

博士論文

バキュロウイルスによる
宿主行動操作メカニズムの研究

國生龍平

目次

序論・・・3

図表・・・8

第一章 BmNPV の新規徘徊行動関連遺伝子の探索および機能解析・・・11

緒言・・・12

材料と方法・・・15

結果・・・30

考察・・・43

図表・・・47

第二章 クワコを用いた鉛直方向の徘徊行動の解析・・・84

緒言・・・85

材料と方法・・・87

結果・・・91

考察・・・95

図表・・・98

総合考察・・・111

図表・・・118

摘要・・・120

謝辞・・・125

引用文献・・・127

序論

病原体や寄生者による宿主行動制御

昆虫病原体や寄生生物の中には、宿主昆虫の行動を変化させるものが存在することが広く知られている (Reviewed in Libersat *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2010; van Houte *et al.*, 2013)。例えば、ハリガネムシの一種 *Paragordius tricuspidatus* に寄生されたコオロギ *Nemobius sylvestris* は異常行動を起こし、最終的にハリガネムシの繁殖場所である水中へと飛び込むことが報告されている (Thomas *et al.*, 2002)。また、熱帯雨林に生息するアリ *Camponotus leonardi* は、真菌類の *Ophiocordyceps unilateralis* に寄生されると、*O. unilateralis* の繁殖に適した環境へと移動し、葉の葉脈へと噛み付いて体を固定した後に死に至ることが知られている (Evans and Samson, 1984; Andersen *et al.*, 2009)。このように、寄生者は宿主昆虫の行動を支配することで、宿主昆虫を自らの繁殖に有利な環境へと移動させ、種の繁栄を図っていると考えられている。進化生物学的観点からは、このような寄生者による宿主行動の変化は「延長された表現型 (extended phenotype)」(Dawkins, 1982)、すなわち、ある生物 (この場合、寄生者) の遺伝子が、他の生物 (宿主昆虫) の表現型に効果を及ぼすという現象の好例であるとみなされてきた。しかしながら、寄生者が宿主昆虫の行動を変化させる分子メカニズムを解明した事例は少なく、この「延長された表現型」の本体がいかなる遺伝子のどのような働きによるものかという点については、未解明の部分が多く残されている。本研究では、病原体による宿主行動制御のモデルケースとして、バキュロウイルスによって引き起こされる異常行動に着目した。以下では、バキュロウイルスの特徴や異常行動に関する先行研究の知見について述べる。

バキュロウイルスとは—生物学的特徴とライフサイクル—

バキュロウイルスは昆虫病原性のウイルスで、*Alphabaculovirus* (チョ

ウ目昆虫特異的核多角体病ウイルス（nucleopolyhedrovirus; NPV）、*Betabaculovirus*（チョウ目昆虫特異的顆粒病ウイルス（granulovirus; GV）、*Gammabaculovirus*（ハチ目昆虫特異的 NPV）、*Deltabaculovirus*（ハエ目昆虫特異的 NPV）の4属に大別される（Jehle *et al.*, 2006）。バキュロウイルスゲノムは約 80~160kbp の環状二本鎖 DNA から構成され（Summers and Anderson, 1972 and 1973）、その中には 100 個以上のタンパク質コード遺伝子が存在する（Rohrmann, 2013）。図 0.1 にバキュロウイルスの感染サイクルを示す。バキュロウイルスはその感染サイクルにおいて、包埋体由来ウイルス（occlusion-derived virus; ODV）と出芽ウイルス（budded virus; BV）の二種類のウイルス粒子を巧みに使い分けることで効率的な感染を成し遂げている。NPV において、ODV は多角体と呼ばれる包埋体の中に包埋され、自然界に存在する。宿主幼虫が多角体を食下すると、中腸内のアルカリ性消化液により多角体が可溶化されて内部から ODV が放出され、ODV は中腸の円筒細胞へと感染する。感染細胞で新たに産生された BV は細胞外へと放出され、体液や気管を通じて全身の細胞へと感染が広がってゆく。感染後期には細胞内で多角体が大量に形成され、最終的に感染幼虫の死体がウイルスの持つシステインプロテアーゼやキチナーゼといった分解酵素によって溶解されることで多角体が再び環境中に拡散する（Slack *et al.*, 1995; Hawtin *et al.*, 1997）。

バキュロウイルスと“*Wipfelkrankheit*（梢頭病）”

バキュロウイルスのもう一つの特徴は、感染幼虫が示す異常行動である。昆虫病理学の分野では、“*Wipfelkrankheit*（梢頭病）”と呼ばれる病気が 100 年以上前から知られている（Hofmann, 1891）。この病気は、バキュロウイルスに感染したチョウ目昆虫の幼虫でしばしば観察される。バキュロウイルスに感染した幼虫は、感染末期に徘徊行動が異常に活性化され（enhanced locomotory

activity; ELA)、最終的に植物の葉や枝の先端へと登って死亡する (climbing behavior; CB) (Goulson *et al.*, 1997; Kamita *et al.*, 2005; Hoover *et al.*, 2011; 図 0.2)。異常行動中の感染幼虫が体液を滲出しながら歩き回ることにより、より広範囲の枝葉が包埋体で汚染される。また、異常行動中の幼虫は鳥等の捕食者から発見されやすくなることから、捕食されて包埋体が糞とともに遠方へと運搬される確率が高まる。以上の理由から、バキュロウイルスによるこれらの異常行動はウイルスの効率的な感染拡大に寄与していると予想され、異常行動はウイルスによる利己的な宿主制御である可能性が論じられてきた (Goulson, 1997; Hoover *et al.*, 2011)。しかしながら、バキュロウイルスによる宿主行動制御の分子メカニズムはこれまでほとんど未解明であった。

バキュロウイルスの徘徊行動関連遺伝子

近年、バキュロウイルスの遺伝子欠損変異株を用いた行動実験により、ウイルスの持つ複数の遺伝子が異常行動に関与することが相次いで報告され、宿主行動制御メカニズムの一端が明らかになりつつある。これまでに、ELA 関連遺伝子として *Bombyx mori* NPV (BmNPV) および *Autographa californica* NPV (AcMNPV) の *protein tyrosine phosphatase* 遺伝子 (*ptp*) や BmNPV の *bv/odv-e26* 遺伝子が、CB 関連遺伝子として *Lymantria dispar* NPV (LdMNPV) の *ecdysteroid UDP-glucosyltransferase* 遺伝子 (*egt*) が報告されている (Kamita *et al.*, 2005; Hoover *et al.*, 2011; Katsuma *et al.*, 2012a; van Houte *et al.*, 2012; 図 0.3)。しかしながら、これらの遺伝子が宿主の行動を制御するメカニズムは未解明の点が多く残されている。また、これらの遺伝子は特定のウイルス-宿主間のみでしか行動制御に関与しない可能性や、ウイルスによって作用機序が異なる可能性が示唆されており (Katsuma *et al.*, 2012b; Ros *et al.*, 2014)、統一的な宿主行動制御メカニズムは未だ明らかになっていない。

そこで本研究では、バキュロウイルスによる宿主行動制御メカニズムの全貌を明らかにすることを目標に、BmNPV およびその宿主昆虫であるカイコを用いて研究を行った。第一章では、遺伝子欠損変異 BmNPV を用いて行動スクリーニングを行うことによって ELA に関与するウイルス遺伝子を探し出し、その機能解析を行った。第二章では、カイコの祖先種であるクワコ幼虫を用いて行動解析を行なうことで、カイコでは解析が困難な CB の解析を行った。

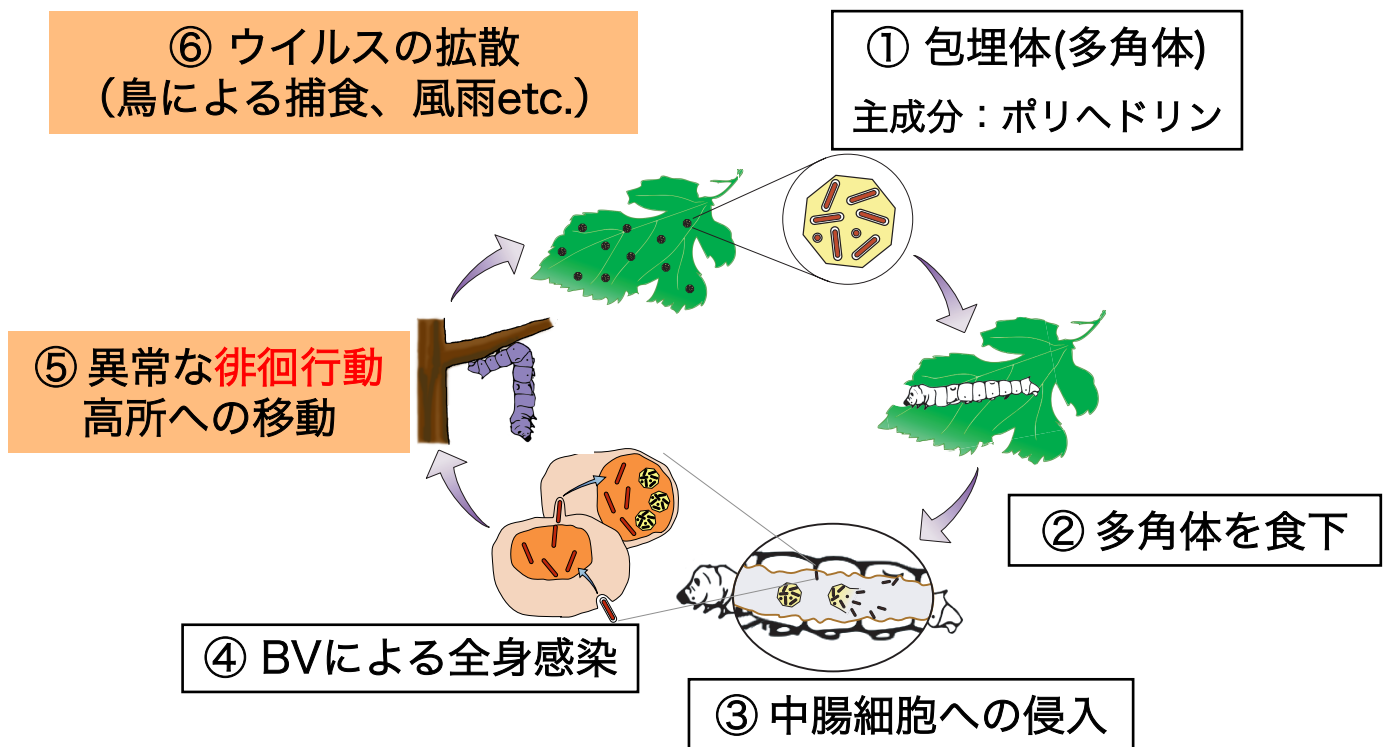


図 0.1 バキュロウイルスの感染サイクル

バキュロウイルスの感染は、包埋体 (①) が宿主昆虫に食下されることで開始する (②)。食下された包埋体は中腸の消化液で溶解し、内包されていたODVが中腸の細胞へと感染する (③)。感染細胞ではBVが産生され、細胞外へと放出されて、血体腔や気管を介して全身へと感染が拡大する (④)。また、感染後期の細胞の核内では多角体が産生される。感染末期には感染幼虫の移動が異常に活性化され、枝葉の先端へと移動して死亡する (⑤)。異常行動によりウイルスの拡散効率が高まるため、より広範囲へと多角体が拡散される (⑥)。



図 0.2 *Bombyx mandarina* NPVに感染したクワコ幼虫が示す“*Wipfelkrankheit* (梢頭病)”異常行動を起こした感染幼虫は、枝葉の先端へと移動し、そこで死亡する。その際、死体が腹脚や尾脚で固定されたままぶら下がる様子がしばしば観察される。

ウイルスによる行動制御

宿主による行動実行

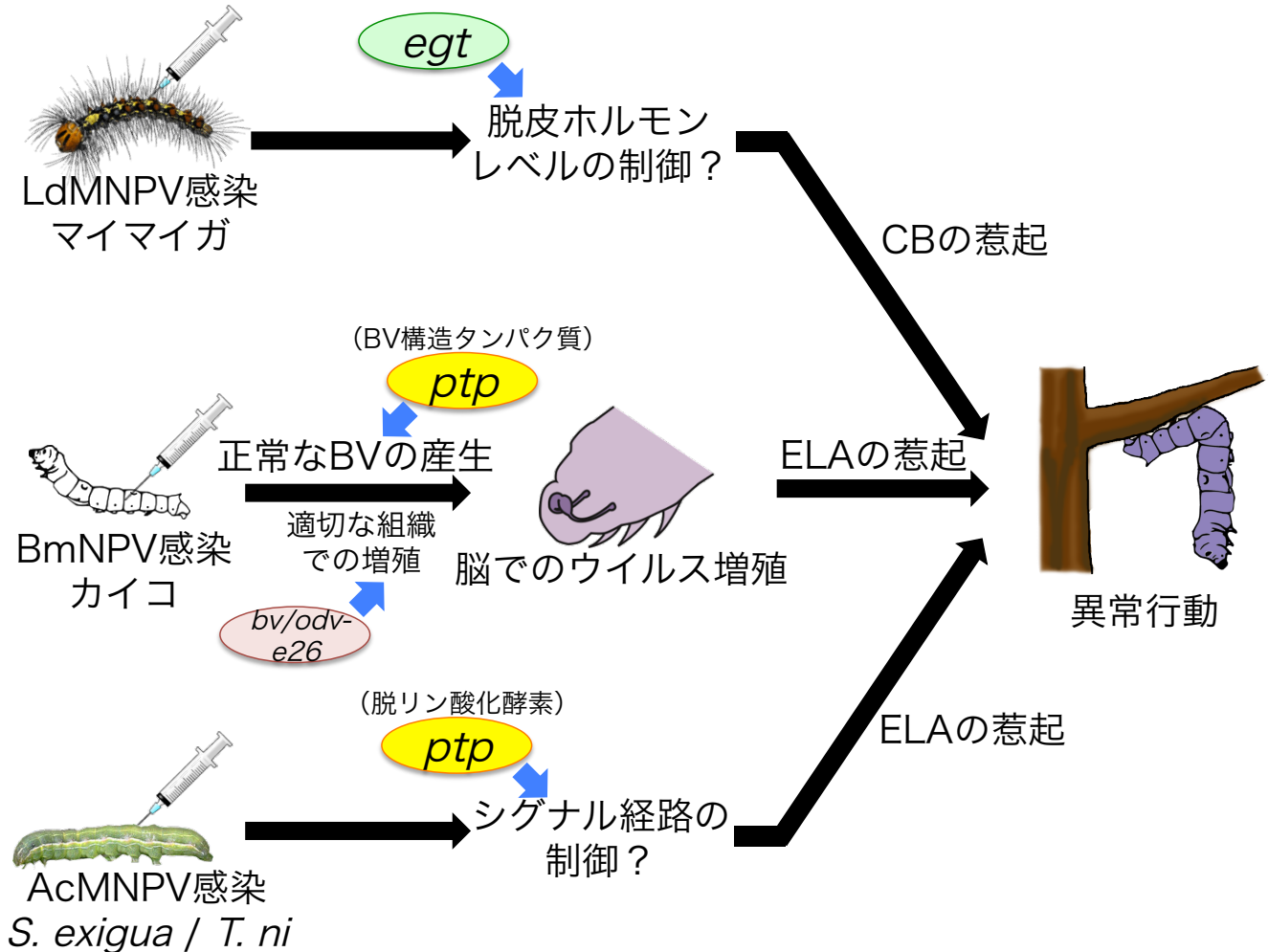


図 0.3 既知の行動関連遺伝子とその予測される機能

LdMNPVを用いた研究から、脱皮ホルモン不活化酵素遺伝子*egt*がCBに関与することが報告された (Hoover *et al.*, 2011)。一方、BmNPVやAcMNPVでは*egt*は行動制御に関与せず (Katsuma *et al.*, 2012a; Ros *et al.*, 2014)、タンパク質脱リン酸化酵素遺伝子*ptp*がELAに関与することが知られている (Kamita *et al.*, 2005; van Houte *et al.*, 2012)。また、*ptp*はBmNPVとAcMNPVで作用機序が異なることや (Katsuma *et al.*, 2012b; van Houte *et al.*, 2012)、AcMNPVにおいてCBには関与しないことが報告されている (van Houte *et al.*, 2014)。その他、BmNPVではウイルス粒子の膜タンパク質遺伝子*bv/odv-e26*がELAに関与することが報告されている (Katsuma *et al.*, 2012a)。

第一章

BmNPV の新規徘徊行動関連遺伝子の探索 および機能解析

緒言

バキュロウイルスに感染した宿主幼虫が見せる異常行動は、ウイルスの広範囲への拡散に貢献していると考えられている (Goulson, 1997)。このような宿主の異常行動を引き起こす詳細な分子メカニズムはこれまでよく分かっていなかったが、近年、バキュロウイルスの遺伝子欠損変異株を用いたアプローチにより、バキュロウイルスの持ついくつかの遺伝子が宿主の行動制御に関与することが報告された (Kamita *et al.*, 2005; Hoover *et al.*, 2011; Katsuma *et al.*, 2012a)。これらの遺伝子の機能解析によって宿主行動制御メカニズム解明の第一歩が踏み出された一方で、ウイルスによる行動制御メカニズムの複雑性も明らかになってきた。

Hoover らは、*egt* を欠損した LdMNPV に感染したマイマイガ幼虫では、CB が低下することを発見した (Hoover *et al.*, 2012)。*egt* はチョウ目昆虫に感染するバキュロウイルスに広く保存された遺伝子で、昆虫の脱皮ホルモンである 20-hydroxyecdisonone を不活化する酵素をコードする (O'Reilly *et al.*, 1992)。このことから、LdMNPV はマイマイガ幼虫の脱皮ホルモンレベルを制御することによって CB を活性化するという仮説が提唱された。しかしながら、BmNPV や AcMNPV において、*egt* は宿主行動制御に関与しないことが報告されており (Katsuma *et al.*, 2012a; Ros *et al.*, 2014)、脱皮ホルモンレベルの制御はバキュロウイルスに共通した行動制御様式ではないと推測される。

ptp は BmNPV とカイコ幼虫を用いた行動スクリーニングにより発見された ELA 関連遺伝子である (Kamita *et al.*, 2005)。*ptp* を欠損した BmNPV や AcMNPV では感染幼虫の ELA が低下する (Kamita *et al.*, 2005; van Houte *et al.*, 2012)。PTP タンパク質は脱リン酸化活性を持ち、タンパク質や RNA を基質と

する (Sheng and Charbonneau, 1993; Takagi *et al.*, 1998)。AcMNPV においては PTP の脱リン酸化酵素活性が ELA の惹起に必要であるのに対し (van Houte *et al.*, 2012)、BmNPV では PTP の脱リン酸化酵素活性は ELA 惹起に必要ないことから (Katsuma *et al.*, 2012b)、*ptp* の作用機序はバキュロウイルスの種類により異なると考えられる。

このように、宿主行動制御メカニズムは単一の遺伝子による単純なものではなく、ウイルスごと、あるいは宿主ごとに異なる宿主行動制御メカニズムを採用している可能性がある。したがって、宿主行動制御メカニズムの全貌を明らかにするには、行動関連遺伝子を網羅的に探索し、それらの機能解析結果から行動制御メカニズムの全体像をつかむことが重要となる。

そこで筆者らは、研究室保有の BmNPV 変異株ライブラリを用いて行動スクリーニングを行うことで、新たな ELA 関連遺伝子を探索した。修士課程在籍時には、Bmpolh-proD と名付けた変異 BmNPV に感染したカイコ幼虫は徘徊行動が顕著に低下することを見出した。このウイルスでは多角体の主構成タンパク質であるポリヘドリン遺伝子 (*polyhedrin*; *polh*) の転写開始点に変異を導入することで、*polh* mRNA の転写活性が消失している。しかしながら、POLH タンパク質や *polh* mRNA は ELA の惹起に不必要であることを示すデータも得られたため、Bmpolh-proD で ELA が消失する原因はこれまで不明であった。そこで本章では、Bmpolh-proD のトランスクリプトーム解析を行なうことにより ELA 消失の原因遺伝子 *arif-1* を見つけ出し、その機能解析を行った。また、BmNPV の遺伝子欠損変異株を用いた研究では、*Bm5*、*Bm29*、*Bm47*、*Bm60*、*Bm96* 遺伝子の欠損が ELA に影響することが報告されている (Gomi *et al.*, 1999)。そ

ここで、これらの遺伝子について組換え BmNPV を作製して ELA への影響を詳細に調査し、各遺伝子の機能解析を行った。

材料と方法

ウイルス、培養細胞、および供試昆虫

ウイルスは、BmNPV の野生株として T3 株（本論文では WT と表示）（Maeda *et al.*, 1985）を、*polh* 領域の組換え BmNPV 作製には *polh* ORF 欠損ウイルスである BmNPV-abb（Kang *et al.*, 1998）を用いた。また、緑色蛍光タンパク質遺伝子（*green fluorescent protein; gfp*）発現ウイルスとして BmhspGFP を用いた（Hori *et al.*, 2013）。培養細胞は、東京大学昆虫遺伝研究室で継代されている BmN（BmN-4）細胞株を用い、10 %非働化牛胎児血清（FBS）添加 TC-100 培地で継代した（Nakanishi *et al.*, 2010）。ウイルスの感染力価（plaque forming unit: PFU）はプラークアッセイによって評価した（Maeda, 1984）。細胞への感染実験は全て重複感染度（multiplicity of infection; MOI）= 5 で行った。カイコ幼虫は実用品種である錦秋×鐘和を人工飼料にて 25°C で飼育した（Katsuma *et al.*, 2012b）。カイコ幼虫へのウイルスの注射感染は、4 齢もしくは 5 齢起蚕を氷水に 10 ~ 20 分間浸けて麻酔した後、BV およびカナマイシン硫酸塩 5 mg / mL を含む TC-100 培地をインスリン用シリンジ（NIPRO）で皮下注射することにより行った。

polh プロモーター変異ウイルスの作製

polh プロモーター活性を失った組換えウイルス Bmpolh-proD は以下の手順で作製した。まず、*polh* 遺伝子及びその近傍領域を保持するトランスファーベクター-pBhEPS1（Kang *et al.*, 1998）を鋳型としてオーバーラップ PCR（Nakanishi *et al.*, 2010）を行うことで、*polh* の転写開始点の塩基配列を ATAAG から ATAAA に変更する変異が導入された PCR 産物を得た。TAAG はバキュロウイルスの後期プロモーターモチーフであり（Rankin *et al.*, 1988）、この塩基配

列を TAAA へと変更することで *polh* mRNA の転写や POLH タンパク質の発現が消失する (嶋田ら, 1994; Katsuma *et al.*, 1999)。得られた PCR 断片と pBhEPS1 を制限酵素 EcoRI および HindIII で切断し、DNA Ligation kit Ver.2.1 (TaKaRa) を用いてライゲーションを行い、変異が導入された組換えプラスミド pPolh-proD を得た。BmNPV-abb の *polh* 領域には人為的に Bsu36I 切断サイトが導入されている。ゲノム DNA を切断してコトランスフェクションに用いることにより、目的の相同組換えが起こったウイルスのみが増殖するため、組換えウイルス作製効率を向上させることができる。pPolh-proD と Bsu36I で切断された BmNPV-abb ゲノム DNA を Lipofectin (Invitrogen) を用いて BmN 細胞にコトランスフェクションし、相同組換えによって組換えウイルスを作製した。コトランスフェクションを行って 5 日後の培養上清を用いてプラークアッセイを行い、多角体非形成のプラークから組換えウイルスを単離した。

polh プロモーター復帰変異ウイルス Bmpolh-proDR は、以下の手順で作製した。pBhEPS1 ベクターと Bmpolh-proD ゲノム DNA を Cellfectin II (Invitrogen) を用いて BmN 細胞にコトランスフェクションし、多角体が形成されたプラークを選別してプラーク純化を行った。

作製した組換えウイルスの *polh* 遺伝子領域の塩基配列は PCR で増幅した後に DNA シークエンサー (3130xl Genetic Analyser; Applied Biosystems) で解析し、目的の変異が導入されていることを確認した。変異ウイルス作製に使用したプライマーは表 1.1 に示す。

行動実験

行動実験は、以下の方法で行った。カイコ幼虫に 1×10^5 PFU / 個体の BV を皮下注射し、感染後 72 時間以降に 6 時間おきにウイルス感染幼虫の行動観察を行った。観察の手順を以下に述べる。まず、感染幼虫を水平に置いたコ

ピー用紙の中央に静置した。静置した時刻を $t=0$ (分) として、 $t=0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3$ にデジタルカメラで写真撮影を行った。カイコ幼虫の座標は、画像解析ソフト Image J (NIH) を用いて導出した。カイコ幼虫の歩行以外の動きによる座標のぶれを軽減するため、最も動きの少ない腹部第三節と第四節の中間点をカイコ幼虫の座標とした。時刻間の座標移動距離を合計して3分間の移動距離を算出し、行動指標とした。なお、背脈管の拍動が停止している個体を死亡、背脈管は動いているが歩行が不可能な個体を瀕死とみなし、ともに移動距離 0 mm とした。

生存曲線

4 齢起蚕のカイコ幼虫に 1×10^5 PFU の BV を皮下注射し、6 時間おきに生死判定を行い死亡までの時間を調査した。生死判定は、背脈管の拍動が停止している個体を死亡とみなした。得られた各時間の生存率を元に、統計ソフト Prism 5 (GraphPad Software) を用いて生存曲線を作成した。

Bmpolh-proD および WT 感染脳のトランスクリプトーム解析

カイコ 5 齢幼虫に WT および Bmpolh-proD の BV を皮下注射し (1×10^5 PFU / 個体)、感染後 3 日および 4 日に感染幼虫の脳をサンプリングした (34 ~ 36 個体 / サンプル)。各サンプルから TRIzol (Invitrogen) を用いて total RNA を抽出し、1 μ g の total RNA を用いて RNA-seq ライブラリを構築した。RNA-seq ライブラリの構築は mRNA Seq Sample Preparation Kit (Illumina) を添付のプロトコルに従って行った (Kawaoka *et al.*, 2013)。各ライブラリの cDNA 末端に Illumina GA シークエンシングアダプターを付加し、Phusion DNA Polymerase (Finnzymes) を用いた 15 サイクルの PCR により cDNA を増幅した。その後、Illumina GA II シークエンサーを用いて RNA-seq を行なうことにより、36 塩基

対の single end タグからなる RNA-seq データが得られた。得られた RNA-seq データは DRA002538 (DDBJ) に登録した。なお、RNA-seq ライブラリの構築および Illumina GA II シークエンサーによる RNA-seq は、東京大学大学院新領域創成科学研究科情報生命科学専攻の鈴木穰教授との共同研究により行っていた。

次に、WT および Bmpolh-proD 感染脳から得られた RNA-seq データを BmNPV の T3 株のゲノム配列 (GenBank Acc. no. L33180) にマッピングした。マッピングは Bowtie (Langmead *et al.*, 2009) を用いて行い、2 塩基のミスマッチを許容した。マッピングデータは Tablet (Milne *et al.*, 2013) を用いて可視化し、WT および Bmpolh-proD のほぼ全ゲノム領域の配列が得られていることを確認した。WT と Bmpolh-proD のトランスクリプトーム配列の比較により見つかった変異が実際に WT、Bmpolh-proD および BmNPV-abb ゲノム中に存在するかどうかは、ゲノム PCR および DNA シークエンシングにより確認した。

***arif-1* 変異ウイルスの作製**

arif-1 欠損ウイルスを作製するにあたり、まず、*arif-1* 遺伝子領域を含む 1.9 kbp の T3 ゲノム断片 (nt 10,329–12,277; GenBank Acc. no. L33180) をベクターにクローニングした。次に、このベクターを制限酵素 NsiI で切断し、*Drosophila melanogaster* の *heat shock protein 70* (*hsp70*) プロモーターと β -galactosidase 遺伝子を繋いだカセット (*hsp70-lacZ* カセット) を導入することで、*arif-1* 遺伝子を破壊した。*hsp70-lacZ* カセット内には Bsu36I 切断サイトが存在する。完成したプラスミド (placZ-*arif1*) を Cellfectin (Invitrogen) を用いて任意のウイルスゲノム DNA と BmN 細胞にコトランスフェクションすることで、Bmpolh-proD-ARIFD (Bmpolh-proD ベース)、BmARIFD (WT ベース)、BmhspGFP-ARIFD (BmhspGFP ベース) の 3 つの *arif-1* 欠損ウイルスを作製し

た。作製した *arif-1* 欠損ウイルスはプラークアッセイによる純化を行った。その際、5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactoside を含むアガロースゲルを重層することにより、 β -galactosidase を発現し青色を呈するプラークを選抜した (Katsuma *et al.*, 2012a)。

arif-1 の復帰変異株およびフレームシフト変異株は、以下の手順で作製した。まず、*arif-1* 遺伝子を含む約 3 kbp の領域 (nt 10,241–13,183; GenBank Acc. no. L33180) を PCR により WT および Bmpolh-proD ゲノム DNA を鋳型に用いて増幅し、pcDNA3.1(-)ベクター (Invitrogen) にクローニングした。WT の配列をクローニングしたものを pcDNA-arif1、Bmpolh-proD の配列をクローニングしたものを pcDNA-arifFS と名付けた。pcDNA-arif1 ベクターと Bsu36I で切断された Bmpolh-proD-ARIFD ゲノム DNA を上述の方法でコトランスフェクションすることで、正常型の *arif-1* を保持する復帰変異ウイルス Bmpolh-proD-ARIFR を作製した。得られた組換えウイルスは *hsp70-lacZ* カセットを持たないと予想される。そのため、プラーク純化の際に 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactoside を含むアガロースゲルを重層することにより、白色を呈するプラークを選抜した。BmARIFD ベースの *arif-1* 復帰変異ウイルス (BmARIFDR) およびフレームシフト変異ウイルス (BmARIF-FS) も、それぞれ pcDNA-arif1 および pcDNA-arifFS ベクターを用いることで同様の方法で作製した。

完成した組換えウイルスは PCR と DNA シークエンシングにより配列を確認した。使用されたプライマーは表 1.1 に示す。

カイコ幼虫および BmN 細胞における多角体/BV 産生量の測定

カイコ幼虫における多角体および BV 産生量は以下のように測定した。カイコ 5 齢幼虫に 1×10^5 PFU の BV を皮下注射し、任意の感染後時間に体液を回収した。体液中に放出された多角体量は血球計算盤を用いて計測した

(Katsuma *et al.*, 2009)。体液中の BV タイターは BmN 細胞を用いたプラークアッセイにより測定した (Nakanishi *et al.*, 2010)。

BmN 細胞における多角体および BV 産生量は以下のように測定した。BV を BmN 細胞に MOI = 5 で感染させ、1 時間静置して BV を BmN 細胞に吸着させた後に新しい培地に交換し、この時間を感染後 0 時間と定めた。その後、任意の時間に 1 / 300 量の培地を回収し、プラークアッセイにより BV タイターを測定した。また、感染細胞スクレイパーを用いて回収し、Katsuma *et al.* (2009) の手法を用いて多角体量を計測した。

GFP 発現ウイルス感染組織の GFP 蛍光観察

カイコ 5 齢幼虫に BmbspGFP および BmbspGFP-ARIFD の BV を 1×10^5 PFU 皮下注射した。任意の感染後時間に感染幼虫から体液を回収し、血球計算盤を用いて観察した。また、感染幼虫をリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline; PBS) 中で解剖して脂肪体、気管、腹側神経索、脳の 4 組織を摘出し、PBS で満たした培養皿中に入れて観察した。GFP 蛍光の観察は FLoid® Cell Imaging Station (Life Technologies) を用いて行った。

定量 RT-PCR 解析

ウイルス感染組織を用いた定量 RT-PCR 解析は以下の手順で行った。まず、 1×10^5 PFU の BV をカイコ 5 齢幼虫に皮下注射し、任意の感染後時間に血球、気管、脳の 3 組織を回収した。次に、TRIzol (Invitrogen) を用いて回収した組織から total RNA を抽出し、それぞれの組織につき 13、250、25 ng の total RNA を cDNA 合成に用いた。cDNA 合成は SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) を用いて添付のプロトコルに従い行った。定量 PCR は StepOnePlus Real-Time PCR system (Applied Biosystems) を使用した。試薬およびプライマ

ーは KAPA SYBR FAST qPCR kit (Kapa Biosystems) および *iel* 定量 PCR 用プライマー (Katsuma & Shimada, 2009; 表 1.1) を用いた。

ウイルス感染 BmN 細胞を用いた定量 RT-PCR 解析は以下の手順で行った。BmN 細胞に BV を MOI = 5 で感染させ、任意の感染後時間にスクレイパーを用いて感染細胞を回収した。TRIzol (Invitrogen) を用いて回収した細胞から total RNA を抽出し、1 μ g の total RNA を用いて cDNA を合成した。以降は感染組織を用いた定量 RT-PCR 解析と同様の方法で行った。使用したプライマーを表 1.1 に示す。

経口感染実験

経口感染における多角体の半数致死濃度 (median lethal concentration; LC₅₀) は、以下のように測定した。経口感染に用いた多角体は、ウイルス感染した 5 齢幼虫の体液から回収し、1 % sodium dodecyl sulfate (SDS) で 1 回、蒸留水で 2 回洗浄し、血球計算盤で濃度を測定したものを使用した。孵化後 8 時間以内の 1 齢幼虫を異なる濃度の多角体を散布した 960 mm² の人工飼料上に 20 匹置き、経口摂取させた。そして、散布した多角体濃度と経口摂取 7 日後の致死数を元に LC₅₀ を算出した。

経口感染による血球の GFP 蛍光観察は以下の手順で行った。カイコ 5 齢幼虫に多角体 1×10^6 個を含んだ 1% スクロース溶液を直接食下させ、人工飼料で飼育した。任意の感染後時間で体液を回収し、血球計算盤と FLoid® Cell Imaging Station (Life Technologies) を用いて血球の GFP 蛍光を観察し、GFP ポジティブな細胞の割合を計測した。

蛍光顕微鏡観察

BmN 細胞は無菌処理したカバーガラスを入れた培養皿で 12 時間培養

した後に、MOI = 5 感染を行った。カバーガラス上の細胞を PBS で 2 回洗浄した後、3.7%のパラホルムアルデヒド / PBS を加え、常温 10 分間静置し、細胞を固定した。

GFP 融合 ARIF-1 タンパク質を観察する際は、固定後の細胞を PBS で 3 回洗浄した後に、カバーガラスをスライドガラスに搭載した。その際に 10 μ l の ProLong® Gold reagent with DAPI (Invitrogen) を添加し、蛍光の退色を防ぐと同時に、DAPI 染色を行った。カバーガラスがずれないようにマニキュアでスライドガラスに固定した後、FLoid® Cell Imaging Station (Life Technologies) で観察した。

F-actin の蛍光染色は、以下の手順で行った。固定後の細胞を PBS で 3 回洗浄した後に、0.1% TritonX-100 / PBS を加えて室温で 5 分間静置し、細胞の透過処理を行った。透過処理後の細胞を PBS で 3 回洗浄し、10 U / ml の Rhodamine Phalloidin (Molecular Probes) を含んだ 1% 牛血清アルブミン (bovine serum albumin; BSA) / PBS を加えて室温 20 分間静置した。その後、PBS で 3 回洗浄し、10 μ l の ProLong® Gold reagent with DAPI (Invitrogen) を添加してカバーガラスをスライドガラスに搭載して固定した後、共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV10i-DOC (OLYMPUS) で観察した。

FLAG タグ付加 BM5 タンパク質の免疫蛍光染色は、以下の手順で行った。固定後の細胞を PBS で 2 回洗浄した後、3.7%のパラホルムアルデヒド / PBS を加え、常温 10 分間静置し、細胞を固定した。0.1% BSA / PBS で 3 回洗浄した後、0.5% TritonX-100 を含む 0.1% BSA / PBS を加え、常温 10 分間静置し、細胞を透過処理した。0.1% BSA / PBS で 3 回洗浄した後、0.1% BSA / PBS で 100 倍希釈したマウス M2 モノクローナル α -FLAG 抗体 (アフィニティ精製) (Sigma) を用いて、一次抗体反応を 4°C o/n で行った。0.1% BSA / PBS で 3 回洗浄した後に、0.1% BSA / PBS で 100 倍希釈したヤギ由来の α -マウス抗体

Alexsa Fluor 488 (Invitrogen) を用いて、二次抗体反応を常温 1 時間で行った。続いて、0.1 % BSA / PBS による洗浄を 3 回行った。カバーガラスをスライドガラスに搭載する際に 10 μ l の ProLong® Gold reagent with DAPI (Invitrogen) を添加し、蛍光の退色を防ぐと同時に、DAPI 染色を行った。カバーガラスがずれないようにマニキュアでスライドガラスに固定した後、FLoid® Cell Imaging Station (Life Technologies) および共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV10i-DOC (OLYMPUS) で観察した。

浮遊細胞数の計測

BmN 細胞に BV を MOI = 5 で感染させ、感染後 3 日に培地上清を回収した。培地上清中に含まれる浮遊細胞数は血球計算盤を用いて計測した。

GFP 融合 ARIF-1 発現ウイルスの作製

GFP 融合 ARIF-1 発現ウイルスは、以下の手順で作製した。まず、KOD-plus-Mutagenesis Kit (TOYOBO) を用いて pcDNA-arif1 の開始コドン直前あるいは stop コドン直前に BamHI 切断サイトを挿入したプラスミドを作製し、それぞれ pcDNA-BamHI-arif1 および pcDNA-arif1-BamHI と名付けた。次に、BmbspGFP ゲノム DNA を鋳型に BamHI 切断サイトを付加したプライマーを用いて *gfp* ORF 領域を PCR で増幅した。得られた PCR 断片と pcDNA-BamHI-arif1 あるいは pcDNA-arif1-BamHI を制限酵素 BamHI で切断し、ベクター側を Alkaline Phosphatase (Calf intestine) (TaKaTa) で脱リン酸化処理した後に DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (TaKaRa) を用いてライゲーションし、N 末端側および C 末端側に *gfp* を付加した *arif-1* を保持するベクター pcDNA-GFP-arif1 および pcDNA-arif1-GFP を作製した。これらのベクターと Bsu36I で切断された BmARIFD ゲノム DNA を上述の方法でコトランスフェクションすることで、N

末端側 GFP 融合 ARIF-1 発現ウイルス GFP-BmARIF および C 末端側 GFP 融合 ARIF-1 発現ウイルス BmARIF-GFP を作製した。得られた組換えウイルスをプラーク純化するには 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactoside を含むアガロースゲルを重層し、白色を呈するプラークを選抜した。完成した組換えウイルスは PCR と DNA シークエンシングにより配列を確認した。使用されたプライマーは表 1.1 に示す。

ウエスタンブロッティング

BmN 細胞に BV を MOI = 5 で感染させ、任意の感染後時間に感染細胞をスクレイパーで回収した。感染細胞の分画サンプルを準備する際は、Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells (Thermo Scientific) を用いて添付のプロトコルに従い細胞質画分・細胞膜+オルガネラ画分・核可溶画分・クロマチン結合画分・不溶画分の 5 つの画分に分画するか、あるいは細胞質画分および細胞膜+オルガネラ画分を回収した後に、残りのペレットに RIPA buffer (50 mM Tris at pH 8.0, 100 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1% NP-40, protease inhibitor cocktail (Roche)) を加えて核画分とした。各画分には等量の 2×SDS sample buffer を加え、懸濁した。また、体液サンプルは、感染幼虫から得られた少量の体液を直接 1×SDS sample buffer に懸濁して調製した。得られたサンプルを用いて常法に則り SDS-PAGE およびウエスタンブロッティングを行った。1 次抗体反応には、マウスの α -GFP (B-2) 抗体 (Santa Cruz) および α -V-CATH 抗体 (Daimon *et al.*, 2007) を使用した。

タンパク質の構造予測

膜貫通ドメインの予測は web 上で利用可能な TMHMM ver. 2.0 ソフトウェアを用いて行った (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)。シグナルペ

プチドの予測には web 上で利用可能な SignalP 4.1 ソフトウェアを用いた (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)。

***Bm5* 変異ウイルスの作製**

Bm5 欠損ウイルス (*Bm5D*) を作製するにあたり、まず、*Bm5* 遺伝子領域を含む 6.5 kbp の T3 ゲノム断片 (nt 147–6,664; GenBank Acc. no. L33180) をベクターにクローニングした。次に、このベクターを制限酵素 BstEII および NruI で切断し、*hsp70-lacZ* カセットを導入することで、*Bm5* 遺伝子を破壊した。完成したプラスミド (placZ-*Bm5*) を Cellfectin (Invitrogen) を用いて T3 ゲノム DNA と BmN 細胞にコトランスフェクションすることで、*Bm5* 欠損ウイルス (*Bm5D*) を作製した。作製したウイルスはプラークアッセイによる純化を行った。その際、5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactoside を含むアガロースゲルを重層することにより、 β -galactosidase を発現し青色を呈するプラークを選抜した (Katsuma *et al.*, 2012a)。

その他の *Bm5* 変異ウイルスは、以下の手順で作製した。まず、*Bm5* 遺伝子を含む約 3 kbp の領域 (nt 4,001–6,989; GenBank Acc. no. L33180) を PCR により T3 ゲノム DNA を鋳型に用いて増幅し、pcDNA3.1(-)ベクター (Invitrogen) にクローニングし、pcDNA-*Bm5* と名付けた。pcDNA-*Bm5* ベクターと Bsu36I で切断された *Bm5D* ゲノム DNA を上述の方法でコトランスフェクションすることで、正常型の *Bm5* を保持する復帰変異ウイルス *Bm5DR* を作製した。また、KOD-plus-Mutagenesis Kit (TOYOBO) を用いて、pcDNA-*Bm5* をベースに *Bm5* ORF の第 43 アミノ酸部位に 1 塩基置換により stop コドンを導入したプラスミド (pcDNA-*Bm5stop*)、DUF3627 モチーフを欠損させたプラスミド (pcDNA-*Bm5DUFD*)、C 末端側に FLAG タグを付加したプラスミド (pcDNA-*Bm5-FLAG*)、および pcDNA-*Bm5DUFD* をベースに C 末端側に FLAG

タグを付加したプラスミド (pcDNA-Bm5DUFD-FLAG) を作製し、同様に Bsu36I 切断 Bm5D ゲノム DNA とコトランスフェクションして、stop コドン導入ウイルス (Bm5stop)、DUF3627 欠損ウイルス (Bm5DUFD)、BM5-FLAG 発現ウイルス (Bm5-FLAG)、および DUF3627 モチーフ欠損 Bm5-FLAG 発現ウイルス (Bm5DUFD-FLAG) の各組換えウイルスを作製した。得られた組換えウイルスは *hsp70-lacZ* カセットを持たないと予想される。そのため、プラーク純化の際に 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactoside を含むアガロースゲルを重層することにより、白色を呈するプラークを選抜した。

完成した組換えウイルスは PCR と DNA シークエンシングにより配列を確認した。使用されたプライマーは表 1.1 に示す。

ウイルスゲノムの定量 PCR

BmN 細胞に *Bm5* 変異ウイルスの BV を MOI = 5 で感染させ、感染後 2 日に以下の手順により DNA サンプルを準備した。まず、スクレイパーを用いて培養皿から感染細胞をはがし、培地上清とともに回収した後に 4°C、500 g で 5 分間遠心した。遠心した上清は回収し、100°C で 5 分間煮沸した後に蒸留水で 10 倍希釈し、培地上清サンプルとした。遠心のペレットは PBS で懸濁した後、常法に則り DNA 抽出を行い、DNA 濃度を 15 ng / μ l に揃えて感染細胞中のゲノムサンプルを得た。定量 PCR は StepOnePlus Real-Time PCR system (Applied Biosystems) を使用した。試薬およびプライマーは KAPA SYBR FAST qPCR kit (Kapa Biosystems) および表 1.1 に示したプライマーを用いた。また、感染細胞中のウイルスゲノム量は、ウイルスゲノム用プライマー (*polh*) で得られた値を宿主ゲノム用プライマー (*ago3*) で得られた値で補正することにより算出した。

***Bm47* 変異ウイルスの作製**

Bm47 欠損ウイルス (*Bm47D*) を作製するにあたり、まず、*Bm47* 遺伝子領域を含む 3.4 kbp の T3 ゲノム断片 (nt 41,356–44,787; GenBank Acc. no. L33180) をベクターにクローニングした。次に、このベクターを制限酵素 *Bst*BI で切断し、*hsp70-lacZ* カセットを導入することで、*Bm47* 遺伝子を破壊した。完成したプラスミド (*placZ-Bm47*) を *Cellfectin* (*Invitrogen*) を用いて T3 ゲノム DNA と *BmN* 細胞にコトランスフェクションすることで、*Bm47* 欠損ウイルス (*Bm47D*) を作製した。作製したウイルスはプラークアッセイによる純化を行った。その際、5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactoside を含むアガロースゲルを重層することにより、 β -galactosidase を発現し青色を呈するプラークを選抜した (Katsuma *et al.*, 2012a)。

その他の *Bm47* 変異ウイルスは、以下の手順で作製した。まず、*Bm47* 遺伝子を含む約 3.6 kbp の領域 (nt 41,061–44,690; GenBank Acc. no. L33180) を PCR により T3 ゲノム DNA を鋳型に用いて増幅し、*pcDNA3.1(-)*ベクター (*Invitrogen*) にクローニングし、*pcDNA-Bm47* と名付けた。*pcDNA-Bm47* ベクターと *Bsu36I* で切断された *Bm47D* ゲノム DNA を上述の方法でコトランスフェクションすることで、正常型の *Bm47* を保持する復帰変異ウイルス *Bm47DR* を作製した。また、*KOD-plus-Mutagenesis Kit* (*TOYOBO*) を用いて、*pcDNA-Bm47* をベースに *Bm47* ORF の第 19 アミノ酸部位に 1 塩基置換により stop コドンを導入したプラスミド (*pcDNA-Bm47stop*)、第 19 アミノ酸部位および第 69 アミノ酸部位に 1 塩基置換により stop コドンを導入したプラスミド (*pcDNA-Bm47stop2*)、および *ChaB* ドメインを欠損させたプラスミド (*pcDNA-Bm47ChaBD*) を作製し、同様に *Bsu36I* 切断 *Bm47D* ゲノム DNA とコトランスフェクションして、stop コドン導入ウイルス (*Bm47stop* および *Bm47stop2*) および *ChaB* ドメイン欠損ウイルス (*Bm47ChaBD*) の各組換えウ

ウイルスを作製した。得られた組換えウイルスは *hsp70-lacZ* カセットを持たないと予想される。そのため、プラーク純化の際に 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactoside を含むアガロースゲルを重層することにより、白色を呈するプラークを選抜した。

完成した組換えウイルスは PCR と DNA シークエンシングにより配列を確認した。使用されたプライマーは表 1.1 に示す。

***Bm96* 系ウイルスの作製**

Bm96 欠損ウイルス (*Bm47D*) を作製するにあたり、まず、*Bm96* 遺伝子領域を含む 3.4 kbp の T3 ゲノム断片 (nt 90,801–93,058; GenBank Acc. no. L33180) をベクターにクローニングした。次に、このベクターを制限酵素 BsmFI および SpeI で切断し、*hsp70-lacZ* カセットを導入することで、*Bm96* 遺伝子を破壊した。完成したプラスミド (placZ-*Bm96*) を Cellfectin (Invitrogen) を用いて T3 ゲノム DNA と BmN 細胞にコトランスフェクションすることで、*Bm96* 欠損ウイルス (*Bm96D*) を作製した。作製したウイルスはプラークアッセイによる純化を行った。その際、5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactoside を含むアガロースゲルを重層することにより、 β -galactosidase を発現し青色を呈するプラークを選抜した (Katsuma *et al.*, 2012a)。

その他の *Bm96* 変異ウイルスは、以下の手順で作製した。まず、*Bm96* 遺伝子を含む約 4.6 kbp の領域 (nt 90,977–95,568; GenBank Acc. no. L33180) を PCR により T3 ゲノム DNA を鋳型に用いて増幅し、pcDNA3.1(-)ベクター (Invitrogen) にクローニングし、pcDNA-*Bm96* と名付けた。pcDNA-*Bm96* ベクターと Bsu36I で切断された *Bm47D* ゲノム DNA を上述の方法でコトランスフェクションすることで、正常型の *Bm96* を保持する復帰変異ウイルス *Bm96DR* を作製した。また、KOD-plus-Mutagenesis Kit (TOYOBO) を用いて、pcDNA-*Bm96*

をベースに *Bm96* ORF の第 8 アミノ酸部位に 1 塩基置換により stop コドンを導入したプラスミド (pcDNA-*Bm96stop*) を作製し、同様に *Bsu36I* 切断 *Bm96D* ゲノム DNA とコトランスフェクションして、stop コドン導入ウイルス (*Bm96stop*) を作製した。得られた組換えウイルスは *hsp70-lacZ* カセットを持たないと予想される。そのため、プラーク純化の際に 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactoside を含むアガロースゲルを重層することにより、白色を呈するプラークを選抜した。

完成した組換えウイルスは PCR と DNA シークエンシングにより配列を確認した。使用されたプライマーは表 1.1 に示す。

統計解析

統計解析は、Prizm 5 (Graphpad software) を用いて行った。行動実験のデータは Kruskal-Wallis 検定および Dunn の後検定を用いて解析した。生存曲線の比較では log-rank (Mantel-Cox) 検定および Bonferroni の補正を行った。多角体産生量、BV 産生量、浮遊細胞数、およびウイルスゲノム量の多群間比較では、一元配置分散分析 (one-way analysis of variance; ANOVA) および Dunnett の後検定を行った。組織別定量 RT-PCR 解析や経口感染における GFP 発現血球数の二群間比較では、Welch の修正を適用した Student の *t* 検定を行った。

結果

Bmpolh-proD ウイルスにおける ELA 消失の原因遺伝子の解明

筆者は修士課程在籍時の研究により、Bmpolh-proD 感染カイコ幼虫では ELA が消失することを明らかにした。そこで、ELA 消失の原因が Bmpolh-proD の *polh* プロモーターに導入された変異であるかどうかを確認するため、Bmpolh-proD をベースに *polh* プロモーター復帰変異株 Bmpolh-proDR を作製した (図 1.1A)。これらのウイルスの BV をカイコ幼虫に皮下注射して感染実験を行った結果、Bmpolh-proD 感染幼虫では WT 感染幼虫で見られるような ELA が消失しており、感染幼虫の致死時間も遅延していた (図 1.1B, C)。また、Bmpolh-proDR では *polh* プロモーターが正常型であるにもかかわらず ELA や致死遅延がレスキューされなかったため (図 1.1B, C)、Bmpolh-proD では *polh* プロモーター以外の領域にも変異が生じており、それが ELA 消失の原因となっている可能性が示唆された。

そこで、Bmpolh-proD ゲノム中に存在する変異を網羅的に同定するために、Bmpolh-proD および WT 感染組織由来のトランスクリプトームデータを活用する方法を提案した。バキュロウイルスの感染後期にはウイルスゲノム中のほとんどすべての領域から転写産物が転写されるため (Katsuma *et al.*, 2011)、感染細胞や感染組織のトランスクリプトームデータをアッセンブルすることにより、全ゲノム配列に相当する配列を得ることができる。今回、Bmpolh-proD および WT に感染した脳由来のトランスクリプトームデータをアッセンブルして比較することにより、Bmpolh-proD ゲノム中には *polh* プロモーターの変異以外に 13 個の変異が存在することが示唆された (表 1.2)。これらの変異について、WT、Bmpolh-proD および Bmpolh-proD の親ウイルスである BmNPV-abb のゲノムシーケンシングを行い、実際のゲノム配列を調査したところ、*actin*

rearrangement inducing factor-1 遺伝子 (*arif-1*) に生じたフレームシフト変異のみが Bmpolh-proD 特有の変異であった (表 1.2)。BmNPV-abb 感染幼虫は WT 同様に ELA が惹起されることを考慮すると (図 1.2)、*arif-1* のフレームシフト変異が Bmpolh-proD で ELA が消失する原因であると推測された。

そこで、Bmpolh-proD をベースに正常型の *arif-1* をレスキューしたウイルス Bmpolh-proD-ARIFR を作製し (図 1.1A)、感染実験を行った。その結果、Bmpolh-proD-ARIFR では ELA と致死遅延がレスキューされたことから (図 1.1B, C)、*arif-1* の変異が ELA 消失の原因であることが証明された。

arif-1 変異ウイルスの性状解析

arif-1 は AcMNPV において、*Trichoplusia ni* 由来の TN-368 細胞への感染初期に細胞質中の F-actin を細胞膜上に局在させる現象 (actin rearrangement) を誘導する因子として発見された遺伝子である (Roncarati *et al.*, 1997)。しかし、AcMNPV の TN-368 細胞への感染において、*arif-1* の欠損はウイルス増殖に大きな影響は及ぼさないことが報告されている (Dreschers *et al.*, 2001)。したがって、actin rearrangement がバキュロウイルスの感染サイクルでどのような役割を持っているのかは不明であり、ELA を含めた幼虫感染時の *arif-1* の機能についても全く明らかになっていない。

そこで筆者は、新たに *arif-1* 欠損ウイルス (BmARIFD)、*arif-1* 復帰変異ウイルス (BmARIFDR)、*arif-1* フレームシフト変異ウイルス (BmARIF-FS) の 3 つの組換えウイルスを作製し (図 1.3)、性状解析を行った。まず、BV を皮下注射して感染幼虫の行動実験を行ったところ、BmARIFD や BmARIF-FS 感染幼虫では WT や BmARIFDR に比べ移動距離が有意に低下しており (図 1.4A)、全幼虫が死亡するまで行動の顕著な活性化は見られなかった (図 1.4C)。また、BmARIFD や BmARIF-FS 感染幼虫では致死時間が有意に遅延していた (図 1.4B)。

次に、カイコ幼虫および BmN 細胞におけるウイルス増殖を調査した。まず、ウイルスを皮下注射したカイコ幼虫におけるウイルス増殖を、体液中の多角体および BV 量を指標に調査したところ、BmARIFD や BmARIF-FS では多角体量と BV 量の両方が WT や BmARIFDR と比較して有意に減少していた (図 1.5A)。一方、BmN 細胞においては、BmARIFD や BmARIF-FS の多角体および BV 産生量は WT や BmARIFDR と同程度であった (図 1.5B)。

以上の結果から、*arif-1* の変異は培養細胞でのウイルス増殖には影響しないが、幼虫感染でのウイルス増殖が減少するために致死遅延や ELA の消失が引き起こされることが明らかになった。

***arif-1* 変異ウイルスの感染組織別ウイルス増殖**

次に、個体でのウイルス増殖遅延の原因をより詳細に調査するため、*D. melanogaster hsp 70* プロモーターの支配下で GFP を発現する *arif-1* 欠損ウイルス (BmhspGFP-ARIFD; 図 1.6) を作製して組織別のウイルス増殖を調査した。血球、脂肪体、気管、食道下神経節、脳の 5 組織について、BV の皮下注射による感染後 1 ~ 4 日の GFP 蛍光を蛍光顕微鏡で観察した。観察の結果、感染後 2 日における血球の GFP 蛍光に顕著な違いは観察されず (図 1.7A, B)、GFP ポジティブな血球の割合も BmhspGFP と BmhspGFP-ARIFD で有意差が認められなかった (BmhspGFP, 87.89 ± 3.49 %; BmhspGFP-ARIFD, 91.86 ± 0.81 %; $n = 3$)。一方、脂肪体、気管、食道下神経節、脳の 4 組織では、BmhspGFP では広範囲の細胞で強い GFP 蛍光が観察されたのに対し (図 1.7C, E, G, I)、BmhspGFP-ARIFD では GFP ポジティブな細胞が一部の領域に限定されていた (図 1.7D, F, H, J)。

さらに、血球、気管、脳の 3 組織について total RNA を抽出して定量 RT-PCR 解析を行った。ウイルスの *iel* 遺伝子の発現量を指標にウイルス増殖量

を調査したところ、BmbspGFP-ARIFD 感染幼虫では BmbspGFP と比較して気管や脳でのウイルス増殖が有意に遅延していたが (図 1.8B, C)、血球への感染は遅延が認められなかった (図 1.8A)。以上の結果から、*arif-1* の欠損は血球以外の組織におけるウイルス増殖が遅延することが明らかになった。

さらに、BmbspGFP と BmbspGFP-ARIFD の経口感染時における感染力や感染速度を調査した。まず、BmbspGFP と BmbspGFP-ARIFD の多角体の経口感染力を調査したところ、両者の LC_{50} には有意な差が認められなかった (表 1.3)。次に、経口感染におけるウイルス感染の進行速度を調査するため、経口感染させた幼虫の感染初期の体液を回収し、GFP ポジティブな血球の割合を調査した。その結果、経口感染後 2 日において、BmbspGFP-ARIFD 感染幼虫では GFP ポジティブな血球の割合が BmbspGFP 感染幼虫と比較して有意に減少していたことから (図 1.9)、BmbspGFP-ARIFD では *arif-1* の欠損によりウイルスの中腸通過効率が低下していることが推測された。

以上の結果から、*arif-1* 変異ウイルスでは幼虫感染において血球を除いた様々な組織でのウイルス増殖あるいは組織の通過効率が低下しており、その結果として ELA の低下や致死の遅延が起こっていると考えられる。

BmN 細胞における *arif-1* 欠損の影響

arif-1 は AcMNPV において、感染初期の actin rearrangement を誘導する因子であると報告されている (Roncarati *et al.*, 1997)。しかしながら、BmNPV において actin rearrangement が調査された前例はない。そこで、BmN 細胞に WT および BmARIF-FS を感染させ、BmNPV においても感染初期に actin rearrangement が起こるか調査した。ローダミンファロイジンを用いて感染後 12 時間の BmN 細胞内の F-actin を蛍光染色したところ、偽感染では F-actin の細胞膜への凝集は観察されなかったのに対し、WT と BmARIF-FS の両方で F-actin

の細胞膜局在が認められた (図 1.10)。この結果から、BmNPV 感染 BmN 細胞においては感染初期の actin rearrangement に *arif-1* は必要ないことが示唆された。

次に、BmN 細胞に *arif-1* 変異ウイルスを MOI = 5 で感染させ、感染後 3 日において培養皿底面から脱離し浮遊した感染細胞数を計測した。その結果、BmARIFD や BmARIF-FS では WT や BmARIFDR と比較して浮遊細胞数が有意に減少していたことから (図 1.11)、*arif-1* は感染後期に細胞の脱離を促進することが示唆された。

***arif-1* mRNA および ARIF-1 タンパク質の発現プロファイルと細胞内局在**

arif-1 の作用機序を解明するため、*arif-1* mRNA や ARIF-1 タンパク質の発現プロファイルを調査した。まず、WT ウイルスを BmN 細胞に MOI=5 で感染させ、*arif-1* mRNA の経時的な発現変化を調査した。その結果、*arif-1* mRNA は感染初期 (感染後 0 ~ 12 時間) から発現が認められ、感染後期 (感染後 24 時間以降) には発現量が顕著に上昇した (図 1.12)。

次に、ARIF-1 タンパク質の経時的な発現変化や細胞内局在を調査するため、新たに N 末端側および C 末端側に GFP を融合した ARIF-1 を発現するウイルス GFP-BmARIF および BmARIF-GFP を作製した (図 1.13A)。まず、GFP-BmARIF および BmARIF-GFP 感染幼虫の致死時間調査したところ、どちらのウイルスでも致死遅延がレスキューされていたことから、GFP 融合 ARIF-1 タンパク質は正常な機能を保持していると考えられた (図 1.13B)。BmARIF-GFP を BmN 細胞に MOI = 5 で感染させ、 α -GFP 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより全感染細胞中の ARIF1-GFP タンパク質発現を経時的に調査したところ、感染後 24 時間以降で約 77 kDa および約 61 kDa のバンドが見られた (図 1.14)。BmNPV 感染 BmN 細胞の完全長 cDNA ライブラリー解析では、*arif-1* は後期プロモーターモチーフから転写される後期遺伝子であることを示すデータ

が得られている (Katsuma *et al.*, 2008)。一方、AcMNPV においては、プライマーエクステンション解析の結果から *arif-1* は初期遺伝子であると報告されており (Roncarati *et al.*, 1997)、ARIF-1 タンパク質も感染初期から後期にかけて発現が見られることが知られている (Dreschers *et al.*, 2001)。しかしながら、近年のトランスクリプトームおよび TSS 解析により、AcMNPV 感染 TN-368 細胞において、*arif-1* は初期プロモーターモチーフしか持たないにも関わらず、感染初期から後期にかけて継続的に発現していることが明らかになった (Chen *et al.*, 2013)。これらの結果から、AcMNPV では *arif-1* は初期および後期遺伝子であるのに対し、BmNPV においては *arif-1* はウイルスの後期遺伝子であることが明らかになった。

次に、ARIF-1 タンパク質の細胞内局在を調査するため、GFP-BmARIF および BmARIF-GFP 感染後 24 時間の BmN 細胞を細胞質画分、細胞膜+オルガネラ画分、核画分の 3 つの画分に分画し、 α -GFP 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。その結果、GFP-BmARIF 感染細胞では膜+オルガネラ画分に約 29 kDa のバンドが見られた (図 1.15A)。一方、BmARIF-GFP 感染細胞では細胞膜+オルガネラ画分に約 77kDa および約 61kDa のバンドが、細胞質画分に約 61 kDa のバンドが検出された (図 1.15A)。蛍光顕微鏡観察下でも GFP-BmARIF および BmARIF-GFP 感染細胞の細胞質側で GFP 蛍光が観察されることから (図 1.15B)、ARIF-1 タンパク質は細胞質およびオルガネラ局在であると推測された。また、GFP-ARIF1 および ARIF1-GFP タンパク質の予測サイズは約 77kDa であるが、GFP-BmARIF では約 29 kDa バンドのみが、BmARIF-GFP では約 77kDa のバンドに加えて約 61 kDa のバンドが検出されたことから (図 1.15A)、ARIF-1 は何らかの切断を受けることが示唆された。ARIF-1 のアミノ酸配列を元に TMHMM ver. 2.0 を用いて膜貫通ドメインを予測すると、ARIF-1 は N 末端側に 4 つの膜貫通ドメインを持つ膜タンパク質であると予測

される (図 1.16A)。ARIF1-GFP タンパク質の 4 つの膜貫通ドメインのうち、膜貫通ドメイン 3 と 4 の間で切断された場合、C 末端側の予測サイズは約 55 ~ 64 kDa であり、BmARIF-GFP 感染細胞で検出された約 61 kDa のバンドと一致する。このことから、ARIF-1 タンパク質は膜貫通ドメイン 4 を含む C 末端側が切断されて機能すると推測された。一方、GFP-BmARIF 感染細胞で検出された約 29kDa のバンドは、膜貫通ドメイン 1 の直後で切断された GFP-ARIF1 タンパク質の N 末端側のサイズ (約 30kDa) とほぼ一致していた。SignalP 4.1 による予測では ARIF-1 タンパク質にはシグナルペプチドは検出されないものの、膜貫通ドメイン 1 の直後でスコアの上昇が見られたため (図 1.16B)、ARIF-1 タンパク質では膜貫通ドメイン 1 がシグナルペプチドとして機能し、切断されている可能性が示唆された。

遺伝子欠損ウイルスを用いた行動実験

Gomi *et al.* (1999) による BmNPV の *hsp70-lacZ* カセット挿入による遺伝子欠損変異株を用いた研究において、*bv/odv-e26* (*Bm8*) と *ptp* (*Bm130*) に加えて、*Bm5*、*Bm29*、*Bm47*、*Bm60*、*Bm96* の各遺伝子を欠損した BmNPV (それぞれ *Bm5D*、*Bm29D*、*Bm47D*、*Bm60D*、*Bm96D*; 表 1.4) が感染したカイコ幼虫は、その ELA が低下することが報告されている。これらの遺伝子と異常行動との関係をより詳細に調査するため、上述の遺伝子欠損ウイルスを用いて行動実験を行い、感染幼虫の移動距離を定量した。その結果、*Bm60D* 感染幼虫では WT と比較して移動距離に有意差が認められなかったが、*Bm5D*、*Bm29D*、*Bm47D*、*Bm96D* の 4 ウイルスでは感染幼虫の ELA が有意に低下していた (図 1.17)。また、感染幼虫の致死時間を調査したところ、*Bm5D*、*Bm47D*、*Bm60D*、*Bm96D* では WT との LT_{50} の差が 12 時間以内であったのに対し、*Bm29D* では

WT と比較して LT_{50} が 40 時間以上遅延していた (図 1.18)。以上の結果から、*Bm5*、*Bm47*、*Bm96* の 3 遺伝子が ELA に関与すると判断し、詳細な解析を行った。*Bm60* は ELA への寄与率が低いと考えられるため、また *Bm29* の欠損はウイルス増殖に重篤な遅延をもたらしていると考えられるため、以降の解析から除外した。

***Bm5* 変異ウイルスの性状解析**

Bm5 ホモログは全ての alphabaculovirus および betabaculovirus で保存されており、機能未知の DUF3627 モチーフを C 末端側に持つタンパク質をコードする (Rohrmann, 2013)。また、*Bm5* は非必須遺伝子であることや (Ono *et al.*, 2012)、ウイルスの後期遺伝子で細胞質に局在することが報告されているが (Zhou *et al.*, 2010)、その機能はこれまでよく分かっていなかった。そこで、*Bm5D* に加えて stop コドン導入による欠損ウイルス (*Bm5stop*) や DUF3627 モチーフ欠損ウイルス (*Bm5DUFD*) といった変異ウイルスを新たに作製し (図 1.19)、その性状を詳細に解析した。

まず、*Bm5* 変異ウイルスを用いて行動実験を行ったところ、*Bm5D* や *Bm5stop* では WT や *Bm5DR* と比較して ELA の開始が遅延しており、徘徊行動のピークは WT や *Bm5DR* が感染後 90 時間出会ったのに対し、*Bm5D* は感染後 102 時間、*Bm5stop* は感染後 114 時間であった (図 1.20A)。これらのウイルスでは LT_{50} も WT や *Bm5DR* と比較して有意に遅延していたことから (WT および *Bm5DR* : 102 時間、*Bm5D* : 120 時間、*Bm5stop* : 132 時間 ; 図 1.20B)、*Bm5* を欠損すると致死の遅延に伴って ELA の開始が遅延することが示唆された。一方、*Bm5DUFD* では致死が遅延するにも関わらず (LT_{50} = 126 時間 ; 図 1.20B)、ELA は WT と同時期に惹起され、その後長時間持続する様子が観察された (図 1.20A)。この結果から、*Bm5DUFD* は ELA を通常のタイミングで惹起するに十

分な機能を持っており、それは致死の遅延とは独立したメカニズムであることが示唆された。

次に、*Bm5* の変異がウイルス増殖にもたらす影響を調査した。まず、感染幼虫における体液中のウイルス増殖を調査したところ、*Bm5D*、*Bm5stop*、*Bm5DUFD* の全てにおいて WT や *Bm5DR* と比較して多角体量が有意に減少していた (図 1.21A)。一方、BV 量は *Bm5D* や *Bm5stop* では WT や *Bm5DR* と比較して有意に減少していたのに対し、*Bm5DUFD* では WT や *Bm5DR* と比較して優位差は認められなかった (図 1.21A)。*BmN* 細胞におけるウイルス増殖でも同様の結果が得られたことから (図 1.21B)、*Bm5* タンパク質はウイルス増殖に関与するタンパク質で、その中でも DUF3627 モチーフが多角体産生に関与することが示唆された。

***Bm5* 変異ウイルス感染細胞におけるウイルスゲノム複製とウイルス遺伝子発現**

Bm5 変異ウイルスにおけるウイルス増殖低下の原因として、ウイルスゲノム複製量が減少している可能性が考えられた。また、ウイルスゲノム複製量が正常であっても、BV の感染細胞外への出芽効率の低下や、出芽した BV の感染力の低下が原因となり、感染性 BV の産生量が低下する可能性が考えられた。そこで、*Bm5* 変異ウイルスを *BmN* 細胞に MOI = 5 感染させ、感染細胞中および培地上清中のウイルスゲノム量を調査したところ、*Bm5D* および *Bm5stop* において、WT や *Bm5DR* と比較して有意に感染細胞中および培地上清中のウイルスゲノム量が減少していた (図 1.22)。この結果から、*Bm5D* や *Bm5stop* におけるウイルス増殖の低下は、ウイルスゲノム複製の低下が一因であることが明らかになった。一方、*Bm5DUFD* では感染細胞中および培地上清中のどちらにおいてもウイルスゲノム量の減少は観察されなかったことから (図 1.22)、

DUF3627 モチーフはウイルスゲノム複製には関与せず、それ以外の原因により多角体産生量が減少していると考えられた。

次に、BmN 細胞におけるウイルスおよび宿主の遺伝子発現量を継時的に調査した。その結果、Bm5D、Bm5stop および Bm5DUFD の全てにおいて、ウイルス遺伝子の感染後 24 時間以降の発現パターンに異常が見られたことから (図 1.23A-G)、BM5 タンパク質の DUF3627 モチーフは感染後期のウイルス遺伝子発現制御に関与することが示唆された。特に、多角体の主構成タンパク質遺伝子である *polh* や、多角体形成に関与する *fp25k* の発現量低下は、*Bm5* 変異ウイルスにおける多角体産生量低下の原因となっていると推測される (図 1.23G)。また、ウイルスの持つタンパク質分解酵素遺伝子である *v-cath* の発現量も低下していたことから (図 1.23F)、*Bm5* 変異ウイルス感染幼虫では *v-cath* 発現量の低下により幼虫の体内の分解が遅れ、致死遅延に繋がったと考えられる。実際に、*Bm5* 変異ウイルス感染幼虫体液中では成熟型の V-CATH 量が減少しており (図 1.24)、この仮説を支持するデータであると言える。一方、*Bm5* 変異ウイルス感染細胞における宿主遺伝子の発現量も調査したところ、全てのウイルスで宿主遺伝子の発現変動に顕著な差は認められなかった (図 1.23H, I)。このことから、BM5 タンパク質は宿主遺伝子発現のシャットオフには関与しないことが示唆された。

BM5 タンパク質の細胞内局在

Zhou *et al.* (2010) の報告によると、*Bm5* mRNA は感染初期 (感染後 6 時間以降) から発現するものの、BM5 タンパク質は感染後期 (感染後 24 時間以降) に発現する。また、6×His-BM5 タンパク質を用いて作成された抗体による免疫染色実験では、BM5 タンパク質は細胞内局在を示すことが報告されている (Zhou *et al.*, 2010)。DUF3627 ドメインを欠損した BM5 タンパク質 (BM5DUFD)

の細胞内局在を調査するため、まず C 末端側に FLAG タグを付加した BM5 タンパク質 (BM5-FLAG) を発現するウイルス (Bm5-FLAG; 図 1.19) を作製し、FLAG タグの付加が BM5 タンパク質の機能に影響を与えないか調査した。その結果、BmN 細胞における BV 産生量と感染幼虫の致死時間の両方において、Bm5-FLAG と WT および Bm5DR との間に有意差は認められなかったことから (図 1.25)、C 末端側への FLAG タグの付加は BM5 の機能に影響しないことを確認できた。

次に、C 末端側 FLAG タグ付加 Bm5DUFD タンパク質を発現するウイルス (Bm5DUFD-FLAG; 図 1.19) を作製し、BM5-FLAG および Bm5DUFD-FLAG タンパク質の細胞内局在を調査した。まず、 α -FLAG 抗体による蛍光免疫染色法を用いて共焦点顕微鏡観察を行った結果、BM5-FLAG タンパク質は主に核内の核膜周辺に局在していることが判明した (図 1.26A)。一方、Bm5DUFD-FLAG 感染細胞では主に細胞質で強いシグナルが検出された (図 1.26A)。さらに、感染細胞を細胞質画分・細胞膜+オルガネラ画分・核可溶画分・クロマチン結合画分・不溶画分の 5 つの画分に分画し、 α -FLAG 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。その結果、BM5-FLAG は主に不溶画分にバンドが見られ、その他に細胞膜+オルガネラ画分と核可溶画分でバンドが見られた (図 1.26B)。一方、Bm5DUFD-FLAG では膜+オルガネラ画分や核可溶画分で強いバンドが見られ、その他に細胞質画分と不溶画分でバンドが検出された (図 1.26B)。これらの結果から、BM5 タンパク質は核内の核膜周辺の不溶画分に主に局在し、その局在には DUF3627 モチーフが重要な役割を果たすことが示唆された。

Bm47 変異ウイルスの行動実験

Bm47 ホモログはほとんど全ての alphabaculovirus に保存されている遺伝子で、細菌においてカチオン輸送タンパク質を制御する ChaB タンパク質に

保存されている ChaB ドメインを持つ (Rohrmann, 2013)。しかしながら、Bm47 タンパク質の機能はこれまで不明であった。そこで、Bm47D に加えて stop コドン導入による *Bm47* 欠損ウイルス (Bm47stop、Bm47stop2) および ChaB ドメイン欠損ウイルス (Bm47ChaBD) を作製し (図 1.27)、それらを用いた行動実験を行った。その結果、Bm47D では ELA が観察されなかったが、Bm47stop、Bm47stop2、Bm47ChaBD の 3 ウイルスでは若干の遅延は見られるものの、WT や Bm47DR と同様に ELA が観察された (ELA 惹起数 (感染後 90 時間、n = 24) : 偽感染 = 0、WT = 17、Bm47D = 0、Bm47DR = 15、Bm47stop = 21、Bm47stop2 = 21、Bm47ChaBD = 16)。 *hsp70-lacZ* カセット挿入による遺伝子欠損変異ウイルスでは、カセット挿入の影響で隣接した遺伝子の発現量が異常となり、ウイルスの増殖に影響を及ぼす場合がある (Katsuma *et al.*, 2012a)。Bm47D では他のウイルスと比較して致死時間が有意に遅延していることから (図 1.28)、Bm47D では *hsp70-lacZ* カセット挿入による影響が強く出ていると考えられる。したがって、*Bm47* 自身は ELA に関与しないと推測された。

Bm96 変異ウイルスの行動実験

Bm96 は多くの alphabaculovirus に保存されている遺伝子であるが、その機能は全く明らかになっていない (Rohrmann, 2013)。そこで、Bm96D に加えて stop コドン導入による *Bm96* 欠損ウイルス (Bm96stop) を作製し (図 1.29)、それらを用いて行動実験を行った。その結果、Bm96D および Bm96stop 感染幼虫では WT や Bm96DR と比較して ELA が有意に低下していたことから (図 1.30A)、*Bm96* は ELA に関与する遺伝子であると考えられる。また、これらのウイルスでは致死時間に顕著な変化は認められなかった (図 1.30B)。 *Bm96* 変異ウイルスのカイコ幼虫におけるウイルス増殖を調査したところ、Bm96D や Bm96stop 感染幼虫では WT や Bm96DR と比較して体液中の多角体量が有意に

増加しており（図 1.31A）、体液中の BV 量も有意差は認められなかったが増加傾向にあった（図 1.31B）。以上の結果から、*Bm96* はウイルス増殖に関与する遺伝子であることが明らかになった。

考察

BmNPV およびカイコ幼虫を用いた研究では、これまで *ptp* と *bv/odv-e26* の 2 遺伝子が ELA 関連遺伝子として報告されている (Kamita *et al.*, 2005; Katsuma *et al.*, 2012a)。詳細な機能解析の結果、PTP は BV の構造タンパク質としてウイルス増殖に関わるタンパク質で、欠損により脳を含めた全身でのウイルス増殖が遅延することが明らかになっている (Katsuma *et al.*, 2012b)。また、BV/ODV-E26 は組織トロピズムに関与するタンパク質で、欠損すると ELA が惹起される前に早期致死する (Katsuma *et al.*, 2012a)。今回、研究室の保持する BmNPV の変異株を用いて新たな ELA 関連遺伝子を探索した結果、*arif-1*、*Bm5*、*Bm96* の 3 遺伝子が ELA に関与することが判明したため、これらの遺伝子の機能解析を行った。

arif-1 は AcMNPV 感染 TN-368 細胞において、感染初期の actin rearrangement を誘導するタンパク質をコードする遺伝子であるが (Roncarati *et al.*, 1997)、ARIF-1 の幼虫感染における機能や actin rearrangement の意義はこれまで明らかになっていなかった。*arif-1* 変異ウイルスを用いた性状解析の結果、*arif-1* 変異ウイルスでは BV の血体腔内注射による幼虫感染において、血球以外の組織におけるウイルス増殖が遅延しており (図 1.7、1.8)、その結果として感染幼虫全体のウイルス増殖や致死時間が遅延し (図 1.4B、1.5A)、ELA が消失する (図 1.4A) ことが明らかになった。経口感染実験においては *arif-1* 欠損により中腸から血体腔へのウイルスの通り抜けが遅延していることを示唆するデータが得られており (図 1.9)、*arif-1* は様々な組織において組織内の感染拡大効率に関与する遺伝子であると推測される。*arif-1* を欠損しても BmN 細胞におけるウイルス増殖には影響が無いことや (図 1.5B)、多角体の経口感染力はコ

ントロールと同程度であることを考慮すると（表 1.3）、*arif-1* はウイルス増殖には関与せず、欠損しても正常な BV や多角体を形成することができると考えられる。BmN 細胞はウイルス感染後期に付着性を失い、培養皿底面から脱離するが、*arif-1* 変異ウイルスでは脱離細胞数がコントロールウイルスに比べ有意に減少することから（図 1.11）、*arif-1* は感染細胞の接着力を緩め、細胞間の間隙を広くすることで組織内の BV の浸透効率を高めているのかもしれない。しかしながら、現状ではそれを証明するデータが不足しており、*arif-1* が組織特異的にウイルスゲノム複製や BV 産生などに関与する可能性も否定出来ないため、ARIF-1 の詳細な作用機序の解明には更なる解析が不可欠である。

GFP 融合 ARIF-1 発現ウイルスを用いて ARIF-1 の発現時期や細胞内局在を調査した結果、ARIF-1 は感染後 24 時間以降に発現する後期タンパク質であることや（図 1.14）、細胞質およびオルガネラに局在し、全長のタンパク質と切断をうけて C 末端側のみとなったタンパク質の 2 つの状態が存在することが明らかになった（図 1.15）。しかしながら、先行研究の報告では AcMNPV の ARIF-1 は感染初期から発現し、細胞膜に局在するタンパク質であり、切断されることを示す結果は得られていない（Dreschers *et al.*, 2001）。このことから、BmNPV の ARIF-1 は AcMNPV の ARIF-1 とは異なる機能を有していることが示唆された。また、*arif-1* フレームシフト変異ウイルスに感染した BmN 細胞でも actin rearrangement が観察されたことから（図 1.10）、actin rearrangement における ARIF-1 の役割も AcMNPV 特有の現象である可能性がある。

BM5 は DUF3627 モチーフを持つこと以外、これまで全く機能が分かっていなかった。そこで、*Bm5* 変異ウイルスを作製して性状解析を行った結果、*Bm5* 欠損ウイルスではウイルスゲノム複製や感染後期のウイルス遺伝子発現制御に異常が生じており（図 1.22、1.23）、その結果としてウイルス増殖や致死時

間および ELA が遅延することが明らかになった (図 1.20、1.21)。また、DUF3627 モチーフ欠損ウイルスを用いた実験の結果から、感染後期のウイルス遺伝子発現制御は DUF3627 モチーフが担っていることが明らかになった。そのため、*Bm5* 欠損ウイルスや DUF3627 モチーフを欠損したウイルスでは、*polh* や *v-cath* の発現量が低下し (図 1.23F、G、1.24)、それが原因で多角体産生量の減少や致死遅延が引き起こされる (図 1.20B、1.21)。一方、ウイルスゲノム複製や BV 産生量は DUF3627 モチーフに影響されないため (図 1.21、1.22)、DUF3627 欠損ウイルスでは WT と同様に全身感染が進行すると考えられる。

BM5-FLAG 発現ウイルスを用いた局在解析の結果、BM5 タンパク質は核内の核膜近傍に局在することが明らかになった (図 1.26A)。この結果は Zhou *et al.* (2010) の結果と矛盾する。筆者の用いた BM5-FLAG 発現ウイルスは、フェノタイプのレスキューや (図 1.25)、ウエスタンブロットティングにおいて非特異バンドは検出されないことを確認しているのに対し (図 1.26B)、Zhou *et al.* (2010) の論文では *Bm5* 欠損ウイルスを用いた抗体の特異性の確認実験が行われていないことから、筆者の結果の方が信頼性が高いと考えられる。また、BM5 タンパク質は DUF3627 モチーフの欠損により核膜近傍特異的な局在が失われたことから (図 1.26A)、DUF3627 モチーフが BM5 の核膜近傍への局在に必要であり、そのことが一部の後期遺伝子の発現に重要な役割を果たしていると言える。

Bm96 は機能未知の遺伝子であるが、*Bm96* 変異ウイルスでは ELA が有意に低下していたため (図 1.30A)、それらの性状解析を行った。その結果、*Bm96* 変異ウイルスではコントロールウイルスと比較して致死時間に有意差は認められなかったが (図 1.30B)、幼虫感染における多角体および BV 産生量が増加することが明らかになった (図 1.31)。通常、ウイルス増殖が増加すると全身感

染の進行や体液中 V-CATH 量の増加が早まり、致死が早期化すると考えられる。しかし、*Bm96* 変異ウイルスでは体液中 BV 量の増加はコントロールウイルスと比較して有意差は認められず、平均値も 1.5 倍程度と比較的軽微であったことから（図 1.31B）、致死時間に優位な差は出なかったと推測される。あるいは、*Bm96* 変異ウイルスではウイルス増殖の増加により致死が若干早期化するが、ELA の低下により感染幼虫がほとんど移動しなくなったため、虫体の物理的損傷が抑えられて致死が遅延し、結果として致死時間に差が出なかった可能性も考えられる。*BM96* タンパク質の作用機序を解明するためには、今後更なる詳細な解析が必要である。

以上のように、*BmNPV* 感染時の ELA には多種多様な機能を持った遺伝子が関与していることが明らかになった。*BmNPV* において見つかった行動関連遺伝子は全て、ウイルスの感染速度や致死時間に関連する遺伝子である。昆虫における行動制御中枢は脳の中心複合体が司っている。*ptp* および *arif-1* 欠損ウイルスでは感染幼虫の脳におけるウイルス増殖が遅延することから推論すると（Katsuma *et al.*, 2012b; 図 1.7、1.8）、宿主行動制御には感染幼虫が致死する前に脳で十分なウイルス増殖を達成することが重要であると考えられる。

表1.1-1 使用したプライマーリスト

プライマー	配列 (5' → 3')	目的
polhF	TGTTACATTGCAAACGTGGTTTCGTGTACC	オーバーラップPCR (<i>polh</i> プロモーターへの変異導入)
polhR	ATCGGCCTAACGCGCCCGATGTAAATATG	
-49F	CCATCTCGCAAATAAATAAATATTTACTG	<i>polh</i> 領域ゲノムPCR
-49R2	CAGTAAAATAATTTATTTATTTGCGAGATGG	
EPS_F1	GCGTTCAGGCACGAGTTTTGATTGTAACAA	<i>orf40</i> 領域ゲノムPCR
EPS_R1	CTCATTGATGGACCTGTTGTGTGTTATGG	
orf40_F	ATGTCTAAACGTGTTTCGTGAAATGTCGGTT	<i>chitinase</i> & <i>lef-7</i> 領域ゲノムPCR
orf40_R	TGCATACTCGACAATAAATTCGGTTGTGATT	
lef-7_F	CGTTTGACAGCGTCGACTCTGTGTTAGGAA	<i>orf121</i> 領域ゲノムPCR
lef-7_R	TGTGCGCTTTGTACATTATGATTGCAACAG	
orf121_F2	CACTCAATATCTAATCTGTGCTGATCGT	<i>bro-e</i> 領域ゲノムPCR
orf121_R2	AAGCGGTGGCGCACCAACTCCCATTGTTAT	
bro-e_F	AAATCAACGTTCAGACGTACATGCCAACG	<i>arif-1</i> 領域ゲノムPCR & ジェノタイプピン
bro-e_R	TTGAATCACGCCGATTAGTAATAAGCAC	
arif-1_F	AACGTGTTGGTAAAAGTTTATTGCTAAGT	<i>arif-1</i> 領域のクローニング&ゲノムPCR
arif-1_R	CGATTTGGAATCGGTGTGCTGGAACCTCTAT	
arif-1±1.5kb_EcoRI_F	AGAGAAATCCCGCTTTTGTAGTCGTCGTCGATATGGC	<i>arif-1</i> のN末端への <i>Bam</i> HIサイト導入inverse PCR
arif-1±1.5kb_HindIII_R	ACGAAAGCTTAATGTGTGTAACACCGGTGACCCGCTTCGTC	
arif-1_N-inv_F	ATGTTAAATAAAACCACTGCAGTTTACAATCCGGAC	<i>arif-1</i> のC末端への <i>Bam</i> HIサイト導入inverse PCR
arif-1_BamHI_N-inv_R	GGATCCTTTGAATATTTAATTAACAACAACTAAGTAATGGC	
arif-1_BamHI_C-inv_F	GGATCCTAGAAAATATATATAAAAGTATTATTTTTGATTATATAAAG	<i>Bam</i> HIサイト付加 <i>gfp</i> のクローニング
arif-1_C-inv_R	ATTATAAACGGATAGTTTTCTCTCTTAAATTTACGC	
EGFP_BamHI_F	AATGGATCCATGGTAGCAAGGCGGAGGAGCTGT	<i>Bm5</i> 領域のクローニング&ゲノムPCR
EGFP-BamHI-R	AATGGATCCCTACTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGT	
EGFP-stop_BamHI_R	AATGGATCCCTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGT	<i>Bm5</i> へのstopコドン導入inverse PCR
orf5±1kb_F1_ApaI	ATAGGGCCCGTTTCGCCGGTGTGAACCAATGGGAAAGGCTTTTGATG	
orf5±1kb_R1_KpnI	AGGGGTACCTGTCTCGAAATGTTGCGCCAAATGTTAGGATGGTGAA	<i>Bm5</i> へのDUF3627モチーフ欠損inverse PCR
orf5_stop_F2	ATCGTTAAATGGGATTCATTCAAATGCAACACGCA	
orf5_stop_R	GTGCGACCAATTGTaGACGTTATGTGGTACTTTTTG	<i>Bm5</i> のC末端へのFLAGタグ付加inverse PCR
orf5_DUFD_F	ATAGCTAAACGTGTAATCGACGTGGAGATTG	
orf5_DUFD_R	GATGGCGGTTTTCAATTTTTTCGGCCGACTG	<i>Bm47</i> 領域のクローニング&ゲノムPCR
orf5_CIFLAG_F	GATGACGATAAATAAATAAATAAATCATGTATAATAGTTATTAGTATG	
orf5_CIFLAG_R	ATCCTTGTAATCCAATACTTCTGTATAACCTCTTTAACT	<i>Bm47</i> へのstopコドン導入inverse PCR
orf47±1kb_F1_BamHI	GGAGGATCCAGGAATTTGGGCAATGTGCCAAACAACAAGATCGAGTA	
orf47±1kb_R1_HindIII	AGGAAAGCTTTGAGGAACACGTTGGACGGCAAATCCGTGACTATAACACA	<i>Bm47</i> へのstopコドン2導入inverse PCR
orf47_stop_F2	CGACATTGACGAAAGCGACGATAACCGCGACAATC	
orf47_stop_R	TCCCTAACTATCTaGTAGGCGGCTTTGCGCGGAATC	<i>Bm47</i> へのChaBドメイン欠損inverse PCR
orf47stop2_F	tAGTTATTTGTCGAGGCGTTTACAAAGTATCATAA	
orf47stop2_R	TTTGGCGGAGGAGGCGTTTTTTCATTGTATAACATATCG	<i>Bm96</i> 領域のクローニング&ゲノムPCR
orf47_ChaBD_F	GCCGCCTACGAGATAGTTAGGGACGACATT	
orf47_ChaBD_R2	ATCGGGAATTTGATATTTATCGTCATCATC	<i>Bm96</i> へのstopコドン導入inverse PCR
T3-90977 Nhe F	GCTAGCCTATACAAATGGCCAAGCGATTCCGGAATGCAC	
T3-95568 EcoRI R	GAATTCGCGATAAAATGTATATATATAGGGCGTGGGAGCTCG	<i>iel</i> 定量RT-PCR (Katsuma & Shimada, 2009)
Bm96_stop_F	TATaGCTTGTTCCTAACGCGCTCAA	
Bm96_stop_R	CATTAGCCGTCAGATGCATAATGTT	<i>lef-2</i> 定量RT-PCR
rie1F1	TACTTGGACGATTACAAAAG	
rie1R1	GTGCAAATGTTTCGTGTTGTG	<i>fp25k</i> 定量RT-PCR (Katsuma & Shimada, 2009)
q_lef-2_F1	ACATGCTGAACAGCAAGATC	
q_lef-2_R2	ACATCGGTTTTACACATTTGG	<i>gp64</i> 定量RT-PCR (Katsuma & Shimada, 2009)
rfpF1	TACGGTATTACGACAACAG	
rfpR1	AACGAAGATTCTATGACGTG	<i>arif-1</i> 定量RT-PCR
gp64F	ACGAAACTATCAGGTCGTG	
gp64R	TTAAACGTAAAGTCGAGCAC	
arif-1_qPCR_F	GTAACGTGATCACTGGGCTGTGTTGGATG	
arif-1_qPCR_R	AGTTTCTACACACAGTTTTGGCTCA	

表1.1-2 使用したプライマーリスト

プライマー	配列 (5' → 3')	目的
vp39F	ACTTTTCATGATGTCACCTGC	<i>vp39</i> 定量RT-PCR (Katsuma & Shimada, 2009)
vp39R	AGTACTTGCAAATCGACACG	
v-cath_qPCR_F1	CGGCTTGTTGCATACAGCATTCTGAAGCCAT	<i>v-cath</i> 定量RT-PCR
v-cath_qPCR_R1	TTCCTCGTACACGATAATGTATCTATAACA	
BmActin3-qPCR-F	CTCGCCTCCCTCTCTACCTT	<i>actin</i> 定量RT-PCR
BmActin3-qPCR-F	CAACAACAACATCCGTTTCG	
rpolhF1	GAACAAGAGGAGAAGCAATG	<i>polh</i> 定量RT-PCR & ゲノム定量PCR (Katsuma & Shimada, 2009)
rpolhR1	TCCAGTTGGCGATTAACCTC	
ago3 F	CTCTCTTCGTAGAACAATATC	<i>ago3</i> ゲノム定量PCR
ago3 R	TTTCTTAGTACTCAAAACG	

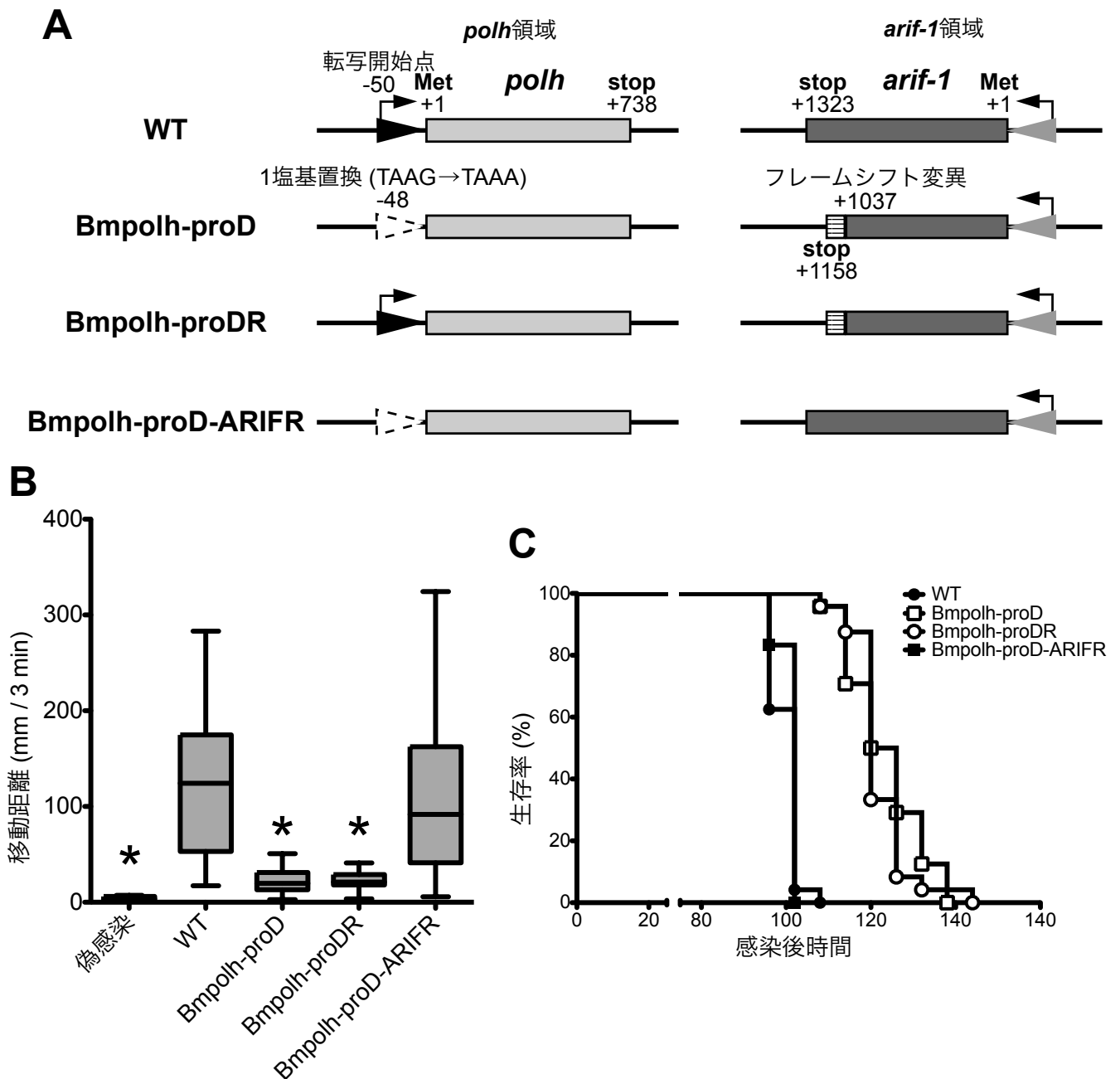


図1.1 Bmpolh-proD系列ウイルスの感染実験

(A) ウイルスの模式図。Bmpolh-proDはBmNPV-abbゲノムをベースに、*polh*後期プロモーターモチーフに1塩基置換を導入したウイルスである。本章の解析により、Bmpolh-proDでは*arif-1*に1塩基欠失によるフレームシフト変異が生じていることが判明した。Bmpolh-proDRはBmpolh-proDベースの*polh*プロモーター復帰変異株、Bmpolh-proD-ARIFRはBmpolh-proDベースの*arif-1*復帰変異株である。

(B) 感染幼虫の移動距離（感染後84時間、 $n = 24$ ）。カイコ4齢幼虫に 1×10^5 PFUのBVを接種し、感染幼虫の3分間の移動距離を測定した。移動距離を箱ひげ図で示す。箱の中央の横線は中央値を、箱の下端及び上端は第1および第3四分位点を、ひげの上下端は外れ値（箱から箱の長さの1.5倍よりも離れた値）を除いた場合の極値を表す。 $*p < 0.05$ （WTと比較）。

(C) 感染幼虫の生存曲線（ $n = 24$ ）。カイコ4齢幼虫に 1×10^5 PFUのBVを接種して6時間おきに生存数をカウントし、生存率を算出した。 $*p < 0.05$ （WTと比較）。

表1.2 Bmpolh-proDゲノム中に存在する変異

Bmpolh-proDおよびWT感染カイコ5齢幼虫の感染後4日の脳のトランスクリプトームデータをアセンブルし、両者を比較することにより、Bmpolh-proDゲノム中に存在する変異を網羅的に調査した。見つかった変異について、Bmpolh-proDのベースとなったBmNPV-abbにも存在するか否かをDNAシーケンシングにより確認した。

ゲノム上の位置 (nt)*	変異	遺伝子	備考	BmNPV-abbゲノム中にも変異が存在するか?
11262	G → -	<i>arif-1</i>	AA346 フレームシフト変異	×
38307	C → T	<i>orf40</i>	同義置換	○
38331	C → T	<i>orf40</i>	同義置換	○
38373	A → G	<i>orf40</i>	同義置換	○
38421	T → G	<i>orf40</i>	同義置換	○
38526	G → A	<i>orf40</i>	同義置換	○
96910	A → G	<i>lef-7</i>	同義置換	○
96964	T → G	<i>lef-7</i>	AA32 Leu → Phe	○
97044	T → C	<i>lef-7</i>	AA6 Lys → Glu	○
97062	C → T	<i>v-chiA</i>	AA549 Arg → Lys	○
116044	C → T	<i>orf121</i>	同義置換	○
126087	T → A	<i>bro-e</i>	AA233 Thr → Ser	○
126109	C → T	<i>bro-e</i>	同義置換	○

* T3ゲノム (GenBank Acc. no. L33180) 上の位置

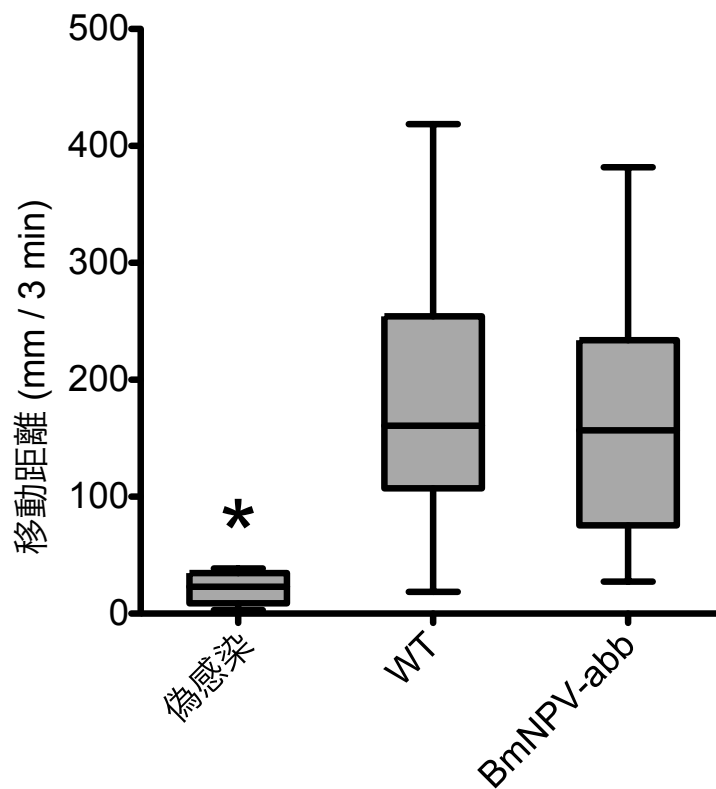


図1.2 BmNPV-abb感染幼虫の移動距離（感染後84時間、n = 24）

カイコ4齢幼虫に 1×10^5 PFUのBVを接種し、感染幼虫の3分間の移動距離を測定した。移動距離を箱ひげ図で示す。箱の中央の横線は中央値を、箱の下端及び上端は第1および第3四分位点を、ひげの上下端は外れ値（箱から箱の長さの1.5倍よりも離れた値）を除いた場合の極値を表す。 $*p < 0.05$ （WTと比較）。

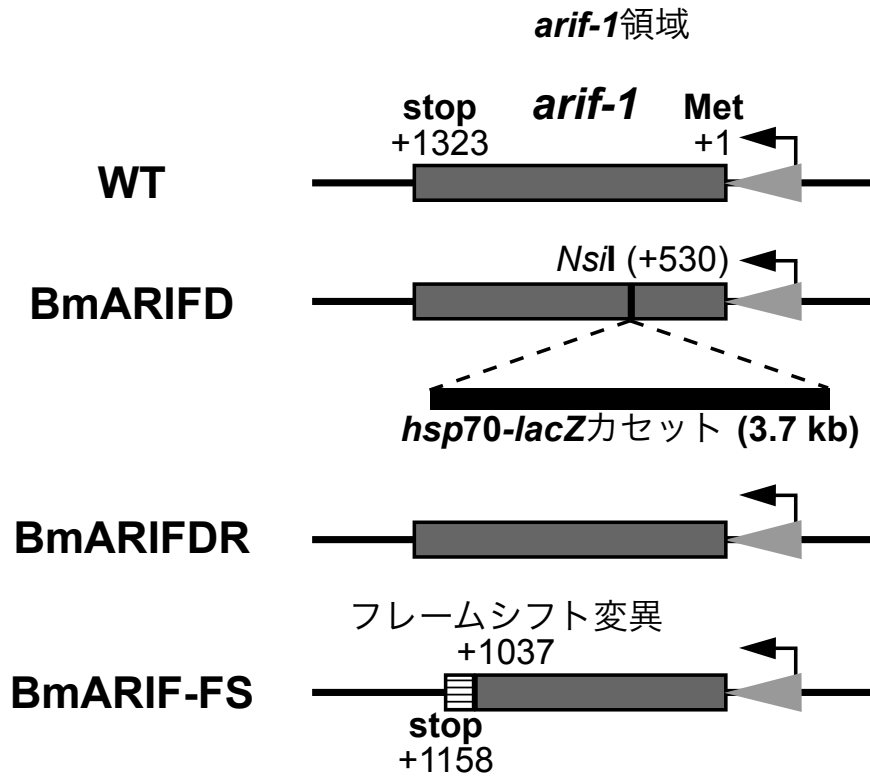


図1.3 *arif-1*変異ウイルスの模式図

BmARIFDはWTゲノムをベースに、*hsp70-lacZ*カセットを導入することにより*arif-1*を欠損させたウイルスである。BmARIFDRはBmARIFDベースの*arif-1*復帰変異株、BmARIF-FSはBmARIFDベースの*arif-1*フレームシフト変異株である。

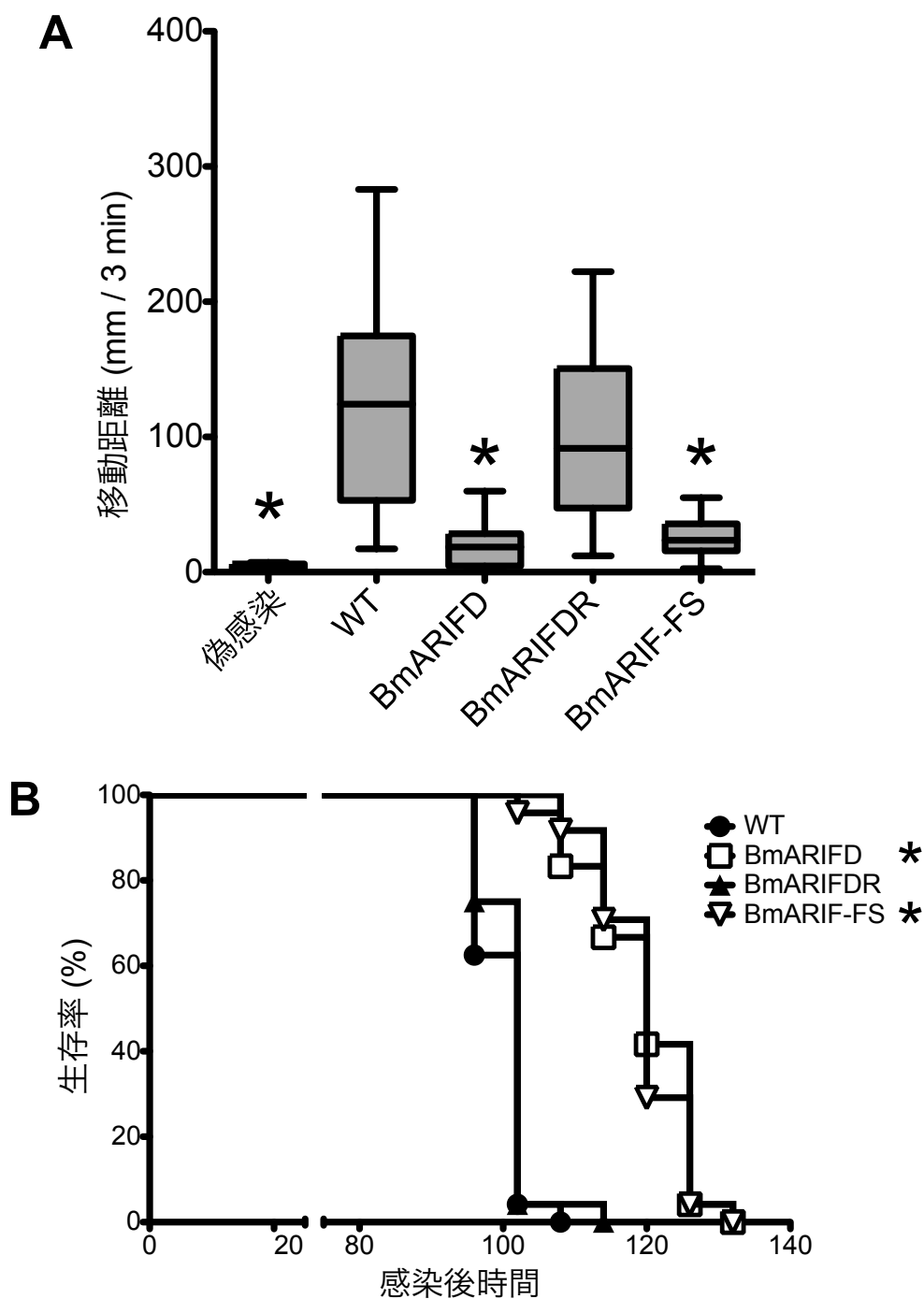


図 1.4 *arif-1*変異ウイルスの感染実験

(A) 感染幼虫の移動距離（感染後84時間、 $n = 24$ ）。カイコ4齢幼虫に 1×10^5 PFUのBVを接種し、感染幼虫の3分間の移動距離を測定した。移動距離を箱ひげ図で示す。箱の中央の横線は中央値を、箱の下端及び上端は第1および第3四分位点を、ひげの上下端は外れ値（箱から箱の長さの1.5倍よりも離れた値）を除いた場合の極値を表す。 $*p < 0.05$ （WTと比較）。

(B) 感染幼虫の生存曲線（ $n = 24$ ）。カイコ4齢幼虫に 1×10^5 PFUのBVを接種して6時間おきに生存数をカウントし、生存率を算出した。 $*p < 0.05$ （WTと比較）。

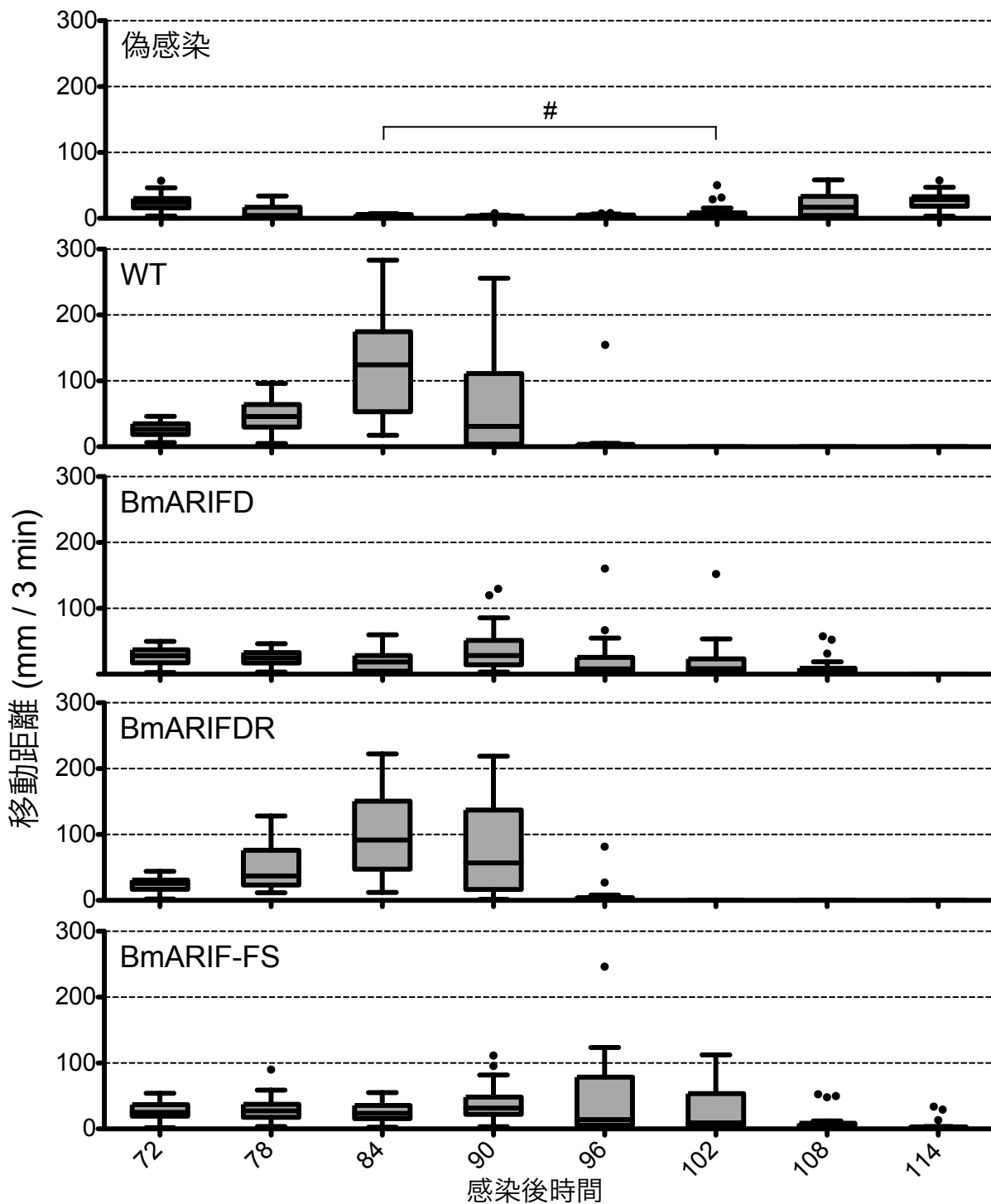


図 1.4 *arif-1*変異ウイルスの感染実験 (続き)

(C) 感染幼虫の経時的な移動距離の変化 (n=24)。カイコ4齢幼虫に 1×10^5 PFUのBVを接種し、感染幼虫の3分間の移動距離を測定し、移動距離の経時的な推移を調査した。移動距離を箱ひげ図で示す。箱の中央の横線は中央値を、箱の下端及び上端は第1および第3四分位点を、ひげの上下端は外れ値 (箱から箱の長さの1.5倍よりも離れた値) を除いた場合の極値を表す。#は、偽感染幼虫の眠の期間を示す。

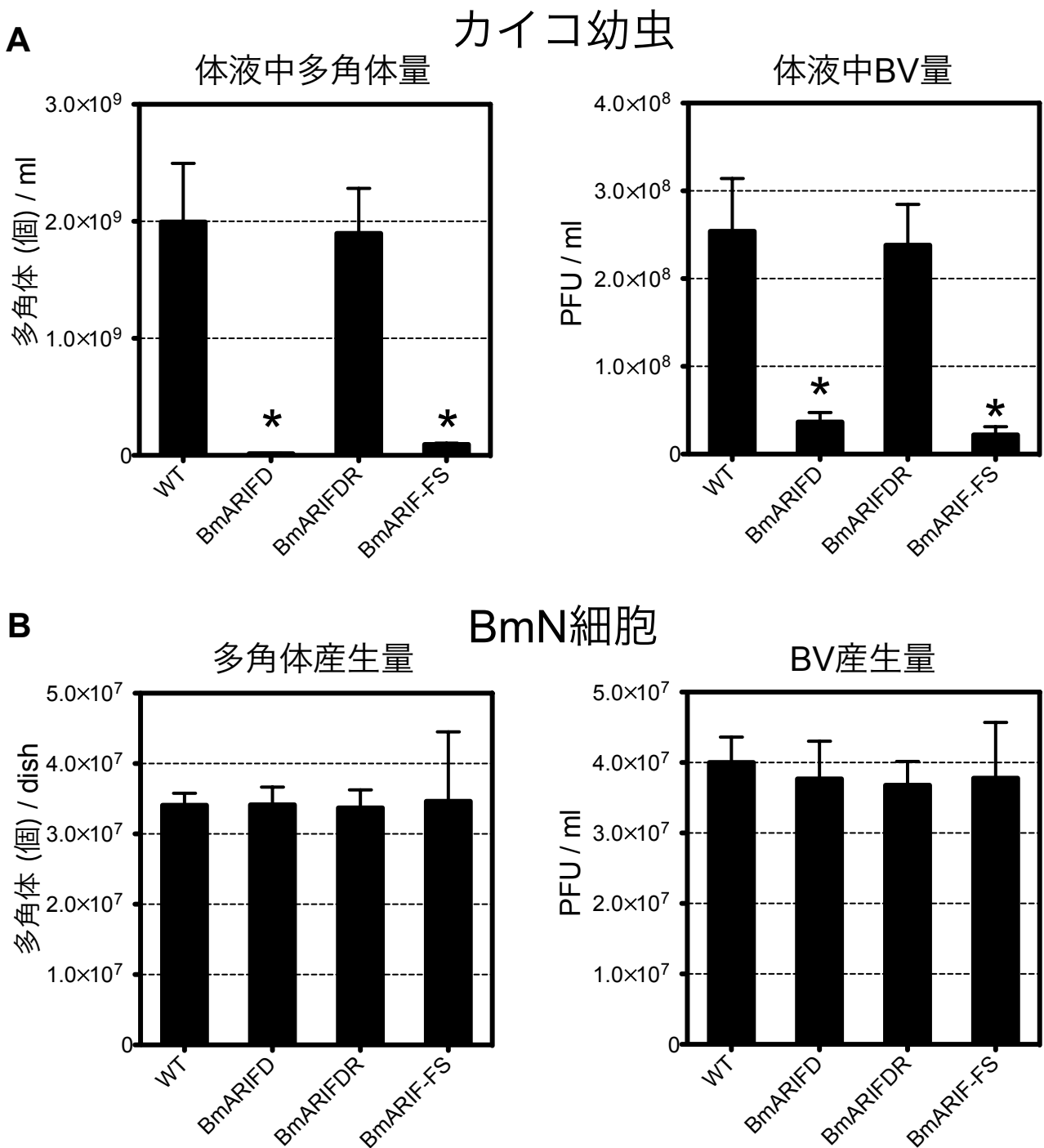


図1.5 *arif-1*変異ウイルスのウイルス増殖

(A) 感染幼虫の体液中の多角体/BV量 (感染後4日、n=6)。カイコ5齢幼虫に 1×10^5 PFUのBVを接種し、体液を回収した。多角体数は血球計算盤を用いて計測した。BV量はプラークアッセイにより測定した。* $p < 0.05$ (WTと比較)。

(B) BmN細胞における多角体/BV産生量 (感染後3日、n=3)。BmN細胞にBVをMOI = 5で感染させ、培地上清を回収してプラークアッセイによりBV量を測定した。感染細胞はスクレイパーではがして回収した後に1% SDSで溶解し、血球計算盤を用いて多角体数を計測した。* $p < 0.05$ (WTと比較)。

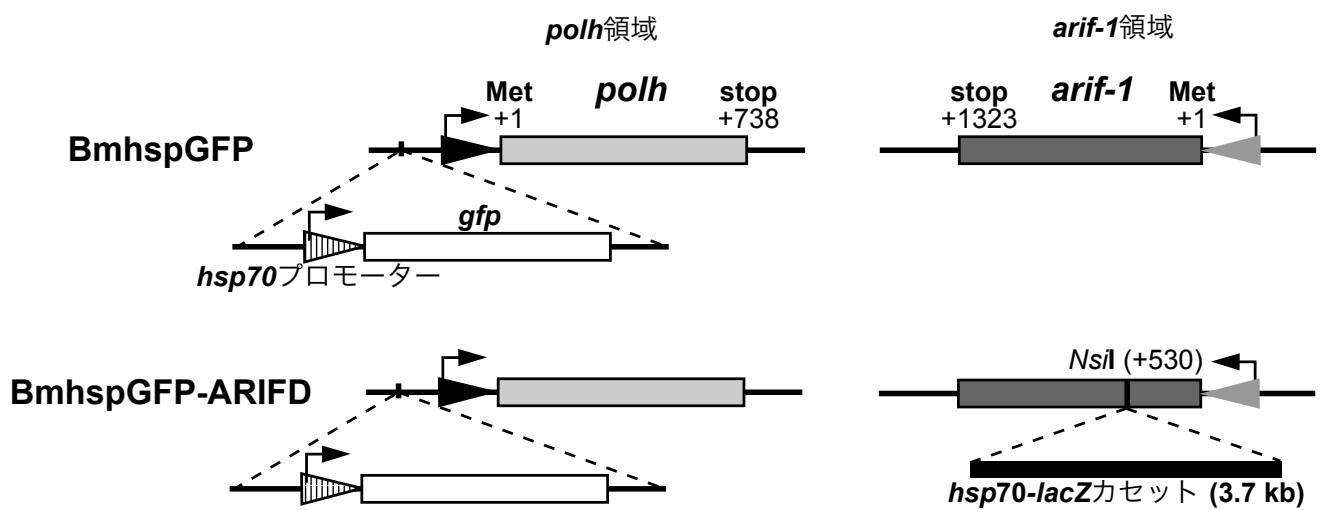


図1.6 GFP発現 $arif-1$ 欠損ウイルスの模式図

BmbspGFPは、*D. melanogaster hsp70*プロモーター制御下で gfp を発現するウイルスである (Hori *et al.*, 2013)。BmbspGFP-ARIFDはBmbspGFPゲノムをベースに、 $arif-1$ に $hsp70-lacZ$ カセットを導入することにより $arif-1$ を欠損させたウイルスである。

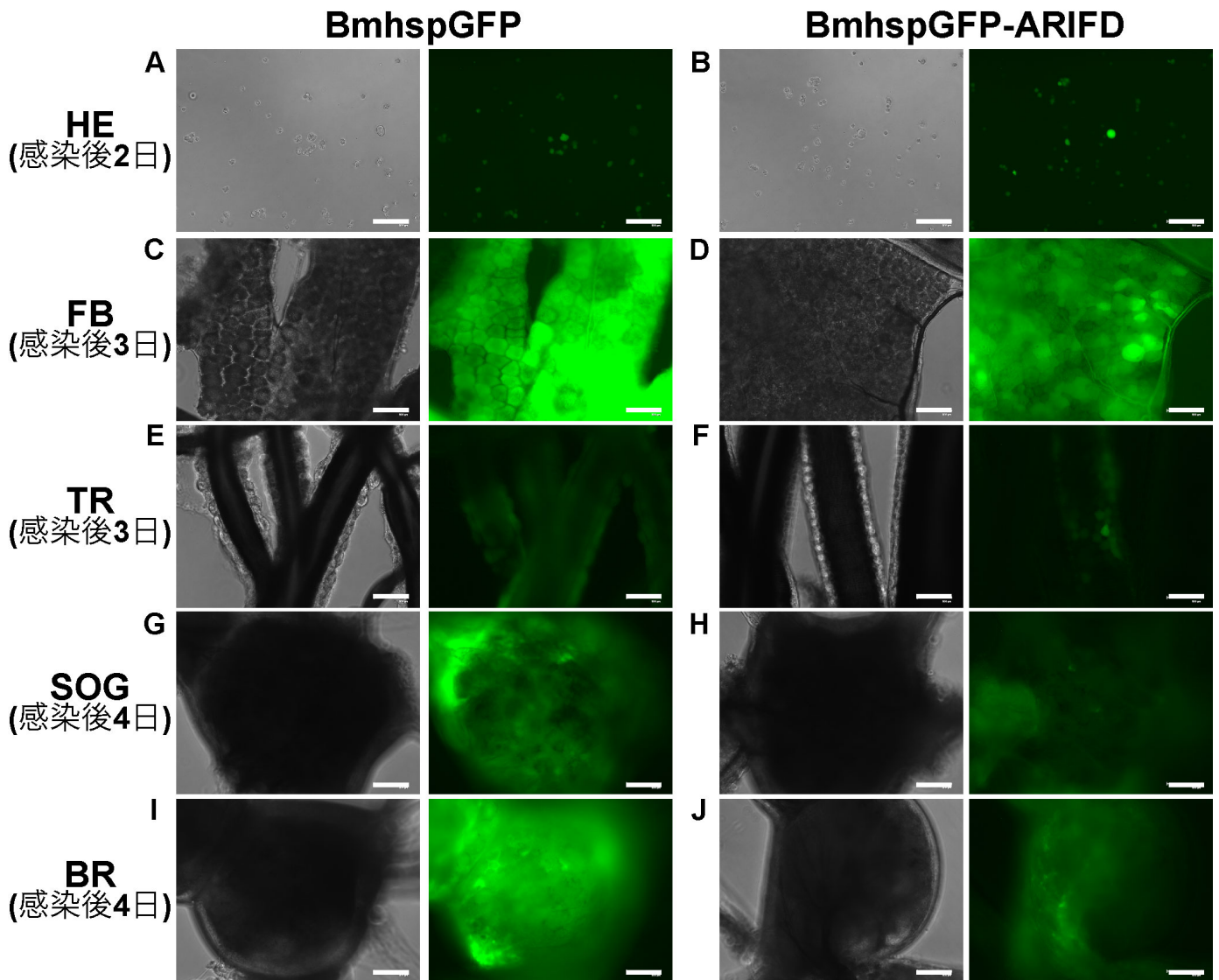


図1.7 GFP発現 $arif-1$ 欠損ウイルスの組織別GFP蛍光観察

カイコ5齢幼虫にBmbspGFPおよびBmbspGFP-ARIFDのBVを接種し (1×10^5 PFU / 幼虫)、感染幼虫を解剖して血球 (HE)、脂肪体 (FB)、気管 (TR)、食道下神経節 (SOG)、および脳 (BR) のGFP蛍光を蛍光顕微鏡で観察した。スケールバー = 100 μ m。

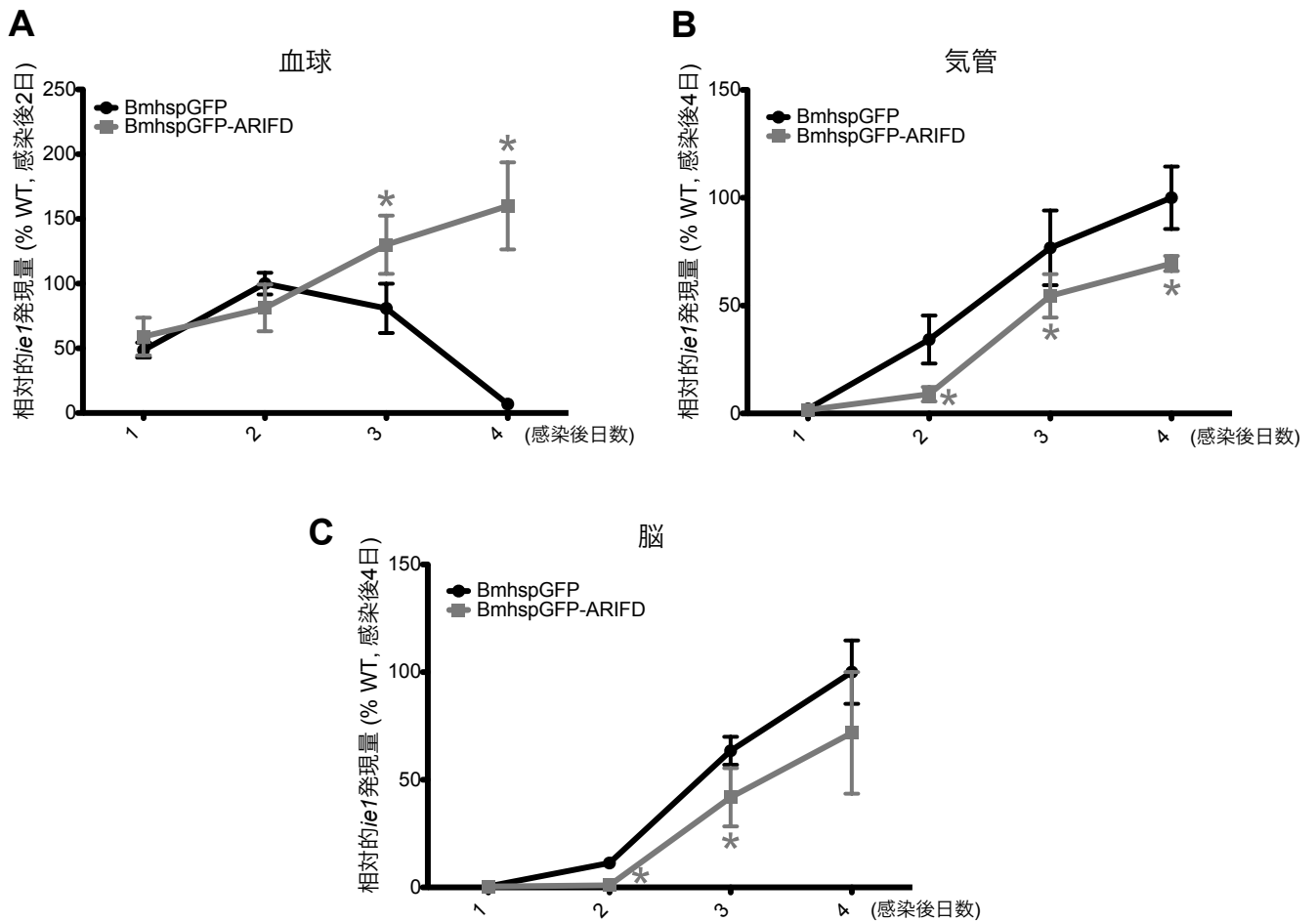


図1.8 GFP発現 $arif-1$ 欠損ウイルスの感染組織別定量RT-PCR

カイコ5齢幼虫にBmbspGFPおよびBmbspGFP-ARIFDのBVを接種し (1×10^5 PFU / 幼虫)、感染幼虫を解剖した後に血球 (A)、気管 (B)、および脳 (C)からtotal RNAを抽出して定量RT-PCR解析を行った。n = 6、* $p < 0.05$ 。

表1.3 GFP発現 $arif-1$ 欠損ウイルスのカイコ幼虫に対する経口感染力
 カイコ1齢幼虫 (n = 20) にWT、BmhspGFP、およびBmpolh-proDの多角体を様々な濃度で経口接種し、7日後の各濃度の致死数からLC₅₀を算出した。

ウイルス	LC ₅₀ (多角体/ml)	95%信頼区間	
		上端	下端
WT	2.16×10^4	3.25×10^4	1.41×10^4
BmhspGFP	2.71×10^4	4.07×10^4	1.78×10^4
BmhspGFP-ARIFD	1.98×10^4	2.91×10^4	1.34×10^4

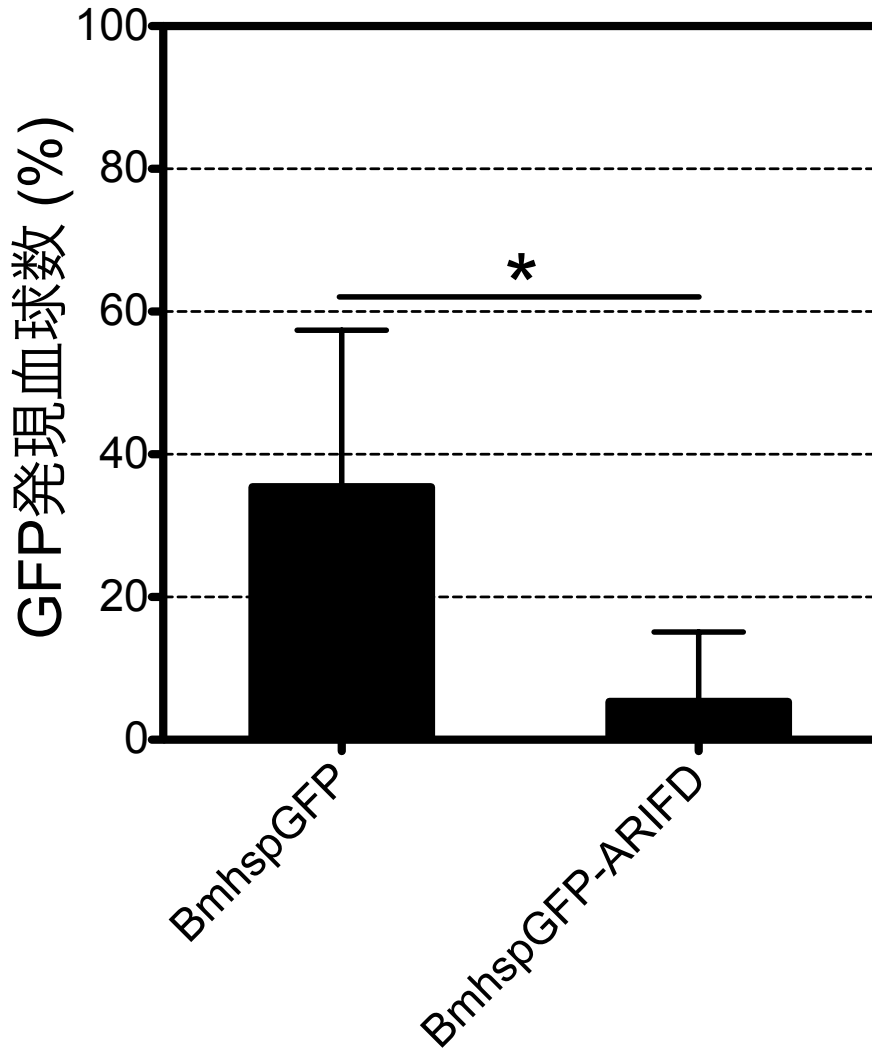


図1.9 GFP発現 $arif-1$ 欠損ウイルスの経口感染におけるGFP発現血球数

カイコ5齢幼虫にBmbspGFPおよびBmbspGFP-ARIFDのBV多角体を経口接種した (1×10^6 個 / 幼虫)。感染幼虫から血球を回収して蛍光顕微鏡で観察し、GFP蛍光を発する血球の割合を算出した。感染後2日、 $n = 6$ 、 $*p < 0.05$ 。

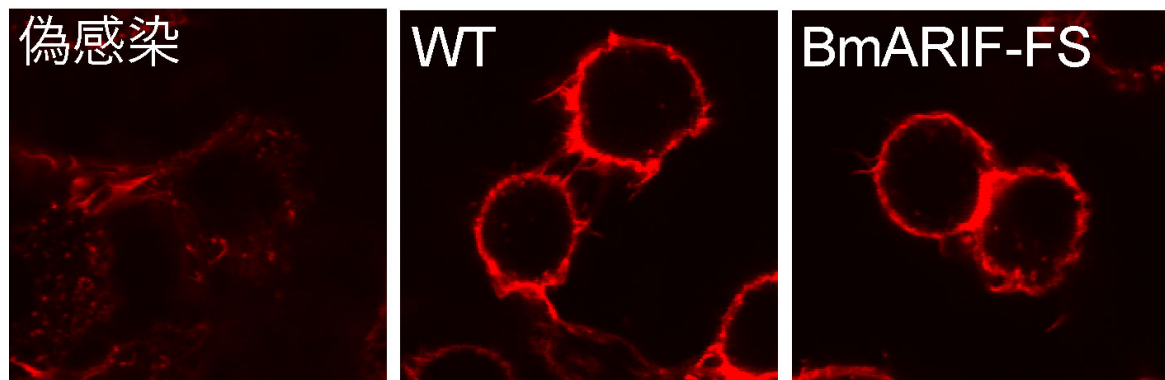


図1.10 *arif-1*変異ウイルスのactin rearrangement

BmN細胞にWT、およびBmARIF-FSをMOI = 5で感染させ、感染後12時間において細胞を固定および透過処理し、ローダミンファロイジンを用いてF-actinを蛍光染色した後に共焦点顕微鏡で観察した。

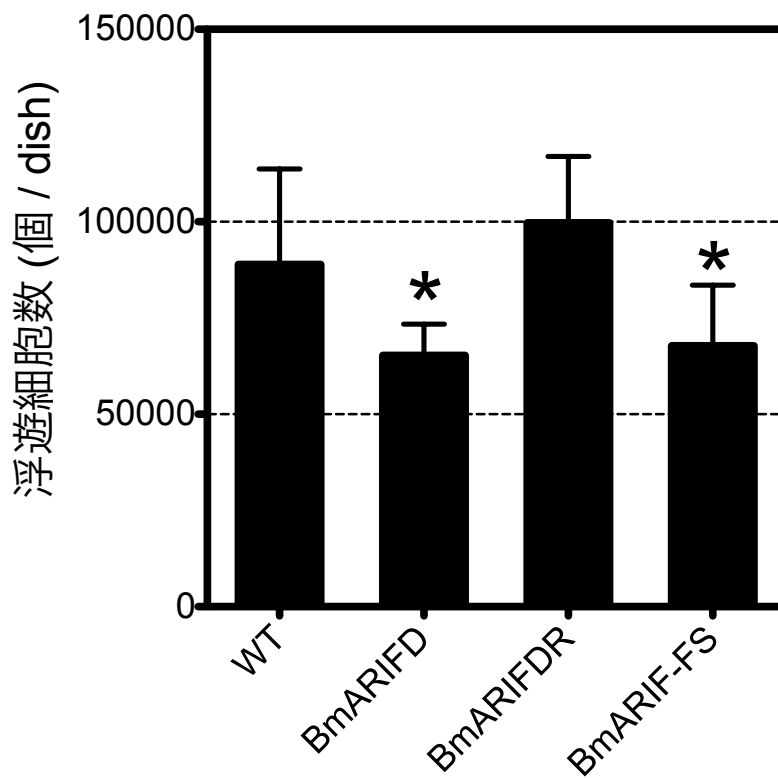


図1.11 *arif-1*変異ウイルス感染における浮遊細胞数

BmN細胞にWT、BmARIFD、BmARIFDR、およびBmARIF-FSをMOI = 5で感染させ、感染後3日に培地上清を全量回収し、上清中に含まれる浮遊細胞数を計測した。n = 6、* $p < 0.05$ 。

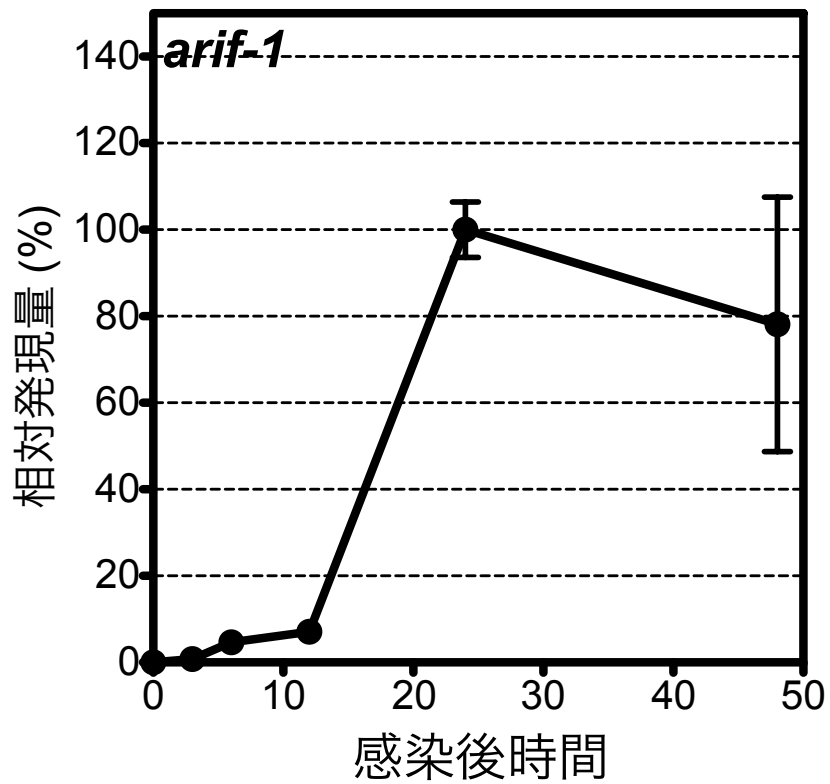


図1.12 *arif-1* mRNAの発現プロファイル

BmN細胞にWTをMOI = 5で感染させ、感染後0、3、6、12、24、および48時間に細胞を回収し、total RNAを抽出して*arif-1*の定量RT-PCRを行った。n = 3。

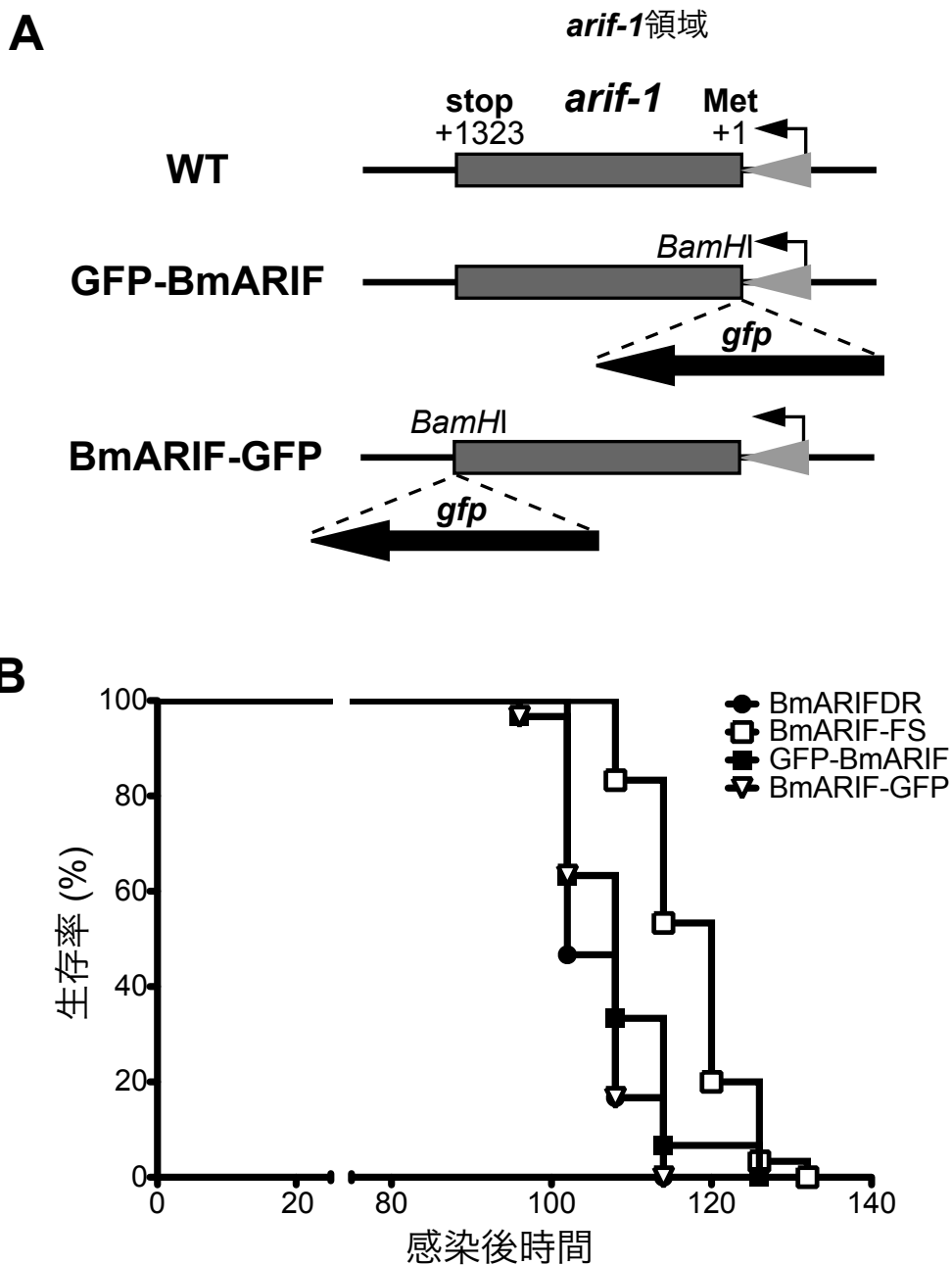


図1.13 GFP融合ARIF-1発現ウイルスの作製

(A) ウイルスの模式図。GFP-BmARIFは、N末端側にGFPを融合させたARIF-1を発現するウイルスである。BmARIF-GFPは、C末端側にGFPを融合させたARIF-1を発現するウイルスである。これらのウイルスは、BmARIFDをベースに作製した。

(B) 感染幼虫の生存曲線 (n = 30)。カイコ4齢幼虫にBmARIFDR、BmARIF-FS、GFP-BmARIF、およびBmARIF-GFPのBVを接種して (1×10^5 PFU / 幼虫)、6時間おきに生存数をカウントし、生存率を算出した。* $p < 0.05$ (BmARIFDRと比較)。

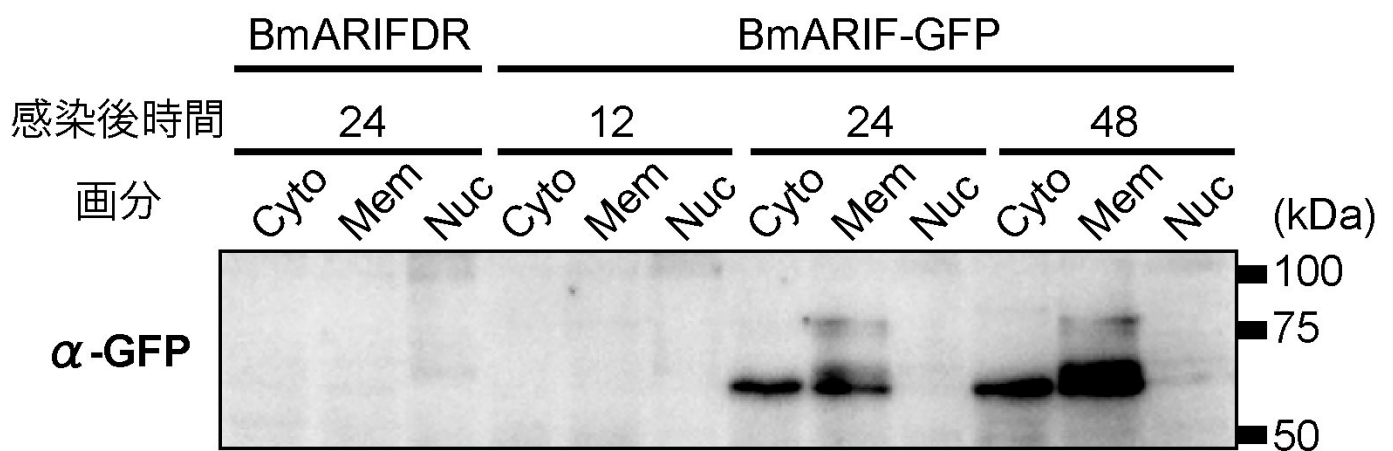


図1.14 ARIF1-GFPタンパク質の経時的発現プロファイル

BmN細胞にBmARIFDRおよびBmARIF-GFPをMOI = 5で感染させ、経時的に細胞を回収し、細胞質画分 (Cyto)、細胞膜+オルガネラ画分 (Mem)、および核画分 (Nuc) に分画した。これらのタンパク質サンプルを用いてウエスタンブロッティングを行い、 α -GFP抗体で検出した。

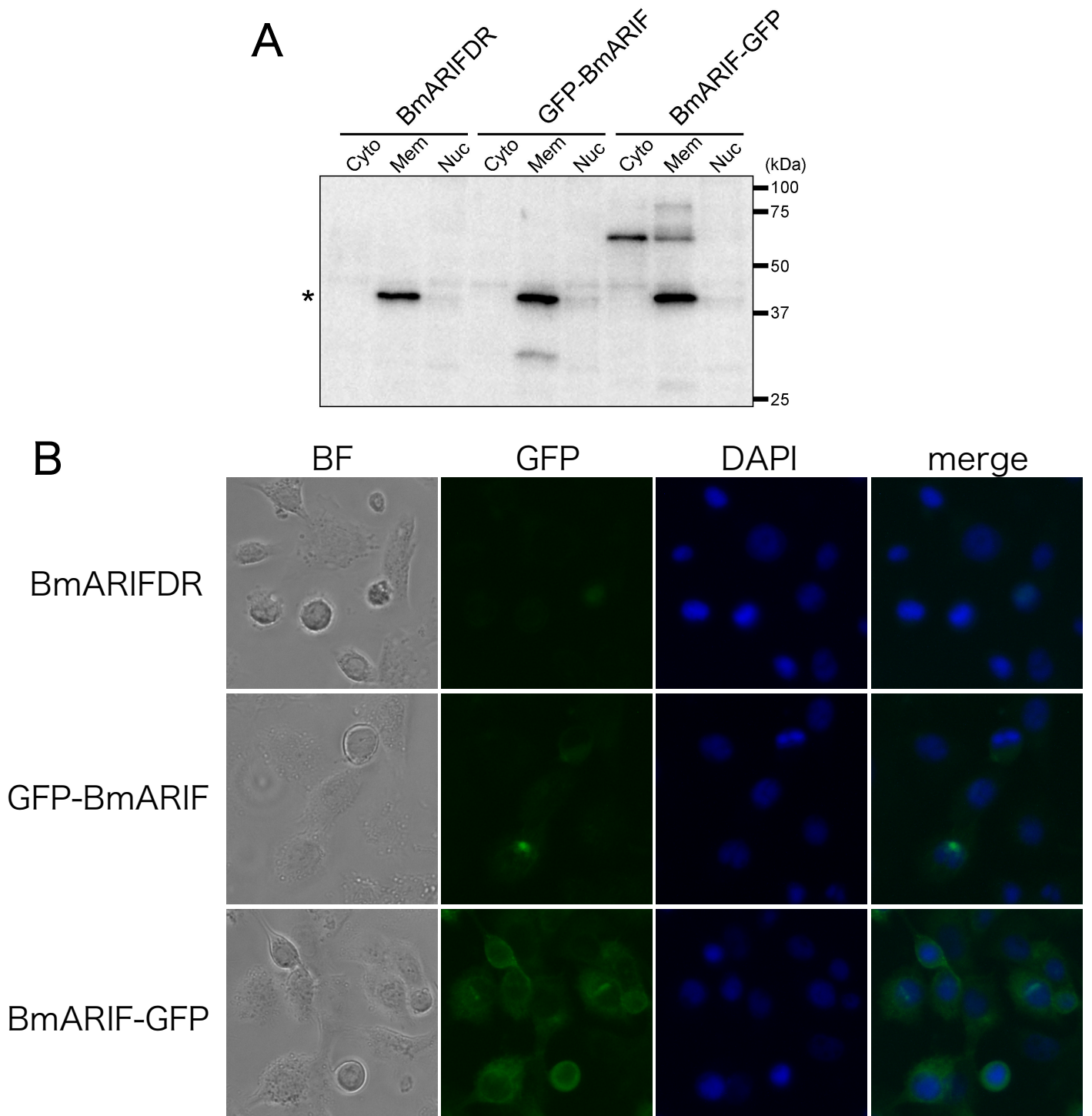


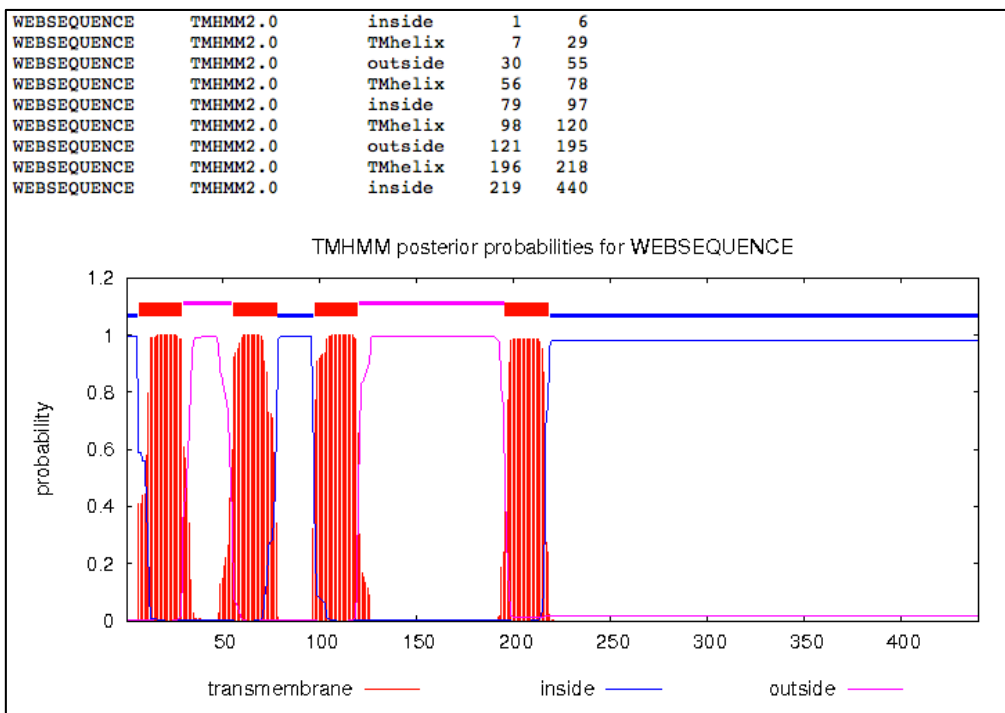
図1.15 GFP融合ARIF-1タンパク質の細胞内局在

BmN細胞にBmARIFDR、GFP-BmARIF、およびBmARIF-GFPをMOI = 5で感染させ、感染後24時間に細胞内局在解析を行った。

(A) 分画ウエスタンブロッティング。感染細胞をスクレイパーではがして回収し、細胞質画分 (Cyto)、細胞膜+オルガネラ画分 (Mem)、および核画分 (Nuc) に分画した。これらのタンパク質サンプルを用いてウエスタンブロッティングを行い、 α -GFP抗体で検出した。*：非特異バンド。

(B) 蛍光顕微鏡観察。細胞を固定し、蛍光顕微鏡にて観察した。BF：明視野観察、GFP：GFP融合ARIF-1タンパク質、DAPI：核。

A



B

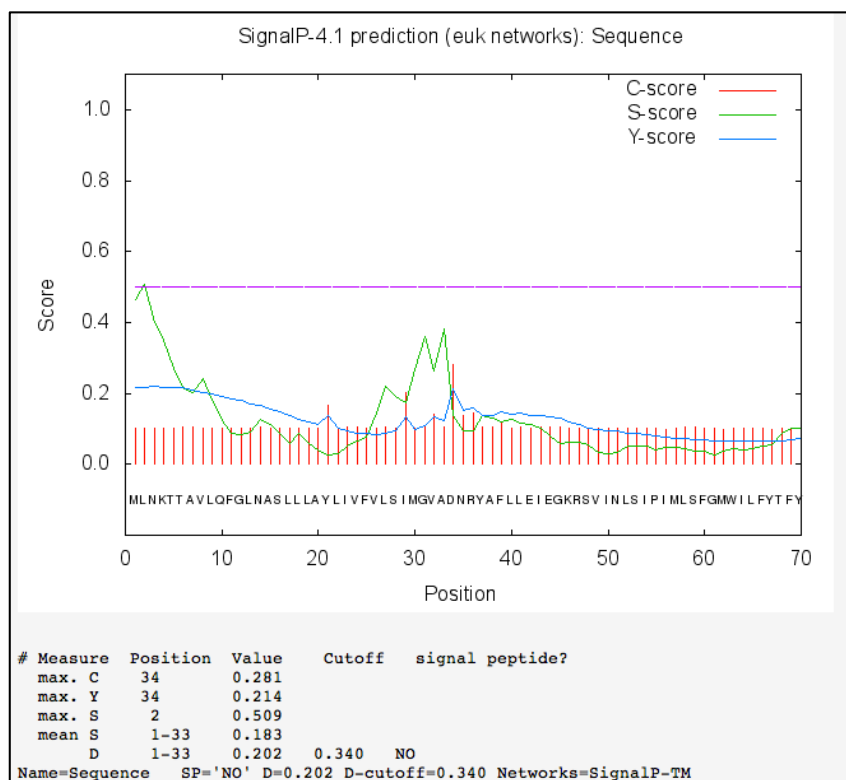


図1.16 ARIF-1タンパク質の構造予測

BmNPVの ARIF-1タンパク質のアミノ酸配列を用いて、TMHMM ver. 2ソフトウェアによる膜貫通ドメイン予測 (A)およびSignalP 4.1ソフトウェアによるシグナルペプチド予測 (B)を行った。

表1.4 異常行動が低下することが報告されている遺伝子欠損BmNPV

virus	遺伝子	<i>hsp70-lacZ</i> カセット挿入部位*	異常行動	参考文献
Bm5D	<i>Bm5</i>	5,057 ~ 5,224	大幅に低下	Gomi <i>et al.</i> , 1999
Bm8D	<i>bv/odv-e26</i>	8,397 ~ 8,689	消失	Gomi <i>et al.</i> , 1999; Katsuma <i>et al.</i> , 2012a
Bm29D	<i>Bm29</i>	26,601 ~ 26,953	ほぼ消失	Gomi <i>et al.</i> , 1999
Bm47D	<i>Bm47</i>	42,851	消失	Gomi <i>et al.</i> , 1999
Bm60D	<i>Bm60</i>	56,798 ~ 57,440	消失	Gomi <i>et al.</i> , 1999
Bm96D	<i>Bm96</i>	92,163 ~ 92,314	大幅に低下	Gomi <i>et al.</i> , 1999
Bm130D (BmPTPD)	<i>ptp</i>	124,427 ~ 124,811	大幅に低下	Kamita <i>et al.</i> , 2005

* T3ゲノム (GenBank Acc. no. L33180) 上の位置

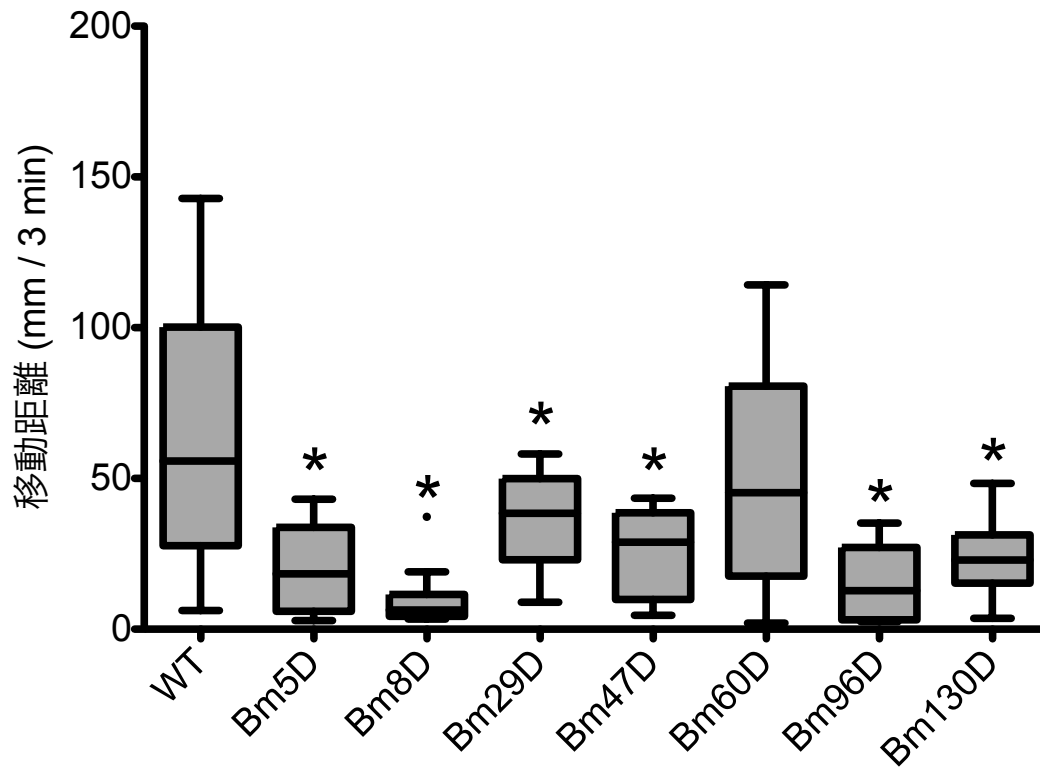


図 1.17 行動関連遺伝子欠損BmNPV感染幼虫の移動距離

カイコ5齢幼虫に 1×10^5 PFUのBVを接種し、感染後4日に感染幼虫の3分間の移動距離を測定した。移動距離を箱ひげ図で示す。箱の中央の横線は中央値を、箱の下端及び上端は第1および第3四分位点を、ひげの上下端は外れ値（箱から箱の長さの1.5倍よりも離れた値）を除いた場合の極値を表す。n = 12、* $p < 0.05$ (WTと比較)。

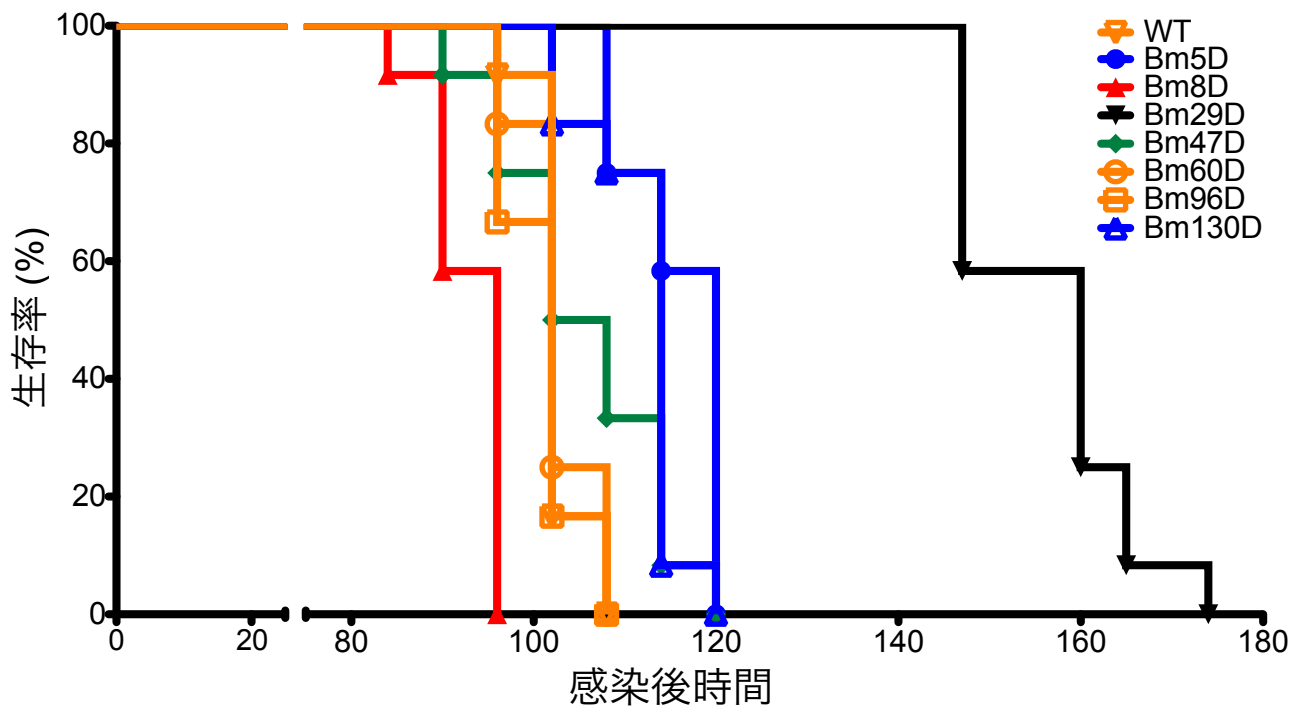


図1.18 行動関連遺伝子欠損BmNPVの生存曲線

カイコ4齢幼虫に 1×10^5 PFUのBVを接種して任意の感染後時間に生存数をカウントし、生存率を算出した。n = 12。

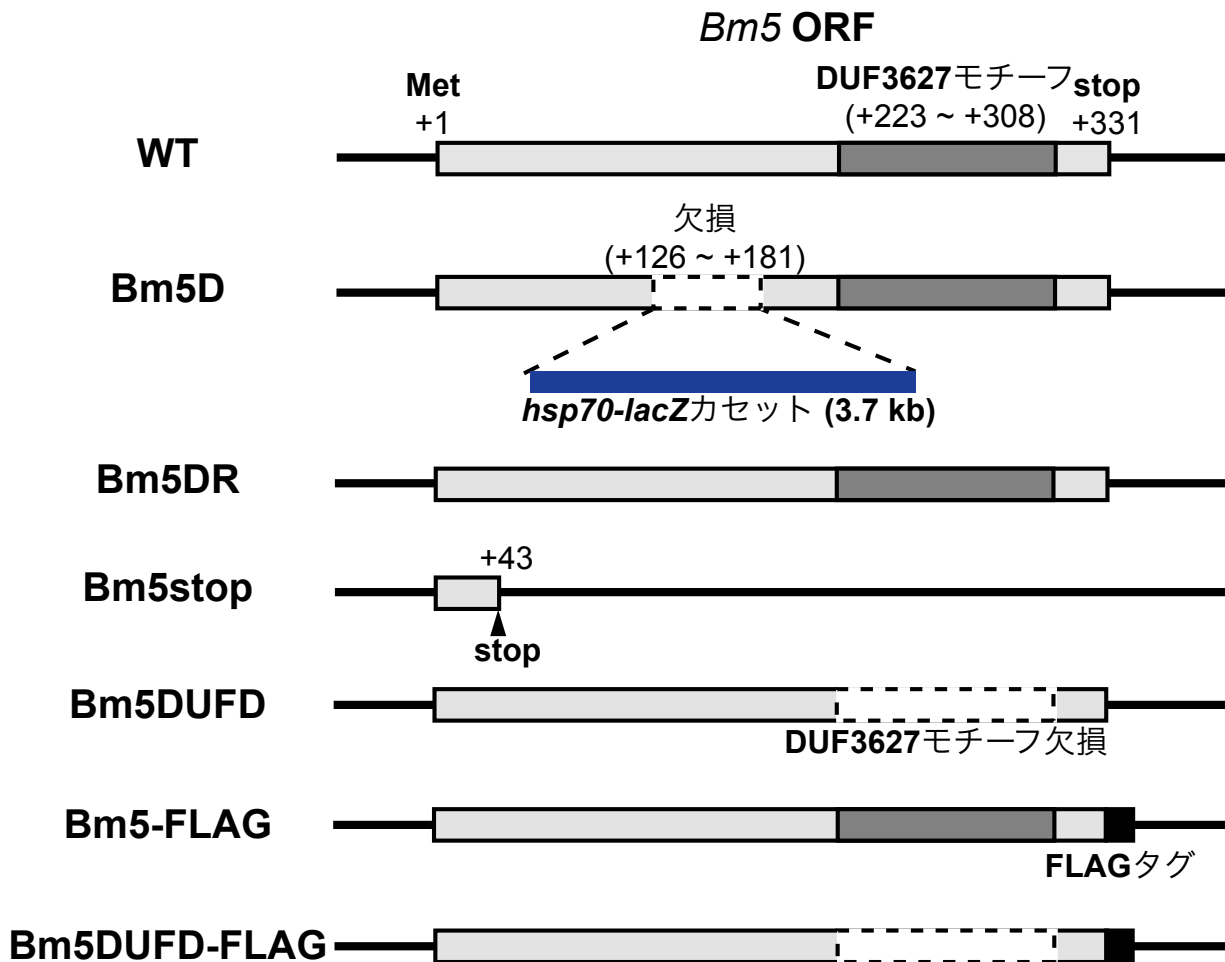


図1.19 Bm5変異ウイルスの模式図

Bm5DはWTゲノムをベースに、*hsp70-lacZ*カセットを導入することによりBm5を欠損させたウイルスである。その他の組換えウイルスは、Bm5Dをベースに作製した。Bm5DRはBm5復帰変異株、Bm5stopはBm5にstopコドンを導入することによるBm5欠損株である。Bm5DUFDはDUF3627モチーフを欠損したBM5タンパク質を発現する変異株である。Bm5-FLAGおよびBm5DUFD-FLAGは、それぞれC末端側にFLAGタグを付加された完全なBM5およびDUF3627モチーフ欠損BM5を発現する変異株である。

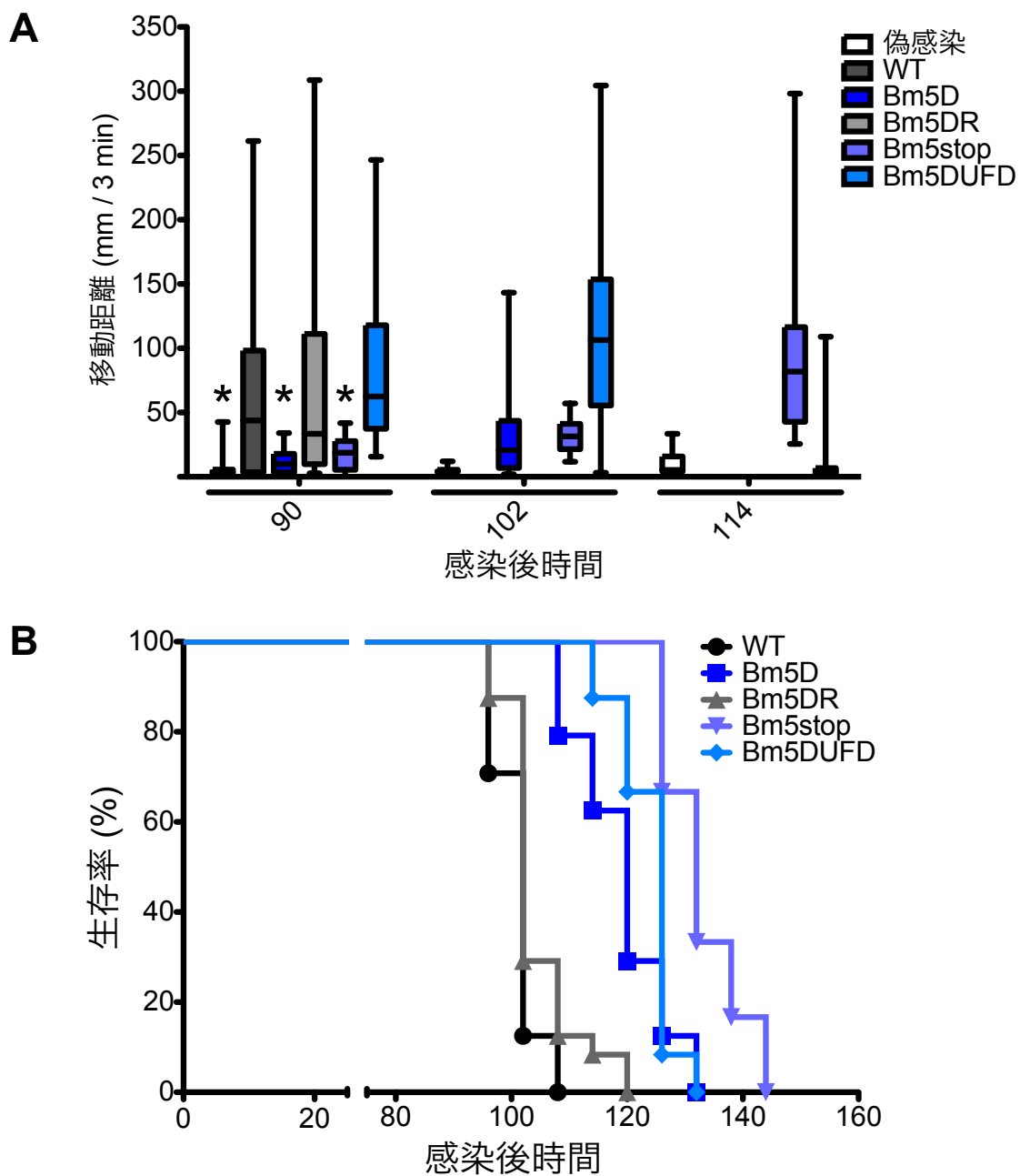


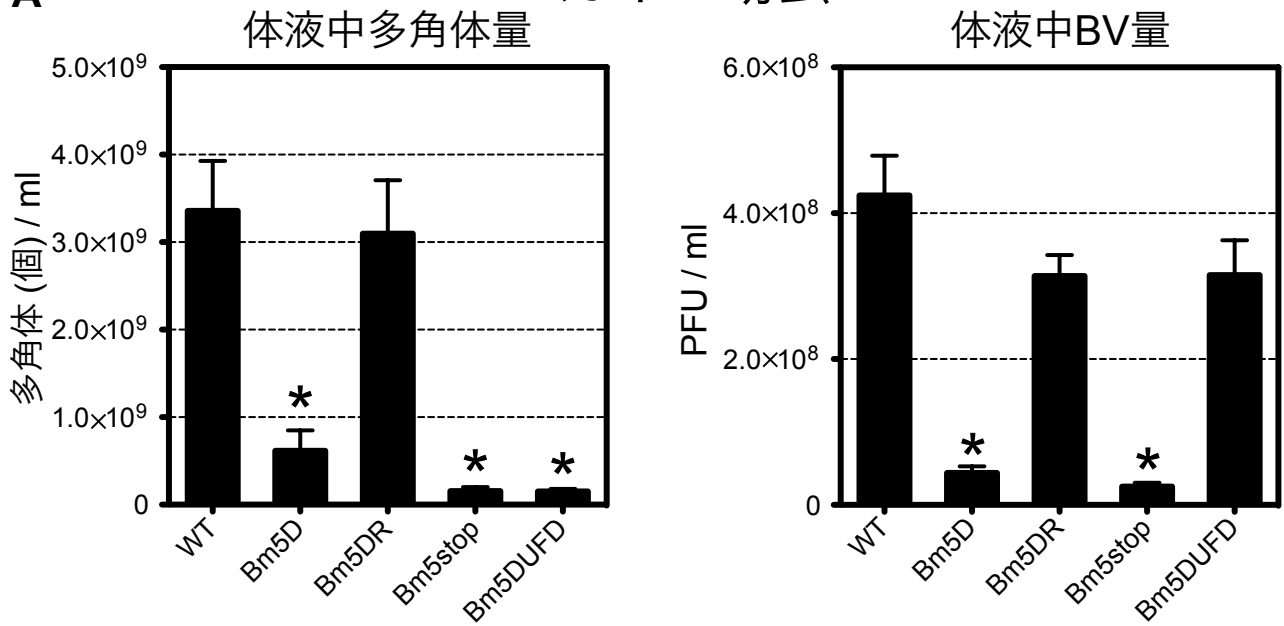
図 1.20 *Bm5*変異ウイルスの感染実験

(A) 感染幼虫の移動距離 (n=24)。カイコ4齢幼虫に 1×10^5 PFUのBVを接種し、感染幼虫の3分間の移動距離を測定した。移動距離を箱ひげ図で示す。箱の中央の横線は中央値を、箱の下端及び上端は第1および第3四分位点を、ひげの上下端は外れ値（箱から箱の長さの1.5倍よりも離れた値）を除いた場合の極値を表す。* $p < 0.05$ (WTと比較)。

(B) 感染幼虫の生存曲線 (n=24)。カイコ4齢幼虫に 1×10^5 PFUのBVを接種して6時間おきに生存数をカウントし、生存率を算出した。* $p < 0.05$ (WTと比較)。

カイコ幼虫

A



B

BmN細胞

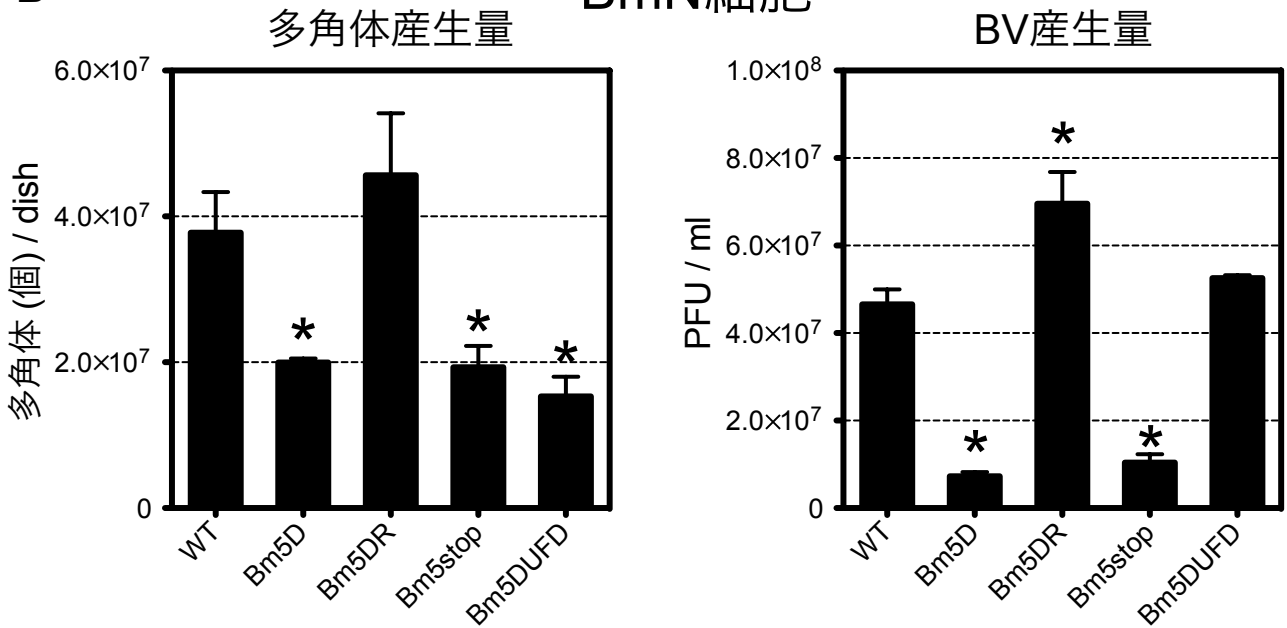


図1.21 Bm5変異ウイルスのウイルス増殖

(A) 感染幼虫の体液中の多角体/BV量 (感染後4日, $n = 6$)。カイコ5齢幼虫に 1×10^5 PFUのBVを接種し、体液を回収した。多角体数は血球計算盤を用いて計測した。BV量はプラークアッセイにより測定した。* $p < 0.05$ (WTと比較)。

(B) BmN細胞における多角体/BV産生量 (感染後3日, $n = 3$)。BmN細胞にBVをMOI = 5で感染させ、培地上清を回収してプラークアッセイによりBV量を測定した。感染細胞はスクレイパーではがして回収した後に1% SDSで溶解し、血球計算盤を用いて多角体数を計測した。* $p < 0.05$ (WTと比較)。

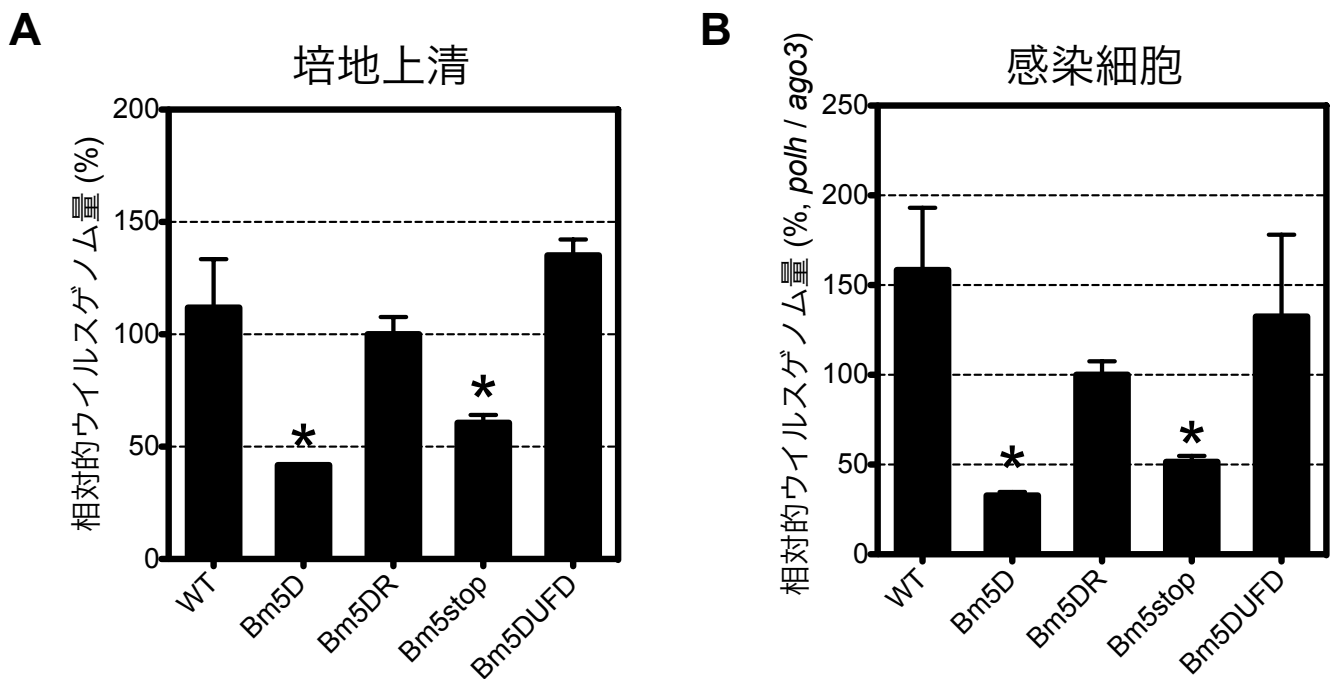


図1.22 Bm5変異ウイルス感染BmN細胞のウイルスゲノム量

BmN細胞にBVをMOI = 5で感染させ、感染後2日に培地上清および細胞を回収した。n = 3。
 (A) 培地上清中のウイルスゲノム量。回収した培地上清を煮沸し、ウイルスゲノム量の定量PCRを行った。定量PCRには*polh*プライマーを用いた。* $p < 0.05$ (WTと比較)。

(B) 感染細胞中のウイルスゲノム量。回収した細胞から常法によりDNAを抽出し、ウイルスゲノム量の定量PCRを行った。定量PCRには*polh*プライマーを用い、*ago3*プライマーにより定量したカイコゲノム量で補正した。* $p < 0.05$ (WTと比較)。

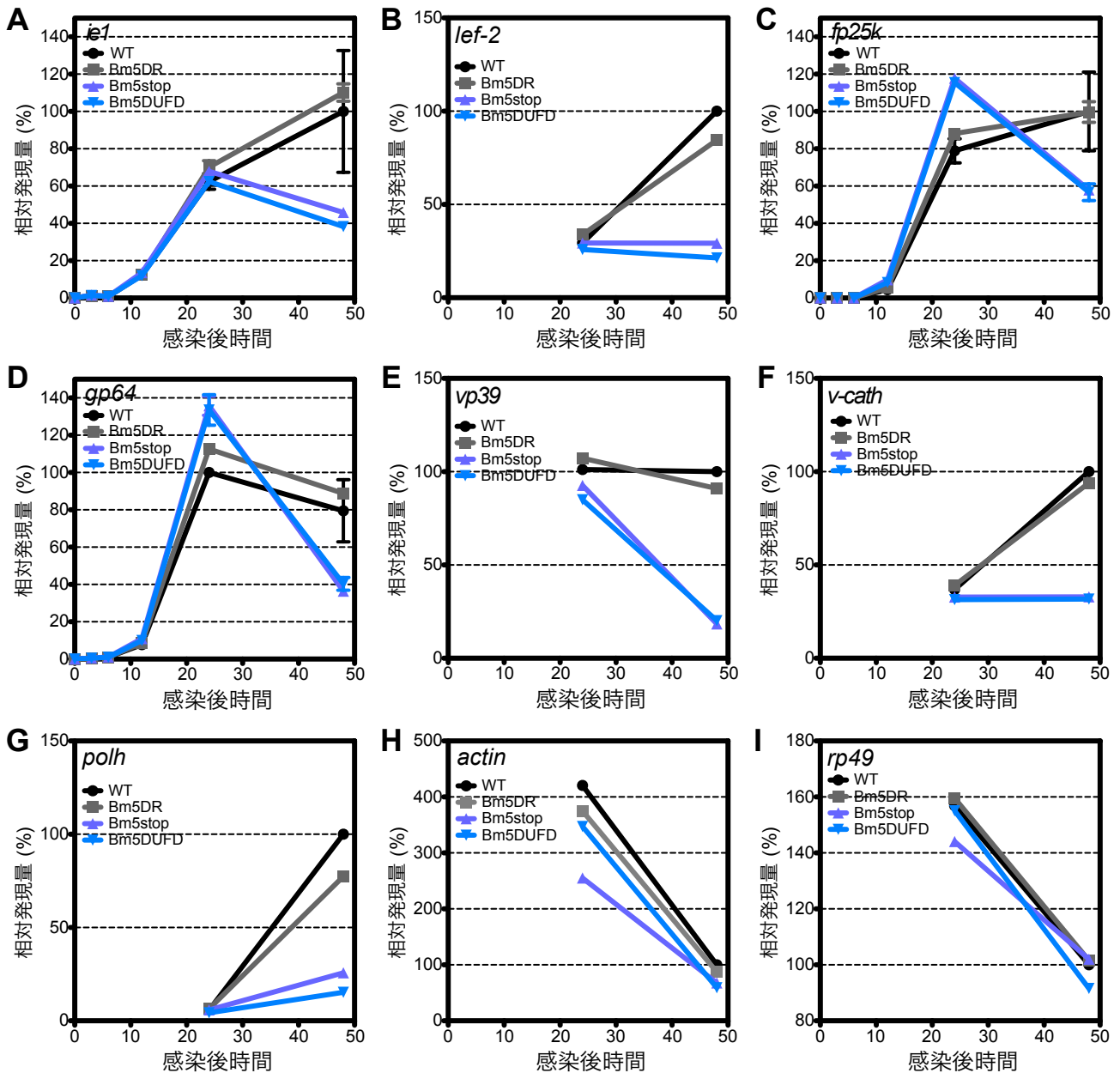


図1.23 *Bm5*変異ウイルス感染BmN細胞における遺伝子発現量

BmN細胞にBVをMOI = 5で感染させ、感染後0、3、6、12、24、および48時間に細胞を回収し、total RNAを抽出して各遺伝子の定量RT-PCRを行った。ウイルスの遺伝子として、*iel* (A)、*lef-2* (B)、*fp25k* (C)、*gp64* (D)、*vp39* (E)、*v-cath* (F)、*polh* (G)を、宿主の遺伝子として *actin* (H)、*rp49* (I)を調査した。*iel* (A)、*fp25k* (C)、*gp64* (D)はn = 3で全期間、その他の遺伝子はn = 1で感染後24および48時間のみ解析した。

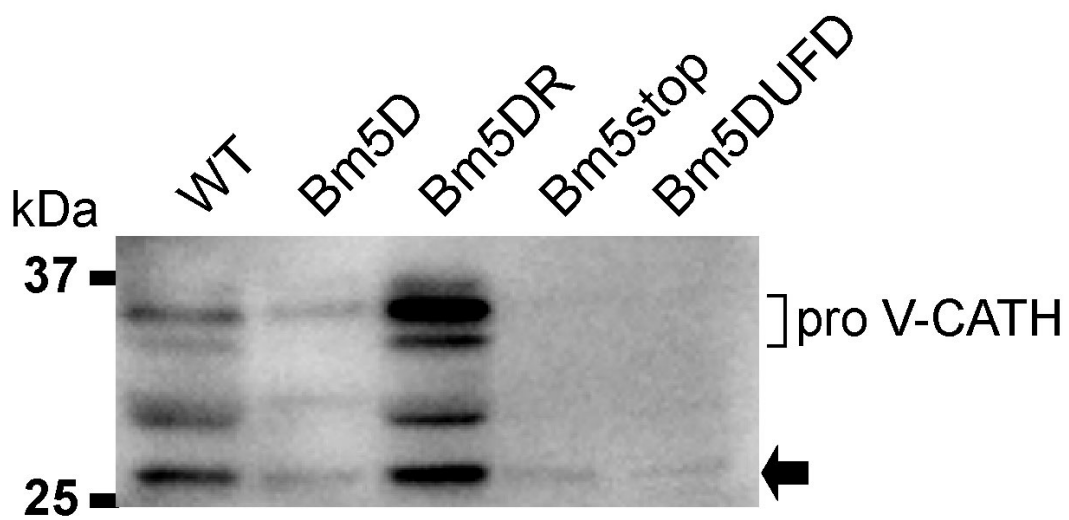


図1.24 *Bm5*変異ウイルス感染幼虫の体液中V-CATH量

カイコ5齢幼虫に 1×10^5 PFUのBVを接種し、感染後3日に体液を回収した。回収した体液サンプルを用いてウエスタンブロッティングを行い、 α -V-CATH抗体で検出した。pro V-CATH：V-CATH前駆体、矢印：活性型V-CATH。

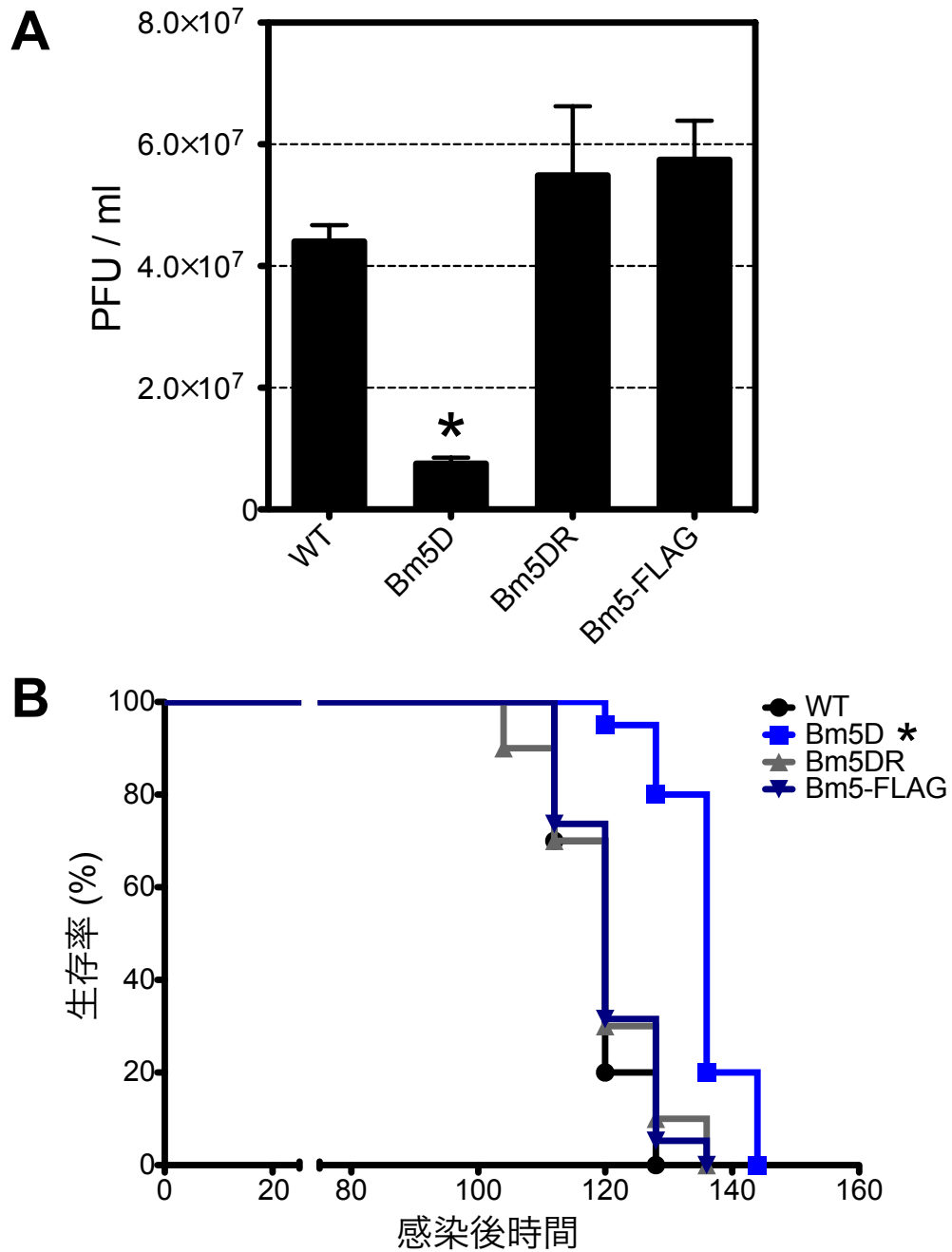


図1.25 FLAGタグ付加BM5発現ウイルスの感染実験

(A) BmN細胞におけるBV産生量（感染後3日、n = 3）。BmN細胞にBVをMOI = 5で感染させ、培地上清を回収してプラークアッセイによりBV量を測定した。**p* < 0.05（WTと比較）。

(B) 感染幼虫の生存曲線（n = 24）。カイコ4齢幼虫に1×10⁵ PFUのBVを接種して6時間おきに生存数をカウントし、生存率を算出した。**p* < 0.05（WTと比較）。

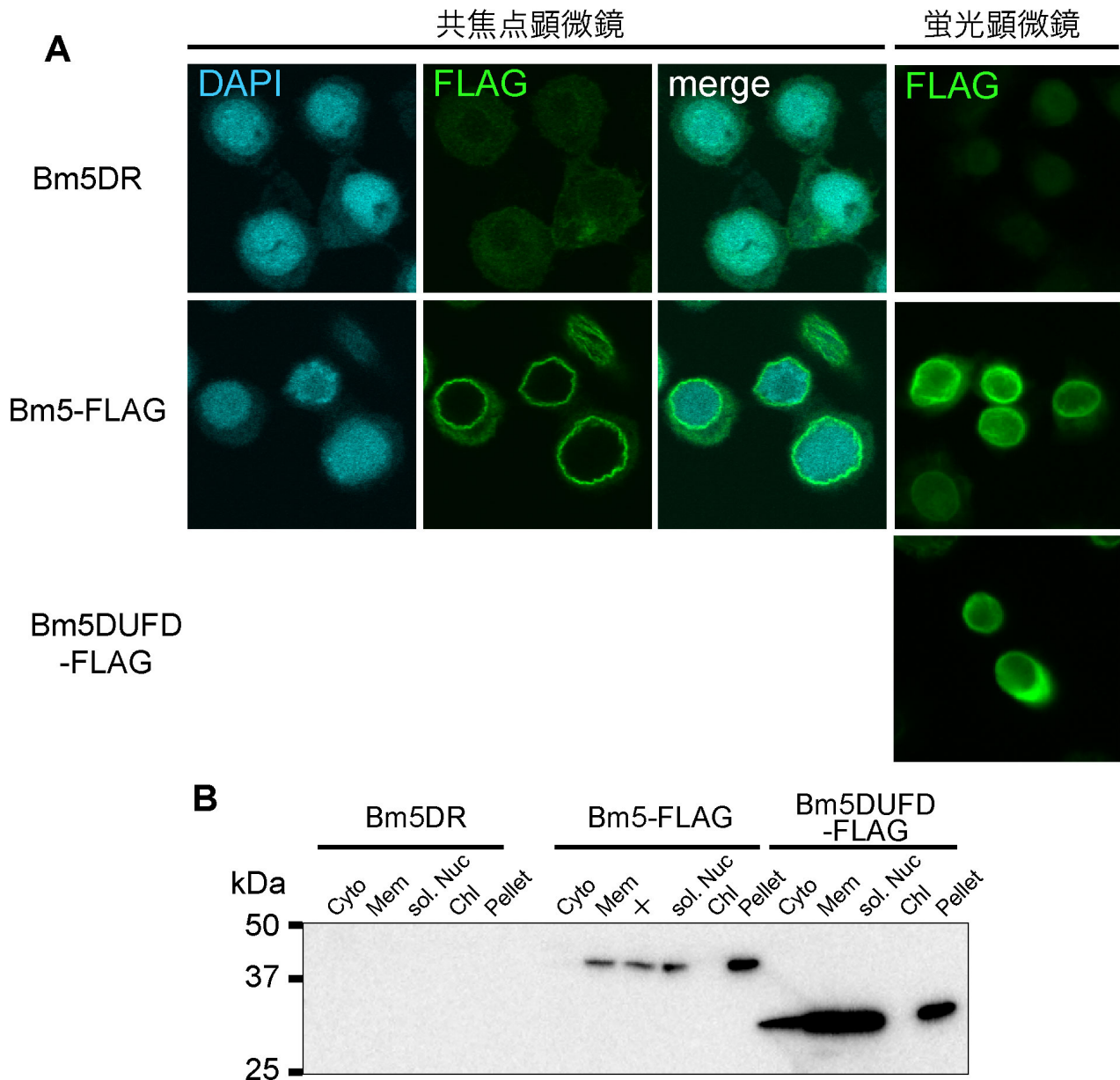


図1.26 BM5タンパク質の細胞内局在

BmN細胞にBm5DR、Bm5-FLAG、およびBm5DUFD-FLAGをMOI = 5で感染させ、感染後24時間に細胞内局在解析を行った。

(A) 蛍光顕微鏡観察。細胞を固定・透過処理した後に α -FLAG抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、共焦点顕微鏡あるいは蛍光顕微鏡にて観察した。FLAG：FLAGタグ付加BM5タンパク質、DAPI：核。

(B) 分画ウエスタンブロッティング。感染細胞をスクレイパーではがして回収し、細胞質画分（Cyto）、細胞膜+オルガネラ画分（Mem）、可溶性核画分（sol. Nuc）、クロマチン結合画分（Chl）、および不溶画分（Pellet）に分画した。これらのタンパク質サンプルを用いてウエスタンブロッティングを行い、 α -FLAG抗体でFLAGタグ付加BM5タンパク質を検出した。

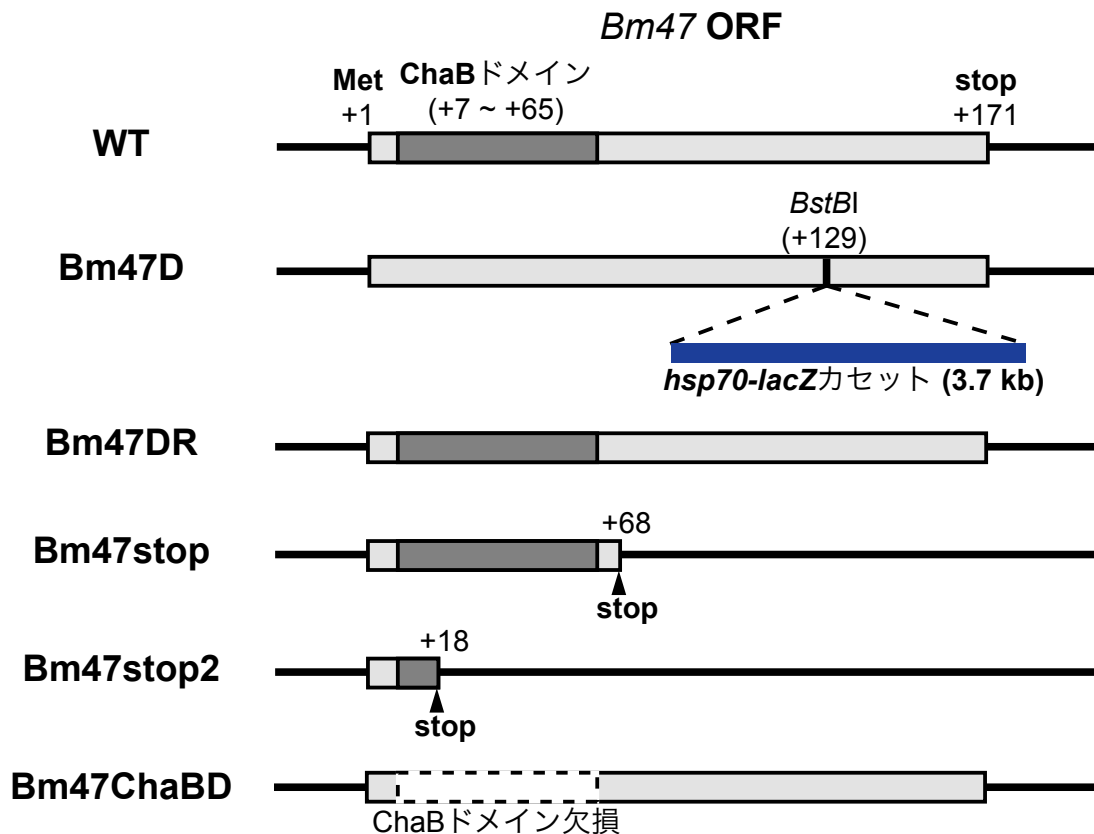


図1.27 *Bm47*変異ウイルスの模式図

*Bm47D*はWTゲノムをベースに、*hsp70-lacZ*カセットを導入することにより*Bm47*を欠損させたウイルスである。その他の組換えウイルスは、*Bm47D*をベースに作製した。*Bm47DR*は*Bm47*復帰変異株、*Bm47stop*および*Bm47stop2*は*Bm47*にstopコドンを導入することによる*Bm47*欠損株である。*Bm47ChaBD*はChaBドメインを欠損した*Bm47*タンパク質を発現する変異株である。

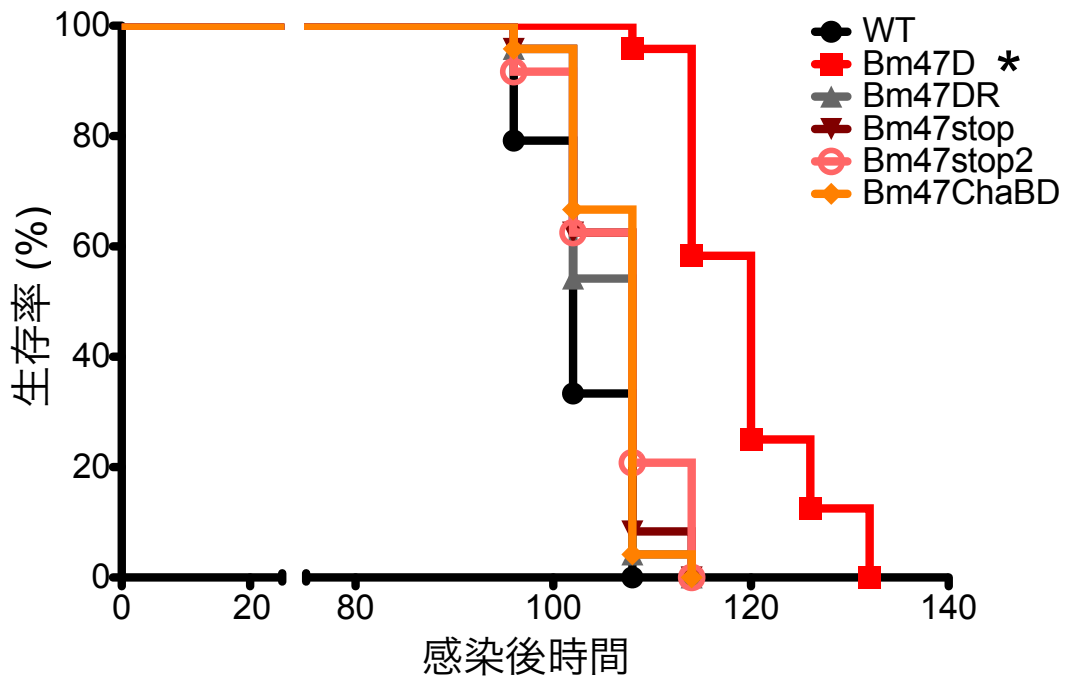


図1.28 *Bm47*変異ウイルス感染幼虫の生存曲線

カイコ4齢幼虫に 1×10^5 PFUのBVを接種して6時間おきに生存数をカウントし、生存率を算出した。n = 24、* $p < 0.05$ (WTと比較)。

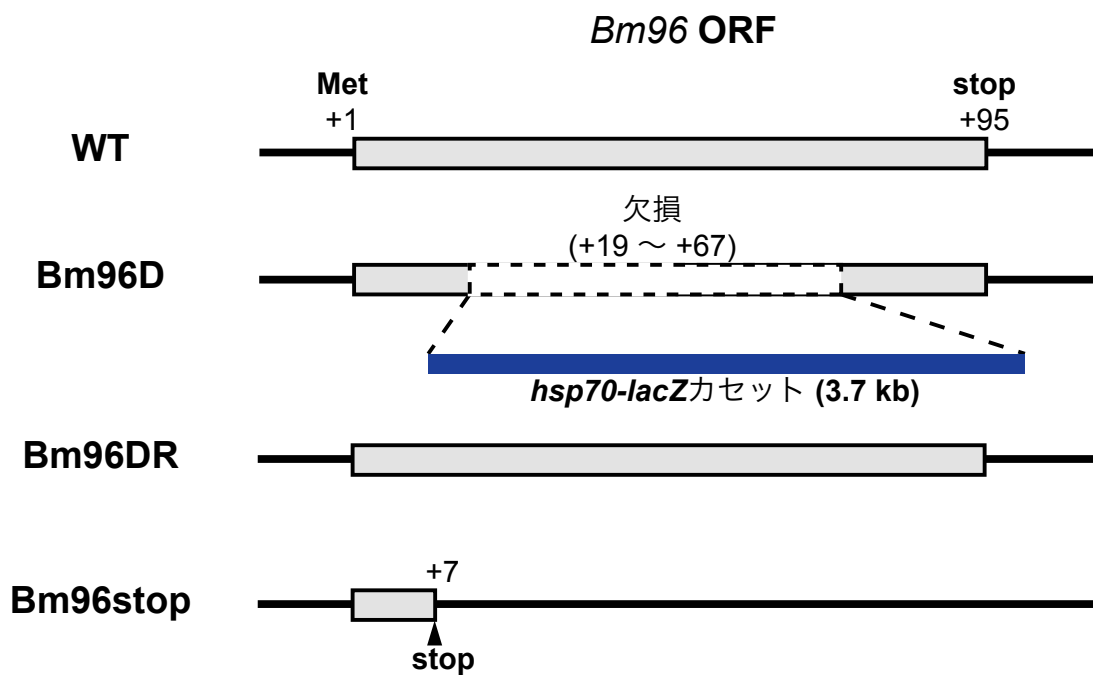


図1.29 Bm96変異ウイルスの模式図

Bm96DはWTゲノムをベースに、*hsp70-lacZ*カセットを導入することによりBm96を欠損させたウイルスである。その他の組換えウイルスは、Bm96Dをベースに作製した。Bm96DRはBm96復帰変異株、Bm96stopはBm96にstopコドンを導入することによるBm96欠損株である。

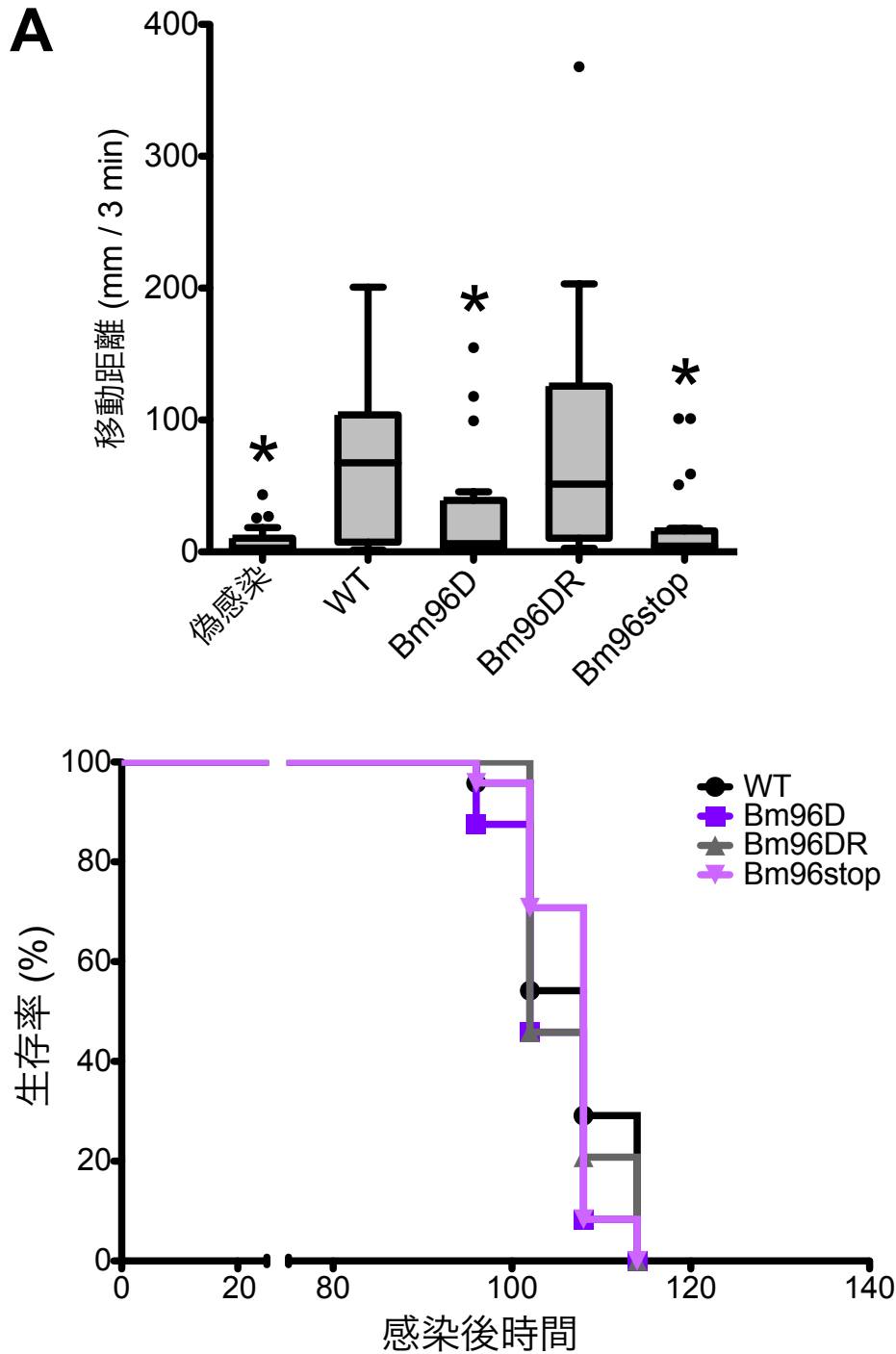


図1.30 Bm96変異ウイルスの感染実験

(A) 感染幼虫の移動距離（感染後90時間、n = 24）。カイコ4齢幼虫に 1×10^5 PFUのBVを接種し、感染幼虫の3分間の移動距離を測定した。移動距離を箱ひげ図で示す。箱の中央の横線は中央値を、箱の下端及び上端は第1および第3四分位点を、ひげの上下端は外れ値（箱から箱の長さの1.5倍よりも離れた値）を除いた場合の極値を表す。 $*p < 0.05$ （WTと比較）。

(B) 感染幼虫の生存曲線（n = 24）。カイコ4齢幼虫に 1×10^5 PFUのBVを接種して6時間おきに生存数をカウントし、生存率を算出した。 $*p < 0.05$ （WTと比較）。

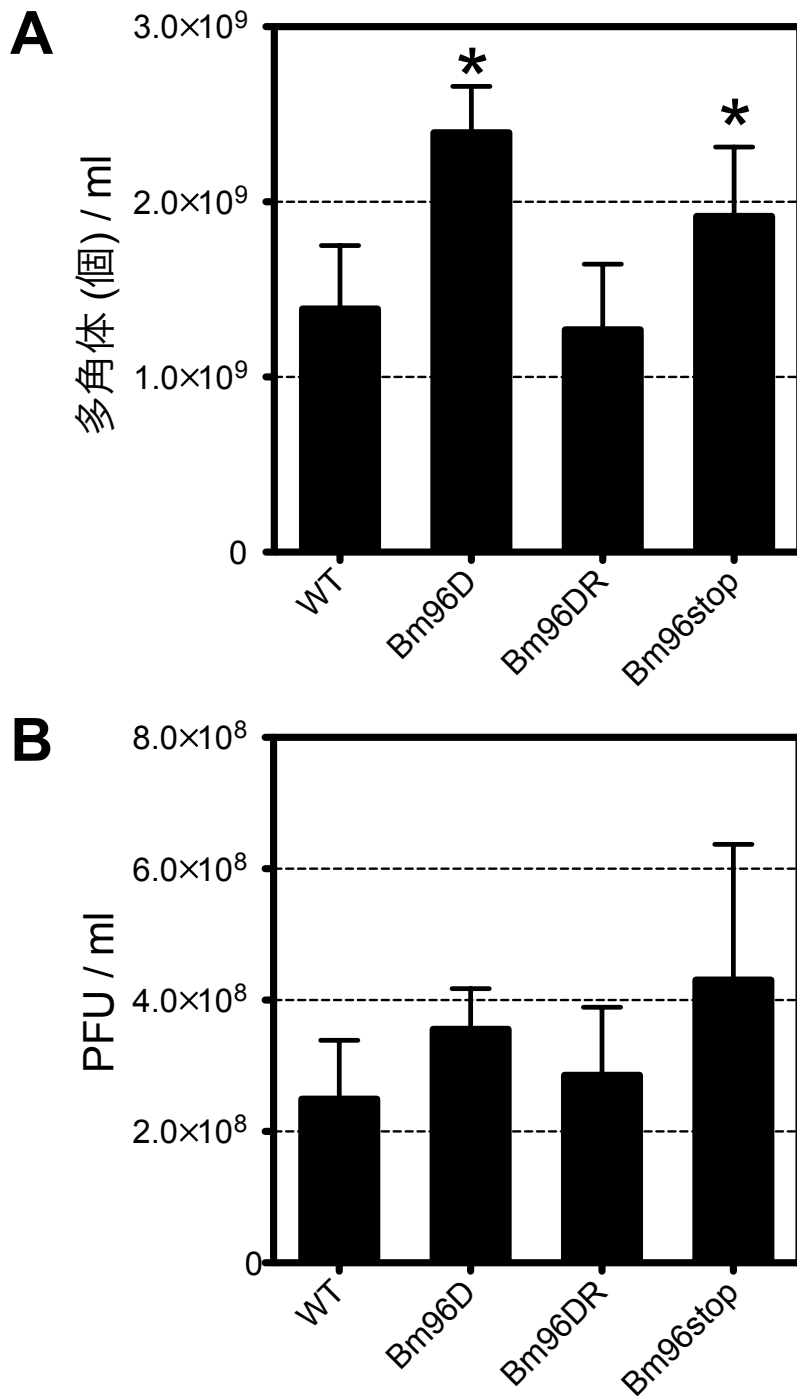


図1.31 *Bm96*変異ウイルスのウイルス増殖

カイコ5齢幼虫に 1×10^5 PFUのBVを接種し、体液を回収した（感染後4日、 $n = 6$ ）。

(A) 感染幼虫の体液中の多角体量。多角体数は血球計算盤を用いて計測した。 $*p < 0.05$ （WTと比較）。

(B) 感染幼虫の体液中のBV量。BV量はプラークアッセイにより測定した。 $*p < 0.05$ （WTと比較）。

第二章

クワコを用いた鉛直方向の徘徊行動の解析

緒言

健全なチョウ目昆虫の幼虫は、外敵から発見されるリスクを回避するために、通常は枝や葉の影に潜み、身動きせずにじっとしている。しかしながら、バキュロウイルスに感染した宿主チョウ目幼虫は、感染末期に徘徊行動が異常に活性化され、最終的に植物の枝や葉の先端へと登って死亡する (Goulson *et al.*, 1997; Kamita *et al.*, 2005; Hoover *et al.*, 2011)。これらの異常行動によって外敵に捕食されるリスクが高まり、ウイルスの拡散効率が上昇するため、徘徊行動の活性化 (ELA) と植物先端部への登頂行動 (CB) はウイルスによる利己的な行動制御であると考えられてきた。これまでに、ELA 関連遺伝子として BmNPV および AcMNPV の *ptp* 遺伝子と BmNPV の *bv/odv-e26* 遺伝子が、CB 関連遺伝子として LdMNPV の *egt* 遺伝子が報告されている (Kamita *et al.*, 2005; Katsuma *et al.*, 2012a; Hoover *et al.*, 2011; van Houte *et al.*, 2012)。一方、BmNPV においては *egt* は ELA に関与しないことが、AcMNPV においては *ptp* や *egt* は CB に関与しないことが報告されており (Katsuma *et al.*, 2012a; van Houte *et al.*, 2014)、ELA と CB は独立したメカニズムで制御されていることが示唆されている。しかしながら、これまで ELA と CB が同時に調査された事例はなく、その詳細な経時的变化や前後関係はよく分かっていなかった。

本章では、カイコの祖先種であるクワコの幼虫およびクワコ NPV (*B. mandarina* NPV; BomaNPV) を用いた行動解析を行なうことで、ELA と CB の両方を同時に解析した。カイコは家畜化の弊害で体サイズに対して腹脚の握力が弱く、枝葉や壁などを鉛直に登ることができないため、CB を解析することが困難である。一方、クワコ幼虫は野生種であるために鉛直な場所を自在に登ることができ、ELA と CB の両方を観察することができる。クワコを本来の宿主

とするバキュロウイルスとしては、BomaNPVが知られている(Xu *et al.*, 2010)。BomaNPVはBmNPVとは非常に近縁で、全ゲノム配列は98.7%の相同性を示す(Xu *et al.*, 2010)。しかしながら、両者では一部の遺伝子の構成やアミノ酸配列が大きく異なっており、カイコ幼虫に対する多角体の経口感染力もBmNPVの約20倍強力であることから(Xu *et al.*, 2010)、行動制御においてもBomaNPVはBmNPVより強い能力を示す可能性が考えられた。

本章では、カイコ幼虫およびクワコ幼虫に対してBmNPVとBomaNPVの感染実験を行い、両者の病原性や異常行動を比較した。その結果、BmNPVはBomaNPV同様にクワコに対し異常行動を惹起できることが判明したため、次に、クワコ幼虫にBmNPVの行動関連遺伝子欠損株を感染させ、ELAおよびCBに対する影響を調査した。

材料と方法

ウイルス、培養細胞、および供試昆虫

ウイルスは、BmNPV の野生株として T3 株 (Maeda *et al.*, 1985) を、BomaNPV は浙江大学の Zhang Chuan-Xi 博士より供与された S1 株 (Xu *et al.*, 2010) を用いた。また、BmNPV の ELA および CB 関連遺伝子欠損株として、Bm7D-2 (*egt* 欠損ウイルス; Katsuma *et al.*, 2012a)、BmARIFD (*arif-1* 欠損ウイルス; 本博士論文第一章)、BmPTPD (*ptp* 欠損ウイルス; Kamita *et al.*, 2005) を用いた。培養細胞は、東京大学昆虫遺伝研究室で継代されている BmN 細胞株を用い、10%非働化 FBS 添加 TC-100 培地で継代した (Nakanishi *et al.*, 2010)。ウイルスの感染力価 (PFU) は BmN 細胞を用いたプラークアッセイによって評価した (Maeda, 1984)。細胞への感染実験は全て MOI = 5 で行った。カイコ幼虫は実用品種である錦秋×鐘和を人工飼料にて 25°C で飼育した (Katsuma *et al.*, 2012b)。クワコ幼虫は当研究室で飼育されている系統 (Daimon *et al.*, 2012) を桑葉にて 25°C で飼育した。カイコ幼虫およびクワコ幼虫へのウイルス感染は、特別な指示がない限り、4 齢もしくは 5 齢起蚕を氷水に 10 ~ 20 分間浸けて麻酔した後、カイコ幼虫には 1×10^5 PFU の、クワコ幼虫には 1×10^4 PFU の BV およびカナマイシン硫酸塩 5 mg / mL を含む TC-100 培地をインスリン用シリンジ (NIPRO) で経皮接種することにより行った。

行動実験

水平方向の行動実験は、以下の方法で行った。カイコ 4 齢幼虫およびクワコ 5 齢幼虫に BV を接種し、任意の感染後時間にウイルス感染幼虫の行動観察を行った。観察の手順を以下に述べる。まず、感染幼虫を水平に置いたコピー用紙の中央に静置した。カイコ幼虫では、静置した時刻を $t = 0$ (分) とし

て、 $t = 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5$ にデジタルカメラで写真撮影を行った。クワコ幼虫の場合は、静置直後は移動度に対する接触の影響が大きいため、静置して3分後を $t = 0$ (分) とし、 $t = 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3$ に写真撮影を行った。

鉛直方向の行動実験では、クワコ5齢幼虫にBVを接種し、任意の感染後時間にウイルス感染幼虫の行動観察を行った。鉛直に立てた壁に貼られたコピー用紙に感染幼虫を横向きに止まらせ、その時刻から3分後を $t = 0$ (分) と、 $t = 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3$ に写真撮影を行った。

感染幼虫の座標は、撮影した写真から画像解析ソフト Image J (NIH) を用いて導出した。感染幼虫の歩行以外の動きによる座標のぶれを軽減するため、最も動きの少ない腹部第三節と第四節の中間点をカイコ幼虫の座標とした。水平方向の行動実験では時刻間の座標移動距離を合計して各感染後時間における総合の移動距離を算出し、行動指標とした。鉛直方向の行動実験では $t = 0$ と $t = 3$ の座標を比較し、鉛直方向の移動距離を算出した。なお、背脈管の拍動が停止している個体を死亡、背脈管は動いているが歩行が不可能な個体を瀕死とみなし、ともに移動距離 0 mm とした。

生存曲線

4 齢起蚕のカイコ幼虫および 5 齢起蚕のクワコ幼虫に BV を接種し、任意の感染後時間に生死判定を行い死亡までの時間を調査した。生死判定は、背脈管の拍動が停止している個体を死亡とみなした。得られた各時間の生存率を元に、統計ソフト Prism 5 (GraphPad Software) を用いて生存曲線を作成した。

BV の感染力の測定

5 齢起蚕のカイコ幼虫に 0.1、0.3、あるいは 1 PFU の BmNPV あるいは BomaNPV の BV を経皮接種し、感染幼虫の致死数を計測した。得られた数値を

元に、プロビット法を用いて半数致死量 (median lethal dose; LD₅₀) を算出した。本実験は、指導教員の勝間進准教授により行われた。

カイコ幼虫、クワコ幼虫、および BmN 細胞における多角体/BV 産生量の測定

カイコ幼虫およびクワコ幼虫における多角体および BV 産生量は以下のように測定した。カイコ 5 齢幼虫に BV を接種し、任意の感染後時間に体液を回収した。体液中に放出された多角体量は血球計算盤を用いて計測した (Katsuma *et al.*, 2009)。体液中の BV タイターは BmN 細胞を用いたプラークアッセイにより測定した (Nakanishi *et al.*, 2010)。なお、カイコ幼虫における多角体および BV 産生量の実験は、指導教員の勝間進准教授により行われた。

BmN 細胞における多角体および BV 産生量は以下のように測定した。BV を BmN 細胞に MOI = 5 で感染させ、1 時間静置して BV を BmN 細胞に吸着させた後に新しい培地に交換し、この時間を感染後 0 時間と定めた。その後、任意の時間に 1 / 300 量の培地を回収し、プラークアッセイにより BV タイターを測定した。また、感染細胞スクレイパーを用いて回収し、Katsuma *et al.* (2009) の手法を用いて多角体量を計測した。

ウエスタンブロットティング

BmN 細胞に BV を MOI = 5 で感染させ、任意の感染後時間に感染細胞をスクレイパーで回収した。回収した細胞を 12,000 rpm で 3 分間遠心して上清を捨て、2×SDS sample buffer に懸濁した。得られたサンプルを用いて常法に則り SDS-PAGE およびウエスタンブロットティングを行った。1 次抗体反応には、バキュロウイルスのタンパク質に対する抗体である α -baculovirus repeated open reading frame A and C (BRO-A/C) (Kang *et al.*, 1999)、 α -DNA-binding protein (DBP) (Okano *et al.*, 1999)、 α -V-CATH (Daimon *et al.*, 2007)、および α -POLH

(嶋田ら, 1994) を使用した。

統計解析

統計解析は、Prizm 5 (Graphpad software) を用いて行った。行動実験のデータは Kruskal-Wallis 検定および Dunn の後検定を用いて解析した。生存曲線の比較では log-rank (Mantel-Cox) 検定および Bonferroni の補正を行った。多角体産生量および BV 産生量の多群間比較では、一元配置分散分析 (one-way analysis of variance; ANOVA) および Dunnett の後検定を行った。

結果

カイコ幼虫における BmNPV および BomaNPV の病原性の比較

カイコ幼虫を用いて BmNPV および BomaNPV の感染実験を行い、感染幼虫の ELA やウイルスの病原性を調査した。まず、本博士論文第一章と同一の方法で水平方向の行動実験を行った。水平方向の行動実験では、水平に設置した紙片上に感染幼虫を配置し、幼虫の移動距離を計測することで、感染幼虫の ELA の程度を調査することができる (図 2.1A)。行動観察の結果、BmNPV 感染カイコ幼虫では感染後 72 時間から ELA が観察され、感染後 84 時間まで移動距離の長い個体が見られた (図 2.2A)。それに対し、BomaNPV 感染カイコ幼虫では ELA が感染後 66 時間から開始し、感染後 84 時間にはほとんどの個体で移動が見られなくなった (図 2.2A)。また、BomaNPV では BmNPV と比較して感染幼虫の致死時間が有意に早いことも明らかになった (図 2.2B)。この結果から、BomaNPV 感染カイコ幼虫では BmNPV 感染幼虫と比較して ELA が早く惹起され、早期致死により早く終了することが明らかになった。

次に、BmNPV と BomaNPV の感染力やウイルス増殖を比較するため、カイコ幼虫およびカイコ卵巣由来の培養細胞である BmN 細胞への感染実験を行った。カイコ幼虫に BmNPV および BomaNPV を注射感染させ、体液中の多角体量および BV 量を測定したところ、BomaNPV 感染幼虫では BmNPV と比較して体液中多角体量と BV 量の両方が有意に増加していた (図 2.3)。また、BmNPV および BomaNPV のカイコ幼虫に対する BV の感染力を調査したところ、BomaNPV の LD₅₀ の値は BmNPV の 1 / 3 程度であった (表 2.1)。BomaNPV の多角体のカイコ幼虫に対する LC₅₀ は BmNPV の約 1 / 20 であることが報告されている (Xu *et al.*, 2010)。以上の結果から、BomaNPV は経口感染に関してはカイコ幼虫への適応を果たしていないが、ひとたび中腸を通過してしまえば

BmNPV より強力な病原性を示すことが示唆された。

一方、BmN 細胞への感染実験の結果、BV 産生量については BomaNPV と BmNPV に有意差は認められなかったが(図 2.4A)、多角体産生量は BomaNPV の方が有意に増加していた(図 2.4B)。ウエスタンブロットティングによる経時的なウイルスタンパク質発現解析の結果、BomaNPV 感染細胞では感染末期に POLH や V-CATH といった後期/最後期遺伝子の発現が増加していたことから(図 2.5)、それらのタンパク質発現上昇が多角体産生量の増加や致死の早期化に貢献していると考えられる。

クワコ幼虫における BmNPV および BomaNPV の病原性の比較

クワコ幼虫における BmNPV および BomaNPV の感染実験を行った。クワコ幼虫を用いた行動実験では、前述の水平方向の行動実験に加えて、鉛直方向の行動実験を行った。鉛直方向の行動実験では鉛直面上という条件下での移動活性だけでなく、上下の方向性を見ることにより重力走性も調査することができる(図 2.1B)。まず、ウイルス偽感染クワコ幼虫の行動に着目したところ、偽感染幼虫では感染後 48 時間においては水平方向および垂直方向の移動がある程度活発であったが、次第に移動が不活発になり、感染後 72 時間以降では幼虫の移動がほとんど見られなくなった(図 2.6A、B)。このことから、クワコ幼虫はカイコ幼虫とは異なり健常な状態でも一定レベルの移動活性を持つが、5 齢において成長とともに移動活性が減少することが明らかになった。また、偽感染では下方向へ移動する幼虫の割合が多い傾向が見られたことから(図 2.6B)、ウイルス非感染時にはクワコ幼虫は正の重力走性を示すと推測された。

次に、BomaNPV や BmNPV 感染クワコ幼虫の行動に着目すると、これらの感染幼虫では感染後 72 時間以降において、ほとんど動かない偽感染幼虫と比較して、水平方向と鉛直方向の行動が顕著に活性化されていた(図 2.6A、B)。

この結果から、BmNPV と BomaNPV はクワコ幼虫において ELA を惹起できることが明らかになった。また、両ウイルス感染幼虫の鉛直方向の行動実験において、感染後 72 時間までは下方向に移動する幼虫の割合が上方向の約 3 倍多いが、感染後 84 時間以降では上方向に移動する幼虫の割合が増加する傾向にあった (図 2.6B)。これらの結果から、NPV 感染クワコ幼虫における異常行動では、まず ELA が惹起され、その後に CB が惹起されることが判明した。

クワコ幼虫における BmNPV および BomaNPV の病原性を調査した結果、感染幼虫は BmNPV と比較して BomaNPV の方が早期致死することが明らかになった (図 2.6C)。そこで、感染幼虫の体液中の多角体および BV 量を調査したところ、多角体量は BomaNPV の方が BmNPV と比較して有意に増加していたのに対し (図 2.7A)、BV 産生量は両者で有意差が認められなかった (図 2.7B)。この結果から、注射感染の場合は、クワコ幼虫においてもカイコ幼虫と同様に BomaNPV の方が強い病原性を示すことが明らかになった。

ELA/CB 関連遺伝子欠損 BmNPV を用いたクワコ幼虫の行動実験

上述の結果から、BmNPV 感染クワコ幼虫においても、野生クワコ由来の NPV である BomaNPV と同様に ELA や CB を惹起できることが明らかになった。そこで、BmNPV の異常行動関連遺伝子欠損株である Bm7D-2 (*egt* 欠損ウイルス; Katsuma *et al.*, 2012a)、BmARIFD (*arif-1* 欠損ウイルス; 本博士論文第一章)、および BmPTPD (*ptp* 欠損ウイルス; Kamita *et al.*, 2005) を用いて行動実験を行い、各遺伝子とクワコ幼虫における異常行動との関係を調査した。行動実験の結果、Bm7D-2 感染幼虫では野生株同様に感染後 72 時間から ELA が、感染後 84 時間から CB が惹起される様子が観察された (図 2.8A、B)。Bm7D-2 感染幼虫では致死時間も野生株と比較して有意差が認められなかったことから (図 2.8C)、クワコ幼虫において *egt* は ELA や CB に関与しないことが明らか

になった。一方、BmARIFD と BmPTPD の感染実験の結果、これらのウイルス感染幼虫では感染後 72 時間では偽感染と同様にほとんど幼虫の移動が見られなかったが、感染後 84 時間になると ELA が、感染後 96 時間には CB が惹起された (図 2.8A、B)。また、BmARIFD および BmPTPD 感染幼虫では野生株と比較して致死が有意に遅延していた (図 2.8C)。これらの結果から、クワコにおいてはカイコとは異なり、*arif-1* や *ptp* は行動制御には必須ではないことが示唆された。

考察

バキュロウイルスは基本的に宿主範囲が狭く、ごく限られた近縁の宿主間のみで感染性を保っていることが多い。そのため、行動制御の研究においては、異常行動を異なるウイルス間もしくは異なる宿主間で比較することが困難であり、これまでそのような研究は行われて来なかった。そこで今回、カイコとその野生種であるクワコの幼虫を用いて BmNPV と BomaNPV の感染実験を行い、それぞれの宿主における両ウイルスの性状を解析した。まず、ウイルスの病原性やウイルス増殖を調査した結果、BomaNPV は BmNPV に比べ両方の宿主で殺虫スピードが早く (図 2.2B、2.6C)、多角体産生量が増加していた (図 2.3B、2.7A)。このことから、カイコ及びクワコに対する注射感染では、BomaNPV の方が BmNPV よりも病原性が強いことが判明した。また、水平方向および鉛直方向の行動実験の結果から、BmNPV と BomaNPV はどちらもカイコ及びクワコに対して ELA や CB を惹起する能力を持つことが明らかになった。しかしながら、ELA の惹起に関しては、カイコ幼虫とクワコ幼虫では得られた結果に若干の相違点が見られた。カイコ幼虫への感染では、BomaNPV の BV 産生量が BmNPV と比較して有意に増加しており (図 2.3A)、ELA や致死も BomaNPV の方が早期化していた (図 2.2)。一方、クワコ幼虫への感染では、BomaNPV 感染幼虫の方が BmNPV と比較して早期に致死したが (図 2.6C)、BomaNPV の BV 産生量は BmNPV と同程度であり (図 2.7B)、ELA や CB も同時期に観察された (図 2.6A、B)。これらの結果は、十分なウイルス増殖が異常行動の惹起に重要であるとする第一章の仮説とも整合性が取れていることから、クワコ幼虫においても ELA や CB の惹起にウイルス増殖速度が重要であることが示唆された。

カイコは家畜化された昆虫であり、品種改良によってより体サイズが

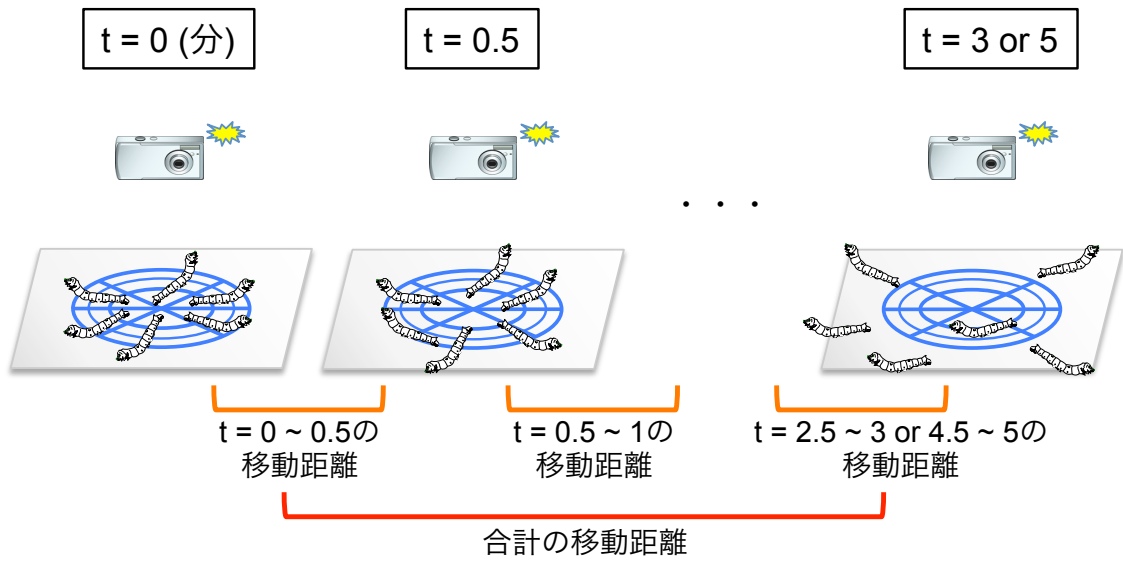
大きく、生産される絹糸量が多い個体が選抜されてきた。その反面、家畜化されたカイコは人間に給餌されるため、自力で桑葉を探索して動き回ったり枝を登ったりする必要がなく、腹脚の握力は壁面で自重を支えきれないほど弱体化している。そのため、BmNPV とカイコを用いた行動研究では CB の観察が困難であり、これまで ELA のみが研究されてきた (Kamita *et al.*, 2005; Katsuma *et al.*, 2012a and b)。また、他のバキュロウイルスにおいても、LdMNPV では CB のみが調査され (Hoover *et al.*, 2011)、AcMNPV でも ELA と CB の調査が同時になされたことはない (van Houte *et al.*, 2012 and 2014)。こうした事情から、バキュロウイルス感染幼虫における ELA と CB の前後関係や、詳細な経時的变化はこれまでよく分かっていなかった。しかしながら、今回、カイコの野生種であるクワコを用いて行動実験を行なうことで、感染幼虫の ELA と CB を同時に解析することができた。行動実験の結果、BmNPV と BomaNPV の双方において、まず ELA が惹起され、その約 12 時間後に CB が遅れて惹起されることが明らかになった (図 2.8A、B)。この結果から、ELA と CB は異なるメカニズムで惹起されており、感染の進行に伴ってそれぞれのスイッチが順番に切り替わると推測される。枝葉の先端への移動は天敵に捕食されるリスクが高いことから、CB が ELA より後に惹起されることは、ウイルスが十分に増殖した後に捕食されるという点でウイルスの拡散効率に貢献していると考えられる。今後、異常行動の各段階において脳のトランスクリプトーム解析を行なうことにより、行動の活性と重力走性を担う宿主遺伝子を発見できる可能性がある。

バキュロウイルスの行動制御に関わる遺伝子は、これまで *ptp*、*egt*、*bv/odv-e26* の 3 遺伝子が報告されている (Hoover *et al.*, 2011; Kamita *et al.*, 2005; Katsuma *et al.*, 2012a)。また、本博士論文第一章では、*arif-1*、*Bm5*、および *Bm96* もカイコの ELA に影響することが明らかになった。そこで本章では、*egt*、*arif-1*、

および *ptp* 欠損 BmNPV をクワコ幼虫に感染させることで、クワコにおいてこれらの遺伝子が ELA や CB に関与するか調査した。その結果、*egt* の欠損は ELA と CB のどちらにも影響を及ぼさないことが明らかになった (図 2.8A and B)。*egt* は LdMNPV 感染マイマイガにおいて CB に関与する遺伝子であるが (Hoover *et al.*, 2011)、BmNPV とカイコにおいては *egt* の欠損は ELA に影響しないことが報告されている (Katsuma *et al.*, 2012a)。このことから、*egt* は BmNPV や BomaNPV において、感染したカイコやクワコ幼虫の行動制御に関与しないことが明らかになった。近年、AcMNPV とその宿主である *T. ni* や *Spodoptera exigua* 幼虫との関係においても *egt* は CB に関与しないことが報告されており (Ros *et al.*, 2014; van Houte *et al.*, 2014)、*egt* による行動制御は一部のバキュロウイルスのみで進化した機構であると推測される。

一方、BmARIFD や BmPTPD 感染クワコ幼虫では、ELA や CB は遅延していたものの、野生株と同等あるいは上回るレベルの移動距離を示した (図 2.8A、B)。この結果から、*arif-1* や *ptp* はクワコ幼虫では必ずしも異常行動の惹起に必要なことが明らかになった。*arif-1* や *ptp* を欠損した BmNPV ではカイコ幼虫において全身感染が遅延する (本博士論文第一章; Katsuma *et al.*, 2012b)。クワコにおいても *arif-1* や *ptp* 欠損ウイルスでは感染幼虫の致死が遅延していることから (図 2.8C)、クワコへの感染においても *arif-1* と *ptp* はカイコの場合と同様の機能を果たすと可能性が示唆された。おそらく、クワコでは脳への感染速度と致死時間とのバランスがカイコと異なるために、*arif-1* や *ptp* 欠損ウイルスでも致死以前に脳で十分にウイルスが増殖でき、ELA や CB が惹起されるのだと考えられる。

A 水平方向の行動実験



B 鉛直方向の行動実験

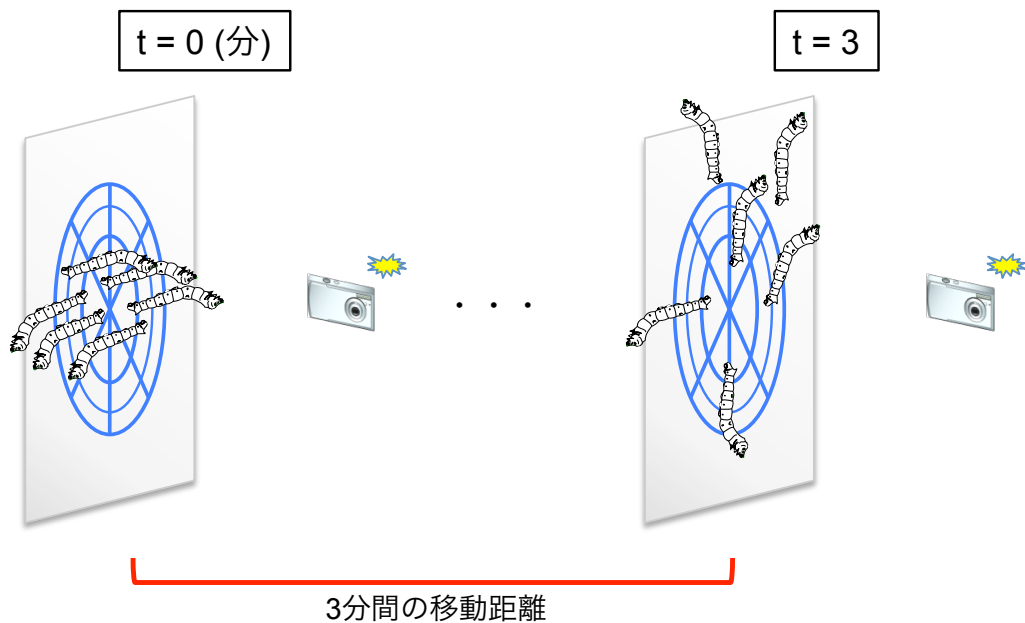


図2.1 クワコ水平方向および鉛直方向の行動実験の模式図

(A) 水平方向の行動実験。水平な紙面に感染幼虫を静置した。その時刻を $t = 0$ (分) として30秒おきに写真撮影し、カイコ幼虫では5分間の移動距離を算出し、ELAの指標とした。クワコ幼虫では人的接触の影響を軽減するため、静置から3分後を $t = 0$ とし、同様に3分間の移動距離を算出した。

(B) 鉛直方向の行動実験。鉛直に立てた壁面に貼った紙面に、クワコ幼虫を水平向きに静置した。人的接触の影響を軽減するため、静置から3分後を $t = 0$ (分) とし、 $t = 0$ および $t = 3$ の写真から3分間の鉛直方向の移動距離を算出し、CBの指標とした。

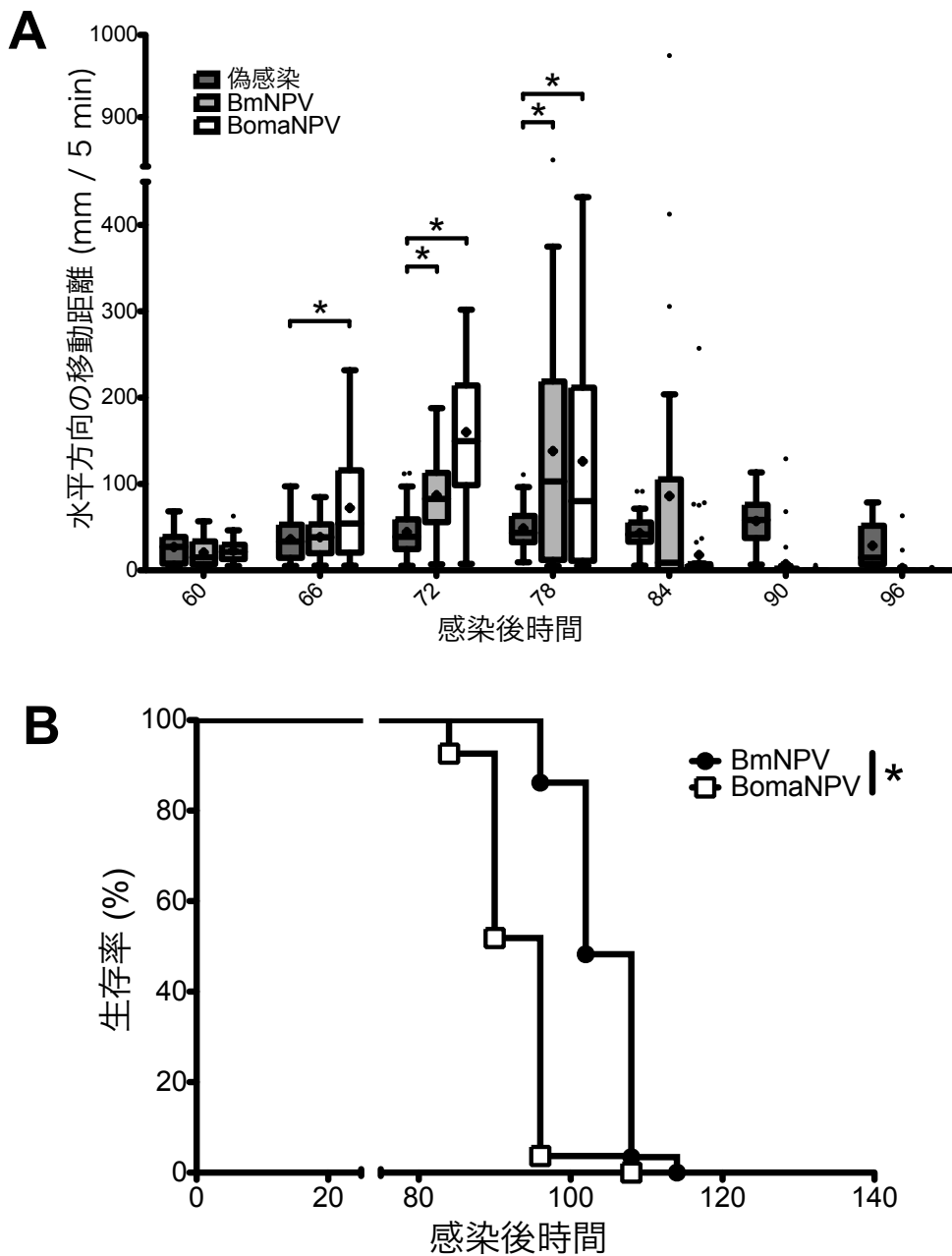


図 2.2 カイコ幼虫におけるBmNPVおよびBomaNPVの感染実験

(A) 感染幼虫の水平方向の移動距離 (n = 36)。カイコ4齢幼虫に 1×10^5 PFUのBVを接種し、感染幼虫の5分間の移動距離を測定した。移動距離を箱ひげ図で示す。箱の中央の横線は中央値を、箱の下端及び上端は第1および第3四分位点を、ひげの上下端は外れ値（箱から箱の長さの1.5倍よりも離れた値）を除いた場合の極値を表す。* $p < 0.05$ 。

(B) 感染幼虫の生存曲線 (BmNPV: n = 29, BomaNPV: n = 27)。カイコ4齢幼虫に 1×10^5 PFUのBVを接種して6時間おきに生存数をカウントし、生存率を算出した。* $p < 0.05$ 。

表2.1 カイコ幼虫におけるBmNPVおよびBomaNPVのBVの感染力

カイコ5齢幼虫に様々な濃度のBVを経皮接種し、その死亡数からLD₅₀を算出した。n > 15、勝間准教授による実験。

ウイルス	LD ₅₀ (PFU / 幼虫)	95%信頼区間	
		下端	上端
BomaNPV S1	0.115	0.044	0.179
BmNPV T3	0.329	0.204	0.575

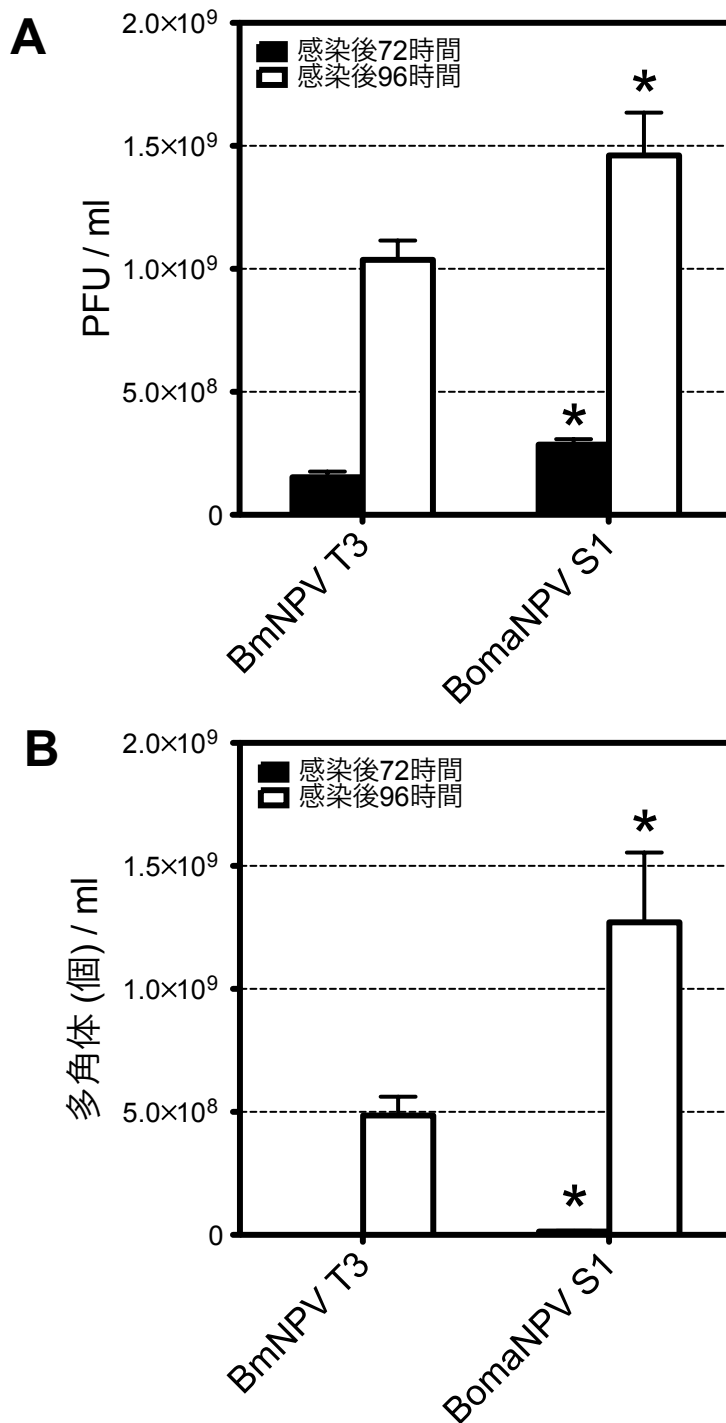


図2.3 カイコ幼虫におけるBmNPVおよびBomaNPVのウイルス増殖

カイコ5齢幼虫に 1×10^5 PFUのBVを接種し、体液を回収した (n=6)。

(A) 感染幼虫の体液中のBV量。BV量はプラークアッセイにより測定した。* $p < 0.05$ (BmNPVと比較)。

(B) 感染幼虫の体液中の多角体量。多角体数は血球計算盤を用いて計測した。* $p < 0.05$ (BmNPVと比較)。

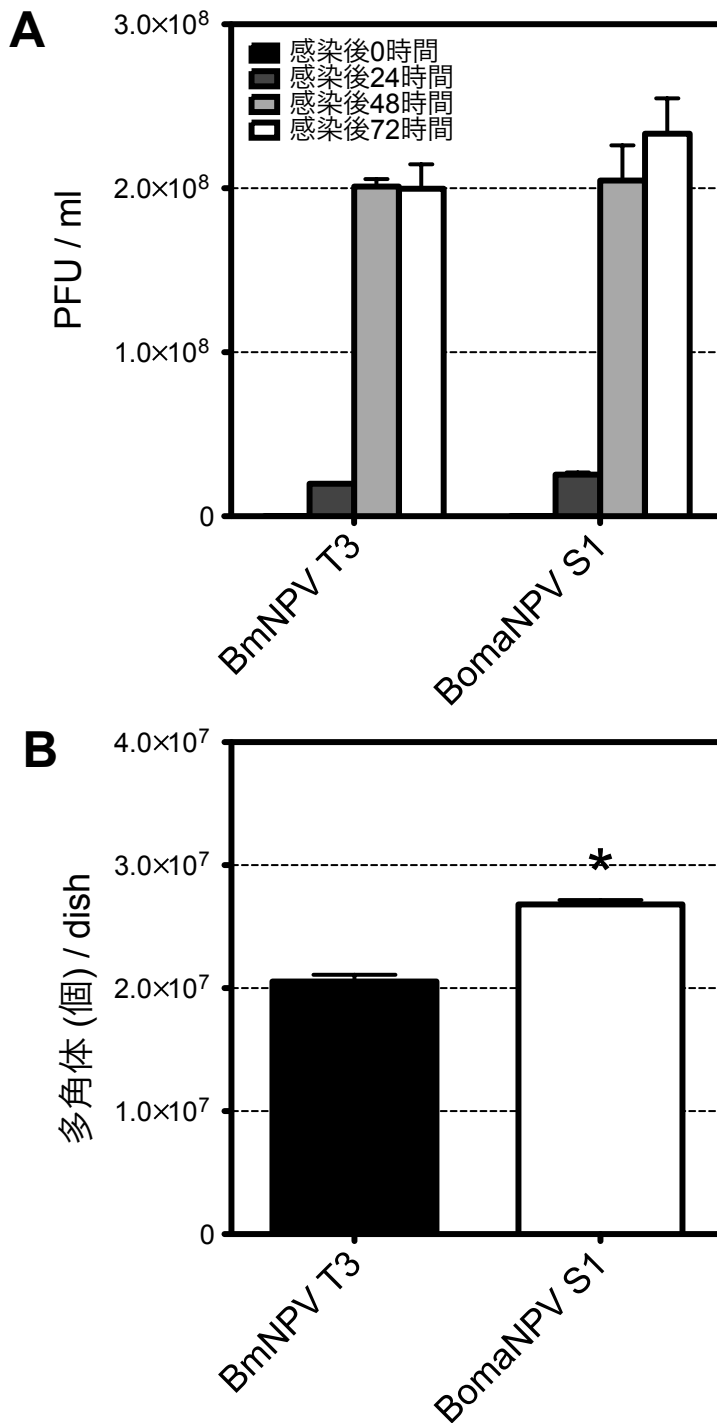


図2.4 BmN細胞におけるBmNPVおよびBomaNPVのウイルス増殖

BmN細胞にBVをMOI = 5で感染させ、培地上清および細胞を回収した。n = 3。

(A) BV産生量。回収した培地上清を用いてプラークアッセイによりBV量を測定した。* $p < 0.05$ (BmNPVと比較)。

(B) 多角体産生量 (感染後72時間)。回収した感染細胞を1% SDSで溶解し、血球計算盤を用いて多角体数を計測した。* $p < 0.05$ (BmNPVと比較)。

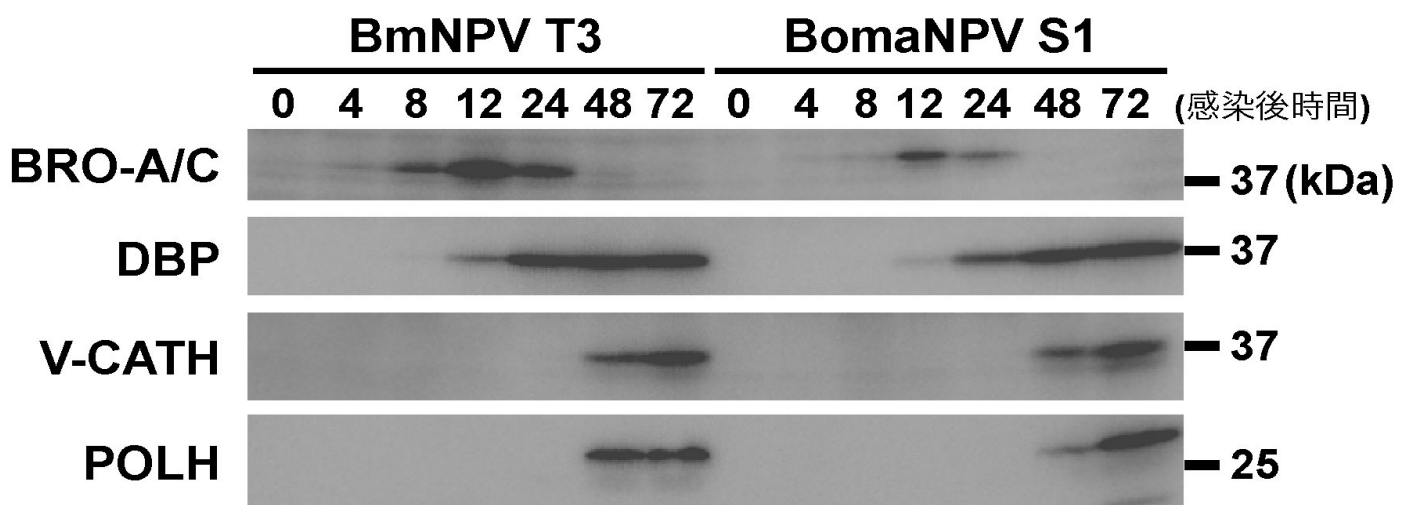


図2.5 BmN細胞におけるBmNPVおよびBomaNPVのウイルスタンパク質発現
 BmN細胞にBmNPVおよびBomaNPVをMOI = 5で感染させ、経時的に細胞を回収した。これらのタンパク質サンプルを用いてウエスタンブロッティングを行い、 α -BRO-A/C抗体、 α -DBP抗体、 α -V-CATH抗体、および α -POLH抗体で検出した。

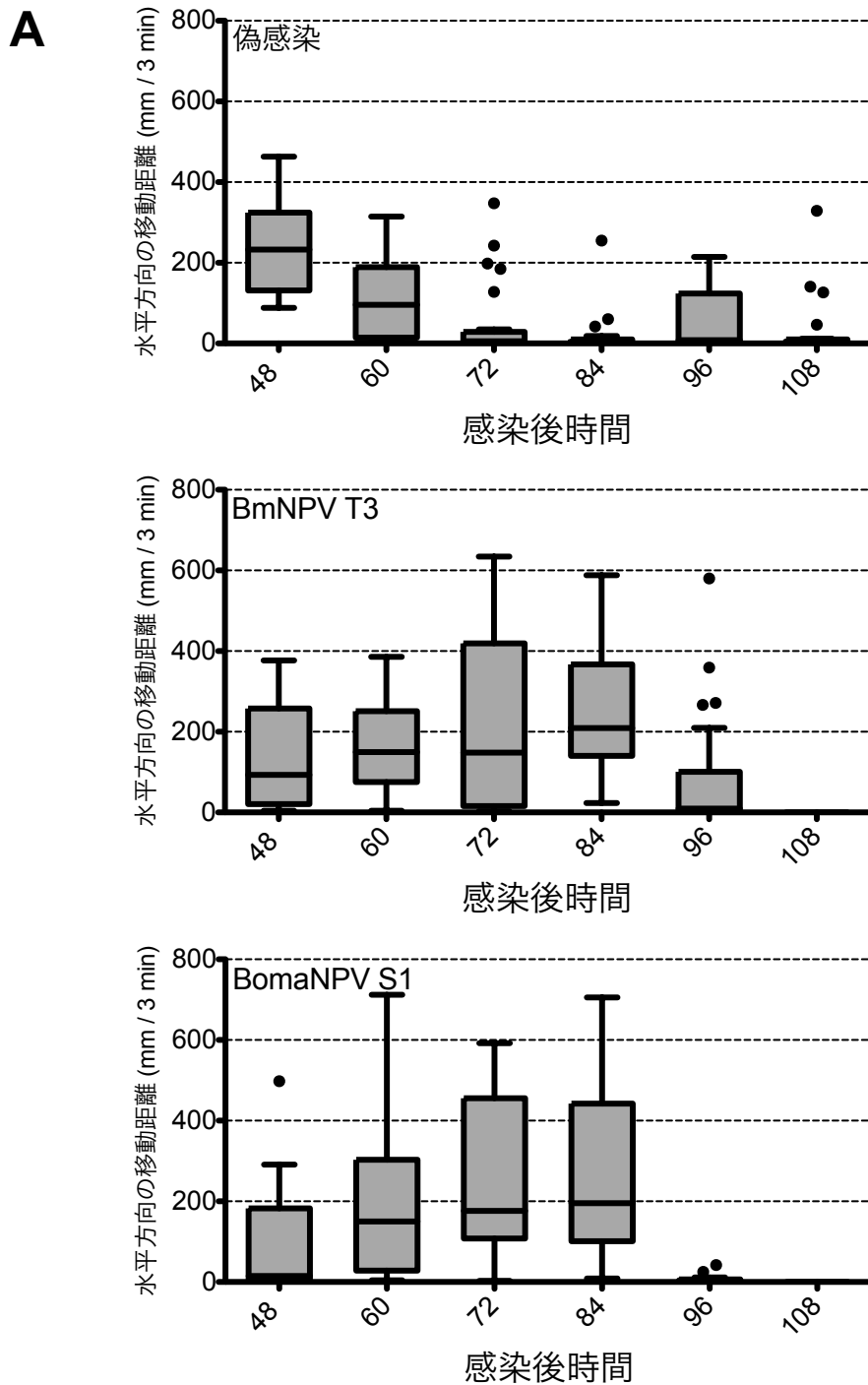


図2.6 クワコ幼虫におけるBmNPVおよびBomaNPVの感染実験

クワコ5齢幼虫に 1×10^4 PFUのBVを接種し、異常行動および致死時間を調査した。n = 24。
 (A) 感染幼虫の水平方向の移動距離。感染幼虫の3分間の移動距離を測定した。移動距離を箱ひげ図で示す。箱の中央の横線は中央値を、箱の下端及び上端は第1および第3四分位点を、ひげの上下端は外れ値（箱から箱の長さの1.5倍よりも離れた値）を除いた場合の極値を表す。

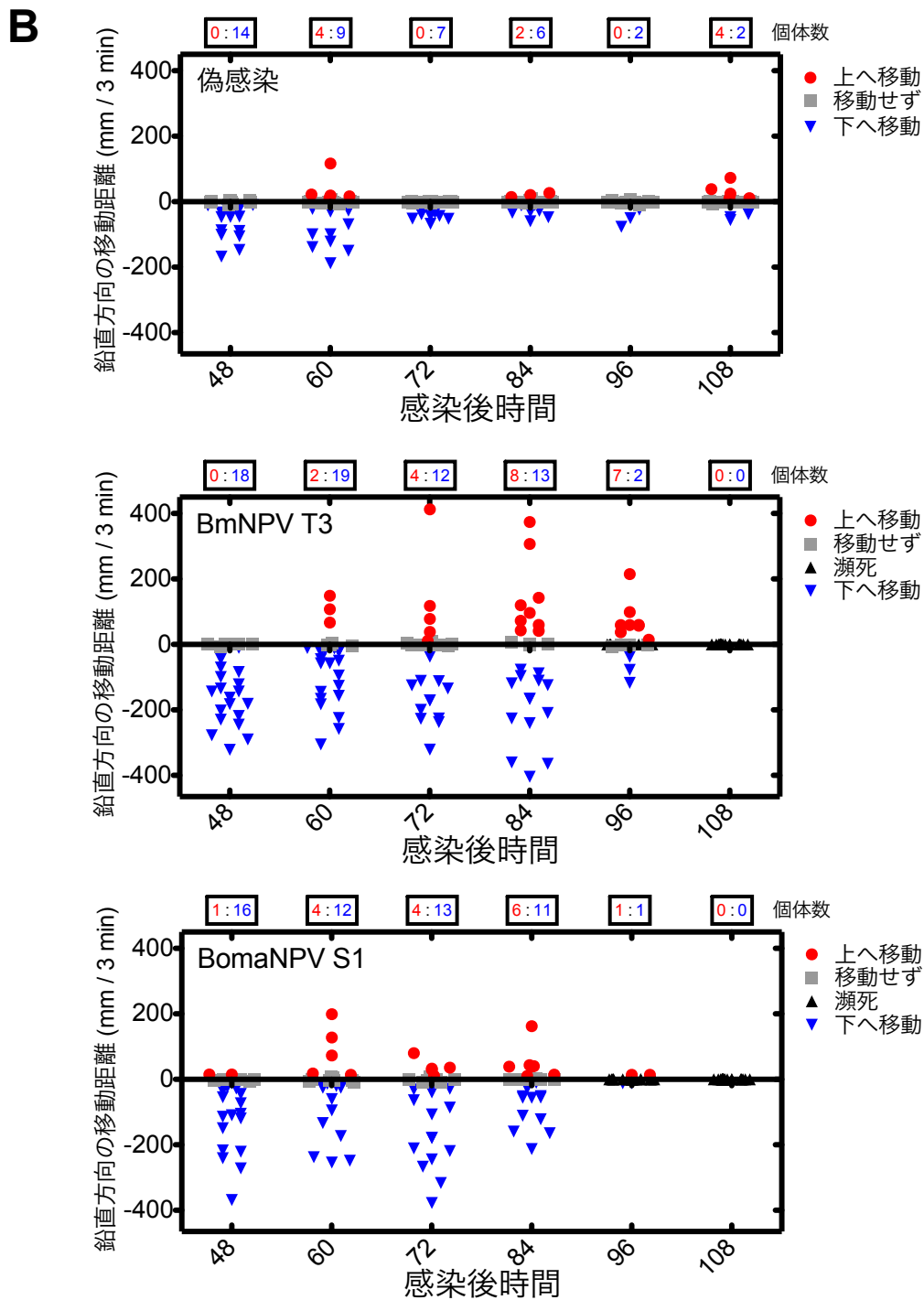


図2.6 クワコ幼虫におけるBmNPVおよびBomaNPVの感染実験

クワコ5齢幼虫に 1×10^4 PFUのBVを接種し、異常行動および致死時間を調査した。n = 24。
 (B) 感染幼虫の鉛直方向の移動距離。感染幼虫の3分間の移動距離を測定した。移動距離を散布図で示す。赤い点は上方向に10 mm以上移動した個体を、青い点は下方向に10 mm以上移動した個体を、灰色の点は移動距離が10mm以下の個体を、黒い点は死亡個体を表す。また、上下方向に移動した個体数を併記した。

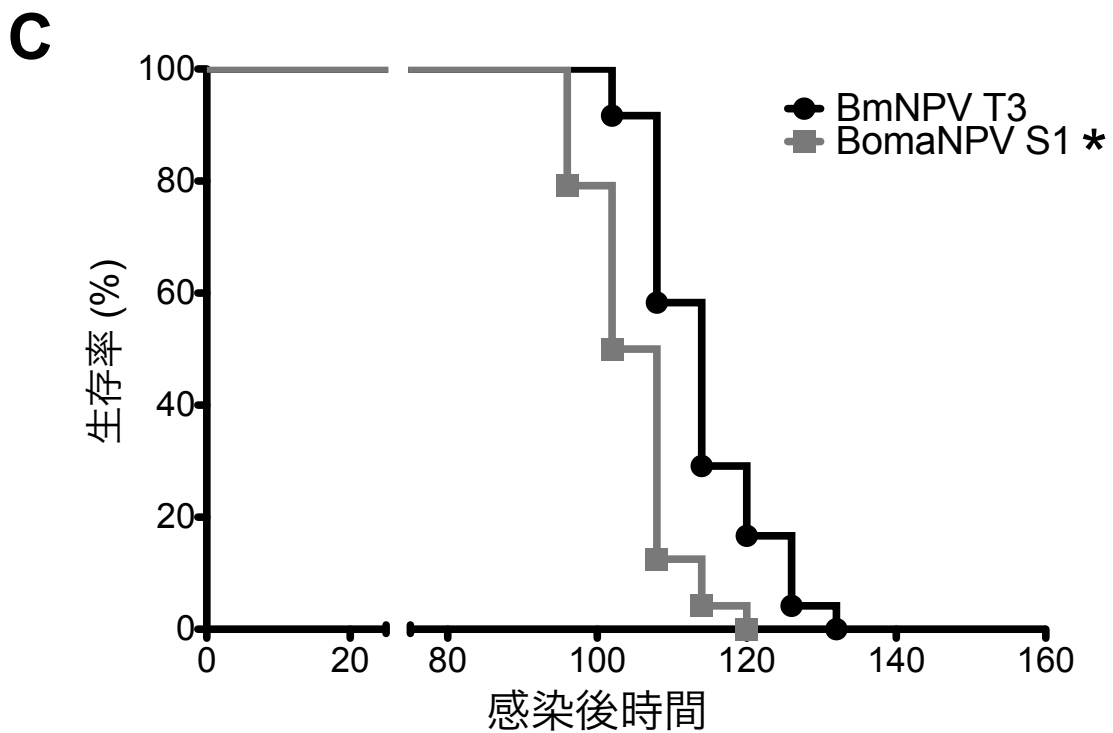


図2.6 クワコ幼虫におけるBmNPVおよびBomaNPVの感染実験

クワコ5齢幼虫に 1×10^4 PFUのBVを接種し、異常行動および致死時間を調査した。n = 24。

(C) 生存曲線。感染幼虫を6時間おきに観察して生存数をカウントし、生存率を算出した。 $*p < 0.05$ (BmNPVと比較)。

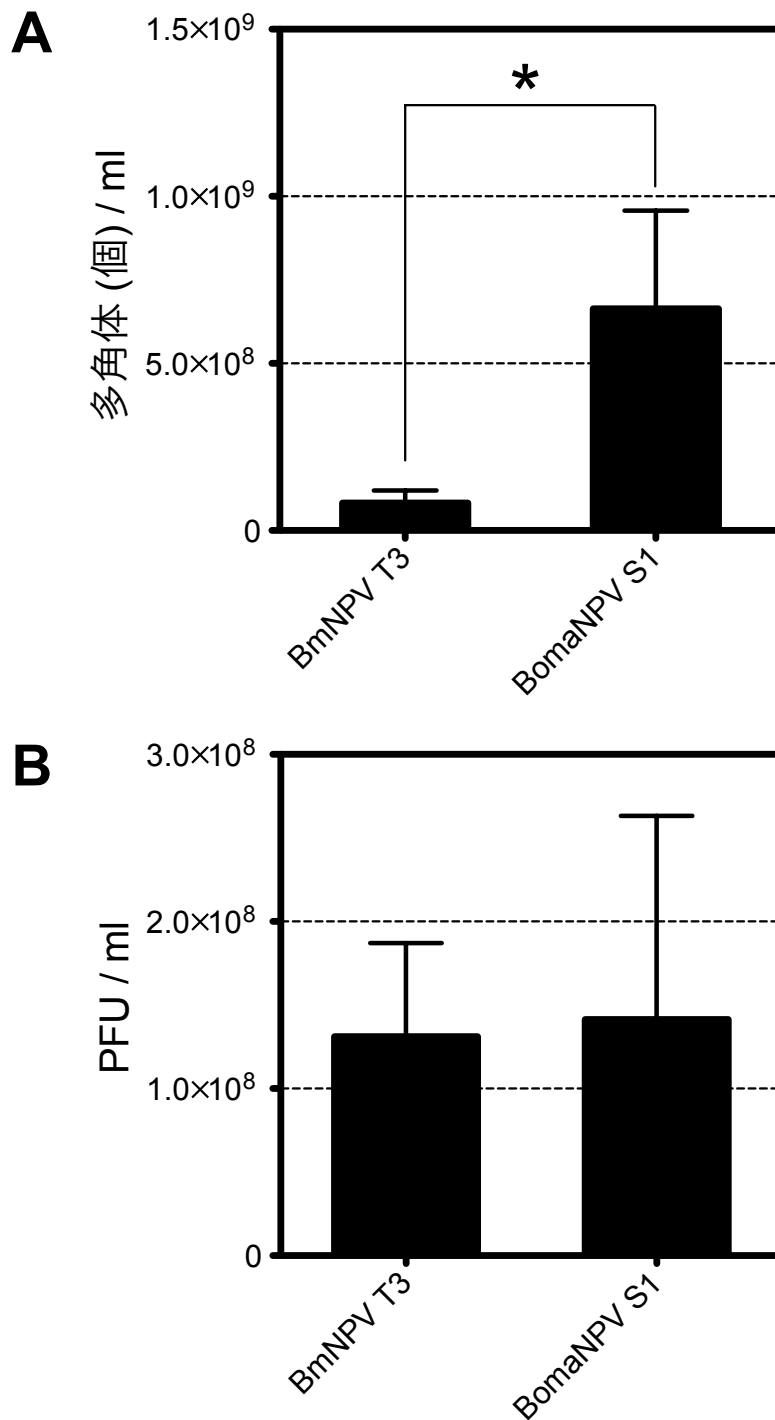
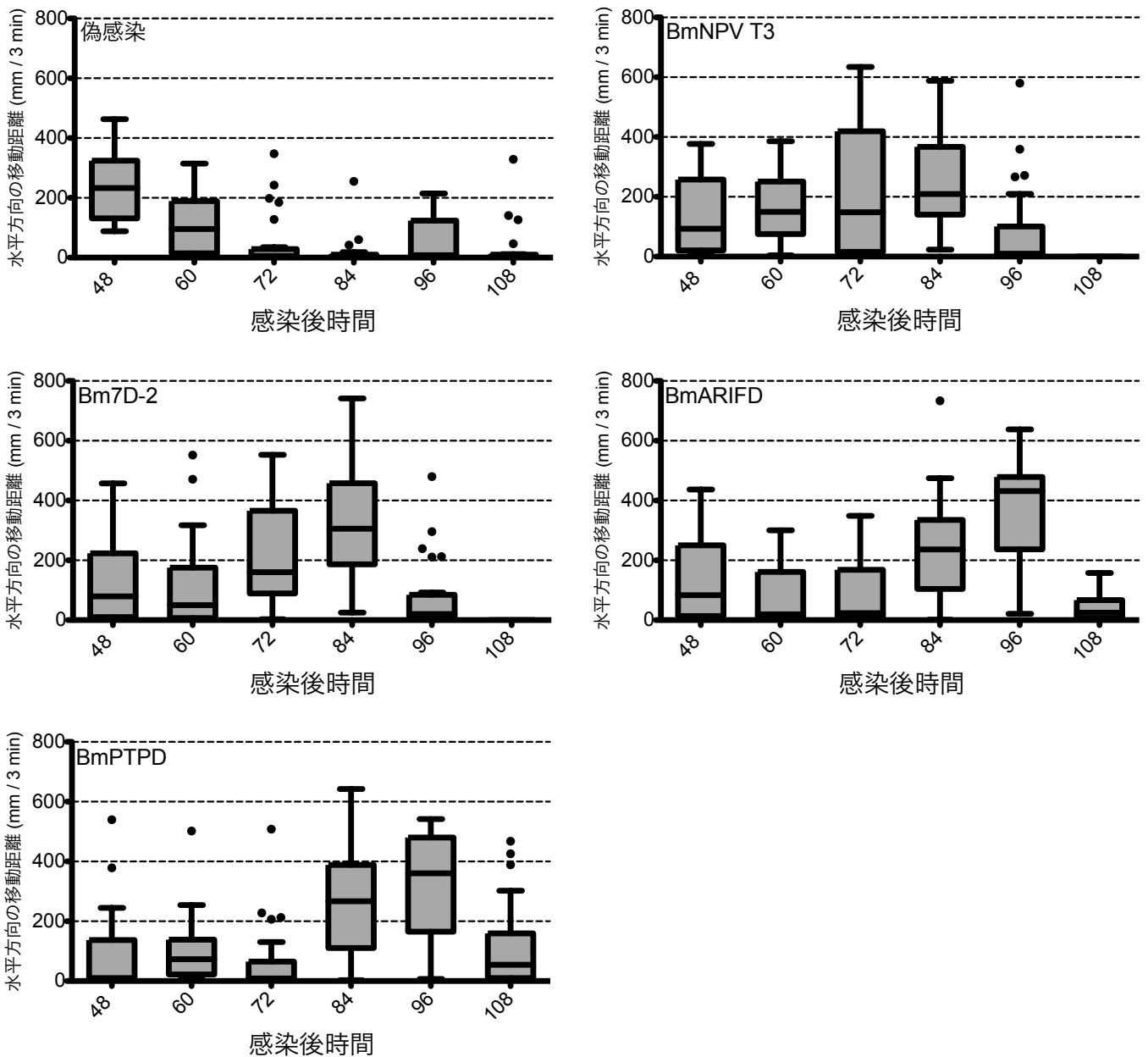


図2.7 クワコ幼虫におけるBmNPVおよびBomaNPVのウイルス増殖

クワコ5齢幼虫に 1×10^4 PFUのBVを接種し、感染後3日に体液を回収した (n = 6)。

(A) 感染幼虫の体液中の多角体量。多角体数は血球計算盤を用いて計測した。* $p < 0.05$ (BmNPVと比較)。

(B) 感染幼虫の体液中のBV量。BV量はプラークアッセイにより測定した。* $p < 0.05$ (BmNPVと比較)。

A**図2.8 クワコ幼虫におけるBmNPVの行動関連遺伝子欠損株の感染実験**

クワコ5齢幼虫に 1×10^4 PFUのBVを接種し、異常行動および致死時間を調査した。n = 24。
(A) 感染幼虫の水平方向の移動距離。感染幼虫の3分間の移動距離を測定した。移動距離を箱ひげ図で示す。箱の中央の横線は中央値を、箱の下端及び上端は第1および第3四分位点を、ひげの上下端は外れ値（箱から箱の長さの1.5倍よりも離れた値）を除いた場合の極値を表す。

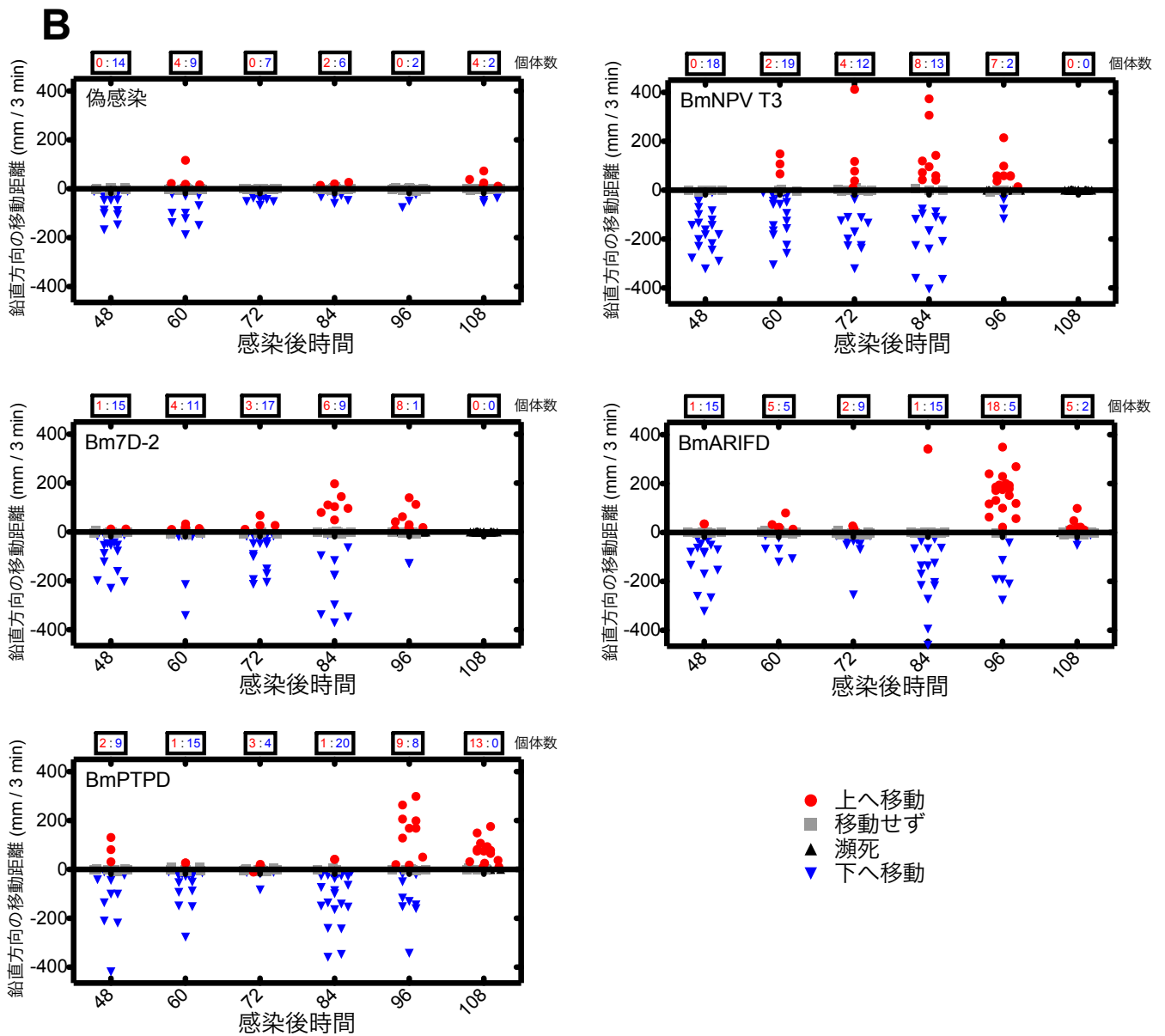


図2.8 クワコ幼虫におけるBmNPVの行動関連遺伝子欠損株の感染実験

クワコ5齢幼虫に 1×10^4 PFUのBVを接種し、異常行動および致死時間を調査した。n = 24。

(B) 感染幼虫の鉛直方向の移動距離。感染幼虫の3分間の移動距離を測定した。移動距離を散布図で示す。赤い点は上方向に10 mm以上移動した個体を、青い点は下方向に10 mm以上移動した個体を、灰色の点は移動距離が10mm以下の個体を、黒い点は死亡個体を表す。また、上下方向に移動した個体数を併記した。

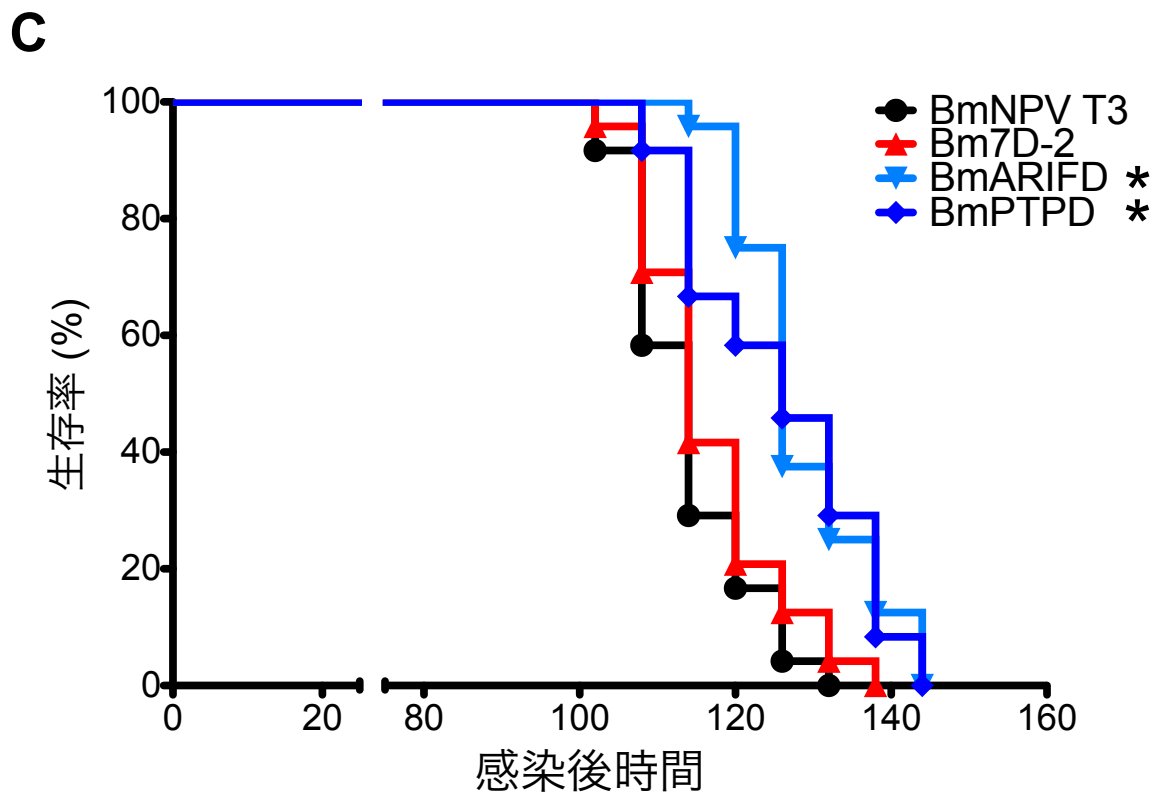


図2.8 クワコ幼虫におけるBmNPVの行動関連遺伝子欠損株の感染実験

クワコ5齢幼虫に 1×10^4 PFUのBVを接種し、異常行動および致死時間を調査した。n = 24。

(C) 生存曲線。感染幼虫を6時間おきに観察して生存数をカウントし、生存率を算出した。 $*p < 0.05$ (BmNPV T3と比較)。

総合考察

本研究の総括

本博士論文では、バキュロウイルスによる宿主行動制御メカニズムの全容を解明することを目標として研究を行った。第一章では、BmNPV の変異株をカイコ幼虫に感染させて行動スクリーニングを行い、ELA に関連する新規ウイルス遺伝子を探索した。その結果、BmNPV においてこれまで既に ELA への関与が知られている *ptp* や *bv/odv-e26* に加えて、新たに *arif-1*、*Bm5* および *Bm96* が ELA 関連遺伝子であることを見出した。詳細な機能解析の結果、*arif-1* はウイルスの全身感染の効率を向上させる遺伝子であることが、*Bm5* はウイルスのゲノム複製や後期遺伝子発現制御に関与する遺伝子であることが明らかになった。また、これらの遺伝子の変異ウイルスを用いた行動解析の結果から、ELA の惹起には致死する前に行動中枢である脳でウイルスが増殖することが重要であることが推測された。第二章では、カイコの祖先種であるクワコの幼虫を用いて CB の解析を行った。まず、BmNPV およびクワコを本来の宿主とする BomaNPV をカイコおよびクワコ幼虫に感染させて、両ウイルスの差異を調査した。その結果、BmNPV は BomaNPV と比較して病原性が弱い、どちらのウイルスもクワコにおいて ELA や CB を惹起できることが明らかになった。また、CB は ELA より遅いタイミングで惹起されることが判明した。BmNPV の行動関連遺伝子変異株を用いてクワコの行動実験を行ったところ、どの変異株でも ELA や CB が惹起されたことから、宿主の種類によってはこれらの遺伝子は必ずしも異常行動の惹起に必要なことが明らかになった。

バキュロウイルスの行動制御メカニズムの新たな仮説

バキュロウイルスがどのようにして宿主の異常行動を惹起するのか、そのメカニズムはこれまでよく分かっていなかった。Hoover らのグループは、*egt* 欠損 LdMNPV に感染したマイマイガ幼虫では CB が低下することを発見し、

宿主行動操作には脱皮ホルモンレベルの制御が重要であるとする仮説を提唱した (Hoover *et al.*, 2011)。しかしながら、その後の研究により *egt* は BmNPV や AcMNPV においては行動制御に関与しないことが報告され (Katsuma *et al.*, 2012a; Ros *et al.*, 2014)、*egt* による行動制御はバキュロウイルスに共通した行動制御メカニズムではないことが明らかになった。

それでは、BmNPV において異常行動はどうやって惹起されているのだろうか。本研究の結果と先行研究の知見を合わせることで、私はバキュロウイルスによる行動制御メカニズムの新たな仮説を提唱する。すなわち、バキュロウイルスは昆虫の脳へと感染することにより、感染幼虫の歩行の活性化や負の重力走性を惹起しているというものである (図 3.1)。昆虫における歩行運動の制御中枢は食道下神経節や脳を中心複合体が司っており、これらの神経活動が直接的に歩行運動の活性とリンクしていることが知られている (Bender *et al.*, 2010; Schoofs *et al.*, 2014)。したがって、バキュロウイルスが脳の行動中枢に感染し、その活性を直接操作することによって異常行動を惹起していると考えられる。このような行動制御を成し遂げるためには、①脳の行動中枢まで感染が進行する感染速度と、②致死時間とのバランスが重要となる。本博士論文および先行研究で得られた行動関連遺伝子の解析結果は、この2つの要素で以下のように説明できる。

ptp や *arif-1* 欠損ウイルスを用いた研究では、これらのウイルスに感染したカイコ幼虫ではウイルス増殖や全身感染が遅延し、特に中枢神経系でのウイルス増殖が遅延することが明らかになった (Katsuma *et al.*, 2012b; 図 1.7、1.8)。ウイルス増殖や全身感染の遅延は脳への感染と致死の両方の遅延に繋がるが、*ptp* や *arif-1* 欠損ウイルスの場合においては脳への感染遅延に対する影響がより大きいために、ELA 惹起前に致死すると推測される。

一方、*Bm5* 欠損ウイルスを用いた実験により、ウイルス増殖の低下が

必ずしも ELA の低下に繋がるわけではなく、ELA の遅延に留まるケースもあることが明らかになった (図 1.20A)。Bm5 変異ウイルスではウイルスの持つタンパク質分解酵素遺伝子である *v-cath* の発現量が低下することから (図 1.23F、1.24)、これらのウイルスではタンパク質分解による感染幼虫の損傷がより軽微であるために致死が遅延し、結果として中枢神経系でのウイルス増殖が ELA の惹起に十分なレベルまで進行する事ができると推測される。また、Bm5 の DUF3627 モチーフ欠損ウイルス感染幼虫では、致死が遅延するにもかかわらず、ELA は WT と同じタイミングで惹起された (図 1.20)。DUF3627 欠損ウイルスでは感染後期のウイルス遺伝子発現制御に異常が生じているが (図 1.23)、BV 産生量は正常であるため (図 1.21)、全身へのウイルス感染は正常に進行していると予想される。したがって、DUF3627 欠損ウイルスでは中枢神経系への感染が WT と同様に正常に進行することで、ELA が遅延せずに惹起されていたと考えられる。

Bm96 変異ウイルスではウイルス増殖が増加するにも関わらず (図 1.31)、致死時間はコントロールウイルスと比較して差が見られず (図 1.30B)、ELA も惹起されなかった (図 1.30A)。Bm96 変異ウイルスで致死が早期化しない原因としては、①ウイルス増殖の増加の影響が軽微である可能性と、②ウイルス増殖の増加により致死は促進されたが、ELA の低下に伴う虫体の物理的損傷の低下により致死が遅延し、結果として致死の早期化は起こらなかった可能性の 2 つが考えられる。①の場合は中枢神経系でのウイルス増殖の観点からは説明が困難であり、Bm96 は未知のメカニズムで ELA 惹起に関与すると考えられる。また、②の場合、Bm96 欠損ウイルスでは致死の促進により、ELA が惹起される以前に致死すると推測される。同じように ELA の惹起以前に早期致死するケースとして、*bv/odv-e26* 欠損 BmNPV が知られている (Katsuma *et al.*, 2012a)。今後、Bm96 の行動制御における役割を詳細に調査することによって、

BmNPV の行動制御メカニズムに関して新しい知見が得られるであろう。

また、クワコ幼虫を用いた実験では、上述の仮説によって ELA だけでなく CB についても説明できることが明らかになった。クワコ幼虫において、CB は ELA よりも約 12 時間遅れて惹起される (図 2.6B、2.8B)。行動の活性と重力走性はそれぞれ脳 (あるいは中枢神経系) の別々の部位が担っており、部位間の感染時期の差が ELA と CB の惹起タイミングの差となって現れているのだと推測される。また、クワコへの感染実験では、*ptp* と *arif-1* 欠損ウイルスのいずれにおいても ELA や CB は遅延に留まった (図 2.8A、B)。おそらく、クワコでは脳への感染速度と致死時間とのバランスがカイコと異なるために、*arif-1* や *ptp* 欠損ウイルスでも致死以前に脳で十分にウイルスが増殖でき、ELA や CB が惹起されるのだと考えられる。

さらに、本博士論文第二章において、この仮説は BmNPV だけでなく他のバキュロウイルスにも適用できるものであることも示唆された。BmNPV に非常に近縁な BomaNPV を用いた行動解析の結果、カイコにおいては BomaNPV 感染幼虫の方が BmNPV 感染の場合と比較して ELA が早期に惹起されるのに対し (図 2.2A)、クワコへの感染では BomaNPV と BmNPV で ELA や CB の惹起タイミングに差は見られなかった (図 2.6A、B)。カイコへの感染では BomaNPV は BmNPV より BV 産生量が多いため (図 2.3A)、その分全身感染が早く進行し、結果として ELA や致死が早期化する。一方、クワコ幼虫への感染では、BmNPV と BomaNPV で BV 産生量に差が無いため (図 2.7B)、全身感染の進行速度も変わらず、結果として ELA や CB の惹起タイミングが同時期になると考えられる。また、BomaNPV では致死が早期化しているために、ELA や CB も BmNPV より早期に減衰したのだと推測される。AcMNPV も BmNPV と同様に *egt* 非依存的な宿主行動制御メカニズムを採用していると考えられるため (Ros *et al.*, 2014)、上述の仮説で提唱したウイルスによる脳の直接制御は、

広範なバキュロウイルスに保存された行動制御メカニズムである可能性が考えられる。

宿主行動制御メカニズムの全容解明に向けて

本研究により、バキュロウイルスの宿主行動制御における脳への感染の重要性が明らかになった。しかしながら、本研究では脳へのウイルス感染が本当に必要であるのか、厳密な証明に至ることは出来なかった。これを証明するためには、脳のみでウイルスを感染させて異常行動を惹起させるか、あるいは脳のみでウイルスが増殖できない状況下で異常行動が惹起できないことを示す必要がある。前者は技術的に困難であるが、後者については神経細胞特異的にウイルス増殖を抑制するカイコを利用することにより、実現できるかも知れない。実際、バキュロウイルス遺伝子に対する shRNA を全身で発現するウイルス抵抗性カイコは既に報告されている (Isobe *et al.*, 2004; Subbaiah *et al.*, 2013)。この系で利用されている shRNA 発現ベクターと GAL4-UAS システム等の組織・時期特異的に発現させるトランスジェニックカイコを組み合わせることで、行動制御に必要な感染トロピズムを解明できるであろう。

また、宿主の異常行動を惹起する宿主側の実行因子については、依然として不明である。これを明らかにするため、Bmp α -proD の変異同定に利用したウイルス感染カイコ脳 RNA-seq データのうち、宿主由来のものを用いてトランスクリプトーム解析を行った。解析の結果、徘徊行動前後の脳において 85 個の宿主由来転写産物の発現量が変動していることが明らかになった。行動変異株の感染脳を用いた解析の結果、ELA 直前に脳で発現量が低下する宿主遺伝子を 9 個、ELA 直後に脳で発現量が上昇する宿主遺伝子を 2 個発見した (図 3.2)。今後これらの遺伝子の機能解析を行なうことにより、脳内における ELA 惹起メカニズムを明らかにできる可能性がある。また、これらの遺伝子の脳内

での発現部位を *in situ* ハイブリダイゼーションで特定することにより、行動制御における宿主遺伝子発現制御部位を絞り込むことができると考えられる。これらの分子生物学的解析に加えて、電気生理学的手法を用いて神経活動を直接的に測定することにより、ウイルスによる宿主行動制御メカニズムの全貌が解明されることが考えられる。

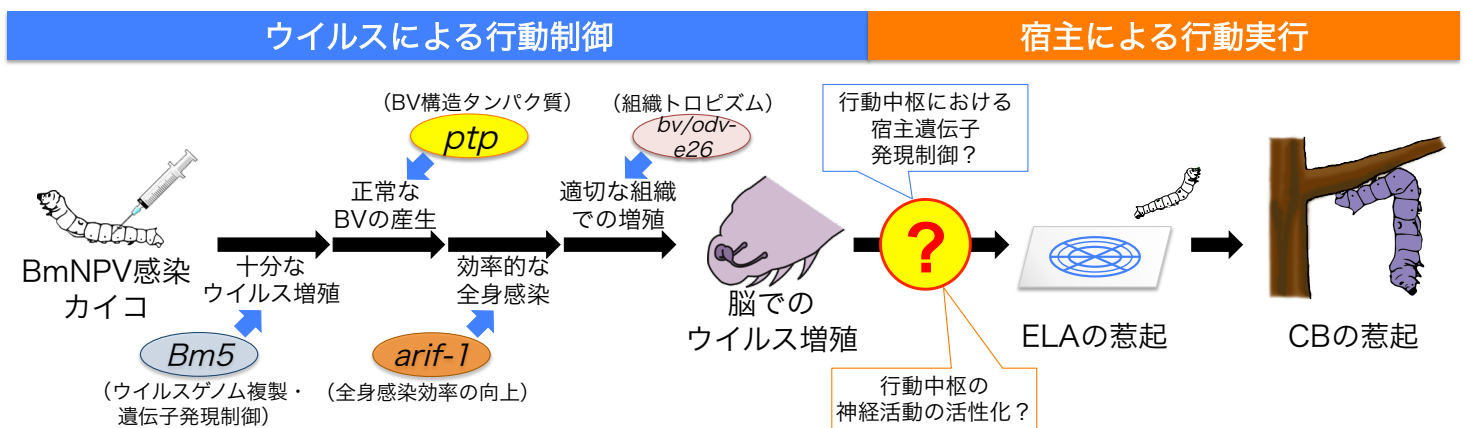


図3.1 本研究が提唱するバキュロウイルスの宿主行動制御メカニズム (仮説)

本研究の結果から、私はバキュロウイルスによる宿主行動制御には脳におけるウイルス増殖が重要であるとする仮説を提唱した。脳でのウイルス増殖に関与する要素として、ウイルスのゲノム複製 (*Bm5*)、BV産生 (*ptp*)、全身感染効率 (*arif-1*) が、致死時間に関与する要素として、*v-cath*発現 (*Bm5*) や組織トロピズム (*bv/odv-e26*) があり、両者のバランスによって致死以前に異常行動が惹起されるかどうか決定する。脳でのウイルス増殖により、脳の行動中枢において宿主遺伝子発現が変化し、行動に関わる神経活動が活性化すると予想される。また、行動の活性と重力走性を司る脳の部位は異なっており、まず行動活性を司る部位に、続いて重力走性を司る部位にウイルスが感染することにより、ELA→CBの順番で異常行動が惹起されると考えられる。

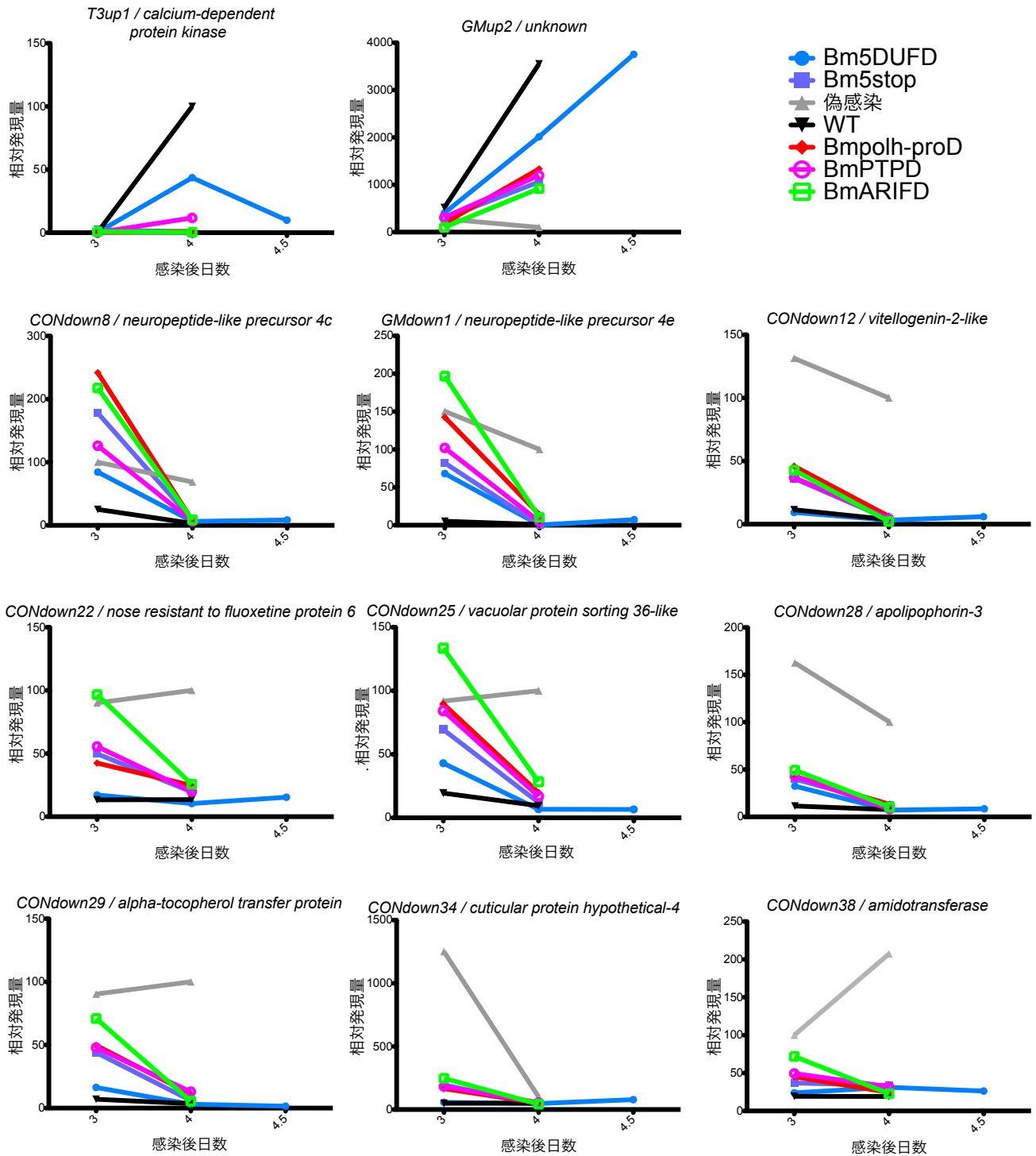


図3.2 ELAが惹起される前後に脳で発現量が変動する遺伝子

カイコ5齢幼虫に 1×10^5 PFUのBVを接種し、任意の感染後日数において解剖して脳をサンプリングした。各サンプルには15匹分の脳を用いた。それぞれのサンプルからtotal RNAを抽出して定量RT-PCR解析を行った。感染後4日のWTとBm5DUFD、および感染後4.5日のBm5DUFDでは感染幼虫でELAが惹起されていた。それ以外の場合、ELAは惹起されていなかった。

摘要

昆虫に対する病原体や寄生者の中には、感染後に宿主に異常行動を引き起こすものが多く知られている。異常行動は病原体の増殖や拡散に有利に働くと考えられているが、行動制御の分子メカニズムが詳細に解明された事例は少ない。そこで本研究では、昆虫病原性ウイルスの一種であるバキュロウイルスにより引き起こされる異常行動に着目した。

バキュロウイルスは約 80~160 kbp の環状二本鎖 DNA をゲノムに持ち、その中には 100 個以上のタンパク質コード遺伝子が存在する。ウイルスゲノム DNA はヌクレオキャプシド内に格納されて脂質二重膜からなるエンベロープに包まれ、ウイルス粒子となる。バキュロウイルスは経口感染に関わる包埋体由来ウイルス (occlusion-derived virus; ODV) と、細胞間感染を司る出芽ウイルス (budded virus; BV) の 2 種類のウイルス粒子を使い分けることで、効率的な感染サイクルを成し遂げている。

感染宿主が示す異常行動は、バキュロウイルスの大きな特徴の一つである。バキュロウイルスに感染したチョウ目昆虫の幼虫は、感染末期に徘徊行動が異常に活性化されて活発に歩き回り (enhanced locomotory activity; ELA)、最終的に植物の枝葉の先端へと登って致死する (climbing behavior; CB)。これらの異常行動により感染幼虫が捕食される確率が高まることや、徘徊行動中に包埋体を大量に含んだ体液を撒き散らすことから、異常行動はバキュロウイルスによる利己的な行動制御であると考えられてきた。これまでに、異常行動には一部のウイルス遺伝子が関与することが報告されているが、バキュロウイルスによる宿主行動制御の詳細なメカニズムはこれまでよく分かっていなかった。

本研究では、バキュロウイルスの一種であるカイコ核多角体病ウイルス (*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus; BmNPV) の遺伝子変異株とその宿主昆虫で

あるカイコおよびクワコを用いることで、ELA や CB の惹起に関わるウイルス側および宿主側の遺伝子を探索し、行動制御メカニズムの全容解明を目指した。

1. BmNPV の新規徘徊行動関連遺伝子の探索および機能解析

バキュロウイルスの行動制御に関与するウイルスの遺伝子として、これまで *protein tyrosine phosphatase (ptp)*、*ecdysteroid UDP-glucosyltransferase (egt)*、*bv/odv-e26* といった遺伝子が報告されている。しかしながら、これらの遺伝子による行動制御は必ずしもバキュロウイルス全体に共通のメカニズムではないことも明らかになりつつある。私は、当研究室で保有する BmNPV の変異株を用いて行動解析を行うことで、ELA に関与する未知のウイルス遺伝子を探索し、各遺伝子の機能と行動制御との関係を調査した。

私は修士課程在籍時に、ELA が消失する変異株 Bmpolh-proD を見出している。今回、Bmpolh-proD のトランスクリプトームデータを活用して Bmpolh-proD ゲノム中に存在する変異を網羅的に調査した結果、Bmpolh-proD では *actin rearrangement inducing factor-1* 遺伝子 (*arif-1*) に 1 塩基欠失によるフレームシフト変異が生じていることが明らかになった。そこで、新たに種々の *arif-1* 変異ウイルスを作製し、それらの性状解析を行ったところ、*arif-1* 変異ウイルスでは幼虫感染において多角体（包埋体）や BV の産生量が減少し、致死時間も遅延していた。また、*arif-1* 変異ウイルスでは脂肪体・気管・食道下神経節・脳においてウイルス増殖の遅延が見られたことから、*arif-1* はウイルスの全身感染効率を向上させる遺伝子であることが明らかになった。培養細胞における感染実験から、ARIF-1 は感染細胞の接着力を緩め、細胞間の間隙を広くすることで組織内の BV の浸透効率を高めていることが示唆された。一方、構造予測によると、ARIF-1 タンパク質は N 末端側に 4 つの膜貫通ドメインが存在する膜タンパク質である。GFP 融合 ARIF-1 タンパク質を発現するウイルスを用い

た細胞内局在解析の結果、ARIF-1 は感染後期に発現する後期遺伝子で、細胞膜あるいはオルガネラに局在し、C 末端側が切断されて細胞質中に放出されることが示唆された。また、培養細胞において、BmNPV の *arif-1* は感染初期の F-actin の局在変化 (actin rearrangement) の誘導に必要なことが判明した。これらの結果から、BmNPV と *Autographa californica* NPV (AcMNPV) の ARIF-1 は異なる機能を持つことが推測された。

遺伝子欠損変異株を用いたスクリーニングの結果、*Bm5* および *Bm96* が ELA に影響する新規遺伝子であることが明らかになった。*Bm5* は C 末端側に DUF3627 モチーフを持つ機能未知のタンパク質をコードする。*Bm5* 欠損ウイルス感染幼虫では多角体や BV の産生量が低下し、ELA や致死時間も遅延していた。また、培養細胞において、*Bm5* 欠損ウイルスではウイルスゲノムの複製量が有意に低下し、感染後期において多角体形成や宿主の分解に関わるウイルス遺伝子発現が顕著に低下することが明らかになった。一方、DUF3627 モチーフのみを欠損したウイルスでは、多角体産生量や感染後期のウイルス遺伝子発現の低下、および致死の遅延のみが観察された。ウエスタンブロットティングにより、感染幼虫の体液中のタンパク質分解酵素量が顕著に減少していることが判明した。これらの結果から、*Bm5* はウイルスゲノムの複製と感染後期のウイルス遺伝子発現を増加させることで、ウイルス増殖や宿主幼虫の分解を促進すると推測される。また、DUF3627 モチーフはこのうちウイルス遺伝子発現制御のみに関与することが明らかになった。BM5 の細胞内局在を共焦点顕微鏡により解析したところ、BM5 は核内の核膜近傍に局在する様子が観察された。一方、DUF3627 モチーフを欠損した BM5 では核膜近傍への局在が消失することから、DUF3627 モチーフが BM5 の核膜近傍への局在に必要であり、そのことが一部の後期遺伝子の発現に重要な役割を果たしていると推測される。もう一つの ELA 関連遺伝子である *Bm96* についても変異ウイルスを作製して性状解析を行

ったところ、*Bm96* 変異ウイルスでは野生株に比べカイコ幼虫におけるウイルス増殖が有意に増加しているにも関わらず、致死時間は野生株と同等であり、ELA は低下していることが分かった。

2. クワコを用いた鉛直方向の徘徊行動の解析

カイコは家畜化により腹脚の握力が弱く、CB を解析するのが困難である。そこで、カイコの祖先種であるクワコを用いて感染実験を行なうことで CB を解析した。まず、クワコを本来の宿主とするクワコ NPV (*B. mandarina* NPV; BomaNPV) と BmNPV をカイコおよびクワコ幼虫に感染させ、ウイルス増殖や異常行動を比較した。その結果、注射感染ではカイコとクワコ両方において、BomaNPV は BmNPV よりも強い病原性を示すことが明らかになった。また、行動観察の結果、BmNPV と BomaNPV はカイコとクワコのいずれにおいても異常行動を惹起できることが判明した。クワコへの感染において、最初に ELA が惹起され、その約 12 時間後から CB が観察されたことから、ELA と CB は異なる制御メカニズムで惹起されることが示唆された。

次に、BmNPV の行動関連遺伝子欠損株を用いて、感染クワコにおける ELA と CB を同時に調査した。*egt* 欠損 BmNPV 感染幼虫では、ELA と CB の両方に影響は見られなかったことから、*egt* はカイコやクワコにおいては行動制御に関与しないことが明らかになった。一方、*arif-1* および *ptp* 欠損 BmNPV に感染したクワコ幼虫では、カイコの場合と同様にウイルス増殖が遅延していた。しかしながら、カイコではこれらのウイルス感染幼虫の ELA が消失するのに対し、クワコ幼虫では ELA や CB は消失せず、遅延するに留まった。

バキュロウイルスが宿主の異常行動をどうやって惹起しているのか、そのメカニズムはこれまでよく分かっていなかった。マイマイガ NPV を用いた研究か

ら、有力な仮説として *egt* による脱皮ホルモンレベルの制御が提唱されていたが、BmNPV や AcMNPV では *egt* は行動制御に関与しないことが明らかになり、バキュロウイルスに共通した行動制御メカニズムは不明であった。本研究の結果と先行研究の知見を合わせることで、私はバキュロウイルスによる行動制御メカニズムの新たな仮説を提唱する。すなわち、バキュロウイルスは昆虫の行動制御中枢である脳へと感染することにより、感染幼虫の歩行の活性化や負の重力走性を惹起しているというものである。このような行動制御を成し遂げるためには、脳の行動中枢まで感染が進行する感染速度と、致死時間とのバランスが重要となる。この仮説に基づくと、これまでに判明した BmNPV の行動関連遺伝子は、①ウイルス増殖遅延により脳で十分に増殖できず ELA が低下する (*ptp* 欠損、*arif-1* 欠損)、②ウイルス増殖は遅延するが致死も遅延するため ELA が遅延する (*Bm5* 欠損)、③ウイルス増殖は正常で致死が遅延するため ELA が正常に惹起された後に持続する (*Bm5* DUF3627 モチーフ欠損)、④早期致死のため ELA が惹起される前に致死する (*bv/odv-e26*)、の 4 パターンに分類することができる。さらに、クワコ感染で ELA よりも CB が遅れて惹起されたことから、脳の行動中枢において行動活性と重力走性は別の部位が担っており、部位間の感染時期の差が ELA と CB の惹起タイミングの差となって現れているのだと推測される。

以上を要するに、本研究により、バキュロウイルスの行動制御における脳への感染の重要性が明らかになった。これは今後の行動操作研究の新たな方向性を示す結果である。既に、ウイルス感染脳のトランスクリプトーム解析が進行中であり、今後更なる解析により脳での行動操作実行因子の解明が期待される。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、指導教員の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 勝間進准教授には語りつくすことの出来ないほどのご指導を賜りました。研究面でのご指導はもちろんのこと、社会生活面で乱れがちな私を辛抱強く更生して下さいました。まだまだ未熟者ですが、勝間准教授のお陰で今後の人生をより良いものとするきっかけが掴めたと思います。5年間のご指導に、この場を借りて心より感謝を申し上げます。

嶋田透教授には研究室に参加して以来、何不自由のない研究環境を整えて頂き、研究に関しての客観的かつ適切なお指導を賜りました。木内隆史助教には、日々のディスカッションから研究内容や進路についての貴重なアドバイスを賜り、大変参考になりました。深く感謝申し上げます。

東京大学新領域創成科学研究科 鈴木穰教授、菅野純夫教授には、ウイルス感染脳のトランスクリプトーム配列決定を行っていただきました。トランスクリプトームデータを活用することにより、組換えウイルスゲノム中の重要な変異を特定するなど、重要な知見を得ることが出来ました。多大なるご協力に感謝申し上げます。

東京大学先端科学技術センター 神崎亮平教授、ハワードヒューズ医学研究所 ジャネリアファーム 並木重宏博士、東京工業大学大学院理工学研究科 峯岸諒博士には、神経活動の電気生理学的解析装置の立ち上げについて多大なるご指導とご助力を賜りました。私の力不足により発表に足るような実験結果が得られる段階まで至らず、大変申し訳ありませんでした。この場を借りて、感謝と謝罪を申し上げます。

また、昆虫遺伝研究室 学術支援専門職員の川本宗孝氏には、トランスクリプトームデータの処理や解析について、あるいは実験装置の組立てなど、

様々な面で多大なるご助力を賜りました。昆虫遺伝研究室 博士課程の石原玄基氏には、同じウイルスを研究テーマとする仲間として、実験方法や研究方針について日々ディスカッションを通して多くの助言や刺激を頂きました。昆虫遺伝研究室 博士課程の庄司佳祐氏には、トランスクリプトームデータの解析手法やその他研究全般において、多くの助言や刺激を頂きました。深く感謝申し上げます。

また、この5年のあいだ研究室生活を共にした昆虫遺伝研究室の皆様、研究室は違えど共に長い大学院生活を過ごし、励ましあった博士課程同期の皆様、そして学生時代絶えず暖かく見守って下さった家族に感謝致します。

引用文献

Andersen, S. B., Gerritsma, S., Yusah, K. M., Mayntz, D., Hywel-Jones, N. L., Billen, J., Boomsma, J. J. & Hughes, D. P. (2009). The life of a dead ant: the expression of an adaptive extended phenotype. *Am Nat* **174**, 424-433.

Bender, J. A., Pollack, A. J. & Ritzmann, R. E. (2010). Neural activity in the central complex of the insect brain is linked to locomotor changes. *Curr Biol* **20**, 921-926.

Chen, Y.-R., Zhong, S., Fei, Z., Hashimoto, Y., Xiang, J. Z., Zhang, S. & Blissard, G. W. (2013). The transcriptome of the baculovirus *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus in *Trichoplusia ni* cells. *J Virol* **87**, 6391-6405.

Daimon, T., Katsuma, S. & Shimada, T. (2007). Mutational analysis of active site residues of chitinase from *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Virus Res* **124**, 168-175.

Daimon, T., Fujii, T., Fujii, T., Yokoyama, T., Katsuma, S., Shinoda, T., Shimada, T. & Ishikawa, Y. (2012). Reinvestigation of the sex pheromone of the wild silkmoth *Bombyx mandarina*: the effects of bombykal and bombykyl acetate. *J Chem Ecol* **38**, 1031-1035.

Dawkins, R. (1982). *The extended phenotype: the long reach of the gene.* (Simonyi,

C., ed.), Oxford University Press, Oxford.

Dreschers, S., Roncarati, R. & Knebel-Mörsdorf, D. (2001). Actin rearrangement-inducing factor of baculoviruses is tyrosine phosphorylated and colocalizes to F-actin at the plasma membrane. *J Virol* **75**, 3771-3778.

Evans, H. C. & Samson, R. A. (1984). *Cordyceps* species and their anamorphs pathogenic on ants (Formicidae) in tropical forest ecosystems. II. The *Camponotus* (Formicidae) complex. *Trans Br Mycol Soci* **82**, 127-150.

Gomi, S., Kamita, S. G. & Maeda S. (1999). Deletion analysis of all genes of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV). *RIKEN Review* **22**, 39-41.

Goulson, D. (1997). *Wipfelkrankheit*: manipulation of host behavior by a baculovirus. *Oecologia* **109**, 219-228.

Hawtin, R. E., Zarkowska, T., Arnold, K., Thomas, C. J., Goodway, G. W., King, L. A., Kuzio, J. A. & Possee, R. D. (1997). Liquefaction of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected insects is dependent on the integrity of virus-encoded *chitinase* and *cathepsin* genes. *Virology* **238**, 243-253.

Hofmann, O. (1891). Die Schlauffsucht (Flacherie) der Nonne (*Liparis monacha*) nebst einem Anhang. Insektentötende Pilze mit besonderer Berücksichtigung der Nonne. P. Weber, Frankfurt.

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

Hori, T., Kiuchi, T., Shimada, T., Nagata, M. & Katsuma, S. (2013). Silkworm plasmatocytes are more resistant than other hemocyte morphotypes to *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus infection. *J Invertebr Pathol* **112**, 102-104.

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

Isoe, R., Kojima, K., Matsuyama, T., Quan, G.-X., Kanda, T., Tamura, T., Sahara, K., Asano, S.-I. & Bando, H. (2004). Use of RNAi technology to confer enhanced resistance to BmNPV on transgenic silkworms. *Arch Virol* **149**, 1931-1940.

Jehle, J. A., Blissard, G. W., Bonning, B. C., Cory, J. S., Herniou, E. A., Rohrmann, G. F., Theilmann, D. A., Thiem, S. M. & Vlak, J. M. (2006). On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision. *Arch Virol* **151**, 1257-1266.

Kamita, S. G., Nagasaka, K., Chua, J. W., Shimada, T., Mita, K., Kobayashi, M., Maeda, S. & Hammock, B. D. (2005). 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.

Kang, W., Tristem, M., Maeda, S., Crook, N. E. & O'Reilly, D. R. (1998).

Identification and characterization of the *Cydia pomonella* granulovirus *cathepsin* and *chitinase* genes. *J Gen Virol* **79**, 2283-2292.

Kang, W., Suzuki, M., Zemskov, E., Okano, K. & Maeda, S. (1999). Characterization of baculovirus repeated open reading frames (bro) in *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *J Virol* **73**, 10339-10345.

Katsuma, S., Noguchi, Y., Shimada, T., Nagata, M., Kobayashi, M. & Maeda, S. (1999). Molecular characterization of baculovirus *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus polyhedron mutants. *Arch Virol* **144**, 1275-1285.

Katsuma, S., Kawaoka, S., Mita, K. & Shimada, T. (2008). Genome-wide survey for baculoviral host homologs using the *Bombyx* genome sequence. *Insect Biochem Mol Biol* **38**, 1080-1086.

Katsuma, S. & Shimada, T. (2009). *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus ORF34 is required for efficient transcription of late and very late genes. *Virology* **392**, 230–237.

Katsuma, S., Nakanishi, T., Daimon, T. & Shimada, T. (2009). N-linked glycans located in the pro-region of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus V-CATH are essential for the proper folding of V-CATH and V-CHIA. *J Gen Virol* **90**, 170-176.

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

Katsuma, S., Koyano, Y., Kang, W. K., Kokusho, R., Kamita, S. G. & Shimada, T. (2012b). The baculovirus uses a captured host phosphatase to induce enhanced locomotory activity in host caterpillars. *PLoS Pathog* **8**, e1002644.

Kawaoka, S., Hara, K., Shoji, K., Kobayashi, M., Shimada, T., Sugano, S., Tomari, Y., Suzuki, Y. & Katsuma, S. (2013). The comprehensive epigenome map of piRNA clusters. *Nucleic Acids Res* **41**, 1581-1590.

Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M. & Salzberg, S. L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* **10**, R25.

Libersat, F., Delago, A. & Gal, R. (2009). Manipulation of host behavior by parasitic insects and insect parasites. *Ann Rev Entomol* **54**, 189-207.

Maeda, S. (1984). A plaque assay and cloning of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *J Seric Sci Japan* **53**, 547-548.

Maeda, S., Kawai, T., Obinata, M., Fujiwara, H., Horiuchi, T., Saeki, Y., Sato, Y. & Furusawa, M. (1985). Production of human α -interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nature* **315**, 592-594.

Milne, I., Stephen, G., Bayer, M., Cock, P. J., Pritchard, L., Cardle, L., Shaw, P. D. & Marshall, D. (2013). Using Tablet for visual exploration of second-generation

sequencing data. *Brief Bioinform* **14**, 193-202.

Nakanishi, T., Goto, C., Kobayashi, M., Kang, W. K., Suzuki, T., Dohmae, N., Matsumoto, S., Shimada, T. & Katsuma, S. (2010). Comparative studies of lepidopteran baculovirus-specific protein FP25K: development of a novel *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus-based vector with a modified *fp25K* gene. *J Virol* **84**, 5191-5200.

Okano, K., Mikhailov V. S. & Maeda S. (1999). Colocalization of baculovirus IE-1 and two DNA-binding proteins, DBP and LEF-3, to viral replication factories. *J Virol* **73**, 110-119.

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

O'Reilly, D. R., Brown, M. R. & Miller, L. K. (1992). Alteration of ecdysteroid metabolism due to baculovirus infection of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: Host ecdysteroids are conjugated with galactose. *Insect Biochem Mol Biol* **22**, 313-320.

Rankin, C., Ooi, B. G. & Miller, L. K. (1988). Eight base pairs encompassing the transcriptional start point are the major determinant of baculovirus *polyhedrin* gene expression. *Gene* **70**, 39-49.

Rohrman, G. F. (2013). *Baculovirus Molecular Biology*, 3rd edn. Bethesda, MD: National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK114593/>.

Roncarati, R. & Knebel-Mörsdorf, D. (1997). Identification of the early actin-rearrangement-inducing factor gene, *arif-1*, from *Autographa californica* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. *J Virol* **71**, 7933-7941.

Ros, V. I. D., van Houte, S., Hemerik, L. & van Oers, M. M. (2014). Baculovirus-induced tree-top disease: how extended is the role of *egt* as a gene for the extended phenotype? *Mol Ecol* Epub ahead of print.

Schoofs, A., Hückesfeld, S., Schlegel, P., Miroshnikow, A., Peters, M., Zeymer, M., Spieß, R., Chiang, A.-S. & Pankratz, M. J. (2014). Selection of motor programs for suppressing food intake and inducing locomotion in the *Drosophila* brain. *PLoS Biol* **12**, e1001893.

Sheng, Z. & Charbonneau, H. (1993). The baculovirus *Autographa californica* encodes a protein tyrosine phosphatase. *J Biol Chem* **5**, 4728-4733.

嶋田透, せん益彰, 野口洋子, 永田昌男, 小林正彦. (1994). カイコ核多角体病ウイルスの多角体非形成変異株におけるポリヘドリン遺伝子の構造と機能の異常. *日蚕雑* **63**, 353-360.

Slack, J., M., Kuzio, J. & Faulkner, P. (1995). Characterization of v-cath, a

cathepsin L-like proteinase expressed by the baculovirus *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus. *J Gen Virol* **76**, 1091-1098.

Subbaiah, E. V., Royer, C., Kanginakudru, S., Satyavathi, V. V., Babu, A. S., Sivaprasad, V., Chavancy, G., DaRocha, M., Jalabert, A., Mauchamp, B., Basha, I., Couble, P. & Nagaraju, J. (2013). Engineering silkworms for resistance to baculovirus through multigene RNA interference. *Genetics* **193**, 63-75.

Summers, M. D. & Anderson, D. L. (1972). Granulosis virus deoxyribonucleic acid: a closed, double-stranded molecule. *J Virol* **9**, 710–713.

Summers, M. D. & Anderson, D. L. (1973). Characterization of nuclear polyhedrosis virus DNAs. *J Virol* **12**, 1336–1346.

Takagi, T., Taylor, G. S., Kusakabe, T., Charbonneau, H. & Buratowski, S. (1998). A protein tyrosine phosphatase-like protein from baculovirus has RNA 5'-triphosphatase and diphosphatase activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9808-9812.

Thomas, F., Schmidt-Rhaesa, A., Martin, G., Manu, C., Durand, P. & Renaud, F. (2002). Do hairworms (Nematomorpha) manipulate the water seeking behaviour of their terrestrial hosts? *J Evol Biol* **15**, 356-361.

Thomas, F., Poulin, R. & Brodeur, J. (2010). Host manipulation by parasites: a multidimensional phenomenon. *Oikos* **119**, 1217-1223.

van Houte, S., Ros, V. I. D., Mastebroek, T. G., Vendrig, N. J., Hoover, K., Spitzen, J. & van Oers, M. M. (2012). Protein tyrosine phosphatase-induced hyperactivity is a conserved strategy of a subset of baculoviruses to manipulate lepidopteran host behavior. *PLoS ONE* **7**, e46933.

van Houte, S., Ros, V. I. D. & van Oers, M. M. (2013). Walking with insects: molecular mechanisms behind parasitic manipulation of host behaviour. *Mol Ecol* **22**, 3458-3475.

van Houte, S., Ros, V. I. D. & van Oers, M. M. (2014). Hyperactivity and tree-top disease induced by the baculovirus AcMNPV in *Spodoptera exigua* larvae are governed by independent mechanisms. *Naturwissenschaften* **101**, 347-350.

Xu, Y.-P., Ye, Z.-P., Niu, C.-Y., Bao, Y.-Y., Wang, W.-B., Shen, W.-D. & Zhang, C.-X. (2010). Comparative analysis of the genomes of *Bombyx mandarina* and *Bombyx mori* nucleopolyhedroviruses. *J Microbiol* **48**, 102-110.

Zhou, Y., Chen, K., Yao, Q., Shen, H., Liang, G., Li, X., Wang, N. & Li, Y. (2010). Characterization of a late expression gene of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Z Naturforsch C* **65**, 508-518.