

主論文の要約

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

名古屋大学大学院生命農学研究科
生物機構・機能科学専攻
生物機能分化学講座
資源昆虫学研究分野
浜島 りな

第 1 章 緒論

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。

第 2 章 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。

第 3 章 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。また、rRNA 分解とアポトーシス誘導の関連を明らかにするために、アポトーシス誘導経路の下流で働くカスパーゼの阻害剤を用いた調査を行った。その結果、rRNA 分解はアポトーシスよりも上流または独立した機構であることが示唆された。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。

第 4 章 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 においての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。

第 5 章 NPV 感染カイコ細胞におけるトランスクリプトーム解析

第 2 章から第 4 章の結果より、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。

第 6 章 総合考察

本研究では、非許容性 NPV 感染カイコ細胞において観察される rRNA 分解の誘導

をカイコ細胞に特異的な抗ウイルス応答と考慮して解析を行い、カイコ細胞における NPV の宿主特異性決定機構の解明を進めた。本研究により、1) rRNA 分解による抗ウイルス応答はカイコガ科昆虫に特異的であること、2) カイコ細胞は NPV-P143 を認識することにより、rRNA 分解を誘導すること、3) カイコ細胞における NPV 増殖の可否には rRNA 分解による抗ウイルス応答が関与すること、4) カイコ細胞は、AcMNPV 感染に伴い、特定の遺伝子の発現レベルを減少させることが明らかとなり、カイコ細胞は、非許容性 NPV-P143 を認識して rRNA 分解を誘導するという抗ウイルス応答を発動することによって、NPV 増殖を阻止することが示唆された。また、BmNPV は P143 を独自に進化させることで rRNA 分解による抗ウイルス応答を回避し、カイコ細胞における増殖を可能にしたことが示唆された。以上より、カイコ細胞における NPV の宿主特異性決定には、rRNA 分解による抗ウイルス応答の発動と回避が大きな要因となる可能性が示された。