

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14862

研究課題名（和文）バキュロウイルスによる昆虫細胞のタンパク質合成能制御機構の解明と発現系への応用

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular mechanism underlying baculovirus hijacking of intracellular protein synthesis and its application to baculovirus expression system

研究代表者

浜島 りな（HAMAJIMA, Rina）

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号：20784408

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：バキュロウイルスは、宿主細胞の機能を高度に制御し、自身の増殖を遂行する。その最たるものは、単一のウイルスタンパク質（ポリヘドリン）の爆発的な発現誘導であるが、大量発現を担う分子機構の詳細は解明されていない。本研究では、カイコ細胞を研究対象とし、リボソームに着目した解析と宿主タンパク質に着目した解析を行った。その結果、バキュロウイルス感染に伴って細胞のリボソームの生合成量が増加する可能性を示した。また、バキュロウイルス感染を負に制御する宿主タンパク質DHX9を見出した。本研究の成果は、バキュロウイルスがポリヘドリンの大量発現を達成する分子機構の解明に向けた重要な手掛かりになると考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バキュロウイルス発現系は、昆虫を宿主とするバキュロウイルスと昆虫細胞を組み合わせたタンパク質大量発現系であり、様々な分野で利用されている。その一方で、生産性の向上やウイルスフリー発現系の構築が大きな課題となっている。この発現系は、バキュロウイルスによる、宿主細胞タンパク質の合成の遮断と単一のウイルスタンパク質の爆発的な発現誘導を利用したものであるが、それを担う分子機構は解明されていない。本研究の成果は、大量発現を担う分子機構の解明につながる重要な知見であるとともに、今後、得られた知見を既存の発現系に応用することで、生産性を飛躍的に向上させた改良型タンパク質発現系の開発につながると考える。

研究成果の概要（英文）：Baculoviruses hijack host cell functions to accomplish their own propagation. The most prominent phenomenon is the explosive induction of expression of a single viral protein (polyhedrin), but the details of the molecular mechanism responsible for this have not been elucidated. In this study, we conducted two analyses, one focusing on the ribosome and the other on the host protein, using silkworm cells. The results showed that the biosynthesis of cellular ribosomes may increase with baculovirus infection. We also found that the host protein DHX9 negatively regulates baculovirus infection. The findings of this study provide an important insight into the molecular mechanism by which baculoviruses achieve the high level of polyhedrin expression.

研究分野：昆虫科学

キーワード：バキュロウイルス 昆虫細胞 タンパク質発現系 リボソーム カイコ

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

バキュロウイルスは、主に昆虫に病気を引き起こす DNA ウイルスであり、日本では益虫であるカイコの保護を、欧米では害虫防除への利用を目的として、1940年代から研究が進められてきた。1970年代に昆虫細胞の培養技術が開発されたことをきっかけに、研究が急速に進展し、現在基礎から応用にわたる様々な分野でタンパク質の大量発現に利用されているバキュロウイルス発現系の開発へとつながった (Maeda *et al.*, 1985; Smith *et al.*, 1983)。一方で、目的タンパク質の分解や凝集、または未知の要因により、大量発現が難しい事例も報告されており、生産性向上のためのブレイクスルーが求められている。

バキュロウイルスは、80~180 kbp の 2 本鎖 DNA をゲノムとしてもち、ゲノム上にコードされる 100 個以上のタンパク質を駆使して、宿主となる細胞の機能を高度に制御し、自身の増殖を遂行する。その最たるものは、タンパク質合成能の制御、すなわち、細胞タンパク質の合成の遮断と、単一のウイルスタンパク質 (ポリヘドリン) の爆発的な発現誘導であり、感染の最終段階では、ポリヘドリンは結晶体 (多角体) を形成し、その量は細胞の全タンパク質量の約 30-50% という驚くべき割合になる。このような単一タンパク質の大量発現は、真核細胞において他に例がなく、上述のバキュロウイルス発現系は、この現象を利用してタンパク質の大量発現を行うものである。しかし、大量発現を担う分子機構の詳細は不明である。

2. 研究の目的

バキュロウイルスが単一のウイルスタンパク質の大量発現をどのように達成するのかを明らかにすることを目的として行った。本研究では、チョウ目のモデル昆虫であるカイコ由来の培養細胞 (カイコ細胞) を研究対象とし、(1) 細胞におけるタンパク質合成の中心として機能するリボソームに着目した解析、(2) ウイルスタンパク質の大量発現に関与する宿主タンパク質の同定と機能解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 細胞におけるタンパク質合成の中心として機能するリボソームに着目した解析

昆虫細胞のリボソーム精製法の確立に取り組み、バキュロウイルス感染が宿主細胞のリボソームに与える影響を調査した。

(2) ウイルスタンパク質の大量発現に関与する宿主タンパク質の同定と機能解析

まず、バキュロウイルス感染昆虫細胞において大量発現するタンパク質の産生レベルを簡易的に測定するため、ポリヘドリンプロモーターによりレポーター遺伝子を発現するレポーターウイルスを作出した。次に、レポーターウイルスを用いて、ウイルスタンパク質の大量発現を負に制御する機能をもつと予測される宿主タンパク質の同定を試み、同定された候補タンパク質の機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) 細胞におけるタンパク質合成の中心として機能するリボソームに着目した解析

リボソームの分画の一般的な手法であるショ糖密度勾配遠心法による検討を進めたが、分画の再現性が低いという問題が生じた。そこで、サイズ排除クロマトグラフィ (SEG) を利用したリボソームの分画 (Yoshikawa *et al.*, 2018) について、カイコ細胞を用いた検討を行った。その結

果、SEG を用いると、再現度高く、ポリソーム、80S リボソーム、60S ならびに 40S リボソームサブユニットを分画できることがわかった。そこで、バキュロウイルスを感染させたカイコ細胞を経時的にサンプリングし、SEG を用いたリボソームのプロファイルの調査を行った。その結果、バキュロウイルス感染に伴ってリボソーム量が増加することが示唆された。以上の結果から、バキュロウイルスの感染により、カイコ細胞において、リボソーム生合成量の増加が誘導されている可能性が示された。

(2) ウイルスタンパク質の大量発現に關与する宿主タンパク質の同定と機能解析

ポリヘドリンプロモーターによりレポーター遺伝子を発現するレポーターバキュロウイルスを作出した。レポーターウイルスをカイコ細胞に感染させ、蛍光強度を経時的に測定した。その結果、昆虫細胞種によってタンパク質の産生のスピードが異なることが示唆された。次に、レポーターウイルスを用いて、ウイルスタンパク質の大量発現を負に制御する機能をもつと予測される宿主タンパク質のスクリーニングを行った。その結果、バキュロウイルス感染を負に制御する機能をもつと予測される宿主 (カイコ) のタンパク質として、DHX9 (Bm-DHX9) を見出した。DHX9 は、哺乳動物において、細胞質におけるウイルス DNA の認識を担い、免疫応答を誘導することが報告されている (Kim et al., 2010) が、Bm-DHX9 についての研究報告はされていなかった。Bm-DHX9 について機能解析を進めた結果、Bm-DHX9 の発現を抑制すると、ウイルスタンパク質の発現量が有意に増加することが明らかとなった。以上の結果から、Bm-DHX9 は、バキュロウイルス感染を負に制御する宿主因子であることが示され、これらの成果は国際誌にて発表した (Kudome et al., 2023)。ここで行われた研究は、当初の研究計画とは異なるものではあるが、昆虫細胞における免疫応答の抑制というアプローチが、バキュロウイルス発現系における目的タンパク質発現量の上昇の達成をもたらす可能性を示したと考えている。また、今回見出した Bm-DHX9 に着目した研究を今後遂行していくことで、未解明である昆虫におけるウイルス由来 DNA の認識機構の理解が進み、昆虫のウイルスに対する防御機構に関する研究を大きく進展させることが期待される。

参考文献 (本研究の成果以外):

- Kim, T., Pazhoor, S., Bao, M., Zhang, Z., Hanabuchi, S., Facchinetti, V., Bover, L., Plumas, J., Chaperot, L., Qin, J., Liu, Y. J. (2010) Aspartate-glutamate-alanine-histidine box motif (DEAH)/RNA helicase A helicases sense microbial DNA in human plasmacytoid dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(34), 15181-15186.
- Maeda, S., Kawai, T., Obinata, M., Fujiwara, H., Horiuchi, T., Saeki, Y., Sato, Y., Furusawa, M. (1985) Production of human α -interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nature*, 315(6020), 592-594.
- Smith, G. E., Summers, M. D., Fraser, M. J. (1983) Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Molecular and cellular biology*, 3(12), 2156-2165.
- Yoshikawa, H., Larance, M., Harney, D. J., Sundaramoorthy, R., Ly, T., Owen-Hughes, T., Lamond, A. I. (2018) Efficient analysis of mammalian polysomes in cells and tissues using Ribo Mega-SEC. *Elife*, 7, e36530.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Kudome Nao, Ito Aika, Ota Ayaka, Kobayashi Michihiro, Ikeda Motoko, Hamajima Rina	4. 巻 147
2. 論文標題 The DEAD/H-box helicase DHX9 contributes to suppression of Bombyx mori nucleopolyhedrovirus propagation in B. mori cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Developmental & Comparative Immunology	6. 最初と最後の頁 104897 ~ 104897
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dci.2023.104897	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 -

1. 著者名 Isobe Shiho, Ota Ayaka, Takata Shiori, Hamajima Rina, Makino Shizuka, Kobayashi Jun, Kobayashi Michihiro, Ikeda Motoko	4. 巻 73
2. 論文標題 NISES-AnPe-428 cell line derived from the Chinese oak silkworm Antheraea pernyi is permissive for multiple nucleopolyhedrovirus species from insects of four different families	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cytotechnology	6. 最初と最後の頁 643-655
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10616-021-00485-0	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 -

1. 著者名 Justine Bennette H. Millado, Rina Hamajima, Waka Sugiura, Shizuka Makino, Michihiro Kobayashi, Motoko Ikeda	4. 巻 90
2. 論文標題 Identification and characterization of Bombyx mori homologs of Bonus, Mdm2, Rad6, Sce, and Synoviolin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Insect Biotechnology and Sericology	6. 最初と最後の頁 21-32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11416/jibs.90.2_021	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24件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 原屋正龍・坂上裕喜・池田素子・浜島りな
2. 発表標題 AcMNPV 感染カイコ細胞において検出されるrRNA分解断片の解析
3. 学会等名 令和6年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 坂上裕喜・池田素子・浜島りな
2. 発表標題 AcMNPV感染カイコ細胞におけるリボソームタンパク質の挙動の調査
3. 学会等名 令和6年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 北谷華穂・池田素子・浜島りな
2. 発表標題 LdMNPVのアポトーシス抑制因子Apsupと相互作用する細胞因子の探索
3. 学会等名 令和6年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 原屋正龍・池田素子・浜島りな
2. 発表標題 AcMNPV感染カイコ細胞におけるrRNA分解の誘導を担う分子機構の解析
3. 学会等名 日本蚕糸学会中部支部第79回・東海支部第75回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 久土目奈央・池田素子・浜島りな
2. 発表標題 BmNPVの増殖抑制に関するカイコDHX9の下流因子の探索
3. 学会等名 第80回昆虫病理研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 原屋正龍・池田素子・浜島りな
2. 発表標題 AcMNPV感染カイコ細胞におけるリボソームRNA 分解断片の配列解析
3. 学会等名 第80回昆虫病理研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 浜島りな
2. 発表標題 Antiviral defenses of the silkworm cells against baculovirus infection
3. 学会等名 JSPS国際交流事業二国間セミナー シンポジウム Frontiers of insect virus research contributing to pesticide reduction and training the next generation researchers (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 河合 祐作・浜島 りな・池田 素子
2. 発表標題 AcMNPV感染に伴うカイコ細胞IAP1の減少を担う分子機構の解析
3. 学会等名 第79回昆虫病理研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原屋 正龍・池田 素子・浜島 りな
2. 発表標題 AcMNPV感染カイコ細胞におけるリボソームRNAの分解機構の解析
3. 学会等名 第79回昆虫病理研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 久土目奈央・浜島りな・伊東愛花・池田素子
2. 発表標題 BmNPV感染カイコ細胞におけるウイルスDNAセンサー相同体の機能解析
3. 学会等名 第79回昆虫病理研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河合 祐作・浜島 りな・池田 素子
2. 発表標題 核多角体病ウイルスIE-1がカイコ細胞iap1遺伝子の発現に及ぼす影響の調査
3. 学会等名 日本蚕糸学会 中部支部第78回・東海支部第74回研究発表会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 原屋 正龍・池田 素子・浜島 りな
2. 発表標題 AcMNPV感染カイコ細胞におけるリボソームRNAの切断部位の同定
3. 学会等名 日本蚕糸学会 中部支部第78回・東海支部第74回研究発表会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 河合 祐作・浜島 りな・池田 素子
2. 発表標題 NPVのIE-1がカイコ細胞iap1遺伝子のmRNA量に及ぼす影響の調査
3. 学会等名 令和5年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 (2023年3月開催)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 原屋 正龍・池田 素子・浜島 りな
2. 発表標題 AcMNPV感染カイコ細胞において認められるリボソームRNA分解断片の解析
3. 学会等名 令和5年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 (2023年3月開催)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 磯部 詩保・浜島 りな・小林 淳・池田 素子
2. 発表標題 サクサン培養細胞における6種の核多角体病ウイルスの感染性調査
3. 学会等名 令和5年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 (2023年3月開催)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 浜島 りな・原屋 正龍・池田 素子
2. 発表標題 カイコ細胞におけるrRNA分解誘導に関与する核多角体病ウイルスP143タンパク質 の立体構造予測
3. 学会等名 令和5年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 (2023年3月開催)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 浜島りな
2. 発表標題 昆虫の防御応答から迫るバキュロウイルスの宿主決定メカニズム
3. 学会等名 日本農業学会第 47 回大会 (共催: 第 21 回農業バイオサイエンス研究会) (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河合祐作・浜島りな・小林迪弘・池田素子
2. 発表標題 AcMNPV感染時に誘導されるカイコ細胞IAP1の減少機構の解析
3. 学会等名 日本蚕糸学会第92回学会 令和4年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久土目奈央・浜島りな・小林迪弘・池田素子
2. 発表標題 BmNPV感染カイコ細胞におけるカイコDHX9相同体の機能解析
3. 学会等名 日本蚕糸学会第92回学会 令和4年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉浦和香・浜島りな・牧野静花・MILLADO Justine・Bennette H・小林迪弘・池田素子
2. 発表標題 カイコ細胞におけるアポトーシス誘導を担うBm-p53のドメイン解析
3. 学会等名 日本蚕糸学会第92回学会 令和4年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河合祐作・浜島りな・小林迪弘・池田素子
2. 発表標題 AcMNPV感染カイコ細胞において誘導される細胞IAP1の減少機構の解析
3. 学会等名 日本蚕糸学会中部支部第77回・東海支部第73回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久土目奈央・ 浜島りな・ 小林迪弘・ 池田素子
2. 発表標題 BmNPV感染カイコ細胞におけるウイルスDNA認識受容体相同体の機能解析
3. 学会等名 日本蚕糸学会中部支部第77回・東海支部第73回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉浦和香・ 浜島りな・ 牧野静花・ MILLADO Justine・ Bennette H・ 小林迪弘・ 池田素子
2. 発表標題 カイコ細胞におけるアポトーシス誘導を担うBm-p53の機能解析
3. 学会等名 日本蚕糸学会中部支部第77回・東海支部第73回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浜島りな
2. 発表標題 カイコ細胞のリボソームRNA分解による抗ウイルス応答
3. 学会等名 日本ウイルス学会 北海道支部会 第54回夏季シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021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
---------	---------