

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 6 月 14 日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380043

研究課題名（和文）昆虫 DNA ウイルスの感染・増殖抑制に関わるカイコ由来新規因子の分子機能解析

研究課題名（英文）Molecular analysis of novel factors involved in repression of infection and propagation of a DNA virus in silkworm.

研究代表者

田中博光（Tanaka Hiromitsu）

独立行政法人農業生物資源研究所・昆虫機能研究開発ユニット・主任研究員

研究者番号：30391577

研究成果の概要（和文）：

カイコ培養細胞を用いた RNA 干渉及び過剰発現実験から、Ets ファミリーに属する転写因子「BmEts」は DNA ウイルスである多角体病ウイルス(BmNPV)のカイコ細胞内での増殖の抑制に関わることが示された。また、BmEts は BmNPV の細胞内増殖に必須なウイルス前初期遺伝子の発現を抑制することで BmNPV の細胞内増殖を抑えていることが示され、さらに BmEts の前初期遺伝子プロモーターに対する抑制機構が明らかにされた。BmEts 遺伝子は細菌感染によっても発現が誘導される細菌感染応答遺伝子でもあり、BmEts はカイコ抗菌性ペプチドの一つであるレボシン遺伝子の発現を活性化させる機能があることも明らかとなった。一方、BmToll10-3 はカイコ培養細胞での過剰発現実験から、前初期遺伝子のプロモーター活性の上昇がみられたことから、BmToll10-3 は BmEts とは拮抗的に働き、前初期遺伝子プロモーター活性の上昇に関わる転写因子の活性化の引き金を引く因子であることが推測された。今回得られたこれら結果は昆虫 DNA ウイルスに対する昆虫の生体防御機構を明らかにする上での重要な知見となりうる。

研究成果の概要（英文）：

RNA interference and overexpression experiments using silkworm culture cells demonstrated that an Ets family transcription factor, BmEts was involved in repression of propagation of BmNPV, which belongs to DNA viruses, in the silkworm cells. BmEts suppressed the activation of promoter activity of viral immediate early gene. Furthermore, the expression of BmEts gene was shown to be up-regulated in response to bacterial challenge. BmEts enhanced the expression of a silkworm antimicrobial peptide gene, *lebocin*. On the other hand, BmToll10-3 was shown to be involved in the promoter activation of viral *immediate early* gene, suggesting that BmToll10-3 induces activation of transcription factors for enhancement of the *immediate early* gene promoter activity, in contrast to BmEts. We believe that these findings contribute to elucidation of the mechanisms of insect immunity against DNA viruses.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2010年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2011年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

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：昆虫病理

### 1. 研究開始当初の背景

昆虫の細菌、真菌に対する生体防御機構に関してはその詳細が徐々に解明されているのに対し、DNAウイルスに対する生体防御機構はほとんど解明されていない。我々は、カイコ培養細胞にDNAウイルスである核多角体病ウイルスを感染させることで、発現の変動が見られた宿主遺伝子を同定し、さらにこれらのうちのいくつかは、カイコ培養細胞での核多角体病ウイルスの感染・増殖抑制に関与する可能性があることをRNA干渉法を用いた実験を用いて示した。これら遺伝子産物の機能を解明できれば、これまで未知であった昆虫のDNAウイルスに対する生体防御機構の一端を明らかにできると考えられた。

### 2. 研究の目的

我々はRNA干渉法を利用した機能的スクリーニングにより、これまで昆虫でほとんど知られていなかったDNAウイルスの感染・増殖を抑制すると思われる新規の候補因子をカイコからいくつか同定した。本研究ではこうした因子のうち、転写因子であると思われるBmEtsと病原微生物の認識に関わるとと思われるBmToll10-3に着目し、DNAウイルスの感染・増殖抑制においてこれら因子がどう関わるかを解析する。DNAウイルスに対する昆虫の生体防御機構はほとんど解明されておらず、我々が行おうとしている解析で得られる成果はこうした機構を解明する上で非常に重要な知見となりうる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 用いたカイコ培養細胞

カイコ胚由来の培養細胞であるBm-NIAS-oyanagi2を用い、10%牛胎児血清

を含むIPL41培地で培養した。

(2) カイコ培養細胞にBmNPVを感染させた後の細胞内BmNPV量の定量実験

カイコ培養細胞へ感染実験に用いたBmNPVはウイルス後期遺伝子プロモーターの下流にルシフェラーゼcDNAを連結したDNAが挿入されているものを用い、感染後、一定時間経過させた細胞から細胞抽出液を調製し、抽出液中のルシフェラーゼ活性を測定することで、これをウイルス量として算出した。

(3) カイコ培養細胞でのBmEts及びBmToll10-3の過剰発現実験

BmEts及びBmToll10-3 cDNAをそれぞれ昆虫細胞用の発現プラスミドに挿入したプラスミドを作製し、Fugene-HDを用い、これらをカイコ培養細胞に導入し、過剰発現させた。

(4) カイコ培養細胞でのウイルス前初期遺伝子あるいはカイコレボシン遺伝子プロモーターの活性測定実験

ウイルス前初期遺伝子プロモーターにホタルルシフェラーゼcDNAを連結させたレポータープラスミドを作製後、Fugene-HDを用い、これらをカイコ培養細胞に導入した。一定時間後、細胞抽出液中のルシフェラーゼ活性を測定し、この活性量をプロモーター活性とした。

(5) BmEtsのウイルス前初期遺伝子プロモーターの特定領域への結合能の解析

特定領域を含むDNA断片をプローブとし、大腸菌で合成したリコンビナントBmEtsを

用い、結合活性があるかをゲルシフト法により解析した。

#### (6) BmEts ノックダウンカイコの作製

BmEts cDNA の約 500bp の配列を逆方向反復配列となるような形で、酵母由来の転写因子 GAL4 の結合配列(UAS) の下流に連結させ、この DNA をカイコ個体のゲノム領域内に挿入させた組換えカイコを作製させた。さらに GAL4 を高発現させた組換えカイコと交配させ、BmEts cDNA の塩基配列を有する逆方向反復配列由来の RNA が過剰に転写された組換えカイコを作製した。

#### 4. 研究成果

(1) カイコ培養細胞を用いた RNA 干渉(図 1) 及び過剰発現実験(図 2)から、Ets ファミリーに属する転写因子「BmEts」は DNA ウイルスである多角体病ウイルス(BmNPV) のカイコ細胞内での増殖の抑制に関わることが示された。

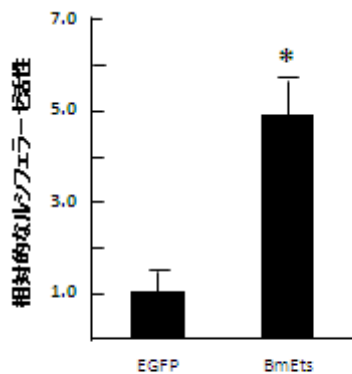


図1 内在性BmEtsの遺伝子発現をRNA干渉を用いてノックダウンするとBmNPVの感染効率が上昇する。\* $P < 0.01$ .

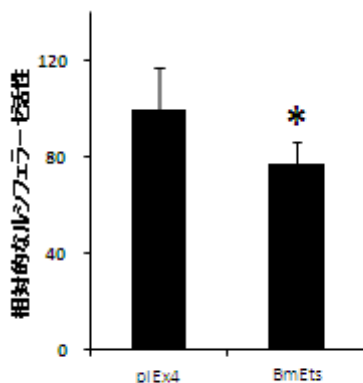


図2 BmEtsを培養細胞で過剰発現させるとBmNPVの感染効率が低下する。\* $P < 0.01$ .

(2) BmEts は BmNPV の細胞内増殖に必要なウイルス前初期遺伝子の発現を抑制す

ることで BmNPV の細胞内増殖を抑えていることが示された(図 3)。

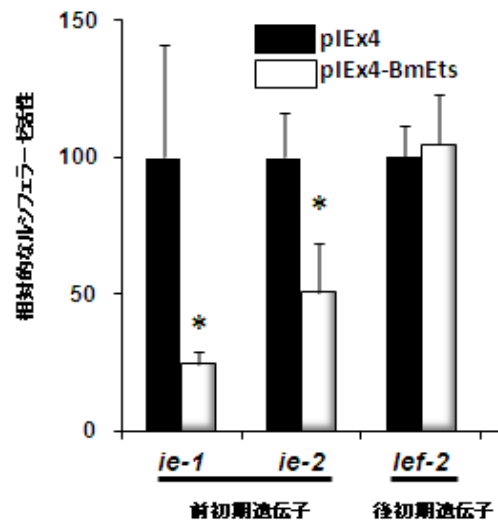


図3 BmEtsはBmNPVの前初期遺伝子である ie-1、ie-2の転写の活性化を抑制する。\* $P < 0.01$ .

(3) ウイルス前初期遺伝子プロモーターはこのプロモーター上の特定の領域を BmEts とは異なる別の Ets ファミリー転写因子が認識し、このプロモーター活性を上昇させていること、BmEts はこの Ets ファミリー転写因子によるウイルス前初期遺伝子遺伝子プロモーターの活性化の抑制に働いていることが明らかとなった。また、BmEts はこの Ets ファミリー転写因子の認識領域に結合活性があることが示された。

(4) BmEts 遺伝子は BmNPV 応答性遺伝子であるが、BmNPV 応答領域はこの遺伝子の 5'上流域 1 kb 内には見いだされなかった。

(5) BmEts 遺伝子は BmNPV だけではなく、細菌感染によっても発現が誘導される細菌感染応答遺伝子でもあり、BmEts はカイコ抗菌性ペプチドの一つであるレボシン遺伝子の発現を活性化させる機能があることも明らかとなった。また、BmEts は別の転写因子である BmRelish 依存的なレボシン遺伝子プロモーター活性を相乗的に上昇させることも見いだされた。

(6) BmEts のノックダウンカイコについては 2 系統作出したが、いずれも十分なノックダウン効果が認められず、カイコ個体での BmNPV に対する BmEts の機能解析はできなかった。現在、二本鎖 RNA を注入することでノックダウン効果を示すことが報告されている SID-1 発現カイコを用い、BmEts RNA を注入することで、効果的な BmEts 遣

伝子の発現量の低下がみられるかを確認している。

(7) Toll ファミリーに属する BmToll10-3 をコードする cDNA をカイコからクローニングした。これをカイコ用の発現プラスミドに挿入したものをカイコ培養細胞に導入後、BmNPV を感染させ、細胞内の BmNPV を測定したところ、有意な細胞内増殖抑制は見られなかった。BmToll10-3 遺伝子をノックダウンさせた培養細胞に BmNPV を感染させた場合は、BmNPV の増殖が有意に上昇したことから、おそらく BmToll10-3 は細胞内で一定の BmNPV 増殖抑制に関わるが、これに関わる BmToll10-3 の量は内在性のものだけで十分であると考えられた。

(8) 一方、BmToll10-3 はカイコ培養細胞での過剰発現実験から、前初期遺伝子のプロモーター活性の上昇がみられたことから、BmToll10-3 は BmEts とは拮抗的に働き、immediate early 遺伝子プロモーター活性の上昇に関わる転写因子の活性化の引き金を引く因子であることが推測された。この結果は(7)で得られた結果と矛盾することから、BmToll10-3 の機能については今後さらに詳細に解析する必要がある。

#### 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2件)

Tanaka H, Suzuki N, Nakajima Y, Sato M, Sagisaka A, Fujita K, Ishibashi J, Imanishi S, Mita K, Yamakawa M (2010) Expression profiling of novel bacteria-induced genes from the silkworm, *Bombyx mori* *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 73(3):148-162 査読あり

Tanaka H, Sagisaka A, Fujita K, Furukawa S, Ishibashi J, Yamakawa M (2012) BmEts upregulates promoter activity of *lebocin* in *Bombyx mori* *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 42(7):474-481 査読あり

[学会発表] (計9件)

田中博光 (2009) カイコゲノム情報から明らかになったカイコの自然免疫 日本蚕糸学会 関東支部第60回大会 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 2009年11月7日 栃木県宇都宮市 宇都宮大学農学部

田中博光, 勾坂晶, 藤田幸輔, 石橋純, 今

西重雄, 三田和英, 山川稔 (2009) RNAi 法を用いてのカイコ核多角体病ウイルスの感染・感染防御に関わるカイコ由来因子の探索・同定昆虫ポストゲノム研究会 2009年9月11日北海道札幌市 北海道大学農学部

勾坂晶, 田中博光, 石橋純, 山川稔 (2010) BmNPV 感染応答遺伝子である BmEts の機能解析 平成22年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 日本蚕糸学会第80回記念大会 2010年4月4日長野県上田市信州大学繊維学部

田中博光, 勾坂晶, 石橋純, 山川稔 (2010) 細菌応答遺伝子として同定されたカイコ Ets ファミリータンパク質遺伝子の発現解析及び遺伝子産物の機能解析 平成22年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 日本蚕糸学会第80回記念大会 2010年4月4日 長野県上田市信州大学繊維学部

Sagisaka A, Ishibashi J, Imanishi S, Mita K, Yamakawa M, Tanaka H (2010) Microarray analysis of host gene expression in the silkworm cells infected with *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus, *Current Opinion in Cellular Host-Pathogen Interactions* 2010年9月7日オランダ アムステルダム

勾坂晶, 田中博光, 藤田幸輔, 石橋純, 山川稔 (2010) BmEts はウイルス由来遺伝子の遺伝子発現に抑制的に作用する 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会 2010年12月8日 兵庫県神戸市 神戸ポートアイランド

勾坂晶, 石橋純, 山川稔, 田中博光 (2011) 培養細胞を用いたカイコのウイルス感染応答遺伝子、BmEts の機能解析 平成23年度日本蚕糸学会合同支部大会 昆虫機能・利用学術講演会 第65回東北支部 第62回関東支部 第77回関西支部 第67回九州支部 合同大会 2011年11月5日 岩手県盛岡市 岩手大学農学部

田中博光, 勾坂晶, 石橋純, 山川稔 (2011) カイコ Ets ファミリータンパク質の自然免疫への関与 第34回日本分子生物学会年会 2011年12月14日神奈川県横浜市 パシフィコ横浜

田中博光 (2011) Ets ファミリータンパク質のカイコ生体防御機構への関与 昆虫ワークショップ2011東北 2011年10月14日 山形県山形市 ZAO センタープラザ

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 博光 (TANAKA HIROMITSU)  
独立行政法人 農業生物資源研究所・昆虫  
機能研究開発ユニット・主任研究員  
研究者番号：30391577

(2) 研究分担者

瀬筒 秀樹 (SEZUTSU HIDEKI)  
独立行政法人 農業生物資源研究所・遺伝  
子組換え研究開発ユニット・ユニット長  
研究者番号：70342805