

審査の結果の要旨

氏名 石原 玄基

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。

最近、カイコ核多角体病ウイルス（BmNPV）が推定ORFの数をはるかに超える数の転写ユニットを産生し、その中には長鎖非コードRNA（lncRNA）と思われる転写物が含まれることがわかった。本研究は、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、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ものである。

1. バキュロウイルスにおける機能性lncRNAの探索

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。

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、このlncRNAは*odv-e56* mRNAの発現やODV-E56タンパク質の翻訳、およびODV粒子への移行に影響しないことが示された。以上の結果から、*odv-e56*アンチセンスlncRNAは、ODV-E56タンパク質と共に、経口感染に必須な因子であることが判明した。

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。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。また、このlncRNAは*pif-3* mRNAの発現に関与しないが、KO95ASではODV粒子内のPIF-3タンパク質が消失していることが示された。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。

以上要するに、本研究では、PKOウイルスを用いたバキュロウイルス由来機能性lncRNAの探索を行い、3種類のバキュロウイルス由来の機能性lncRNAを発見した。この成果は、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り、ウイルスlncRNAの機能に新たな切り口を開いたものである。このように、本論文は学術上、応用上、重要な知見を明らかにしているため、審査委員一同は、博士(農学)の学位論文として価値があるものと認めた。