

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14471

研究課題名(和文) ウイルスは宿主の脳を操るか? : 脳特異的ウイルス制御機構を用いた脳機能操作の実証

研究課題名(英文) How baculoviruses manipulate host brain?: relationship between neuronal infection and host manipulation.

研究代表者

國生 龍平 (Kokusho, Ryuhei)

金沢大学・生命理工学系・研究協力員

研究者番号：90756537

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、カイコ核多角体病ウイルス(BmNPV)が宿主昆虫であるカイコ幼虫の脳に感染することで、カイコの行動を操っていると着想した。そこで、本研究ではGAL4/UASシステムを用いることで、カイコの中樞神経系のみでウイルス増殖を抑制できる遺伝子組換えカイコを作出することで、この仮説の実証を試みた。結果として、ウイルス増殖を大幅に抑制できるカイコ系統は作出できたが、その効果を中樞神経系のみ限定するカイコ系統の作出に難航している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で作出したUASカイコ系統は、GAL4カイコ系統と組み合わせて用いることでBmNPVの増殖を顕著に抑制できることが実証された。このシステムをカイコ実用品種にも導入することで、将来的には養蚕現場におけるBmNPV被害を低減させることができると考えられる。また、本研究では中樞神経系特異的GAL4系統カイコの作出には至らなかったが、今回得られた知見をもとにロックイン手法を改良することで、将来的に当該系統の作出につながると期待している。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that baculoviruses manipulate host behavior by directly infecting and controlling host central nervous system (CNS). To demonstrate this, we have tried to generate GAL4/UAS transgenic silkworm strains that can suppress viral propagation in specific tissues including CNS. We obtained UAS strains, which express CRISPR-Cas9 system for the cleavage of viral DNA. In the F1 hybrid of these UAS strains and the ActinA3-GAL4 strain, viral propagation significantly delayed. Also, we tried to generate CNS-specific GAL4 strains by GAL4 knock-in into neuron-specific gene loci, but no strains can induce neuron-specific expression so far.

研究分野：昆虫病理学

キーワード：宿主操作 バキュロウイルス カイコ BmNPV GAL4-UAS ゲノム編集 中樞神経系

1. 研究開始当初の背景

病原体感染が引き起こす宿主の異常行動は、自然界で普遍的に見られる現象であり、多くの研究者からの生態学的・進化学的興味の対象である。例えば、申請者の研究対象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、感染末期に移動が大幅に活性化し、積極的に上方向へと向かうようになる。近年、宿主の行動に影響を及ぼすバキュロウイルスの遺伝子として脱リン酸化酵素遺伝子 (*ptp*) (Kamita et al., 2005, *Proc Natl Acad Sci USA*) と脱皮ホルモン不活化酵素遺伝子 (*egt*) (Hoover et al., 2011, *Science*) が報告されたことから、当初はこれらの遺伝子が行動操作の実行因子であると考えられていた。

申請者は、カイコ核多角体病ウイルス (*Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*; BmNPV) とその宿主昆虫であるカイコおよびクワコを用いて、行動操作の分子機構の解明を目指して研究を行ってきた。その過程で、BmNPV 感染クワコにおいては *ptp* と *egt* がどちらも行動操作に必要なことを明らかにした (Kokusho & Katsuma, 2021, *J. Invertebr. Pathol.*)。同様に *ptp* や *egt* が行動操作に必要なでないケースが様々なウイルスと宿主の組み合わせで報告されたことから (Katsuma et al., 2012, *J. Virol.*; Ros et al., 2015, *Mol. Ecol.*)、バキュロウイルスにはこれまで行動操作関連因子として報告されていた *ptp* や *egt* を介さない行動操作の未知のコアメカニズムが存在することが推測された。また、申請者が新たに発見した異常行動関連遺伝子 (*arif-1*, *Bm5*) や *ptp* の機能を調査した結果、これらの遺伝子がウイルス増殖を促進する機能を持つことが判明し、特に、宿主の脳でのウイルス増殖と異常行動の惹起に正の相関が見られた (Kokusho et al., 2015, *J. Gen. Virol.*; Kokusho et al., 2016, *Virology*)。つまり、これまで報告された異常行動関連遺伝子は脳でのウイルス増殖に寄与する補助的なものに過ぎず、実際には脳に到達したウイルスが宿主脳の行動制御中枢を直接制御することで行動操作を実行していると考えられたが、未だその実験的証明には至っていない。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は、①バキュロウイルスは宿主の脳を直接制御しているのか？ (=ウイルスによる脳制御の証明)、②脳のどの部分を、どのように制御するのか？ (=行動操作の分子・神経メカニズムの解明)、を明らかにすることである。その第一歩として、本研究では組織あるいは細胞群特異的にウイルス増殖を制御することで、行動操作におけるウイルスの宿主脳感染の重要性を証明し、脳の行動操作関連領域を絞り込むことを目的とした。そのために、本研究では以下の3つを達成目標として研究を遂行した。

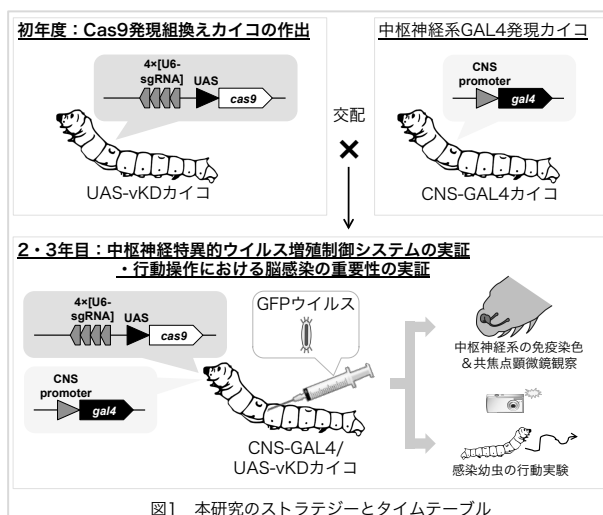
- I. ウイルスを標的にした CRISPR/Cas9 を GAL4 依存的に発現する組換えカイコの作出
- II. GAL4/UAS カイコによる組織特異的ウイルス増殖抑制システムの確立と評価
- III. 多様な GAL4 カイコを用いた感染実験による、行動操作に重要な脳領域の絞り込み

3. 研究の方法

本研究の概略を図1に示す。まず、GAL4 タンパク質依存的に Cas9 タンパク質を発現する組換えカイコ (UAS-vKD カイコ) を作出する。組換えに用いる *piggyBac* ベースのトランスファーベクターの転移領域内には、UAS-Cas9 と 4×[U6-sgRNA]のカセットが導入されている。UAS 配列の下流に Cas9 遺伝子が組み込まれているため、GAL4 発現組織で Cas9 の発現を誘導することができる。また、sgRNA は BmNPV の増殖に必須な遺伝子 (*iel*, *me53*, *p143*) をターゲットにしており、カイコの U6 プロモーターにより恒常的に発現する。*iel* と *me53* に対する sgRNA 配列は先行研究において有効性が実証されている配列を用いるため (Chen et al., 2017, *J. Virol.*)、高いウイルス増殖抑制効率が期待される。UAS-

vKD カイコと任意の GAL4 カイコの F1 雑種では、GAL4 発現組織において BmNPV のゲノム DNA が複数箇所切断されることで、ウイルスの必須遺伝子の発現やウイルスゲノム複製が不可能となるため、結果として当該組織におけるウイルス増殖が抑制されると想定される。

次に、作出した UAS-vKD カイコと GAL4 カイコの F1 雑種を用いてウイルス感染実験を行なうことで、組織特異的ウイルス増殖抑制システムの有効性を評価する。カイコではナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) により数多くのエンハンサートラップシステムやジーントラッ



プ系統が維持されており (<http://sgp.dna.affrc.go.jp/ETDB/>)、そのうち中枢神経系を含む限られた組織で発現誘導できる GAL4 カイコ系統 (CNS-GAL4 カイコ) は現在 5 系統が利用可能である。これらの CNS-GAL4 カイコと UAS-vKD カイコの F1 雑種 (CNS-GAL4/UAS-vKD カイコ) に対し、GFP を発現する組換え BmNPV (Hori et al., 2013, *J. Invertebr. Pathol.*) を接種する。ウイルス感染カイコの中枢神経系のホールマウント免疫染色を行ない、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察することで、Cas9 発現細胞におけるウイルス増殖抑制の程度を定量的に評価する。

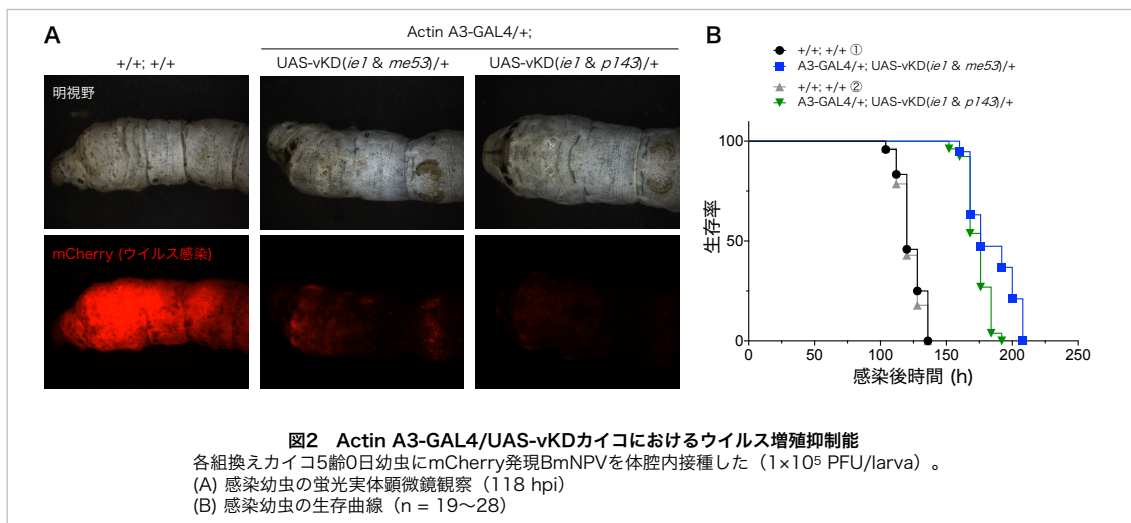
ウイルス増殖制御システムの実証後は、行動操作に関連する神経領域の絞り込みを試みる。ウイルスに感染した各 CNS-GAL4/UAS-vKD カイコの行動実験を行った際に、Cas9 が行動操作関連神経群で発現している系統であれば感染幼虫の異常行動が惹起されないと予想される。また、当該系統をベースに、カイコでの有効性が実証されている Cre/loxP 組換えシステム (Duan et al., 2013, *Transgenic Res.*) を利用したモザイク解析により、さらに行動操作関連細胞を絞り込む。

解析には現在利用可能な 5 系統の CNS-GAL4 カイコを利用する予定であるが、これらの系統と異常行動との関連が見られなかった場合、新規の CNS-GAL4 系統の作出を試みる。近年、カイコにおいてもゲノム編集による遺伝子ノックイン技術が確立されたため (Nakada et al., 2014, *Nat. Commun.*)、脳や中枢神経系特異的に発現する遺伝子配列中に GAL4 をノックインすることで、任意の発現パターンを示す GAL4 カイコを作出し、実験に用いることが可能である。

4. 研究成果

BmNPV の *iel* と *me53* あるいは *p143* をターゲットにした UAS-vKD カイコ (UAS-vKD(*iel* & *me53*), UAS-vKD(*iel* & *p143*)) 作出用のドナーベクターを構築し、*piggyBac* 転移酵素 mRNA とともにカイコ初期胚にインジェクションした。後代でのマーカー選別の結果、それぞれ 1 系統ずつ樹立することに成功した。そこで、各 UAS-vKD カイコ系統を全身で GAL4 を発現する Actin A3-GAL4 系統と交配し、F1 幼虫におけるウイルス抵抗性を調査した。5 齢 0 日幼虫に mCherry 発現 BmNPV を体腔内接種し、感染後 118 時間において mCherry 蛍光を観察したところ、対照群の幼虫では表皮組織全体で強い mCherry 蛍光が観察された、すなわち BmNPV が感染・増殖していたのに対し、Actin A3-GAL4 かつ UAS-vKD 幼虫では mCherry 蛍光が顕著に減少していた (図 2A)。また、感染幼虫の致死時間を調査した結果、Actin A3-GAL4 かつ UAS-vKD 幼虫では致死時間が約 48 時間遅延していた (図 2B)。したがって、作出した UAS-vKD カイコ系統を用いることで、BmNPV の増殖を顕著に抑制できることが実証された。

一方、当初は NBRP のエンハンサートラップ GAL4 系統カイコを本研究に利用予定であったが、実際に取り寄せて発現パターンを調査した結果、中枢神経系での発現誘導が見られなかった。そこで、神経細胞特異的 GAL4 系統を新規に作出するため、キイロショウジョウバエで神経細胞特異的 GAL4 系統としてよく利用されている *elav* や *nSyb* の遺伝子領域に GAL4 をノックインすることを試みた。その結果、*Gal4* 遺伝子カセットを含むノックインベクターを *nSyb* の 5'UTR 領域へノックインすること自体には成功したものの、当該系統では GAL4 の発現がほとんど見られなかった。一般に、5'UTR へのノックインは比較的容易だが、必ずしも標的遺伝子の発現パターンを模倣しないことが知られている。したがって、5'UTR へのノックインよりも難易度が上がるが、*nSyb* の C 末端にインフレームで 2A-GAL4 をノックインすることにより、本来の *nSyb* の発現パターンに近づく可能性がある。また、今回ノックイン手法ではマーカー遺伝子やベクターのバックボーンが残ってしまうため、それらが発現パターンに悪影響を与えている可能性が推測される。今後、FRT 配列を導入した改良型ドナーベクターを用いてノックインを行い、フリップパーゼを用いて後代でマーカー遺伝子やベクターバックボーンの配列を取り除くことで、*nSyb* や *elav* の本来の発現パターンを模倣できるか検証したい。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------