

## 学位論文題名

## バキュロウイルス耐性カイコ作出に関する基盤研究

## 学位論文内容の要旨

バキュロウイルス科に属する *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) はカイコに核多角体病を引き起こす病原ウイルスである。BmNPV は古来よりカイコの飼育において最も深刻な被害をあたえるもののひとつであり、核多角体病は現在の養蚕業においても重要な問題のひとつである。

近年、Isobe *et al.* (2004) は RNA polymerase II (pol II) 系のプロモーターを利用して BmNPV の必須遺伝子である *lef-1* に対する二本鎖 RNA (dsRNA) を発現するようなトランスジェニックカイコを作出した。このトランスジェニックカイコにおいては、ウイルスの経口摂取後 96 時間においてもウイルスの増殖は顕著に抑制されたが、致死率の劇的な改善は認められなかった。さらに、Kanginakudru *et al.* (2007) によっても pol II 系のプロモーターを用いて BmNPV の必須遺伝子 *ie1* に対する dsRNA を発現するトランスジェニックカイコが作製されたが、やはり十分な BmNPV 耐性をカイコに付与することができなかった。

このように、これまでのところ実用レベルでの BmNPV 耐性カイコの作出には至っていない。耐性カイコの作出に至らなかった原因としては dsRNA の発現が組織特異的発現制御を受けてしまい dsRNA の十分な発現が確保できなかった可能性や、BmNPV が引き起こす宿主遺伝子の発現抑制 (shut off) によって、dsRNA の発現が継続しなかった可能性が挙げられる。一般的に pol II プロモーターは生体内において組織特異的制御を受けることから、このようなプロモーターを用いたトランスジェニックカイコにおいては、特定の組織においてトランスジーンが発現が不十分である場合がある。この問題を解決するため、一般に組織特異性が低いとされる RNA polymerase III (pol III) 系のプロモーターであるカイコ U6 プロモーターを利用し、small-hairpin RNA (shRNA) 発現ユニットを作製した。まず、U6 プロモーターを利用した shRNA 発現ユニット (U6-shRNA 発現ユニット) を持つプラスミドを用いてレポーター遺伝子に対する発現抑制効果を評価した結果、U6-shRNA 発現ユニットはカイコ BmN 細胞において効果的にレポーター遺伝子の発現を抑制できることが判明した。次に、この U6-shRNA 発現ユニットが BmN 細胞に BmNPV 抵抗性を付与できるのかを調査した。即ち、U6-shRNA 発現ユニットを有するプラスミドを用いて BmNPV の必須遺伝子 *ie1* を標的とした shRNA を一過的に BmN 細胞で発現させ (トランスフェクション効率は約 50%)、ウイルスの増殖抑制効果を調査した。その結果、shRNA を発現させた細胞ではウイルス感染 48 時間後における培養上清中の

ウイルス量が shRNA を発現しないコントロールの細胞と比較して約 70 %程度抑制された。これらのことから、U6-shRNA 発現ユニットがカイコの細胞において効果的に RNAi を誘導することができるツールであることが示唆された。

次に、BmNPV 感染による宿主遺伝子の shut off に関する問題の解決を試みた。バキュロウイルス感染による宿主遺伝子の shut off は転写レベルでの制御であることが考えられているが、その機構については明らかではない。しかし、興味深いことにウイルスの遺伝子発現は抑制されない。このことはウイルス自身の遺伝子発現には BmNPV 感染による shut off を回避できる機構が存在していることが考えられる。ところで、BmNPV ゲノムに散在するシスエレメントである *hr* は多様なウイルス遺伝子の発現を活性化することが知られている。そこで、*hr* が shut off を回避するのに関わっているのではないかと考え、検証実験を行った。まず、*hr5* を付加した EGFP 発現ユニットを BmN 細胞のゲノムに挿入した組換え細胞 (rBmN-A3EGFP/*hr5*<sup>2</sup>) を作製した。次に、この組換え細胞に BmNPV を感染させたところ、宿主細胞の内在性遺伝子である GAPDH 遺伝子の発現は減少したが、EGFP 遺伝子の発現は減少せず、むしろ増加した。このことから、*hr5* は宿主ゲノム上に shut off を回避できる領域を作ることができると考えられた。

そこで、BmNPV の *ie1* を標的とした shRNA を発現する U6-shRNA 発現ユニットと *hr5* を利用して組換え細胞を作製し、そのウイルス増殖抑制効果を調査した。その結果、組換え細胞においては BmNPV の増殖抑制が認められ、最も増殖抑制効果の高かった細胞 (B10) においてはコントロールの非組換え細胞と比較してウイルスの増殖が 1 %以下にまで抑制された。

最後に BmNPV 感染による shut off 機構について考察した。まず、本研究において BmNPV 感染による shut off 機構は細胞ゲノム上の遺伝子には影響するがプラスミド上の遺伝子には影響しないことが示唆された。細胞ゲノムの一部の遺伝子を除く大部分の遺伝子発現が抑制される現象として熱ショック (Heat shock: HS) 応答を挙げることができる。そこで HS により発現誘導される遺伝子 (*samui*) について解析したところ、BmNPV 感染によっても発現が誘導されることが判明した。このことから BmNPV 感染により起こる細胞の反応は HS によって起こる反応と類似している可能性が示唆された。そして、興味深いことにこの HS による遺伝子の発現抑制は *hr5* を用いて回避できることが明らかとなった。さらに、BmNPV 感染により発現が抑制された遺伝子では HS による発現抑制と同様にヌクレオソームの安定性が増していることが示唆された。これらの結果から、BmNPV 感染による宿主遺伝子の shut off は HS により起こる細胞遺伝子の発現抑制と同様な機構で起こっている可能性が示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主査	教授	伴戸久徳
副査	教授	増田 税
副査	准教授	浅野 眞一郎
副査	講師	佐原 健

学位論文題名

## バキュロウイルス耐性カイコ作出に関する基盤研究

本論文は 72 頁、図表 20 からなり、参考論文 1 編が付されている。バキュロウイルス科に属する *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) はカイコに核多角体病を引き起こす病原ウイルスである。BmNPV は古来よりカイコの飼育において最も深刻な被害をあたえるもののひとつであり、核多角体病の発生予防は現在も世界の養蚕業において最も重要な課題のひとつである。近年、BmNPV 耐性カイコの作出を目的として、Isobe *et al.* (2004) は RNA polymerase II (pol II) 系のプロモーターを用いて BmNPV の必須遺伝子である *lef-1* に対する二本鎖 RNA (dsRNA) を発現するようなトランスジェニックカイコを作製した。このトランスジェニックカイコにおいては、ウイルスの経口摂取後 96 時間においてもウイルス増殖の顕著な抑制が観察されたが、致死率の劇的な改善は認められなかった。さらに、Kanginakudru *et al.* (2007) によっても pol II 系のプロモーターを用いて BmNPV の必須遺伝子 *ie1* に対する dsRNA を発現するトランスジェニックカイコが作製されたが、やはり顕著な BmNPV 耐性をカイコに付与することができなかった。このように、これまでのところ実用レベルでの BmNPV 耐性カイコの作出には至っていない。

耐性カイコの作出に至らなかった原因としては dsRNA の発現が組織特異的発現制御を受けてしまい dsRNA の十分な発現が確保できなかった可能性、および BmNPV が引き起こす宿主遺伝子の発現抑制 (shut off) によって、dsRNA の発現が継続しなかった可能性が挙げられる。本研究は、より強力な BmNPV 耐性をカイコに付与するための基盤研究として、トランスジーン (dsRNA 発現遺伝子) の発現を妨げるこれらの問題を解決するための研究を行ったものである。

一般的に pol II プロモーターは生体内において組織特異的制御を受けることから、このようなプロモーターを用いたトランスジェニックカイコにおいては、特定の組織においてトランスジーンが発現が不十分である場合がある。この問題を解決するため、一般に組織特異性が低いとされる RNA polymerase III (pol III) 系のプロモーターであるカイコ U6 プロモーターを利用し、small-hairpin RNA (shRNA) 発現ユニットを作製した。まず、U6 プロモーターを利用した shRNA 発現ユニット (U6-shRNA 発現ユニット) を持つプラスミドを用いてレポーター遺伝子に対する発現抑制効果を評価した結果、U6-shRNA 発現ユニットはカイコ BmN 細胞において効果的にレポ

ーター遺伝子の発現を抑制できることが判明した。次に、この U6-shRNA 発現ユニットが BmN 細胞に BmNPV 抵抗性を付与できるのかを調査した。即ち、U6-shRNA 発現ユニットを有するプラスミドを用いて BmNPV の必須遺伝子 *ie1* を標的とした shRNA を一過的に BmN 細胞で発現させ (トランスフェクション効率は約 50%)、ウイルスの増殖抑制効果を調査した。その結果、shRNA を発現させた細胞ではウイルス感染 48 時間後における培養上清中のウイルス量が shRNA を発現しないコントロールの細胞と比較して約 70% 程度抑制された。これらのことから、U6-shRNA 発現ユニットがカイコの細胞において効果的に RNAi を誘導することができるツールであることが示唆された。

次に、BmNPV 感染による宿主遺伝子の shut off に関する問題の解決を試みた。バキュロウイルス感染による宿主遺伝子の shut off は転写レベルでの制御であることが考えられているが、その機構については明らかではない。しかし、興味深いことにウイルスの遺伝子発現は抑制されない。このことはウイルス自身の遺伝子発現には BmNPV 感染による shut off を回避できる機構が存在していることが考えられる。ところで、BmNPV ゲノムに散在するシスエレメントである *hr* は多様なウイルス遺伝子の発現を活性化することが知られている。そこで、*hr* が shut off を回避するのに関わっているのではないかと考え、検証実験を行った。まず、*hr5* を付加した EGFP 発現ユニットを BmN 細胞のゲノムに挿入した組換え細胞 (rBmN-A3EGFP/*hr5*<sup>2</sup>) を作製した。次に、この組換え細胞に BmNPV を感染させたところ、宿主細胞の内在性遺伝子である GAPDH 遺伝子の発現は減少したが、EGFP 遺伝子の発現は減少せず、むしろ増加した。このことから、*hr5* は宿主ゲノム上に shut off を回避できる領域を作ることができると考えられた。そこで、BmNPV の *ie1* を標的とした shRNA を発現する U6-shRNA 発現ユニットと *hr5* を利用して組換え細胞を作製し、そのウイルス増殖抑制効果を調査した。その結果、組換え細胞においては BmNPV の増殖抑制が認められ、最も増殖抑制効果の高かった細胞 (B10) においてはコントロールの非組換え細胞と比較してウイルスの増殖が 1% 以下にまで抑制された。

最後に BmNPV 感染による shut off 機構について考察している。まず、本研究において BmNPV 感染による shut off 機構は細胞ゲノム上の遺伝子には影響するがプラスミド上の遺伝子には影響しないことが示唆された。細胞ゲノムの一部の遺伝子を除く大部分の遺伝子発現が抑制される現象として熱ショック (Heat shock: HS) 応答を挙げることができる。そこで HS により発現誘導される遺伝子 (*samui*) について解析したところ、BmNPV 感染によっても発現が誘導されることが判明した。このことから BmNPV 感染により起こる細胞の反応は HS によって起こる反応と類似している可能性が示唆された。そして、BmNPV 感染により発現が抑制された遺伝子では HS による発現抑制と同様にヌクレオソームの安定性が増していることが示唆された。さらに、興味深いことにこの HS による遺伝子の発現抑制は *hr5* を用いて回避できることが明らかとなった。これらの結果から、BmNPV 感染による宿主遺伝子の shut off は HS により起こる細胞遺伝子の発現抑制と同様な機構で起こっている可能性が示唆された。このように本研究では、強力な BmNPV 耐性をカイコに付与するための極めて有効な要素技術を確立するとともに、これまで不明であったバキュロウイルスの宿主遺伝子発現抑制機構に関して重要な知見を得た。

よって、審査員一同は、大塚大輔が博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。