

論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻
平成 24 年度博士課程進学
氏名 國生龍平
指導教員名 勝間進

論文題目

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

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 *Bm*NPV 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 *Bm*NPV 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、*Bm*NPV 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、*Bm*NPV 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事ができる。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。