

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

主論文の要旨

論文題目 核多角体病ウイルス感染カイコ細胞が誘導する
RNA 分解の分子機構解析
氏名 浜島 りな

論文内容の要旨

核多角体病ウイルス (nucleopolyhedrovirus, NPV) は、バキュロウイルス科に属する昆虫病原性の DNA ウイルスであり、近年は、バキュロウイルス発現システムやウイルス農薬などとして、様々な分野で利用されている。NPV は、ウイルスが分離された昆虫種とわずかな近縁種においてのみ増殖する。このように、NPV の宿主は厳密に限られており、宿主特異性が高いウイルスであるが、宿主特異性を決定する分子機構は未だ明らかにされていない。今後、NPV をより安全に利用していくためにも、NPV の宿主特異性決定機構の解明は重要な課題である。

NPV の宿主特異性決定機構の解明を目指して、本研究ではカイコ由来細胞（カイコ細胞）に着目した。カイコ細胞において、カイコ NPV (BmNPV) は増殖感染するが、*Autographa californica* MNPV (AcMNPV) など多くの NPV は増殖できず不全感染となる。これまでに、NPV が不全感染となった細胞において、細胞のリボソーム RNA (rRNA) の急速な分解が誘導されることが示された。一方、BmNPV を感染させた場合は、rRNA 分解は認められなかった。これらのことから、カイコ細胞において、細胞の rRNA 分解誘導の有無が、NPV 増殖の可否、すなわち宿主特異性決定の主要因であると考えられた。そこで、カイコ細胞における NPV の宿主特異性決定機構を明らかにすることを目的として、NPV 感染カイコ細胞が誘導する rRNA 分解の分子機構の解析を行った。

1. NPV 感染昆虫細胞が誘導する rRNA 分解の進化的保存性

非許容性 NPV 感染に伴う rRNA 分解は他のチョウ目昆虫由来細胞（ヨトウガ、マイマイガ、シロイチモジヨトウ、クワゴマダラヒトリ）やショウジョウバエ由来細胞において認められないことから、カイコ細胞に特異的な抗ウイルス応答であると考えられた。そこで、まず、非許容性 NPV 感染に伴う rRNA 分解の誘導がカイコ細胞で

一般的に誘導される応答であるかどうかを明らかにするために、様々なカイコ由来細胞株を用いて調査を行った。その結果、rRNA 分解の誘導は、カイコ細胞で広く保存された抗ウイルス応答であることが明らかとなった。次に、NPV 感染昆虫細胞が誘導する rRNA 分解の進化的保存性を明らかにするために、カイコの祖先種と考えられるカイコガ科のクワコ由来細胞（クワコ細胞）、カイコに比較的近縁なヤマモユガ科のサクサン由来細胞（サクサン細胞）を用いて、NPV 感染に伴う rRNA 分解誘導の有無について調査した。その結果、クワコ細胞は NPV 感染に伴って rRNA 分解を誘導することが明らかとなった。一方、サクサン細胞においては、rRNA 分解は認められなかった。サクサン細胞は、AcMNPV の感染を許容するという点でカイコ細胞やクワコ細胞と異なっていることから、rRNA 分解による抗ウイルス応答を保持していない可能性が示された。これらの結果から、非許容性 NPV 感染に伴う rRNA 分解誘導は、カイコガ科昆虫に特異的な抗ウイルス応答であることが示唆された。

2. NPV 感染カイコ細胞の rRNA 分解誘導に関与する NPV-P143 の機能解析

本研究室の先行研究において、NPV ゲノムのコスミド・ライブラリーを用いた rRNA 分解誘導に関与する NPV 因子の探索が行われ、NPV の P143 (NPV-P143) が候補因子となった。そこで、NPV-P143 の rRNA 分解誘導への関与を明らかにすることを目的として、NPV-P143 の機能解析を行った。はじめに、AcMNPV 感染カイコ細胞において、AcMNPV の *p143* 遺伝子 (*ac-p143*) のノックダウン解析を行った。その結果、*ac-p143* をノックダウンしたカイコ細胞では、AcMNPV 感染に伴う rRNA 分解が誘導されなかった。このことから、*ac-p143* がカイコ細胞における rRNA 分解誘導のトリガーとなることが示された。次に、NPV-P143 の一過性発現解析を行った。その結果、4 種の非許容性 NPV-P143 を一過性発現させたカイコ細胞は、いずれも rRNA 分解とアポトーシスを誘導することが明らかとなり、非許容性 NPV-P143 が rRNA 分解誘導に関与すること、rRNA 分解に伴ってアポトーシスが誘導されることが示された。一方、BmNPV の P143 (Bm-P143) を一過性発現させたカイコ細胞は、rRNA 分解もアポトーシスも誘導しなかった。これらの結果から、カイコ細胞は、何らかの機構を用いて非許容性 NPV-P143 を認識することで rRNA 分解とアポトーシスを誘導し、NPV 感染を防いでいることが示唆された。

3. Ac-P143 の rRNA 分解誘導と NPV 増殖の制限に関与するアミノ酸残基の決定

P143 は、DNA ヘリケースドメインを持つウイルス DNA 複製に必須の因子である。また、AcMNPV の P143 (Ac-P143) の一部の領域 (ScH 領域) を Bm-P143 のものと組換えた AcMNPV はカイコ細胞で増殖感染することから、Ac-P143 は、AcMNPV のカイコ細胞における NPV 増殖の可否に関与することが示唆されている。そこで、rRNA 分解誘導と NPV 増殖の可否の関係を明らかにするために、rRNA 分解誘導に関わる Ac-P143 のアミノ酸残基の決定を行った。まず、高温で P143 の DNA ヘリケース活性が阻害される AcMNPV 変異体 *ts8* を用いて、P143 の DNA ヘリケース活性と rRNA

分解誘導の関係を調査した。その結果、P143のDNAヘリケース活性はrRNA分解誘導には関連しないことが示された。次に、ScH領域をBm-P143のものと組換えたAc-P143変異体を用いて、ScH領域とrRNA分解誘導の関係を調査した。その結果、Ac-P143変異体を一過性発現させたカイコ細胞は、rRNA分解を誘導しないことが明らかとなり、ScH領域がrRNA分解誘導に関与することが示された。Ac-P143とBm-P143は、アミノ酸レベルで96%という高い相同性を示し、ScH領域においては14アミノ酸残基のみが異なっている。これらのことから、Ac-P143の14アミノ酸残基がrRNA分解誘導に関わると予想された。そこで、アミノ酸残基をBm-P143のものと組換えたAc-P143変異体シリーズを作製し、rRNA分解誘導に関わるアミノ酸残基の決定を試みた。その結果、ScH領域内の6から8アミノ酸残基がrRNA分解誘導に関与することが明らかとなった。また、Ac-P143変異体がNPV増殖に与える影響についても調査した結果、rRNA分解誘導に関わるアミノ酸残基がNPV増殖の制限にも関わることが示された。さらに、NPV-P143においてScH領域のアミノ酸配列を比較したところ、これらのアミノ酸は非許容性NPV-P143において高く保存されている一方、Bm-P143における保存性は低いことが明らかとなった。以上の結果から、rRNA分解誘導は、カイコ細胞におけるNPV増殖制限の要因であり、宿主特異性決定に関わる抗ウイルス応答であることが示唆された。

4. NPV感染カイコ細胞におけるトランスクリプトーム解析

1から3の結果から、rRNA分解の誘導は、カイコ細胞が特異的に保持する抗ウイルス応答であることが示唆された。そこで、rRNA分解誘導のシグナル伝達機構の解明を目的として、NPV感染カイコ細胞のRNA-seq法によるトランスクリプトーム解析を行った。カイコ細胞にBmNPVまたはAcMNPVをMOI 10で感染させ、感染後2、4、8時間でtotal RNAを回収してサンプルとし、実験に用いた。NPV感染に伴う細胞遺伝子の発現レベルの変動を調査した結果、感染後8時間のAcMNPV感染細胞において、730遺伝子の発現レベルが減少していることが明らかとなった。この遺伝子群には、リボソームに関連する39遺伝子、アポトーシス阻害遺伝子である*cBm-iap1*が含まれていた。Real-time qRT-PCRにより、リボソームタンパク質遺伝子と*cBm-iap1*の発現変動を確認したところ、感染に伴い遺伝子発現のレベルが減少することが確認され、感染後24時間では著しく減少していることが明らかとなった。以上の結果から、特定の遺伝子の発現レベルの減少が、NPV感染カイコ細胞におけるrRNA分解やアポトーシスの誘導の要因の一つである可能性が示された。