

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26292173

研究課題名(和文)核多角体病ウイルス感染細胞におけるrRNA分解による抗ウイルス応答の分子機構

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of rRNA degradation in NPV-infected insect cells

研究代表者

池田 素子 (IKEDA, Motoko)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：20262892

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに、カイコ細胞において、核多角体病ウイルス(NPV)感染に対する抗ウイルス応答としてrRNAが分解減少することを報告した。本研究では、rRNA分解の誘導機構を明らかにすることを目的とした。rRNA分解を誘導する因子として*Autographa californica* NPVのp143遺伝子(ac-p143)を同定した。さらに、誘導に関わるAc-P143のドメイン解析、Ac-P143と相互作用するカイコ細胞因子の探索、rRNA分解を誘導するためのシグナル伝達因子の探索を行った。

研究成果の概要(英文)：We previously showed that rRNA degradation occurs in *Bombyx* cells (BM-N cells) as an antiviral immune response during abortive infection with heterologous nucleopolyhedroviruses (NPVs). In the present study, we examined the induction mechanisms of rRNA degradation in *Autographa californica* NPV (AcMNPV) infected BM-N cells. We identified AcMNPV p143 (ac-p143) as an inducer of rRNA degradation. And then, we investigated the domain of Ac-P143 responsible for rRNA degradation, the cellular factors interacting with Ac-P143, and the signal transduction factors responsible for induction of rRNA degradation.

研究分野：昆虫ウイルス学

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 全タンパク質合成停止 宿主域  
決定因子

## 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、感染昆虫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。

私たちはこれまでの研究により、カイコ細胞において不全感染となる種々の NPV によって、カイコ細胞の rRNA が分解減少することを明らかにし、これにより全タンパク質合成停止となることを示唆した。さらに、rRNA 分解を誘導する因子としてアメリカシロヒトリ NPV から *p143* 遺伝子を同定し、AcMNPV を含む他の NPV の *p143* 遺伝子も同様に rRNA 分解を誘導することを明らかにした。

そこで、rRNA 分解の誘導機構を、NPV の *p143* 遺伝子とカイコ細胞を用いて明らかにすることを計画した。

## 2. 研究の目的

NPV の *p143* 遺伝子とカイコ細胞を用いて、rRNA 分解の誘導機構を明らかにすることを目的とした。P143 と相互作用する細胞タンパク質を同定し、rRNA 分解を誘導するためのシグナル伝達因子を明らかにする。さらに、rRNA 分解に関わる細胞因子を明らかにすることによって rRNA 分解機構の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

- (1) *Autographa californica* MNPV (AcMNPV) の P143 (Ac-P143) と相互作用するカイコ細胞因子を共免疫沈降法により探索した。ホ乳動物細胞用の TAP System (Tandem Affinity Purification System) を昆虫細胞用に改変し、*ac-p143* 遺伝子を挿入することによって Ac-P143 発現プラスミドを作製した。Ac-P143 発現プラスミドを Bm-N 細胞で一過性発現させ、発現細胞から相互作用するタンパク質を共免疫沈降法により精製した。
- (2) rRNA 分解を誘導するためのシグナル伝達因子の探索を目的として、AcMNPV あるいは *Bombyx mori* NPV (BmNPV) 感染細胞と偽感染細胞から経時的に RNA を回収し、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 解析をおこなった。
- (3) rRNA 分解に関わるウイルスの感染現象を特定するため、AcMNPV 感染カイコ細胞において初期遺伝子発現、DNA 複製、後期遺伝子発現にかかわるウイルス遺伝子を RNAi 法によりノックダウンし、rRNA の分解量が減少する感染現象を調査した。

## 4. 研究成果

### (1) Ac-P143 と相互作用する細胞因子の同定

Ac-P143 発現プラスミドを一過性発現させたカイコ細胞から Ac-P143 と相互作用するタンパク質を共免疫沈降法により精製した。SDS-PAGE 法により精製された細胞タンパク質のバンドを確認することができた。しかし、N 末端配列の解析や抗体作製を進めるために十分な量のタンパク質を回収することはできなかった。

### (2) rRNA 分解誘導にかかわる Ac-P143 のドメイン解析

Ac-P143 の部分欠損体の一過性発現解析を行った。その結果、rRNA 分解には N 末端側の配列 (1-599) が必要であり、C 末端側の配列 (600-1221) は関与していないことが示された。

一過性発現による全長 Ac-P143 の発現量は少なく、共免疫沈降法の実験が停滞していたが、Ac-P143 の N 末端側の配列 (1-599) を用いることによって発現量が増え、カイコ細胞因子の候補を複数種検出することができた。

### (3) rRNA 分解を誘導するためのシグナル伝達因子の同定

感染時間に伴うカイコ細胞遺伝子発現変動を比較した結果、AcMNPV 感染細胞において、BmNPV 感染細胞よりも多くの遺伝子の発現レベルが変動することが明らかとなった。その中で、発現レベルが減少する遺伝子群については、Real-time qRT-PCR 解析によって再現性を確認することができた。発現レベルが減少する遺伝子群の中には、リボソームに関連する遺伝子とアポトーシスに関連する遺伝子が含まれていた。

### (4) 全タンパク質合成停止をレスキューするカイコ NPV 因子の探索と同定

Ac-P143 および BmNPV の P143 (Bm-P143) の間でアミノ酸置換を行い、全タンパク質合成停止をレスキューする Bm-P143 のアミノ酸配列を決定した。その結果、Bm-P143 の ScH と呼ばれる 190 アミノ酸残基の領域がレスキューに関わることを明らかにした。

AcP143ScH と BmP143ScH では 14 アミノ酸残基が異なっていた。そこで、それぞれのアミノ酸残基を置換することによって、AcP143ScH の 6 アミノ酸残基が rRNA 分解誘導に関与することを明らかにした。

### (4) rRNA 分解に関わるウイルス感染現象の特定

AcMNPV 感染カイコ細胞において、RNAi 法により初期遺伝子発現、DNA 複製、後期遺伝子発現に関わる AcMNPV 遺伝子のノックダウン解析を行った。その結果、いずれの遺伝子のノックダウンによっても rRNA の分解量は

変化せず, *ac-p143* 遺伝子のノックダウンによってのみ分解量が減少した。したがって, rRNA分解は *ac-p143* 遺伝子の発現によって誘導されることが明らかとなった。

*ac-p143* 遺伝子の一過性発現によって誘導される rRNA の分解量は, AcMNPV 感染細胞で認められる rRNA の分解量よりも少なく, rRNA の分解を増強させるウイルスの感染現象の存在を予想しているが, 今回の結果からその感染現象を特定することはできなかった。

## 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 11 件)

(1) Hamajima, R., Kobayashi, M. and Ikeda, M. (2017) P143 proteins from heterologous nucleopolyhedroviruses induce apoptosis in BM-N cells derived from the silkworm *Bombyx mori*. *Virus Res.* **233**, 70-76. doi: 10.1016/j.virusres.2017.03.012 (査読有)

(2) Tachibana, A., Hamajima, R., Tomizaki, M., Kondo, T., Nanba, Y., Kobayashi, M., Yamada, H. & Ikeda, M. (2017) HCF-1 encoded by baculovirus AcMNPV is required for productive nucleopolyhedrovirus infection of non-permissive Tn368 cells. *Sci. Rep.* **7**, 3807. doi:10.1038/s41598-017-03710-z (査読有)

(3) Chaeychomsri, S., Chaeychomsri, W., Ikeda, M. and Kobayashi, M. (2017) Susceptibility of a cloned cell line from *Helicoverpa armigera* to homologous nucleopolyhedrovirus. *J. Adv. Agric. Technol.* **4**, 200-208. doi: 10.18178/joaat.4.3.200-208 (査読有)

(4) Hamajima, R., Yasunaga-Aoki, C., Iwanaga, M., Imanishi, S., Kobayashi, J., Sasaki, K., Kusakabe, T., Lee J-M., Mon, H., Kobayashi, M. and Ikeda, M. (2016) rRNA degradation in *Bombyx mori* and *Bombyx mandarina* cells infected with heterologous nucleopolyhedroviruses. *J. Insect Biotechnol. Sericol.* **85**, 73-77. (査読有)

(5) Hamajima, R., Iwamoto, A., Tomizaki, M., Suganuma, I., Kitaguchi, K., Kobayashi, M., Yamada, H., and Ikeda, M. (2016) Functional analysis of inhibitor of apoptosis 1 of the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **79**, 97-107. doi: 10.1016/j.ibmb.2016.10.012 (査読有)

(6) Chaeychomsri, S., Chaeychomsri, W.,

Ikeda, M. and Kobayashi, M. (2016) A new continuous cell line of *Spodoptera exigua* and its susceptibility to Autographa californica Multicapsid nucleopolyhedrovirus. *J. Adv. Agric. Technol.* **3**, 231-238. doi: 10.18178/joaat.3.4.231-238 (査読有)

(7) Katayama, Y., Suzuki, T., Ebisawa, T., Ohtsuka, J., Wang, S., Natsume, R, Lo Y.-H., Senda, T., Nagamine, T., Hull, J. J., Matsumoto, S., Nagasawa, H., Nagata, K. and Tanokura, M. (2016) A class-A GPCR solubilized under high hydrostatic pressure retains its ligand binding ability. *Biochim. Biophys. Acta* doi: 2145-2151. doi:10.1016/j.bbamem.2016.06.012 (査読有)

(8) Nagamine, T. and Sako, Y. (2016) A role for the anti-viral host defense mechanism in the phylogenetic divergence in baculovirus evolution. *PLoS ONE* doi: 11e0156394. doi:10.1371/journal.pone.0156394 (査読有)

(9) Hamajima, R., Kobayashi, M. and Ikeda, M. (2015) Identification of amino acid residues of AcMNPV P143 protein involved in rRNA degradation and restricted viral replication in BM-N cells from the silkworm *Bombyx mori*. *Virology* **485**, 244-251. doi: 10.1016/j.virol.2015.08.008 (査読有)

(10) Chaeychomsri, S., Chaeychomsri, W., Ikeda, M. and Kobayashi, M. (2015) Characterization of the *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus during serial passage in cell culture. *J. Adv. Agric. Technol.* **2**, 63-70. doi: 10.12720/joaat.2.1.63-70 (査読有)

(11) Nagamine, T., Saito, T., Osada, H. and Matsumoto, S. (2015) Dissection of two modes of IE1 sub-nuclear localization in baculovirus-infected cells. *Virus Res.* **208**, 120-128. doi:10.1016/j.virusres.2015.06.005 (査読有)

[学会発表](計 37 件)

(1) 牧野静花・浜島りな・富崎 萌・小林迪弘・山田早人・池田素子 (2018) 核多角体病ウイルス感染カイコ細胞のアポトーシス誘導における Bm-p53 の機能解析. 平成 30 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会(名古屋) 3 月 19・20 日.

(2) 山田早人・小林迪弘・池田素子 (2018) カイコにおけるカスパーゼのアダプター因子相同体 Bm-Dark の機能解析. 平成 30 年度

蚕糸・昆虫機能利用学術講演会（名古屋）3月19・20日。

(3) 牧野静花・浜島りな・富崎 萌・小林迪弘・山田早人・池田素子 (2017) BmNPV 感染カイコ細胞のアポトーシス誘導におけるBm-P53 の機能解析．日本蚕糸学会中部支部第73回・東海支部第69回大会（松本）12月1・2日。

(4) 浜島りな・小林迪弘・山田早人・池田素子 (2017) カイコ細胞が誘導する rRNA 分解とアポトーシスに關与する核多角体病ウイルス P143 の機能解析．平成 29 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会（つくば）3月21・22日。

(5) 牧野静花・浜島りな・富崎 萌・小林迪弘・山田早人・池田素子 (2017) 核多角体病ウイルス感染カイコ細胞が誘導するアポトーシスにおけるカイコの P53 および IAP antagonist の機能解析．平成 29 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会（つくば）3月21・22日。

(6) 橘 亜美・浜島りな・富崎萌・近藤拓也・小林迪弘・山田早人・池田素子 (2017) 遺伝子組換え HycuMNPV バクミドを用いた AcMNPV hcf-1 遺伝子の機能解析．平成 29 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会（つくば）3月21・22日。

(7) 永峰俊弘・稲葉岳彦・佐甲靖志 (2017) バキュロウイルス感染細胞核抽出液によるチューブ状リポソームの形成誘導．平成 29 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会（つくば）3月21・22日。

(8) 牧野静花・浜島りな・富崎 萌・小林迪弘・山田早人・池田素子 (2016) NPV 感染カイコ細胞に誘導されるアポトーシスにおける BmP53 と IAP アンタゴニストの機能解析．日本蚕糸学会中部支部第72回・東海支部第68回大会（松本）．12月9・10日。

(9) 橘 亜美・浜島りな・富崎 萌・近藤拓也・小林迪弘・池田素子 (2016) HycuMNPV バクミドを用いた hcf-1 遺伝子の機能ドメイン解析．日本蚕糸学会中部支部第72回・東海支部第68回大会（松本）．12月9・10日。

(10) 山田早人・小林迪弘・池田素子 (2016) カイコにおけるカスパーゼのアダプター因子相同体 Bm-Dark の単離と機能解析．日本蚕糸学会中部支部第72回・東海支部第68回大会（松本）．12月9・10日。

(11) Tachibana, A., Hamajima, R., Tomizaki, M., Kondo, T., Nanba, Y., Kobayashi, M. and Ikeda, M. *hcf-1* gene of AcMNPV is an

essential viral factor required for productive infection of HycuMNPV in Tn368 cells. International Congress of Entomology 2016, September 25–30, 2016, Florida, USA.

(12) Hamajima, R., Sato, M., Kobayashi, M. and Ikeda, M. RNA-seq transcriptome analysis of *Bombyx mori* cells infected with *B. mori* nucleopolyhedrovirus (NPV) and *Autographa californica* multiple NPV. International Congress of Entomology 2016, September 25–30, 2016, Florida, USA.

(13) 橘 亜美・浜島りな・富崎 萌・近藤拓也・小林迪弘・池田素子 (2016) AcMNPV *hcf-1* 遺伝子の Tn368 細胞における NPV 感染への影響．第 12 回昆虫病理研究会シンポジウム．モンタナリゾート（岩沼）9月15–17日。

(14) 浜島りな・小林迪弘・山田早人・池田素子 (2016) チョウ目昆虫細胞における核多角体病ウイルス P143 タンパク質のアポトーシス誘導能の解析．第 12 回昆虫病理研究会シンポジウム．モンタナリゾート（岩沼）9月15–17日。

(15) 牧野静花・浜島りな・富崎 萌・小林迪弘・山田早人・池田素子 (2016) 核多角体病ウイルス感染カイコ細胞のアポトーシス誘導における P53 および IAP アンタゴニスト相同体の機能解析．第 12 回昆虫病理研究会シンポジウム．モンタナリゾート（岩沼）9月15–17日。

(16) 浜島りな・佐藤昌直・小林迪弘・池田素子 (2016) RNA-seq を用いた核多角体病ウイルス感染カイコ細胞のトランスクリプトーム解析．平成 28 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会（京都）3月17・18日。

(17) 永峰俊弘・佐甲靖志 (2016) バキュロウイルスと昆虫の共進化：生体防御超克機構によるウイルスの多様化．平成 28 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会（京都）3月17・18日。

(18) 窪田亮介・浜島りな・富崎 萌・橘 亜美・小林迪弘・池田素子 (2015) マイマイガ核多角体病ウイルスを基にしたバクミドの作製．日本蚕糸学会中部支部第71回・東海支部第67回大会（松本）．12月4・5日。

(19) 齋藤 綾・浜島りな・山田早人・北口晃司・小林迪弘・池田素子 (2015) Apsup とマイマイガイニシエーターカスパーゼとの相互作用解析．日本蚕糸学会中部支部第71回・東海支部第67回大会（松本）．12月4・5日。

(20) 橘 亜美・浜島りな・富崎 萌・近藤拓

也・小林迪弘・池田素子(2015)AcMNPV HCF-1 による HycuMNPV の Tn368 細胞における増殖促進. 日本蚕糸学会中部支部第 71 回・東海支部第 67 回大会(松本). 12月4・5日.

(21) 富崎 萌・浜島りな・岩本麻子・小林迪弘・池田素子(2015)カイコとマイマイガの Ibm1 によるアポトーシス誘導機構の解析. 日本蚕糸学会中部支部第 71 回・東海支部第 67 回大会(松本). 12月4・5日.

(22) 浜島りな・青木智佐・岩永将司・小林淳・李 在萬・小林迪弘・池田素子(2015)核多角体病ウイルス感染に伴う RNA 分解誘導のチョウ目昆虫における保存性. 日本蚕糸学会中部支部第 71 回・東海支部第 67 回大会(松本). 12月4・5日.

(23) 富崎 萌・浜島りな・岩本麻子・小林迪弘・池田素子(2015)カイコとマイマイガにおける p53, sir2, reaper 相同体の機能解析. 平成 27 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会(札幌)9月26・27日.

(24) 橘 亜美・浜島りな・富崎 萌・近藤拓也・小林迪弘・池田素子(2015)AcMNPV hcf-1 遺伝子を持つ HycuNPV バクミドの作出と感受性の調査. 平成 27 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会(札幌)9月26・27日.

(25) 浜島りな・永峰俊弘・小林迪弘・池田素子(2015) *Autographa californica* 核多角体病ウイルス P143 の RNA 分解誘導に関わるアミノ酸の決定. 平成 27 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会(札幌)9月26・27日.

(26) 永峰俊弘・佐甲靖志(2015)バキュロウイルスと昆虫の共進化: BmNPV の宿主特異化機構解析. 平成 27 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会(札幌)9月26・27日.

(27) 浜島りな・小林迪弘・池田素子(2015)AcMNPV 感染カイコ細胞が誘導する RNA 分解に関わる AcMNPV P143 の機能解析. 第 75 回昆虫病理研究会(札幌)9月25日.

(28) Hamajima, R., Kobayashi, M. and Ikeda, M. Identification of the region of *Autographa californica* MNPV P143 responsible for ribosomal RNA degradation in *Bombyx mori* cells. The 4th Asia-Pacific Congress of Sericulture and Insect Biotechnology. April 23-25, 2015, Busan, Korea.

(29) Ikeda, M., Yamada, H., Kitaguchi, K. and Kobayashi, M. Mechanisms of apoptosis regulation by apsup during *Lymantria dispar* MNPV infection. The 4th Asia-Pacific Congress of Sericulture and

Insect Biotechnology. April 23-25, 2015, Busan, Korea.

(30) 浜島りな・小林迪弘・池田素子(2015) *Autographa californica* 核多角体病ウイルス感染によるカイコ細胞の RNA 分解誘導. 第 59 回日本応用動物昆虫学会大会(山形)3月26-28日.

(31) 浜島りな・小林迪弘・池田素子(2014)カイコ細胞が誘導する RNA 分解における AcMNPV-P143ScH 領域の機能解析. 日本蚕糸学会中部支部第 70 回・東海支部第 66 回大会(岡谷). 10月25・26日.

(32) 富崎 萌・浜島りな・岩本麻子・小林迪弘・池田素子(2014)カイコとマイマイガにおける p53, sir2, RHG 遺伝子の同定と機能解析. 日本蚕糸学会中部支部第 70 回・東海支部第 66 回大会(岡谷). 10月25・26日.

(33) 橘 亜美・浜島りな・富崎 萌・近藤拓也・小林迪弘・池田素子(2014) HycuMNPV のバクミド作成. 日本蚕糸学会中部支部第 70 回・東海支部第 66 回大会(岡谷). 10月25・26日.

(34) 橘 亜美・浜島りな・富崎 萌・近藤拓也・小林迪弘・池田素子(2014) アメリカシロヒトリ核多角体病ウイルスのバクミド作成. 第 11 回昆虫病理研究会シンポジウム. 人材開発センター富士研修所(富士吉田)9月18-20日.

(35) 富崎 萌・浜島りな・岩本麻子・小林迪弘・池田素子(2014)カイコとマイマイガのアポトーシス誘導遺伝子の同定と機能解析. 第 11 回昆虫病理研究会シンポジウム. 人材開発センター富士研修所(富士吉田)9月18-20日.

(36) 浜島りな・小林迪弘・池田素子(2014)カイコ細胞の RNA 分解誘導における AcMNPV-P143ScH 領域の機能解析. 第 11 回昆虫病理研究会シンポジウム. 人材開発センター富士研修所(富士吉田)9月18-20日.

(37) 永峰俊弘・斎藤臣雄・長田裕之・松本正吾(2014) early-to-late 遷移に伴うバキュロウイルスタンパク質 IE1 の局在機構転換. 第 11 回昆虫病理研究会シンポジウム. 人材開発センター富士研修所(富士吉田)9月18-20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・教授  
研究者番号：20262892

### (2) 研究分担者

永峰 俊弘 (NAGAMINE, Toshihiro)  
国立研究開発法人理化学研究所・佐甲細胞  
情報研究室・専任研究員  
研究者番号：90237553

山田 早人 (YAMADA, Hayato)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教  
研究者番号：70778258

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )