

## 論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻  
平成 23 年度博士課程入学

氏名 石原玄基  
指導教員名 勝間進

論文題目 バキュロウイルスにおける長鎖非コード RNA の機能解析

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。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*adv-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、*adv-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、*adv-e56*アンチセンスlncRNAのみを欠失した KO124ASと、従来法によって*adv-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*adv-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*adv-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抗体を用いたウエスタン解析から、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、*adv-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を欠失させた*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。