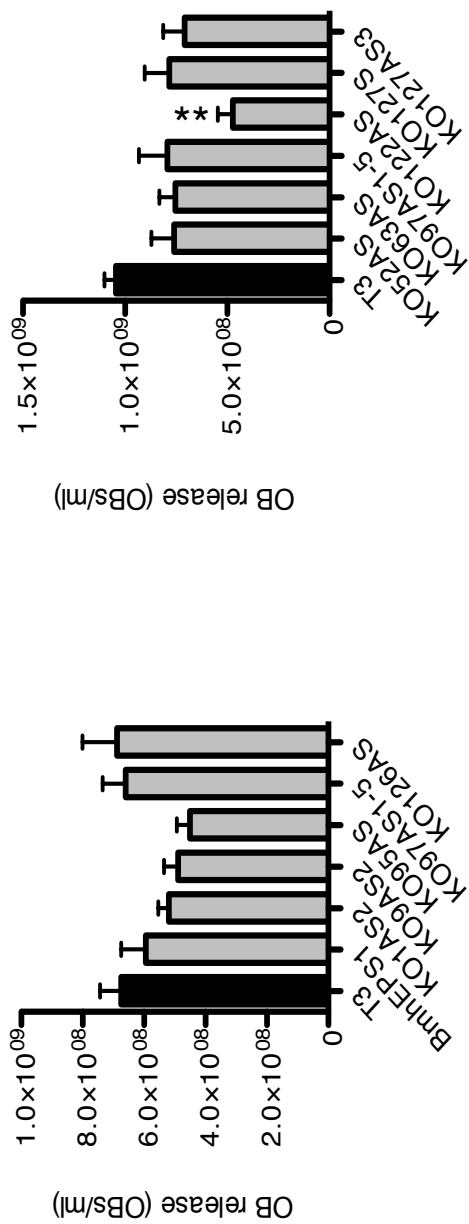


図9：PKOウイルス感染カイコ幼虫におけるOB放出量
 コントロールウイルス、およびPKOウイルスをカイコ5齢幼虫に感染させ、4日後に体液中のOB産生量を測定した。感染実験は各ウイルス5頭のカイコを用いて行った。一元配置分散分析とTukey-Kramer検定による多重検定比較を行い、コントロールウイルスとPKOウイルスにおけるデータを比較した。**はP値<0.01を、***はP値<0.001を示している。各グラフは独立して行った実験を示している。

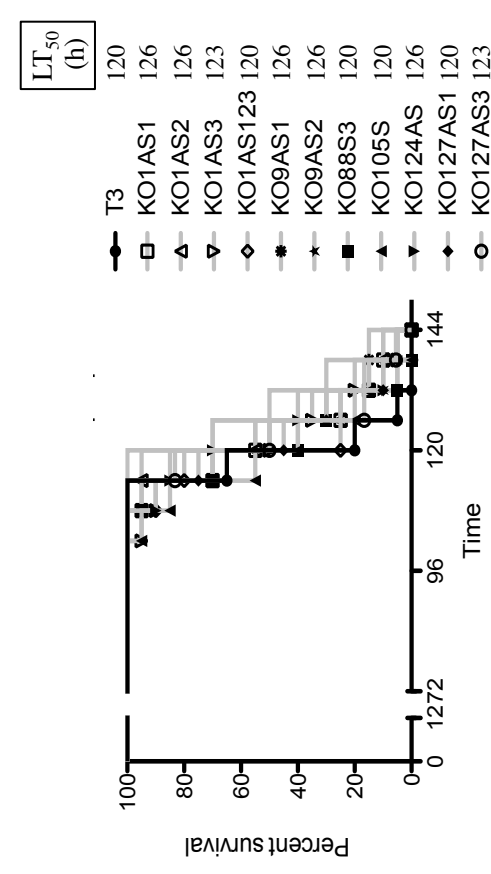
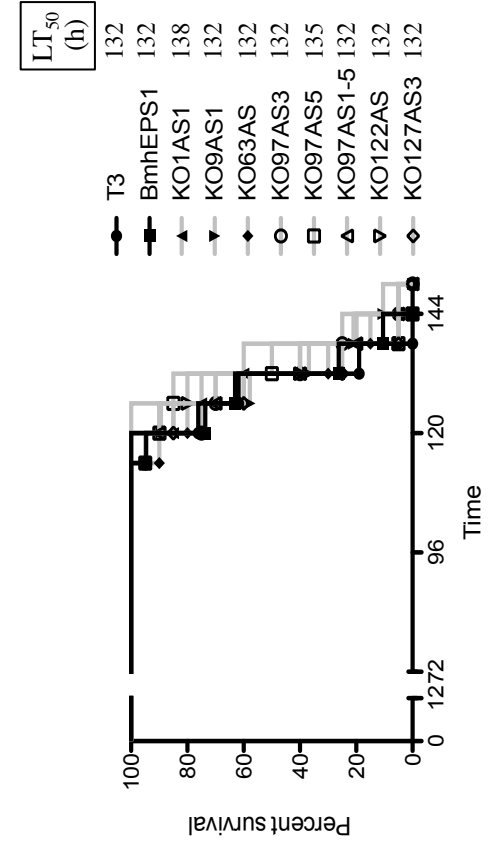
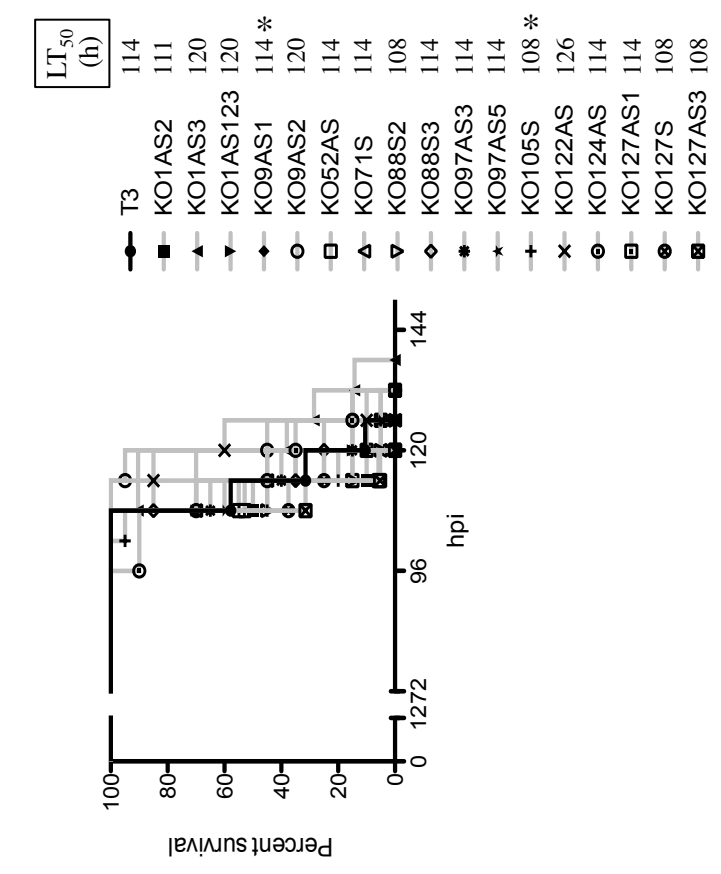
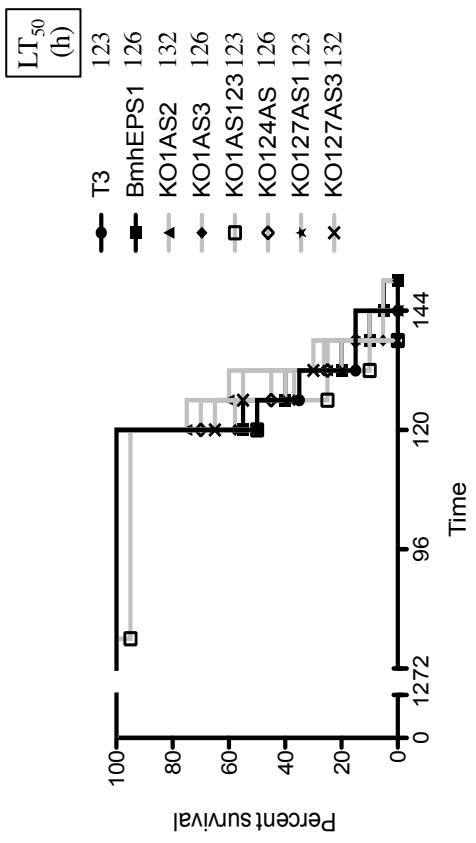


図10-1：PKOウイルス感染カイロ幼虫の生存曲線

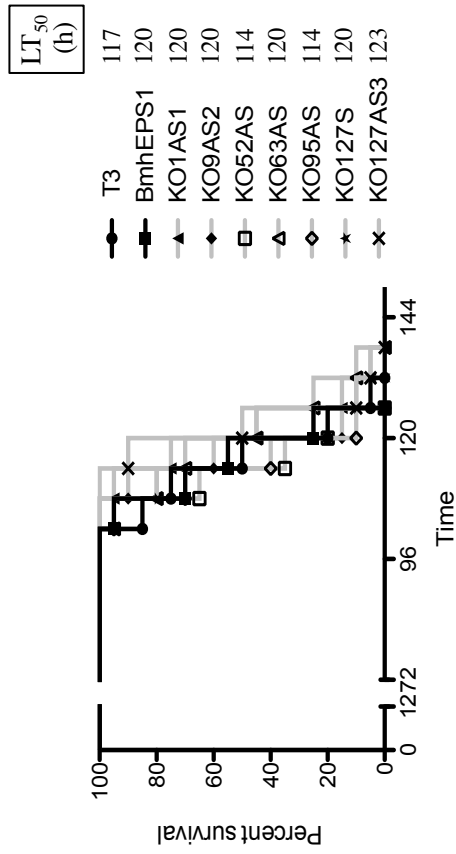
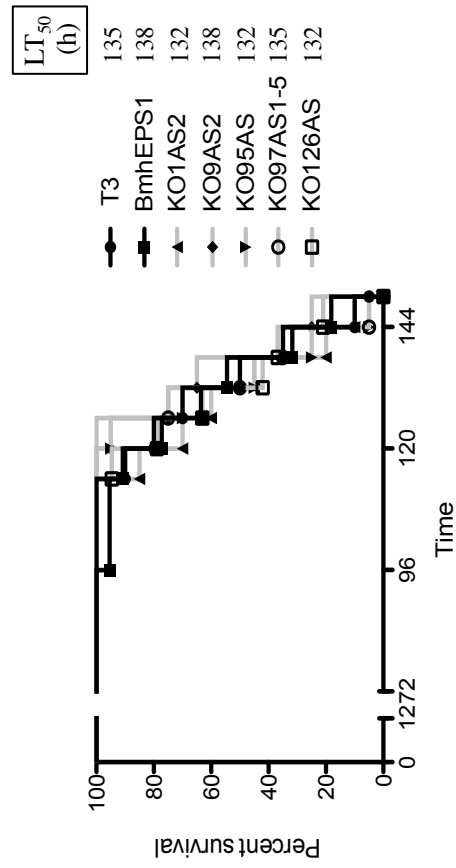


図10-2 : PKOウイルス感染カイコ幼虫の生存曲線
 コントロールウイルス、およびPKOウイルスをカイコ5齢幼虫に感染させ、致死時間を測定した。感染実験は各ウイルスにつき20個体を用いた。感染カイコ幼虫のLT₅₀は、Gehan-Breslow-Wilcoxon検定によって、コントロールウイルスと比較した。*はP値<0.05を示している。各グラフは独立して行った実験を示している。

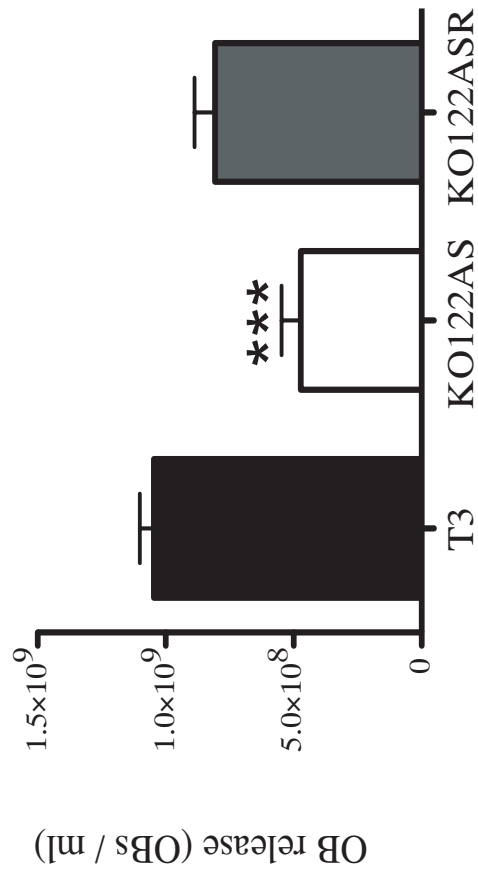
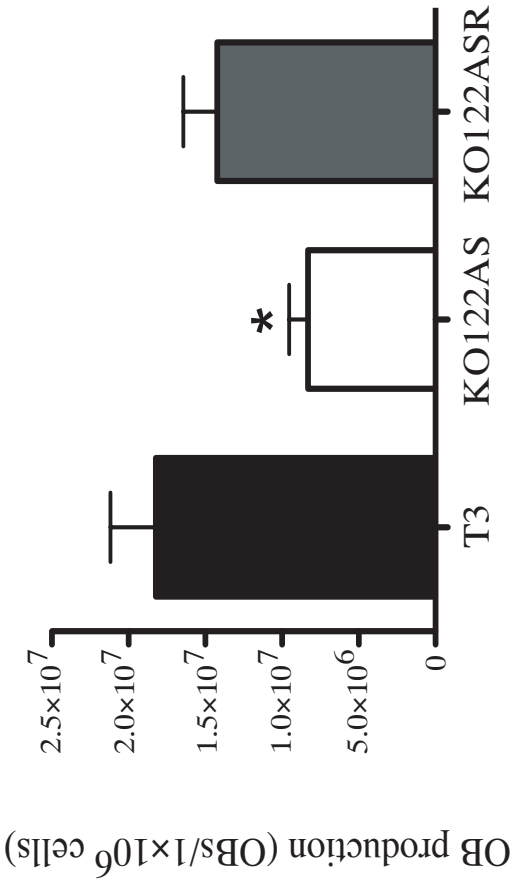


図11 : KO122AS、およびKO122ASR感染細胞、およびカイコ幼虫における多角体産生

(A) T3、KO122AS、およびKO122ASRを用いてBmN細胞におけるOB産生量を調査した。(B) T3、KO122AS、およびKO122ASRを用いてカイコ幼虫におけるOB産生量を調査した。*はP値<0.05を、***はP値<0.001を示している。(Ishihara et. al., 2015. Appl Entomol Zool. DOI 10.1007/s13355-014-0317-4.を改変使用)

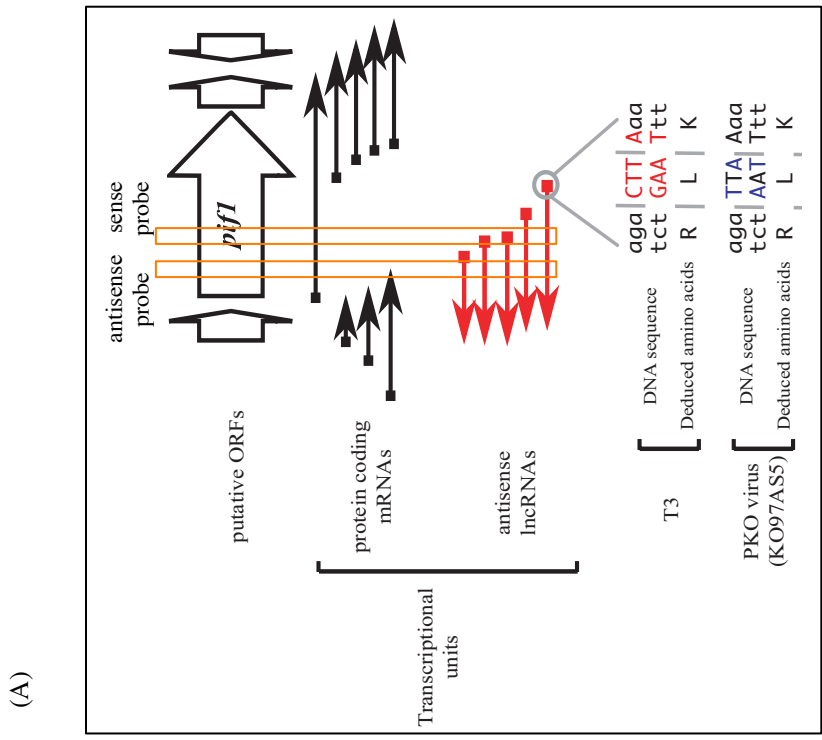
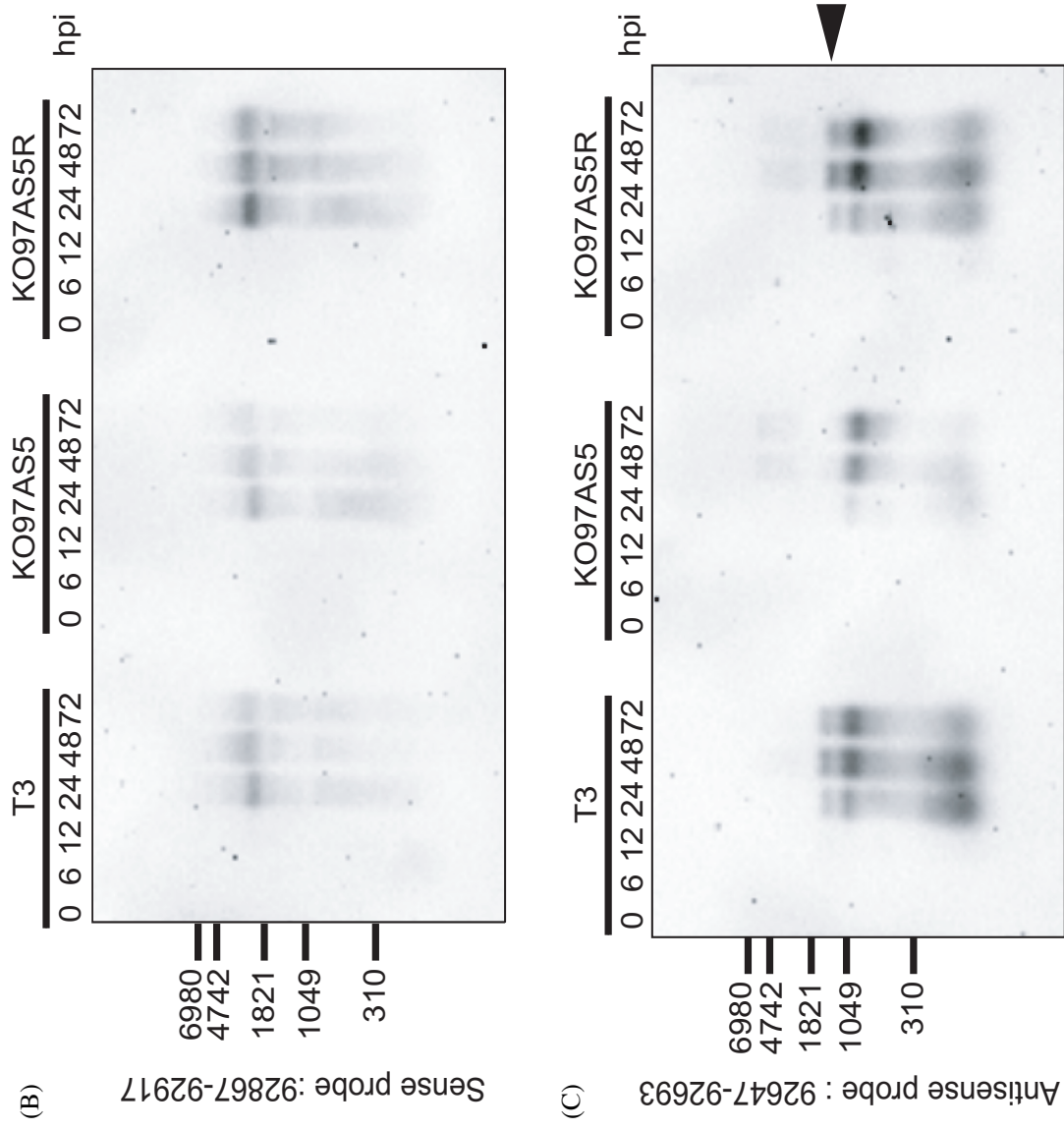
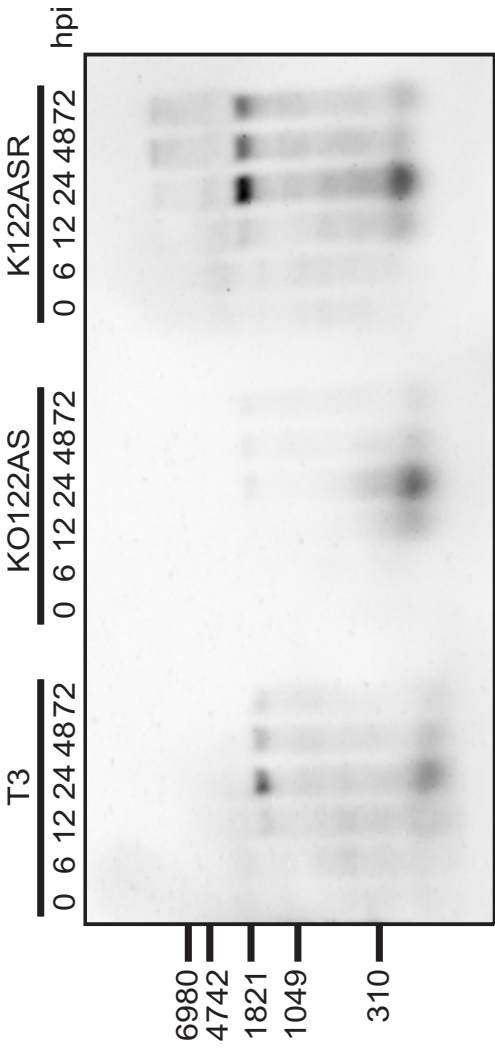
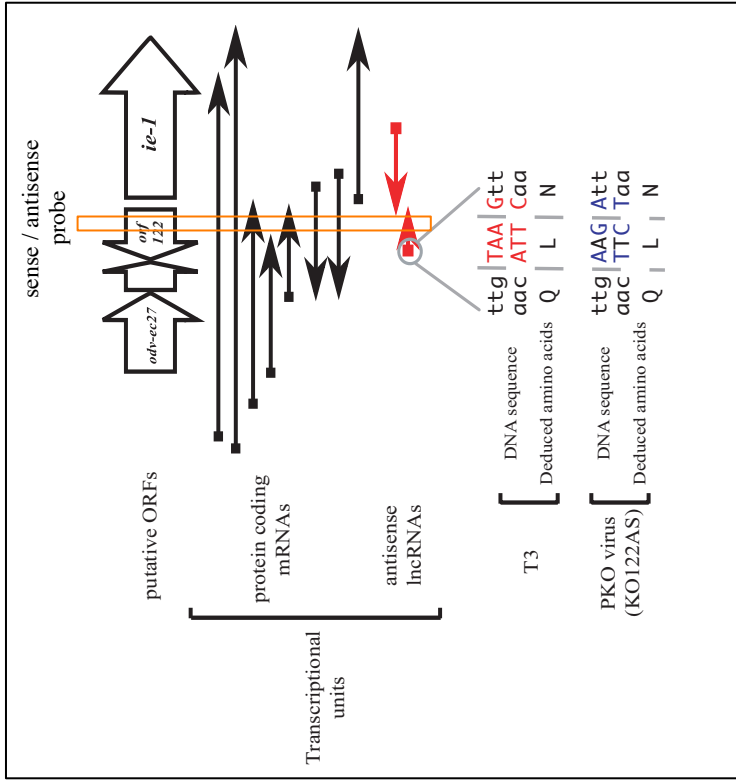


図12 : KO97AS5感染細胞を用いた*pif-1*、および*pif-1* lncRNAの発現解析 (A)*pif-1*領域における転写ユニットとKO95AS5の模式図を示した。用いたプローブの位置はオレンジのボックスで示している。T3、KO97AS5、およびKO97AS5R感染細胞を用いて (B) では、センスRNAを検出するノーザンブロットティングを (C) では、アンチセンスRNAを検出するノーザンブロットティングを行った。矢頭は欠失させたlncRNAのサイズを示している。(Ishihara et. al., 2015. Appl Entomol Zool. DOI 10.1007/s13355-014-0317-4.を改変使用)

(A)



(C)

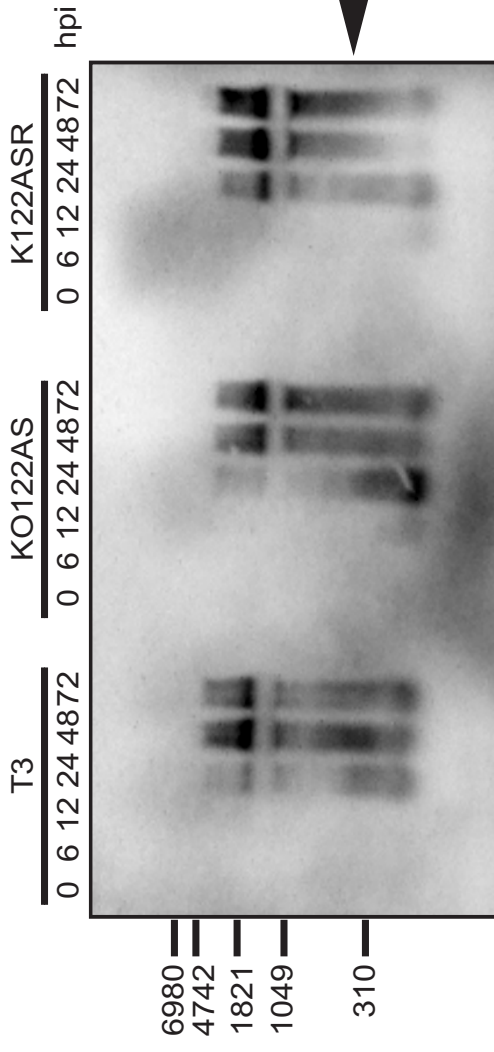
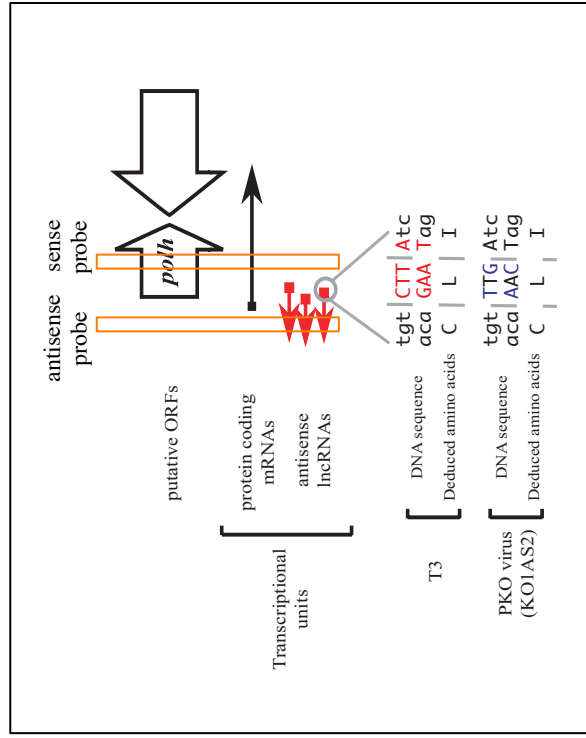


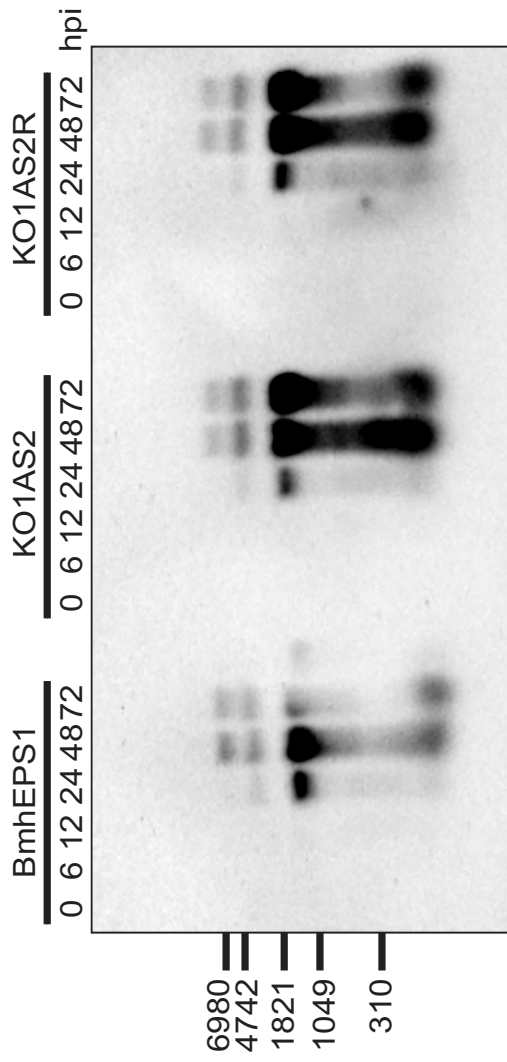
図13 : KO122AS感染細胞を用いた*BmI22*、および*BmI22* lncRNAの発現解析

(A) *BmI22*領域における転写ユニットとKO122ASの模式図を示している。用いたプローブの位置はオレンジのボックスで示している。T3、KO122AS、およびKO122ASR感染細胞を用いて (B) では、センスRNAを検出するノーザンブロットリングを (C) では、アンチセンスRNAを検出するノーザンブロットリングを行った。矢頭は欠失させたlncRNAのサイズを示している。KO122AS感染細胞において、変異導入によるlncRNAの欠失はつきりと確認できなかった。また、mRNAの発現量はT3、およびKO122ASR感染細胞と比較して減少していた。(Ishihara et. al., 2015. Appl Entomol Zool. DOI 10.1007/s13355-014-0317-4.を改変使用)

(A)



(B)



(C)

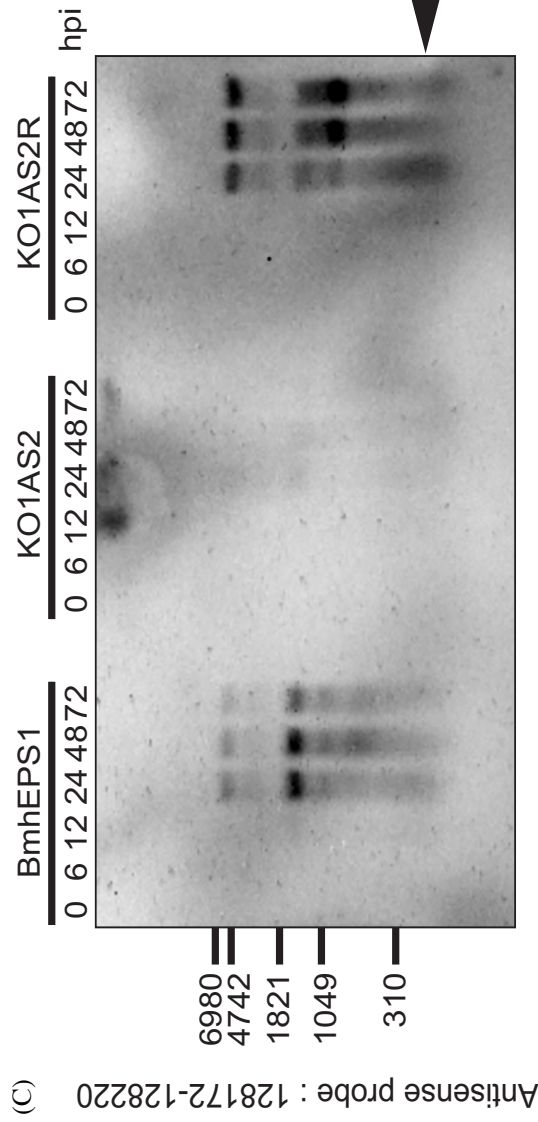
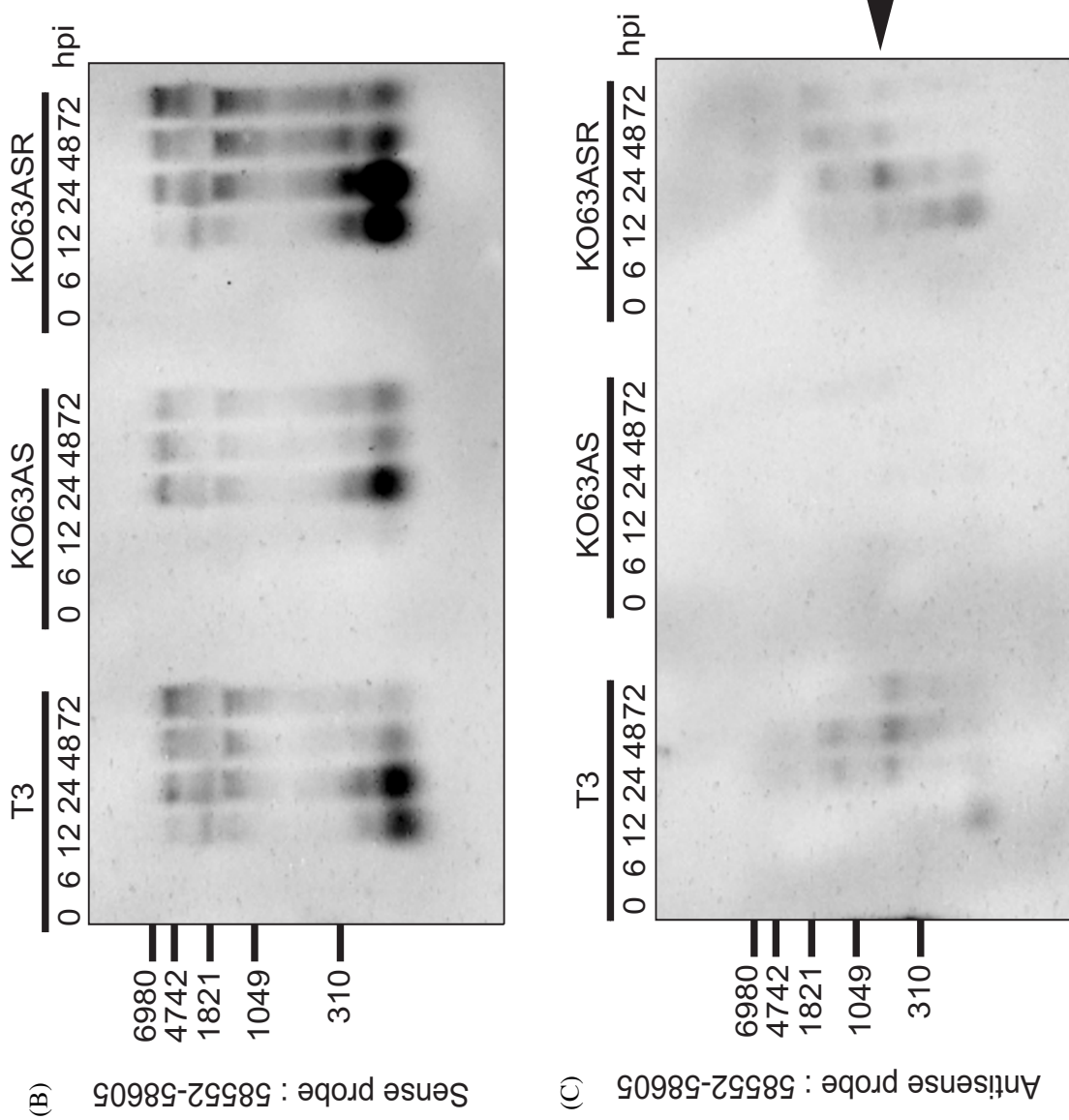


図14 : KO1AS2感染細胞を用いた*polh*、および*polh* lncRNAの発現解析

(A)*polh*領域における転写ユニットとKO1AS2の模式図を示している。用いたプローブの位置はオレンジのボックスで示している。BmhEPS1、KO1AS2、およびKO1AS2R感染細胞を用いて (B) では、センスRNAを検出するノーザンブロットイングを (C) では、アンチセンスRNAを検出するノーザンブロットイングを行った。矢頭は欠失をさせたlncRNAのサイズを示している。KO1AS2感染細胞において、変異導入によるlncRNAの欠失をはっきりと確認できなかったが、全てのアンチセンスRNAの転写が消失していた。また、mRNAの発現量はBmhEPS1、およびKO1AS2R感染細胞と同程度であった。



(A)

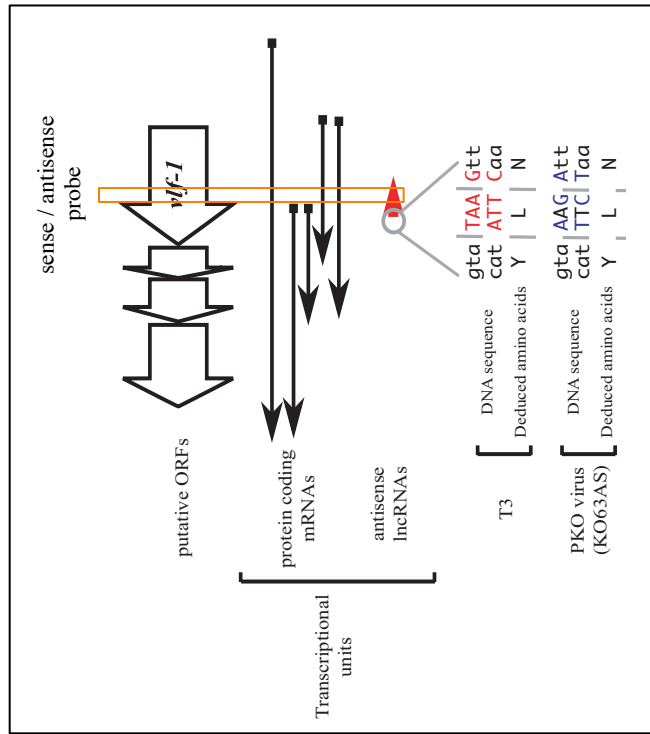


図15 : KO63AS感染細胞を用いた*vif-1*、および*vif-1* lncRNAの発現解析 (A)*vif-1*領域における転写ユニットとKO63ASの模式図を示している。用いたプローブの位置はオレンジのボックスで示している。T3、KO63AS、およびKO63ASR感染細胞を用いて (B) では、センスRNAを検出するノーザンブロットイングを (C) では、アンチセンスRNAを検出するノーザンブロットイングを行った。矢頭は欠失をさせたlncRNAのサイズを示している。KO63AS感染細胞において、変異導入によるlncRNAの欠失をはっきりと確認できなかったが、全てのアンチセンスRNAの転写が消失していた。また、mRNAの発現はT3、およびKO63ASR感染細胞と比較して遅延していた。

第2章 バキュロウイルスの経口感染に必須な lncRNA の機能解析

緒言

自然環境におけるバキュロウイルスの感染は、封入体を餌とともに摂食することから開始される。この感染経路を経口感染という（図2、3）。経口感染力が消失すると、実験室における培養細胞への感染やBVのカイコ幼虫への皮下注射実験においては影響が見られないが、自然環境中ではウイルスの伝播が不可能となる。NPVの経口感染経路は、①宿主幼虫がOBを食下する、②中腸で分泌されるアルカリ性の消化液によりOBが溶解し、中に含まれていたODVが中腸内に放出される、③放出されたODVが中腸細胞に吸着し、自身のエンベロープと細胞膜の間で膜融合を引き起こし細胞内へと侵入する、④中腸細胞から感染性のウイルスがトラキオブラストを介して他組織に移行し、BVを介した二次感染による全身感染が起きる、というものである（Keddie et al. 1989, Engelhard et al. 1994, Rohmann 2013）。しかしながら、詳細なメカニズムに関しては不明な点が多く残されている。

経口感染に関与する因子としては、*per os infectivity factors-1* (PIF-1) (BmNPVではBm97、AcMNPVではAc119に該当する。以下の標記も同じ。)、PIF-2(Bm13、Ac22)、PIF-3 (Bm95、Ac115)、PIF-4 (Bm79、Ac96)、ODV-E56 (PIF-5、Bm124、

Ac148)、PIF-6 (Bm56、Ac68)、P74 (Bm115、Ac138)、VP91 (Bm69、Ac83)、ODV-E66 (Bm37、Ac46)、Bm121 (Ac145)、および Bm126 (Ac150) が報告されており (表 8) (Rohmann. 2013)、これらの遺伝子の内、ODV-E66 と Bm126 以外のオーソログはすべてのバキュロウイルスに保存されている (Wang et al. 2007, Rohmann. 2013)。PIF-1、PIF-2、および P74 は中腸細胞へ ODV 粒子が直接結合するために必要な ODV の構造タンパク質であるが (Ohkawa et al. 2005, Haas-Stapleton et al. 2004)、PIF-3 は構造タンパク質であるが中腸細胞への結合には関与せず、その機能は不明である (Li et al. 2007, Ohkawa et al. 2005)。免疫沈降法を用いた結合実験 (Peng et al. 2010) とプロテオミクス解析 (Peng et al. 2012) により、PIF-1、PIF-2、PIF-3、P74、PIF-4、および VP91 は PIF 複合体を形成し、ODV のエンベロープに含まれることが示されている。ODV-E56 は PIF complex の構成因子ではないが、ODV エンベロープの構造タンパク質となっている (Braunagel et al. 1996, Peng et al. 2012)。遺伝子破壊カセットの挿入による *odv-e56* 領域の欠損ウイルスは経口感染力のみが消失するが、ODV の中腸細胞への結合には影響しないことが報告されている (Xiang et al. 2011b, Sparks et al. 2011a)。

一方、AcMNPV において、*gp64* 遺伝子の初期プロモーターから転写される mRNA

から翻訳されるタンパク質が経口感染に寄与することも報告されている (Washburn et al. 2003, Zhang et al. 2004)。GP64 は BV 粒子に含まれる構造タンパク質であり、細胞間の二次感染の際に必須なタンパク質である。バックミドシステムと遺伝子破壊カセットを用いて作成した *gp64* 欠損ウイルスゲノムをトランスフェクションによって培養細胞に導入すると、ウイルスゲノムが導入された細胞は感染が進行するが、新たな BV が放出されず、他の細胞に感染することない (Monsma et al.1996, Oomens and Blissard. 1999)。AcMNPV の *gp64* 遺伝子上流配列には複数のプロモーター配列 (1 つの初期プロモーターと 4 つの後期プロモーター) が存在している。Washburn らは、相同組換えによって *gp64* 初期プロモーターからの転写産物を欠損させた組換え AcMNPV を作製した。パルスチェイス実験の結果から、この初期産物が GP64 バリエントを産生していること、およびバイオアッセイによって *Heliothis virescens* (タバコガの一種) 4 齢幼虫における変異株の経口感染力が野生株の約 1/50 に低下することを示した (Washburn et al. 2003)。

本章では、第一章にて作成した PKO ウイルスを用いて、経口感染力に関与するバキュロウイルス由来の機能性 lncRNA の探索を行った。次に、経口感染実験の結果から同定された経口感染に必須な lncRNA について、それぞれを欠失した

PKO ウイルスを用いてその作用機序を調査した。

材料と方法

経口感染力（Lethal Concentration, 50%;LC₅₀）の測定

経口感染実験に使用した OB は、カイコ 5 齢幼虫に T3、BmhEPS1、および PKO ウイルスを注射感染し、4 日後の感染幼虫から回収した体液を、蒸留水で二回、1% SDS 溶液で一回、蒸留水で一回洗浄したものを使用した。OB は蒸留水に懸濁後、血球計算盤（NanoEnTek）を用いて濃度を測定した。LC₅₀を測定するための経口感染実験は、経口感染力が消失した変異導入ウイルスにおいては 1×10^8 、 5×10^7 、 1×10^7 、 5×10^6 、 1×10^6 OB/ml の濃度、他のウイルスにおいては 1×10^6 、 5×10^5 、 1×10^5 、 5×10^4 、 1×10^4 OB/ml の濃度を、9 cm² の面積へ広げた人工飼料へ滴下し、カイコ 5 齢起蚕幼虫 20 個体に与えることで行った。ウイルス接種 7 日後に死亡幼虫数を測定し、R コードを用いて probit 分析を行い LC₅₀ を算出した。

変異ウイルスの BmN 細胞への感染実験

BmN 細胞を用いた感染実験は、第一章に準じて行った。

変異ウイルスのカイコ 5 齢幼虫への皮下接種実験

カイコ 5 齢幼虫への変異ウイルスの皮下接種実験は、第一章に準じて行った。

ノーザンブロットイング

第一章に準じて行った。

低分子 RNA のノーザンブロットイング

ウイルス非感染 BmN 細胞と、T3、KO124AS、および KO95AS 感染 48 時間後の BmN 細胞から、mirVana™ miRNA Isolation Kit (Ambion) を用いて低分子 RNA を抽出し、各レーン 1 μg の RNA を 15%ウレア変性ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動した。泳動した RNA はセミドライブロッターによって Amersham Hybond™ -N⁺ (GE healthcare) にトランスファーを行い、UV クロスリンクによって固定した。DIG ラベリングした RNA プローブは、e56AS F と T7 e56AS R プライマーにより *odv-e56* アンチセンス lncRNA 領域を PCR 法で増幅した DNA 断片、または pif3AS F と T7 pif3AS R プライマーにより *pif-3* アンチセンス lncRNA 領域を増幅した PCR 断片をテンプレートにして、DIG RNA Labeling Mix (Roche) 及び T7 RNA polymerase (Roche) を用いて合成した。ハイブリダイゼーションと検出反応は第一章と同様に行った。また、低分子 RNA のコントロールとして miRNA として知られる *let-7* 配列 (Liu et al. 2007) に対するオリゴヌクレオチドプローブを作成し、検出した (表 5)。

ODV-E56 抗体の作成

ODV-E56 の N 末端から 318 アミノ酸残基分に相当する塩基配列を pcold-1 ベクター（タカラバイオ）へクローニングした。完成したプラスミドは大腸菌 BL21 株へ形質転換し、1 mM IPTG 存在下、16°C で 48 時間発現誘導を行った。発現したタンパク質は HIS Gravi-trap（GE）によるアフィニティー精製と Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes（Pierce）を用いた透析を行い、抗体作成用の抗原とした。抗原は抗 HIS 抗体を用いたウエスタンブロッティングによる確認をした後に、ウサギへの免疫を外部委託し（Sigma）、抗 ODV-E56 抗血清を得た。抗 ODV-E56 抗血清は Ab-Rapid PuRe 2（Protenova）を用いて精製し、IgG 画分にしたものを抗 ODV-E56 抗体として使用した。

ウエスタンブロッティング

T3 及び変異導入ウイルス感染細胞は、サンプルバッファー（62.5 mM Tris-HCl pH6.8、2% SDS、10% Glycerol、0.01% ブロモフェノールブルー、5% 2-メルカプトエタノール）を用いて溶解し、1 レーン当たり 1×10^4 個の細胞に由来するタンパク質をサンプルとして用いた。

ウイルス感染カイコ幼虫より回収した OB（ 1×10^8 OBs）を 1 ml DAS バッファ

ー (0.1 M Na₂CO₃、 166 mM NaCl、 10 mM EDTA; pH 10.5) で OB を溶解した後に遠心分離を行い、ODV 粒子を精製した。ODV 粒子は RIPA バッファー (25 mM Tris-HCl pH 8.0、 150 mM NaCl、 1% NP-40、 1% sodium deoxycholate) で溶解後、Pierce® BCA™ Protein Assay Kit (Pierce) を用いてタンパク濃度を測定し、1 レーン当たり 250 μg の ODV 粒子由来タンパク質をサンプルバッファーに溶解し、サンプルとした。

タンパク質サンプルは、13% ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動で分離し、セミドライプロッターで PVDF 膜に転写した。転写した PVDF 膜は、ブロックエース (DS ファーマバイオメディカル) でブロッキングした。ODV-E56 タンパク質の検出には、一次抗体反応に抗 ODV-E56 抗体:ブロックエース (1:1000) 溶液、二次抗体反応に Rabbit 抗体:TBS-T (1:25000) 溶液を用いた。

PIF-1 タンパク質の検出には、一次抗体反応に抗 PIF-1 抗体:ブロックエース (1:1000) 溶液、二次抗体反応に Rat 抗体:TBS-T (1:2500) 溶液を用いた。PIF-3 タンパク質の検出には、一次抗体反応に抗 PIF-3 抗体:ブロックエース (1:1000) 溶液、二次抗体反応に Rat 抗体:TBS-T (1:2500) 溶液を用いた。抗 PIF-1 抗体、および抗 PIF-3 抗体は、オランダ Wageningen 大学の Monique van Oers 博士より供与いただいた (Peng et al. 2010)。検出試薬には、Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) を使用した。

カイコ 5 齢幼虫への経口感染実験

カイコ 5 齢幼虫に対する経口感染実験は、5 齢起蚕 12 時間以内のカイコ幼虫へ 1 匹あたり 1×10^7 OB を含む 10%スクロース液 $3 \mu\text{l}$ をピペットマンで経口投与した。実験に用いた OB は前述と同様の処理を行った。

経口感染カイコにおける血中 BV 量の測定

経口感染 72 時間後のカイコ 5 齢幼虫から体液をサンプリングし、第一章の方法に準じてプラークアッセイを行い、血中 BV 量を測定した。

経口感染カイコ中腸内のウイルスゲノムの qPCR

経口感染 6、12、18、24、48、72 時間後のカイコ幼虫の中腸から DNA を抽出した。中腸組織の DNA は、サンプリングした組織をホモジナイズし、Protease K 処理によるタンパク質分解を行った後にフェノール・クロロホルム処理を行うことで抽出した。抽出した DNA の濃度を測定し、50 ng の DNA をテンプレートとして KAPA SYBR Fast qPCR Kit (Kapa biosystems) と polh F と polh R プライマーを用いた qPCR によってウイルスゲノム量を調査した。得られた値は、カイコの *BmAgo3* 領域を増幅する ago3 F と ago3 R プライマーを用いた qPCR によっ

て得られた値を用いて補正をした（表 9）。

ウイルス感染中腸の RNA シークエンシング

経口感染 24、48 時間後のカイコ幼虫の中腸から Trizol Reagent (Invitrogen) を用いて total RNA を抽出した。抽出した RNA の一部の逆転写を行い、KAPA SYBR Fast qPCR Kit (Kapa biosystems) と polh F と polh R プライマー、または gp64 F と gp64 R プライマー（表 9）を用いた qPCR によって、各サンプルにおけるウイルス感染や RNA の品質確認を行った。その後、イルミナ社 HiSeq 2500 を用いた RNA シークエンシングを行った。RNA シークエンシングは、東京大学大学院 新領域創成科学研究科鈴木穰教授、菅野純夫教授にご協力頂いた。

RNA シークエンスデータの配列解析

T3 ウイルスの全長配列から切り出した ORF の配列に対し、10 ライブラリーのリードを TopHat2 を使用してミスマッチ 2 許容、マルチマップ非許容でマッピングした (Kim et al. 2013)。そして、それぞれの ORF における発現量を調査するため、マッピングの結果得られたリードカウント（マップされたリード数ではない）を、それぞれのライブラリーの総リード数を使用して補正して RPKM 値を算出した。得られた RPKM 値に 0 が存在すると、後に行う解析において対

数を用いた計算が出来ないことから、算出した RPKM 値の 0.001 未満の値にダイナミックレンジを考慮して 0.001 を代入した。次に、底 2 で log を取った値を使用して、クラスタリング及びヒートマップの描画を行った。クラスタリングには R コード `hclust` を使用し、距離の算出にはピアソンの相関係数を使用した ((1-相関係数) で距離に変換)。heatmap の描画には R パッケージである `gplots` に含まれる `heatmap2` を使用した。シーケンスデータの解析は、東京大学大学院 昆虫遺伝研究室 学術支援専門職員の川本宗孝氏にご協力頂いた。

ODV-E56 タンパク質欠損ウイルス (ODV-E56 stop) の構築

第一章において作成した BmNPV T3 株ゲノム 117,498-121,145 領域を含む pcDNA-odve56 (表 4) をテンプレートにして、KOD-plus-Mutagenesis Kit (TOYOBO) を用いて ODV-E56 の N 末端から 3 番目のアミノ酸であるフェニルアラニンのコドン配列 TTT に対して点変異を導入し終止コドン配列 TAA とすることで、ODV-E56 タンパク質を欠損させる組換えトランスファーベクターを作成し、pmODV-E56 stop と命名した。作成した pmODV-E56 stop と、制限酵素 *Bsu36I* 処理によって直鎖状にした Bm124D (図 16) のウイルスゲノム DNA をコトランスフェクションすることで ODV-E56 タンパク質を欠損したウイルスを作成した。ODV-E56 タンパク質欠損ウイルスは、第 1 章に準じた手法で純化を行

い、ODV-E56 stop と命名した (図 17)。本章で使用したプライマーのリストは表 9 に、作成したプラスミドのリストは表 10 に記した。

***odv-e56* アンチセンス lncRNA プロモーター導入ウイルスの構築**

長さの異なる *odv-e56* アンチセンス lncRNA を復帰させるために ODV-E56 タンパク質のアミノ酸配列を変化させないように、後期プロモーター配列 TAAG を導入した組換えウイルスを 4 つ作成した (図 18)。最初に *odv-e56* アンチセンス lncRNA 配列内及び、近傍領域の配列においてアミノ酸配列を変異させることなく、後期プロモーター配列 TAAG への置換が可能な配列を探索した。BmNPV T3 118,963 塩基の A を G に置換することで野生型の *odv-e56* アンチセンス lncRNA プロモーターより 151 塩基長い *odv-e56* アンチセンス lncRNA を、BmNPV T3 119,260 塩基の G を A に置換することで野生型より 146 塩基短い *odv-e56* アンチセンス lncRNA を、BmNPV T3 119534 塩基の A を G に置換することで野生型より 420 塩基短い *odv-e56* アンチセンス lncRNA を、BmNPV T3 120,066 塩基の T を G に、120,068 塩基の T を G に置換することで野生型より 952 塩基短い *odv-e56* アンチセンス lncRNA を転写するプロモーター配列を導入できる事が判明した。そこで、それら 4 ヶ所の塩基配列に変異導入を行うため、*odv-e56* 領域における PKO ウイルスを構築する際に構築した組換えトランスファーベクターである

pmKO124AS(表4)をテンプレートとして、KOD-plus-Mutagenesis Kit (TOYOBO)を用いた塩基置換を行った。作成した4つの組換えトランスファーベクターをpmKO124ASR+151、pmKO124ASR-146、pmKO125ASR-420、およびpmKO124ASR-952と命名した(表10)。*odv-e56* アンチセンス lncRNA プロモーター導入ウイルスは第1章の手法と同様に準じて、組換えトランスファーベクターと制限酵素 *Bsu36I* 処理によって直鎖化した Bm124D ウイルスゲノム DNA をコトランスフェクションして作成した。各ウイルスは KO124ASR+151、KO124ASR-146、KO124ASR-420、および KO124ASR-952 と命名した(図18)。

***pif-3* アンチセンス RNA に予測されるペプチドを欠失した変異導入ウイルス**

pif-3 アンチセンス lncRNA において 81 アミノ酸残基のペプチドを欠失させるために、BmNPV T3 ゲノムの 91,999 塩基に存在する開始コドン ATG を AGG に変更することでペプチドを欠失した変異導入ウイルスを作成した。第一章において作成した BmNPV T3 株ゲノムの 90,068–93,022 塩基の領域を含む遺伝子断片を pcDNA3.1 (-) ベクター (Invitrogen) ヘクローニングした pcDNA-*pif3* (表4) をテンプレートに、KOD-plus-Mutagenesis Kit (TOYOBO) を用いて ATG を AGG へ置換した組換えトランスファーを構築し、pm-*pif3AS* peptide stop と命名した

(表 10)。pm-pif3AS peptide stop と制限酵素 *Bsu36I* 処理によって直鎖状にした Bm95D ウイルスゲノム DNA をコトランスフェクションすることで *pif-3* アンチセンス lncRNA に予測されるペプチドを欠失したウイルスを作成した。作成したウイルスは、第 1 章に準じた手法で純化を行い、pif3 AS peptide stop と命名した。

結果

PKO ウイルスの経口感染力の調査

バキュロウイルスゲノムから転写される lncRNA が経口感染に関与しているかどうか調査するため、第一章で作成した PKO ウイルスとカイコ 1 齢幼虫を用いて LC₅₀ の測定を行った (表 11)。その結果、コントロールウイルスと比較して KO95AS、KO105S、および KO124AS において経口感染力がほぼ消失することが認められた (表 11)。

KO105S は、*gp64* の初期プロモーターから転写されているセンス RNA を消失したウイルスである。完全長 cDNA ライブラリーを用いたシーケンシングでは、シーケンス時に用いる Oligo (dT)プライマーの結合部位により、正確な 3' 末端配列を決定できていない可能性が考えられる (Katsuma et al. 2011)。今回行った lncRNA 候補転写ユニット選抜では、センス RNA であっても 3' 末端が ORF 内にあるような完全に ORF を含まない転写ユニットを含めて選抜している。この *gp64* 初期プロモーター配列から転写されるセンス RNA は、AcMNPV において GP64 タンパク質を翻訳し、経口感染に寄与することが報告されていることから (Washburn et al. 2003)、BmNPV においても同様に lncRNA ではなくタンパク

質をコードしていることが考えられた。そこで、以降の解析では KO124AS と KO95AS に着目して解析を行うこととした。

***odv-e56* 領域から転写されるアンチセンス lncRNA の機能解析**

1. 培養細胞及び、カイコ幼虫における KO124AS の性状解析

KO124AS は *odv-e56* 領域内の BmNPV ゲノム 119,112 塩基 から転写されている 1,473 塩基のアンチセンス lncRNA を欠失させた PKO ウイルスである (図 22A)。

この lncRNA の経口感染における役割を調査するため、BmN 細胞とカイコ幼虫を用いた KO124AS の性状解析を行った。解析にはリバータントウイルス KO124ASR も使用した (表 2)。

最初に、BmN 細胞への感染実験を行った。T3、KO124AS、および KO124ASR ウイルスは BmN 細胞へ MOI = 5 で感染させた。BmN 細胞は感染 96 時間後に回収し、BV 産生量と OB 産生量を測定した。その結果、KO124AS ウイルスは BV 産生量、OB 産生量ともに T3、または KO124ASR と同程度であった (図 19)。

次に、カイコ 5 齢起蚕幼虫を用いた経皮接種による感染実験を行った。T3、KO124AS、および KO124ASR はカイコ幼虫へ 1 匹あたり 1×10^5 PFU のウイ

ルス液を皮下感染させた。カイコ幼虫から感染 96 時間後に体液を回収し、BV 産生量と OB 放出量を測定した。その結果、KO124AS 感染幼虫において BV 産生量、OB 放出量ともに、T3 感染カイコ幼虫、KO124ASR 感染カイコ幼虫と同程度であった (図 20)。さらに、KO124AS の病原性への影響を調査するために感染カイコ幼虫の LT_{50} を調査した。その結果、KO124AS 感染カイコは致死時間においても、T3、および KO124ASR 感染カイコ幼虫と同様の結果であった (図 21)。

最後に、T3、KO124AS、および KO124ASR ウイルスと 1 齢幼虫を用いて LC_{50} を再確認した。KO124AS においては経口感染力が消失していたが、KO124ASR は T3 と同程度の経口感染力が認められ、経口感染力の復帰が確認された。この結果から、*odv-e56* 領域から転写されているアンチセンス lncRNA が経口感染力の消失に関与していることが明らかになった (表 12)。

2. ノーザンブロッティングによる *odv-e56* アンチセンス lncRNA、*odv-e56* mRNA、および *odv-e56* 領域の miRNA の発現解析

odv-e56 アンチセンス lncRNA のノックアウトが対応する *odv-e56* mRNA に対して影響を与えているかどうかを調査するため、オリゴヌクレオチドプローブを

用いた鎖特異的なノーザンブロッティングを行った。その結果、KO124AS 感染細胞において、変異導入によってアンチセンス lncRNA が欠失していることが確認された (図 22C)。また mRNA においては T3、および KO124ASR と比較して *odv-e56* mRNA の発現量には影響が見られなかった (図 22B)。

バキュロウイルスゲノムからは非コード RNA の一種である miRNA が発現し、機能していることが知られている (Singh et al. 2010, Singh et al. 2012, Zhu M et al. 2013, Singh et al. 2014)。*odv-e56* アンチセンス lncRNA が miRNA 前駆体として転写され、最終的に miRNA を産生することで機能を果たしているかどうか調査するために、ウイルス非感染の BmN 細胞と T3、および KO124AS 感染細胞から低分子 RNA を抽出し、低分子 RNA のノーザンブロッティングを行った。*odv-e56* アンチセンス lncRNA が miRNA の前駆体として転写され、最終的に miRNA となっている場合には、T3 感染細胞においてのみ 21 から 25 塩基の範囲に特異的なシグナルが検出されると予想される。コントロールプローブの *let-7* プローブにおいては、非感染細胞、T3、および KO124AS 感染細胞において 21 nt 付近のサイズにシグナルが検出されたが、*odv-56* アンチセンス lncRNA を検出するリボプローブを用いた場合は T3 感染細胞に特異的なシグナルが検出できなかった (図 23)。このことから *odv-e56* アンチセンス lncRNA が miRNA 前駆体ではな

いと考えられた。

3. ウェスタンブロッティングによる ODV-E56 タンパク質の発現解析

odv-e56 アンチセンス lncRNA のノックアウトが、対応する ODV-E56 タンパク質の翻訳や、ODV 粒子への含有量へ影響を与えるかどうか調査するために、抗 ODV-E56 抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。ウイルス非感染の BmN 細胞、T3 感染細胞、KO124AS 感染細胞、KO124ASR 感染細胞、Bm124D 感染細胞、および Bm124D のリバータントウイルス KO124ASR 感染細胞と、抗体作成の際に使用した ODV-E56 抗原をサンプルとして、抗 ODV-E56 抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。T3 および変異ウイルス感染細胞は、感染 96 時間後のサンプルを使用した。その結果、ウイルス非感染の BmN 細胞と ODV-E56 タンパク質を欠失している Bm124D 感染細胞においてシグナルが検出されず、KO124AS 感染細胞、KO124ASR 感染細胞、KO124ASR 感染細胞、ODV-E56 抗原において特異的なシグナルが検出された (図 24A)。このことから作成した抗 ODV-E56 抗体が ODV-E56 を検出していることが確認された。ODV-E56 のアミノ酸配列から予測される分子量である 41.3 kDa にメインシグナルが検出されたが、それ以外の分子量のマイナーシグナルが複数検出された (図 24A)。このことから ODV-E56 タンパク質は何らかの修飾、プロセッシングや分

解を受けている可能性が考えられた。次に、感染 0、6、12、24、48、および 72 時間後の T3、KO124AS、KO124ASR 感染細胞に対してウエスタンブロッティングを行い、感染経時的な ODV-E56 タンパク質の発現量を調査した (図 24B)。その結果、ODV-E56 タンパク質はウイルス感染 24 時間後までには検出レベルに達し、KO124AS における発現パターンは、T3、および KO124ASR と差異が認められなかった。この結果から、*odv-e56* アンチセンス lncRNA は ODV-E56 タンパク質の翻訳や安定性の向上には関与していないことが示唆された。

ODV-E56 タンパク質は ODV の構造タンパク質であることから (Braunagel et al. 1996)、*odv-e56* アンチセンス lncRNA が ODV-E56 タンパク質の ODV 粒子へのリクルートに寄与しているかどうかを調査した。T3、KO124AS、KO124ASR、Bm124D、および Bm124D の ODV 粒子を多角体から精製し、それぞれ 250 μ g の ODV 粒子を用いてウエスタンブロッティングを行った。その結果、KO124AS の ODV 粒子においても T3、および KO124ASR と同様 ODV-E56 のシグナルが検出された (図 25)。このことから *odv-e56* アンチセンス lncRNA は ODV-E56 タンパク質の ODV 粒子への含有には影響を与えないことが示唆された。

4. *odv-e56* アンチセンス lncRNA の経口感染感染プロセスにおける役割

odv-e56 アンチセンス lncRNA が経口感染のどの段階で寄与しているのかを解明するために、多角体を投与した 5 齢カイコ幼虫を用いた調査を行った。最初に、経口感染後、BV が血体腔へ放出されているかどうかを調査するため、T3、KO124AS、KO124ASR、Bm124D、および Bm124DR 由来の多角体を経口投与し、感染 3 日後に感染幼虫から体液を回収し、プラークアッセイで BV 産生量を測定した。その結果、KO124AS、および Bm124D 感染幼虫の体液からは感染性 BV が全く検出されなかった (図 26)。このことから、KO124AS 感染において血体腔への BV の放出が行われていないことが明らかになった。

次に、KO124AS 由来の多角体を経口投与した場合、感染幼虫の中腸細胞においてウイルスゲノムの複製が行われているかを調査するため、各ウイルスを経口感染させた 5 齢幼虫の中腸、およびウイルス非感染のカイコ 5 齢幼虫の中腸から DNA を抽出し、qPCR を用いてウイルスゲノム量を調査した。その結果、T3、KO124ASR、および Bm124DR 経口感染カイコにおいてウイルスゲノム量の増加を認めることが出来たが、KO124AS、および Bm124D 感染中腸ではウイルスゲノムの増加が認められなかった (図 27)。この結果から、KO124AS を経口感染させたカイコ幼虫の中腸細胞において、ウイルスゲノムの複製が行われていないことが明らかになった。

最後に、経口感染における中腸細胞でのウイルス遺伝子の転写を調査するために、T3、KO124AS、および Bm124D を経口感染し 24、48 時間後の中腸から RNA を抽出し、RNA シークエンシングを行った。得られたリードを、BmNPV ゲノムへマッピングした後に、各ウイルス間におけるウイルス遺伝子発現量の比較を行った。その結果、KO124AS、および Bm124D 感染中腸においてはウイルス遺伝子の発現が全く認められなかった (図 28)。この結果から、KO124AS は経口感染時において、ウイルスキャプシドの中腸細胞内への侵入が達成されず、遺伝子発現およびゲノム複製が行われていないことが示唆された。

5. ODV-E56 stop ウイルスを用いた解析

本研究で得られた結果と、現在まで AcMNPV および BmNPV の *odv-e56* 領域について報告されている知見から (Xiang et al. 2011b, Spark et al. 2011a)、*odv-e56* 遺伝子領域を遺伝子破壊カセットの挿入により欠損させることにより *odv-e56* mRNA、ODV-E56 タンパク質、および *odv-e56* アンチセンス lncRNA の 3 つをすべて欠失した変異ウイルス (BmNPV の場合は本研究で用いている Bm124D) と、*odv-e56* アンチセンス lncRNA のみを欠失した KO124AS の表現型が同じであることがわかった。すなわち、双方の変異ウイルスともに培養細胞やカイコ幼虫

での経皮感染におけるウイルス増殖や病原性には影響無く、経口感染力の消失のみが観察される。この結果は、*odv-e56* アンチセンス lncRNA のみが経口感染力に必須であり、ODV-E56 タンパク質自体は経口感染に必須でない可能性を示している。そこで、*odv-e56* mRNA、および *odv-e56* アンチセンス lncRNA はともに転写されるが、ODV-E56 タンパク質は翻訳されないようなウイルスである ODV-E56 stop を構築した。ODV-E56 stop は ODV-E56 の 3 番目のアミノ酸であるフェニルアラニンをストップコドンに変異を入れたウイルスである。この ODV-E56 stop の経口感染力を調査することで、ODV-E56 タンパク質自体が経口感染力に寄与しているかを明らかにすることができる。ODV-E56 stop 感染細胞と ODV 粒子を用いたウエスタンブロットティングの結果、ODV-E56 タンパク質のシグナルが全く検出されなかったことから、ストップコドンの導入によって ODV-E56 タンパク質が全く産生されないことが確認された (図 30)。また、ODV-E56 stop 感染細胞を用いたノーザンブロットティングの結果、ODV-E56 stop 感染細胞において mRNA と lncRNA のシグナルが検出されたことから (図 29)、ODV-E56 stop は *odv-e56* mRNA、および *odv-e56* アンチセンス lncRNA を転写するが、ODV-E56 タンパク質は産生されないウイルスであることが確認された。次に、ODV-E56 stop 由来の多角体の LC₅₀ の測定を行ったが、ODV-E56 stop の経口感染力は完全に消失していた (表 13)。以上の結果をあわせると、ODV-E56

タンパク質と *odv-e56* アンチセンス lncRNA は、ともに経口感染に必須な因子であることが明らかになった。

6. *odv-e56* アンチセンス lncRNA プロモーター導入ウイルスを用いた解析

odv-e56 アンチセンス lncRNA の配列内の経口感染に必須な領域を調査するため、段階的に長さの異なる *odv-e56* アンチセンス lncRNA を復帰させた変異導入ウイルスを作成した。ODV-E56 タンパク質のアミノ酸配列を変化させないように、後期プロモーター配列 TAAG を導入することで、野生型ウイルスの *odv-e56* 領域のアンチセンス RNA よりも 151 塩基長いアンチセンス RNA を復帰させたウイルスである KO124ASR+151、146 塩基短いアンチセンス RNA を復帰させたウイルスである KO124ASR-146、420 塩基短いアンチセンス RNA を復帰させたウイルスである KO124ASR-420、および 952 塩基短いアンチセンス RNA を復帰させたウイルスである KO124ASR-952 を構築した (図 18)。*odv-e56* アンチセンス lncRNA プロモーター導入ウイルスにおける *odv-e56* 領域の RNA の発現を調査するため、ウイルス感染 72 時間後の BmN 細胞を用いたノーザンブロッティングを行った。その結果、*odv-e56* 領域のセンス RNA のプロファイルには T3 感染細胞と比較して、全てのウイルス感染細胞で顕著な差は見られなかった (図 29A)。一方、アンチセンス RNA においては変異ウイルスごとに発現量の差が認められ

た (図 31)。T3 感染細胞や KO124ASR 感染細胞と比較して、KO124ASR+151 感染細胞においては *odv-e56* アンチセンス lncRNA の減少が、KO124ASR-420 感染細胞においては検出限界レベルに減少が、KO124ASR-146 感染細胞においては増加が観察された (図 29B)。一方、KO124ASR-952 感染細胞においては、導入したアンチセンス lncRNA (521 塩基) が下流に存在する *orf126* の mRNA (490 塩基) と同程度の塩基数であることからシグナルが重複しており、発現を明瞭に確認することが出来なかった (図 29B)。この結果から、*odv-e56* アンチセンス lncRNA のプロモーター配列の位置によって転写量が異なること、もしくは lncRNA の長さによる安定性の違いが生じている可能性が考えられた。

次に、*odv-e56* アンチセンス lncRNA プロモーター導入ウイルスにおける ODV-E56 タンパク質の発現量と ODV 粒子への含有量に変化がないかを調査するため、それぞれのウイルス感染細胞、および ODV 粒子を用いたウエスタンブロットティングを行った。その結果、全ての *odv-e56* アンチセンス lncRNA プロモーター導入ウイルスにおいて ODV-E56 タンパク質の発現量や ODV 粒子への含有量に影響がないことが確認できた (図 30)。そこで、各ウイルス用いて経口感染力を調査した。その結果、KO124ASR+151 においては野生株の 1/500 に低下し、KO124ASR-420 では野生株の 1/100 に低下したが、経口感染力は部分的に復

帰っていた。しかし、KO124ASR-146 と KO124ASR-952 では経口感染力はほとんど消失していた（表 14）。これらの結果から、経口感染には *odv-e56* アンチセンス lncRNA の適切な長さ（あるいは配列）と発現量が必要であることが判明した。

pif-3 領域から転写されるアンチセンス lncRNA の機能解析

1. 培養細胞、およびカイコ幼虫における KO95AS の性状解析

KO95AS は *pif-3* 領域内の BmNPV ゲノム 91,564 塩基 から転写されている 433 塩基のアンチセンス lncRNA を欠失させた PKO ウイルスである（図 34A）。PKO ウイルスの経口感染力における調査の結果、KO124AS と同様に経口感染力が消失していた。この *pif-3* アンチセンス lncRNA の性状解析を行うため、リバータントウイルス KO95ASR を作成し、BmN 細胞とカイコ幼虫を用いた KO95AS の性状解析を行った。

最初に、BmN 細胞への感染実験を行った。T3、KO95AS、および KO95ASR 感染細胞において、前述の方法と同様に BV 産生量と OB 産生量を測定した。その結果、KO95AS は BV 産生量、OB 産生量ともに T3 または KO95ASR と同程度であった（図 31）。

次に、カイコ 5 齢幼虫を用いた性状解析を行った。T3、 KO95AS、 および KO95ASR をカイコ幼虫に経皮接種し、BV 産生量と血中への OB 放出量を測定した。その結果、KO95AS 感染幼虫における BV 産生量と OB 放出量は共に、T3、 および KO95ASR 感染カイコ幼虫と同程度であった (図 32)。また、KO95AS 感染カイコ幼虫の LT_{50} を調査した結果、T3、 および KO95ASR 感染カイコ幼虫との間に有意差は認められなかった (図 33)。

最後に、T3、 KO95AS、 および KO95ASR を用いて LC_{50} を測定した。その結果、KO95AS においては経口感染力が消失していたが、KO95ASR においては T3 と同程度の経口感染力が認められた (表 15)。この結果から、*pif-3* アンチセンス lncRNA の欠失だけが経口感染能力の消失の原因であることが示された。

2. ノーザンブロッティングによる *pif-3* アンチセンス lncRNA、*pif-3* mRNA、 および *pif-3* 領域の miRNA の発現解析

pif-3 アンチセンス lncRNA の欠失が *pif-3* mRNA の発現に対して影響を与えているかどうかを調査するため、オリゴヌクレオチドプローブを用いたノーザンブロッティングを行った。その結果、KO95AS 感染細胞において、変異導入によ

る目的のアンチセンス lncRNA だけでなく、他のアンチセンス RNA の発現も消失していることが確認された(図 34C)。このことから、*pif-3* アンチセンス lncRNA の欠失が、近傍領域の遺伝子発現に影響を与えていることが示唆された。一方センス RNA においては T3、および KO95ASR と比較して mRNA の発現量には影響が見られなかった(図 34B)。近傍領域の遺伝子発現へ影響が考えられたため、*pif-3* と隣接する *orf94* および *orf96* を欠損した Bm94D と Bm96D に対して LC₅₀を測定し、経口感染力への影響を調査した。その結果、Bm94D、および Bm96D においては経口感染力が消失しなかったことから、*orf94*、および *orf96* が経口感染に必須ではないことが示唆された(表 15)。Bm94D については、経口接種 7 日後の経口感染力が 1/5 に低下していたが、これは感染カイコ幼虫の致死時間が延長した結果であると考えられた。

次に、*pif-3* アンチセンス lncRNA が miRNA 前駆体として転写され、miRNA を産生するかどうか調査するため、ウイルス非感染の BmN 細胞と T3、および KO95AS 感染細胞から低分子 RNA を抽出し、ノーザンブロッティングを行った。その結果、コントロールとして用いた *let-7* プローブにおいては、非感染細胞、T3、および KO95AS 感染細胞においてシグナルが検出された(図 35B)。*pif-3* アンチセンス lncRNA 領域を検出するリボプローブを用いた結果においては、

T3 特異的なシグナルが検出できなかった (図 35A)。このことから *pif-3* アンチセンス lncRNA は miRNA 前駆体ではないと考えられた。

3. ウェスタンブロッティングによる PIF-3 タンパク質の解析

pif-3 アンチセンス lncRNA のノックアウトが、PIF-3 タンパク質の ODV 粒子への含有に影響を与えているかどうか調査するために、抗 PIF-3 抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。また、ODV 粒子内に経口感染に必須な他の PIF タンパク質が含まれているかどうかを確認するために、抗 PIF-1 抗体を用いた解析も行った。T3、Bm95D、KO95AS、KO95ASR、および Bm97D 由来の多角体から ODV 粒子を精製し、ウェスタンブロッティングを行った。Bm95D は PIF-3 のネガティブコントロールとして、Bm97D は抗 PIF-1 抗体のネガティブコントロールとして用いた。抗 PIF-3 抗体を用いたウェスタンブロッティングの結果、T3、KO95ASR において特異的なシグナルが検出されたが、Bm95D、KO95AS、Bm97D においてはシグナルが検出されなかった (図 36A)。このことから、KO95AS においては ODV 粒子へ PIF-3 タンパク質が含有していないことが示唆された。すなわち、*pif-3* アンチセンス lncRNA のノックアウトが、PIF-3 タンパク質の翻訳、あるいは ODV 粒子への含有に関与していることが示唆された。一方、*pif-1* の欠損により PIF-3 の ODV へのリクルートが阻害されることも判明し

た。また、T3、KO95AS、および KO95ASR 感染細胞と抗 PIF-3 抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った結果、全ての感染細胞において特異的なシグナルを得ることが出来なかった（データ示さず）。現在まで、本論文で使用した抗体を用いた感染細胞ライセートを用いたウエスタンブロッティングは報告されていないことから、本抗体ではウイルス感染細胞における PIF-3 の発現の有無を調査することは困難であると考えられる。

PIF-1 抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果、Bm97D を除く T3、Bm95D、KO95AS、および KO95ASR において特異的なシグナルが検出された。Bm95D において PIF-1 のシグナルが検出されたことから、PIF-3 タンパク質非存在下でも ODV 粒子内に PIF-1 タンパク質が含まれることが判明した（図 36B）。これと同様の結果は、AcMNPV において報告されている（Peng et al. 2010）。

4. *pif-3* アンチセンス lncRNA の経口感染感染プロセスにおける役割

pif-3 アンチセンス lncRNA が経口感染のどの段階で寄与しているのかを調査するために、*odv-e56* アンチセンス lncRNA の場合と同様に、5 齢カイコ幼虫を用いた解析を行った。最初に、T3、KO95AS、および KO95ASR を経口感染させ、感染 3 日後の体液を回収し、BV 産生量を測定した。その結果、KO95AS 感染幼

虫における BV 産生が全く検出されなかった (図 37)。この結果から、KO95AS はその経口感染時に血体腔への BV の放出が行われていないことが判明した。

次に、KO95AS を経口感染した中腸細胞においてウイルスゲノムの複製が行われているかどうかを調査するため、中腸から DNA を抽出し、qPCR を用いてウイルスゲノム量を調査した。その結果、T3 または KO95ASR を経口感染した場合はウイルスゲノム量の増加を認めることができたが、KO95AS 感染中腸ではウイルス非感染幼虫と同様ウイルスゲノムの増加が認められなかった (図 38)。このことから、KO95AS 経口感染カイコ幼虫の中腸細胞内においては、ウイルスゲノムの複製が行われていないことが明らかになった。

最後に、経口感染時に KO95AS が中腸細胞においてウイルス遺伝子の転写を行っているかどうかを調査するために、T3、KO95AS、および Bm95D の多角体を経口投与して 24、48 時間後の 5 齢幼虫の中腸から RNA を抽出し、RNA シーケンシングを行った。ウイルス遺伝子の発現量比較を行った結果、KO95AS および Bm95D 経口感染中腸においてはウイルス遺伝子の発現がほとんど認められなかった (図 28)。KO95AS 感染 24 時間後の中腸細胞において *bm21*、*egt*、*bm108* 遺伝子の発現が認められたが、それぞれの遺伝子において得られたタグ数が極

めて少なく、48 時間後においては発現が認められなかった。これらの結果から、KO95AS は KO124AS と同様に、経口感染時にウイルスキャプシドの中腸細胞内への侵入が達成されていないことが示唆された。

5. *pif-3* アンチセンス lncRNA がコードする可能性があるペプチドの解析

配列解析の結果、*pif-3* アンチセンス lncRNA 配列内に 81AA のペプチドが翻訳される可能性が考えられた (図 39)。このペプチドの消失が KO95AS の経口感染力の消失に関与しているかどうか調査するため、この予想ペプチドの開始コドン ATG を破壊した変異ウイルス *pif3 AS peptide stop* を作成し、その性状解析を行った。まず、*pif3 AS peptide stop* の ODV 粒子を精製しウエスタンブロッティングを行った結果、KO95AS とは異なり PIF-3 のシグナルが検出された (図 40)。この結果は、KO95AS において ODV 粒子に PIF-3 タンパク質が含まれないことと本ペプチドの合成に関係がないことを示している。次に、*pif3 AS peptide stop* の LC₅₀ を調査したところ、経口感染力は野生株と同程度であった (表 16)。これらの結果から、*pif-3* アンチセンス lncRNA に存在が予測されたペプチドは少なくとも、KO95AS の表現型に関与していないことが判明した。

考察

本章では、宿主昆虫に対するバキュロウイルス感染の最初の段階である経口感染性に着目して、第一章で作成した PKO ウイルスを用いて経口感染力に寄与する機能性 lncRNA の探索を行った。その結果、*pif-3* アンチセンス lncRNA を欠失した KO95AS、*gp64* 初期プロモーターから転写される RNA を欠失した KO105S、および *odv-e56* アンチセンス lncRNA を欠失した KO124AS の 3 つの PKO ウイルスにおいて経口感染力が消失することが明らかになった。KO105S においては、近縁ウイルスである AcMNPV において、*gp64* の初期プロモーターから転写される RNA が GP64 タンパク質をコードし、経口感染へ関与しているという報告なされていた (Washburn et al. 2003)。そのため本研究では、アンチセンス lncRNA を欠失した KO95AS と KO124AS の 2 つのウイルスに対して詳細な性状解析を行った。経口感染力に寄与すると同定された 2 つのアンチセンス lncRNA のセンス鎖には経口感染に関わる *pif-3* および *odv-e56* がコードされている。すなわち、遺伝子破壊カセットを用いた欠損ウイルスによる解析から、これら 2 遺伝子が産生するタンパク質が経口感染に関与することが示されている (Li et al. 2007、Xiang et al. 2011b, Spark et al. 2011a)。*pif-1* もまた経口感染に必須なタンパク質をコードしている領域であるが (Ohkawa et al. 2005)、*pif-1* アンチセンス lncRNA

を欠失した KO97AS3、KO97AS5、KO97AS1-5 においては経口感染力が減少しなかった（表 11）。このことから、経口感染に関与するタンパク質をコードしている領域から転写されている全ての lncRNA が経口感染に寄与しているわけではないことが明らかになった。

odv-e56 アンチセンス lncRNA を欠失した KO124AS は、感染培養細胞の BV および OB の産生量に影響は見られなかった。また、皮下注射によって経皮感染させたカイコ幼虫における BV 産生量、血中への OB 放出量、幼虫致死時間においても全く影響が見られなかった。これらの結果から、KO124AS は野生型ウイルスと比較して、経口感染力のみが低下する表現型を示すウイルスであることが明らかとなった。一方、KO124AS 感染細胞におけるノーザンブロッティングの結果から、*odv-e56* mRNA の発現に *odv-e56* アンチセンス lncRNA が関与しないことも分かった。さらに、抗 ODV-E56 抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果から、ODV-E56 タンパク質の翻訳や ODV 粒子への含有にも影響しないことも示された。これらの結果から、*odv-e56* アンチセンス lncRNA のみを欠失した KO124AS と、従来法によって *odv-e56* 遺伝子領域を遺伝子破壊カセットにより欠損させることにより *odv-e56* mRNA、ODV-E56 タンパク質、*odv-e56* アンチセンス lncRNA をすべて欠失した Bm124D が、経口感染力が消失するという同

様の表現型を示すことが明らかになった。ODV-E56 タンパク質自体が経口感染に関与していない可能性が考えられたため、ODV-E56 タンパク質の翻訳を途中でストップするような ODV-E56 stop を作成し、その LC₅₀ を測定した。その結果、経口感染力が Bm124D や KO124AS と同程度に低下したことから、ODV-E56 タンパク質が *odv-e56* アンチセンス lncRNA と共に、経口感染に必須な因子であることが示唆された。これまでに報告されている Xiang や Spark らの行った遺伝子破壊カセットによる BmNPV および AcMNPV の *odv-e56* 遺伝子の欠損実験では、*polh* 領域など異なったウイルスゲノム領域に *odv-e56* 遺伝子を復帰させたレスキューウイルスが作成されていない (Xiang et al. 2011b, Spark et al. 2011a)。これらの研究では、通常行われるような *odv-e56* の ORF 配列のみの復帰によって経口感染に必須な *odv-e56* アンチセンス lncRNA が回復されず、経口感染力のレスキューが出来なかったために、*polh* 領域へのレスキュー実験の結果が報告されていない可能性がある。

次に、経口感染に必要なアンチセンス lncRNA 領域を調査するため、KO124AS ウイルスの *odv-e56* 領域内に新たなアンチセンス lncRNA のプロモーター配列を導入し、長さの異なる lncRNA を復帰させたウイルス (*odv-e56* アンチセンス lncRNA プロモーター導入ウイルス) を 4 つ作成し、それらの性状解析を行った。

KO124ASR+151は野生型のアンチセンス lncRNA よりも長い lncRNA を転写するが、lncRNA の発現量は減少し、経口感染力が野生型の 1/500 程度に低下した。

KO124ASR-146 は、野生型のアンチセンス lncRNA よりも 151 塩基短い lncRNA を転写するように変異を導入したウイルスである。その結果、lncRNA の発現量は増加したが、経口感染力はほぼ消失していた。一方、KO124ASR-420 は KO124ASR-146 よりも短いアンチセンス lncRNA を発現するようなウイルスであるが、lncRNA の発現量は減少しているにも関わらず、経口感染力は野生型の 1/100 程度まで復帰した。今回の結果からは、アンチセンス lncRNA の長さおよび lncRNA の発現量と経口感染力の復帰の程度に単純な相関関係が見られなかったため、復帰させたアンチセンス lncRNA の高次構造など他の要素についても考慮する必要があると考えられる。今後、*odv-e56* アンチセンス lncRNA の機能解析には、*odv-e56* アンチセンス lncRNA 発現プラスミドを一過性発現した培養細胞へ KO124AS 感染し、培養細胞内で産生される OB の経口感染力を定量するような実験系が必要だと考えられる。このような実験系が構築できれば、lncRNA における必須配列や高次構造の同定が行えるはずである。

一方、*pif-3* アンチセンス lncRNA を欠失した KO95AS も野生型ウイルスと比較して、経口感染力のみが消失する表現型を示すウイルスであることが判明した。

つまり、*pif-3* アンチセンス lncRNA が経口感染に必須な因子であることが示された。KO95AS 感染細胞におけるノーザンブロッティングの結果から、*pif-3* mRNA の発現に *pif-3* アンチセンス lncRNA が関与しないことが示唆された。しかし、抗 PIF-3 抗体を用いた ODV 粒子のウエスタンブロッティングの結果では、KO95AS が産生する ODV 粒子には PIF-3 が全く含まれていなかった。これらの結果から、*pif-3* アンチセンス lncRNA が PIF-3 タンパク質の翻訳、タンパク質の安定性、または ODV 粒子へのリクルートに寄与していることが考えられる。KO95AS では Bm95D と同様に PIF-3 タンパク質が存在しない ODV 粒子となることが、経口感染力の消失の原因であると結論できる。タンパク質の翻訳を促進する lncRNA としては、マウスの脳機能や神経変成疾患に関与している *ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 (Uchl1)* 遺伝子領域から転写されるアンチセンス lncRNA である *AS Uchl1* が報告されている (Carrieri et al. 2012)。*AS Uchl1* は 5' 領域に *Uchl1* mRNA と 72 塩基オーバーラップする配列を持ち、結合することで UCHL1 タンパク質の翻訳を促進する。今後、*pif-3* アンチセンス lncRNA が *AS Uchl1* と同様にタンパク質翻訳を促進する機能を有するのか、さらなる機能解析が必要であると考えられる。

現在までに、いくつかの真核生物の lncRNA がタンパク質と結合し複合体を形成

することで、その機能を果たすことが報告されている。例えば、*inactive X specific transcripts RNA (Xist RNA)* は、ホ乳類の雌が有する 2 本の X 染色体のうち、1 本の X 染色体を不活性化することで性染色体の遺伝子発現を雌雄間で等しくする遺伝子量補償に関与する lncRNA である。*Xist RNA* は、ヒストン H3 メチル化酵素である polycomb repressor complex 2 (PRC2) や、DNA 結合タンパク質である YY1 と相互作用することで、最終的に X 染色体のヘテロクロマチン化を達成していることが報告されている (Zhao et al. 2008, Jeon and Lee. 2011)。*odv-e56* アンチセンス lncRNA や *pif-3* アンチセンス lncRNA 等のウイルス由来の lncRNA においても、何らかのウイルスおよび宿主由来のタンパク質との相互作用によって機能を果たしている可能性がある。今後、RNA-pull down アッセイ等を行うことにより lncRNA 結合タンパク質を同定することで、lncRNA がどのようなメカニズムで経口感染に関わっているかを理解できると考えられる。

本章で解析した 2 種類の lncRNA はともに経口感染に必須の RNA であったが、上述のように作用機序が異なることが明らかになった。そこで、次に各 lncRNA の経口感染プロセスにおける役割を調査した。KO124AS と KO95AS の多角体を用いて経口感染を行い、その中腸を用いて RNA シークエンシングを行った。その結果を用いたウイルス遺伝子の網羅的発現解析では、どちらのウイルスも中

腸でのウイルス遺伝子の発現が全く検出できず、経口感染時にウイルスキャプシドが中腸細胞へ侵入できていないか、あるいは核内への輸送が達成されていないことが示唆された。以上のことから、両ウイルスの経口感染力の消失は ODV 形成時における異常によって引き起こされている可能性が高いと考えられる。

しかし、経口感染力が消失したもう一つのウイルスである KO105S は、細胞間の二次感染に必須な BV 構造タンパク質である GP64 の初期プロモーターを欠失したウイルスである。AcMNPV においては、GP64 が ODV 粒子に含まれていないにも関わらず、経口感染に寄与していることが知られている (Braunagel et al. 2003, Washburn et al. 2003, Zhang et al. 2004)。バキュロウイルスの経口感染経路の研究は主に AcMNPV を用いて行われてきた (Keddie et al. 1989, Engelhard et al. 1994)。ODV が中腸細胞内へ侵入した後に複数のキャプシドが細胞内を移動し、一部の核へ移行したキャプシドにより産生された GP64 によって、残りの一部のキャプシドがエンベロープを被って BV となり、トラキアを介して二次感染に移行すると考えられている (Rohrmann. 2013)。しかしながら、この経路は AcMNPV のように ODV 粒子の中に複数のキャプシドを持つマルチキャプシド型のウイルスで可能なプロセスであり、BmNPV のような ODV 粒子の中に一つのキャプシドしか持たないウイルスでは、複数のウイルスが一つの同じ細胞に感染しない限り同じストラテジーでの感染は不可能である。本研究において解析した

KO105S について経口感染時の性状を調べたところ、BV は血体腔に全く放出されていなかった (図 41)。この結果は、AcMNPV の *gp64* 初期プロモーター変異ウイルスとほぼ同じ表現型である。今後、KO105S 感染中腸を用いた RNA シーケンシングを行うことで、BmNPV を含むシングルキャプシド型のウイルスの経口感染経路に対して有用な知見が得られることが期待される。

表8：現在までに報告されている経口感染関連遺伝子

遺伝子名	機能	引用文献
<i>pif-1(Bm97, Ac119)</i>	経口感染のみに必須。PIF complexに含まれる。	Ohkawa et al. 2005, Peng et al. 2010
<i>pif-2(Bm13, Ac22)</i>	経口感染のみに必須。PIF complexに含まれる。	Ohkawa et al. 2005, Peng et al. 2010
<i>pif-3(Bm95, Ac115)</i>	経口感染のみに必須。PIF complexに含まれるが、中腸細胞への結合には関与しない。	Ohkawa et al. 2005, Li et al. 2007, Peng et al. 2010
<i>pif-4(Bm79, Ac96)</i>	BV、ODVのエンベロープの構造タンパク質。PIF complexに含まれる。	Fang et al. 2009, Peng et al. 2012
<i>pif-5(odv-e56, Bm124, Ac148)</i>	経口感染のみに必須。BV、ODVのエンベロープの構造タンパク質。中腸細胞への結合には関与しない。	Braungel et al. 1996, Sparks et al. 2011a, Xiang et al. 2011b, Peng et al. 2012
<i>pif-6(Bm56, Ac68)</i>	経口感染に必須。PIF complexに含まれる。欠損BmNPVは、経口感染幼虫における致死時間延長と多角体形成異常を引き起こす。	Li et al. 2008, Xu et al. 2008, Nie et al. 2011, Peng et al. 2012
<i>p74(Bm115, Ac138)</i>	経口感染のみに必須。PIF complexに含まれる。	Haas-Stapleton et al. 2004, Zhou et al. 2005, Slack et al. 2010, Peng et al. 2011,
<i>vp91(Bm69, Ac83)</i>	PIF complexに含まれる。キチン結合ドメインを持つ。ドメイン欠損すると経口感染のみ低下するが、遺伝子破壊カセットによる欠損ではBV産生されない。	Peng et al. 2012, Zhu S et al. 2013, Xiang et al. 2013
<i>odv-e66(Bm37, Ac46)</i>	コンドロイチナーゼ活性を持ち中腸上皮と結合する。欠損ウイルスの経口感染時には致死が遅延する。	Sparks et al. 2011b, Xiang et al. 2011a
<i>Bm121(Ac145)</i>	キチン結合ドメインを持つ。BV、ODVに含まれる構造タンパク質。遺伝子欠損AcMNPVでは、経口感染力が低下する。	Lapointe et al. 2004
<i>Bm126(Ac150)</i>	BV、ODVに含まれる構造タンパク質。遺伝子欠損AcMNPVでは経口感染が低下するが、遺伝子欠損BmNPVでは致死が遅延し、経口感染に差はない。	Lapointe et al. 2004 Zhang et al. 2005

表9：第二章で使用したプライマーリスト

name	sequence	purpose
odv-e56 Sac F	ccaagagctcatgagttttttacaaatctcgtagag	cloning
odv-e56 Xba R	tttttctagatttggtgaggatgccgcactac	
odv-e56 stop F	ttaactcattttaaagcaaaacttattaataaatatcacag	mutagenesis
odv-e56 stop R	tttacaatcttcgtagagtcataaaattgtatcc	
odv-e56 ASR+151 F	cttaatactttattttatctacagatacatgac	
odv-e56 ASR+151 R	cctaaaacaagaccgcgcctac	
odv-e56 ASR-146 F	ttactaaccaacatgtgccaaggatttaactatg	
odv-e56 ASR-146 R	ggggcgaatcgttagccaacaagg	
odv-e56 ASR-420 F	cttacataatcacatgagaacctgaaagtag	
odv-e56 ASR-420 R	cgggggttttgctgcagtgcgttttg	
odv-e56 ASR-952 F	cgcttagattttaccaacatggcgccgcag	
odv-e56 ASR-952 R	tctccttgcttagattttgggcgagaggg	
e56 AS F	aagggtcgatgcacatgattgttggc	riboprobe
T7 e56 AS R	ctctcttaatacgactcactatagggataatctgatataggacaacaatctttaa	
pif3 pep mut F	cctgcgtgagcacgtacagagactg	mutation
pif3 pep mut R	cttgagacacgacaaaatctccgcctg	
pif3 AS F	aaggcctcggcgttcccgtatcgtc	riboprobe
T7 pif3 AS R	ctctcttaatacgactcactataggggttgaacttttggcaatac	
polh F	gaacaagaggagaagcaatg	qPCR
polh R	tccagttggcgattaacttc	
ago3 F	ctctctcgtagaacatc	
ago3 R	tttcttagtacctcaacg	

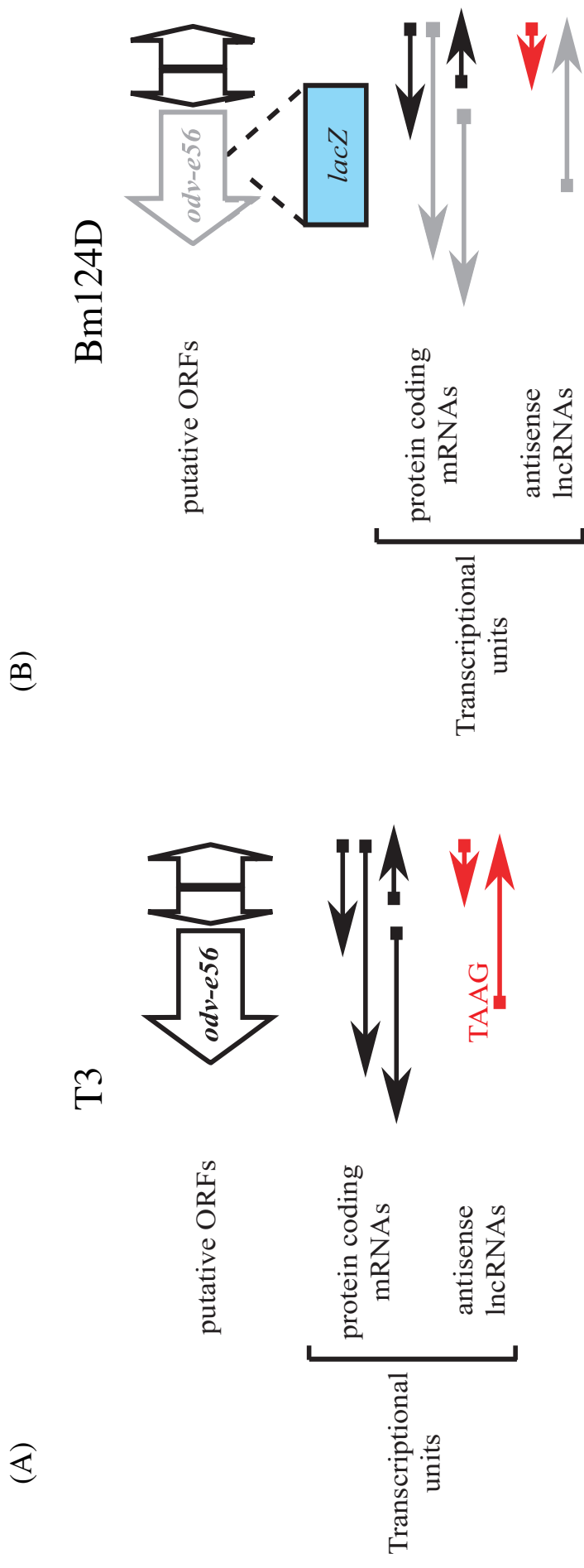


図16 : Bm124Dウイルスの構造
 (A) BmNPV T3株の*adv-e56*領域におけるORFと転写産物のプロファイルの模式図。 (B) 遺伝子破壊カセットを挿入したBm124Dの模式図。Bm124Dでは、*lacZ*遺伝子発現カセットの挿入により、*adv-e56* mRNA、ODV-E56タンパク質、*adv-e56*アンチセンスlncRNAが欠失していると考えられる。

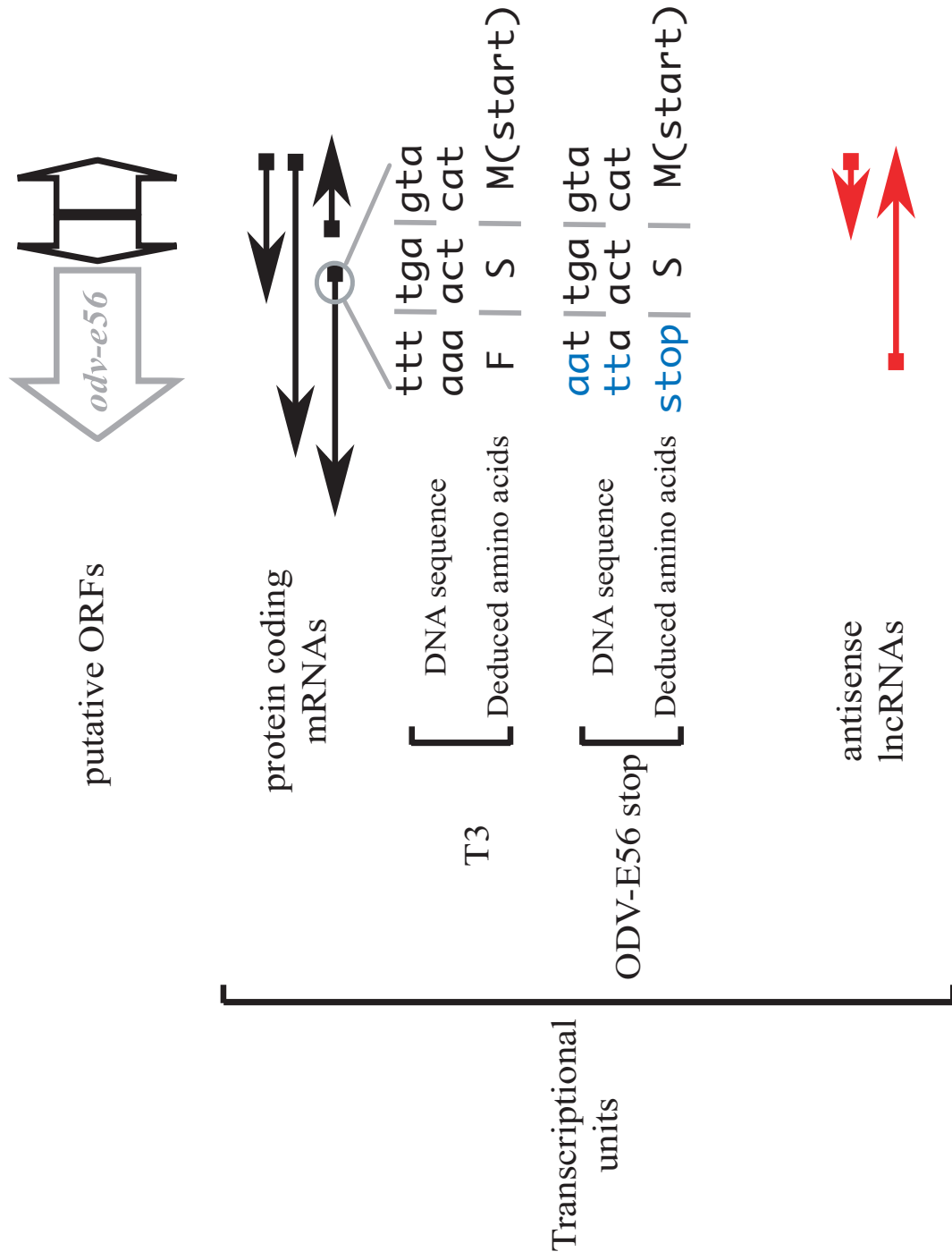


図17 : ODV-E56 stop ウイルスの構造
 ODV-E56 タンパク質の3番目のアミノ酸残基であるフェニルアラニンのコドン配列TTTに対して点変異を導入し、終止コドン配列TAAに置換することで、ODV-E56 タンパク質のみを欠失するODV-E56 stop を作成した。

表10：第二章で作成したしたプラスミドリスト

plasmid name	vector	primers set
pcold-e56	pcold-1	odv-e56 Sac F/ odv-e56 Xba R
pm-e56stop	pcDNA-odve56	odv-e56 stop F/ odv-e56 stop R
pmKO124ASR+151	pmKO124AS	odv-e56 ASR+151 F/ odv-e56 ASR+151 R
pmKO124ASR-146	pmKO124AS	odv-e56 ASR-146 F/ odv-e56 ASR-146 R
pmKO125ASR-420	pmKO124AS	odv-e56 ASR-420 F/ odv-e56 ASR-420 R
pmKO124ASR-952	pmKO124AS	odv-e56 ASR-952 F/ odv-e56 ASR-952 R
pm-pif3AS peptide stop	pcDNA-pif3	pif3 pep mut F/ pif3 pep mut R

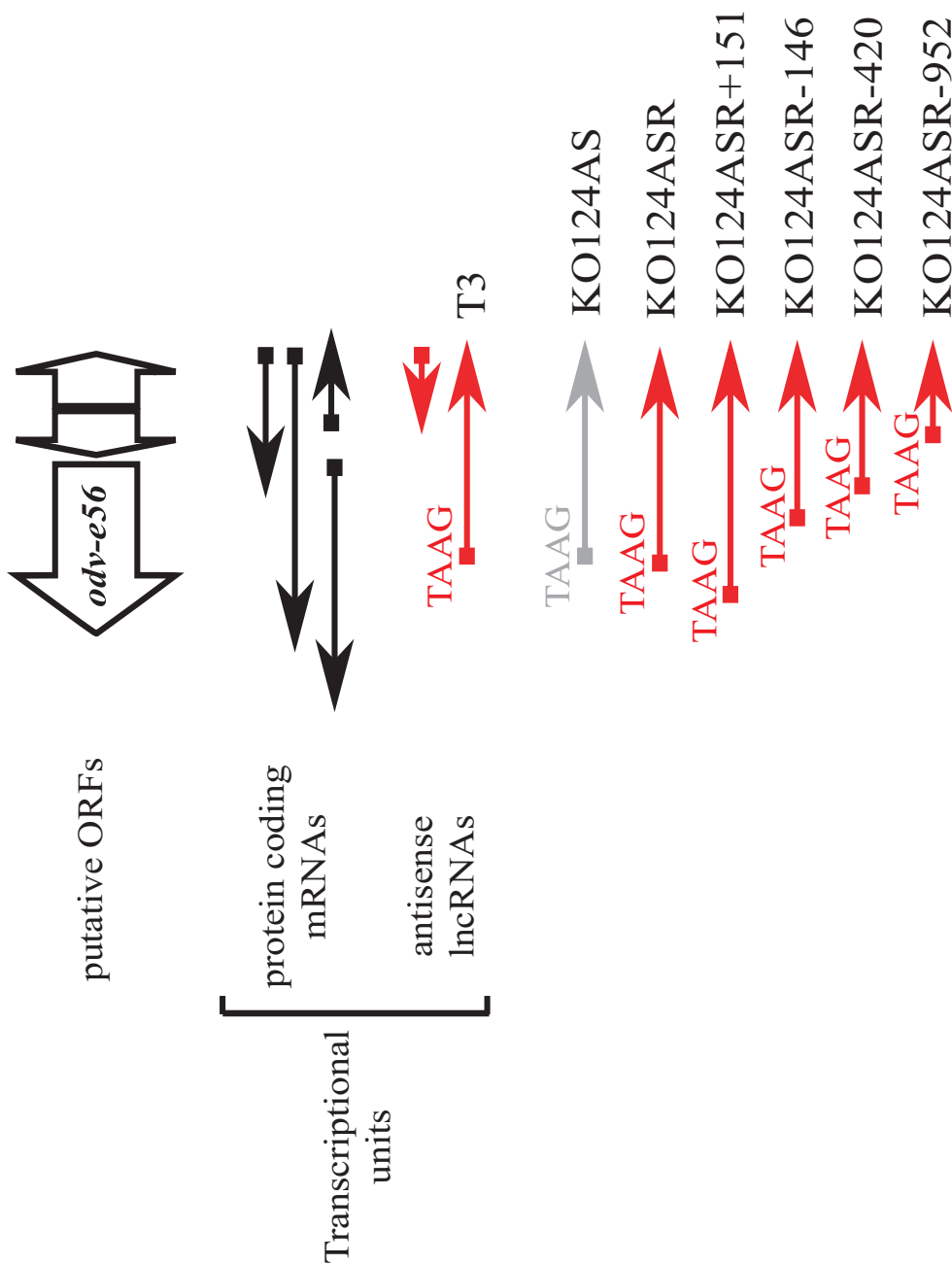


図18：odv-e56 アンチセンスlncRNAプロモーター導入ウイルスの構造
 KO124ASに塩基置換によってlate promoter motif (TAAG)を導入することで、長さの異なるodv-e56アンチセンスlncRNAを復帰させた4種類のodv-e56 アンチセンスlncRNAプロモーター導入ウイルスを構築した。odv-e56領域のアンチセンスlncRNAよりも151塩基長いウイルスをKO124ASR+151、146塩基短いウイルスをKO124ASR-146、420塩基短いウイルスをKO124ASR-420、そして952塩基短いウイルスをKO124ASR-952と名付けた。変異ウイルスの作成においては、ODV-E56タンパク質のアミノ酸配列を変化させないよう、後期プロモーター配列TAAGを導入した。

表11：PKOウイルスを用いた経口感染実験

virus	7 dpi LC ₅₀	95% Confidence Intervals	
		Lower	Upper
T3	5.5×10^4	3.1×10^4	8.8×10^4
BmhEPS1	3.7×10^4	2.3×10^4	5.4×10^4
KO1AS1	3.0×10^4	1.7×10^4	4.7×10^4
KO1AS2	2.8×10^4	1.5×10^4	4.4×10^4
KO1AS3	3.7×10^4	2.4×10^4	5.1×10^4
KO1AS123	4.1×10^4	1.5×10^4	8.0×10^4
T3	3.3×10^4	2.1×10^4	4.8×10^4
KO9AS1	5.4×10^3	3.0×10^2	1.1×10^4
KO9AS2	3.5×10^4	2.3×10^4	5.0×10^4
KO52AS	2.7×10^4	1.7×10^4	3.8×10^4
KO71S	1.5×10^4	5.9×10^3	2.6×10^4
KO88S2	1.9×10^4	1.2×10^4	2.8×10^4
KO88S3	3.3×10^3	2.1×10^1	1.2×10^4
KO97AS3	1.4×10^4	4.2×10^3	2.7×10^4
KO97AS5	1.5×10^4	9.6×10^3	2.1×10^4
KO105S	$> 1.0 \times 10^8$		
KO122AS	2.5×10^4	1.5×10^4	3.6×10^4
KO124AS	$> 1.0 \times 10^8$		
KO127AS1	1.6×10^4	9.7×10^3	2.3×10^4
KO127S	1.8×10^4	1.1×10^4	2.6×10^4
KO127AS3	9.5×10^3	2.5×10^3	1.7×10^4
T3	2.3×10^4	1.1×10^4	3.7×10^4
KO63AS	7.8×10^4	4.3×10^4	1.3×10^5
KO95AS	$> 1.0 \times 10^8$		
KO97AS1-5	7.4×10^4	5.1×10^4	1.1×10^5
KO126AS	4.2×10^4	2.1×10^4	7.1×10^4

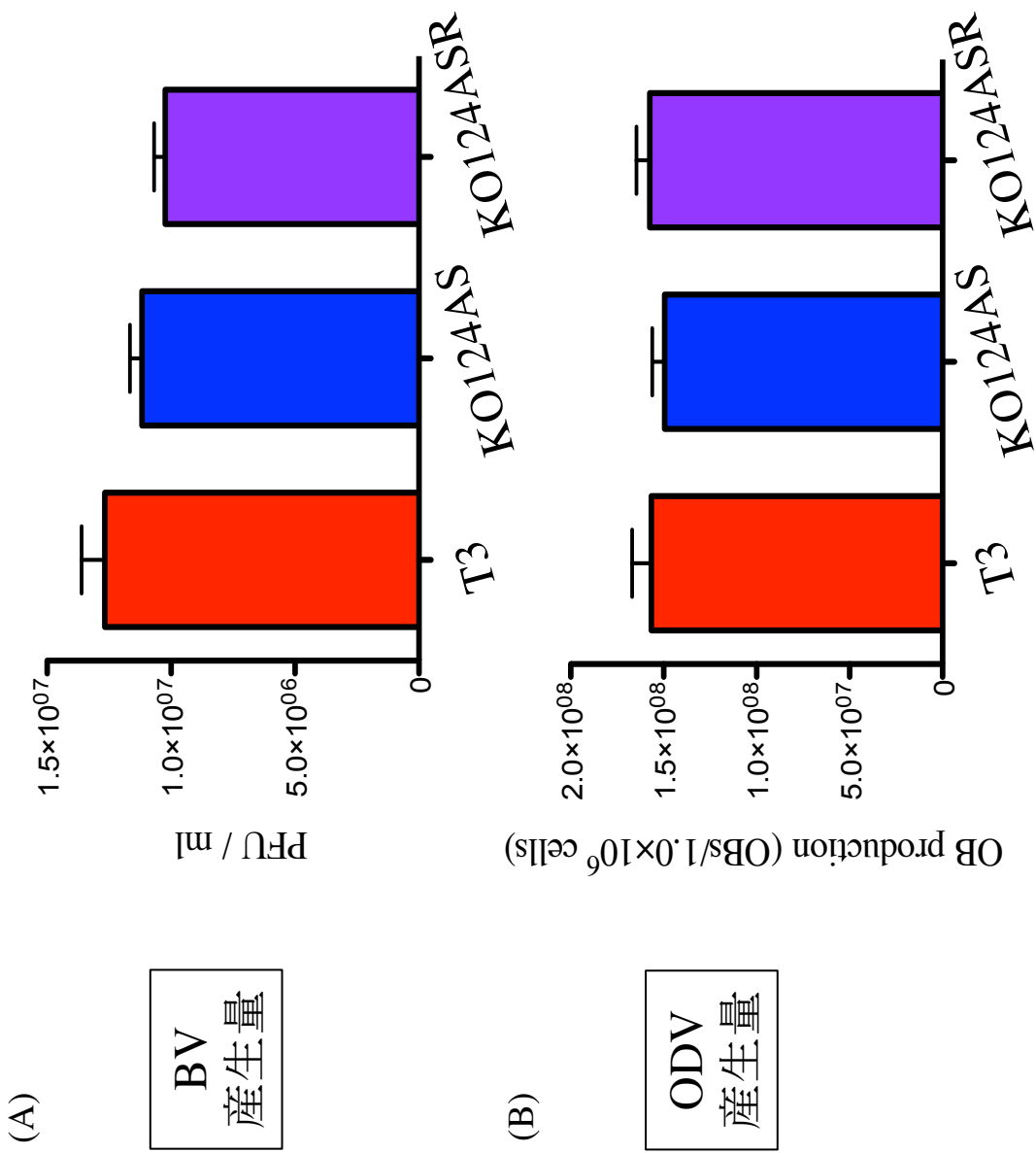


図19 : KO124AS感染細胞におけるBVおよびODV産生量

(A) T3、KO124AS、およびKO124ASRを用いて感染4日後のBmN細胞におけるBV産生量を調査した。(B) T3、KO124AS、およびKO124ASRを用いて感染4日後のBmN細胞におけるODV産生量を調査した。

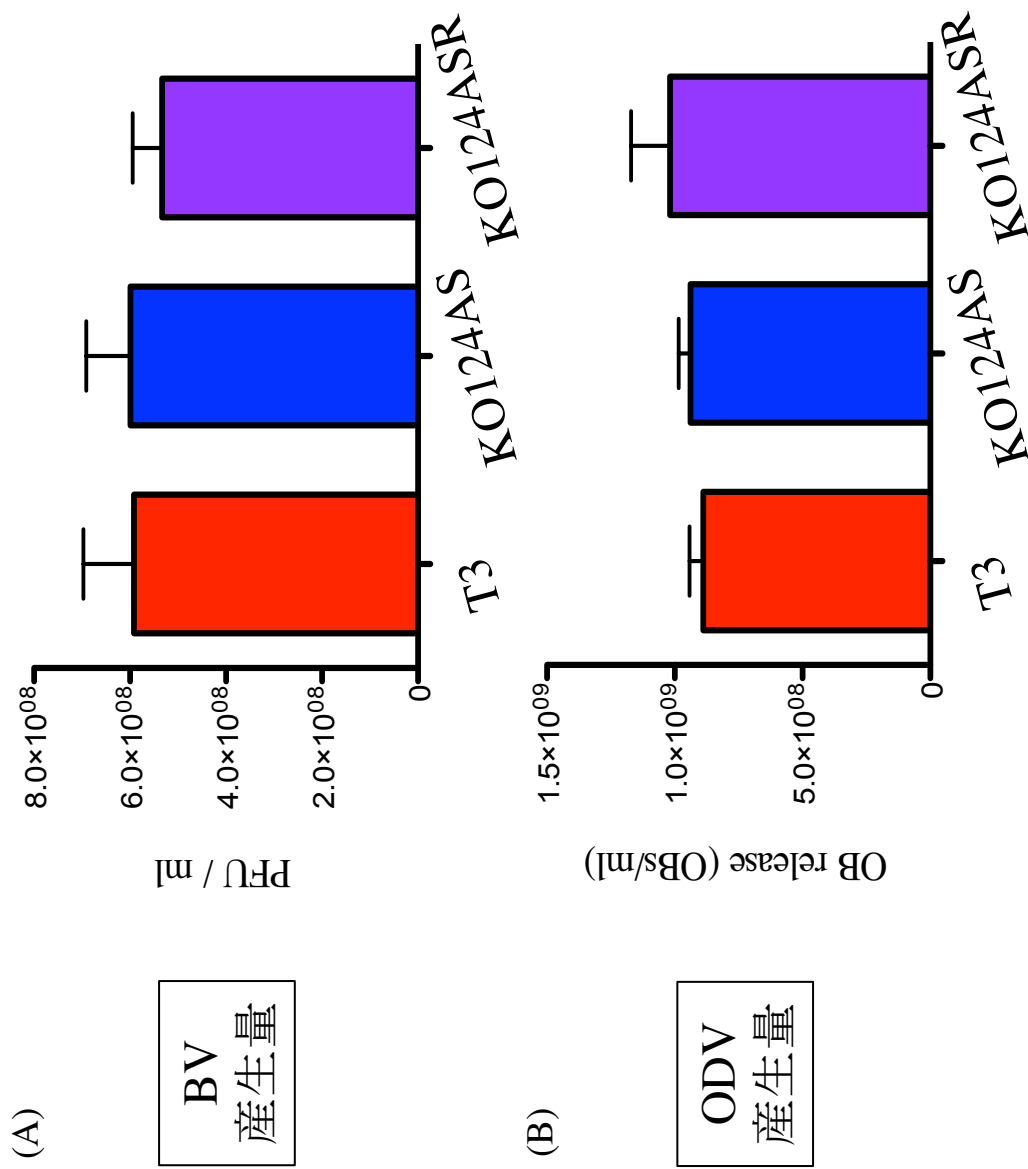


図20 : KO124AS感染カイコ幼虫におけるBV産生量とOB放出量

(A) T3、KO124AS、およびKO124ASRをカイコ5齢幼虫に感染させ、4日後に体液中のBV産生量を調査した。(B) T3、KO124AS、KO124ASRをカイコ5齢幼虫に感染させ、4日後に体液中のOB放出量を調査した。

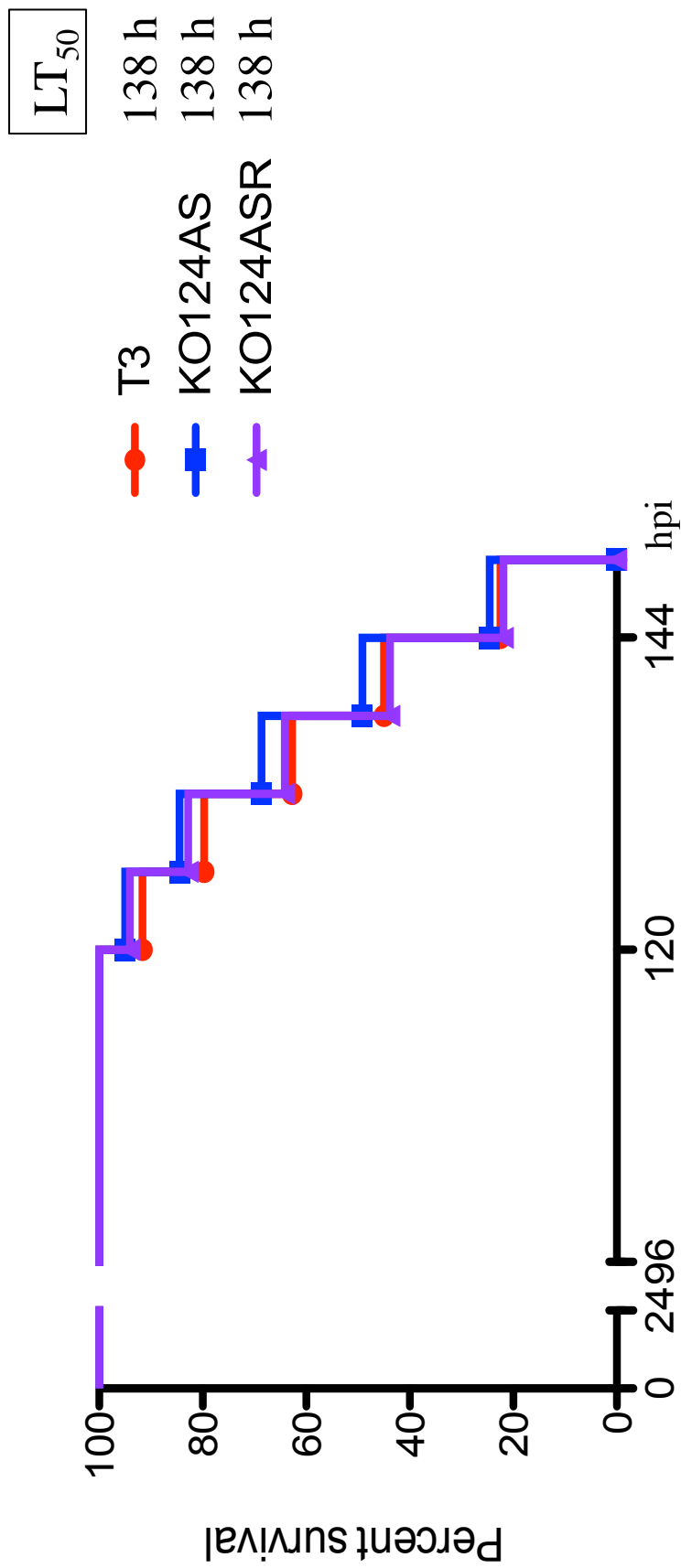


図21 : KO124AS感染カイコ幼虫の生存曲線
T3、KO124AS、およびKO124ASRを用いて、カイコ5齢幼虫における致死時間を測定した。感染実験は各ウイルスについて20個体を用いて行った。

表12：KO124ASを用いた経口感染実験

virus	7 dpi LC ₅₀	95% Confidence Intervals	
		Lower	Upper
T3	2.3×10^4	1.1×10^4	3.7×10^4
KO124AS	$> 1.0 \times 10^8$		
KO124ASR	3.5×10^4	1.9×10^4	5.6×10^4
Bm124D	$> 1.0 \times 10^8$		
Bm124DR	3.4×10^4	2.1×10^4	5.0×10^4

T3、KO124AS、KO124ASR、Bm124D、Bm124DRとカイコ一齢起蚕幼虫を用いて経口感染力の調査を行った。

(A)

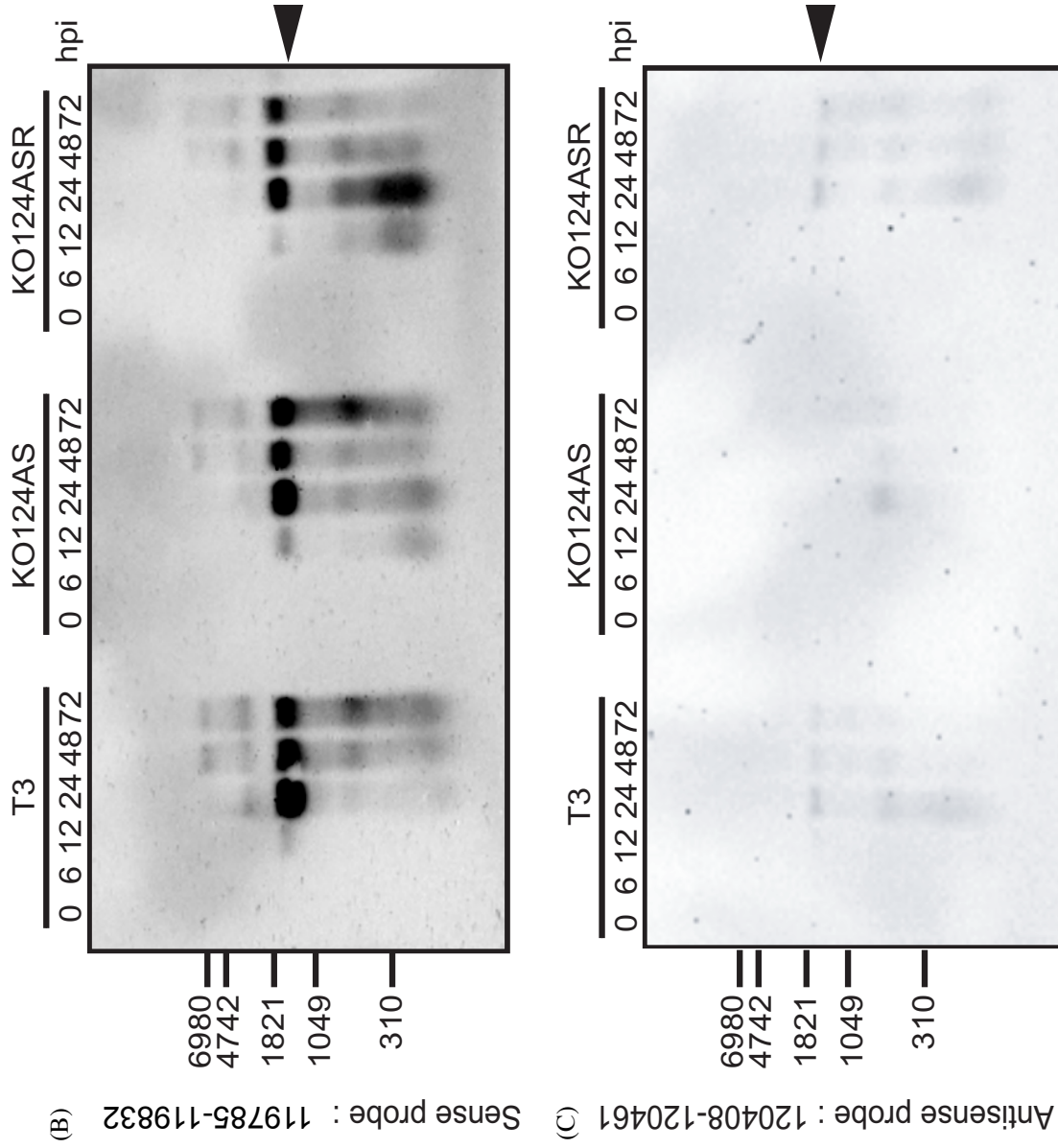
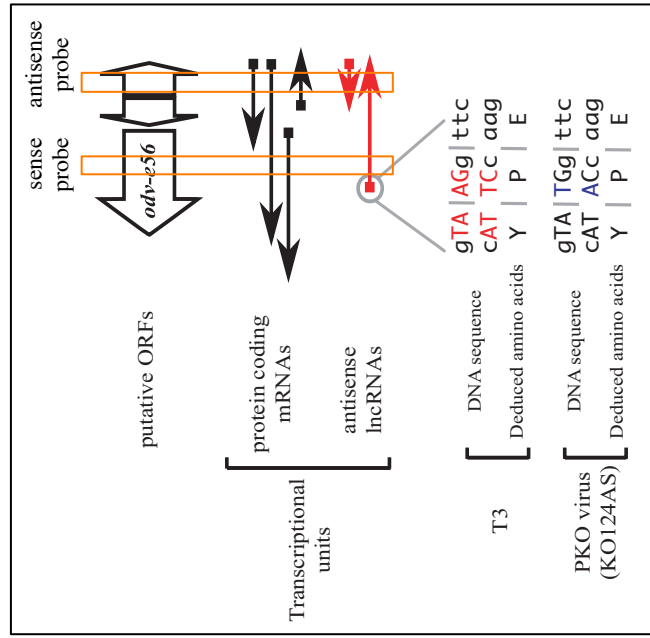


図22 : KO124AS感染細胞を用いた*odv-e56*、および*odv-e56 lncRNA*の発現解析

(A)*odv-e56*領域における転写ユニットとKO124ASの模式図を示した。用いたプローブの位置はオレンジのボックスで示している。T3、KO124AS、およびKO124ASR感染細胞を用いて (B) では、センスRNAを検出するノーザンブロットイングを (C) では、アンチセンスRNAを検出するノーザンブロットイングを行った。矢頭は欠失させた*lncRNA*のサイズを示している。KO124AS感染細胞において、変異導入による*lncRNA*の欠失が確認された。また、mRNAの発現量はT3、およびKO124ASR感染細胞と同程度であった。

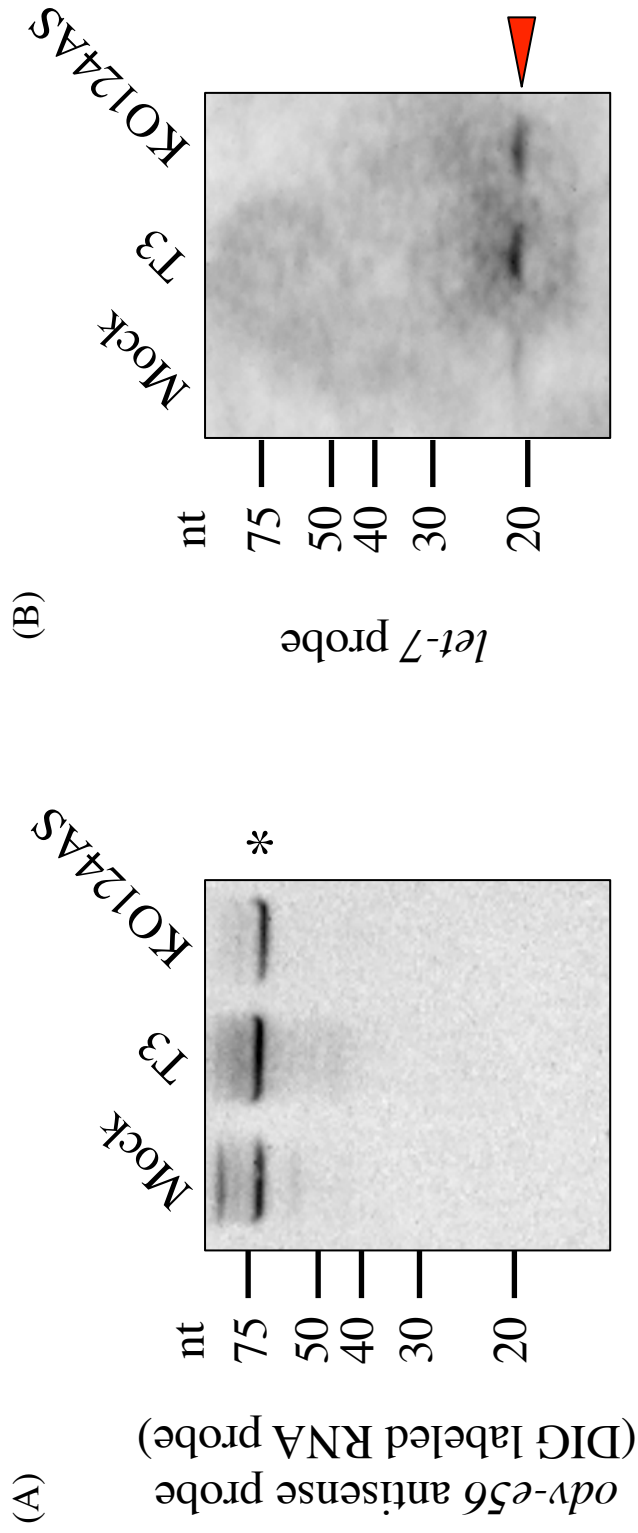


図23 : *odv-e56*アンチセンスlncRNA領域における低分子RNAの探索
T3、KO124AS、およびBm124D感染細胞を用いて、*odv-e56*アンチセンスlncRNA領域からmiRNAが産生されているかどうか調査した。(A) では*odv-e56*アンチセンスlncRNA領域を検出するリポプローブを用い、(B) ではコントロールとして*let-7*をプローブとして用いてノーザンブロットティングを行った。*は非特異的に検出されたシグナルを示し、矢頭は*let-7*を示している。

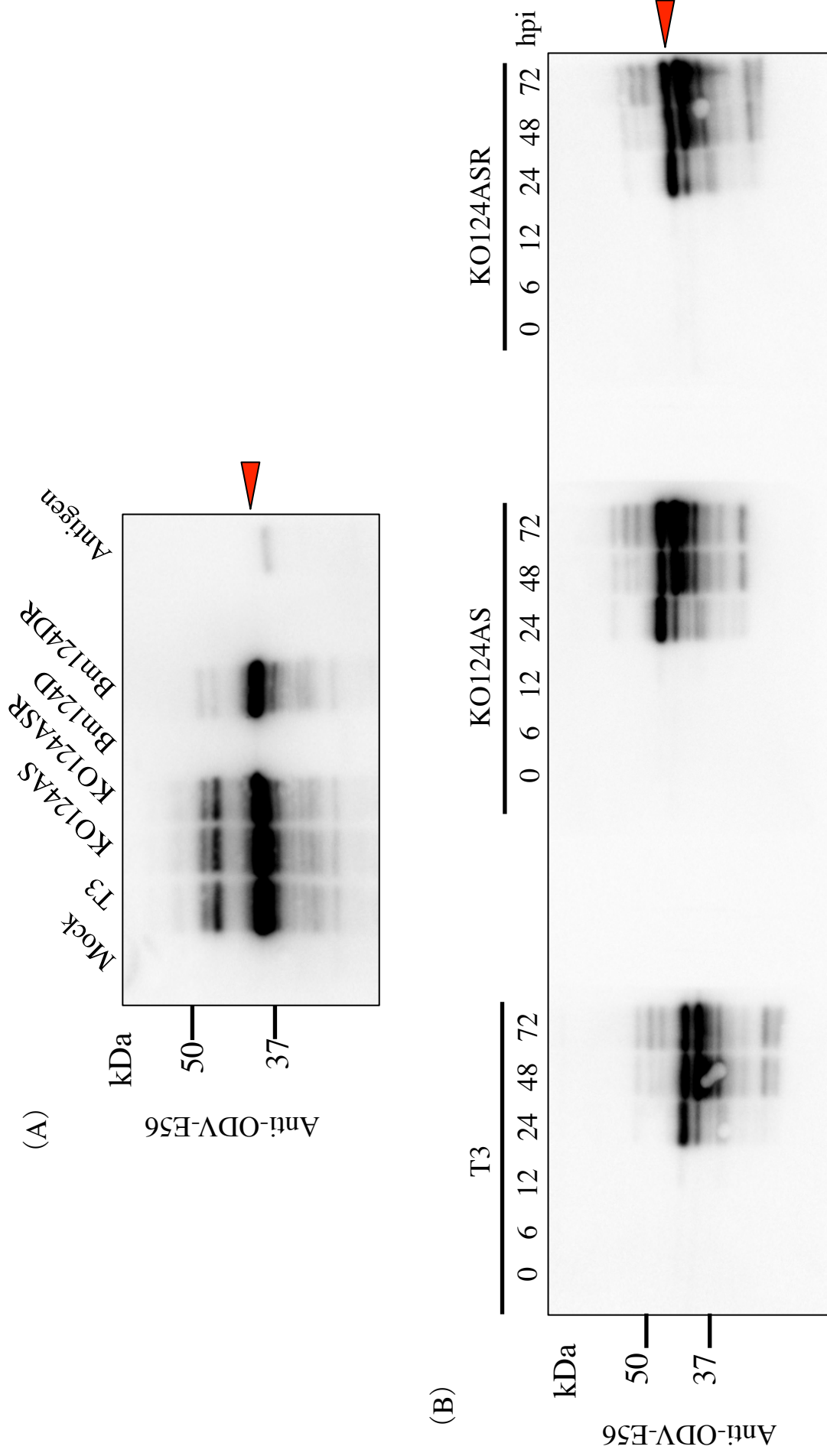


図24 : KO124AS感染細胞におけるODV-E56の検出

(A) ウイルス感染96時間後のBmN細胞ライセートと抗ODV-E56抗体を用いてウェスタンプロテイングを行った。Mockはウイルス非感染のBmN細胞を、Antigenは抗原として用いた組換えタンパク質を示している。(B) ウイルス感染経時的にサンプリングしたBmN細胞を用いてウェスタンプロテイングを行った。矢頭はODV-E56のアミノ酸配列から予測される約41kDaのシグナルを示している。

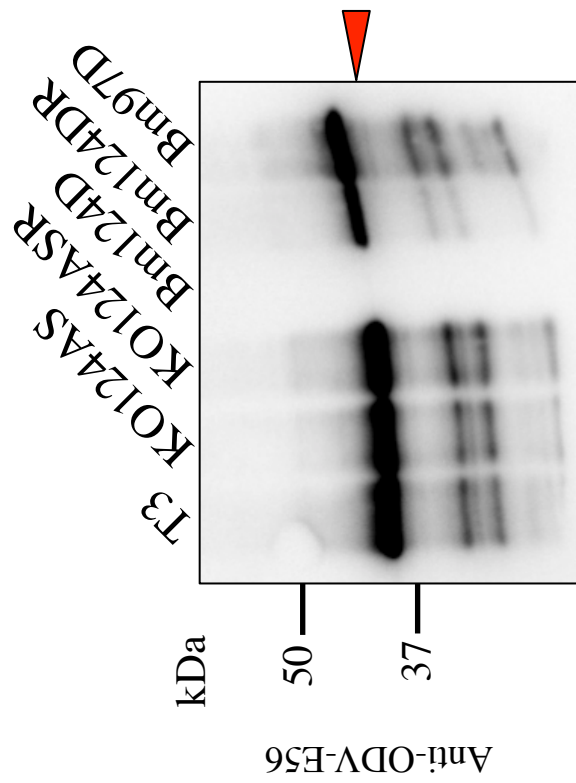


図25 : KO124AS由来ODV粒子におけるODV-E56の検出
各ウイルス由来のODV粒子と抗ODV-E56抗体を用いてウエスタンブロットティングを行った。

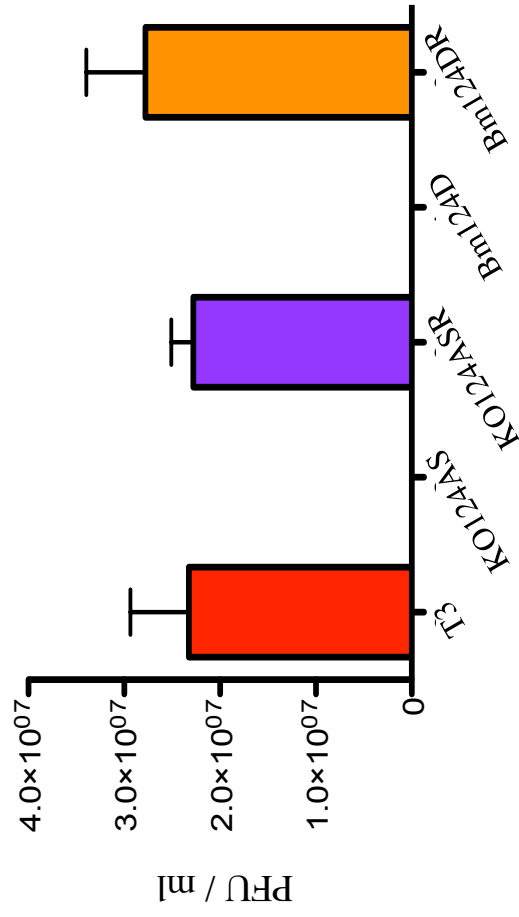


図26 : KO124ASを経口感染させたカイコ幼虫体液中のBV量
 T3、KO124AS、KO124ASR、Bm124D、およびBm124DRを経口感染し、3日後に5齢カイコ幼虫の体液中のBV産生量を調査した。

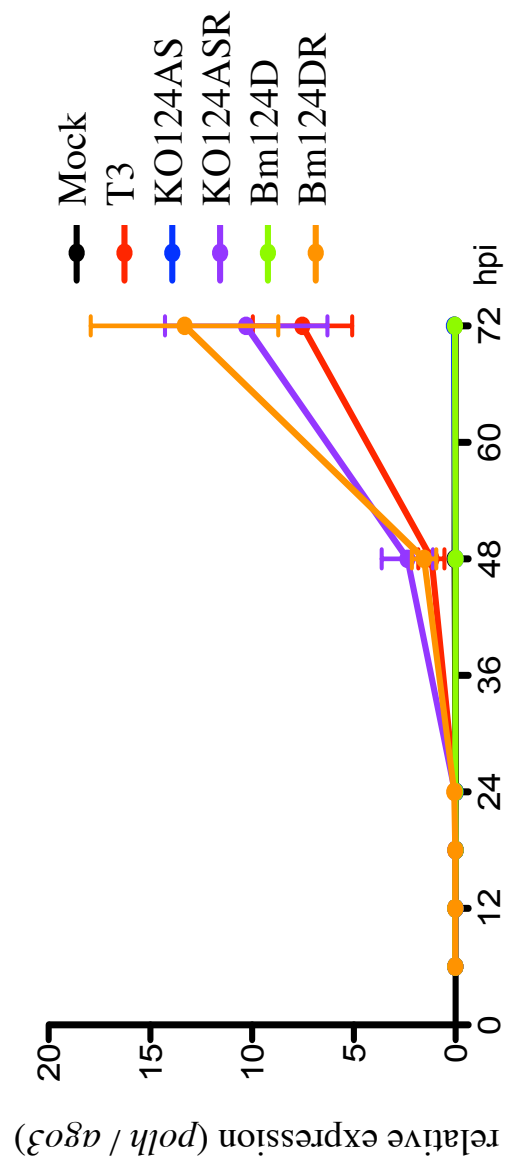


図27 : KO124ASを経口感染させたカイコ幼虫の中腸におけるウイルスゲノム量
 ウイルス非感染 (mock)、T3、KO124AS、KO124ASR、Bm124D、およびBm124DRを経口感染し、経時的に感染中腸をサンブ
 リングした。ウイルスゲノム量はqPCRによって定量した。

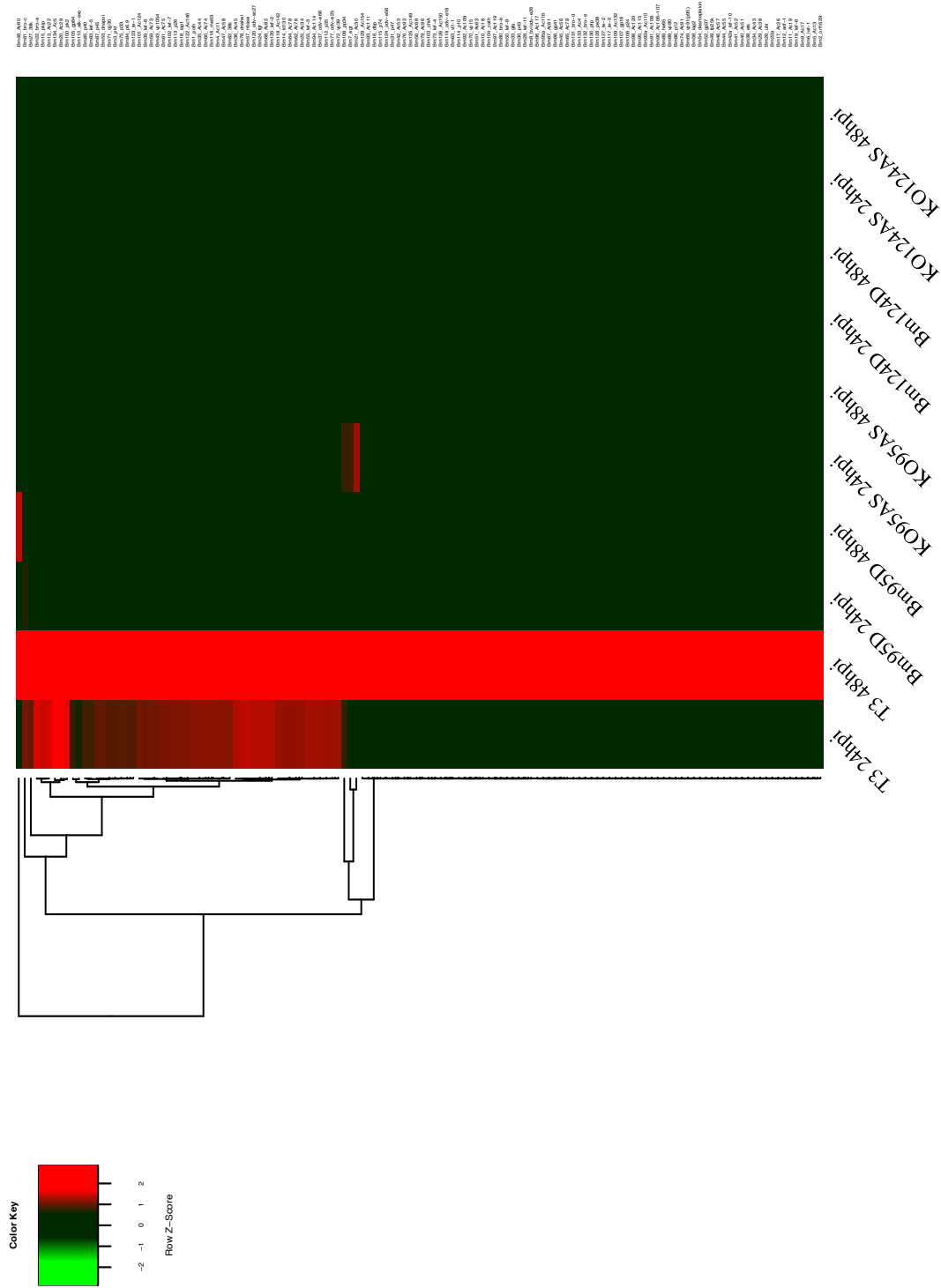


図28 : KO124AS、KO95AS経口感染カイコ幼虫の中腸におけるRNAシークエンシングを用いた発現解析
T3、KO124AS、Bm124D、KO95AS、およびBm95Dを経口感染させたカイコ幼虫の24、48時間後の中腸からRNAを抽出し、RNA
シークエンシングを行った。 ヒートマップはウイルス遺伝子の相対発現量を示している。

表13 : ODV-E56 stopを用いた経口感染実験

virus	7 dpi LC ₅₀	95% Confidence Intervals	
		Lower	Upper
T3	3.8×10^4	2.2×10^4	5.9×10^4
Bm124D	$> 1.0 \times 10^8$		
Bm124DR	3.9×10^4	2.4×10^4	5.8×10^4
ODV-E56 stop	$> 1.0 \times 10^8$		

T3、Bm124D、Bm124DR、ODV-E56 stopとカイコ一齢起蚕幼虫を用いて経口感染力の調査を行った。

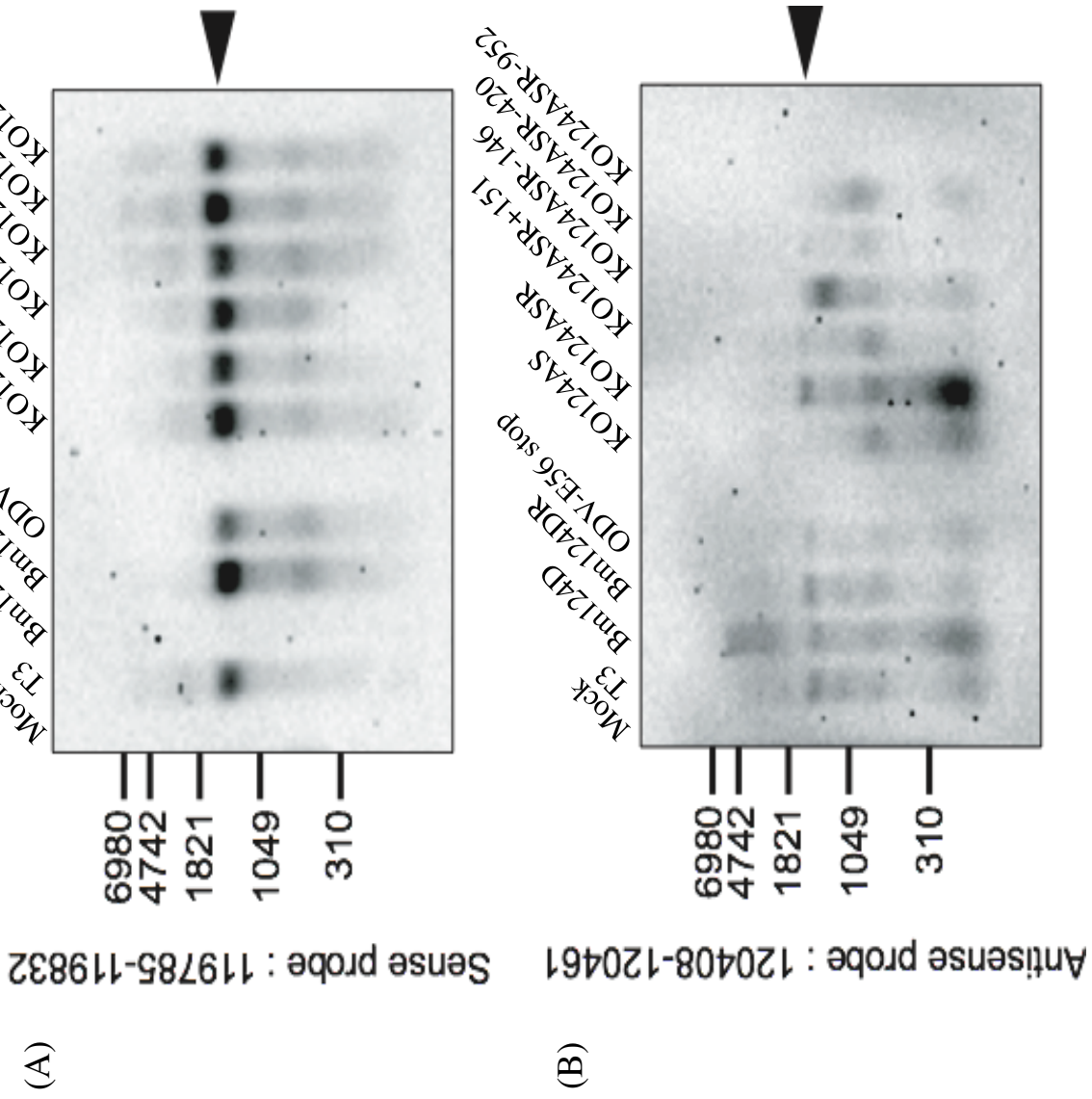


図29：変異ウイルス感染細胞における *odv-e56* mRNA、および *odv-e56* アンチセンス lncRNA の発現解析
 各変異ウイルス感染細胞を用いて (A) では、*odv-e56* mRNA を検出するノーザンブロットティングを行った。矢頭は *odv-e56* mRNA を示している。(B) では、*odv-e56* アンチセンス lncRNA を検出するノーザンブロットティングを行った。矢頭は *odv-e56* アンチセンス lncRNA を示している

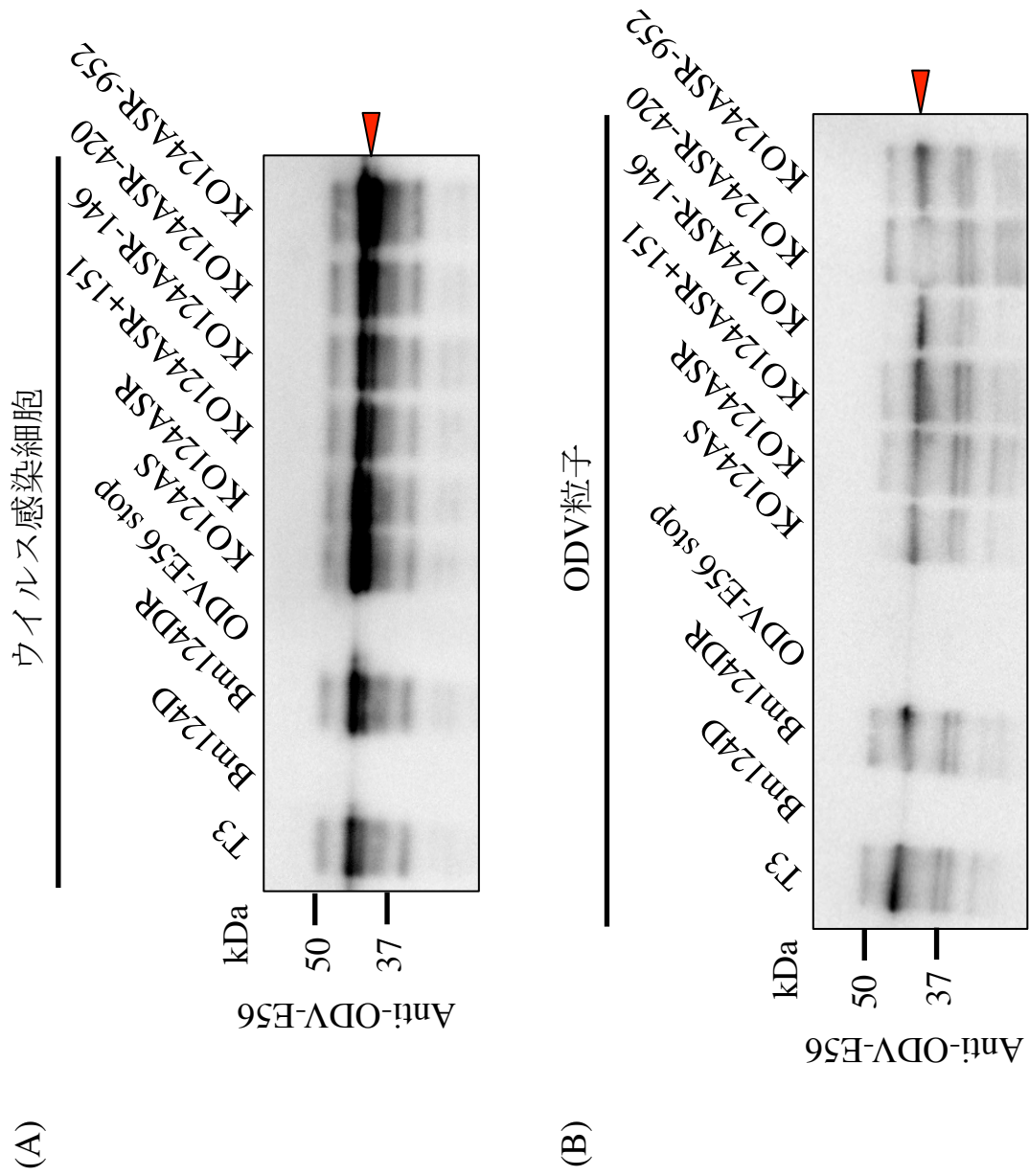


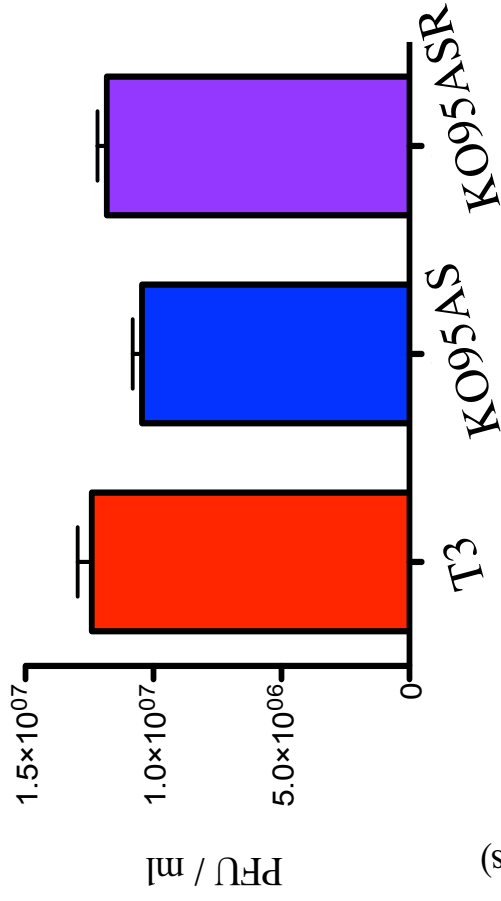
図30：変異ウイルス感染細胞、およびODV粒子におけるODV-E56の検出
 (A) 各ウイルス感染96時間後のBmN細胞ライセートと抗ODV-E56抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った。(B) 各ウイルス由来のODV粒子と抗ODV-E56抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った。

表14： *odv-e56* アンチセンスIncRNAプロモーター導入ウイルスを用いた経口感染実験

virus	7 dpi LC ₅₀	95% Confidence Intervals	
		Lower	Upper
T3	3.8×10^4	2.2×10^4	5.9×10^4
Bm124D	$> 1.0 \times 10^8$		
Bm124DR	3.9×10^4	2.4×10^4	5.8×10^4
KO124AS	$> 1.0 \times 10^8$		
KO124ASR	4.7×10^4	2.5×10^4	7.7×10^4
KO124ASR+151	1.8×10^7	3.4×10^6	3.6×10^8
KO124ASR-146	$> 1.0 \times 10^8$		
KO124ASR-420	3.0×10^6	1.7×10^6	4.6×10^6
KO124ASR-952	1.4×10^8	3.0×10^7	2.6×10^{14}

野生型ウイルスの*odv-e56*領域のアンチセンスRNAよりも151塩基長いアンチセンスRNAを復帰させたウイルスであるKO124ASR+151、146塩基短いアンチセンスRNAを復帰させたウイルスであるKO124ASR-146、420塩基短いアンチセンスRNAを復帰させたウイルスであるKO124ASR-420、および952塩基短いアンチセンスRNAを復帰させたウイルスであるKO124ASR-952とカイコ一齢起蚕幼虫を用いて経口感染力の調査を行った。

(A)



(B)

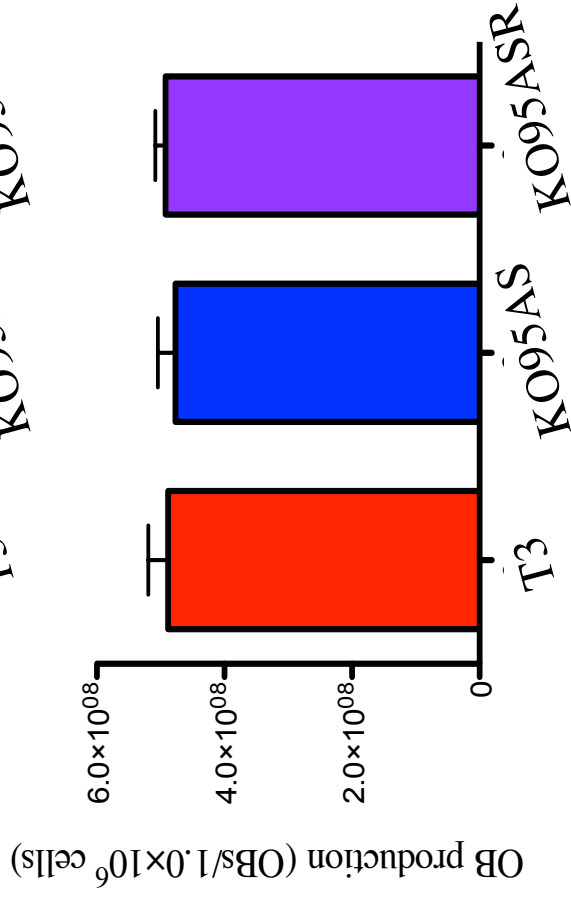


図31 : KO95AS感染細胞におけるBV産生量とOB産生量

(A) T3、KO95AS、およびKO95ASRを用いて感染96時間後のBmN細胞におけるBV産生量を調査した。(B) T3、KO95AS、およびKO95ASRを用いて感染96時間後のBmN細胞におけるOB産生量を調査した。

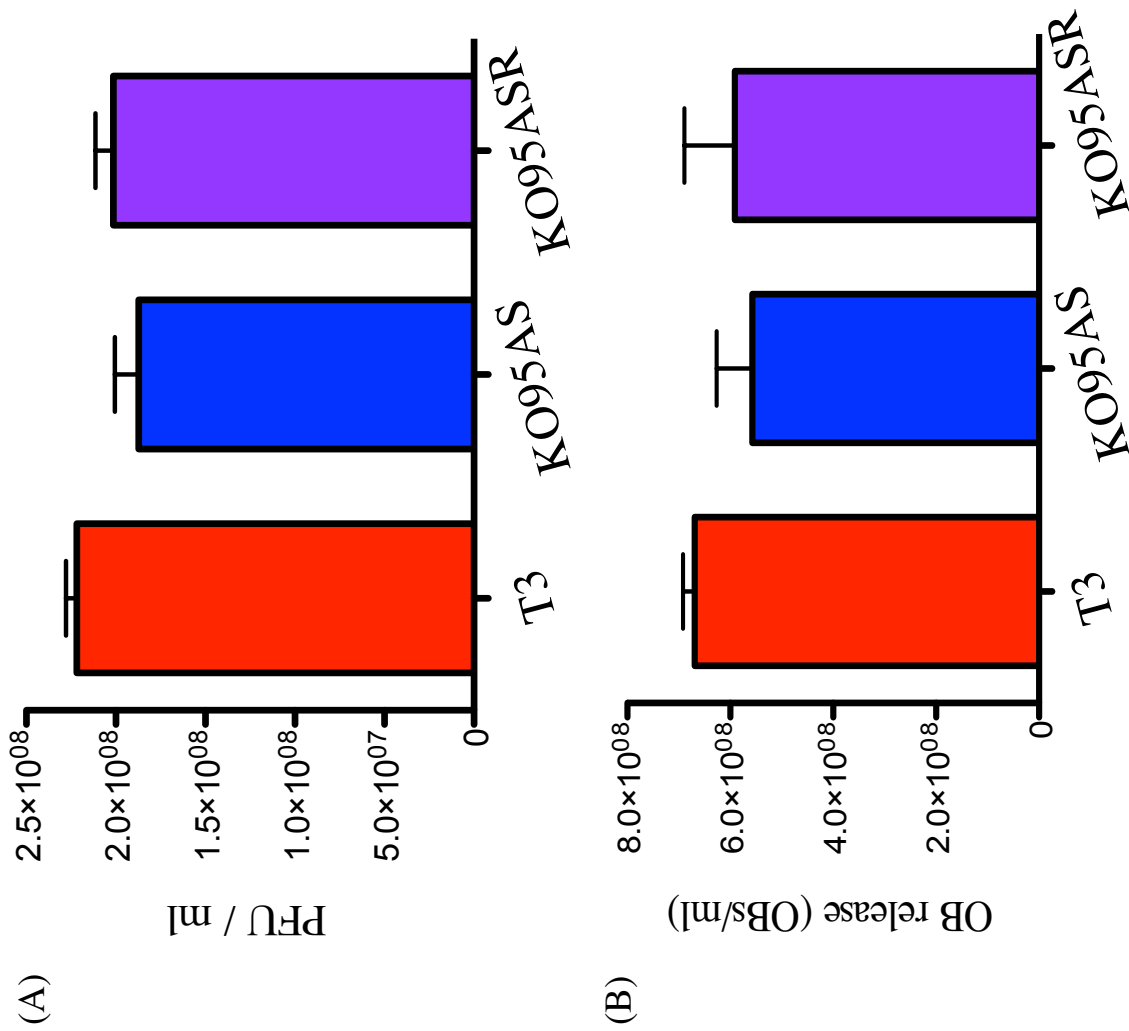


図32 : KO95AS感染カイコ幼虫におけるBV産生量とOB放出量

(A) T3、KO95AS、およびKO95ASRをカイコ5齢幼虫に感染させ、4日後に体液中のBV産生量を調査した。(B) T3、KO95AS、KO95ASRをカイコ5齢幼虫に感染させ、4日後に体液中のOB放出量を調査した。

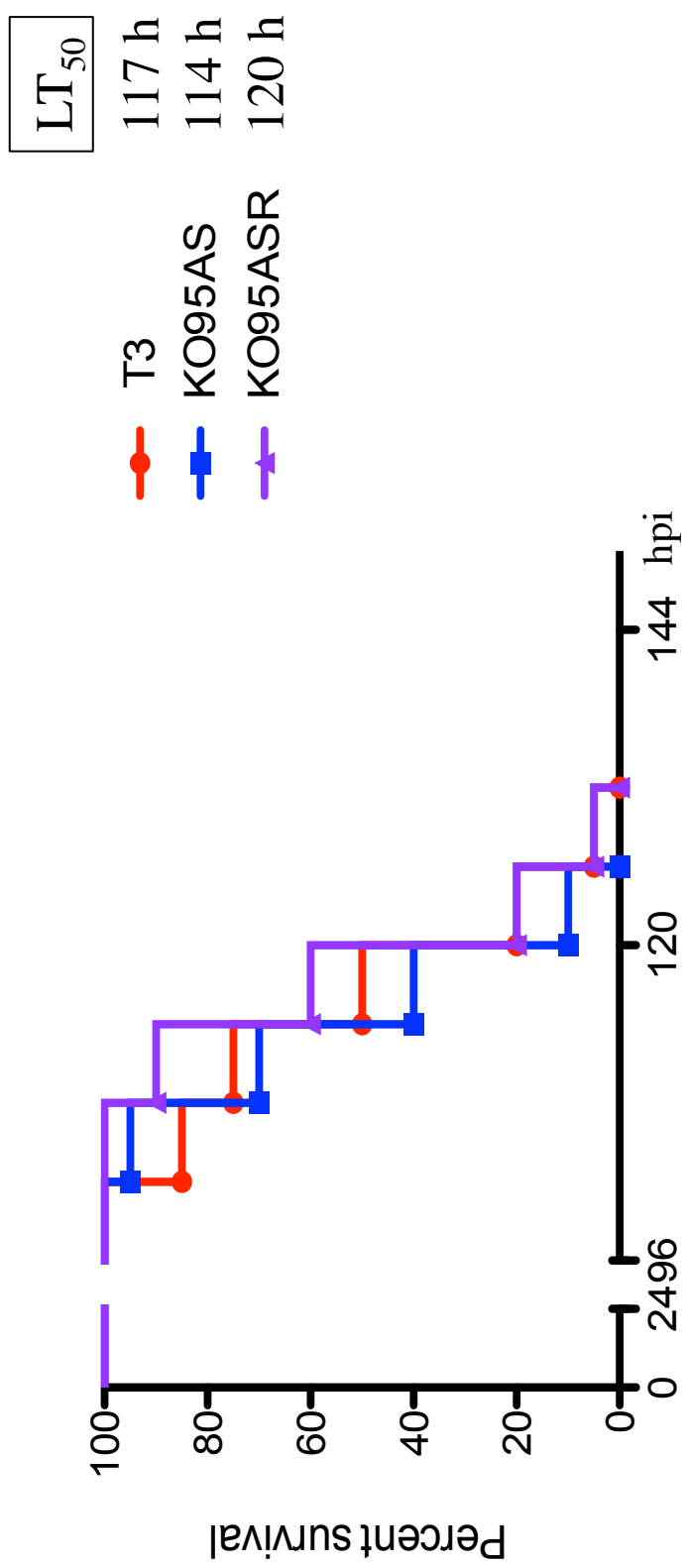


図33 : KO95AS感染カイコ幼虫の生存曲線
 T3、KO95AS、およびKO95ASRをカイコ幼虫に経皮接種し、致死時間を測定した。感染実験は各ウイルスについて20個体用いた。

表15 : KO95ASを用いた経口感染実験

virus	7 dpi LC ₅₀	95% Confidence Intervals	
		Lower	Upper
T3	2.1×10^4	8.3×10^3	3.6×10^4
KO95AS	$> 1.0 \times 10^8$		
KO95ASR	5.2×10^4	2.7×10^4	8.8×10^4
Bm95D	$> 1.0 \times 10^8$		
Bm95DR	3.4×10^4	2.1×10^4	5.0×10^4
Bm94D	1.0×10^5	6.4×10^4	1.6×10^5
Bm96D	6.0×10^4	3.8×10^4	8.9×10^4

T3、KO95AS、KO95ASR、Bm95D、Bm95DRとカイコー齡起蚕幼虫を用いて経口感染力の調査を行った。また、KO95AS感染細胞を用いたアンチセンスRNAを検出したノーザンブロットティングにおいてシグナルが消失したことから、Bm94D、Bm96Dを用いた経口感染力の調査を行った。

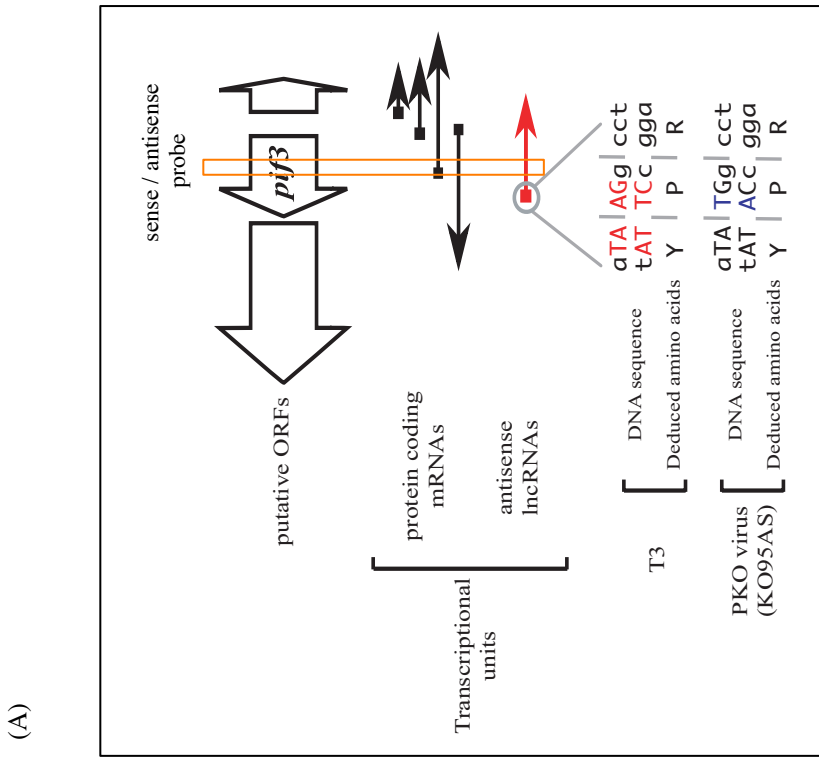
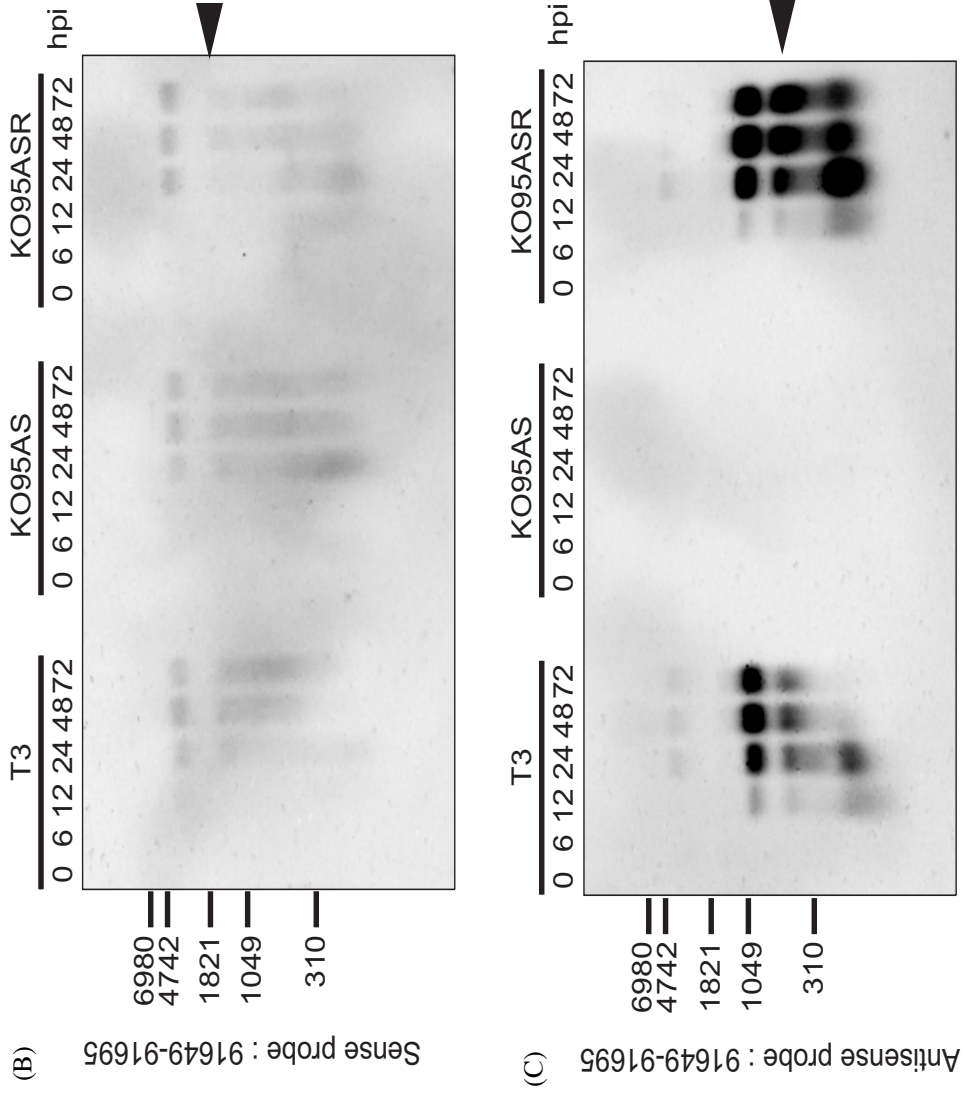


図34 : KO95AS感染細胞を用いた*pif-3*、および*pif-3*lncRNAの発現解析

(A) *pif-3*領域における転写ユニットとKO95ASの模式図を示した。用いたプローブの位置はオレンジのボックスで示している。T3、KO95AS、およびKO95ASR感染細胞を用いて (B) では、センスRNAを検出するノーザンブロットを (C) では、アンチセンスRNAを検出するノーザンブロットを行った。矢頭は欠失させたlncRNAのサイズを示している。KO95AS感染細胞において、全てのアンチセンスlncRNAの欠失が確認された。また、mRNAの発現量はT3及び、KO95ASR感染細胞と同程度であった。

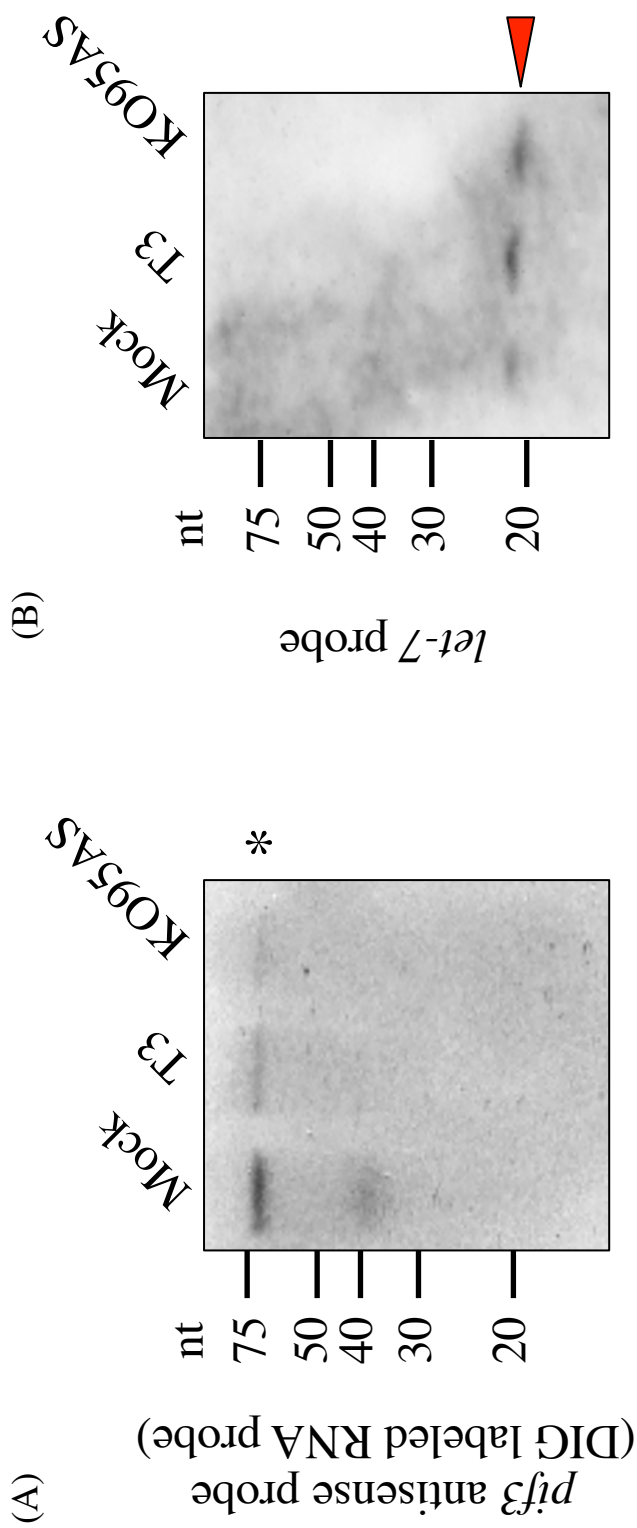


図35 : *pif-3*アンチセンスlncRNA領域における低分子RNAの探索

T3、KO95AS、およびBm95D感染細胞を用いて、*pif-3*アンチセンスlncRNA領域からmiRNAが産生されているかどうか調査した。(A)では*pif-3*アンチセンスlncRNA領域を検出するリボプローブを用い、(B)ではコントロールとして*let-7*をプローブとして用いてノーザンブロッティングを行った。*は非特異に検出されたシグナルを示し、矢頭は*let-7*を示している。

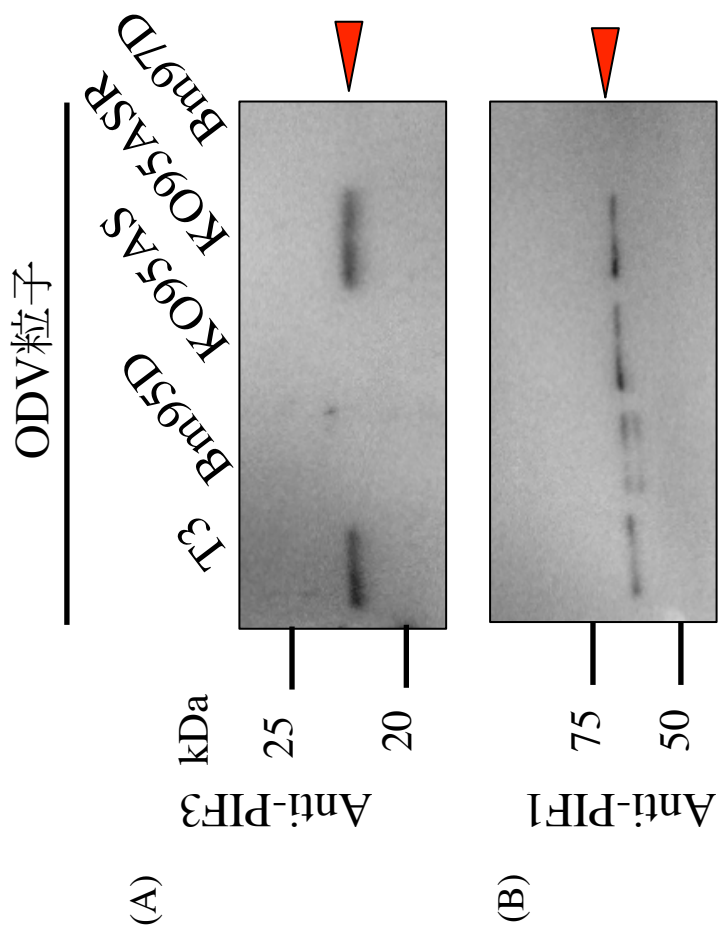


図36 : KO95AS由来ODV粒子におけるPIF-3の検出
 各ウイルス由来のODV粒子を用いてウエスタブロットティングを行った。(A) は抗PIF-3抗体、(B) はコントロールとして用いた抗PIF-1抗体の結果を示している。

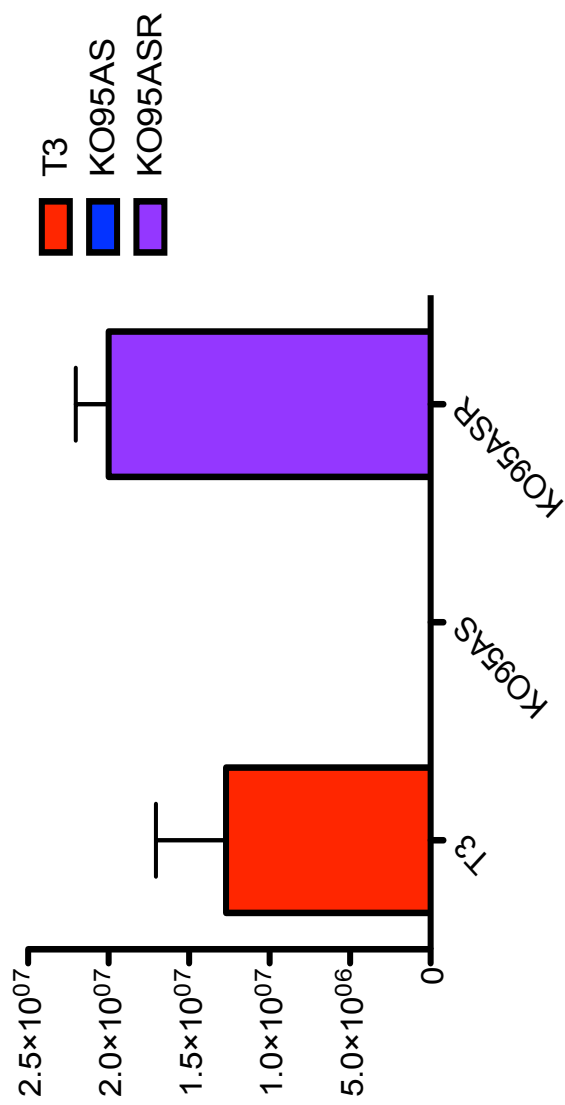


図37 : KO95ASを経口感染させたカイコ幼虫体液中のBV量
 T3、KO95AS、およびKO95ASRを経口感染し、3日後に5齢カイコ幼虫の体液中のBV産生量を調査した。

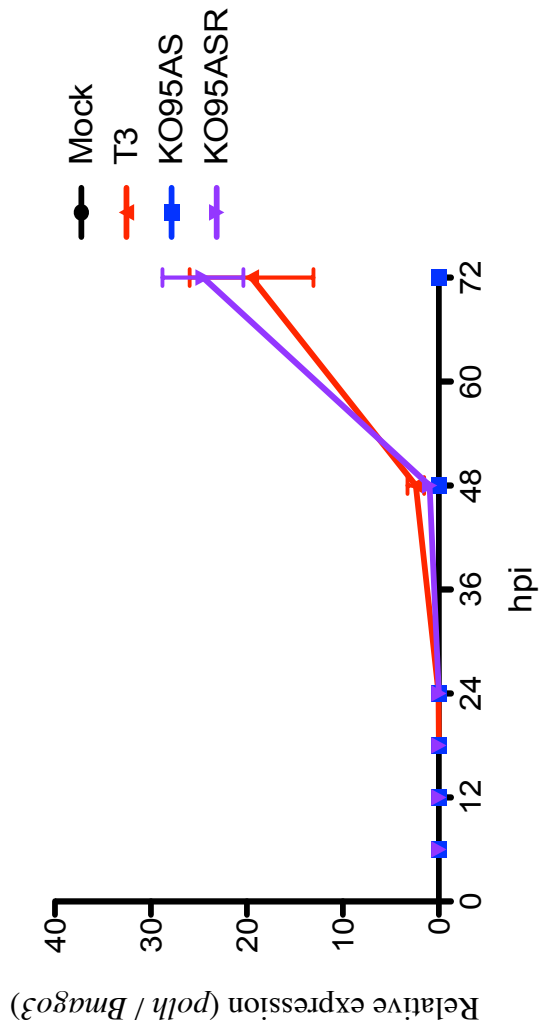
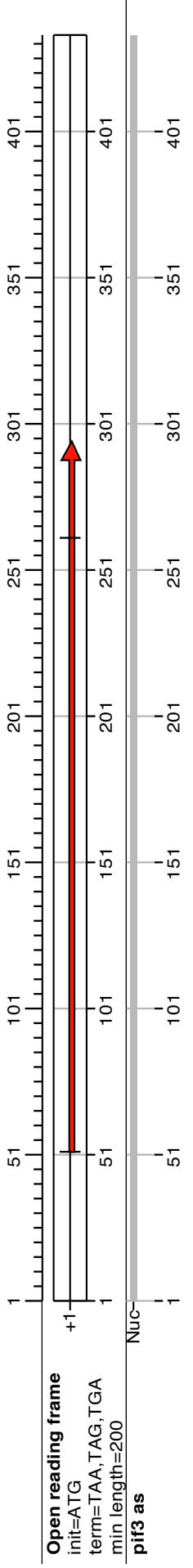


図38 : KO95ASを経口感染させたカイコ幼虫の中腸におけるウイルスゲノム量
 ウイルス非感染 (mock)、T3、KO124AS、およびKO124ASRを経口感染し、経時的に感染中腸をサンプリングした。ウイルス
 ゲノム量はqPCRによって定量した。

(A)



(B)

MLETRQNLRRLRRKCEASPVDRILSSPEPVR**LAKR**WWRYK**NHPGR**STR**LQ**R
W**KSR**SCLYTADPSRTVTGSMNNLRLDCAET

図39 : *pif-3*アンチセンスlncRNAにおけるORF探索

(A) *pif-3*アンチセンスlncRNA配列に80アミノ酸残基のペプチドの存在が予測された。(B) *pif-3*アンチセンスlncRNA配列に予測されるペプチドの配列を示した。赤字で示したメチオニン残基は、*pif3 AS peptide stop*にて変異導入したアミノ酸残基を示している。

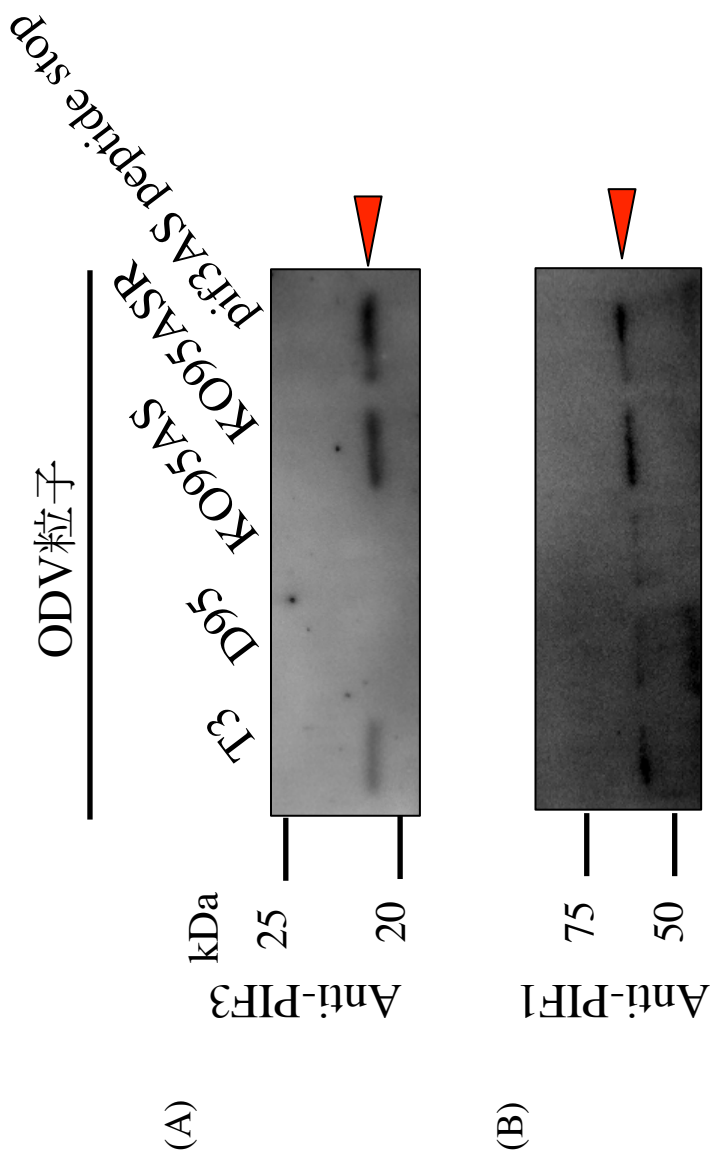


図40 : pif3 AS peptide stopのODV粒子におけるPIF-3タンパク質の検出
 各ウイルス由来のODV粒子を用いて (A) 抗PIF-3抗体、(B)抗PIF-1抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った。

表16： pif3 AS peptide stopを用いた経口感染実験

virus	7 dpi LC ₅₀	95% Confidence Intervals	
		Lower	Upper
T3	3.0×10^4	2.0×10^4	4.0×10^4
Bm95D	$> 1.0 \times 10^8$		
pif3AS peptide stop	1.1×10^5	7.7×10^4	1.5×10^5

T3、Bm95D、pif3AS peptide stopとカイコ一齢起蚕幼虫を用いて経口感染力の調査を行った。

総合考察

本博士論文は、バキュロウイルスから転写される機能性 lncRNA の探索と機能解析を目的として行ったものである。網羅的なトランスクリプトーム解析から同定された BmNPV 由来 lncRNA に対して、それらを欠失した PKO ウイルスを作成し、性状解析を行うことで最終的に 3 種類の機能性 lncRNA を獲得した。

現在までに報告されている真核生物やウイルスにおける機能性 lncRNA の知見について、図 42 に模式図を示した (Geisler and Collier, 2013)。本研究で見いだしたバキュロウイルス由来 lncRNA の作用モデルを考えるため、以下にそれぞれの作用機序を概説する。

① *Xist RNA* (Zhao et al. 2008, Jeon and Lee, 2011) や *PAN RNA* (Borah et al. 2011, Rossetto and Pari, 2012, Rossetto et al. 2013) は、クロマチン修飾を介した発現制御を行うことが報告されている。これらの lncRNA はヒストン修飾酵素との結合と、相補性をもつ DNA 領域との結合を共に行うことで、特定の遺伝子領域のエピジェネティックな制御を達成している。

② 転写干渉によって mRNA の発現制御を行う lncRNA としてアカパンカビの *qrf* が報告されている。*qrf* は、アカパンカビの概日リズム関連遺伝子である *frequency*

(*frq*)領域 (Merrow et al. 1999, Hong et al. 2008) のアンチセンス lncRNA である。

qrf は上流領域に光刺激により発現誘導される転写因子の結合部位を持ち、光刺激により *qrf* の発現が上昇することで、センスの *frq* の発現がシスに抑制されている (Xue et al. 2014)。

③ *MALAT1* は、6.5 kb 以上長さを持つ lncRNA であり、mRNA に必須な因子である *serine/arginine splicing factor 1* (*SRSF1*) と共局在をして、*SRSF-1* のリン酸化状態を制御することで pre-mRNA の選択的スプライシングに寄与していると考えられている (Tripathi et al. 2010)。

④ mRNA の安定性に寄与している lncRNA である *BACE1AS* は、アルツハイマー病に関連する *beta-site APP-cleaving enzyme 1* (*BACE1*) 遺伝子のアンチセンス RNA である。*BACE1* mRNA と結合することで、mRNA と miRNA (*miR-485-5p*) の結合を阻害していることが報告されている (Faghihi et al. 2008, Faghihi et al. 2010)。また、*PTENP1* (Poliseno et al. 2010, He. 2010) や *KRAS1P* (Poliseno et al. 2010) は偽遺伝子領域から転写される lncRNA であり、miRNA のデコイとして分解されることで mRNA の保護をしている事が報告されている。*l/2-sbsRNAs* は、mRNA の Alu 反復配列を含む 3'UTR 配列と結合し、二本鎖 RNA 結合タンパク質 *stau1* (*STAU1*) を誘導することで、最終的に mRNA の分解を促進することが報告されている (Gong and Maquat. 2011)。

⑤翻訳制御に関わる lncRNA としては、翻訳促進に関わる *AS Uchl1* (Carrieri et al. 2012) と翻訳抑制に関わる *lincRNA-p21* (Yoon et al. 2012) が報告されている。

AS Uchl1 は、*ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 (Uchl1)* のアンチセンス RNA として転写される lncRNA であり、5'領域にリボソームとの親和性を持つ *short interspersed nuclear element B2 (SINEB2)* 配列を持つ。*Uchl1* mRNA が *AS Uchl1* の 3'領域と結合することで翻訳促進が達成されている (Carrieri et al. 2012)。

lincRNA-p21 は、 β -*catenin (CTNNB1)* と癌遺伝子 *JunB* の mRNA と相補性により結合する (Yoon et al. 2012)。また、RNA 結合タンパク質の *ATP dependent RNA helicase (DDX6、Rck)* タンパク質 (Smillie and Sommerville. 2002) と、翻訳抑制因子である *Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP)* (Ascano et al. 2012) とも結合し、複合体を形成することで目的の mRNA の翻訳抑制を行うことが報告されている (Yoon et al. 2012)。

⑥RNA-タンパク質複合体 (RNP) を形成してタンパク質の活性の制御や、核内パラスペックルの構成因子として働く機能性 lncRNA も報告されている。上述したウイルスの産生する lncRNA である *EBERs* (Owen et al. 2010, McKenna et al, 2007) と *VAI noncoding RNA* (Kitajewski et al. 1986, Ma and Mathews. 1996, MaKenna et al. 2007) は、共に RNA の高次構造と宿主細胞内の PKR が結合することで、最終的に生体防御機構を阻害する。*NEAT1* は、核内構造体であるパラ

スペックルを形成するための核となる lncRNA である (Sasaki et al. 2009)。NEATI には 3.7 kb の NEAT_1 と、23 kb の NEAT_2 が有り、NEAT_2 はトリプルヘリックス構造と tRNA 様構造を形成しており (Naganuma et al. 2012)、40 種の RNA 結合性タンパク質と相互作用することでパラスペックルを形成する (Hirose et al. 2014)。このように、機能性 lncRNA は高次構造に依存してタンパク質と結合したり、塩基配列の相補性によって mRNA や miRNA と結合することで、様々な生命現象に関与していることが明らかとなってきた。

上述の機能性 lncRNA の作用機序を元に、本研究で同定された 3 種類のバキュロウイルスから転写される機能性 lncRNA の作用機構モデルを考察する。Bm122 アンチセンス lncRNA を欠損した KO122AS 感染細胞を用いたノーザン解析の結果、Bm122 mRNA の転写が著しく減少していた (図 13)。このことから、Bm122 アンチセンス lncRNA と mRNA と結合することにより RNA の安定性の向上や、miRNA のデコイとして機能することで mRNA を保護する役割を果たしている可能性が考えられる (図 43)。また、odv-e56 アンチセンス lncRNA を欠損した KO124AS ウイルスにおいては、mRNA の転写、ODV-E56 タンパク質の翻訳や ODV 粒子へのリクルートには関与していないにも関わらず、経口感染力が消失していた。このことから odv-e56 アンチセンス lncRNA と ODV-E56 タンパク質

が結合し複合体を形成することで、経口感染に機能することが可能となっている可能性が考えられた (図 44)。また、*pif-3* アンチセンス lncRNA を欠失した KO95AS においては、*pif-3* mRNA の転写には影響がないにもかかわらず、PIF-3 タンパク質が ODV 粒子へ含まれておらず、経口感染力が消失していた。このことから *pif-3* アンチセンス lncRNA は、*pif-3* mRNA と結合することで PIF-3 タンパク質の翻訳を促進している可能性、PIF-3 タンパク質と結合することで PIF-3 タンパク質の安定性を向上している可能性、PIF-3 タンパク質の核内への移行や ODV 粒子へのリクルートに関与している可能性が考えられた (図 45)。今後 Ribonuclease protection assay や RNA-pull down assay を用いて lncRNA と結合する因子を同定することで、それぞれの lncRNA の詳細な機能が明らかになることが期待される。

Chen らが行った AnMNPV 感染細胞を用いた RNA シークエンシングを用いたトランスクリプトーム解析の結果から (Chen et al. 2013)、本研究で発見した 3 種類の機能性 lncRNA が BmNPV だけでなく AcMNPV においても転写されていることが判明した。そこで、本研究で選抜した機能性 lncRNA 候補転写ユニットの中から、AcMNPV においても保存されているアンチセンス転写ユニットを探索した。その結果、新たに *arif-1*、*orf92*、*pif-1*、*orf111*、*p74*、*ie2*、および *orf129*

の領域から転写されるアンチセンス lncRNA が、BmNPV と AcMNPV に共通して転写されていることが明らかになった。これらの転写ユニットもウイルス感染に何らかの役割を果たしている可能性が考えられることから、新たに PKO ウイルスを作成し、それらの解析を進める必要があるだろう。*pif-1* および *ie2* 領域から転写される lncRNA に関しては、本研究において KO97AS5 と KO127AS3 という PKO ウイルスを用いた性状解析を行ったが、野生型ウイルスとの表現型の違いは認められなかった。今回行った機能性 lncRNA のスクリーニングは、ウイルス増殖と病原性を一定の条件下で調査したものである。例えば、感染時に温度変化を与えた場合のウイルス増殖や、OB を紫外線や乾燥状態に晒した後に経口感染力を測定するなど、より自然環境状態に近い条件を考慮したスクリーニングを行うことで、今回野生型ウイルスと同様の表現型を示した PKO ウイルスの中からも新たな機能をもつ lncRNA を同定できるかもしれない。

DNA ウイルスにおける機能性 lncRNA の報告はほとんどなく (Cox and Sullivan, 2014)、本研究で発見した機能性 lncRNA はバキュロウイルスにおける最初の知見である。これまで、バキュロウイルスの機能解析の多くは、ORF にコードされたタンパク質に着目して行われてきた。本研究により、今まで世界中の研究者が注目してこなかった非コード転写ユニットに機能を確認することができた。

今後は、ORF をコードした mRNA だけでなく、同じ領域に存在する他の転写ユニットに対しても機能性 lncRNA や機能性ペプチドをコードしている可能性について考慮して研究を行う必要があると言える。また、バキュロウイルス感染時に発現している転写ユニットは、複雑に組み入れていることがわかっている (図 4)。ウイルスゲノムがコードしている転写ユニットは mRNA だけでなく、複数の ORF を持つ転写ユニット、機能性 lncRNA、また *gp64* の初期転写産物のように同じ ORF をコードしていてもプロモーターの違いによる発現タイミングの違いから組織特異的に機能する転写ユニットも存在している。このことから、これまで行われてきた遺伝子破壊カセットによる各遺伝子の欠損ウイルスを用いた機能解析の中には、目的とするタンパク質の欠失だけでなく、近傍領域に存在する他の機能性転写ユニットも共に欠失してしまうことで、本来のタンパク質の機能を正しく解析できていないものがあるかもしれない。今後は、本研究で作成した PKO ウイルスやタンパク質の翻訳をアミノ酸置換で終止させたウイルスのような、目的とする因子のみを欠失させた変異ウイルスを用いた解析を行うことによって、より正確にバキュロウイルス遺伝子の機能解析を行うことが出来ると考えられる。

本研究、および既報の研究結果から、バキュロウイルス感染におけるバキュロ

ウイルス由来非コード RNA の位置づけは以下のようになる。バキュロウイルスが宿主細胞内へ感染しウイルスゲノムが核内へ侵入すると、宿主の RNA ポリメラーゼによってウイルスの初期プロモーターから初期遺伝子が転写される。感染初期においては miRNA の *bmnpv-miR-1* が宿主の生体防御機構を阻害し、*bmnpv-miR-3* が感染初期に不要なウイルス後期遺伝子の僅かな発現を抑制する (Singh et al. 2012, Singh et al. 2014)。感染後期にはウイルス由来 RNA ポリメラーゼ (LEF-8、LEF-9、LEF-4、P47) によってウイルス後期プロモーターから後期遺伝子の転写が開始され、ウイルスゲノムの複製、BV 産生、ODV 産生、および宿主遺伝子発現のシャットオフが起こる。感染後期において *acmnpv-miR1* は後期遺伝子 (*odv-e25*) の発現制御を行うことで BV と ODV を産生するタイミングの調整を行い (Zhu M et al. 2013)、*Bm122* アンチセンス lncRNA は必須遺伝子である *Bm122* mRNA の転写促進もしくは安定性を上昇させている。また、*odv-e56* アンチセンス lncRNA と *pif-3* アンチセンス lncRNA は ODV 粒子の感染性に必須な役割を果たす。そして、VLF-1 の最後期遺伝子 *polh* および *p10* のプロモーター領域への結合により (Yang and Miller. 1999)、感染最後期には強力なプロモーター活性を持つ *polh* の高発現が達成され、最終的には大量の多角体が産生される。このように、バキュロウイルス感染時における遺伝子発現制御は、初期プロモーター、後期プロモーターの違いによる制御だけでなく、miRNA に

よる抑制と lncRNA の関与により時空間特異的に最適化されていることが明らかになった。また、一部の lncRNA (*odv-e56* アンチセンス lncRNA および *pif-3* アンチセンス lncRNA) は自然環境下におけるウイルスの感染性に寄与しており、バキュロウイルスのライフサイクルに必須の要素となっていることも判明した。今後、ウイルスゲノム由来の miRNA や lncRNA を、タンパク質をコードする mRNA と同様に 1 遺伝子として解析を行うことで、ウイルスゲノムにおける時空間特異的な遺伝子発現制御機構が詳細に解明されるようになるだろう。

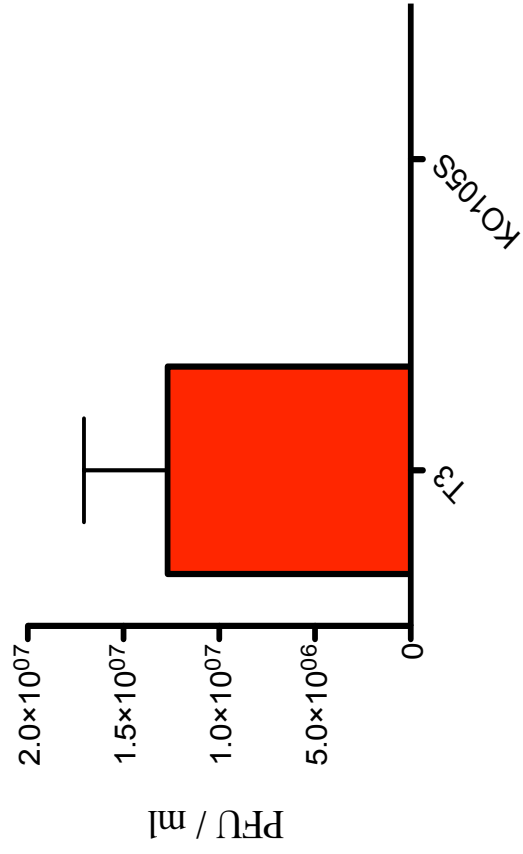
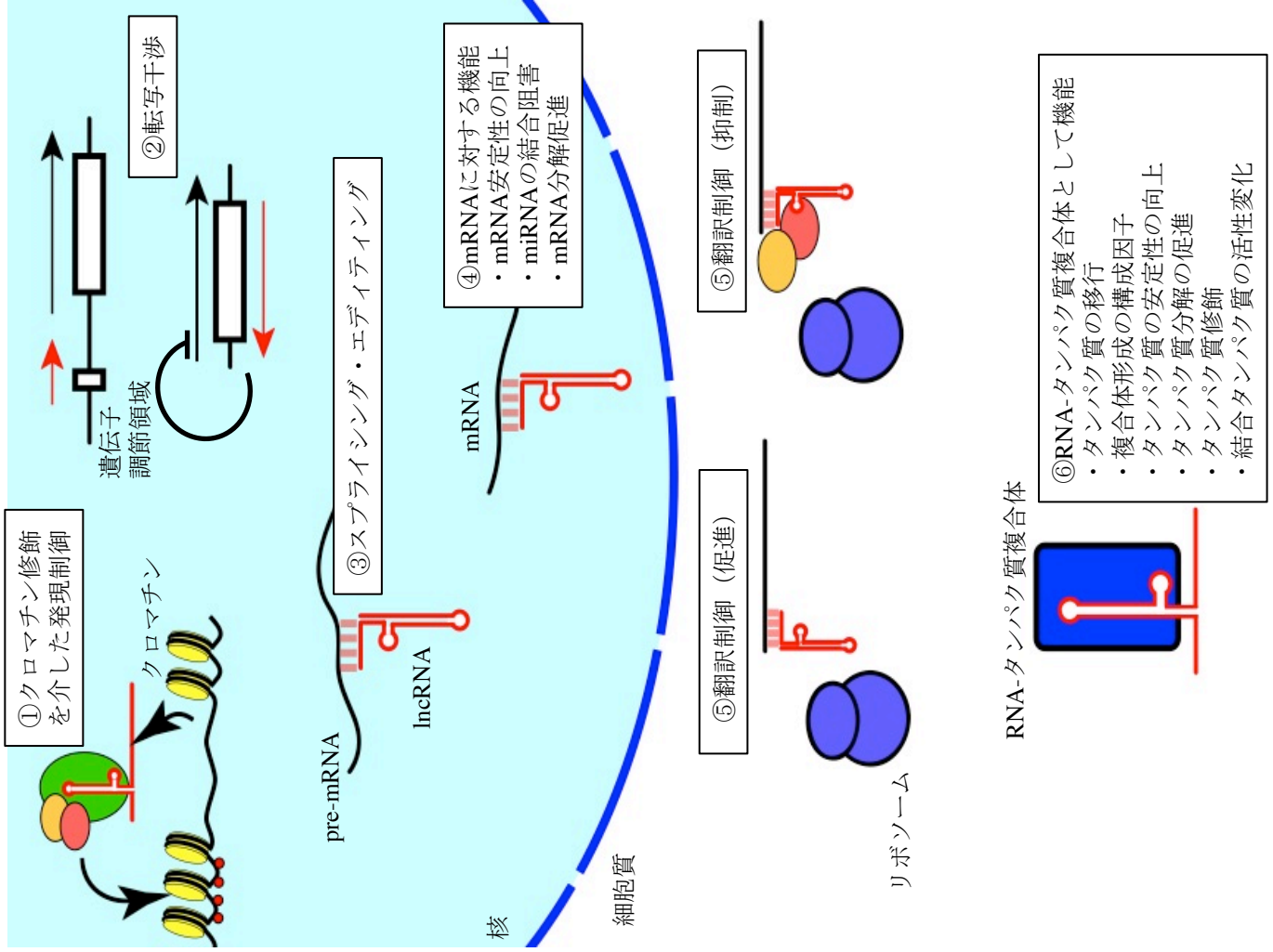


図41 : KO105Sを経口感染させたカイコ幼虫体液中のBV量
T3、KO105ASを経口感染し、3日後に5齢カイコ幼虫の体液中のBV産生量を調査した。

現在まで報告されている機能性lncRNAの例

- ①クロマチン修飾を介した発現制御
 - ・発現抑制→*Xist*, *Tsix*, *MALAT1*, *HOTAIR*, *TUG1*
 - ・発現促進→*PAN RNA*, *HOTTIP*, *Mistral*
- ②転写干渉
 - ・遺伝子調節領域の転写→*PU.1*
 - ・アンチセンスRNAの転写→*qrf*, *IME1 antisenseRNA*
- ③スプライシング・エディティング
 - MALAT1*, *SRA-1*, *Neuroblastoma MYC*
- ④mRNAに対する機能
 - ・mRNAとの結合による安定性の向上→*BACE1AS*
 - ・miRNAの阻害 (デコイ) →*linc-MD1*, *PTENP1*, *VAI noncoding RNA*, *KRASIP*
- ⑤ mRNA 分解促進→*I/2-sbsRNAs*, *Emx2 AS*, *TINCR*, *Sas10 mRNA 3'UTR*, *Myc*, *Tie-1AS*
- ⑥翻訳制御
 - ・翻訳促進→*antisense Uchl1*, *ZEB2 (NAT)*
 - ・翻訳抑制→*lincRNA-p21*, *BCI*
- ⑦RNA-タンパク質複合体として機能
 - EBERs*, *VAI noncoding RNA*, *NEAT1*, *gomafu*, *NCRNACCND1*, *SRP RNA*

図42：現在まで報告されている機能性lncRNAの例



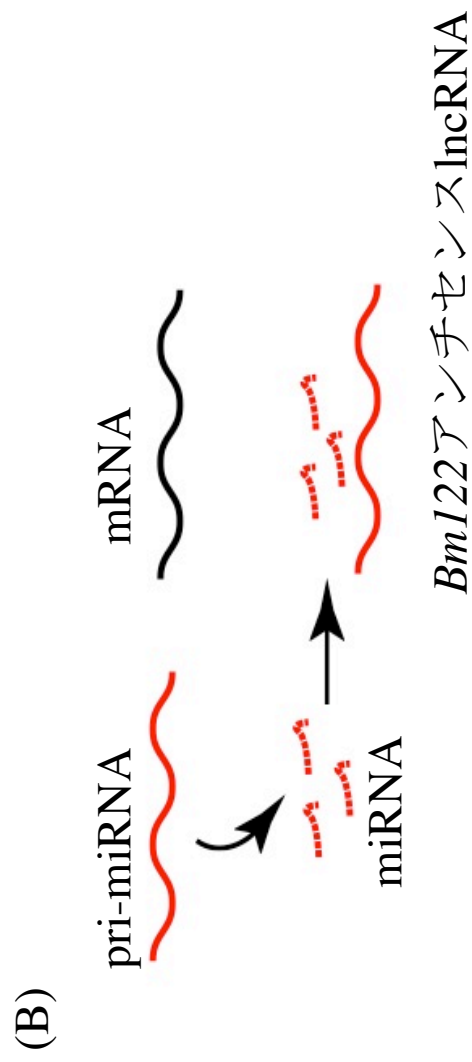
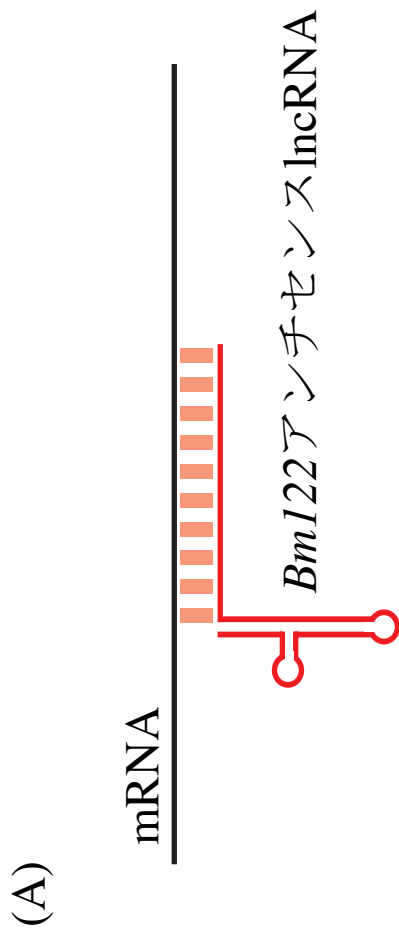


図43：予測される*Bm122*アンチセンスlncRNAの作用機構
 (A) mRNAと結合し安定性を向上させている可能性、(B) miRNAのデコイとして働きmRNAを保護している可能性が考えられる。

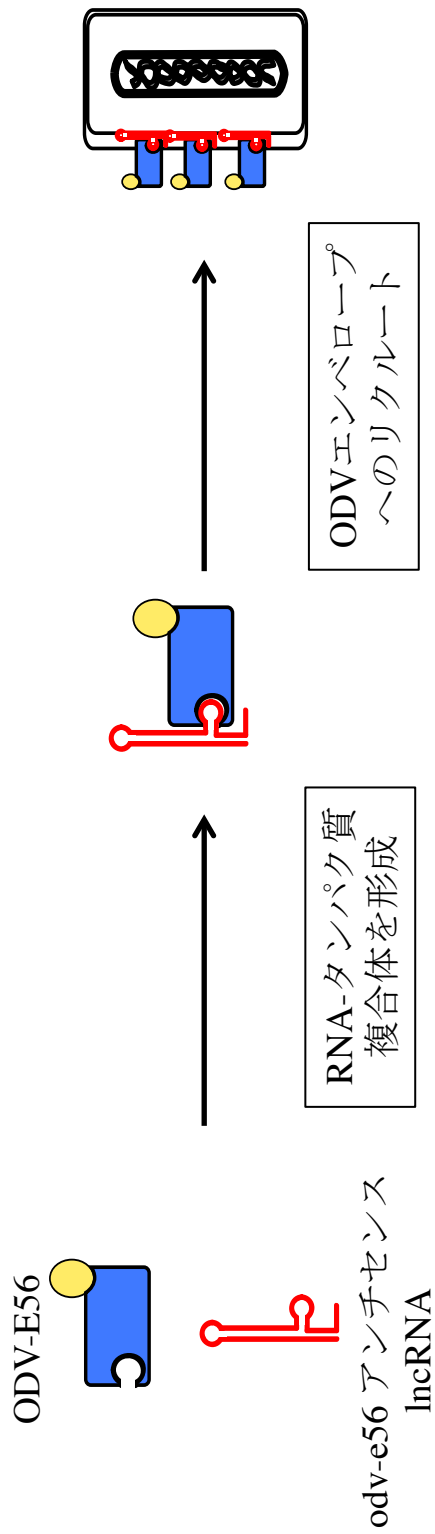


図44：予測されるodv-e56アンチセンスIncRNAの作用機構
odv-e56アンチセンスIncRNAとODV-E56タンパク質が結合し複合体を形成することで、経口感染に機能することが可能となっている可能性が考えられる。

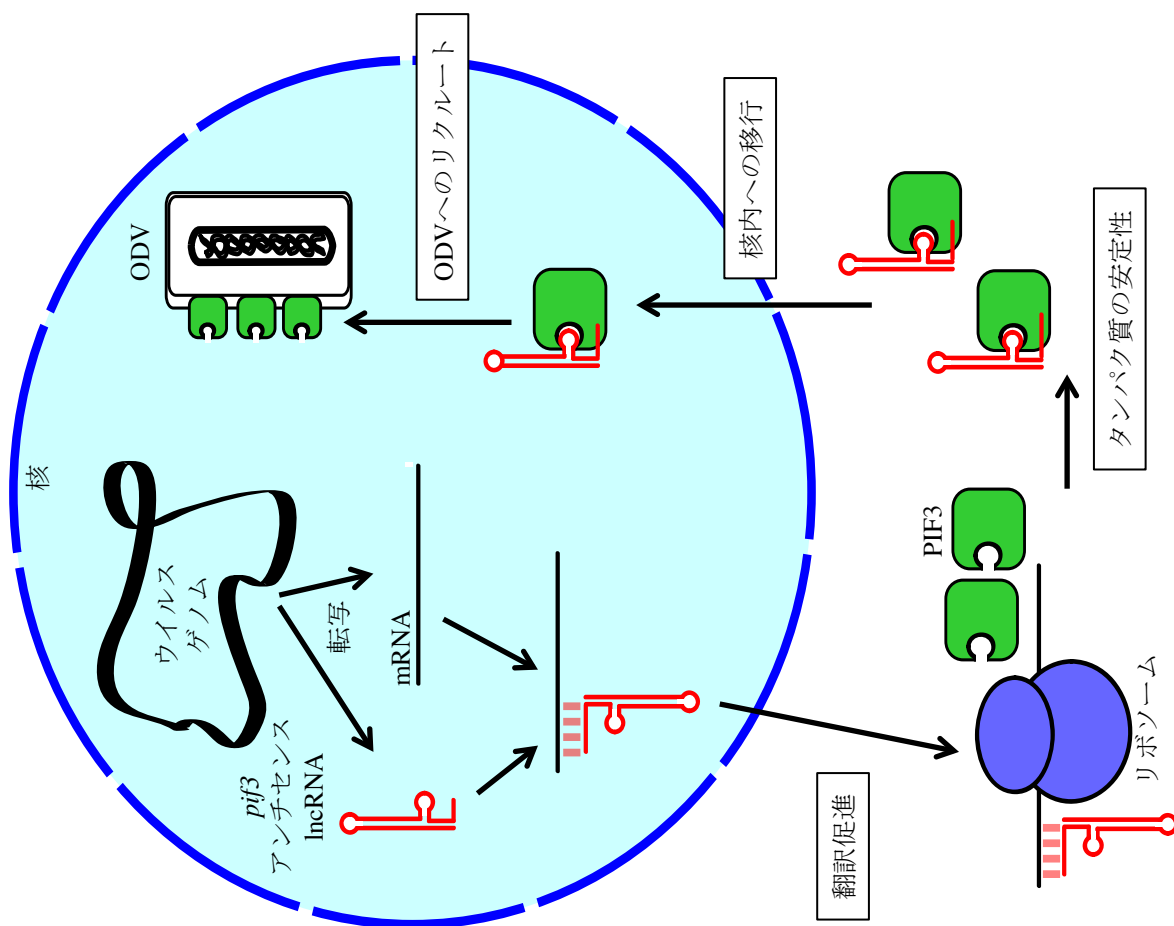


図45：予測される *pif-3* アンチセンス lncRNA の作用機構
pif-3 アンチセンス lncRNA は PIF-3 タンパク質の翻訳促進や、複合体を形成することでタンパク質の安定性や移行に関与している可能性が考えられる。

摘要

昆虫ウイルスの一種であるバキュロウイルスは、80～180 kbpの環状二本鎖DNAをゲノムとする大型DNAウイルスである。バキュロウイルスはウイルス粒子を封入する結晶構造（封入体）を形成する特徴があり、その性状の違いにより核多角体病ウイルス（nucleopolyhedrovirus; NPV）と顆粒病ウイルス（granulovirus; GV）に大別される。NPVの封入体は多角体（occlusion body, OB）と呼ばれる。バキュロウイルスには、包埋ウイルス（occlusion-derived virus; ODV）と出芽ウイルス（budded virus; BV）という構造の異なる二種類のウイルス粒子が存在し、それぞれライフサイクルにおける役割が異なっている。NPVの自然環境下での感染ルートは経口感染である。すなわち、宿主昆虫が多数のODVが包埋されたOBを食下すると、中腸で分泌されるアルカリ性の消化液によりOBが溶解し、包埋されていたODVが中腸内に放出される。ODVが中腸円筒細胞に侵入することで感染が始まる（一次感染）。細胞外へ放出されたBVは、血球や脂肪体など他の組織の細胞膜に吸着した後、エンドサイトーシスにより細胞質に侵入することで新たな感染を成立させる（二次感染）。感染細胞から産生されるBVは、細胞間感染に利用され、宿主個体全身に感染を広げていく。そして、感染末期には、ODVが封入されたOBが大量に形成され、宿主昆虫は死に至る。致死した宿

主は、ウイルスが作り出すカテプシンやキチナーゼの作用により表皮が溶解し、OBが自然環境中へ放出される。OBは非常に強固な構造を持ち、自然環境下において長期間に渡り紫外線や乾燥からODVを保護することが可能である。昆虫体外へ拡散したOBは、新たな宿主昆虫に食下されることで、他個体への感染が成立する。

バキュロウイルスは自身の増殖を有利に進めるために、脱皮ホルモンであるエクダイソンの不活化やアポトーシスの阻害、およびワンダリング行動の誘起といった非常に高度な宿主制御を行う。このような複雑な制御を行うためには、厳密な遺伝子発現制御機構の存在が不可欠である。近年、私たちの研究室では、カイコ核多角体病ウイルス（BmNPV）感染BmN細胞から調製したmRNAを用いて完全長cDNAライブラリーを作成し、5'末端および3'末端を約1万クローンずつシーケンスすることにより、4,679個のウイルスゲノム由来の転写ユニットを同定した。詳細なデータ解析の結果、ウイルス感染時には推定ORFの数ははるかに超える数の転写ユニットが存在し、その中には5個以上のORFを含む非常に長いユニット（約8 kb）や既報のORFを含まないユニットが存在することが明らかとなった。また、後者は長鎖非コードRNA（lncRNA）や、短いペプチドをコードする可能性が示唆された。

本研究では、バキュロウイルスゲノムに由来するlncRNAが、ウイルス感染においてどのような機能を持っているのかを解明するために、トランスクリプトーム解析により同定されたBmNPV由来lncRNAに対してlncRNA欠損ウイルスを作成し、カイコ由来培養細胞、およびカイコ幼虫を用いた性状解析を行った。

1. バキュロウイルスにおける機能性lncRNAの探索

既報のORFを完全には含まない新規の転写ユニットの中から、バキュロウイルスの初期プロモーター配列（CAGT / CATT）、または後期プロモーター配列（TAAG）から転写されている転写ユニット、つまり不完全な逆転写産物がクローニングされた結果ではないことが確認されたユニットを選抜した。その結果、100種408個の転写ユニットがlncRNA候補配列として得られた。次に、各lncRNAのウイルス感染時における機能解析を行うため、それぞれの転写開始点に変異導入することで、プロモーター活性を失活させたプロモーターノックアウト（PKO）ウイルスの構築を行い、最終的に22個のPKOウイルスを得た。これら全てのPKOウイルスに対し、培養細胞、およびカイコ幼虫を用いたウイルス増殖の調査を行った結果、*Bm122*領域から転写されているアンチセンスlncRNAを欠損したKO122ASが、カイコ由来培養細胞、およびカイコ幼虫のどちらにおいても、BV産生量には影響が見られないが、OB産生量は約50%に低下することが

判明した。また、ノーザン解析の結果、KO122AS感染細胞において、*Bm122* mRNAの転写が著しく減少していた。これらのことから、*Bm122*アンチセンスlncRNAは、タンパク質をコードするmRNA発現を制御し、その結果としてOB産生に寄与していることが示唆された。

2. バキュロウイルスの経口感染に関与するlncRNAの機能解析

自然環境におけるバキュロウイルスの感染は、封入体を餌とともに摂食することで開始される。経口感染力が消失すると、実験室における培養細胞への感染や、BVのカイコ幼虫への皮下注射実験においては影響が見られないが、自然環境下ではウイルスの伝播が不可能となる。しかし、経口感染のメカニズムには不明な点が多く残されている。そこで、経口感染に関与するバキュロウイルス由来の機能性lncRNAの探索を行った。その結果、経口感染力が消失する2つのPKOウイルスKO95AS、および KO124ASを発見した。

2-1. *odv-e56*領域から転写されるアンチセンスlncRNAの機能解析

KO124ASは、経口感染に必須なタンパク質をコードする*odv-e56*のアンチセンス鎖に存在するlncRNAを欠損したPKOウイルスである。KO124AS感染培養細胞、およびカイコ幼虫における性状解析の結果、KO124ASは野生型ウイルスと比較

して、経口感染力の低下以外は正常であるウイルスであることが明らかとなった。また、KO124AS感染細胞におけるノーザン解析の結果から、*odv-e56* mRNAの発現にこのlncRNAは関与しないことが明らかになった。さらに、抗ODV-E56抗体を用いたウエスタン解析から、ODV-E56タンパク質の翻訳やODV粒子への移行にも影響しないことが示された。一方、KO124ASを経口感染させた際のカイコ幼虫におけるBV産生量、中腸細胞におけるウイルスゲノムの複製、および中腸RNAを用いたRNAシーケンシングの結果から、KO124ASが中腸細胞へ侵入できないことが示唆された。

以上の結果から、*odv-e56*アンチセンスlncRNAのみを欠失した KO124ASと、従来法によって*odv-56*遺伝子領域を遺伝子破壊カセットにより欠損させることにより*odv-e56* mRNA、ODV-E56タンパク質、アンチセンスlncRNAをすべて欠失したBm124Dが、経口感染力が消失するという同様の表現型を示すことが明らかになった。このことから、ODV-E56タンパク質自体が経口感染に関与していない可能性が考えられたため、ODV-E56タンパク質の翻訳を途中でストップするようなODV-E56 stopを作成し、その経口感染力を測定した。その結果、経口感染力がBm124DやKO124ASと同様に消失したことから、ODV-E56タンパク質自身もアンチセンスlncRNAと共に、経口感染に必須な因子であることが判明した。

次に、経口感染に必要なアンチセンスlncRNA領域を決定するため、KO124ASウイルスの*odv-e56*領域内に新たなプロモーター配列を導入し、長さの異なるlncRNAを復帰させたウイルスを4つ作成し、それらの性状解析を行った。その結果、アンチセンスlncRNAの長さとその発現量と経口感染力に単純な相関関係が見られなかった。アンチセンスlncRNAの高次構造が関与している可能性など他の要素についても考慮する必要があると考えられる。

2-2. *pif-3*領域から転写されるアンチセンスlncRNAの機能解析

KO95ASは経口感染に必須なタンパク質をコードする*pif-3*のアンチセンス鎖から転写されるlncRNAを欠損したPKOウイルスである。培養細胞、およびカイコ幼虫における性状解析の結果、KO95ASは、上述のKO124ASと同様、経口感染力の消失以外は正常なウイルスであることが判明した。また、KO95AS感染細胞におけるノーザン解析の結果から、このlncRNAは*pif-3* mRNAの発現に関与しないことが明らかになった。しかし、抗PIF-3抗体を用いたウェスタン解析から、ODV粒子内に存在するはずのPIF-3タンパク質が消失していることが示された。さらに、経口感染時の中腸を調査した結果、KO95ASは中腸細胞に侵入出来ないウイルスであることが示唆された。以上の結果から、*pif-3*アンチセンスlncRNA

はPIF-3タンパク質の翻訳、あるいは移行に関与しており、*odv-e56*アンチセンス lncRNAとは異なる機構で経口感染力に寄与していることが判明した。

一方、配列解析から、このアンチセンスlncRNA配列内に81アミノ酸残基のペプチドが見いだされたことから、このペプチドの開始コドンに欠失させた*pif3* AS peptide stopを作成し、その経口感染力を調査した。その結果、*pif3* AS peptide stopの経口感染力は野生株と同程度であったことから、*pif-3*アンチセンスlncRNAに存在が予測されたペプチドは経口感染には関与していないことが判明した。

本研究では、PKOウイルスを用いたバキュロウイルス由来lncRNAの探索と機能解析を行った。その結果、3種類のバキュロウイルス由来の機能性lncRNAを発見した。これらは、lncRNAの発現がバキュロウイルスの病原性に影響を与えていることを示す初めての報告である。今後、さらなる機能性lncRNAの探索と機能解析を進めることで、バキュロウイルスにおける厳密な遺伝子発現制御機構の解明やウイルスlncRNAの新たな機能の発見が期待される。

謝辞

本研究を行うにあたり、東京大学大学院農学生命科学研究科 生産・環境生物学
専攻 昆虫遺伝研究室 勝間進准教授には数多くのご指導、ご助言をしていただき
ました。私自身の至らない点によって多大なご迷惑をお掛けしましたが、研
究面だけではなく生活面においても辛抱強く適切な指導をしてくださいました。
この場を借りて厚く御礼申し上げます。

昆虫遺伝研究室嶋田透教授、木内隆史助教授には、最適な研究環境を整えて頂
き、研究に関しても適切な指導を賜りました。厚く御礼申し上げます。

polh 遺伝子領域に対する PKO ウイルスの作成は、昆虫遺伝研究室 國生龍平氏
によるものです。國生氏には、本実験のみならず、研究内容における有意義な
ディスカッションを数多くして頂きました。厚く御礼申し上げます。

ウイルス感染中腸から調整した RNA の Hiseq 2500 を用いた RNA シークエンシ
ングは、東京大学大学院 新領域創成科学研究科鈴木穰教授、菅野純夫教授にご
協力して頂きました。厚く御礼申し上げます。

RNA シーケンスデータの配列解析は、東京大学大学院 昆虫遺伝研究室 学術支援専門職員 川本宗孝氏によるものです。厚く御礼申し上げます。

最後に、4年間の研究生生活を共に過ごした昆虫遺伝研究室の諸氏に心から感謝致します。

引用文献

Ascano M Jr, Mukherjee N, Bandaru P, Miller JB, Nusbaum JD, Corcoran DL, Langlois C, Munschauer M, Dewell S, Hafner M, Williams Z, Ohler U, Tuschl T. FMRP targets distinct mRNA sequence elements to regulate protein expression. *Nature* **492**, 382–386 (2012).

Barth S, Pfuhl T, Mamiani A, Ehses C, Roemer K, Kremmer E, Jäker C, Höck J, Meister G, Grässer FA. Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART2 down-regulates the viral DNA polymerase BALF5. *Nucleic Acids Res.* **36**, 666–675 (2008).

Blissard GW, Quant-Russell RL, Rohrmann GF, Beaudreau GS. Nucleotide sequence, transcriptional mapping, and temporal expression of the gene encoding p39, a major structural protein of the multicapsid nuclear polyhedrosis virus of *Orgyia pseudotsugata*. *Virology* **168**, 354–362 (1989).

Borah S, Darricarrère N, Darnell A, Myoung J, Steitz JA. A viral nuclear noncoding

RNA binds re-localized poly(A) binding protein and is required for late KSHV gene expression. *PLoS Pathog.* **7**, e1002300 (2011).

Braunagel SC, Elton DM, Ma H, Summers MD. Identification and analysis of an *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus structural protein of the occlusion-derived virus envelope: ODV-E56. *Virology* **217**, 97–110 (1996).

Braunagel SC, Russell WK, Rosas-Acosta G, Russell DH, Summers MD. Determination of the protein composition of the occlusion-derived virus of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 9797–9802 (2003).

Canny SP, Reese TA, Johnson LS, Zhang X, Kambal A, Duan E, Liu CY, Virgin HW. Pervasive Transcription of a Herpesvirus Genome Generates Functionally Important RNAs. *MBio.* **11**, e01033-13 (2014).

Carrieri C, Cimatti L, Biagioli M, Beugnet A, Zucchelli S, Fedele S, Pesce E, Ferrer I, Collavin L, Santoro C, Forrest AR, Carninci P, Biffo S, Stupka E, Gustincich S. Long

non-coding antisense RNA controls *Uchl1* translation through an embedded SINEB2 repeat. *Nature* **491**, 454–457 (2012).

Chen YR, Zhong S, Fei Z, Hashimoto Y, Xiang JZ, Zhang S, Blissard GW. The transcriptome of the baculovirus *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus in *Trichoplusia ni* cells. *J. Virol.* **87**, 6391–6405 (2013).

Clem RJ, Fechheimer M, Miller LK. Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science.* **254**, 1388–1390 (1991).

Cox JE, and Sullivan CS. Balance and Stealth: The Role of Noncoding RNAs in the Regulation of Virus Gene Expression. *Annu. Rev. Virol.* **1**, 89–109 (2014).

Dickison VL, Willis LG, Sokal NR, Theilmann DA. Deletion of AcMNPV *ac146* eliminates the production of budded virus. *Virology* **431**, 29–39 (2012).

Engelhard EK, Kam-Morgan LN, Washburn JO, Volkman LE. The insect tracheal system: a conduit for the systemic spread of *Autographa californica* M nuclear

polyhedrosis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 3224–3227 (1994).

Faghihi MA, Modarresi F, Khalil AM, Wood DE, Sahagan BG, Morgan TE, Finch CE, St Laurent G 3rd, Kenny PJ, Wahlestedt C. Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of β -secretase. *Nat. Med.* **14**, 723–730 (2008).

Faghihi MA, Zhang M, Huang J, Modarresi F, Van der Brug MP, Nalls MA, Cookson MR, St-Laurent G 3rd, Wahlestedt C. Evidence for natural antisense transcript-mediated inhibition of microRNA function. *Genome Biol.* **11**, R56 (2010).

Fang M, Nie Y, Harris S, Erlandson MA, Theilmann DA. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus core gene *ac96* encodes a per Os infectivity factor (*pif-4*). *J. Virol.* **83**, 12569–12578 (2009).

Geisler S, and Coller J. RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 699–712 (2013).

Gomi S, Zhou CE, Yih W, Majima K, Maeda S. Deletion analysis of four of eighteen late gene expression factor gene homologues of the baculovirus, BmNPV. *Virology* **230**, 35–47 (1997).

Gomi S, Majima K, Maeda S. Sequence analysis of the genome of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *J. Gen. Virol.* **80**, 1323–1337 (1999).

Gong C, and Maquat LE. lncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements. *Nature* **470**, 284–288 (2011).

Guarino LA, Xu B, Jin J, Dong W. A virus-encoded RNA polymerase purified from baculovirus-infected cells. *J. Virol.* **72**, 7985–7991 (1998).

Haas-Stapleton EJ, Washburn JO, Volkman LE. P74 Mediates Specific Binding of *Autographa californica* M Nucleopolyhedrovirus Occlusion-Derived Virus to Primary Cellular Targets in the Midgut Epithelia of *Heliothis virescens* Larvae. *J. Virol.* **78**, 6786–6791 (2004).

Hawtin RE, Arnold K, Ayres MD, Zanotto PM, Howard SC, Gooday GW, Chappell LH, Kitts PA, King LA, Possee RD. Identification and Preliminary Characterization of a Chitinase Gene in the *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus Genome. *Virology* **212**, 673–685 (1995).

He L. Posttranscriptional regulation of PTEN dosage by noncoding RNAs. *Sci. Signal.* **3**, pe39 (2010).

Hirose T, Virnicchi G, Tanigawa A, Naganuma T, Li R, Kimura H, Yokoi T, Nakagawa S, Bénard M, Fox AH, Pierron G. NEAT1 long noncoding RNA regulates transcription via protein sequestration within subnuclear bodies. *Mol. Biol. cell* **25**, 169–183 (2014).

Hong CI, Ruoff P, Loros JJ, Dunlap JC. Closing the circadian negative feedback loop: FRQ-dependent clearance of WC-1 from the nucleus. *Genes Dev.* 3196–3204 (2008).

Hoover K, Grove M, Gardner M, Hughes DP, McNeil J, Slavicek J. A gene for an extended phenotype. *Science* **333**, 1401 (2011).

Ishihara G, Shimada T, Katsuma S. Functional characterization of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus CG30 protein. *Virus Res.* **174**, 52–59 (2013).

Iwanaga M, Takaya K, Katsuma S, Ote M, Tanaka S, Kamita SG, Kang W, Shimada T, Kobayashi M. Expression profiling of baculovirus genes in permissive and nonpermissive cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **323**, 599–614 (2004).

Jehle JA, Blissard GW, Bonning BC, Cory JS, Herniou EA, Rohrmann GF, Theilmann DA, Thiem SM, Vlak JM. On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Arch. Virol.* **151**, 1257–1266 (2006).

Jeon Y, and Lee JT. YY1 tethers Xist RNA to the inactive X nucleation center. *Cell* **146**, 119–133 (2011).

Kamita SG, Nagasaka K, Chua JW, Shimada T, Mita K, Kobayashi M, Maeda S, Hammock BD. A baculovirus-encoded protein tyrosine phosphatase gene induces enhanced locomotory activity in a lepidopteran host. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 2584–2589 (2005).

Kang W, Tristem M, Maeda S, Crook NE, O'Reilly DR. Identification and characterization of the *Cydia pomonella* granulovirus cathepsin and chitinase genes. *J. Gen. Virol.* **79**, 2283–2292 (1998).

Katsuma S, Kang W, Shin-i T, Ohishi K, Kadota K, Kohara Y, Shimada T. Mass identification of transcriptional units expressed from the *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus genome. *J. Gen. Virol.* **92**, 200–203 (2011).

Katsuma S, Kobayashi J, Koyano Y, Matsuda-Imai N, Kang W, Shimada T. Baculovirus-encoded protein BV/ODV-E26 determines tissue tropism and virulence in lepidopteran insects. *J. Virol.* **86**, 2545–2555 (2012).

Keddie BA, Aponte GW, Volkman LE. The pathway of infection of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in an insect host. *Science* **243**, 1728–1730 (1989).

Kim D, Perteza G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions.

Genome Biol. **14**, R36 (2013).

Kitajewski J, Schneider RJ, Safer B, Munemitsu SM, Samuel CE, Thimmappaya B, Shenk T. Adenovirus VAI RNA Antagonizes the Antiviral Action of Interferon by Preventing Activation of the Interferon-Induced eIF-2 α Kinase. *Cell* **45**, 195–200 (1986).

Lapointe R, Popham HJ, Straschil U, Goulding D, O'Reilly DR, Olszewski JA. Characterization of two *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus proteins, Ac145 and Ac150, which affect oral infectivity in a host-dependent manner. *J. Virol.* **78**, 6439–6448 (2004).

Li G, Wang J, Deng R, Wang X. Characterization of AcMNPV with a deletion of *ac68* gene. *Virus Genes* **37**, 119–127 (2008).

Li X, Song J, Jiang T, Liang C, Chen X. The N-terminal hydrophobic sequence of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus PIF-3 is essential for oral infection. *Arch. Virol.* **152**, 1851–1858 (2007).

Liu S, Xia Q, Zhao P, Cheng T, Hong K, Xiang Z. Characterization and expression patterns of let-7 microRNA in the silkworm (*Bombyx mori*). *BMC Dev. Biol.* **7**, 88 (2007).

Lu S, and Cullen BR. Adenovirus VA1 noncoding RNA can inhibit small interfering RNA and MicroRNA biogenesis. *J. Virol.* **78**, 12868–12876 (2004).

Ma Y, and Mathews MB. Structure, function, and evolution of adenovirus-associated RNA: a phylogenetic approach. *J. Virol.* **70**, 5083–5099 (1996).

前田 進. カイコ核多角体病ウイルスのプラーク法による定量とウイルスのクローニング. 日蚕雑. **53**, 547-548 (1984).

Maeda S, and Majima K. Molecular cloning and physical mapping of the genome of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *J. Gen. Virol.* **71**, 1851–1855 (1990).

Maran A, and Mathews MB. Characterization of the Double-Stranded RNA Implicated

in the inhibition of protein synthesis in Cells Infected with a Mutant Adenovirus Defective for VA RNA. *Virology* **13**, 106–113 (1988).

McKenna SA, Lindhout DA, Shimoike T, Aitken CE, Puglisi JD. Viral dsRNA inhibitors prevent self-association and autophosphorylation of PKR. *J. Mol. Biol.* **372**, 103–113 (2007).

Merrow M, Brunner M, Roenneberg T. Assignment of circadian function for the *Neurospora* clock gene *frequency*. *Nature* **399**, 584–586 (1999).

Monsma SA, Oomens AG, Blissard GW. The GP64 Envelope Fusion Protein Is an Essential Baculovirus Protein Required for Cell-to-Cell Transmission of Infection. *J. Virol.* **70**, 4607–4616 (1996).

Naganuma T, Nakagawa S, Tanigawa A, Sasaki YF, Goshima N, Hirose T. Alternative 3'-end processing of long noncoding RNA initiates construction of nuclear paraspeckles. *EMBO J.* **31**, 4020–4034 (2012).

Nie Y, Fang M, Erlandson MA, Theilmann DA. Analysis of the *autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus overlapping gene pair *lef3* and *ac68* reveals that AC68 is a *per os* infectivity factor and that LEF3 is critical, but not essential, for virus replication. *J. Virol.* **86**, 3985–3994 (2012).

Nobiron I, O'Reilly DR, Olszewski JA. *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus infection of *Spodoptera frugiperda* cells: a global analysis of host gene regulation during infection, using a differential display approach. *J. Gen. Virol.* **84**, 3029–3039 (2003).

O'Reilly DR, and Miller LK. A baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid UDP-glucosyl transferase. *Science.* **245**, 1110–1112 (1989).

Ohkawa T, Majima K, Maeda S. A cysteine protease encoded by the baculovirus *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* **68**, 6619–6625 (1994).

Ohkawa T, Washburn JO, Sitapara R, Sid E, Volkman LE. Specific binding of *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus occlusion-derived virus to midgut cells

of *Heliothis virescens* larvae is mediated by products of pif genes *Ac119* and *Ac022* but not by *Ac115*. *J. Virol.* **79**, 15258–15264 (2005).

Ono C, Kamagata T, Taka H, Sahara K, Asano S, Bando H. Phenotypic grouping of 141 BmNPVs lacking viral gene sequences. *Virus Res.* **165**, 197–206 (2012).

Ooi BG, and Miller LK. Transcription of the Baculovirus Polyhedrin Gene Reduces the Levels of an Antisense Transcript Initiated Downstream. *J. Virol.* **64**, 3126–3129 (1990).

Oomens AG, Blissard GW. Requirement for GP64 to drive efficient budding of *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *Virology* **254**, 297–314 (1999).

Owen TJ, O'Neil JD, Dawson CW, Hu C, Chen X, Yao Y, Wood VH, Mitchell LE, White RJ, Young LS, Arrand JR. Epstein-Barr virus-encoded EBNA1 enhances RNA polymerase III-dependent EBER expression through induction of EBER-associated cellular transcription factors. *Mol. Cancer* **9**, 241 (2010).

Peng K, van Oers MM, Hu Z, van Lent JW, Vlak JM. Baculovirus *per os* infectivity factors form a complex on the surface of occlusion-derived virus. *J. Virol.* **84**, 9497–9504 (2010).

Peng K, van Lent JW, Vlak JM, Hu Z, van Oers MM. *In situ* cleavage of the baculovirus occlusion derived virus receptor binding protein P74 in the peroral infectivity complex. *J. Virol.* **85**, 10710–10718 (2011).

Peng K, van Lent JW, Boeren S, Fang M, Theilmann DA, Erlandson MA, Vlak JM, van Oers MM. Characterization of novel components of the baculovirus *per os* infectivity factor complex. *J. Virol.* **86**, 4981–4988 (2012).

Poliseno L, Salmena L, Zhang J, Carver B, Haveman WJ, Pandolfi PP. A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature* **465**, 1033–1038 (2010).

Pullen SS, and Friesen PD. The CAGT Motif Functions as an Initiator Element during

Early Transcription of the Baculovirus Transregulator *ie-1*. *J. Virol.* **69**, 3575-3583 (1995).

Rohrmann GF. *Baculovirus Molecular Biology*, 3rd edn. Bethesda, MD: National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (2013).

Rossetto CC, and Pari GS. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus noncoding polyadenylated nuclear RNA interacts with virus- and host cell-encoded proteins and suppresses expression of genes involved in immune modulation. *J. Virol.* **85**, 13290–13297 (2012).

Rossetto CC, Tarrant-Elorza M, Verma S, Purushothaman P, Pari GS. Regulation of Viral and Cellular Gene Expression by Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Polyadenylated Nuclear RNA. *J. Virol.* **87**, 5540–5553 (2013).

Sasaki YT, Ideue T, Sano M, Mituyama T, Hirose T. MEN ϵ/β noncoding RNAs are essential for structural integrity of nuclear paraspeckles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 2525-2530 (2009).

Singh CP, Singh J, Nagaraju J. A baculovirus-encoded miRNA suppresses its host miRNAs biogenesis by regulating the Exportin-5 co-factor Ran. *J. Virol.* **86**, 7867-7879 (2012).

Singh CP, Singh J, Nagaraju J. bmnvp-miR-3 facilitates BmNPV infection by modulating the expression of viral P6.9 and other late genes in *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **49**, 59–69 (2014).

Singh J, Singh CP, Bhavani A, Nagaraju J. Discovering microRNAs from *Bombyx mori* nucleopolyhedrosis virus. *Virology* **407**, 120–128 (2010).

Slack JM, Lawrence SD, Krell PJ, Arif BM. A soluble form of P74 can act as a *per os* infectivity factor to the *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus. *J. Gen. Virol.* **91**, 915–918 (2010).

Smillie DA, and Sommerville J. RNA helicase p54 (DDX6) is a shuttling protein involved in nuclear assembly of stored mRNP particles. *J. Cell Sci.* **54**, 395-407 (2002).

Sparks WO, Harrison RL, Bonning BC. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ODV-E56 is a *per os* infectivity factor, but is not essential for binding and fusion of occlusion-derived virus to the host midgut. *Virology* **409**, 69–76 (2011a).

Sparks WO, Rohlfing A, Bonning BC. A peptide with similarity to baculovirus ODV-E66 binds the gut epithelium of *Heliothis virescens* and impedes infection with *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus. *J. Gen. Virol.* **92**, 1051–1060 (2011b).

Sullivan CS, Grundhoff AT, Tevethia S, Pipas JM, Ganem D. SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature* **435**, 682–686 (2005).

Tripathi V, Ellis JD, Shen Z, Song DY, Pan Q, Watt AT, Freier SM, Bennett CF, Sharma A, Bubulya PA, Blencowe BJ, Prasanth SG, Prasanth KV. The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing

factor phosphorylation. *Mol. Cell* **39**, 925–938 (2010).

Wang Y, Kleespies RG, Huger AM, Jehle JA. The genome of *Gryllus bimaculatus* nudivirus indicates an ancient diversification of baculovirus-related nonoccluded nudiviruses of insects. *J. Virol.* **81**, 5395–5406 (2007).

Washburn JO, Chan EY, Volkman LE, Aumiller JJ, Jarvis DL. Early Synthesis of Budded Virus Envelope Fusion Protein GP64 Enhances *Autographa californica* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus Virulence in Orally Infected *Heliothis virescens*. *J. Virol.* **77**, 280–290 (2003).

Xing K, Deng R, Wang J, Feng J, Huang M, Wang X. Analysis and prediction of baculovirus promoter sequences. *Virus Res.* **113**, 64–71 (2005).

Xiang X, Chen L, Hu X, Yu S, Yang R, Wu X. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus *odv-e66* is an essential gene required for oral infectivity. *Virus Res.* **158**, 72–78 (2011a).

Xiang X, Chen L, Guo A, Yu S, Yang R, Wu X. The *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) ODV-E56 envelope protein is also a *per os* infectivity factor. *Virus Res.* **155**, 69–75 (2011b).

Xiang X, Shen Y, Yang R, Chen L, Hu X, Wu X. *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus *BmP95* plays an essential role in BV production and nucleocapsid assembly. *J. Gen. Virol.* **94**, 1669–1679 (2013)

Xu HJ, Yang ZN, Zhao JF, Tian CH, Ge JQ, Tang XD, Bao YY, Zhang CX. *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus ORF56 encodes an occlusion-derived virus protein and is not essential for budded virus production. *J. Gen. Virol.* **89**, 1212–1219 (2008).

Yang S, and Miller LK. Activation of baculovirus very late promoters by interaction with very late factor 1. *J. Virol.* **73**, 3404–3409 (1999).

Yoon JH, Abdelmohsen K, Srikantan S, Yang X, Martindale JL, De S, Huarte M, Zhan M, Becker KG, Gorospe M. LincRNA-p21 suppresses target mRNA translation. *Mol. Cell* **47**, 648–655 (2012).

Zhang JH, Washburn JO, Jarvis DL, Volkman LE. *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus early GP64 synthesis mitigates developmental resistance in orally infected noctuid hosts. *J. Gen. Virol.* **85**, 833–842 (2004).

Zhang JH, Ohkawa T, Washburn JO, Volkman LE. Effects of Ac150 on virulence and pathogenesis of *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* in noctuid hosts. *J. Gen. Virol.* **86**, 1619–1627 (2005).

Zhao J, Sun BK, Erwin JA, Song JJ, Lee JT. Polycomb Proteins Targeted by a Short Repeat RNA to the Mouse X Chromosome. *Science* **215**, 750–756 (2008).

Zhou W, Yao L, Xu H, Yan F, Qi Y. The function of envelope protein P74 from *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* in primary infection to host. *Virus Genes* **30**, 139–150 (2005).

Zhu M, Wang J, Deng R, Xiong P, Liang H, Wang X. A microRNA encoded by *Autographa californica nucleopolyhedrovirus* regulates expression of viral gene

ODV-E25. *J. Virol.* **87**, 13029–13034 (2013).

Zhu S, Wang W, Wang Y, Yuan M, Yang K. The baculovirus core gene *ac83* is required for nucleocapsid assembly and *per os* infectivity of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. *J. Virol.* **87**, 10573–10586 (2013).