

審査の結果の要旨

氏名 國生 龍平

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ものである。

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、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。國生氏は、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、新規 ELA 関連遺伝子として、*actin rearrangement inducing factor-1* 遺伝子 (*arif-1*) を見いだした。*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、さらなる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。

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、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。

以上要するに、本研究では、バキュロウイルスが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ことを明らかにした。また、バキュロウイルスが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であるという新しい仮説を提唱した。このように、本論文は学術上、応用上、重要な知見を明らかにしているため、審査委員一同は、博士(農学)の学位論文として価値があるものと認めた。