

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20380034

研究課題名(和文)

核多角体病ウイルス感染細胞が発動する全タンパク質合成停止の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of protein synthesis shutdown in insect cells infected with nucleopolyhedrovirus

研究代表者：

池田 素子 (IKEDA MOTOKO)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授

研究者番号：20262892

研究成果の概要(和文)：

カイコ培養細胞(BM-N細胞)は、ある種の核多角体病ウイルスの感染に対して、細胞のタンパク質合成だけでなく、ウイルスのタンパク質合成も停止して全タンパク質合成停止となり、ウイルス増殖を阻止している。本研究は、この全タンパク質合成停止の分子機構の解明を目的として行った。その結果、BM-N細胞は1つのウイルス因子、もしくはその因子のはたらきを認識すると、自らのRNAを急速に分解する機構を使って全タンパク質合成停止となることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：

The molecular basis for the global protein synthesis shutdown in *Bombyx mori* BM-N cells caused by several nucleopolyhedroviruses (NPVs) infections is not well known. In this study, we showed that the RNA in BM-N cells was degraded quickly after abortive infection of the cells by various NPVs. In contrast, the RNA degradation was not induced by *Bombyx mori* NPV infection which results in productive infection in the cells. These results indicate that a viral factor and/or its function induce the degradation of RNA, which causes global protein synthesis shutdown in BM-N cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2009年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：昆虫ウイルス学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：核多角体病ウイルス，昆虫細胞，抗ウイルス応答，リボソームRNA分解

1. 研究開始当初の背景

核多角体病ウイルス(NPV)が不全感染となる昆虫細胞では、しばしば、細胞のタンパク質合成だけでなく、ウイルスのタンパク質合成も停止し、全タンパク質合成停止となることが報告されてきた。この全タンパク質合成停止は、感染細胞がウイルスの増殖を阻止するために発動する生体防御戦略の重要な要素であるにもかかわらず、ほとんど研究されてこなかった。

私たちはこれまでに、アメリカシロヒトリMNPV感染によって、カイコ由来のBM-N細胞に全タンパク質合成停止が誘導されることを明らかにしてきた。さらに、全タンパク質合成停止が誘導されたBM-N細胞において、細胞のRNAが著しく減少していることがわかり、細胞はRNAの分解を誘導することによって全タンパク質合成停止を引き起こし、ウイルスの増殖を阻止していることが予想された。そこで、この全タンパク質合成停止機構

を明らかにすることを目的として、本研究課題を立案した。

2. 研究の目的

NPV 感染にともなって昆虫細胞が発動する全タンパク質合成停止の機構、ならびにこれに対抗して、ウイルスが獲得した全タンパク質合成停止を回避する機構を、分子レベルで解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) NPV 感染細胞における RNA の減少が全タンパク質合成停止の原因となっていることを示すため、BM-N 細胞において不全感染となるアメリカシロヒトリ MNPV, *Autographa californica* MNPV (AcMNPV), シロイチモジヨトウ MNPV, ハスモンヨトウ MNPV を BM-N 細胞に感染させ、感染にともなう RNA の量的変動や、RNA の分解パターンの変動を調査した。

(2) アメリカシロヒトリ MNPV のコスミドライブラリーを BM-N 細胞にトランスフェクション法により導入することによって、RNA 分解を誘導するウイルス因子の探索を行った。

(3) BM-N 細胞において不全感染となる *Autographa californica* MNPV (AcMNPV), シロイチモジヨトウ MNPV, ハスモンヨトウ MNPV のウイルス因子についても、ウイルス因子が細胞の RNA に及ぼす影響を調査した。

(4) BM-N 細胞で増殖感染となるカイコ NPV のコスミドライブラリーを用いて、全タンパク質合成停止の回避に関わるウイルス遺伝子の探索を行った。

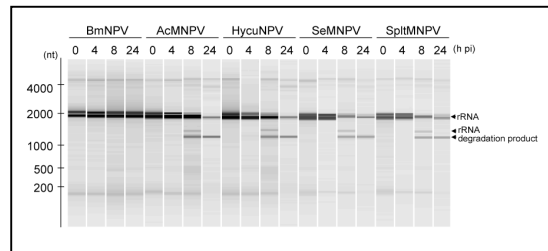
(5) 全タンパク質合成停止の回避に関わるウイルス遺伝子の候補としてカイコ NPV の *p143* 遺伝子 (*bmp143* 遺伝子) が得られたことから、*bmp143* 遺伝子を構成的に発現する BM-N 細胞, BM-N^{bmp143} 細胞, を作出した。この細胞にアメリカシロヒトリ MNPV を含む種々の NPV を感染させることによって、*bmp143* 遺伝子が全タンパク質合成停止を回避し、ウイルス増殖をレスキューするかどうかを検討した。

4. 研究成果

(1) NPV 感染 BM-N 細胞における RNA 分解：

NPV 感染細胞から定量的に RNA を抽出する方法を検討し、アメリカシロヒトリ MNPV 感染にともなう BM-N 細胞の total RNA 量の変動を調査した。その結果、感染の初期段階に BM-N 細胞の total RNA 量は急激に減少することを示した。次に、キャピラリー電気泳動装置 MultiNA を用いて total RNA の電気泳動パターンを解析した。その結果、感染後 0 時間の細胞から抽出した RNA は、約 2000 nt の位

置にメジャーな太いバンドとして検出された。バンドのサイズと RNA 全体に占める割合から、このバンドが rRNA であると判断した。カイコ NPV の感染細胞においては、rRNA のバンドは感染後 24 時間においても変化がなく、感染を通して一定に検出された。一方、アメリカシロヒトリ NPV 感染細胞では、rRNA のバンドは感染後 4 時間から減少が認められ、感染後 48 時間ではほとんど検出できないレベルまで減少した。さらに、感染後 8 時間から、約 1500 nt の位置にバンドが検出され、rRNA が断片化を経て分解されることが明らかとなった(図 1)。ウイルス感染による細胞の RNA の分解が NPV に一般化できる現象であるかどうかを知るため、様々な昆虫細胞と各種 NPV の組み合わせで感染実験を行い、感染細胞における RNA の動態を調査した。その結果、BM-N 細胞において、アメリカシロヒトリ MNPV 以外にも *Autographa californica* NPV, シロイチモジヨトウ MNPV, ハスモンヨトウ MNPV 感染によって、同様の rRNA 分解が誘導されることを明らかにした(図 1)。



(図 1) NPV 感染 BM-N 細胞における RNA の分解. BM-N 細胞に種々の NPV を感染させ、感染後 0, 4, 8, 24 時間後に RNA を抽出して、キャピラリー電気泳動装置により RNA の電気泳動パターンを解析した。rRNA と rRNA の分解断片を図示した

マイマイガ由来の Ld652Y 細胞に AcMNPV やアメリカシロヒトリ MNPV を感染させると全タンパク質合成停止となることが報告されている。そこで、NPV 感染 Ld652Y 細胞の RNA の変動について調査した。その結果、AcMNPV あるいはアメリカシロヒトリ MNPV を感染させた Ld652Y 細胞では、RNA の急激な減少や分解断片は認められなかった。

以上の結果から、BM-N 細胞での全タンパク質合成停止は RNA の分解によっておこることが示された。一方、Ld652Y 細胞での全タンパク質合成停止機構は明らかではないが、BM-N 細胞とは異なることが明らかとなった。

(2) NPV がコードする RNA 分解誘導因子の探索：

NPV 感染細胞における rRNA 分解機構を明らかにすることを目的として、アメリカシロヒ

トリ MNPV のゲノムをすべて網羅するようなコスミドライブラリーを BM-N 細胞に導入し、これらの細胞から抽出した RNA の電気泳動パターンを解析することによって、RNA 分解を誘導するウイルス因子の探索を行った。その結果、アメリカシロヒトリ MNPV がコードする *p143* 遺伝子が、BM-N 細胞の RNA 分解を誘導することが示された。*p143* 遺伝子は全ての NPV に保存されている。そこで、BM-N 細胞において増殖感染となるカイコ NPV と、不全感染となる *Autographa californica* MNPV、シロイチモジヨトウ MNPV、ハスモンヨトウ MNPV の各 *p143* 遺伝子を BM-N 細胞で一過性発現させることによって、RNA 分解が誘導されるかどうかを調査した。その結果、カイコ NPV *p143* 遺伝子は RNA 分解を誘導しなかったが、不全感染となる NPV の *p143* 遺伝子によって RNA 分解が誘導された。

(3) 全タンパク質合成停止の回避に関わるウイルス遺伝子の探索：

AcMNPV にカイコ NPV の *p143* 遺伝子を組換えたウイルス (vAc**mp143**) は、BM-N 細胞で増殖することが報告されている。そこで、*bmp143* 遺伝子を形質転換用ベクターに挿入して、BM-N 細胞に導入し、抗生物質であるピューロマイシンで選抜することによって、*bmp143* を構成的に発現する BM-N 細胞、BM-N^{bmp143} 細胞を作出した。AcMNPV が増殖できるかどうかを調査した結果、AcMNPV は BM-N^{bmp143} 細胞において増殖し、多角体の形成が認められた。そこで、AcMNPV を感染させた BM-N^{bmp143} 細胞の RNA の電気泳動パターンを調査した。その結果、BM-N 細胞で観察された急激な rRNA の減少や分解断片は認められなかった。以上の結果から、*bmp143* 遺伝子産物によって、BM-N 細胞における RNA の分解は回避され、ウイルス増殖がレスキューされることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Yamada, H., Shibuya, M., Kobayashi, M. and Ikeda, M. (2011) Identification of a novel apoptosis suppressor gene from the baculovirus *Lymantria dispar* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *J. Virol.* **85**, 5237-5242.
- ② Nagai, S., FelipeAlves, C. A., Kobayashi, M. and Ikeda, M. (2011) Comparative transient expression assay analysis of *hycu-hr6-* and IE1-dependent regulation

of baculovirus *gp64* early promoters in three insect cell lines. *Virus Res* **155**, 83-90.

- ③ Katou, Y., Yamada, H., Ikeda, M. and Kobayashi, M. (2010) A singleamino acid substitution modulates low-pH-triggered membrane fusion of GP64 protein in *Autographa californica* and *Bombyx mori* nucleopolyhedroviruses. *Virology* **404**, 204-214.
- ④ Shirata, N., Ikeda, M. and Kobayashi, M. (2010) Identification of a *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus (NPV) gene that is involved in global protein synthesis shutdown and restricted *Bombyx mori* NPV multiplication in a *B. mori* cell line. *Virology* **398**, 149-157.
- ⑤ Felipe Alves, C. A., Ishikawa, H., Ikeda, M. and Kobayashi, M. (2009) *hycu-hr6*, a large homologous region of the *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus genome, as a powerful and versatile enhancer in insect expression systems. *Virus Gene* **39**, 403-408.
- ⑥ Ogembo, J. G., Caoili, B. L., Shikata, M., Chaeychomsri, S., Kobayashi, M. and Ikeda, M. (2009) Comparative genomic sequence analysis of novel *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus (NPV) isolated from Kenya and three other previously sequenced *Helicoverpa* spp. NPVs. *Virus Gene* **39**, 261-272.
- ⑦ Ogembo, J. G., Chaeychomsri, S., Caoili, B. A., Ikeda, M. and Kobayashi, M. (2008) Susceptibility of newly established cell lines from *Helicoverpa armigera* to homologous and heterologous nucleopolyhedroviruses. *J. Insect Biotechnol. Sericol.* **77**, 25-34.
- ⑧ Ogembo, J. G., Chaeychomsri, S., Caoili, B. A., Ikeda, M. and Kobayashi, M. (2008) Susceptibility of the cell line Hv-AM1 from *Heliothis virescens* to eight selected nucleopolyhedroviruses. *J. Insect Biotechnol. Sericol.* **77**, 141-150.

[学会発表] (計 20 件)

- ① 伊藤勇弥・光武宏・小林淳・池田素子・小林迪弘 (2010) NPV 感染に伴う *bmp143* 形質転換 BM-N 細胞における RNA 分解。

日本蚕糸学会支部合同大会・東海支部第
62 回大会. てだこホール (浦添市). 11 月
15・16 日.

- ② 池田素子・小林迪弘 (2010) アメリカシ
ロヒトリ核多角体病ウイルス IAP の機能
解析. 第 9 回昆虫病理研究会シンポジウ
ム. 2010 年 9 月 23~25 日. 人材開発セ
ンター富士研修所 (富士吉田市).
- ③ 伊藤勇弥・光武宏・小林淳・池田素子・小
林迪弘 (2010) NPV 感染に伴う BM-N 細
胞の RNA 分解. 第 9 回昆虫病理研究会シ
ンポジウム. 2010 年 9 月 23~25 日. 人
材開発センター富士研修所 (富士吉田市).
- ④ 伊藤勇弥・光武宏・小林淳・池田素子・小
林迪弘 (2010) 核多角体病ウイルス感染に
伴う BM-N 細胞の RNA 分解. 平成 22 年度蚕
糸・昆虫機能利用学術講演会. 信州大学(上
田市). 4 月 3・4 日.
- ⑤ 伊藤弘行・小林迪弘・池田素子 (2010) ア
メリカシロヒトリ核多角体病ウイルス
IAP のドメイン解析. 平成 22 年度蚕糸・
昆虫機能利用学術講演会信州大学(上田).
4 月 3・4 日.
- ⑥ 伊藤勇弥・池田素子・小林迪弘 (2009) 核
多角体病ウイルス感染に伴う昆虫細胞の
RNA 分解. 日本蚕糸学会中部支部第 64 回・
東海支部第 60 回合同大会. 名古屋大学(名
古屋). 12 月 3・4 日.

[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 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

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

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 素子 (IKEDA MOTOKO)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教
授
研究者番号 : 20262892

(2) 研究分担者

小林 迪弘 (KOBAYASHI MICHIHIRO)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授
研究者番号 : 60111837

(3) 連携研究者 なし