

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06069

研究課題名（和文）昆虫ウイルスとミトコンドリアのクロストークの解明

研究課題名（英文）Elucidation of crosstalk between insect viruses and host mitochondria

研究代表者

岩永 将司（Iwanaga, Masashi）

宇都宮大学・農学部・教授

研究者番号：40400717

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）：カイコ核多角体病ウイルス（BmNPV）の感染と宿主ミトコンドリアの関わりを明らかにするため、ウイルス感染細胞のミトコンドリア特異的なタンパク質を2次元電気泳動で解析した。その結果、BmNPVのGP37が宿主ミトコンドリアに局在することを明らかにした。次に、GP37欠損ウイルス株（Bm52D）を作製し、GP37の機能解析を行った結果、GP37がキチン結合能を有するODV構造タンパク質であること、N型糖鎖の翻訳後修飾を受けていることを明らかにした。また、培養細胞では、GP37欠損の影響は認められなかったが、カイコ幼虫では半数致死濃度の低下や半数致死時間の延長が生じることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリアはエネルギー生産の場であり、エネルギー生産系を持たないウイルスにとっては重要な細胞小器官である。そのため、本研究によってミトコンドリアに局在するウイルス由来タンパク質を発見したことは今後の研究展開に大いに期待出来る。また、斃死体で観察される液状化は、バキュロウイルス感染の大きな特徴であり、液状化によって幼虫に内包されていたウイルス封入体が環境中へ拡散するための重要な現象である。本研究で、液状化に関わる新たなウイルス由来因子を同定できたことは、今後のバキュロウイルス学のみならず、表皮溶解のメカニズムという点で大きなインパクトをもたらすと考えられる。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the relationship between the infection of Bombyx mori nucleopolyhedrovirus (BmNPV) and host mitochondria, we analyzed mitochondria-specific proteins derived from BmNPV-infected cells by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and clarified that BmNPV GP37 (BmGP37) localizes to host mitochondria. Next, we constructed a GP37-deletion mutant Bm52D and analyzed the function of GP37. We demonstrated that BmGP37 is an occlusion-derived virus-associated protein with chitin-binding ability and that it is post-translationally modified with N-glycans. Also, although Bm52D had no significant effect in cultured cells, but showed substantial decrease in LC50 and a prolongation of LT50 in larvae.

研究分野：昆虫ウイルス学

キーワード：BmNPV バキュロウイルス 死後溶解

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

### 1. 研究開始当初の背景

カイコ核多角体病ウイルス (BmNPV) は、養蚕業に甚大な被害を及ぼす膿病の原因ウイルスである。BmNPV の感染末期の宿主細胞では特徴的なウイルス封入体が多数形成される。このウイルス封入体の主要な構成タンパク質はポリヘドリンであり、ポリヘドリンタンパク質は全タンパク質量の 30%~50% を占めるほど多量に発現される。そこで、ポリヘドリン遺伝子と外来遺伝子を組換え、ポリヘドリンの代わりに多量の有用タンパク質を生産する外来タンパク質発現系 (BEVS) が開発された。BEVS はインフルエンザウイルスや新型コロナウイルスのワクチンや、獣医薬、診断薬の生産に世界中で利用されている。

ポリヘドリンが感染末期に大量に発現されるメカニズムは不明のままである。例えば、ポリヘドリンの転写には強力なポリヘドリンプロモーターが関与しているが、このプロモーターがどのようなメカニズムで強力な転写を可能にしているのかは明らかでない。また、タンパク質の翻訳過程では ATP が必要となるが、大量なポリヘドリンの翻訳に不可欠なはずの ATP がウイルス感染末期にどのように準備されるのかも明らかではない。真核生物である昆虫の ATP は、クエン酸回路と電子伝達系を有するミトコンドリアで生産される。しかしながら、BmNPV と宿主細胞のミトコンドリアに関わる報告は全くない。

そこで本研究では、BmNPV と宿主細胞のミトコンドリアの関わりに焦点をあて、ウイルス感染細胞由来のミトコンドリアに局在する BmNPV 由来のタンパク質があるのかどうか、そしてその結果ミトコンドリアから見出した BmNPV 由来タンパク質の機能解析に取り組んだ。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、(1) BmNPV が感染した宿主細胞のミトコンドリアに局在する BmNPV 由来タンパク質を同定すること、(2) 宿主細胞のミトコンドリアに局在する BmNPV 由来タンパク質の機能を明らかにすること、である。これらの研究によって、どのようなメカニズムでウイルスタンパク質がミトコンドリアに局在するのか、そして BmNPV 感染細胞で消費される ATP がどのように調達されるのかを明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

(1) BmNPV 非感染細胞と BmNPV 感染細胞のそれぞれからミトコンドリアを精製し、2次元電気泳動で展開することで、ミトコンドリアタンパク質を比較した。その結果、ウイルス感染細胞のミトコンドリア特異的に現れたタンパク質スポットを LC/MS/MS で解析し、当該タンパク質が BmNPV の GP37 であることを明らかにした。

(2) BmNPV の GP37 が宿主ミトコンドリアに及ぼす影響を明らかにするため、GP37 欠損 BmNPV (Bm52D) を作製した。次に、培養細胞における Bm52D と野生株 (WT) の性状を解析した。

(3) カイコ幼虫における Bm52D と野生株 (WT) の性状を解析した。

### 4. 研究成果

(1) BmNPV 非感染細胞と BmNPV 感染細胞のそれぞれからミトコンドリアを精製し、2次元電気泳動で展開した結果、BmNPV 感染細胞のミトコンドリア特異的に現れるタンパク質スポットを発見した。そこで、当該スポットをリジルエンドペプチダーゼでゲル内消化後、LC/MS/MS で解析した。その結果、本タンパク質が BmNPV の GP37 であることを明らかにした。そこで、組換え大腸菌の系によって GP37 の部分配列を発現し、BmNPV GP37 の特異的抗体を作製した。得られた抗体を用いた解析の結果、生化学的手法、及び蛍光細胞免疫学的手法のいずれにおいても、本タンパク質は主として宿主細胞のミトコンドリアに局在することが明らかになった。そこで BmNPV GP37 の機能解析を進めた結果、本タンパク質は他の NPV の GP37 と同様にキチン結合能を有すること、そして N 型糖鎖の翻訳後修飾を受けていることを明らかにした。更に、GP37 が BmNPV の構造タンパク質であるかどうかを明らかにするため、精製ウイルス粒子を用いたウェスタン解析を行った結果、BmNPV GP37 はウイルス封入体由来ウイルス (ODV) の新規構造タンパク質となっていることを明らかにした ([雑誌論文 1] [学会発表 1])。

(2) BmNPV GP37 欠損株 (Bm52D) を作製した。Bm52D と野生株 (WT) をそれぞれ培養細胞に接種することで、GP37 の機能解析を行った。その結果、ウイルスゲノム複製量、ウイルス封入体数、ポリヘドリンタンパク質量、ポリヘドリン RNA 量に関して、Bm52D と WT の間に有意差は認められなかった。また、細胞外に漏洩するウイルス封入体数にも違いが認められず、宿主細胞への病毒性についても大きな差異がないと考えられた。すなわち、ミトコンドリアに局在する BmNPV GP37 をウイルスゲノムから欠損しても、ウイルスの増殖や、宿主細胞への毒性に大きな影響は認められなかった ([学会発表 1])。

(3) Bm52D と野生株 (WT) をそれぞれカイコ幼虫に接種することで、GP37 の機能解析を行った。その結果、Bm52D 感染幼虫では、ウイルス封入体の総数は変わらないものの、血液中のウイルス封入体数が大きく減少していた。これは GP37 を欠損した Bm52D では脂肪体などの宿主器官の崩壊が抑制されていたことを示すものであった。また、孵化幼虫を用いたウイルス封入体の半数致死濃度を算出した結果、Bm52D の半数致死濃度は野生株の 100 分の 1 ほどまで低下することが明らかになった。この結果は、GP37 が中腸の囲食膜の破壊を促進しウイルスの侵入を助けるといった他の NPV の報告に一致するものであった。加えて、5 齢幼虫へと出芽ウイルスを接種することで半数致死時間を算出した結果、Bm52D の半数致死時間は 10 時間ほど有意に延長する

ことが明らかとなった。また、興味深いことに、Bm52D では野生株で通常観察される斃死体の液状化が認められないことが明らかになった。そこで、BmGP37 が細胞外へと分泌されるかどうかを調査した結果、培養細胞においては BmGP37 が細胞外へと分泌されないこと、一方で、BmGP37 はウイルス感染末期の幼虫血液中で検出されることが明らかとなった〔学会発表 1,2〕。これらの結果から、何らかの理由によって幼虫血液へと漏洩した BmGP37 が斃死体の液状化に関与することで半数致死時間にも影響を及ぼすのではないかと推測された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fujimoto, S., Fujimaki, K., Suzuki, T., Katsuma, S., Iwanaga, M.	4. 巻 59 (3)
2. 論文標題 Expression and localization of Bombyx mori nucleopolyhedrovirus GP37	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Virus Genes	6. 最初と最後の頁 457-463
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11262-023-01983-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤巻海飛、岩永将司
2. 発表標題 BmNPV GP37と宿主昆虫の死後溶解に関する研究
3. 学会等名 第7回蚕糸・昆虫機能利用関東地区学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤巻海飛、勝間進、岩永将司
2. 発表標題 BmNPV GP37と宿主昆虫の死後溶解に関する研究
3. 学会等名 令和5年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2023年

〔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
---------	---------