

学 位 論 文 要 旨

カイコ核多角体病ウイルスラオス株の性状解析と全ゲノム配列の決定、
及び比較トランスクリプトーム解析

Characterization, whole-genome sequencing, and comparative transcriptome
analysis of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus variant isolated in Laos

生物生産科学専攻 生物制御科学大講座
藤本 正太

バキュロウイルスは、バキュロウイルス科に属するウイルスの総称であり、二本鎖環状 DNA をゲノムとして有し主に昆虫を宿主とするウイルスである。バキュロウイルスのゲノムサイズは約 80~180 kbp であり、90~180 個の遺伝子をコードする。また、バキュロウイルスは、感染末期に自身のウイルス粒子を包埋する結晶構造である包埋体を大量に形成する。バキュロウイルスの一つである核多角体病ウイルス (NPV) が形成する包埋体は主にポリヘドリンと呼ばれる単一のタンパク質から構成されており、強力なポリヘドリンプロモーターを利用したバキュロウイルス発現系 (BEVS) は、バイオテクノロジーの基盤技術として世界中で利用されている。特に、カイコに特異的に感染するカイコ核多角体病ウイルス (BmNPV) は、培養細胞だけでなく家畜化昆虫であるカイコを宿主として利用できるため、多くの獣医薬や実験用タンパク質の生産に利用されている。しかしながら、BmNPV では主として標準株 T3 の解析や利用が進められており、その他のウイルス株の研究例は著しく少ない。そこで本研究では、ラオス由来の BmNPV 株である La について、標準株 T3 との比較性状解析を行い、その表現型を調査した。更に、RNA-seq による La 全ゲノム配列の決定と、比較トランスクリプトーム解析を行った。また、La を用いた BEVS ベクターを構築した。

第一章では、ラオス由来の BmNPV 株である La と標準株 T3 について、幼虫個体、及び培養細胞を用いた比較性状解析を行った。その結果、La は T3 と比べて高い病原性を有し、宿主昆虫、及び培養細胞を激しく損傷することが明らかとなった。また、ウイルス接種後 96 時間における La のポリヘドリンの発現

量は T3 の 1.75 倍、転写量は約 3 倍に達することが明らかとなった。一方、La のポリヘドリンプロモーターの配列は T3 と完全に一致しており、La のポリヘドリンの高い転写能はプロモーター配列に依存していないことが示唆された。更に、多角体の電子顕微鏡観察の結果、La は T3 と比べて多数のマルチプルヌクレオキャプシド型 ODV を形成することが明らかとなった。

第二章では、La の表現型がどのような因子に由来するのかを明らかにするために、RNA-seq による La 全ゲノム配列の決定、及び T3 との比較トランスクリプトーム解析を行った。その結果、La の全ゲノム配列は、143 個の遺伝子をコードする 127,618 bp であることが明らかとなった。他の BmNPV 株、及びカイコの祖先種であるクワコに感染するクワコ核多角体病ウイルス (BoMaNPV) 株との系統解析の結果、La は T3 と最も高い相同性を有したが、La のゲノムはバキュロウイルス特異的な遺伝子である *bro* 遺伝子の内 *bro-b* 遺伝子を欠いており、また、La と T3 の遺伝子配列には多数の違いが存在していた。La と T3 の間で違いが存在した遺伝子には、ウイルス粒子の構造タンパク質や転写因子の遺伝子も含まれており、La の有する特異的な表現型との関与が示唆された。また、感染後期のトランスクリプトームを比較した結果、ウイルス感染細胞の崩壊や個体の液状化の原因遺伝子である *v-cath* 遺伝子の発現量が T3 感染細胞よりも La 感染細胞で多いことが明らかとなり、これが La の有する高い病原性の原因であると考えられた。また、La と T3 のゲノム間には、それぞれのウイルス感染細胞で転写されやすい、または転写されにくい 5 つのクラスターが存在することが示唆された。更に、La 感染細胞では宿主のリボソームタンパク質遺伝子の RNA 量が T3 感染細胞よりも有意に少ないことが明らかとなり、宿主細胞による抗ウイルス応答やウイルスによる宿主制御である可能性が考えられた。

第三章では、La が T3 よりも多くのポリヘドリンを転写、発現することを利用して、La を用いた BEVS 発現ベクターを構築した。La、または T3 を用いてホタルルシフェラーゼ (*Luc*) を発現させた結果、幼虫個体と培養細胞のどちらにおいても La は T3 よりも 3~5 倍の LUC を発現した。一方で、*LacZ* の発現量を比較した結果、La の *LacZ* 発現量は T3 と同程度かそれよりも少ない結果となった。この原因として、*Luc* と *LacZ* の組換えに用いた T3 の由来が異なることや外来遺伝子の種類による影響が考えられた。第三章では更に、La を用いた組換えウイルスの作製を簡便化するための La の線状化ゲノムウイルス (La_L)、そして組換えタンパク質の分解を抑制するための *v-cath* 遺伝子欠損株 (La_L_CPD) を構築した。*Luc* を発現させた結果、La_L_CPD は *v-cath* を有する組換えウイルスに比べてウイルス接種後 96 時間で約 1.5 倍の LUC 活性を有することが明らかとなり、*v-cath* 遺伝子欠損の優位性が示された。

本研究は、ラオス由来 BmNPV 株である La に関して、比較性状解析、全ゲノム配列の決定、比較トランスクリプトーム解析を切り口に、その性状や特徴を明らかにした。更に、La を用いた BEVS を構築し、その優位性を示唆した。また、本研究の結果は、La のような変異株の比較性状解析と比較トランスクリプトーム解析が NPV 研究の新たなアプローチとして有効であることを示した。