

令和元年5月21日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05051

研究課題名(和文)細胞マシナリーの改変によるバキュロウイルス宿主制御ストラテジー

研究課題名(英文)Baculovirus manipulates host cells by modulating host cellular machineries

研究代表者

勝間 進 (Katsuma, Susumu)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：20378863

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：バキュロウイルスは自身を持つ100以上の遺伝子を巧みに利用することで、高度な宿主制御を実現し、子孫ウイルスの産生を最大限にすることが明らかになっている。これまでの研究は、個々のウイルス遺伝子の機能解析に重きが置かれてきたが、それらの機能が最終的にどのように統合され、ウイルス産生が最大化されているかはほとんど理解されていない。本研究では、バキュロウイルス感染をウイルスと宿主の両面からとらえることによって、バキュロウイルスが宿主制御に用いている分子とその役割、およびウイルス感染時の宿主細胞の状態変化を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルス変異体を用いた解析によって、キャプシド形成と最後期遺伝子発現の関係、ウイルス遺伝子発現ネットワークにおけるハブ因子(Bm8)の役割などを明らかにした。また、メタボローム、およびトランスクリプトーム解析から、バキュロウイルス感染時のシャットオフを免れている遺伝子群を同定し、ウイルス感染時に宿主細胞のメチル化経路が増強されていることを明らかにした。一方、宿主クロマチン状態の解析により、バキュロウイルス感染時の宿主クロマチンの状態は予想よりも変化が少ないことが明らかになった。これらの成果はウイルスによる宿主制御機構の解明という点で新しい知見を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：The Baculoviridae is a large family of pathogens that are infectious mainly for lepidopteran insects. Baculoviruses have a large circular, supercoiled, and double-stranded DNA genome packaged into rod-shaped virions and encode more than 100 genes in their genomes. Baculoviruses are known to maximize production of their progenies by manipulating host cellular machineries, but the mechanism of how functions of baculoviral genes are integrated to produce progeny viruses is unknown. In this study, we revealed the roles of viral genes whose products are utilized to manipulate host cells and the changes in host cellular machineries during baculovirus infection.

研究分野：昆虫病理学・昆虫遺伝学

キーワード：バキュロウイルス カイコ トランスクリプトーム メタボローム 宿主制御

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

昆虫ウイルスの一種であるバキュロウイルスは、80-180 kbp の 2 本鎖 DNA をゲノムとして持つ大型の DNA ウイルスである。バキュロウイルスは、感染後期に全細胞タンパク質の 30-50% ほどに達する量の封入体タンパク質（ポリヘドリン）を合成し、子孫ウイルスを包埋する多角体を形成する。このレベルで単一のタンパク質が高発現する例は、真核細胞ではバキュロウイルス-昆虫細胞系のみであり、実際、外来遺伝子発現系として獣医薬やワクチン生産に利用されているが、それがいかにして実現されているかは実はほとんど理解されていない。一方、遺伝子欠損ウイルスの作成により、本ウイルスが、脱皮ホルモン（エクジソン）の不活化（O'Reilly et al., *Science*, 1989）、アポトーシスの阻害（Clem et al., *Science*, 1991）、ワンダリング行動の誘起（Kamita et al., *PNAS*, 2005）など非常に高度な宿主制御機構を有するウイルスであることも判明している。

バキュロウイルスによる宿主制御は、細胞レベルと個体レベルに大別される（Miller LK, *The Baculoviruses*, 1997）。申請者は、カイコに特異的に感染するカイコ核多角体病ウイルス（*Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*: BmNPV）の遺伝子欠損株を用いた研究で、これらに關与するウイルス遺伝子を多数同定することに成功している。細胞レベルの制御因子としては、PK2 が宿主の eIF2 α キナーゼの 1 つである HRI のインヒビターとして働き、eIF2 α のリン酸化を阻害することで宿主細胞の翻訳を制御していること（Li et al., *PNAS*, 2015）やポリヘドリンやカテプシンの転写に関わるマスター因子 FP25K（Nakanishi et al., *J. Virol.*, 2012; Katsuma et al., *Virus Res.*, 2009; Katsuma et al., *JGV*, 1999）の発見があげられる。一方、個体レベルの制御因子としては、全身へのシステミック感染に關与する ARIF-1（Kokusho et al., *JGV*, 2015）、組織トロピズムに關与する BV/ODV-E26（Katsuma et al., 2012, *J. Virol.*）、脳・神経系への効率的感染と徘徊行動に關与する PTP（Katsuma et al., 2012, *PLoS Pathog.*）、個体溶解に協調的に關わるカテプシンとキチナーゼ（Katsuma et al., *JGV*, 2008）、バキュロウイルスのみが有する繊維芽細胞成長因子 FGF ホモログ（Katsuma et al., 2006, *J. Virol.*）、および致死までの時間を制御する EGT（Katsuma and Shimada, *JIP*, 2015）などがあげられる。これら以外にも宿主制御に關与するウイルス遺伝子の役割が多数報告されているが、それらの機能が最終的にどのように統合され、子孫ウイルス産生が最大化されているかはほとんど理解されていない。

2. 研究の目的

バキュロウイルスは自身が持つ 100 以上の遺伝子を巧みに利用することで、高度な宿主制御を実現し、子孫ウイルスの産生を最大限にすることが明らかになっている。これまでの研究は、個々のウイルス遺伝子の機能解析に重きが置かれてきたが、それらの機能が最終的にどのように統合され、ウイルス産生が最大化されているかはほとんど理解されていない。本申請課題では、これまでとは逆に、バキュロウイルス感染をシグナルカスケード、タンパク質合成・輸送システム、宿主ゲノムの修飾・高次構造、および物質代謝システムといった宿主細胞マシナリーの状態変化からとらえることによって、バキュロウイルスがいかにして宿主細胞をチューニングし、驚くべきレベルの子孫ウイルス産生を可能としているのかを解明する。

3. 研究の方法

- (1) 宿主細胞マシナリーの状態変化に關与するバキュロウイルス遺伝子の解析
突然変異誘起剤、およびマーカー遺伝子の導入により作出したカイコ核多角体病ウイルス（*Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*, BmNPV）変異体を用いて、宿主細胞マシナリーの制御に重要な役割を持つウイルス遺伝子を同定し、その機能を解析する。
- (2) トランスクリプトーム解析、およびメタボローム解析による宿主シャットオフ現象の検討
バキュロウイルス感染における宿主トランスクリプトームを調査することで、バキュロウイルスによるシャットオフを逃れるエスケイプ遺伝子群を同定する。一方、同感染時期の細胞を用いてメタボローム解析を行うことで、バキュロウイルス感染細胞における遺伝子発現と代謝システムの関係性を明らかにする。
- (3) バキュロウイルス感染時の宿主クロマチンの修飾・高次構造解析
ヒストンマークに対する抗体を用いた染色体免疫沈降法（ChIP-seq）、およびトランスポゾームを用いたクロマチン状態の解析（ATAC-seq）により、バキュロウイルス感染時の宿主クロマチンの状態を調査する。

4. 研究成果

- (1) 突然変異誘起剤を用いて作成した多角体産生が少なくなる Few Polyhedra (FP) 変異体を解析し、その原因がキャプシドの主要構成タンパク質である VP39 の 1 アミノ酸変異であることを明らかにした。これは *vp39* の変異体として初めての報告である。この変異体の詳細な解析により、キャプシド形成と最後期遺伝子発現の密接な関係を解明した。この成果は *Journal of Virology* 誌に発表し、掲載号の注目論文（Spotlight）に採択された。

我々の研究室で発見した感染幼虫の組織トロピズムに関与する *Bm8* について変異体を用いた解析を行い、*Bm8* タンパク質がウイルス増殖に対して負に働くユニークな因子であることが明らかになった。すなわち、細胞内で *Bm8* が適切にウイルス遺伝子の発現にブレーキをかけることによって、様々な情報が最適に統合され、結果としてウイルス産生が最大化することが示唆された。この *Bm8* がウイルス遺伝子発現ネットワークのハブ因子の一つであることを示した成果は、*Virus Research* 誌に発表した。

以前の研究によってバキュロウイルスの宿主行動制御関連遺伝子であると考えられた *Bm5* について、変異体を用いた解析を行った。解析の結果、*Bm5* は核膜に存在するタンパク質をコードし、ウイルス遺伝子の発現、および子孫ウイルスの産生に関与する遺伝子であることが明らかになった。この成果は *Virology* 誌に発表した。

行動制御関連遺伝子 *ptp* の発現時期と行動制活性の関係、および DNA 結合タンパク質遺伝子 *dbp* の近接遺伝子内に存在する転写開始点の役割について研究を行い、それぞれの成果を *Journal of Insect Biotechnology and Sericology* 誌、および *Virus Research* 誌に発表した。その他にも変異ウイルスを用いた解析によって、昆虫個体内での感染拡大における ARIF-1 の役割、*p24* の多角体形成における役割、および *BmNPV* による宿主行動操作に関与する *Bm96* の機能解析などについても進捗があり、それぞれについて学会発表を行った。

バキュロウイルスが持つ宿主制御遺伝子について、これまでの研究成果をまとめて、日本ウイルス学会誌に総説として発表した。

(2) *BmNPV* 感染・非感染 *BmN-4* 細胞を用いてメタボローム、およびトランスクリプトーム (RNA-seq) データを取得した。RNA-seq 解析から、バキュロウイルス感染時のシャットオフを免れている遺伝子群を同定することに成功した。GO ターム解析から、それらの大部分がタンパク質の翻訳に関与する遺伝子群であることが判明した。一方、メタボローム解析から、ウイルス感染時に宿主細胞のメチル化経路が増強されていることが示唆された。メチル化経路の重要性について検討するため、*BmNPV* 自身が保持しているメチル基転移酵素遺伝子 (*Bm57*) の変異体の作成等を行った。現在、その変異体を用いた詳細な解析を行っているところである。これらの成果は、国内学会、および国際学会(The 51st Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology)で発表し、国際学会においては Travel award を受賞した。

(3) 我々の以前の研究 (Kawaoka et al., *Nucleic Acids Res.*, 2013; Shoji et al., *Nucleic Acids Res.*, 2014) において *BmN-4* 細胞における ChIP-seq で使用可能であった各種修飾ヒストン抗体を用いて、感染時間別に ChIP-seq を行った。しかし、驚くべきことに、感染・非感染の間でリードのマッピングパターンに明確な違いが認められなかった。そこで、クロマチン構造を調査する他の手法として ATAC-seq を採用し、感染・非感染における比較を試みた。RNA-seq データと組み合わせると、シャットオフを受ける遺伝子と受けにくい遺伝子との間で、クロマチンの状況が異なることが示唆された。現在、追試も含め、詳細な解析を進めているところである。

(4) その他としてカイコ *BmN-4* 細胞に慢性感染しているカイコマキュラウイルスについて、トランスクリプトームデータを用いた解析を行った。その結果、このウイルス由来の RNA は全細胞 mRNA 中 15%程度も占めることが明らかになった。さらにこの RNA 量は 2 種類の小分子 RNA、piRNA と siRNA によって抑制されており、これらを支配する宿主細胞マシナリーを減弱させると 30%程度まで RNA 量が増加し、その結果細胞が死に至ることが判明した。この成果は *DNA Research* 誌に発表し、共同研究先の宇都宮大学からプレスリリースされた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① **勝間進**. バキュロウイルスの宿主制御遺伝子. ウイルス (日本ウイルス学会), Vol. 68, No. 2, 147–156. 2018 年 12 月
- ② Tsukui K, Yagisawa C, Fujimoto S, Ogawa M, Kokusho R, Nozawa M, Kawasaki H, **Katsuma S**, Iwanaga M*. Infectious virions of *Bombyx mori latent virus* are incorporated into *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* occlusion bodies. *Viruses*, Vol. 11, No. 4, E316. 2019 年 4 月
- ③ **Katsuma S***, Kawamoto M, Shoji K, Aizawa T, Kiuchi T, Izumi N, Ogawa M, Mashiko T, Kawasaki H, Sugano S, Tomari Y, Suzuki Y, and Iwanaga M*. Transcriptome profiling reveals infection strategy of an insect maculavirus. *DNA Research*, Vol. 25, No. 3, 277–286. 2018 年 6 月
- ④ Hikida H, Kokusho R, Kobayashi J, Shimada T, **Katsuma S***. Inhibitory role of the *Bm8* protein in the propagation of *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*. *Virus Research*, Vol. 249, 124–131. 2018 年 4 月
- ⑤ **Katsuma S***. The very late promoter-driven *ptp* transcription can rescue the ELA-defective phenotype of a *ptp*-disrupted *BmNPV*. *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, Vol. 87, No. 1, 25–28. 2018 年 3 月
- ⑥ Fujimoto S, Kokusho R, Kakemizu H, Izaku T, **Katsuma S**, Iwashita Y, Kawasaki H, Iwanaga M*. Characterization of a *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* variant isolated in Laos. *Journal of Insect*

Biotechnology and Sericology, Vol. 86, No. 3, 85–94. 2017年11月

⑦ **Katsuma S***, Kokusho R. A conserved glycine residue is required for proper functioning of a baculovirus VP39 protein. *Journal of Virology*, Vol. 91, No. 6, e02253-16. 2017年2月

⑧ Kokusho R*, Koh Y, Fujimoto M, Shimada T, **Katsuma S***. Bombyx mori nucleopolyhedrovirus BM5 protein regulates progeny virus production and viral gene expression. *Virology*, Vol. 498, 240–249. 2016年11月

⑨ **Katsuma S***. Transcription of *dbp* from the coding region of the *Bm17* gene is required for the efficient propagation of Bombyx mori nucleopolyhedrovirus. *Virus Research*, Vol. 223, 57–63. 2016年9月

〔学会発表〕(計 19 件)

① 松田(今井)典子, 勝間進. NIAS-Bm-aff3 細胞の性状解析. 日本蚕糸学会第 89 回大会, 2019 年

② 國生龍平, 勝間進. BmNPV の P24 タンパク質は多角体の形状を規定する. 日本蚕糸学会第 89 回大会, 2019 年

③ 疋田弘之, 川本宗孝, 鈴木穰, 勝間進. 中部糸腺への BmNPV 感染による *fibrohexamerin* の発現異常. 日本蚕糸学会第 89 回大会, 2019 年

④ 勝間進, 岩永将司. チョウ目培養細胞の内在性ウイルス. 日本蚕糸学会第 89 回大会 (招待講演), 2019 年

⑤ 疋田弘之, 庄司佳祐, 川本宗孝, 鈴木穰, 嶋田透, 勝間進. トランスオミクスを用いたバキュロウイルス感染細胞におけるシャットオフ回避遺伝子の機能解析. 第 41 回日本分子生物学会年会, 2018 年

⑥ 疋田弘之, 庄司佳祐, 川本宗孝, 鈴木穰, 嶋田透, 勝間進. バキュロウイルス感染細胞におけるシャットオフを逃れる遺伝子の網羅的解析. 第 13 回昆虫病理研究会シンポジウム, 2018 年

⑦ 國生龍平, 勝間進. 宿主体内におけるバキュロウイルスの感染拡大機構. 第 13 回昆虫病理研究会シンポジウム (招待講演), 2018 年

⑧ Hiroyuki Hikida, Ryuhei Kokusho, Noriko Matsuda-Imai, Susumu Katsuma. BmNPV Bm96 protein facilitates virus-induced locomotory activity. The 6th Asia-Pacific Congress of Sericulture and Insect Biotechnology, 2019 年

⑨ Hiroyuki Hikida, Yutaka Suzuki, Munetaka Kawamoto, Toru Shimada, Susumu Katsuma. Integration of transcriptomics and metabolomics reveals a role for cellular methylation process during Bombyx mori nucleopolyhedrovirus infection. The 51st Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, 2018 年

⑩ 國生龍平, 勝間進. *ptp* や *egt* に依存しないバキュロウイルスの宿主行動操作. 第 76 回昆虫病理研究会, 2017 年

⑪ 勝間進, 庄司佳祐, 川本宗孝, 木内隆史, 泉奈津子, 泊幸秀, 鈴木穰, 岩永将司. カイコマキュラウイルスは piRNA 経路および RNAi 経路によって RNA サイレンシングを受ける. 第 76 回昆虫病理研究会, 2017 年

⑫ 疋田弘之, 國生龍平, 嶋田透, 勝間進. Bm8 タンパク質を介したカイコ核多角体病ウイルスによる宿主致死時間制御. 第 76 回昆虫病理研究会, 2017 年

⑬ 國生龍平, 勝間進. BmNPV の ARIF-1 は気管の非末端部位からの感染に重要である. 日本蚕糸学会第 88 回大会, 2018 年

⑭ 勝間進. バキュロウイルスの宿主制御機構に関する研究 (日本蚕糸学会賞 受賞講演). 日本蚕糸学会第 88 回大会 (招待講演), 2018 年

⑮ 疋田弘之, 國生龍平, 嶋田透, 勝間進. 行動活性を評価する新規手法を用いたカイコ核多角体病ウイルス *Bm96* 遺伝子の機能解析. 日本蚕糸学会第 88 回大会, 2018 年

⑯ 勝間進, 國生龍平. バキュロウイルス感染におけるキャプシド形成と最後期遺伝子発現との関係. 平成 29 年度 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会, 2017 年

⑰ 國生龍平, 勝間進. バキュロウイルスの全身感染促進因子 ARIF-1 の構造活性相関解析. 平成 29 年度 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会, 2017 年

⑱ 疋田弘之, 國生龍平, 嶋田透, 勝間進. カイコ核多角体病ウイルスがコードする遺伝子 *Bm8(bv/odv-e26)* が感染を抑制することによる感染進行の最適化. 平成 29 年度 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会, 2017 年

⑲ 藤本正太, 川本宗孝, 國生龍平, 鈴木穰, 川崎秀樹, 岩下嘉光, 勝間進, 岩永将司. ラオス由来新規カイコ核多角体病ウイルス株 BmNPV La の解析. 平成 29 年度 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会, 2017 年

〔図書〕(計 0 件)

〔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://papilio.ab.a.u-tokyo.ac.jp/igb/>

6. 研究組織
(1) 研究分担者
なし
(2) 研究協力者
なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。