

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 4 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06155

研究課題名（和文）バキュロウイルスの全身感染効率を規定する新たな分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）Investigation of the molecular mechanism underlying efficient systemic infection of the baculovirus

研究代表者

國生 龍平（Kokusho, Ryuhei）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・特任研究員

研究者番号：90756537

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：バキュロウイルスは全身感染性の昆虫ウイルスで、actin rearrangement-inducing factor 1 遺伝子（arif-1）により宿主体内における感染拡大効率を飛躍的に向上させているが、その詳細な分子メカニズムは不明であった。本研究では、ARIF-1に様々な変異を導入することで、ARIF-1の機能に重要なアミノ酸領域を同定した。また、感染組織の詳細な観察から、これまで想定されていなかった新規の感染ルートを発見し、ARIF-1が新規感染ルートからの感染に必須な因子であることを突き止めた。

研究成果の概要（英文）：Baculoviruses are insect viruses that establish systemic infection in the body of host larvae. Previously we found that viral actin rearrangement-inducing factor 1 gene (arif-1) dramatically enhances systemic infection, but its molecular mechanism remains unknown. In this study, we introduced several mutations in arif-1 and identified amino acid regions responsible for its function. In addition, detailed observation of infected tissues revealed the previously unknown infection route that required ARIF-1.

研究分野：昆虫病理学

キーワード：バキュロウイルス 全身感染 BmNPV arif-1 カイコ 気管

## 1. 研究開始当初の背景

バキュロウイルスは主にチョウ目昆虫の幼虫に感染する大型二本鎖 DNA ウィルスである。バキュロウイルスの感染は、宿主昆虫がウィルスの包埋体を食下し、ウィルス粒子が中腸の円筒細胞へと感染することでスタートする。感染細胞ではウィルスゲノムが複製され、新たに産生された出芽ウィルス (budded virus; BV) が細胞外へと放出される。通常、昆虫の組織は緻密な細胞外マトリクスである基底膜で覆われており、BV は体液中から組織内の細胞へと直接感染ができないと考えられている (Passarelli, 2011, *Virology*)。そのため、BV は気管末端の露出した細胞への感染を足がかりとすることで、組織内への感染を可能にしている (Engelhard et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*)。つまり、基底膜で覆われた組織内へいかにして侵入し、効率的に感染を拡大するかが、バキュロウイルスの全身感染における重要なファクターとなっている。

私は 2014 年度、カイコ核多角体病ウィルス (Bombyx mori nucleopolyhedrovirus; BmNPV) の *actin rearrangement inducing factor-1* 遺伝子 (*arif-1*) が全身感染効率の向上に寄与することを明らかにした (Kokusho et al., 2015, *J. Gen. Virol.*)。Autographa californica NPV の培養細胞に対する感染実験では、*arif-1* は感染初期における actin filament の局在改変に関わる因子であることが報告されていたが (Dreschers et al., 2001, *J. Virol.*)、*arif-1* の幼虫感染における役割はこれまで不明であった。*arif-1* 欠損 BmNPV に感染したカイコ幼虫では、感染幼虫で通常観察される行動の異常な活性化がほとんど観察されなくなり、個体全体におけるウィルス産生量も有意に減少することから、*arif-1* により全身感染が正常に成立することはウィルスの効率的な増殖・拡散に重要であると考えられた。また、*arif-1* は培養細胞におけるウィルス増殖に関与しないことから、*arif-1* は幼虫感染時のみで機能する遺伝子であると推測された。しかしながら、ARIF-1 が全身感染を促進する詳細な分子メカニズムは未解明であった。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、ARIF-1 タンパク質の詳細な作用機序を明らかにし、全身感染効率向上の分子メカニズムを解明し実証することを目指した。

### (1) ARIF-1 が機能する分子メカニズムの解明

ARIF-1 はそのアミノ酸 1 次構造から 4 回膜貫通タンパク質であることが予測されており、C 末端には Proline-rich な領域が存在することが報告されている (Dreschers et al., 2001, *J. Virol.*)。しかしながら、全身感染に重要なアミノ酸領域は未解明であった。そこで、ARIF-1 変異株を多数作製して性状解析を行なうことで、ARIF-1 の機能に重

要なアミノ酸領域を絞り込み、さらに研究が順調に進んだ場合は、生化学的解析により ARIF-1 と相互作用する因子を同定し、その機能解析を行うことを目標とした。

### (2) 細胞集団培養系を用いた ARIF-1 による全身感染促進メカニズムの実証

これまでの研究では、GFP 発現ウィルスを用いてカイコ幼虫体内における感染拡大の様子を観察してきた。しかしながら、カイコ幼虫を用いた感染実験では他の組織や体液成分、あるいは体液中 BV 量の経時的变化による影響が無視できないことや、同じ感染組織を経時的にモニタリングできないといったデメリットがあったため、*arif-1* 欠損ウィルス感染組織における感染の遅延が何に起因するか、厳密に証明することが困難であった。そこで本研究では、組織培養および 3D 培養 (以下、合わせて細胞集団培養と呼ぶ) を利用した感染実験系の確立を試みた。このような *in vitro* と *in vivo* の中間に位置する実験系を用いることで、ウィルスの感染拡大の様子を経時的に、かつより均一な条件下でモニタリングすることが可能となる。

最終的に、培養細胞やカイコ幼虫における解析結果を細胞集団培養系へと適用し、その機能を実証することで、これまで未知であった ARIF-1 による全身感染効率向上メカニズムの解明を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) ARIF-1 変異株を用いた構造活性相関解析

すでに、GFP 融合 ARIF-1 発現ウィルスを用いた細胞内局在解析により、ARIF-1 は細胞膜に局在し、何らかの化学修飾を受ける可能性が示唆されている (國生、未発表)。そこで、部分欠損やアミノ酸置換を導入した変異型 ARIF-1 を発現する組換えウィルスを多数作製して細胞内局在やカイコ幼虫におけるフェノタイプを調査することで、ARIF-1 の機能や修飾等に重要なアミノ酸領域のプロファイリングを行なった。

### (2) 細胞集団培養系の確立と全身感染促進の実証

カイコではこれまでに翅原基や初期胚などの様々な組織において組織培養が行われてきた歴史があり、組織培養系を用いたバキュロウイルスの感染実験も報告例がある (Rahman & Gopinathan, 2004, *Virus Res*)。そこでまず、培地の組成、抗生物質の添加、培養時間などの実験条件を最適化することで、組織培養の系の確立を試みた。また、ARIF-1 が細胞骨格を操作することにより、細胞集団の 3 次元構造を改変して全身感染効率を向上させている可能性を検証するため、カイコ培養細胞の 3D 培養系の構築を目指した。

## 4. 研究成果

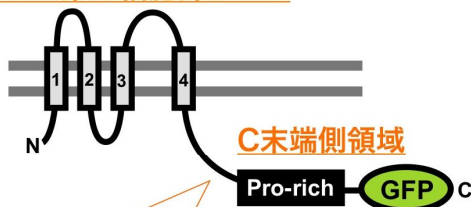
### (1) ARIF-1 の機能に重要なアミノ酸領域の同定

ARIF-1の詳細な作用メカニズムを明らかにするため、まずARIF-1のC末端にGFPを融合したタンパク質を発現する組換えウイルス(ARIF-GFP)を用いて詳細な性状解析を行った。ウイルス感染細胞を用いたウエスタンブロッティングの結果、ARIF-GFPは感染初期から発現を開始し、感染の進行に伴い高分子量側にバンドがシフトする、すなわち何らかの修飾を受けることが示唆された。CaI Intestine Alkaline Phosphatase 処理したタンパクサンプルではこのバンドが見られなくなったことから、ARIF-1が受けている修飾はリン酸間修飾であると考えられる。また、ARIF-1は細胞膜画分に存在するだけでなく、出芽ウイルス(BV)にリクルートされ、特にヌクレオキャプシド画分で強く検出されることが明らかになった。

次に、ARIF-GFPをベースに様々な変異を導入した変異株を作製することで、ARIF-1の機能やリン酸化修飾、BVへのリクルートに重要なアミノ酸領域の特定を試みた。NCBIデータベース上に登録されているAlphabaculovirus全125系統のARIF-1ホモログ配列を取得して配列解析を行ったところ、種間で高度に保存されたアミノ酸残基がARIF-1の第1細胞外ループに3個、第2細胞外ループに12個存在した。また、C末端の細胞内領域の配列は種間/種内でのバリエーションが多様であったものの、Proline-rich領域が存在し、SerineやThreonineにも富むことが共通していた。そこで、細胞外ループの保存アミノ酸をAlanineに置換した変異株(Ala置換株)を15種類とC末端を部分欠損した変異株(C末端部分欠損株)を5種類作成し、性状を調査した。その結果、全てのAla置換株はARIF-1欠損株と同様のフェノタイプ

保存されたアミノ酸残基が機能・修飾・BVへのリクルートに重要である

### 第1・第2細胞外ループ



C末端側領域も機能に重要であり、特にPro-rich領域よりN末端側の領域が修飾やヌクレオキャプシドとの結合に重要である

図1. ARIF-1変異株の性状解析による重要アミノ酸の同定(まとめ)

を示し、リン酸化修飾やBVへのリクルートの割合も顕著に低下していた。また、このうち1つのAla置換株について共焦点顕微鏡観察を行ったところ、Ala置換株ではARIF-1が細胞膜に局在せず細胞質中にアグリゲートを形成していることが明らかになった。これらの結果から、ARIF-1の細胞外ループは細胞膜およびBVへのリクルート、そしてリン酸化修飾に重要な役割を果たすことが明らかになった(図1)。一方、C末端部分欠損株は全てARIF-1欠損型のフェノタイプを示したことから、C末端側の細胞内領域は全てARIF-1の機能に重要であることが示唆された。また、Proline-rich領域はARIF-1のリン酸化修飾に必須ではなく、Proline-rich領域よりN末端側の約120アミノ酸の領域がリン酸化修飾やヌクレオキャプシドとの結合に重要な役割を果たすことが示唆された(図1)。

### (2) ARIF-1を介した新規全身感染ルートの発見

これまでバキュロウイルスが体液中から組織内に入る際は、基底膜で覆われていない気管の末端の細胞からのみ侵入できる

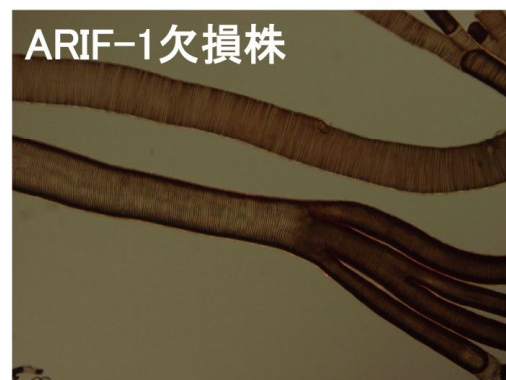
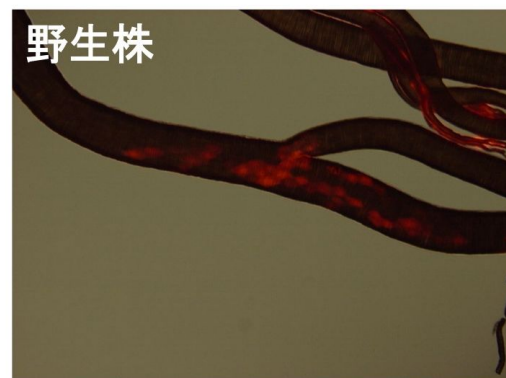


図2. ウイルス感染組織の免疫染色

カイコ5齢起蚕にGFP発現ウイルスのBV( $1 \times 10^5$  PFU)を接種後36時間の気管を摘出し、抗GFP抗体を用いて免疫染色を行った。野生株ではウイルス感染細胞(赤)が気管の分岐を基点に広がっているが(写真上)、ARIF-1欠損株ではそのような感染は見られない(写真下)。

と考えられていた。しかしながら、GFP 発現ウイルス感染組織の詳細な観察の結果、野生株ウイルス感染幼虫では、気管の末端以外の、特に気管の分岐点付近からも感染を開始することが明らかになった(図 2 上)。また、ARIF-1 欠損株においては気管末端からの感染は通常通り起こるにもかかわらず、気管の非末端領域からの感染はほとんど見られなくなったことから(図 2 下)、当初の予想とは異なり、バキュロウイルスは ARIF-1 を介して気管の非末端領域からの感染というこれまで未知であった新規の感染ルートで全身感染効率を向上させていることが明らかになった。

そこで、当初の実験予定を一部変更し、組織培養した気管に野生株および ARIF-1 欠損株の BV を感染させることで、組織培養系における非末端感染の再現を試みた。様々な気管培養条件を検討した結果、予備実験の段階ではあるが、5 齢 2 日のカイコ幼虫より摘出した気管を TC-100 培地 (+10% ウシ胎児血清添加) 中で培養することで、気管の非末端領域への感染をある程度再現できることが示唆された。現在、この組織培養感染実験系の再現性を確認するための実験を継続中である。

本研究の成果により、ARIF-1 はリン酸化修飾を受け BV にリクルートされること、そして気管の非末端感染という新規の感染ルートに必須であることが明らかになった。非末端感染が気管組織培養感染系で再現できることを考慮すると、ARIF-1 は BV の構成タンパク質として、BV が気管の非末端領域に感染する際に重要な役割を果たしていると考えられる。

一方で、気管等の昆虫の体組織は基底膜に覆われているために BV は直接感染できないと考えられており、ARIF-1 がいかにして気管の基底膜を克服しているのか、その詳細な作用機序は未だ明らかになっていない。今回作製した ARIF-1 変異株を利用し、特に BV における ARIF-1 相互作用因子を生化学的に同定することで、今後具体的な分子メカニズムを明らかにできると考えている。

また、応用的な側面では、ARIF-1 を介したウイルスによる宿主基底膜制御メカニズムが明らかになれば、生物農薬としてのバキュロウイルスの有効性をさらに高めることができるかと予想される。

#### 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 0 件)

なし

〔学会発表〕(計 3 件)

國生龍平、勝間進 「バキュロウイルスの

全身感染促進因子 ARIF-1 の構造活性相関解析」、『日本蚕糸学会第 87 回大会』、農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター(茨城県つくば市) 2017 年 3 月 21 日～22 日

國生龍平、藤本優、嶋田透、勝間進 「バキュロウイルスの効率的な全身感染を支える分子メカニズム」、『第 12 回昆虫病理研究会シンポジウム』、モンタナリゾート(宮城県岩沼市) 2016 年 9 月 15 日～17 日

國生龍平、黄嘉禾、堤伸浩、嶋田透、勝間進 「カイコ核多角体病ウイルスの ARIF-1 タンパク質はウイルスの全身感染を促進する」、『日本蚕糸学会第 85 回大会』、北海道大学(北海道札幌市) 2015 年 9 月 26 日～27 日

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

なし

出願状況(計 0 件)

なし

取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

國生 龍平 (KOKUSHO, Ryuhei)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任研究員

研究者番号：90756537

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし

##### (4) 研究協力者

なし