

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06866

研究課題名(和文)バキュロウイルスの新規アポトーシス抑制因子Apsupによる宿主域決定機構解析

研究課題名(英文)Functional analysis of the novel apoptosis suppressor Apsup from the baculovirus  
Lymantria dispar multiple nucleopolyhedrovirus

研究代表者

山田 早人 (Yamada, Hayato)

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号：70778258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでに、マイマイガ核多角体病ウイルスが持つ新規アポトーシス抑制因子Apsup (apoptosis suppressor) を同定し、マイマイガのイニシエーターカスパーゼLd-Droncがその標的因子であることを報告した。本研究では、Apsupのアポトーシス抑制機構の詳細を明らかにするため、各種Apsup変異体を用いてApsupの機能ドメインの探索を試みた。本研究により、ApsupのN末端領域がLd-Droncとの相互作用に機能すること、ApsupのC末端領域が活性型Ld-Droncへのプロセッシング抑制に機能することが示唆され、Apsupのアポトーシス抑制機構解明の手がかりを得た。

研究成果の概要(英文)：We have previously identified a novel apoptosis suppressor Apsup from the baculovirus Lymantria dispar multiple nucleopolyhedrovirus (LdMNPV). Apsup suppresses apoptosis by preventing proteolytic processing of L. dispar initiator caspase Ld-Dronc. Here, we performed mutation analyses of Apsup to determine functional domains in Apsup. Mutation analyses indicated that the N-terminal region in Apsup required for interacting with Ld-Dronc, and the C-terminal region in Apsup required for preventing the proteolytic processing of Ld-Dronc. Our findings provide clues to understand the mechanisms by which Apsup suppresses apoptosis.

研究分野：昆虫科学

キーワード：バキュロウイルス Apsup アポトーシス マイマイガ 抗ウイルス応答 昆虫培養細胞 核多角体病ウイルス

1. 研究開始当初の背景

(1) バキュロウイルス感染昆虫細胞では、抗ウイルス応答であるアポトーシスが誘導されてウイルスの増殖が阻害される。一方のバキュロウイルスはアポトーシス抑制因子を保持し、昆虫細胞が誘導するアポトーシスを抑制することで自身の増殖を図る。アポトーシスが誘導されるか抑制されるかは、昆虫細胞においてバキュロウイルスが増殖できるか否かにつながり、バキュロウイルスの宿主域決定機構に関わる重要な要素となっている。

(2) 我々はこれまでに、マイマイガから単離されたマイマイガ核多角体病ウイルス (*Lymantria dispar* multiple nucleopolyhedrovirus, LdMNPV) が持つアポトーシス抑制因子 Apsup (apoptosis suppressor) を同定した。Apsup は既知のバキュロウイルスのアポトーシス抑制因子とは相同性がなく、既知の機能ドメインも見出されない新規アポトーシス抑制因子であった。

(3) アポトーシスは一般に、カスパーゼと呼ばれるプロテアーゼの段階的な活性化によるシグナル伝達経路を介して最終的に実行される。我々はこれまでに、マイマイガのイニシエーターカスパーゼ Ld-Dronc とエフェクターカスパーゼ Ld-Caspase-1 を単離し、Apsup との相互作用解析を進めてきた。その結果、Apsup は Ld-Caspase-1 とは相互作用せず、Ld-Dronc と相互作用することが明らかになった。また、Apsup は Ld-Dronc の活性化を阻害することにより、マイマイガ細胞のアポトーシスを抑制することを明らかにした (図 1)。しかし、Apsup のアポトーシス抑制機構や機能ドメインの詳細は明らかでない。

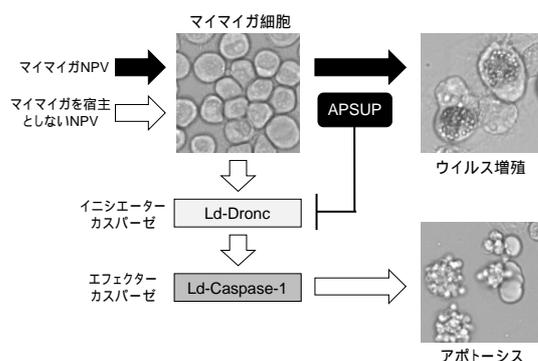


図1. 核多角体病ウイルス (NPV) 感染に対するマイマイガ細胞の応答

2. 研究の目的

(1) 昆虫ウイルスであるバキュロウイルスは、限られた昆虫種以外には感染しないため、特定の害虫に効果的で安全なウイルス農薬として活用されている。しかし、その宿主域の狭さゆえ多様な害虫層に対する防除効果が期待できないという問題がある。本研究では、

新規アポトーシス抑制因子 Apsup のアポトーシス抑制機構の解明に取り組み、Apsup のアポトーシス抑制機能を応用した多様な害虫層へ防除効果のあるバキュロウイルス農薬の開発を目指す (図 2)。

	化学農薬	従来のウイルス農薬	APSUPを応用したウイルス農薬
農薬抵抗性昆虫の出現防止	×	○	○
環境・生態系の維持	×	○	○
多様な害虫層への防除効果	○	×	○

図2. 研究の目的

3. 研究の方法

(1) Apsup 変異体発現プラスミドの作製  
*Autographa californica* MNPV (AcMNPV) がコードする Apsup 相同体 (Ac112/113) は、LdMNPV Apsup と比較して C 末端領域の 79 アミノ酸残基を欠損した構造のタンパク質であり、アポトーシス抑制活性を持たない。また、LdMNPV Apsup および AcMNPV Apsup 相同体の N 末端側領域には、機能未知の DUF2661 ドメインが存在する。LdMNPV Apsup の機能ドメインを探索するため、LdMNPV-AcMNPV Apsup 融合体 (AcMNPV Apsup の C 末端側に LdMNPV Apsup の C 末端側の 79 アミノ酸残基を融合)、LdMNPV Apsup C 末端欠損体 (C 末端側 79 アミノ酸残基を欠損)、LdMNPV Apsup C 末端発現体 (C 末端側 79 アミノ酸残基以外を欠損)、LdMNPV Apsup ドメイン欠損体 (DUF2661 ドメインを欠損)、LdMNPV Apsup ドメイン発現体 (DUF2661 ドメイン以外のアミノ酸領域を欠損) をそれぞれ発現するプラスミドを作製した (図 3)。

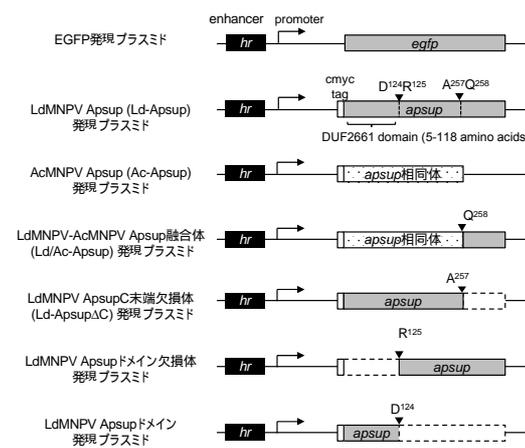


図3. LdMNPV Apsup機能ドメイン探索に用いた発現プラスミド

(2) Ld-Dronc のプロセッシング抑制に必要な LdMNPV Apsup の機能ドメインの探索

マイマイガ細胞において各種 Apsup 変異体と Ld-Dronc を共発現させ、Ld-Dronc により誘導されるアポトーシスを各種 Apsup 変異体が抑制するかどうかを調べた。具体的には、光学顕微鏡によるアポトーシス小体形成観察、蛍光基質を用いたカスパーゼ活性測定、

ウエスタンブロット法による Ld-Dronc のプロセシング検出を行った。

### (3) Ld-Dronc との相互作用に必要な LdMNPV Apsup の機能ドメインの探索

マイマイガ細胞において各種 Apsup 変異体を一過性発現させ、各種 Apsup 変異体が内在性の Ld-Dronc と相互作用するかどうかを共免疫沈降解析を用いて調べた。

### (4) アダプター因子相同体 Ld-Dark の単離

活性型 Ld-Dronc へのプロセシング誘導には、マイマイガのアダプター因子相同体 Ld-Dark が関わると考えられた。Ld-Dronc のプロセシング抑制における Apsup と Ld-Dark との関連を調べるため、マイマイガの mRNA-seq データベースに基づき設計したプライマーと、マイマイガ細胞由来 cDNA ライブラリーを鋳型に用いた RT-PCR により、Ld-Dark の単離を試みた。PCR 増幅により得られた cDNA 配列から推定されるアミノ酸配列について、既知のチョウ目昆虫のアダプター因子相同体との相同性解析および機能ドメインの探索を行った。

## 4. 研究成果

### (1) Ld-Dronc のプロセシング抑制に必要な LdMNPV Apsup の機能ドメインの探索

LdMNPV-AcMNPV Apsup 融合体 (Ld/Ac-Apsup) は、Ld-Dronc の一過性発現により誘導されるマイマイガ細胞のアポトーシスを抑制したが、LdMNPV Apsup C 末端欠損体 (Ld-Apsup $\Delta$ C) は抑制しなかった (図 4)。

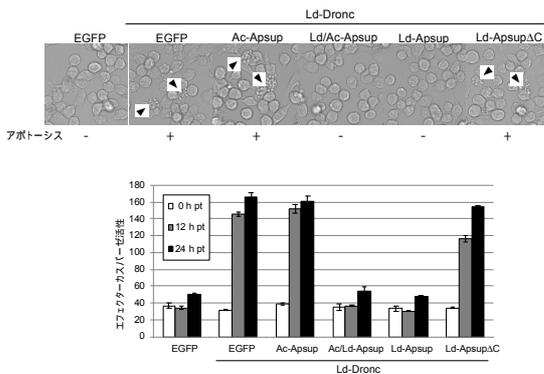


図4. マイマイガ細胞における各種変異体ApsupとLd-Droncとの共発現解析。矢頭はアポトーシスを誘導した細胞を示す。発現プラスミドを導入後0, 12, 24時間 (h post-transfection; h pt) にてエフェクターカスパーゼ活性を測定した。

また、アポトーシス誘導が抑制されたマイマイガ細胞では、Ld-Dronc のプロセシングが抑制されていた。このことから、LdMNPV Apsup のC末端側の79アミノ酸残基領域において、Ld-Dronc のプロセシング抑制に必要な機能ドメインが含まれることが示唆された。一方、LdMNPV Apsup ドメイン欠損体と LdMNPV Apsup ドメイン発現体のいずれも Ld-Dronc の一過性発現により誘導されるマイマイガ細胞のアポトーシスを抑制しなかった。このことから、Ld-Dronc のプロセシング抑制には、LdMNPV Apsup のC末端側の79アミノ酸残

基領域だけでは不十分であり、その他の領域も必要であることが示唆された。

### (2) Ld-Dronc との相互作用に必要な LdMNPV Apsup の機能ドメインの探索

AcMNPV Apsup 相同体 (Ac-Apsup) と LdMNPV Apsup C 末端欠損体 (Ld-Apsup $\Delta$ C) はアポトーシス抑制活性を示さないが、Ld-Dronc と相互作用することが示された。このことから、LdMNPV Apsup のN末端側領域 (C末端側の79アミノ酸残基領域以外の領域) において、Ld-Dronc との相互作用に必要な機能ドメインが含まれることが示唆された。特に、LdMNPV Apsup および AcMNPV Apsup のN末端領域に存在する DUF2661 ドメインが Ld-Dronc との相互作用に機能することが予想された。そこで、LdMNPV Apsup ドメイン欠損体および LdMNPV Apsup ドメイン発現体と Ld-Dronc との相互作用解析を行ったが、実験条件の検討が不十分であり、DUF2661 ドメインが Ld-Dronc との相互作用に必要な機能ドメインであるかどうかについての結論は得られなかった。

(1), (2) の研究結果から、LdMNPV Apsup のN末端領域に Ld-Dronc との相互作用に関わる機能ドメインが存在し、C末端領域に Ld-Dronc のプロセシング抑制に関わる機能ドメインが存在することが示唆された (図 5)。



図5. LdMNPV Apsupの推定機能ドメイン

### (3) アダプター因子相同体 Ld-Dark の単離

3921 bp の cDNA 部分配列を得た。cDNA 部分配列から推定された 1307 アミノ酸残基のタンパク質は、チョウ目昆虫における既知のアダプター因子相同体と高いアミノ酸相同性を示し、アダプター因子に保存されているコアダメインを保持することが示された。このことから、単離された cDNA 配列はマイマイガにおけるアダプター因子相同体 Ld-Dark の部分配列であることが示唆された。

## 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4件)

1. Makino S, Hamajima R, Saito A, Tomizaki M, Iwamoto A, Kobayashi M, Yamada H, Ikeda M. (2018) “*Bombyx mori* homolog of tumor suppressor p53 is involved in apoptosis-mediated antiviral immunity of *B. mori* cells infected with nucleopolyhedrovirus.” *Developmental and Comparative Immunology* 84, 133-141. (査読あり)
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.” *Scientific reports* 7: 3807. (査読あり)
- Hasan Z, Koizumi S, Sasaki D, Yamada H, Araki N, Fujihara Y, Okitsu S, Shirahata, H, Ishikawa, H. (2017) “JunB is essential for IL-23-dependent pathogenicity of Th17 cells.” *Nature Communications* 8: 15628. (査読あり)
  - 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. (査読あり)

〔学会発表〕(計 10 件)

- 日本蚕糸学会第 88 回大会 (2018 年 3 月 名古屋, 口頭発表)  
山田早人・小林迪弘・池田素子「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」
- 日本蚕糸学会第 88 回大会 (2018 年 3 月 名古屋, 口頭発表)  
牧野静花・浜島りな・富崎萌・小林迪弘・山田早人・池田素子「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」
- 日本蚕糸学会中部支部第 73 回・東海支部第 69 回合同研究発表会 (2017 年 12 月 松本, 口頭発表)  
牧野静花・浜島りな・富崎萌・小林迪弘・山田早人・池田素子「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」
- 日本蚕糸学会第 87 回大会 (2017 年 3 月 つくば, 口頭発表)  
浜島りな・小林迪弘・山田早人・池田素子「カイコ細胞が誘導する rRNA 分解とアポトーシスに関する核多角体病ウイルスの機能解析」
- 日本蚕糸学会第 87 回大会 (2017 年 3 月 つくば, 口頭発表)  
牧野静花・浜島りな・富崎萌・小林迪弘・山田早人・池田素子「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」
- 日本蚕糸学会第 87 回大会 (2017 年 3 月 つくば, 口頭発表)  
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「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」
- 日本蚕糸学会中部支部第 72 回・東海支部第 68 回合同研究発表会 (2016 年 12 月 松本, 口頭発表)

山田早人・小林迪弘・池田素子「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 回合同研究発表会 (2016 年 12 月 松本, 口頭発表)  
牧野静花・浜島りな・富崎萌・小林迪弘・山田早人・池田素子「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」
- 第 12 回 昆虫病理研究会シンポジウム (2016 年 9 月 岩沼, ポスター発表)  
浜島りな・小林迪弘・山田早人・池田素子「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 (2016 年 9 月 岩沼, ポスター発表)  
牧野静花・浜島りな・富崎萌・小林迪弘・山田早人・池田素子「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」

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~yousan/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者 なし