

平成 31 年 4 月 26 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08095

研究課題名(和文) BmMLV持続感染成立のコアメカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the core mechanism of BmMLV persistent infection

研究代表者

岩永 将司 (Iwanaga, Masashi)

宇都宮大学・農学部・准教授

研究者番号：40400717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Bombyx mori latent virus(BmLV)は、カイコ由来培養細胞から発見された持続感染型RNAウイルスである。本研究では、BmLVの持続感染メカニズムの解明に取り組んだ。その結果、BmLVの急性感染に対してはsiRNAを介した宿主のRNAサイレンシングが発動するのに対して、BmLVの持続感染に対しては、siRNAだけでなく、piRNAを介したRNAサイレンシングが発動することを明らかにした。更に、BmLVはカイコバキュロウイルス(BmNPV)との共感染によってカイコ幼虫で増殖するだけでなく、BmNPVのウイルス封入体へ感染性を維持したまま封入されることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ウイルスの急性感染と持続感染で宿主側の異なるRNAサイレンシング機構が発動していることを明らかにした。ウイルスの急性感染からどのようなメカニズムで持続感染に移行するのには完全には明らかではなく、本研究成果は非常に興味深いものである。また、ウイルスが別種のウイルスの封入体に、感染性を維持したまま取り込まれるということは、ウイルスの相乗り現象であり、本研究成果は、このような現象が様々なウイルス間で行われている可能性を示すものであり、非常に意義深いものであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Bombyx mori latent virus (BmLV) is a positive, single-stranded insect RNA virus with a close relationship to plant tymoviruses and currently classified as an "unclassified" tymovirus. In this study, we first identified 150 differentially expressed genes during BmLV infection by RNA-seq analysis. Also, we revealed that while siRNA pathway functions in both acute and persistent infection of BmLV, piRNA pathway functions only in the persistent infection of this virus. Furthermore, we showed that persistent infection with BmLV caused a slight delay in BmNPV propagation, and BmLV propagation was enhanced in B. mori larvae via co-infection with BmNPV. We also showed that BmLV infectious virions were co-occluded with BmNPV virions into BmNPV occlusion bodies.

研究分野：昆虫ウイルス学

キーワード：BmLV カイコ 持続感染 急性感染 培養細胞 植物ウイルス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Bombyx mori macula-like virus (BmMLV) は、2005年にカイコ培養細胞から発見されたプラス鎖 RNA ウイルスである。興味深いことに、本ウイルスは昆虫の培養細胞に感染するものの、そのゲノム配列は植物ウイルスに高い類縁性を有している。一方で、本ウイルスの宿主はカイコとその祖先種であるクワコの、しかも培養細胞に限られており、本質的にカイコのウイルスであると考えられている。しかしながら、BmMLV の増殖メカニズムは明らかではない。

また、BmMLV は既に樹立されたほとんど全てのカイコ由来培養細胞へ混入し、高いレベルで持続感染を成立させている。持続感染とは、宿主を致死に至らせること無きまま、ウイルス粒子を放出し続ける感染様式である。持続感染成立のメカニズムに関しては、C 型肝炎ウイルスで宿主のインターフェロンを抑えることや、結核菌がマクロファージの貪食を回避するためにフリーラジカルを不活化することが知られているが、そのコアとなる分子メカニズムは全く解明されていない。一方で、近年カイコ由来 BmMLV 陰性培養細胞株 (BmVF 細胞) が樹立されており、BmVF 細胞へ BmMLV を接種した急性感染と、BmMLV が既に持続感染している BmN 細胞を用いることで BmMLV の持続感染成立のメカニズムを明らかにできると考えた。そこで BmMLV 感染細胞の RNAseq 解析を進めた結果、多数の宿主細胞の転写量が変動しているだけでなく、ウイルス由来 small RNA が多量に存在することが明らかとなった。

そこで本研究では、これら転写量の変動する宿主遺伝子とウイルス由来 small RNA の解析によって BmMLV の持続感染について調査すると共に、BmMLV がカイコ幼虫で増殖できないメカニズムを明らかにすることにした。

なお、研究機関中、2018年の国際ウイルス分類委員会 (ICTV) によって BmMLV は *Bombyx mori* latent virus (BmLV) へと改称された。そのため、本報告書は以下、BmMLV を BmLV として表記する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、BmLV 感染によって転写量が変動する宿主遺伝子の機能を明らかにすること、BmLV 感染細胞における small RNA の機能を明らかにすること、BmLV の増殖メカニズムを明らかにすること、の3点である。これら3点の研究によって、BmLV の持続感染成立のコアメカニズムを明らかにすることである。

3. 研究の方法

BmLV 感染によって転写量が変動する宿主遺伝子の機能を明らかにするため、BmLV 感染継時的な RNAseq 解析のデータを精査し、ウイルス感染後転写量が増加する宿主遺伝子を探索した。その結果、細胞接着因子である Fasciclin に相同性を示す遺伝子 (*BmFasI*) の RNA 量が見出されたため、BmLV 感染細胞における *BmFasI* の機能解析を行うこととした。そのために、*BmFasI* の遺伝子解析、及びノックダウン、過剰発現実験などに取り組んだ。

BmLV 感染細胞における small RNA の機能を明らかにするために、BmLV 感染継時的な細胞から small RNA を抽出し、small RNAseq を行った。また、得られたデータを元に、関連遺伝子のノックダウンを行い、それが BmLV の増殖に及ぼす影響を調査した。

BmLV の増殖メカニズムを明らかにするために、致死的な感染様式を有するカイコ核多角体病ウイルス (BmNPV) と BmLV の共感染実験を行い、どのような変化がそれぞれのウイルスに生じるか調査した。

4. 研究成果

BmLV 感染によって転写量が変動する宿主遺伝子の機能については、まず、*BmFasI* が細胞接着因子に相同性を示すことから、BmLV 感染後の宿主細胞の接着性について調査した。その結果、BmLV の感染によって有意に細胞集塊が形成されることが明らかとなった。次に、*BmFasI* の遺伝子解析を行うことで BmVF 細胞では *BmFasI* は variant x4 のみが転写されていることが明らかとなった。更に、*BmFasI* を過剰発現した結果、宿主細胞集塊が有意に形成されることを見出し、逆にノックダウンした結果、形成される宿主細胞集塊は有意に減少、または細胞集塊の大きさが有意に小さくなることが明らかとなった。これらの結果から、*BmFasI* は細胞集塊の形成に関与すること、そして BmLV の感染に伴って転写量が増加する *BmFasI* によって、多数の細胞集塊が形成されることを明らかにした ([雑誌論文 3] [学会発表 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 14, 15, 16, 17])。

更に、BmLV 感染継時的な RNAseq データに基づいていくつかの別種のウイルス様 RNA がカイコ培養細胞で転写されていることを明らかにした。 [学会発表 1, 10, 11, 18])

BmLV 感染細胞における small RNA の機能については、BmLV 感染細胞から small RNA を抽出して small RNAseq 解析を行った。その結果、BmLV 由来の siRNA が BmLV のゲノム全体に渡って産生されていることが明らかとなった。また、本来はトランスポゾンの制御に関わる piRNA が BmLV のサブゲノム領域に特異的に産生されていることが明らかとなった。そこで、BmLV の持続感染している BmN 細胞と、BmLV を新たに急性感染させた BmVF 細胞でこれら small RNA を比較した結果、急性感染では siRNA による RNA サイレncing が引き起こされているのに対して、持続感染では siRNA に加えて piRNA による RNA サイレncing も引き起こされていることが明らかとなった。また、これらの RNA サイレncing に関わる因子のノックダウン実験によって、これらの RNA サイレncing 機構が BmLV の増殖を抑えていることも明らかとなった ([雑誌論

文 2,3)〔学会発表 1,7,9,13,20〕。

BmLV の増殖メカニズムを明らかにすること、については、BmLV を BmNPV と共感染する実験を行った。まず、培養細胞を用いた実験の結果、BmLV の持続感染が BmNPV の増殖を遅延させることが明らかとなり、これらのウイルスに何らかの相関があることが明らかとなった。次に、BmLV が単独では増殖しないカイコ幼虫へ BmNPV との共感染実験を行った結果、共感染によって初めて BmLV の RNA がカイコ幼虫で増加し、ウイルスが増殖することが明らかとなった。更に、BmNPV のウイルス封入体に BmLV のウイルス粒子が封入されていることを明らかにした。そこで、封入体を溶解し、再度培養細胞へ接種する実験を行った結果、BmLV の粒子は BmNPV の封入体に感染性を維持したまま取り込まれていることが明らかとなった (〔雑誌論文 1〕〔学会発表 19,20〕)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. 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*, 査読有, 11, 2019 年, 316 DOI: 10.3390/v11040316
2. 岩永将司 昆虫培養細胞に潜在感染する *Bombyx mori latent virus*. ウイルス, 査読なし, 68, 2018 年, 137-146.
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., Iwanaga, M. Transcriptome profiling reveals infection strategy of an insect maculavirus. *DNA research*, 査読有, 25, 2018 年, 277-286.

〔学会発表〕(計 20 件)

1. 勝間進、岩永 将司、チョウ目培養細胞の内在性ウイルス、平成 31 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会、2019 年 3 月 22 日、東京農工大学小金井キャンパス
2. 酒井大吉、庄司佳佑、相澤昂洋、勝間 進、岩永 将司、*Bombyx mori latent virus* 感染によって転写量が増加する *Bombyx mori fasciclin1* の機能解析、平成 31 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会、2019 年 3 月 23 日、東京農工大学小金井キャンパス
3. 酒井大吉、相澤昂洋、長谷川智士、庄司佳佑、早崎芳夫、川崎秀樹、勝間進、岩永 将司、カイコマキュラウイルス感染細胞の細胞集塊形成を促進する *Bombyx mori fasciclin1* の機能解析、第 41 回日本分子生物学会年会、2018 年 11 月 29 日、パシフィコ横浜
4. 酒井大吉、相澤昂洋、庄司佳佑、川本宗孝、鈴木穰、川崎秀樹、勝間進、岩永 将司、*Bombyx mori fasciclin1* は、*Bombyx mori latent virus* 感染における宿主細胞集塊の形成を促進する、第 4 回蚕糸・昆虫機能利用関東地区学術講演会、2018 年 11 月 17 日、日本大学湘南キャンパス
5. 酒井大吉、相澤昂洋、長谷川智士、庄司佳佑、早崎芳夫、川崎秀樹、勝間進、岩永 将司、カイコ *fasciclin1* は、カイコマキュラウイルス感染における宿主細胞集塊の形成を促進する、第 13 回昆虫病理研究会シンポジウム、2018 年 9 月 21 日、富士 calm
6. 酒井大吉、相澤昂洋、長谷川智士、庄司佳佑、川本宗孝、鈴木穰、早崎芳夫、川崎秀樹、勝間進、岩永 将司、カイコマキュラウイルス感染継時的に転写量が増加する宿主細胞接着因子の解析、平成 30 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会、2018 年 3 月 20 日、名古屋大学
7. 庄司佳佑、泉奈津子、鈴木穰、泊幸秀、岩永 将司、勝間進、カイコ培養細胞において持続感染している昆虫マキュラウイルスは二つの異なる small RNA 経路によって抑制される、平成 30 年度、蚕糸・昆虫機能利用学術講演会、2018 年 3 月 20 日、名古屋大学
8. 酒井大吉、相澤昂洋、長谷川智士、庄司佳佑、川本宗孝、鈴木穰、早崎芳夫、川崎秀樹、勝間進、岩永 将司、カイコマキュラウイルス感染継時的に転写量が上昇する *fasciclin1* の機能解析、第 7 回宇都宮大学オプトバイオシンポジウム、2017 年 12 月 13 日、宇都宮大学
9. 庄司佳佑、泉奈津子、鈴木穰、泊幸秀、岩永 将司、勝間進、カイコ培養細胞において持続感染している昆虫マキュラウイルスに由来する piRNA の性状、2017 年度 生命科学系学会合同年次大会、2017 年 12 月 8 日、神戸ポートアイランド
10. 遠藤由梨、松岡雄介、川本宗孝、鈴木穰、川崎秀樹、勝間進、岩永将司、カイコ培養細胞に持続感染するイフラウイルスの解析、第 3 回蚕糸・昆虫機能利用関東地区学術講演会、2017 年 11 月 18 日、東京大学柏キャンパス
11. 小川茂恵、八木沢千尋、津久井啓多、國生龍平、野澤瑞佳、勝間進、川崎秀樹、岩永将司、多角体へと封入されるカイコマキュラウイルスの解析、第 3 回蚕糸・昆虫機能利用関東地区学術講演会、2017 年 11 月 18 日、東京大学柏キャンパス
12. 酒井大吉、相澤昂洋、長谷川智士、庄司佳佑、川本宗孝、鈴木穰、早崎芳夫、川崎秀樹、勝間進、岩永将司、BmMLV 感染細胞における宿主細胞接着因子の機能解析、第 3 回蚕糸・昆虫機能利用関東地区学術講演会、2017 年 11 月 18 日、東京大学柏キャンパス

13. 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 9 月 30 日、東京大学農学部
14. 相澤昂洋、川本宗孝、鈴木穰、今西重雄、川崎秀樹、勝間進、岩永将司、トランスクリプトーム解析による Bombyx mori macula-like virus の増殖メカニズムの解明、平成 29 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会、2017 年 3 月 22 日、つくば産学連携支援センター
15. 相澤昂洋、持続感染型昆虫ウイルスを用いた新たな外来タンパク質発現系の開発、CDI ヤングイノベーションスカラーシップ研究成果報告会、2017 年 3 月 2 日、宇都宮大学工学部
16. 相澤昂洋、川本宗孝、内山航大、石原玄基、鈴木穰、今西重雄、川崎秀樹、勝間進、岩永将司、RNA-seq による Bombyx mori macula-like virus 感染細胞のトランスクリプトーム解析、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日、パシフィコ横浜
17. 相澤昂洋、川本宗孝、鈴木穰、川崎秀樹、勝間進、岩永将司、RNA-seq を用いた Bombyx mori macula-like virus の増殖メカニズムの解析、第 2 回蚕糸・昆虫機能利用関東地区学術講演会、2016 年 11 月 5 日、宇都宮大学
18. 加藤駿、高宮達郎、川本宗孝、鈴木穰、川崎秀樹、勝間進、岩永将司、カイコ培養細胞から見出されたトストルブウイルスに相同性を示す cDNA の解析、第 2 回蚕糸・昆虫機能利用関東地区学術講演会、2016 年 11 月 5 日、宇都宮大学
19. 八木沢千尋、津久井啓多、松岡雄介、国生龍平、野澤瑞佳、勝間進、川崎秀樹、岩永将司、カイコマキュラ様ウイルスとカイコ核多角体病ウイルスの相互作用の解析、第 2 回蚕糸・昆虫機能利用関東地区学術講演会、2016 年 11 月 5 日、宇都宮大学
20. 岩永将司、昆虫マキュラ様ウイルスの持続感染メカニズムの研究、第 12 回昆虫病理研究会シンポジウム、2016 年 9 月 15-17 日、宮城モンタナリゾート

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年：
 国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年：
 国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

1. 宇都宮大学プレスリリース「植物ウイルス様昆虫ウイルスが別のウイルス封入体に相乗りすることを発見」<https://www.utsunomiya-u.ac.jp/topics/research/007609.php>
2. 宇都宮大学プレスリリース「見た目は植物ウイルス、でも昆虫細胞に持続感染しているウイルスの謎を解明」<https://www.utsunomiya-u.ac.jp/topics/006117.php>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。