

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380033

研究課題名(和文) リボソームRNA分解による昆虫細胞の抗ウイルス応答

研究課題名(英文) Degradation of rRNA in insect cells antiviral immune 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) 15,000,000円、(間接経費) 4,500,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに、核多角体病ウイルス(NPV)感染によって、全タンパク質合成停止となりウイルスの増殖が抑制されるカイコ培養細胞(BM-N細胞)において、rRNAが分解減少することを報告した。本研究では、全タンパク質合成停止の分子機構の解明を目的として、rRNA分解に関わるRNase遺伝子と、RNase活性を調節しているRNaseインヒビターの遺伝子の同定と機能解析を行った。さらに、BM-N細胞で増殖できるカイコNPVから、rRNA分解を回避する因子の同定を行った。

研究成果の概要(英文)：Previously, we demonstrated that rRNA degradation occurs in Bombyx cells (BM-N cells) during abortive infection with heterologous nucleopolyhedroviruses (NPVs). rRNA degradation is likely linked to the global protein synthesis shutdown observed in BM-N cells infected with heterologous NPVs. In the present study, we examined the molecular mechanisms of rRNA degradation of BM-N cells. We cloned cDNAs of RNase and RNase inhibitor from BM-N cells possibly responsible for rRNA degradation, and functional analyses were performed by the transient gene expression and RNAi-based gene silencing. We also examined the possible Bombyx mori NPV factor(s) responsible for inhibition of rRNA degradation in BM-N cells.

研究分野：昆虫ウイルス学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：核多角体病ウイルス 昆虫細胞 抗ウイルス応答 リボソームRNA分解 全タンパク質合成停止 カイコ

## 1. 研究開始当初の背景

核多角体病ウイルス (NPV) が不全感染となる昆虫細胞では、しばしば、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、感染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戦略の重要な要素であるにもかかわらず、ほとんど研究されてこなかった。

私達はこれまでに、NPV 感染によって全タンパク質合成停止となるカイコ由来の BM-N 細胞で、リボソーム RNA (rRNA) が断片化を伴って分解減少することを明らかにした。この rRNA の分解減少が、全タンパク質合成停止の主因であると考えられた。そこで、全タンパク質合成停止を誘導する NPV と BM-N 細胞を用いることによって、rRNA の分解機構と分解の誘導機構、ウイルスによる全タンパク質合成停止を回避する機構が解析できると考え、本研究課題を立案した。

## 2. 研究の目的

本研究は、核多角体病ウイルス (NPV) 感染にともなう、昆虫細胞が発動する全タンパク質合成停止の分子機構を解明することを目的としている。この全タンパク質合成停止は、感染細胞がウイルス増殖を阻止するために発動する生体防御機構の 1 つと考えられる。本研究は、rRNA の分解機構と分解の誘導機構、ウイルス感染による全タンパク質合成停止を回避する機構を明らかにすることによって、rRNA の分解を介した全タンパク質合成停止の分子機構の解明をめざした。

## 3. 研究の方法

(1) カイコゲノム情報から、リボソーム RNA (rRNA) の断片化に関わる RNase の候補遺伝子として、酵母 IRE1 相同体である BmIRE1 を探索し、RACE 法により cDNA を単離した。BmIRE1 遺伝子発現ベクターを構築し、BM-N 細胞で一過性発現させ、rRNA の切断・分解を調査した。

(2) BmIRE1 dsRNA を BM-N 細胞に導入し、BmIRE1 をノックダウンした細胞を用いて、NPV 感染による rRNA 分解を調査した。また、BmIRE1 を一過性発現させた細胞において、BmXBP1 mRNA のスプライシングを PCR 法により調査した。

(3) ショウジョウバエ RNaseL インヒビターの相同体として、DmRLI が同定されている。ショウジョウバエは、RNaseL を持たないが、その相同体として DmIRE1 をもつことから、DmRLI は DmIRE1 のインヒビターであることが予想された。そこで、カイコゲノム情報から、BmRLI を探索した結果、相同体である BmRLI

が見出された。そこで、RACE 法により BmRLI cDNA を単離し、BM-N 細胞への一過性発現により、BmIRE1 に対する抑制活性を調査した。さらに、NPV 感染にともなう BmRLI 遺伝子の発現変動を、定量 RT-PCR 法により調査した。

(4) AcNMNPV の P143 (Ac-P143) と、カイコ NPV の P143 (Bm-P143) の組換えタンパク質を発現するベクターを構築し、BM-N 細胞にトランスフェクションすることにより、rRNA 分解に関わるドメインの検索を行った。

## 4. 研究成果

(1) BM-N 細胞における RNase 遺伝子 BmIRE1 のクローニング

動物細胞において、小胞体ストレスにตอบสนองして誘導される翻訳抑制に、28S rRNA の切断が関与していることが報告されている。rRNA の切断には、IRE1 と呼ばれる 1 型膜貫通キナーゼ/リボヌクレアーゼである小胞体タンパク質が機能している。そこで、本研究では IRE1 のカイコ相同体 cDNA を探索し、その機能解析を行った。まず、ショウジョウバエで同定されている IRE1 相同体のアミノ酸配列を用いて、カイコゲノムのデータベースを検索した結果、IRE1 相同体をコードする遺伝子 (BmIRE1) の存在が見出された。そこで、BmIRE1 cDNA を RACE 法によりクローニングした。得られた cDNA は 1020 アミノ酸残基からなるタンパク質をコードし、N 末端側から膜貫通ドメイン、セリン/スレオニンキナーゼドメイン、RNase ドメインを持つことがわかった。BmIRE1 cDNA を発現ベクターに挿入し、BM-N 細胞で一過性発現を行い、rRNA の分解を調査した。その結果、BmIRE1 の発現はウェスタンブロット法により確認できたが、rRNA の分解は認められなかった。さらに、BmIRE1 の発現を RNAi 法によりノックダウンさせた BM-N 細胞を用いて、NPV 感染により誘導される rRNA の分解が抑制されるかどうかを調査した。その結果、BmIRE1 のノックダウンによる rRNA 分解への影響はほとんど認められなかった。したがって、今回の結果から、BmIRE1 が NPV 感染 BM-N 細胞に誘導される rRNA の分解に関与していることを示すことはできなかった。

(2) BM-N 細胞における RNase 遺伝子 BmIRE1 の機能解析

動物細胞の IRE1 およびショウジョウバエの IRE1 は、転写因子である XBP1 の mRNA のスプライシングを行い、スプライシングを受けた XBP1 mRNA は翻訳され、小胞体シャペロン群の転写を誘導する。そこで、カイコの XBP1 相同遺伝子 (BmXBP1) を同定し、BmIRE1 による BmXBP1 mRNA のスプライシング活性を調査した。まず、BmIRE1 遺伝子を一過性発現させた BM-N 細胞において、BmXBP1 mRNA のスプライシングは検出されなかった。しかし、

BM-N 細胞をツニカマイシン処理することによって小胞体ストレスを誘導した場合にも, BmXBP1 mRNA のスプライシングは検出されなかった. したがって, カイコでは IRE1 による XBP1 mRNA のスプライシングは保存されていない可能性がある. つぎに, XBP1 mRNA のスプライシングが確認されているショウジョウバエ由来の S2 細胞を用いて, BmIRE1 遺伝子の一過性発現を行った. その結果, コントロールに用いた EGFP 発現プラスミドを導入した細胞においてもショウジョウバエ XBP1 mRNA のスプライシングが観察され, 一過性発現させた BmIRE1 のスプライシング活性を検出することができなかった.

(3) BmIRE1 のインヒビターであることが予想される BmRLI のクローニングと機能解析

BM-N 細胞から, BmRLI 遺伝子のクローニングを行った. BmRLI 遺伝子を発現プラスミドに挿入し, BM-N 細胞に一過性発現させることにより, rRNA 分解の抑制活性を調査した. その結果, *Autographa californica* MNPV (AcMNPV) 感染により誘導される rRNA 分解に対して, 抑制活性は認められなかった. そこで, AcMNPV およびカイコ NPV をそれぞれ BM-N 細胞に感染させて, 各ウイルス感染細胞における BmRLI 遺伝子の発現変動を調査した. その結果, rRNA 分解が誘導されないカイコ NPV 感染では, BmRLI 遺伝子の mRNA 量は, 感染時間に伴って増加する傾向が認められたのに対し, AcMNPV 感染細胞では, 感染後 24 時間において BmRLI 遺伝子の mRNA 量は減少した. したがって, 阻害因子である BmRLI の発現は, rRNA 分解誘導とパラレルに減少していることが示された.

(4) rRNA 分解を誘導するウイルス因子 P143 のドメイン解析

rRNA 分解を誘導する AcMNPV の P143 (Ac-P143) と, rRNA 分解を誘導しないカイコ NPV の P143 (Bm-P143) の組換えタンパク質を BM-N 細胞で発現することにより, Ac-P143 の rRNA 分解誘導に関わるドメインの解析を行った. その結果, Ac-P143 タンパク質の宿主特異性決定に関わるドメインが, rRNA 分解に関与していることが示された.

## 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 11 件)

(1) Ikeda, M., Hamajima, R. and Kobayashi, M. (2014) Baculoviruses: diversity, evolution and manipulation of insect. *Entomol. Sci.* **17**, in press. (査読あり)

(2) Hamajima, R., Kobayashi, M. and Ikeda, M. (2014) p143-mediated rRNA degradation

in AcMNPV-infected BM-N cells is not associated with viral DNA replication. *J. Insect Biotechnol. Sericol.* **84**, in press. (査読あり)

(3) Ikeda, M., Yamada, H., Hamajima, R. and Kobayashi, M. (2013) Baculovirus genes modulating intracellular innate antiviral immunity of lepidopteran insect cells. *Virology* **435**, 1-13. doi: 10.1016/j.virol.2012.10.016. (査読あり)

(4) Yamada, H., Kitaguchi, K., Hamajima, R., Kobayashi, M. and Ikeda, M. (2013) Novel apoptosis suppressor Apsup from the baculovirus *Lymantria dispar* multiple nucleopolyhedrovirus precludes apoptosis through preventing proteolytic processing and activation of initiator caspase Dronc. *J. Virol.* **87**, 12925-12934. doi: 10.1128/JVI.02065-13. (査読あり)

(5) Kitaguchi, K., Hamajima, R., Yamada, H., Kobayashi, M. and Ikeda, M. (2013) Transient expression assay reveals kinetic difference in the proteolytic processing between Dronc proteins from the gypsy moth *Lymantria dispar* and the silkworm *Bombyx mori*. *J. Insect Biotechnol. Sericol.* **82**, 49-54. (査読あり)

(6) Hamajima, R., Ito, Y., Ichikawa, H., Mitsutake, H., Kobayashi, J., Kobayashi, M. and Ikeda, M. (2013) Degradation of ribosomal RNA in BM-N cells from the silkworm *Bombyx mori* during abortive infection with heterologous nucleopolyhedroviruses. *J. Gen. Virol.* **94**, 2102-2111. doi: 10.1099/vir.0.053645-0. (査読あり)

(7) Kitaguchi, K., Hamajima, R., Yamada, H., Kobayashi, M. and Ikeda, M. (2013) Cloning and functional characterization of the *Lymantria dispar* initiator caspase *dronc*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **436**, 331-337. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.05.103. (査読あり)

(8) Yamada, H., Okamoto, K., Kobayashi, M. and Ikeda, M. (2012) Cloning and characterization of an effector caspase, Ld-caspase-1, from *Lymantria dispar* Ld652Y cells. *J. Insect Biotechnol. Sericol.* **81**, 75-83. (査読あり)

(9) Yamada, H., Shibuya, M., Kobayashi, M. and Ikeda, M. (2012) Baculovirus *Lymantria dispar* multiple nucleopolyhedrovirus IAP2 and IAP3 do not suppress apoptosis, but

trigger apoptosis of insect cells in a transient expression assay. *Virus Genes* **45**, 370-379. doi: 10.1007/s11262-012-0783-0. (査読あり)

(10) Suganuma, I., Ushiyama, T., Yamada, H., Iwamoto, A., Kobayashi, M. and Ikeda, M. (2011) Cloning and characterization of a dronc homologue in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **41**, 909-921. doi: 10.1016/j.ibmb.2011.08.005. (査読あり)

(11) Ikeda, M., Yamada, H., Ito, H. and Kobayashi, M. (2011) Baculovirus IAP1 induces caspase-dependent apoptosis in insect cells. *J. Gen. Virol.* **92**, 2654-2663. doi: 10.1099/vir.0.033332-0. (査読あり)

〔学会発表〕(計 32 件)

(1) 浜島りな・永峰俊弘・川崎祐・松本正吾・長田裕之・小林迪弘・池田素子 (2014) *Autographa californica* 核多角体病ウイルス P143 の RNA 分解誘導に関わる領域の探索. 平成 26 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 (藤沢) 3月 10・11 日.

(2) 富崎萌・浜島りな・岩本麻子・小林迪弘・池田素子 (2014) 核多角体病ウイルス感染カイコ細胞における *Bmp53*, *BmSirt2* の機能解析. 平成 26 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 (藤沢) 3月 10・11 日.

(3) 永峰俊弘・浜島りな・川崎祐・松本正吾・長田裕之・今西重雄・岩永将司・小林迪弘・池田素子 (2014) カイコ核多角体病ウイルス (BmNPV) と AcMNPV の分岐 (ウイルス種分化) に関する進化的考察. 平成 26 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 (藤沢) 3月 10・11 日.

(4) 浜島りな・永峰俊弘・川崎祐・松本正吾・長田裕之・小林迪弘・池田素子 (2013) カイコ細胞の rRNA 分解誘導と宿主特異性決定に関与する核多角体病ウイルス P143 の機能解析. 日本蚕糸学会中部支部第 69 回・東海支部第 65 回合同大会 (松本) 11月 9・10 日.

(5) 富崎萌・浜島りな・岩本麻子・小林迪弘・池田素子 (2013) カイコアポトーシス関連遺伝子 *p53*, *sir2*, *ibm1* のクローニングと機能解析. 日本蚕糸学会中部支部第 69 回・東海支部第 65 回合同大会 (松本) 11月 9・10 日.

(6) 浜島りな・伊藤勇弥・小林迪弘・池田素子 (2013) AcMNPV bacmid を用いた BM-N 細胞における rRNA 分解機構解析. 平成 25 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 (つくば) 3月 18・19 日.

(7) 北口晃司・山田早人・小林迪弘・池田素子 (2013) NPV 感染細胞におけるアポトーシスの誘導と抑制の機構解析: マイマイガ Dronc とカイコ Dronc の機能比較. 平成 25 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 (つくば) 3月 18・19 日.

(8) 山田早人・北口晃司・小林迪弘・池田素子 (2013) LdMNPV Apsup のアポトーシス阻害ドメインの解析. 平成 25 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 (つくば) 3月 18・19 日.

(9) 山田早人・北口晃司・小林迪弘・池田素子 (2012) LdMNPV Apsup の機能ドメイン探索とアポトーシス抑制機構解析. 日本蚕糸学会合同支部大会・東海支部第 64 回大会 (上田) 11月 10・11 日.

(10) 岩本麻子・浜島りな・小林迪弘・池田素子 (2012) BM-N 細胞 IAP1 における Bm-Dronc の制御. 日本蚕糸学会合同支部大会・東海支部第 64 回大会 (上田) 11月 10・11 日.

(11) 今井資大・伊藤弘行・山田早人・小林迪弘・池田素子 (2012) Hycu-IAP ドメインのドメイン欠損体による機能解析. 日本蚕糸学会合同支部大会・東海支部第 64 回大会 (上田) 11月 10・11 日.

(12) 市川はるか・伊藤勇弥・小林迪弘・池田素子 (2012) *BmIRE1* と *BmRLI* の機能解析. 日本蚕糸学会合同支部大会・東海支部第 64 回大会 (上田) 11月 10・11 日.

(13) 北口晃司・山田早人・小林迪弘・池田素子 (2012) チョウ目昆虫のイニシエーターカスパーゼ Bm-Dronc と Ld-Dronc の機能解析. 日本蚕糸学会合同支部大会・東海支部第 64 回大会 (上田) 11月 10・11 日.

(14) 浜島りな・伊藤勇弥・小林迪弘・池田素子 (2012) AcMNPV 感染に伴う BM-N 細胞の RNA 分解機構解析. 日本蚕糸学会合同支部大会・東海支部第 64 回大会 (上田) 11月 10・11 日.

(15) 山田早人・北口晃司・小林迪弘・池田素子 (2012) マイマイガ核多角体病ウイルス Apsup のアポトーシス抑制機構解析. 第 10 回昆虫病理研究会シンポジウム (帯広) 2012 年 9月 21~23 日.

(16) 市川はるか・伊藤勇弥・小林迪弘・池田素子 (2012) *BmIRE1* と *BmRLI* のクローニングと機能解析. 第 10 回昆虫病理研究会シンポジウム (帯広) 2012 年 9月 21~23 日.

(17) 今井資大・伊藤弘行・山田早人・小林迪弘・池田素子 (2012) Hycu-IAP ドメイン欠損体によるアポトーシスの誘導と阻害. 第 10

回昆虫病理研究会シンポジウム(帯広)2012年9月21~23日.

(18) 岩本麻子・小林迪弘・池田素子(2012)カイコ由来BM-N細胞IAP1の機能解析.第10回昆虫病理研究会シンポジウム(帯広)2012年9月21~23日.

(19) 北口晃司・菅沼育恵・山田早人・小林迪弘・池田素子(2012)イニシエーターカスパーゼBm-DroncとLd-Droncの機能解析.第10回昆虫病理研究会シンポジウム(帯広)2012年9月21~23日.

(20) 浜島りな・伊藤勇弥・小林迪弘・池田素子(2012)AcMNPV感染BM-N細胞におけるリボソームRNA分解の機構解析.第10回昆虫病理研究会シンポジウム(帯広)2012年9月21~23日.

(21) 杉浦信夫・吉村真弓・池田素子・小林迪弘・渡辺秀人(2012)各種バキュロウイルスのコンドロイチナーゼ活性とカイコ胃食膜のコンドロイチン硫酸.第31回日本糖質学会年会(鹿児島)9月17-20日.

(22) Ikeda, M., Suganuma, I. and Kobayashi, M. (2012) Regulation of *Bombyx mori* initiator caspase Dronc by Hycu-IAP3 of *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus. XXIV International Congress of Entomology (Daegu, Korea) August 19-25.

(23) Kobayashi, M. and Ikeda, M. (2012) Responses of *Bombyx mori* cells to nucleopolyhedrovirus infection. XXIV International Congress of Entomology (Daegu, Korea) August 19-25.

(24) Yamamda, H., Kitaguchi, K., Kobayashi, M. and Ikeda, M. (2012) Functional analysis of apoptosis suppressor genes encoded by *Lymantria dispar* multiple nucleopolyhedrovirus. XXIV International Congress of Entomology (Daegu, Korea) August 19-25.

(25) Hamajima, R., Ito, Y., Kobayashi, M. and Ikeda, M. (2012) Ribosomal RNA degradation during abortive nucleopolyhedrovirus infection of BM-N cells derived from the silkworm, *Bombyx mori*. XXIV International Congress of Entomology (Daegu, Korea) August 19-25.

(26) 北口晃司・山田早人・小林迪弘・池田素子(2012)核多角体病ウイルス感染Ld652Y細胞におけるLd-Droncの活性化.平成24年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会(福岡)3月18・19日.

(27) 山田早人・澁谷美幸・小林迪弘・池田素子(2012)マイマイガ核多角体病ウイルスIAPの機能解析.平成24年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会(福岡)3月18・19日.

(28) 浜島りな・伊藤勇弥・光武宏・小林淳・小林迪弘・池田素子(2012)BM-N細胞におけるBmNPV-P143のNPV感染増殖への影響.平成24年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会(福岡)3月18・19日.

(29) 神谷克巳・池田素子・小林迪弘・河村敏(2012)アメリカシロヒトリ核多角体病ウイルスの殺虫特性評価によるクローンの選抜.平成24年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会(福岡)3月18・19日.

(30) 浜島りな・伊藤勇弥・光武宏・小林淳・小林迪弘・池田素子(2011)種々のNPVp143遺伝子によるBM-N細胞のRNA分解誘導.日本蚕糸学会中部支部第67回・東海支部第63回合同大会(北杜)11月24・25日.

(31) 山田早人・北口晃司・小林迪弘・池田素子(2011)Ld652Y細胞におけるLdMNPV *apsup*のアポトーシス抑制機構解析.日本蚕糸学会中部支部第67回・東海支部第63回合同大会(北杜)11月24・25日.

(32) 北口晃司・山田早人・杉山靖博・小林迪弘・池田素子(2011)マイマイガ由来のLd652Y細胞におけるイニシエーターカスパーゼの同定と機能解析.日本蚕糸学会中部支部第67回・東海支部第63回合同大会(北杜)11月24・25日.

〔図書〕(計2件)

(1) 池田素子・小林迪弘(2014)第6章ウイルス病.6.1.ウイルスの特徴.「最新昆虫病理学(国見裕久・小林迪弘編)」pp.108-116, 講談社, 東京.

(2) 池田素子(2014)第9章昆虫における生体防御.9.4.ウイルス感染に対する生体防御.「最新昆虫病理学(国見裕久・小林迪弘編)」pp.200-206, 講談社, 東京.

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 素子 (IKEDA, Motoko)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授  
研究者番号：20262892

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし