

平成30年 5月25日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18807

研究課題名(和文) カイコ濃核病ウイルス抵抗性遺伝子Nid-1とnsd-1の単離と作用機構の解明

研究課題名(英文) Positional cloning and functional analysis of the non-susceptibility genes to Bombyx densovirus type 1, Nid-1 and nsd-1

研究代表者

伊藤 克彦 (Ito, Katsuhiko)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：80725812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、カイコ濃核病ウイルス1型の感染に対して、独立に完全抵抗性を示す2種類の遺伝子Nid-1とnsd-1の単離とその作用機構の解明を目的としている。Nid-1を明らかにするため、ウイルス接種および非接種の抵抗性カイコを用いたトランスクリプトーム解析を進めた。両者で発現量が異なる遺伝子を数多く見つけ出すことに成功したが、Nid-1の責任領域(カイコ第17番染色体上の約260 kb)内にマップする遺伝子はなかった。一方nsd-1は、原因遺伝子の単離に成功した。その遺伝子はウイルスの感染組織である中腸の膜タンパク質をコードしており、ウイルスのレセプターとして機能していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The aims of this study are to isolate two non-susceptibility genes to Bombyx mori densovirus (BmDV), Nid-1 and nsd-1, and clarify the mechanisms of absolute resistance of B. mori to BmDV. To identify Nid-1, we performed transcriptome analysis using total RNA purified from the midgut of the virus-inoculated and virus-non-inoculated silkworms strain caring Nid-1. RNA-seq analysis revealed clear difference in the expression levels in many genes between the virus-inoculated and virus-non-inoculated silkworm, however, there was no gene which is mapped to the region responsible for Nid-1. On the other hand, we succeeded to identify the gene responsible for nsd-1. Sequence and biochemical analyses revealed that nsd-1 encodes a Bombyx-specific mucin-like glycoprotein with a single transmembrane domain. Moreover, the NSD-1 protein was specifically expressed in the larval midgut epithelium, the known infection site of BmDV.

研究分野：昆虫遺伝学

キーワード：カイコ 濃核病ウイルス ウイルス抵抗性遺伝子 ポジショナルクローニング トランスクリプトーム解析

1. 研究開始当初の背景

濃核病ウイルスは様々な昆虫や甲殻類で発見されており、その検出方法や性状解析に関する研究が世界中で行われている。特に、作物の大害虫であるチョウ目や衛生害虫であるゴキブリ目、さらには吸血によって病原体を媒介するハエ目などの要防除昆虫に感染するウイルスや、養殖産業で重要なエビ類に感染するウイルスが多く含まれているため、近年重要な研究対象として注目されている。これまでの研究によりウイルスの感染組織や感染時期、そして病徴については多く報告されてきた (Kawase & Kurstak, 1991; Afanasiev & Carlson, 2000)。しかしながら、ウイルス感染に関わる具体的な因子に関しては、その報告はほとんどない。なぜなら、感染性に関わるようなウイルスまたは宿主の変異体が見つかっていないためである。

カイコに感染する濃核病ウイルスには1型と2型があり、いずれも養蚕業に甚大な被害を与えるウイルスとして古くから問題視されてきた。興味深いことに、このウイルス感染の成否は、宿主であるカイコがもつ抵抗性遺伝子の有無によって決定されており、この遺伝子をもつカイコの変異体では、ウイルスの接種量をどれだけ増やしてもまったく感染しない“完全抵抗性”を示す(図1)(伊藤 & 門野, 2007)。30年以上前の遺伝学的交配実験によって、ウイルス1型の抵抗性には優性と劣性の突然変異遺伝子 *Nid-1* (Eguchi *et al.*, 1986) と *nsd-1* (渡辺 & 前田, 1978) が、ウイルス2型には劣性の *nsd-2* (関 & 岩下, 1983) が関わっていることが明らかになっていた。しかしながら、これらの原因遺伝子がいったいどのようなものかについては、まったくわかっていなかった。

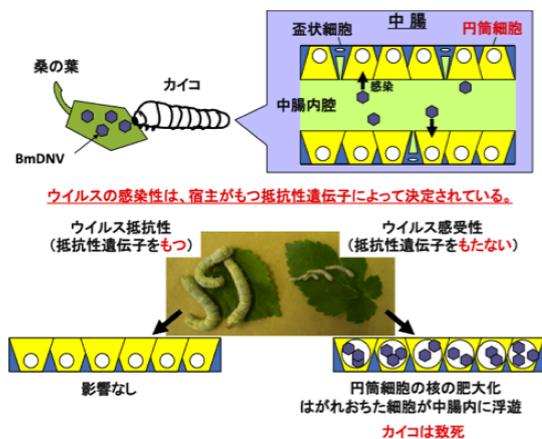


図1. カイコ濃核病ウイルスの感染と抵抗性遺伝子の影響。カイコ濃核病ウイルスの感染の成否は、宿主であるカイコが持つ抵抗性遺伝子によって決定されている。

このような背景のもと、2008年、我々はカイコにおいて突然変異遺伝子の単離方法を確立し、ウイルス2型に対する抵抗性遺伝子 *nsd-2* の単離に成功した (Ito *et al.*, 2008)。こ

の成果は、濃核病ウイルス研究において、初めてウイルス感染決定因子を明らかにしたという点で世界に先駆けた成果となった。

現在は、もう一つのウイルス1型の抵抗性遺伝子 *Nid-1* と *nsd-1* について、原因遺伝子の単離とその機能解析を進めている。

2. 研究の目的

昆虫ウイルス研究においてウイルス感染に関わる宿主側の因子は、感染機構を解明するための突破口になると考えられるが、その報告は極めて少ない。これまでの知見によりカイコには、カイコ濃核病ウイルス1型の感染に対して、独立に完全抵抗性を示す2種類の遺伝子 *Nid-1* と *nsd-1* が存在することがわかっている。しかしそれら遺伝子本体および機能については、未だ明らかになっていない。そこで本研究は、完全抵抗性遺伝子 *Nid-1* と *nsd-1* を単離しその作用機構を調査することで、昆虫病原性ウイルスに対する宿主昆虫側の抵抗性機構を解明することを目指している。また本研究では、遺伝子産物とウイルスとの相互作用を調査するための新たなアッセイ系の構築も行う。

3. 研究の方法

ウイルス1型の抵抗性遺伝子 *Nid-1* と *nsd-1* について、カイコゲノム情報を利用したポジショナルクローニングによる候補遺伝子の単離を進める。さらに明らかにした候補遺伝子を導入した形質転換カイコの作出とウイルス接種試験により、その遺伝子が本当にウイルス感染性に関わっていることを証明する。また、抵抗性遺伝子の機能解析を行い、各抵抗性遺伝子産物を介したウイルス抵抗性機構を調査する。

4. 研究成果

(1) ポジショナルクローニングによる *Nid-1* 候補遺伝子の単離

これまでの研究により、*Nid-1* の責任領域をカイコの第17染色体上の約260 kb内に限定することに成功し、その中に11個の予測遺伝子が存在することを明らかにしている。そこでこの11個の遺伝子について、*Nid-1* 系統 (No. 908) と *Nid-1* をもたない標準系統 (C108) 間で、ウイルスの感染組織である中腸での候補遺伝子の発現の有無、候補遺伝子の完全長 cDNA 配列の比較、定量的PCRを用いた候補遺伝子の発現量の比較、候補遺伝子のアノテーション、を行った。その結果、この中の一つの遺伝子において、No. 908 と C108 間で ORF 内に1塩基の多型が存在することがわかった。さらにこの塩基多型は、アミノ酸置換を引き起こしており、両系統間で異なるタンパク質が翻訳されていることが予測された。そこで、この候補遺伝子について、*Nid-1* 系統と標準系統の数を増やし、候補遺伝子内のアミノ酸置換を比較した。その結果、このアミノ酸配列は *Nid-1* 系統で

保存されておらず、この遺伝子は *Nid-1* ではないことがわかった。

#### (2) 次世代シーケンサーを用いた発現遺伝子の網羅的解析

*Nid-1* の抵抗性機構の解析と原因遺伝子の特定を目指し、*Nid-1* 系統にウイルスを感染させた際の中腸への影響の調査とトランスクリプトーム解析を行った。*Nid-1* 系統においてウイルス接種区と非接種区を準備し、その後 24、48、72 時間の中腸をサンプリングし RNA-seq を行った。解析には次世代シーケンサー HiSeq4000 を使用して、101PE でシーケンスを行った。その結果、各データセットで約 60~90 M リードのデータが得られた。続いて、これらのデータを用いて *Nid-1* の原因遺伝子のスクリーニングを行った。その結果、ウイルス接種および非接種区間で発現パターンが異なる遺伝子を数多く見つけ出すことに成功した。この中には *Nid-1* がマップする第 17 染色体上で発現している遺伝子がいくつか存在したが、*Nid-1* の責任領域内(カイコの第 17 染色体上の約 260 kb 内)さらにはその近傍にマップする遺伝子は見つからなかった。

#### (3) *Nid-1* 系統におけるウイルス抵抗性機構の調査

*Nid-1* 系統にウイルスを接種したのち、ウイルスの感染組織である中腸からウイルス由来の遺伝子およびタンパク質が検出されるかどうかを調査した。その結果、*Nid-1* 系統ではウイルス由来の遺伝子をはっきりと検出されたことから、ウイルスは中腸細胞内に侵入していることがわかった。一方で、ウイルス由来のタンパク質はウイルス感染後まったく検出されなかった。このことから、*Nid-1* はウイルスが細胞に侵入したのち、ウイルス由来タンパク質が翻訳される過程で阻害していることが明らかになった。この結果は大変興味深く、なぜなら昆虫ウイルスにおいて、ウイルスが細胞に侵入した後に働く因子で抵抗性および感受性を決定するものについては、これまでひとつも報告がないからである。このことは、*Nid-1* は昆虫ウイルス感染に関わる新規因子をコードする重要な遺伝子であることを意味していた。

#### (4) *nsd-1* 候補遺伝子の単離と機能証明

これまでの研究により、*nsd-1* の候補領域を第 21 連鎖群上の約 450 kb 内に限定することに成功し、その中に 5 個の予測遺伝子が存在することを明らかにしている。これらの遺伝子について、濃核病ウイルスの標的組織である中腸での発現の有無を調べた結果、そのなかの 1 つが中腸で特異的に発現していた。また、アミノ酸配列解析および組織切片を用いた免疫染色によって、この遺伝子は、膜タンパク質をコードしていること、ウイルスの感染組織である中腸細胞膜上に局在して

いることから、ウイルスのエントリーレセプターとして機能している可能性が考えられた。さらに、ウイルス抵抗性系統に抵抗性遺伝子の対立遺伝子である感受性遺伝子を導入した形質転換カイコを作出し、ウイルス接種試験を実施した。その結果、この形質転換カイコは、確かにウイルス抵抗性から感受性に形質が転換することが明らかになった。よってこれらの結果より、単離した遺伝子が目的の *nsd-1* であることを証明することに成功した。これらの研究成果は、学術論文に掲載された(主な発表論文等、雑誌論文)。

#### <引用文献>

- Kawase, S. & Kurstak, E. (1991) Parvoviridae of Invertebrates: Densonucleosis Viruses. In *Viruses of Invertebrates* Ed by Kurstak, E. Marcel Dekker, Inc. 315-34.
- Afanasyev, B. and Carlson, J. (2000) Densovirus as gene transfer vehicles. *Contrib Microbiol* 4, 33-58.
- 伊藤克彦、門野敬子 (2007) カイコ濃核病ウイルスと抵抗性遺伝子群. 蚕糸・昆虫バイオテック 76, 197-205.
- Eguchi, R., Furuta, Y., Ninaki, O. (1986) Dominant nonsusceptibility to densonucleosis virus in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci.* 55, 177-178.
- 渡辺仁、前田進 (1978) カイコの濃核病ウイルスに対する感染抵抗性とその遺伝様式. 日蚕雑 47, 209-214.
- 関宏夫、岩下嘉光 (1983) 山梨県の農家から分離した濃核病ウイルスの病理組織学的特徴と病原性. 日蚕雑 52, 400-405.
- Ito, K., Kidokoro, K., Sezutsu, H., Nohata, J., Yamamoto, K., Kobayashi, I., Uchino, K., Kalyebi, A., Eguchi, R., Hara, W., Tamura, T., Katsuma, S., Shimada, T., Mita, K., Kadono-Okuda, K. (2008) Deletion of a gene encoding an amino acid transporter in the midgut membrane causes resistance to a *Bombyx parvo*-like virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 7523-7527.

#### 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 9 件)

- Ito K, Kidokoro K, Katsuma S, Sezutu H, Uchino K, Kobayashi I, Tamura T, Yamamoto K, Mita K, Shimada T, Kadono-Okuda K. A single amino acid substitution in the *Bombyx*-specific mucin-like membrane protein causes resistance to *Bombyx mori* densovirus. *Sci Rep*. Accepted. (論文, 査読有)
- Gupta T, Ito K, Kadono-Okuda K, Murthy GN, Gowri EV, Ponnuel KM (2018)

Characterization and genome comparison of an Indian isolate of bidensovirus infecting the silkworm *Bombyx mori*. Arch. Virol. 163: 125-134. (論文, 査読有) doi: 10.1007/s00705-017-3584-x.

伊藤 克彦 (2017) カイコで見つかったウイルス完全抵抗性機構. アグリバイオ. 1: 47-51. (解説, 査読無)

伊藤 克彦 (2016) カイコ濃核病ウイルスと宿主の感染抵抗性機構 (最終回) - カイコ濃核病ウイルス研究 -. 昆虫と自然. 昆虫と自然. 51 (5): 32-34. (解説, 査読無)

伊藤 克彦 (2016) カイコ濃核病ウイルスと宿主の感染抵抗性機構 (3) - カイコ濃核病ウイルス 1 型抵抗性遺伝子とは? -. 昆虫と自然. 51 (4): 31-33. (解説, 査読無)

伊藤 克彦 (2016) カイコ濃核病ウイルスと宿主の感染抵抗性機構 (2) - カイコ濃核病ウイルス 2 型抵抗性遺伝子とは? -. 昆虫と自然. 51 (3): 35-38. (解説, 査読無)

伊藤 克彦 (2016) カイコ濃核病ウイルスと宿主の感染抵抗性機構 (第 1 回) - カイコ濃核病ウイルスとは? -. 昆虫と自然. 51 (2): 34-37. (解説, 査読無)

Ito K, Shimura S, Katsuma S, Tsuda Y, Kobayashi J, Tabunoki H, Yokoyama T, Shimada T, Kadono-Okuda K (2016) Gene expression and localization analysis of *Bombyx mori* bidensovirus and its putative receptor in *B. mori* midgut. J Invertebr Pathol. 136: 50-56. (論文, 査読有) doi: 10.1016/j.jip.2016.03.005.

Gupta T, Kadono-Okuda K, Ito K, Ponnuel KM (2015) Densovirus infection in silkworm *Bombyx mori* and genes associated with disease resistance. Invertebrate Survival Journal. 12: 118-128. (総説, 査読有)

〔学会発表〕(計 6 件)

伊藤 克彦・横山 岳・門野 敬子. カイコがもつ優性のウイルス感染抵抗性遺伝子の作用機構. 第 62 回日本応用動物昆虫学. 2018 年 3 月. 名古屋.

Katsuhiko Ito, Takeshi Fujii, Takeshi Yokoyama, Keiko Kadono-Okuda. Expression profile of *nsd-2* gene encoding the putative *Bombyx mori* bidensovirus receptor after virus infection. Society for Invertebrate Pathology Annual Meeting-2017. Aug 2017. San Diego.

伊藤 克彦、天竺桂弘子、横山岳、門野敬子. 中腸の組織培養と培養組織を用いたカイコ濃核病ウイルス 2 型の感染実験. 第 60 回日本応用動物昆虫学. 2016 年 3 月. 大阪.

伊藤 克彦・藤井毅・天竺桂弘子・横山岳. カイコ濃核病ウイルス 1 型を感染させた

*Nid-1* 抵抗性系統のトランスクリプトーム解析. 日本蚕糸学会第 86 回大会. 2016 年 3 月. 京都.

伊藤 克彦・志村幸子・天竺桂弘子・横山岳・門野敬子. カイコ濃核病ウイルス 2 型がカイコ中腸に及ぼす影響の経時的観察. 日本蚕糸学会第 84 回大会. 2015 年 9 月. 札幌.

Katsuhiko Ito, Tabunoki Hiroko, Takeshi Yokoyama, Keiko Kadono-Okuda. Effect of non-susceptibility gene to *Bombyx* densovirus type 1, *Nid-1*, to the virus infection mechanism. The 4<sup>th</sup> Asia-Pacific Congress of Sericulture and Insect Biotechnology (APSERI-2015). April 2015. Busan.

〔図書〕(計 1 件)

伊藤 克彦 (第 3 章執筆担当) ホルモンから見た生命現象と進化シリーズ VII 生体防御・社会性 (第 3 章 ウイルスの侵入) 裳華房 (2016). 23-34.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

研究室ホームページ

<http://web.tuat.ac.jp/~kaiko/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 克彦 (ITO, Katsuhiko)

東京農工大学・(連合) 農学研究科 (研究院)・助教

研究者番号: 80725812