

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02213

研究課題名(和文) 昆虫細胞における抗ウイルス応答としての全タンパク質合成停止機構の解明

研究課題名(英文) anti-viral response

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)：カイコ細胞が核多角体病ウイルス(NPV)の感染に対する抗ウイルス応答として誘導する、rRNAの分解機構の解明を目的として行った。rRNA分解を誘導する、NPVのP143(Ac-P143)の最小領域を決定し、最小領域と相互作用するカイコ細胞因子を探索した。蛍光標識したカイコリボソームの観察から、細胞質に存在するリボソームタンパク質あるいはリボソーム自体の分解が、NPV感染によって誘導されることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昆虫のウイルス感染に対する生体防御は主に自然免疫である。昆虫は獲得免疫を持たないかわりに自然免疫を発達させていると考えられる。NPV感染によってカイコ細胞に誘導されるrRNAの分解は、生体防御機構の1つである。リボソームの分解は細胞の生存戦略として生物一般に備わっているが、そのメカニズムはわかっていない。昆虫の自然免疫に関する研究成果は、リボソーム分解の仕組みの理解につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：To clarify the molecular mechanisms of protein synthesis shutdown in anti-viral immune response of NPV-infected insect cells, we analyzed the mechanisms of rRNA degradation in *Bombyx mori* cells (BM-N cells) during abortive infection with heterologous nucleopolyhedrovirus (NPVs). In this research, we identified the minimal region of Ac-P143 responsible for rRNA degradation. By using the minimal region of Ac-P143, we have searched the cellular factors interacting with Ac-P143 and responsible for induction of rRNA degradation. By using fluorescence-labelled ribosomal proteins, we indicated that ribosomal proteins and/or ribosomes are degraded in the cytoplasm of infected cells.

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 抗ウイルス応答 カイコ 全タンパク質合成停止 リボソーム分解 リボソームRNA分解

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

核多角体病ウイルス (NPV) は宿主特異性が高く、宿主以外の昆虫細胞では感染が途中で停止して子ウイルスが産生されない、すなわち不全感染となる場合がある。不全感染となる昆虫細胞では、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、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の重要な要素と考えられるが、私たちの研究を除いて十分な追求が試みられておらず、そのメカニズムは明らかになっていない。

私たちはこれまでの研究により、カイコ由来の培養細胞 (カイコ細胞) で不全感染となる、*Autographa californica* MNPV (AcMNPV) を含む種々の NPV の感染によって、カイコ細胞のリボソーム RNA (rRNA) が分解減少することを発見した。一方、カイコ細胞で増殖感染する *Bombyx mori* NPV (BmNPV) 感染では rRNA の分解減少は認められなかったことから、rRNA の分解減少によって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、カイコ細胞で不全感染となる種々の 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。

真核生物のリボソームは、rRNA とリボソームタンパク質からなる巨大な複合体であり、非常に安定に存在している。しかし、栄養飢餓やある種のストレスにさらされると、リボソームは急速に分解され、余分なタンパク質合成を抑制することが知られている。このように、リボソームは必要に応じて急速に分解される仕組みが細胞内に備わっていると考えられるが、分解を誘導するシグナルや巨大複合体を分解するメカニズムなどについてはほとんどわかっていない。

### 2. 研究の目的

本研究は、私たちが見出した NPV 感染によって誘導される、カイコ細胞における rRNA 分解の分子機構を解明し、全タンパク質合成停止のメカニズムを明らかにすることを目的とした。この成果は、生物に共通して備わっているリボソームの分解の仕組みの解明につながることを期待される。

### 3. 研究の方法

(1) *Autographa californica* MNPV (AcMNPV) の P143 (Ac-P143) の部分欠損体の作製は、Ac-P143 発現プラスミドをテンプレートとして、KOD-plus-Mutagenesis Kit を用いて任意の配列を欠損させることにより行った。*Bombyx mori* NPV P143 (Bm-P143) の部分欠損体は、Bm-P143 発現プラスミドをテンプレートとして Ac-P143 部分欠損体と同様に作製し、コントロールとして使用した。各発現プラスミドをカイコ由来 BM-N 細胞 (カイコ細胞) で一過性発現させ、発現細胞から RNA を回収して、キャピラリー電気泳動法により RNA の分解を解析した。

(2) バキュロウイルス発現系を用いて Ac-P143 の最小領域を発現する組換えウイルスを作製した。組換えウイルスを Sf9 細胞に感染させることにより、タンパク質の発現を行った。

(3) KAIKOBase の登録配列からエンドリボヌクレアーゼをコードすることが推定される 18 の遺伝子を選抜し、ORF 部分配列をクローニングして、これを鋳型として MEGAscript T7 Kit を用いて dsRNA を合成した。各遺伝子を soaking RNAi 法 (dsRNA を培地に添加して細胞に取り込ませる方法) によってノックダウンしたカイコ由来 BmN4-SID1 細胞に、AcMNPV を感染させ、感染細胞から RNA を回収して、キャピラリー電気泳動法により RNA の分解を解析した。

(4) カイコリボソームの小サブユニットに組み込まれる BmRpS15 と BmRpS18、および大サブユニットに組み込まれる BmRpL10 と BmRpL11 をコードする遺伝子をそれぞれクローニングした。BmRpS15 と BmRpS18 には N 末端または C 末端に Egfp タグを付加した発現プラスミドを作製し、一方、BmRpL10 と BmRpL11 には N 末端または C 末端に DsRed タグを付加した発現プラスミドを作製して、トランスフェクション法によりカイコ細胞に導入した。強い蛍光が観察された、N 末に Egfp を付加した EgfpRpS15 と、C 末に DsRED を付加した RpL11DsRed を用いて以下の解析を行った。EgfpRpS15 と RpL11DsRed を共発現させたカイコ細胞に、AcMNPV または BmNPV を感染させ、経時的に蛍光顕微鏡観察を行った。

### 4. 研究成果

### (1) rRNA 分解を誘導する Ac-P143 最小領域の決定

Ac-P143 と相互作用するカイコ細胞因子の探索を目的として、全長の Ac-P143 をカイコ細胞で一過性発現させて免疫沈降法を実施したが、候補となる細胞タンパク質を特定することができなかった。特定できなかった原因として、カイコ細胞における Ac-P143 の発現量が低いことが考えられた。Ac-P143 は 1221 アミノ酸残基 (aa) からなるタンパク質であり、この大きさが発現効率に影響していると予想された。そこで、発現効率を上げる目的で、rRNA 分解を誘導する Ac-P143 の最小領域の探索を行った。その結果、Ac-P143 の 325 から 599 番目までのアミノ酸残基 (aa325-599) によって rRNA 分解が誘導され、325 番目のグルタミン残基を欠損させた Ac-P143(aa326-599)では rRNA 分解が誘導されなかったことから、Ac-P143(aa325-599)が最小領域であると結論した。グルタミン残基(Q325)はエフェクタードメインの構成要素として機能しているかを検討するため、アラニン残基への置換を行った。その結果、Ac-P143(aa325-599)のアラニン置換体においても rRNA 分解が誘導されたことから、Q325 は適切な構造の維持に関与すると考えられた。この Ac-P143 最小領域をカイコ細胞で一過性発現させたが、十分な発現を確認することができず、相互作用する細胞因子を特定することはできなかった。発現が確認できなかった理由として、タンパク質として十分に発現蓄積する以前に rRNA が分解され、タンパク質合成停止となっていると考えられた。そこで、実験方法を見直し、カイコ細胞内でタンパク質を発現させるのではなく、タンパク質発現系を用いて Ac-P143 の最小領域を大量発現させ、発現タンパク質を用いたアフィニティーカラムを作製する方法に切り替えた。大腸菌発現系とバキュロウイルス発現系を用いて大量発現を試みた結果、バキュロウイルス発現系で Ac-P143 最小領域の発現を確認することができた。この発現タンパク質を用いてアフィニティーカラムを作製し、相互作用するカイコ細胞因子の探索を進めている。

### (2) エンドリボヌクレアーゼ遺伝子の探索

NPV 感染カイコ細胞から抽出した RNA をキャピラリー電気泳動法により解析すると、約 1,400 nt の rRNA 分解断片が検出されることから、rRNA 分解の実行因子はエンドリボヌクレアーゼであると予想した。カイコゲノムデータベース (KAIKOBASE) を用いて、エンドリボヌクレアーゼをコードすることが推定される 18 個の遺伝子を選抜した。選抜した遺伝子が rRNA 分解に関与するかを、dsRNA を用いた RNAi 法により解析した。soaking RNAi 法により各遺伝子をノックダウンした BmN4-SID1 細胞に AcMNPV を感染させた結果、いずれの遺伝子をノックダウンした場合も rRNA 分解は抑制されなかった。したがって、今回選抜した 18 の遺伝子からエンドリボヌクレアーゼを特定することはできなかった。

### (3) 感染細胞におけるリボソームの挙動

rRNA 分解をもたらすリボソーム分解経路を明らかにすることを目的として、リボソーム分解が行われる細胞内局在を調査した。まず、Egfp あるいは DsRed タグによって蛍光標識されたカイコリボソームタンパク質をカイコ細胞で発現させる系を構築した。キイロショウジョウバエで蛍光標識タンパク質が正常にリボソームに組み込まれることが報告されているリボソームタンパク質のカイコホモログ (BmRpS15, BmRpS18, BmRpL10, BmRpL11) をコードする遺伝子をクローニングし、発現ベクターに挿入した。発現タンパク質の N 末端あるいは C 末端側に Egfp あるいは DsRed を付加するため、それぞれのタグ配列を N 末端あるいは C 末端側に挿入した。各発現プラスミドをカイコ細胞に導入した結果、N 末端に EGFP を付加した BmRpS15 と、C 末端に DsRed を付加した BmRpL11 の発現によって、主に細胞質に強い蛍光が観察された。つぎに、蛍光標識した両リボソームタンパク質を共発現させたカイコ細胞に、rRNA 分解を誘導する *Autographa californica* NPV (AcMNPV) 感染させ、経時的に顕微鏡観察を行った。その結果、感染後 24 時間において、両方の蛍光の減少が認められた。一方、コントロールとして用いた、rRNA 分解を誘導しない *Bombyx mori* NPV (BmNPV) 感染細胞および偽感染細胞においては、いずれの蛍光の減少も認められなかった。したがって、AcMNPV 感染によって、細胞質に存在するリボソームタンパク質あるいはリボソーム自体の分解が誘導されていることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Isobe, S., Ota, A., Takata, S., Hamajima, R., Makino, S., Kobayashi, M., and Ikeda, M.	4. 巻 73
2. 論文標題 NISES-AnPe-428 cell line derived from the Chinese oak silkworm <i>Antheraea pernyi</i> is permissive for multiple nucleopolyhedrovirus species from insects of four different families.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cytotechnol.	6. 最初と最後の頁 643-655
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10616-021-00485-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Millado, JBH., Hamajima, R., Sugiura, W., Makino, S., Kobayashi, M., and Ikeda, M.	4. 巻 90
2. 論文標題 Identification and characterization of <i>Bombyx mori</i> homologs of Bonus, Mdm2, Rad6, Sce, and Synoviolin.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Insect Biotechnol. Sericol.	6. 最初と最後の頁 21-32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11416/jibs.90.2_021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hamajima, R., Ota, A., Makino, S., Millado, JBH., Kobayashi, M., and Ikeda, M.	4. 巻 276
2. 論文標題 Identification of the minimal AcMNPV P143 protein region responsible for triggering apoptosis and rRNA degradation of <i>Bombyx mori</i> cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Virus Res.	6. 最初と最後の頁 19832
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.virusres.2019.197832	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 池田素子	4. 巻 69
2. 論文標題 昆虫細胞の抗ウイルス応答	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ウイルス	6. 最初と最後の頁 47-60
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2222/jsv.69.47	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Makino, S., Hamajima, R., Saito, A., Tomizaki, M., Iwamoto, A., Kobayashi, M., Yamada, H., Ikeda, M.	4. 巻 84
2. 論文標題 Bombyx mori homolog of tumor suppressor p53 is involved in apoptosis-mediated antiviral immunity of B. mori cells infected with nucleopolyhedrovirus.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Dev. Comp. Immunol.	6. 最初と最後の頁 133-141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dci.2018.02.009.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hamajima, R., Saito, A., Makino, S., Kobayashi, M., and Ikeda, M.	4. 巻 258
2. 論文標題 Antiviral immune responses of Bombyx mori cells during abortive infection with Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Virus Res	6. 最初と最後の頁 28-38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virusres.2018.09.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計22件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 太田綾香・浜島りな・MTLLADO, Justine Bennette H.・小林迪弘・池田素子
2. 発表標題 AcMNPV 感染カイコ細胞における rRNA 分解実行因子とリボソームの挙動の調査
3. 学会等名 令和3年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 MILLADO, Justine Bennette H., HAMAJIMA Rina, MAKINO S. KOBAYASHI Michihiro, IKEDA Motoko
2. 発表標題 Functional analysis of bonus, MDM2, rad6, SCE, and synoviolin homologs from Bombyx mori
3. 学会等名 令和3年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高田史緒里・浜島りな・斎藤綾・小林迪弘・池田素子
2. 発表標題 カイコ核多角体病ウイルスの bm-iap1とbm-iap2のアポトーシスにおける機能解析
3. 学会等名 令和3年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉浦和香・浜島りな・牧野静花・MILLADO, Justine Bennette H.・小林迪弘・池田素子
2. 発表標題 カイコ p53 タンパク質のアポトーシス誘導活性及び局在性を担うドメインの調査
3. 学会等名 令和3年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久土目奈央・浜島りな・小林迪弘・池田素子
2. 発表標題 NPV 感染カイコ細胞における抗ウイルス応答の誘導に關与するDNA 認識受容体の探索
3. 学会等名 令和3年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Jusitine Bennette H. Millado・Rina Hamajima・Shizuka Makino・Michihiro Kobayashi・Motoko Ikeda
2. 発表標題 Cloning and characterization of Bombyx mori homologs of bonus, mdm2, rad6, SCE, and synoviolin.
3. 学会等名 日本蚕糸学会中部支部第76回・東海支部第72回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉浦和香・浜島りな・牧野静花・Millado, Justine Bennette H.・小林迪弘・池田素子
2. 発表標題 カイコp53タンパク質の局在性及びアポトーシス誘導活性を担うドメインの探索
3. 学会等名 日本蚕糸学会中部支部第76回・東海支部第72回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久土目奈央・浜島りな・小林迪弘・池田素子
2. 発表標題 核多角体病ウイルス感染カイコ細胞におけるカイコSTING相同体の機能解析
3. 学会等名 日本蚕糸学会中部支部第76回・東海支部第72回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 太田綾香・浜島りな・Millado, Justine Bennette H.・小林迪弘・池田素子
2. 発表標題 rRNA分解に関わるAc-P143機能領域の決定とrRNA分解実行因子の探索
3. 学会等名 日本蚕糸学会中部支部第76回・東海支部第72回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高田史緒里・浜島りな・斎藤綾・小林迪弘・池田素子
2. 発表標題 カイコ細胞におけるカイコ核多角体病ウイルスのbm- iap1とbm- iap2の機能解析
3. 学会等名 日本蚕糸学会中部支部第76回・東海支部第72回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浜島りな・太田綾香・Millado, Justine Bennette H.・小林迪弘・池田素子
2. 発表標題 Autographa californica核多角体病ウイルスP143のrRNA分解とアポトーシスの誘導に関する領域の探索
3. 学会等名 平成31年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 牧野静花・浜島りな・Millado, Justine Bennette H.・小林迪弘・池田素子
2. 発表標題 カイコ細胞におけるBm-p53の制御機構解析
3. 学会等名 平成31年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田早人・小林迪弘・池田素子
2. 発表標題 soaking RNAi法が利用可能な形質転換マイマイガ細胞の作出とマイマイガNPV apsupの機能解析
3. 学会等名 平成31年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥野文人・浜島りな・橘亜美・小林迪弘・池田素子
2. 発表標題 カイコ細胞における抗ウイルス応答に関するp143とep32遺伝子を欠損させたHycuMNPV バクミドの作製と感染性の調査
3. 学会等名 日本蚕糸学会中部支部第75回・東海支部第71回大会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 下山敦志・今泉明敏・浜島りな・小林迪弘・山田早人・池田素子
2. 発表標題 NPV感染マイマイガ細胞におけるcI <sub>d</sub> -iap1減少機構の解析
3. 学会等名 日本蚕糸学会中部支部第75回・東海支部第71回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田綾香・浜島りな・Millado, Justine Bennette H.・小林迪弘・池田素子
2. 発表標題 AcMNPV P143 のrRNA 分解とアポトーシスの誘導を引き起こす最小配列の決定
3. 学会等名 日本蚕糸学会中部支部第75回・東海支部第71回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高田史緒里・浜島りな・牧野静花・小林迪弘・池田素子
2. 発表標題 カイコ核多角体病ウイルスがコードする bm-iap1 と bm-iap2 の機能解析
3. 学会等名 日本蚕糸学会中部支部第75回・東海支部第71回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 牧野静花・浜島りな・富崎 萌・小林迪弘・山田早人・池田素子
2. 発表標題 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
3. 学会等名 平成30年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田早人・小林迪弘・池田素子
2. 発表標題 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
3. 学会等名 平成30年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 下山敦志・今泉明敏・浜島りな・小林迪弘・山田早人・池田素子
2. 発表標題 マイマイガ細胞におけるLd-p53の同定と機能解析
3. 学会等名 日本蚕糸学会中部支部第74回・東海支部第70回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 牧野静花・浜島りな・富崎 萌・小林迪弘・池田素子
2. 発表標題 BmNPV感染カイコ細胞におけるカイコp53を介したアポトーシス誘導機構の解析
3. 学会等名 日本蚕糸学会中部支部第74回・東海支部第70回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浜島りな・斎藤 綾・牧野静花・小林迪弘・池田素子
2. 発表標題 AcMNPV感染カイコ細胞におけるNPVの感染現象と抗ウイルス応答誘導の関係性の調査
3. 学会等名 日本蚕糸学会中部支部第74回・東海支部第70回大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------