

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22380033

研究課題名（和文） バキュロウイルスをモデルとした長鎖非コード RNA の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of baculoviral long non-coding RNAs

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・准教授

研究者番号：20378863

研究成果の概要（和文）：昆虫ウイルスの一種であるバキュロウイルスは、100kbp 以上の 2 本鎖 DNA をゲノムとして持つ大型の DNA ウイルスであり、高度な宿主制御を行うことが知られている。バキュロウイルスゲノムには 100 個以上のタンパク質コード遺伝子が存在するが、一部のグループが提唱している microRNA をのぞいて、非コード RNA の存在は知られていない。申請者は、ウイルス感染培養細胞のトランスクリプトーム解析によって、既報の ORF をコードしない長鎖非コード RNA がウイルスゲノムから転写されていることを発見した。バイオインフォマティクス解析により 100 個以上の非コード転写ユニットを同定し、そのうちの一部は、遺伝子 ORF の 5' 端にクラスターをなしてマップされたことから、ORF の転写制御に何らかの役割を果たしていると考えられた。さらに、発現量が多い転写物に関して、ノザンプロット解析を行うとともに、プロモーターノックアウトウイルスの作成を行った。現在までに 13 種類の変異ウイルスの作成に成功しているが、それらのほとんどが、野生株と比較して、ウイルス増殖に異常が認められた。以上のことから、バキュロウイルスのゲノム中に存在する長鎖非コード RNA はゲノムからリークした単なる転写産物ではなく、「機能性」RNA として存在していることが判明した。

研究成果の概要（英文）：The baculoviruses possess a large circular, dsDNA genome encapsidated within a rodshaped virion. During the transcriptome analysis of baculovirus-infected cells, we identified more than one hundred of putative long non-coding RNAs (ncRNAs), most of which are expressed from recognized baculovirus early or late promoter motifs. To understand better the roles of these putative ncRNAs, we have generated 13 mutant NPVs whose ncRNA promoters are inactivated. We found that most of the mutants showed defects in virus growth, indicating that baculovirus long ncRNAs play important roles in virus propagation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2011 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2012 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
総計	13,300,000	3,990,000	17,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：バキュロウイルス・非コード RNA・カイコ・昆虫ウイルス・病原性

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、100kbp 以上の 2 本鎖 DNA をゲノムとして持つ大型の DNA ウイルスであり、高度な宿主制御を行うことが知られている。バキュロウイルスゲノムには 100 個以上のタンパク質コード遺伝子が存在するが、一部のグループが提唱している microRNA をのぞいて、非コード RNA の存在は知られていなかった。そのような状況の下、研究代表者は、ウイルス感染培養細胞のトランスクリプトーム解析によって、既報の ORF をコードしない長鎖非コード RNA (long ncRNAs) がウイルスゲノムから転写されている可能性を見いだしていた。他の SV40 や EB ウイルスなどでは、短鎖非コード RNA である microRNA の存在が知られていたが、ウイルス由来の long ncRNAs の報告は皆無であった。

2. 研究の目的

バキュロウイルスをモデルとして、現在までに全く報告がないウイルス由来 long ncRNAs の機能解析を行い、それらのウイルス感染時における役割を解明する。

3. 研究の方法

- (1) バイオインフォマティクス解析、およびノザンプロットにより、long ncRNAs がバキュロウイルスの early または late プロモーターから発現していることを確認する。
- (2) 発現量が多いユニットを中心に、ncRNA のプロモーターをノックアウトした変異体を培養細胞における相同組換えによって作成する。
- (3) プロモーターノックアウトウイルスの性状を培養細胞、およびカイコ幼虫を用いて、詳細に調査する。

4. 研究成果

- (1) ウイルス由来 long ncRNAs であると考えられた転写ユニットは、ほぼすべてバキュロウイルスの early または late プロモーターモチーフ内から転写されていることが判明した。また、ストランド特異的プローブを用いたノザンプロットにより、それらが実際にウイルス感染時に発現していることを確認した。
- (2) プロモーターノックアウトウイルスを 13 種類作成することに成功した。
- (3) プロモーターノックアウトウイルスのほとんどは、培養細胞かカイコ個体において、ウイルス増殖の低下が認められた。その中に

は、経口感染力が低下したり、半数致死時間が延長しているものも存在した。

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 13 件) すべて査読あり

1. Ishihara G, Shimada T, and Katsuma S., Functional characterization of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus CG30 protein. *Virus Research*, 2013, 174, 52-59. DOI:10.1016/j.virusres.2013.02.014
2. Katsuma S and Shimada T., Comparative studies of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus infection in BmN4 cell lines maintained in different laboratories. *Journal of Insect Biotechnology and Sericulture*, 2012, 81, 7-12
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jibs/81/1/81_1_007/pdf
3. Katsuma S, Koyano Y, Kang W-K, Kokusho R, Kamita SG, and Shimada T., The baculovirus uses a captured host phosphatase to induce enhanced locomotory activity in host caterpillars. *PLoS Pathogens*, 2012, 8, e1002644
DOI:10.1371/journal.ppat.1002644
4. Hori T, Kiuchi T, Shimada T, Nagata M, and Katsuma S., Silkworm plasmatocytes are more resistant than other hemocyte morphotypes to *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus infection. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2013, 112, 102-104.
DOI:10.1016/j.jip.2012.09.004
5. Kang W-K, Katsuma S, Matsuda-Imai N, Kurihara M, Yoshiga T, Shimada T, and Matsumoto S., Identification and characterization of host factors interacting with *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus ORF8. *Journal of Microbiology*, 2012, 50, 469-477.
DOI: 10.1007/s12275-012-2010-z
6. Katsuma S, Kobayashi J, Koyano Y, Matsuda-Imai N, Kang W-K, and Shimada T., Baculovirus-encoded protein BV/ODV-E26 determines tissue tropism and virulence in lepidopteran insects. *Journal of*

- Virology*, 2012, 86, 2545-2555.
DOI: 10.1128/JVI.06308-11
7. Iwanaga M, Hitotsuyama T, Katsuma S, Ishihara G, Daimon T, Shimada T, Imanishi S, and Kawasaki H., Infection study of *Bombyx mori* macula-like virus (BmMLV) using a BmMLV-negative cell line and an infectious cDNA clone. *Journal of Virological Methods*, 2012, 179, 316-324.
DOI: 10.1016/j.jviromet.2011.11.016
 8. Kokusho R, Zhang C-X, Shimada T, and Katsuma S., Comparative analysis of budded virus infectivity of *Bombyx mandarina* and *B. mori* nucleopolyhedroviruses. *Virus Genes*, 2011, 43, 313-317.
DOI: 10.1007/s11262-011-0623-7
 9. Tabunoki H, Ode H, Banno Y, Katsuma S, Shimada T, Mita K, Yamamoto K, Sato R, Ishii-Nozawa R, and Satoh J-I., BmDJ-1 is a key regulator for the developmental oxidative modification of the silkworm, *Bombyx mori*. *PLoS One*, 2011, 6, e17683
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0017683>.
 10. Katsuma S, Tsuchida A, Imai-Matsuda N, Kang W-K, and Shimada T., Role of the ubiquitin-proteasome system in *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus infection. *Journal of General Virology*, 2011, 92, 699-705.
DOI: 10.1099/vir.0.027573-0
 11. Katsuma S, Kang W-K, Shin-i T, Ohishi K, Kadota K, Kohara Y, and Shimada T., Mass identification of transcriptional units expressed from the *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus genome. *Journal of General Virology*, 2011, 92, 200-203.
DOI: 10.1099/vir.0.025908-0
 12. Iwasaki S, Kobayashi M, Yoda M, Sakaguchi Y, Katsuma S, Suzuki T, and Tomari Y., Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. *Molecular Cell*, 2010, 39, 292-299.
DOI: 10.1016/j.molcel.2010.05.015
 13. Nakanishi T, Shimada T, and Katsuma S., Characterization of a *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus mutant lacking both fp25K and p35. *Virus Genes*, 2010, 41, 144-148.
DOI: 10.1007/s11262-010-0492-5
- [学会発表] (計 17 件) すべて査読なし
1. 石原玄基・嶋田透・勝間進、バキュロウイルスにおける機能性長鎖非コードRNAの探索、日本蚕糸学会第83回大会、2013年3月18日(月)-19日(火)、農林水産技術会議事務局筑波事務所本館(茨城県つくば市観音台2-1-9)
 2. 石原玄基・嶋田透・勝間進、*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus *cg30* の機能解析、第10回昆虫病理研究会、2012年9月21日(金)~23日(日)、帯広畜産大学大講義室(北海道帯広市稲田町西2線-11)
 3. 勝間進・小林淳・嶋田透、増殖組織特異性を規定するバキュロウイルス遺伝子の同定、第10回昆虫病理研究会、2012年9月21日(金)~23日(日)、帯広畜産大学大講義室(北海道帯広市稲田町西2線-11)
 4. Genki Ishihara, Toru Shimada, Susumu Katsuma, Molecular dissection of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus *cg30*, XXIV International Congress of Entomology, The EXCO-Daegu Convention Center, Daegu, Korea, August 19-24, 2012
 5. 石原玄基・嶋田透・勝間進、カイコ核多角体病ウイルス *cg30* の機能解析、日本蚕糸学会第82回大会、2012年3月18日(日)~19日(月)、九州大学箱崎キャンパス文系地区(福岡県福岡市東区箱崎6-10-1)
 6. 國生龍平・嶋田透・勝間進、ポリヘドリンプロモーターからの転写が BmNPV の宿主行動制御に果たす役割、日本蚕糸学会第82回大会、2012年3月18日(日)~19日(月)、九州大学箱崎キャンパス文系地区(福岡県福岡市東区箱崎6-10-1)
 7. 石原玄基・岩永将司・川崎秀樹・今西重雄・嶋田透・勝間進、*Bombyx mori* macula-like virus における 5' UTR の機能解析、第73回昆虫病理研究会、2011年12月3日(土)、東京大学農学部1号館2階8番講義室(東京都文京区弥生1-1-1)
 8. 國生龍平・嶋田透・勝間進、ポリヘドリンプロモーターからの転写が BmNPV の宿主行動制御に果たす役割、第73回昆虫病理研究会、2011年12月3日(土)、東京大学農学部1号館2階8番講義室(東京都文京区弥生1-1-1)
 9. 土田歩未・嶋田透・勝間進、バキュロウイルス感染におけるユビキチンリガーゼ IE2 の役割、第73回昆虫病理研究会、2011年12月3日(土)、東京大学農学部1号館2階8番講義室(東京都文京区弥生1-1-1)
 10. Susumu Katsuma, Baculoviruses control host physiology and behavior by captured cellular homologs, Silkworm Genome Symposium - New Silk Road: Silkworm Genome to Sustainable Agriculture, November 9-10, 2010,

Tsukuba Center for Institutes, Tsukuba,
Ibaraki, Japan

11. 國生龍平・小谷野泰枝・嶋田透・勝間進、バキュロウイルスの宿主行動制御におけるポリヘドリンプロモーターの役割、2011年 昆虫ポストゲノム研究会 ミニシンポジウム「昆虫ポストゲノム研究の最近のトピックス」、2011年9月12日～13日、九州大学農学部4号館1階110号講義室(福岡市東区箱崎6-10-1)
12. 土田歩未・姜媛瓊・松田(今井)典子・嶋田透・勝間進、バキュロウイルス感染におけるユビキチン・プロテアソーム経路の役割、第9回昆虫病理研究会シンポジウム・第16回BT研究会 2010年9月23日(木)～25日(土)、富士C a 1 m(財団法人人材開発センター富士研修所、山梨県富士吉田市)
13. 國生龍平・小谷野泰枝・嶋田透・勝間進、BmNPVの宿主行動制御における *polh* 領域の役割、第9回昆虫病理研究会シンポジウム・第16回BT研究会 2010年9月23日(木)～25日(土)、富士C a 1 m(財団法人人材開発センター富士研修所、山梨県富士吉田市)
14. 小谷野泰枝・姜媛瓊・嶋田透・勝間進、バキュロウイルスによる宿主行動制御における PTP タンパク質の役割、第9回昆虫病理研究会シンポジウム・第16回BT研究会 2010年9月23日(木)～25日(土)、富士C a 1 m(財団法人人材開発センター富士研修所、山梨県富士吉田市)
15. 勝間進、昆虫ウイルスの巧みな宿主制御戦略、日本昆虫科学連合設立記念日本学会議公開シンポジウム「新時代の昆虫科学を拓く」2010年7月24日、日本学会議講堂(東京都港区六本木 7-22-34)
16. 勝間進・小谷野泰枝(東大院農)・小林淳・嶋田透、エクジソン糖転移酵素はカイロ個体におけるウイルス増殖部位の決定に関与する、日本蚕糸学会第80回記念大会、2009年4月3日(土)-4日(日)、信州大学繊維学部(長野県上田市常田 3-15-1)
17. 土田歩未・姜媛瓊・松田(今井)典子・嶋田透・勝間進、バキュロウイルス感染におけるユビキチン・プロテアソーム経路の役割、日本蚕糸学会第80回記念大会、2009年4月3日(土)-4日(日)、信州大学繊維学部(長野県上田市常田 3-15-1)

[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]

ホームページ等

<http://papilio.ab.a.u-tokyo.ac.jp/igb/>

6. 研究組織

(1) 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・准教授

研究者番号：20378863

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし