

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24年 5月 8日現在

機関番号：12201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780045

研究課題名（和文） BmMLV 由来の特定と持続感染メカニズムの解明

研究課題名（英文） Analysis of the origin and the mechanism of persistent infection of BmMLV

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

研究成果の概要（和文）：カイコ由来培養細胞株へ持続感染している *Bombyx mori* macula-like virus (BmMLV) の由来を明らかにするために、本研究においては、まず本ウイルスの宿主域に着目した。特に、BmMLV がカイコヤツマジロクサトウなどの昆虫由来培養細胞だけでなく種々の哺乳類由来培養細胞で増殖可能か調査した。その結果、BmMLV はカイコのみで増殖可能であることが明らかとなった。また、BmMLV 陰性 BmVF 細胞を用いた組換えバキュロウイルス発現系は、既に実用化されている BmN 細胞と同等の発現量、翻訳後修飾能を有することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：To identify the origin of *Bombyx mori* macula-like virus, we analyzed the host range of BmMLV. Several insect- and mammalian-derived cell lines were inoculated with BmMLV and analyzed for the propagation of BmMLV. We showed that only *B. mori*-derived cell lines were permissive to BmMLV persistent infection. Also, BmMLV-negative BmVF cells were inoculated with BmNPV. We identified that the recombinant protein was fully expressed and suitable post-translational modification was occurred in BmNPV-infected BmVF cells. These data showed that BmMLV replicates only in *B. mori*-derived cells and BmVF cell line was suitable for baculovirus expression vector system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：BmMLV、マキユラウイルス、宿主域、持続感染、培養細胞、バキュロウイルス発現系、カイコ、バキュロウイルス

1. 研究開始当初の背景

Bombyx mori macula-like virus (BmMLV) は、2005年に発見された新規のRNAウイルスである（文献1）。BmMLVは

植物ウイルスであるチモウイルス科マキユラウイルス属の *Grapevine fleck virus* に高い相同性を示し、そのゲノム構造から植物ウイルスであると考えられている。しかしなが

ら、BmMLV は鱗翅目昆虫であるカイコ由来培養細胞に特異的に持続感染しており、どのような経路でカイコ由来培養細胞へ混入したのか、そしてどのようなメカニズムで昆虫の培養細胞へ適応したのかは非常に興味深い。

そこで、BmMLV の感染メカニズムを明らかにするために、研究代表者らはまず BmMLV がどのような細胞へ感染しているのかを調査した。その結果、供試したカイコ由来培養細胞の全てに BmMLV が持続感染していることが明らかとなった (図 1; 文献 2)。そこでカイコ胚より、新しく BmMLV 陰性の BmVF 細胞を樹立した。感染実験の結果、BmVF 細胞は、BmMLV の持続感染を許容することが明らかとなり、本細胞によって BmMLV の感染実験系を構築することができた。

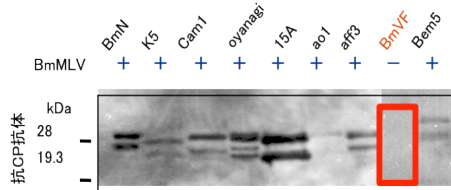


図 1. カイコ由来各種培養細胞における BmMLV の感染調査の結果。新たに樹立した BmVF (赤枠) 細胞以外の全てでウイルスのシグナルが検出された。

更に本ウイルスの解析を進めるために BmMLV の感染性 cDNA クローンをマキユラウイルス属で初めて構築 (図 2) し、リバーシジェネティクス (逆遺伝学) による解析を行うことが出来るようになった。

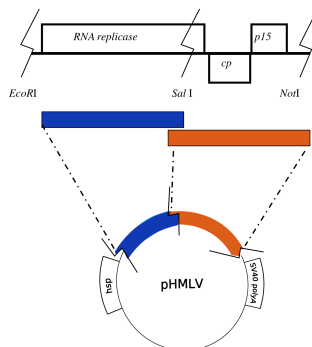


図 2. BmMLV の感染性 cDNA クローンの構築

文献 1; Katsuma, S., Tanaka, S., Omuro, N., Takabuchi, L., Daimon, T., Imanishi, S., Yamashita, S., Iwanaga, M., Mita, K., Maeda, S., Kobayashi, M. and Shimada, T. 2005 Novel macula-like virus identified in *Bombyx mori* cultured cells. *J. Virol.* 79: 5577-5584.

文献 2; Iwanaga, M., Hitotsuyama, T., Katsuma, S., Ishihara, G., Daimon, T., Shimada, T., Imanishi, S., Kawasaki, H. 2012 Infection study of *Bombyx mori*

macula-like virus (BmMLV) using a BmMLV-negative cell line and an infectious cDNA clone. *J. Viro. Methods* 179: 316-324.

2. 研究の目的

上記の様に、BmMLV の解析は、BmMLV 陰性細胞株の樹立や BmMLV の感染性クローンの構築によって端緒が開かれたばかりであり、未だ本ウイルスの混入源や、持続感染メカニズムは明らかではない。特にカイコ由来培養細胞株は組換えバキュロウイルスの宿主として獣医薬の生産などで実用化されていることから、BmMLV がカイコ由来培養細胞のみに感染性を有するのか、他の昆虫由来培養細胞や哺乳類由来培養細胞に感染性を有するかどうかは重要な知見であり、このような BmMLV の宿主域を明らかにすることは本ウイルスの混入源を明らかにすることにつながる。そこで、本研究ではまず、BmMLV を様々な培養細胞株へ感染させ、ウイルスのゲノム複製が起こるかどうかを詳細に調査することにした。また、研究代表者らの樹立した BmMLV 陰性 BmVF 細胞が、組換えバキュロウイルス発現系で有用であるかどうか、更に BmMLV の持続感染がバキュロウイルスの感染にどのような影響を与えるのか調査することで、カイコバキュロウイルスを利用した組換えバキュロウイルス発現系の発展に寄与することを目的とした。

3. 研究の方法

BmMLV の宿主域に関しては、昆虫由来培養細胞だけでなく、9 種類の哺乳類由来培養細胞へと BmMLV を接種し、ゲノムの複製が行われるかどうかリアルタイム PCR、及びノーザンブロットにより調査した。また、BmVF 細胞がバキュロウイルス発現系で有用であるかどうかについては、マウスインターロイキン 3 を組込んだ組換えバキュロウイルスを感染させ、その発現量や翻訳後修飾の有無について、既存の培養細胞と比較した。更に、BmMLV の持続感染がバキュロウイルスの感染にどのような影響を与えるのかについては、BmMLV の有無によってバキュロウイルスの増殖量やポリヘドリンプロモーター活性に差が生じるかどうかを調査した。

4. 研究成果

BmMLV の宿主域に関しては、カイコ由来培養細胞以外の、供試した全ての昆虫由来培養細胞、及び哺乳類由来培養細胞で BmMLV の増殖は認められなかった (図 3)。また、ウイルスの吸着性に関しては、カイコ由来培養細胞も含めどの細胞にも差異は認められず、BmMLV の宿主域は、宿主細胞への吸着後に決定されていることが示唆された。これらの結

果は、本ウイルスがカイコ由来培養細胞のみを宿主としていることを強く示唆するものである。

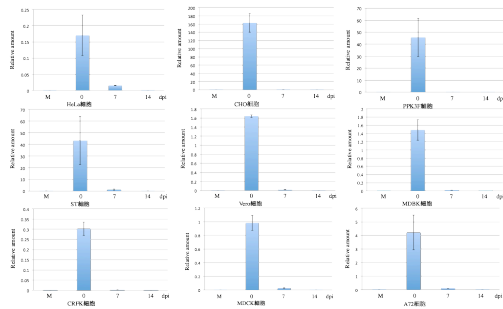


図 3. 様々な培養細胞における BmMLV の増殖試験 (リアルタイム PCR 解析)

BmMLV 陰性 BmVF 細胞が、組換えバキュロウイルス発現系で有用であるかどうかについてマウスインターロイキン3を発現させた結果、その発現量、翻訳後修飾、分泌能は既存のカイコ由来培養細胞の中で最も頻りに用いられる BmN 細胞と遜色ないことが明らかとなった (図 4、5)。これらの結果は BmVF 細胞を用いることで BmMLV フリーのバキュロウイルス発現系を開発することが可能であることを示すものである。

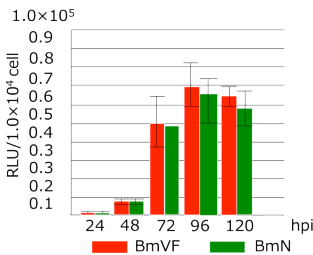


図 4. BmMLV 陰性 BmVF 細胞におけるバキュロウイルスポリヘドリンプロモーター活性

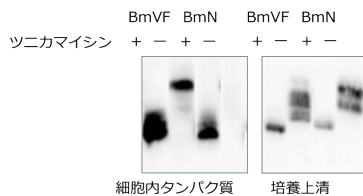


図 5. 組換えバキュロウイルス発現系によって発現したマウスインターロイキン3の翻訳後修飾、及び分泌能の比較

BmMLV の持続感染がバキュロウイルスの増殖にどのような影響を与えるのか調査するために、ウイルス陰性の BmVF 細胞と、BmVF 細胞へ BmMLV を持続感染させた BmVF-MLV 細胞へカイコバキュロウイルスを感染させ、バキュロウイルスの増殖量やポリヘドリンプロモーター活性を調査した。その結果、BmMLV の持続感染によってバキュロウイルスの増

殖量は低下するだけでなく、ポリヘドリンプロモーター活性も低下することが明らかとなった (図 6、7)。これらの結果は、BmMLV の持続感染はバキュロウイルスには負に働いており、既存のカイコ由来培養細胞から BmMLV を除去することによって発現量の増大が可能となることを示唆するものである。

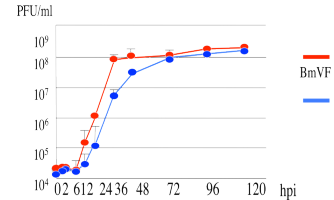


図 6. BmMLV の有無によるバキュロウイルスの増殖量の比較

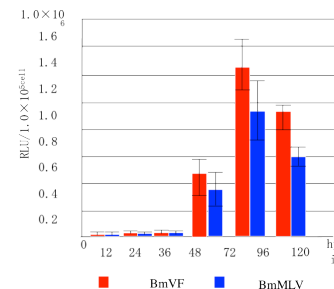


図 7. BmMLV の有無によるバキュロウイルスポリヘドリンプロモーター活性の比較

以上の結果より、BmMLV の宿主域はカイコ由来培養細胞に限られていること、BmMLV 陰性の BmVF 細胞が組換えバキュロウイルス発現系に有用であること、BmMLV の持続感染がバキュロウイルスの増殖には負に働いていることが明らかとなり、その感染メカニズムの一端を明らかにすることが出来た。

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)

[学会発表] (計 7 件)

1. 印南克久、佐瀬孝一、津久井利広、勝間進、今西重雄、川崎秀樹、岩永将司「BmMLV の哺乳類由来培養細胞における増殖性評価」日本蚕糸学会 第 82 回大会、2012 年 3 月、福岡県九州大学

2. 津久井啓太、内山航大、勝間進、今西重雄、川崎秀樹、岩永将司「バキュロウイルス発現系における BmVF 細胞の利用」日本蚕糸学会 第 82 回大会、2012 年 3 月、福岡県九州大学

3. 印南克久、石原玄基、勝間進、松田典子、嶋田透、今西重雄、姜媛瓊、川崎秀樹、岩永将司「酵母 2-ハイブリッド法により得られた

BmMLV タンパク質の相互作用の検証」第 34 回
日本分子生物学会年会、2011 年 12 月、神奈
川県パシフィコ横浜

4. 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 10 回
昆虫病理研究会、2011 年 12 月、東京都東京
大学農学部

5. 印南克久、石原玄基、勝間進、松田典子、
嶋田透、今西重雄、姜媛瓊、川崎秀樹、岩永
将司「酵母 2-ハイブリッド法を用いた BmMLV
の相互作用解析」日本蚕糸学会第 81 回学術
講演会、2011 年 3 月、東京都東京大学農学部

6. 石原玄基、勝間進、嶋田透、今西重雄、
川崎秀樹、岩永将司「リバーシジェネティク
スを用いた *Bombyx mori* macula-like virus
の解析」日本蚕糸学会第 81 回学術講演会、
2011 年 3 月、東京都東京大学農学部

7. 石原玄基、勝間進、嶋田透、今西重雄、
川崎秀樹、岩永将司「リバーシジェネティク
スを用いた *Bombyx mori* macula-like virus
の複製機構の解析」第 9 回昆虫病理研究会シ
ンポジウム、2010 年 9 月、山梨県富士吉田市
人材開発センター

6. 研究組織

(1) 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