

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02966

研究課題名(和文)バキュロウイルスが多角体の大量産生を実現する細胞内チューニングプロセスの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of how baculoviruses produce a huge amount of occlusion bodies in host cells

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(農学部)・教授

研究者番号：20378863

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)：昆虫を宿主とするバキュロウイルスの最大の特徴は、感染の最後期に「多角体」と呼ばれるタンパク性の結晶体を大量に産生することである。多角体の主成分はポリヘドリンであり、ウイルス感染細胞全タンパク質の50%を占めることもある。このように単一のタンパク質が細胞全タンパク質の数十%を占めるシステムは、多細胞真核細胞ではこのバキュロウイルス-昆虫細胞系のみである。本研究では、バキュロウイルスがこの多角体の産生機構について、ポリヘドリンの核移行、蓄積量、結晶化、およびウイルス感染時の宿主ゲノム・遺伝子発現について成果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バキュロウイルスベクター(Baculovirus Expression Vector System, BEVS)は、インフルエンザワクチンをはじめとするVirus-like particle (VLP)ワクチンの製造から獣医薬、試薬生産まで幅広く利用されている。そのような背景にも関わらず、バキュロウイルスが最終的に大量の多角体を感染細胞核内に産生するメカニズムは、開発から約40年経った今でもその大部分が未解明である。本研究でバキュロウイルス発現系のコアメカニズムを解明することは、それを模倣したウイルスフリーVLP産生系の開発やそれを用いた新しいワクチン生産技術の開発につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Baculoviruses are insect pathogens that produce a huge amount of occlusion bodies (OBs) in the nuclei of the infected cells at the very late stage of infection. OBs are composed mainly of a single viral protein called polyhedrin (POLH). By utilizing extremely high level expression of POLH in insect cells, baculoviral vector has been developed to produce foreign proteins including vaccines in insect cells. However, at present, it is still largely unknown how polh is hypertranscribed and how POLH is efficiently translated, transported into the nucleus, and crystallized. In this study, we attempted to solve these issues using *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus as a model.

研究分野：昆虫分子生物学、昆虫病理学

キーワード：バキュロウイルス、ポリヘドリン、リヘト、リン、多角体、大量発現、バキュロウイルスベクター、核移行、結晶化、昆虫細胞

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

バキュロウイルスは昆虫に感染する大型の DNA ウイルスである。バキュロウイルスは自身が持つ 100 以上の遺伝子を巧みに利用することで、高度な宿主制御を実現し、子孫ウイルスの産生を最大化する。バキュロウイルスの最大の特徴は、感染の最後期に「多角体」と呼ばれる数百の子孫ウイルスを含むタンパク性の結晶体を大量に産生することである。多角体の主成分はウイルスが合成するポリヘドリン (POLH) であり、ウイルス感染細胞全タンパク質の 50% を占めることもある。このように単一のタンパク質が細胞全タンパク質の数十% を占めるシステムは、多細胞真核細胞ではこのバキュロウイルス-昆虫細胞系のみであり、このポリヘドリン遺伝子 (*polh*) プロモーターを利用した「バキュロウイルスベクター (Baculovirus Expression Vector System, BEVS)」が開発されることにつながった。現在では、インフルエンザワクチンをはじめとするワクチンの製造から獣医薬、試薬生産まで幅広く利用されている。そのような背景にも関わらず、バキュロウイルスが最終的に大量の多角体を感染細胞核内に産生するメカニズムは、開発から約 40 年経った今でもその大部分が未解明である。

2. 研究の目的

多角体の大量発現機構は、*polh* の選択的転写機構、*polh* mRNA の効率的翻訳機構、POLH の選択的核移行システム、および POLH の結晶化というステップに分けられるが、すべてのステップが未解明と言って良い状況にある。一方、多角体の大量発現が実現するための宿主細胞環境の理解も進んでいない。本研究では、主に POLH の核移行、結晶化、宿主のゲノム状態と遺伝子発現について研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) において、POLH の核移行シグナル (Nuclear localization Signal, NLS) が同定されている (Jarvis et al., 1991, *Virology*)。しかし、NLS の詳細な解析や他のバキュロウイルスにおける POLH NLS の研究は全く行われていない。本研究では、*Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* (BmNPV) を用いて、POLH NLS の機能解析を行い、多角体の性状との関係も調査する。

(2) BmNPV の遺伝子欠損株や変異体の解析から、多角体の形状や産生量に異常を生じる変異体を見出した。これらの変異体の性状解析から、遺伝子と多角体の性状の関係を明らかにする。

(3) バキュロウイルスの感染実験は、通常、卵巣や胚子由来の細胞を用いて行われる。多角体の形状が環境によって変化するかどうか調査するために、脂肪体由来の培養細胞を用いた感染実験を行い、多角体の性状について検討する。

(4) POLH はバキュロウイルス感染細胞全タンパク質の 50% を占めることもある。このように単一のタンパク質が細胞全タンパク質の数十% を占める異常な状況下における宿主細胞のゲノム環境、遺伝子発現について ChIP-seq と RNA-seq (Shoji et al., 2014, *Nucleic Acids Res.* に準じる) を用いた解析を行う。

(5) ケミカルスクリーニングにより、POLH の発現に関わる宿主因子を同定し、その作用点と POLH 発現の関係を解明する。

4. 研究成果

(1) AcMNPV を用いた解析より、POLH は 32-35 番目の KRKK という塩基性アミノ酸クラスターがその核移行に必須であることが知られている。BmNPV を用いて KRKK に 1, 2, 3, 4 個の変

異を導入したウイルスを作成した（合計 17 ウイルス）。それらのウイルスを用いて感染実験を行い、野生株との性状比較を行った。その結果、AcMNPV と同様、BmNPV においても KRKK に変異が存在すると POLH の核移行が阻害され、多角体が核と細胞質に存在するようになることが明らかになった。その際、核局在する多角体の形状は野生株と同じだが、細胞質に存在する多角体は大型化し、四面体形状を示すことがあった。すなわち、POLH のアミノ酸配列は同じでも、形成される場所の違いで多角体の形状が変化することが初めて示された。一方、33 番目の R に変異が入ると POLH の蓄積量が低下し、少数の四面体の多角体を形成することが明らかになった。報告されているすべての POLH 配列をデータベースから取得し、KRKK の保存性について調査したところ、R33 はすべてのアルファバキュロウイルスで保存されていた。以上の結果から、R33 は核移行よりもむしろ POLH の蓄積量に関与する重要な残基であることが判明した（投稿論文準備中）。

(2) BmNPV の *p24* と呼ばれる遺伝子を欠損すると、立方体の多角体を形成することが明らかになった。さらに、組換えウイルスの作成によって、中国のグループから配列のみ発表されていた四角の多角体を形成する変異体の原因が *p24* における点変異によるものであることを明らかにした（Kokusho and Katsuma, 2021, *Virology*）。ポリヘドリン遺伝子以外の遺伝子変異によって多角体の形状が変化することを示した数少ない報告となった。

一方、近縁である 2 種のバキュロウイルス AcMNPV と BmNPV の遺伝子比較を行い、AcMNPV ゲノムに存在するが BmNPV にはない遺伝子の機能を解析した。その結果、BmNPV において AcMNPV の *p94* 遺伝子を発現させた際に多角体の産生量が低下することが明らかになった。BmNPV のゲノム上には *p94* が欠損した痕跡が認められることから（Kamita et al., 1993, *J. Virol.*）、BmNPV において *p94* はポリヘドリンの発現に負に作用する遺伝子であると考えられた。

(3) 脂肪体由来の培養細胞である NIAS-aff3 に BmNPV を感染させた場合、通常用いている卵巣由来 BmN-4 細胞と比較すると多角体が大きくなり、立方体型になることが明らかになった。カイコ幼虫に BmNPV を感染させ、脂肪体に形成される多角体の形状を調査したが、他組織で形成される多角体と差異は認められなかった（Matsuda-Imai and Katsuma, 2020, *J. Invertebr. Pathol.*）。以上のことから、NIAS-aff3 における形態異常多角体の形成は脂肪体の性質に依存するわけではなく、NIAS-aff3 そのものの性質によるものであることがわかった。ウイルスが同じでも、感染・増殖環境によって多角体の形状が変化することを示すことができた。

(4) ポリヘドリンの高発現と宿主細胞ゲノム状態の関係を調査するために、BmNPV 感染 BmN-4 細胞におけるユークロマチンマークである H3K4me3 修飾を調査した。その結果、BmN-4 細胞において高発現している遺伝子は H3K4me3 修飾がエンリッチされていること、低発現の遺伝子はその逆であることを確認した。BmNPV 感染時でもこの傾向は変わらなかったが、ウイルス感染が進行するに伴いこの修飾のエンリッチ傾向は弱まり、高発現している遺伝子の発現は減少し、低発現の遺伝子の発現が上昇してくることが判明した。すなわち、ウイルス感染によって H3K4me3 修飾の制御がリラックスし、宿主遺伝子の発現に影響が出ることが判明した（Shoji et al., 2021, *Virus Genes*）。

(5) ケミカルスクリーニングの結果、BmNPV 感染時に Hsp90 阻害剤である 17-N-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) を添加すると多角体がほとんど形成されないことが明らかになった。詳細な解析の結果、その原因が初期遺伝子 *iel* の転写抑制による delayed early、early、late 遺伝子の発現遅延によるものであることが明らかになった（Katsuma, 2021, *Virus Res.*）。

参考文献（本研究の成果以外）：

Requirements for nuclear localization and supramolecular assembly of a baculovirus polyhedrin protein.

Jarvis DL, Bohlmeier DA, Garcia A Jr.

Virology. 1991 Dec;185(2):795-810. doi: 10.1016/0042-6822(91)90551-1.

Identification and characterization of the p35 gene of Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus that prevents virus-induced apoptosis.

Kamita SG, Majima K, Maeda S.

J Virol. 1993 Jan;67(1):455-63. doi: 10.1128/JVI.67.1.455-463.1993.

Silkworm HP1a transcriptionally enhances highly expressed euchromatic genes via association with their transcription start sites.

Shoji K, Hara K, Kawamoto M, Kiuchi T, Kawaoka S, Sugano S, Shimada T, Suzuki Y, Katsuma S.

Nucleic Acids Res. 2014 Oct;42(18):11462-71. doi: 10.1093/nar/gku862.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9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 Fujimoto S, Kawamoto M, Shoji K, Suzuki Y, Katsuma S, Iwanaga M	4. 巻 56
2. 論文標題 Whole-genome sequencing and comparative transcriptome analysis of Bombyx mori nucleopolyhedrovirus La strain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Virus Genes	6. 最初と最後の頁 249, 259
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11262-019-01727-2	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 Kokusho R, Katsuma S	4. 巻 559
2. 論文標題 Loss of p24 from the Bombyx mori nucleopolyhedrovirus genome results in the formation of cuboidal occlusion bodies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 173, 181
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.virol.2021.03.017	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 Katsuma S	4. 巻 291
2. 論文標題 Hsp90 function is required for stable transcription of the baculovirus transactivator ie-1 gene	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Virus Research	6. 最初と最後の頁 198200
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.virusres.2020.198200	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 Hikida H, Katsuma S	4. 巻 148
2. 論文標題 High-resolution analysis of baculovirus-induced host manipulation in the domestic silkworm, Bombyx mori	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parasitology	6. 最初と最後の頁 105, 109
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1017/S0031182020001924	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 Matsuda-Imai N, Katsuma S	4. 巻 177
2. 論文標題 Characterization of Bombyx mori nucleopolyhedrovirus infection in fat body-derived Bombyx mori cultured cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Invertebr Pathol	6. 最初と最後の頁 107476
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jip.2020.107476	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 Hikida H, Kokusho R, Matsuda-Imai N, Katsuma S	4. 巻 173
2. 論文標題 Bombyx mori nucleopolyhedrovirus Bm96 suppresses viral virulence in Bombyx mori larvae	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Invertebr Pathol	6. 最初と最後の頁 107374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jip.2020.107374	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 Shoji K, Kokusho R, Kawamoto M, Suzuki Y, Katsuma S	4. 巻 57
2. 論文標題 H3K4me3 histone modification in baculovirus-infected silkworm cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Virus Genes	6. 最初と最後の頁 459, 463
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11262-021-01858-5	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 Kokusho R, Katsuma S	4. 巻 183
2. 論文標題 Bombyx mori nucleopolyhedrovirus ptp and egt genes are dispensable for triggering enhanced locomotory activity and climbing behavior in Bombyx mandarina larvae	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Invertebr Pathol	6. 最初と最後の頁 107604
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jip.2021.107604	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 勝間進	4. 巻 35
2. 論文標題 昆虫ウイルスの制御と利用, 特集 ウイルスとたたかう農畜水産	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本農学アカデミー会報	6. 最初と最後の頁 11, 13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 藤本正太・疋田弘之・國生龍平・鈴木智大・勝間進・岩永将司
2. 発表標題 Bombyx mori nucleopolyhedrovirus gp37遺伝子の解析
3. 学会等名 令和2年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 疋田弘之・庄司佳祐・鈴木穰・勝間進
2. 発表標題 カイコ核多角体病ウイルス感染細胞における宿主シャットオフ回避機構の解析
3. 学会等名 令和2年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 勝間進
2. 発表標題 昆虫ウイルスと宿主昆虫との 相互作用を分子レベルで紐解く
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 勝間進
2. 発表標題 昆虫ウイルスの制御と利用
3. 学会等名 日本農学アカデミー公開シンポジウム「ウイルスとたたかう農畜水産」(招待講演)(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 室塚慶大、勝間進
2. 発表標題 BmNPVゲノムに存在しないAcMNPV遺伝子の機能解析
3. 学会等名 令和4年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会(日本蚕糸学会第92回大会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 國生龍平、勝間進
2. 発表標題 BmNPV感染カイコ細胞がARIF-1を介して形成する二種類の細胞内構造
3. 学会等名 第78回昆虫病理研究会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 勝間進	4. 発行年 2020年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 224
3. 書名 カイコの科学「カイコ幼虫の行動を操るバキュロウイルス」	

1. 著者名 仲井まどか、勝間進	4. 発行年 2022年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 200
3. 書名 バイオロジカル・コントロール 第2版	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京大学昆虫遺伝研究室ホームページ https://sites.google.com/view/igblab-ut-aba</p>

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
---------	---------