

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292196

研究課題名(和文) 高次宿主制御を司るバキュロウイルス組織トロピズムの分子解剖

研究課題名(英文) Study on the molecular mechanisms of baculovirus tissue tropism

研究代表者

勝間 進 (KATSUMA, Susumu)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：20378863

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

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、細胞死の抑制や徘徊行動の誘起など非常に高度な宿主制御機構を有するウイルスである。この制御には「組織トロピズム」と呼ばれるウイルスの感染時期及び感染組織の特異性が関与していると考えられる。本研究では、「組織トロピズム」に関与するウイルス遺伝子を同定し、その機能を解明することで、「組織トロピズム」と「高次宿主制御」の関係を明らかにすることを目的とした。

研究成果の概要(英文)：The Baculoviridae is a large family of pathogens that are infectious for arthropods, particularly insects of the Lepidoptera. Baculoviruses are known to potentially encode >100 proteins, some of which are utilized to control host physiology at cellular and/or organismal levels. Lepidopteran baculoviruses show distinct tissue tropism in host insect larvae, but the molecular mechanisms of this tropism and its relationship to viral control of host caterpillars are largely unknown. In this study, I attempted to identify the genes involved in baculovirus tissue tropism and to clarify their roles in baculoviral host control.

研究分野：昆虫病理学

キーワード：バキュロウイルス 組織トロピズム 行動制御 カイコ 昆虫病理学

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、80-180 kbp の 2 本鎖 DNA をゲノムとして持つ大型の DNA ウイルスである。ゲノム解析や遺伝子欠損ウイルスの作成により、本ウイルスが、脱皮ホルモン (エクジソン) の不活化、アポトーシスの阻害、徘徊行動の誘起など非常に高度な宿主制御機構を有するウイルスであることが判明している。

昆虫ウイルスは、一般的には、その最初のターゲット組織である中腸に感染し、そこでのみ感染・増殖を行う。しかし、アルファおよびベータバキュロウイルス (チョウ目昆虫に感染するバキュロウイルス) のほとんどは、例外的に中腸ではあまり増殖せず、血液やトラキアを介して全身に速やかに移行し、ほぼ全身でウイルスが増殖する。このように、ウイルスが適切な組織で適切な量だけ増殖することが、宿主のシグナル伝達ネットワークを操作し、高次宿主制御を可能にしている要因であると考えられる。実際、私たちは、カイコ核多角体病ウイルス (BmNPV) が持つ protein tyrosine phosphatase (PTP) が、感染末期の宿主脳への感染に重要なタンパク質であり、それが正常に機能しなければ、宿主のワンダリング行動を支配できないことを示している (Katsuma et al., PLoS Pathog., 2012)。

バキュロウイルスが感染昆虫のどの組織でどの程度増殖するのかという研究は、古くは光学および電子顕微鏡観察、また最近では GFP などのマーカータンパク質を発現する遺伝子組換えウイルスを用いて行われてきた。しかし、意外なことに、各組織間でのウイルス増殖量を定量的に報告している研究は皆無であった。私たちは、カイコと BmNPV を用いて、バキュロウイルスが「良く増殖する組織」と「あまり増殖しない組織」を定量的に判定することに成功した。つまり、脂肪体やトラキアではウイルスが良く増殖する

が、絹糸腺やマルピーギ管、中腸では増殖が抑制されていることを証明した (Katsuma et al., J. Virol., 2012)。このような組織間におけるウイルス増殖の差異を本研究では「組織トロピズム」と呼ぶことにする。バキュロウイルスはその感染過程において、組織トロピズムを実現することにより、高度な宿主制御を可能にしていると考えられる。しかし、現時点では、それに関わるウイルス遺伝子群、およびそれらの作用機序はほとんど未解明である。

2. 研究の目的

本研究では、ウイルス・宿主の両面から「組織トロピズム」の分子解剖を行い、責任遺伝子を同定・解析するとともに、組織トロピズムを介した高次宿主制御メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1) 組織トロピズムに異常を示すウイルス変異体のスクリーニング、および原因遺伝子の同定

マーカー遺伝子挿入ウイルス、および点変異ウイルスライブラリーから組織トロピズムや行動制御に異常がある変異体をスクリーニングし、原因遺伝子を同定する。

(2) 組織特異的に発現するウイルス遺伝子群の同定、およびその機能解析

感染組織別 RNA を用いた RNA-seq により、組織特異的発現を示すウイルス遺伝子を同定する。

(3) 組織トロピズム実現メカニズムの解明

ウイルス変異体やトランスクリプトーム解析を通じて、バキュロウイルスにおける組織トロピズムの実現がいかにして行われているかを解明する。

4. 研究成果

(1) 組織トロピズム関連遺伝子 *bv/odv-e26* (*Bm8*) の機能解析

組織トロピズム関連遺伝子として同定している *bv/odv-e26* (*Bm8*) (Katsuma et al., J. Virol., 2012)の機能を解析するため、GFP 発現ウイルスをベースとして *bv/odv-e26* を欠損したウイルスを作成し、その性状をカイコ幼虫を用いて調査した。その結果、絹糸腺以外に前胸腺における多角体産生も欠損株において増加していた。さらに詳細な観察を行ったところ、*bv/odv-e26* 欠損ウイルスは野生株よりも感染組織におけるウイルス増殖の速度が速いことが示唆された。一方、*bv/odv-e26* 産物の局在を詳細に調査するため、GFP 融合 *bv/odv-e26* を発現する組換えウイルスを作成した。現在、野生株、及び *bv/odv-e26* 欠損ウイルスを感染させたカイコ絹糸腺を用いて、RNA-seq によるトランスクリプトームの比較解析を行っている。

(2) 行動関連遺伝子 *ptp* の再解析

BmNPV の *ptp* を欠損するとウイルス感染による徘徊行動が低下する (Kamita et al., PNAS, 2005)。私たちの研究により、PTP タンパク質による行動制御は酵素活性に依存せず、PTP タンパク質の構造タンパク質としての機能に依存することが判明している (Katsuma et al., PLoS Pathog., 2012)。しかし、近縁なバキュロウイルスである AcMNPV では PTP の酵素活性こそが行動制御に重要であるという報告がある。この相違点を再検討するため、AcMNPV の研究で用いられている変異体とほぼ同じゲノム構造や変異を持つ BmNPV を作成し、その表現型を調査した。その結果、これまでの実験結果と同様、BmNPV と AcMNPV では行動制御における PTP の作用機序が異なることが示唆された (Katsuma, J. Invertebr. Pathol., 2015)。

(3) systemic infection に関与する *arif-1* の発見と機能解析

ウイルス感染時の徘徊行動が顕著に低下するウイルスを研究室所有のウイルスライブラリーから発見した。RNA-seq 情報を利用し

た変異マッピングの結果、このウイルスは *arif-1* と呼ばれる遺伝子に変異を持ち、それが原因となり徘徊行動が低下していることが明らかになった。GFP 発現ウイルスをベースにした *arif-1* 変異体を作成し、感染個体におけるウイルス増殖を可視化したところ、血球以外の組織でのウイルス感染が遅延していることが明らかになった。すなわち、*arif-1* 変異体感染カイコで見られる徘徊行動の低下は、systemic infection の遅延によるものであった (Kokusho et al., J. Gen. Virol., 2015)。

(4) *vp39* 変異体の解析

BrdU を添加したウイルス培養上清から単離した #2080 株は、当初、多角体産生が低下する few polyhedral (FP) 変異体であると考えられた。その後の詳細な表現型解析から、#2080 に感染にしたカイコ幼虫の徘徊行動惹起が大きく遅延することがわかった。ゲノムライブラリーを使ったマーカーレススクリーン実験の結果、キャプシドタンパク質をコードする *vp39* 遺伝子にアミノ酸置換をもたらす一塩基置換を見出した。抗体を用いた解析により、変異 VP39 は野生型と同程度発現するが感染細胞内で不安定であること、およびウイルス粒子に含まれる量が少ないことが明らかになった。また、電子顕微鏡観察の結果、#2080 が形成するほとんどのウイルス粒子が異常な形状を示すことが明らかになった。

(5) *egt* と徘徊行動、および致死時間との関係

マイマイガ NPV において徘徊行動との関係が報告されている *egt* (エクジソン不活化酵素) 遺伝子が、BmNPV において徘徊行動に影響を及ぼすかを調査した。*egt* 欠損変異ウイルスを用いた行動実験の結果、BmNPV 感染において *egt* は徘徊行動と関連しないことが示された (Katsuma, J. Invertebr. Pathol., 2015)。一方、多くの NPV において *egt* 欠損が早期致死をもたらすことが報告されている。カイコ

幼虫を用いて詳細に検討した結果、ウイルスを感染させる時期によって致死時間が変化することが明らかになった (Katsuma, J. *Invertebr. Pathol.*, 2015).

(6) RNA-seq を用いた BmNPV における経口感染プロセスの解明

チョウ目昆虫に感染するバキュロウイルスは、中腸から侵入し全身に感染する。中腸は最初にウイルスが感染する組織であるが、そのレベルは低いと考えられている。中腸から組織トロピズムを伴う全身感染に至るプロセスを時系列として詳細に検討するため、カイコ幼虫に GFP 発現 BmNPV を経口感染し、継続的に中腸、脂肪体、血球を観察・サンプリングし RNA-seq を行った。解析の結果、中腸でのウイルス増殖は極めて低レベルであり、比較的速やかに血球等他組織に移行することが明らかになった。また、この解析からは組織特異的発現を示すウイルス遺伝子は発見できなかった。

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 6 件)

①Katsuma S*. Phosphatase activity of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus PTP is dispensable for enhanced locomotory activity in *B. mori* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2015, 132, 228-232, doi: 10.1016/j.jip.2015.11.002.

②Li JJ, Cao C, Fixsen SM, Young JM, Ono C, Bando H, Elde NC, Katsuma S*, Dever TE*, and Sicheri F*. Baculovirus protein PK2 subverts eIF2 α kinase function by mimicry of its kinase domain C-lobe. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015, 112, E4364-4373, doi: 10.1073/pnas.1505481112.

③Kokusho R, Kawamoto M, Koyano Y, Sugano S, Suzuki Y, Shimada T, and Katsuma S*. *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus ARIF-1 enhances systemic infection in *B. mori* larvae. *Journal of General Virology*, 2015, 96, 1938-1946, doi: 10.1099/vir.0.000130.

④Katsuma S*, and Shimada T. The killing speed of *egt*-inactivated *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus depends on the developmental stage of *B. mori* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2015, 126, 64-70, doi: 10.1016/j.jip.2015.01.012.

⑤Katsuma S*, Bando H, and Shimada T. Deletion analysis of a superoxide dismutase gene of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Applied Entomology and Zoology*, 2015, 50, 57-62, doi: 10.1007/s13355-014-0304-9.

⑥Ito H, Bando H, Shimada T, and Katsuma S*. The BIR and BIR-like domains of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus IAP2 protein are required for efficient viral propagation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014, 454, 581-587, doi: 10.1016/j.bbrc.2014.10.132.

[学会発表] (計 11 件)

①勝間進・川本宗孝・石原玄基・菅野純夫・鈴木穰・嶋田透, BmNPV の *gp64* 初期転写物は経口感染に必須である, 第 75 回昆虫病理研究会, 2015 年 9 月 25 日, 北海道大学農学部 (北海道・札幌市).

②國生龍平・黄嘉禾・堤伸浩・嶋田透・勝間進, BmNPV の BM5 タンパク質は子孫ウイルスの産生と感染後期のウイルス遺伝子発現制御に関与する, 第 75 回昆虫病理研究会, 2015 年 9 月 25 日, 北海道大学農学部 (北海道・札幌市).

- ③勝間進・川本宗孝・菅野純夫・鈴木穰・嶋田透, RNA-seq を用いた BmNPV における経口感染プロセスの解明, 第 11 回昆虫病理研究会シンポジウム, 2014 年 9 月 18 日-20 日, 富士 Calm (山梨県・富士吉田市).
- ④石原玄基・嶋田透・勝間進, バキュロウイルスの経口感染に必須なアンチセンス RNA の解析, 第 11 回昆虫病理研究会シンポジウム, 2014 年 9 月 18 日-20 日, 富士 Calm (山梨県・富士吉田市).
- ⑤國生龍平・川本宗孝・嶋田透・勝間進, BmNPV の徘徊行動関連遺伝子 *arif-1* の機能解析, 第 11 回昆虫病理研究会シンポジウム, 2014 年 9 月 18 日-20 日, 富士 Calm (山梨県・富士吉田市).
- ⑥石原玄基・嶋田透・勝間進, バキュロウイルス由来長鎖非コード RNA の機能解析, 第 74 回昆虫病理研究会, 2013 年 9 月 24 日, 東京大学農学部 (東京都・文京区).
- ⑦國生龍平・嶋田透・勝間進, *arif-1*: 新たな徘徊行動関連遺伝子, 第 74 回昆虫病理研究会, 2013 年 9 月 24 日, 東京大学農学部 (東京都・文京区).
- ⑧勝間進・嶋田透, *vp39* 変異体の機能解析, 第 74 回昆虫病理研究会, 2013 年 9 月 24 日, 東京大学農学部 (東京都・文京区).
- ⑨伊藤華子・伴戸久徳・嶋田透・勝間進, カイコ核多角体病ウイルス IAP2 の機能解析, 第 74 回昆虫病理研究会, 2013 年 9 月 24 日, 東京大学農学部 (東京都・文京区).
- ⑩國生龍平・川本宗孝・嶋田透・勝間進, BmNPV における新たな徘徊行動関連遺伝子 *arif-1* の発見と機能解析, 日本蚕糸学会第 84 回大会, 2014 年 3 月 11 日, 日本大学生物資源科学部 (神奈川県・藤沢市).
- ⑪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 の解析, 日本蚕糸学会第 84 回大会, 2014 年 3 月 11 日, 日本大学生物資源科学部 (神奈川県・藤沢市).

[図書] (計 2 件)

- ① 日本昆虫科学連合編, 昆虫科学読本 (虫の目で見た驚きの世界), 9 章・ウイルスはいかにして宿主を支配するのか (勝間進), 2015 年, 東海大学出版.
- ② 国見裕久・小林迪弘編著, 最新昆虫病理学, 2014 年, 講談社.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

- ・研究室ホームページ
<http://papilio.ab.a.u-tokyo.ac.jp/igb/>
- ・プレスリリース
<http://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/2015/20150728-1.html>

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