

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380036

研究課題名(和文) 昆虫DNAウイルスに対するカイコの応答性防御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of defense mechanism against DNA viruses in the silkworm

研究代表者

田中 博光 (TANAKA, Hiromitsu)

独立行政法人農業生物資源研究所・昆虫微生物機能研究ユニット・ユニット長

研究者番号：30391577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではカイコとカイコ核多角体病ウイルス(BmNPV)を用いて、昆虫のDNAウイルス感染に反応してDNAウイルスの増殖を抑制するメカニズムの解析を行った。その結果、膜タンパク質と予想されるテトラスパニン及びインテグリンが、BmNPVの増殖抑制に関わっていることが明らかとなった。またこれまでにBmEtsがBmNPVの細胞内増殖に必須な前初期遺伝子の発現を抑制することで、BmNPVの細胞内増殖抑制がなされていることが知られているが、テトラスパニンはこの抑制に関与していることが示された。今回得られた結果は昆虫ウイルスに対する昆虫の生体防御機構を明らかにする上で重要な知見となり得る。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the suppression mechanism of DNA viral propagation in response to DNA viral infection using a silkworm cell line and silkworm nucleopolyhedroviruses (BmNPV). We found that two predicted membrane proteins, tetraspanin and integrin, both of which genes are up-regulated in response to BmNPV infection, were involved in suppression of BmNPV propagation in the cells. We further demonstrated that tetraspanin regulated BmEts-dependent repression of expression of the viral immediate early gene. We believe that these findings contribute to elucidation of the mechanisms of insect immunity against DNA viruses.

研究分野：昆虫免疫学

キーワード：カイコ 核多角体病ウイルス テトラスパニン インテグリン Etsファミリータンパク質 昆虫免疫

1. 研究開始当初の背景

昆虫の細菌や真菌、RNA ウイルスに対する自然免疫機構の解析は大きく進展している一方で、昆虫が体内に侵入した DNA ウイルスを積極的に排除あるいは増殖抑制する機構を有しているかはこれまで全く不明であった。我々はこれまでにカイコ転写因子である BmEts が、カイコ DNA ウイルスであるカイコ多角体病ウイルス (BmNPV) に応答して細胞内に侵入したウイルスの増殖を抑制する反応に関わる因子であることを見いだし、昆虫にも DNA ウイルスに対する積極的な応答性増殖機構があることを初めて明らかにした。さらにいくつかの細胞表面タンパク質もウイルスの感染・増殖抑制機構に関わるといふ予備的な結果を得た。しかしながら、DNA ウイルスに対する感染・増殖抑制機構の詳細は不明であり、さらに深く踏み込んだ解析が必要であった。

2. 研究の目的

本研究では BmNPV とカイコを用い、BmEts 以外の DNA ウイルスの感染・増殖抑制に関わる新規因子を明らかにするとともに、応答性ウイルス防御反応がどのようなメカニズムでウイルス感染によって発動・活性化するのかについてその詳細を解明する。

3. 研究の方法

(1) カイコ培養細胞および BmNPV

カイコ胚由来の Bm-NIAS-oyanagi2 細胞を用いた。10%牛胎児血清を含む IPL41 培地で 25℃ で培養した。BmNPV はウイルス後期遺伝子プロモーターの下流にルシフェラーゼ cDNA が挿入された改変 BmNPV を用いた。

(2) カイコ培養細胞への BmNPV の感染及び、感染後の細胞内 BmNPV 量の定量

カイコ培養細胞には出芽型の BmNPV を感染させた。感染後、一定時間経過させた細胞から細胞抽出液を調製し、抽出液中のルシフェラーゼ活性を測定することでこれをウイルス量として算出した。ウイルス量に関しては、細胞から DNA を調製後、ウイルス由来の DNA を定量 PCR 解析によっても定量を行った。

(3) カイコ培養細胞へのノックダウン実験

テトラスパニン、インテグリン及び BmEts 遺伝子の配列を有する small hairpin RNA (shRNA) 発現プラスミドを作製し、Fugene-HD を用いてこれらをカイコ培養細胞

に導入し、これら遺伝子をノックダウンさせた。

(4) カイコ培養細胞での過剰発現実験

テトラスパニン、インテグリン及び BmEts cDNA をそれぞれ昆虫用の発現プラスミドに挿入したプラスミドを作製し、Fugene-HD を用いてこれらをカイコ培養細胞に導入して過剰発現させた。

(5) カイコ培養細胞でのウイルス前初期遺伝子プロモーターの活性測定実験

ウイルス前初期遺伝子プロモーターにルシフェラーゼ cDNA を連結させたレポータープラスミドを shRNA 発現プラスミドあるいは過剰発現プラスミドとともにカイコ培養細胞へ導入した。一定時間後に細胞抽出液を調製し、抽出液のルシフェラーゼ活性を測定した。

(6) テトラスパニン過剰発現カイコの作出

テトラスパニン cDNA を酵母由来の転写因子 GAL4 の結合領域(UAS)の下流に連結させ、この DNA をカイコゲノムに挿入したカイコを作製した。このカイコと脂肪体で GAL4 を高発現させた組換えカイコを交配させ、脂肪体でテトラスパニンが過剰発現するカイコを作出した。

(7) テトラスパニンノックアウトカイコの作出

テトラスパニン遺伝子の特定のエキソン領域を切断する TALEN を用いて、テトラスパニン遺伝子のノックアウトカイコを作出した。

4. 研究成果

(1) テトラスパニン及びインテグリンのカイコ培養細胞内での BmNPV 増殖の抑制

テトラスパニン及びインテグリン遺伝子は BmNPV の感染に応答して発現が誘導されることが既に知られている。これらは膜タンパク質であると予想されることから、これらに着目して研究を進めた。まずテトラスパニンを RNAi 干渉法でノックダウンさせたカイコ培養細胞に BmNPV を感染させ、一定時間後の細胞中のウイルス量を定量したところ、有意に増大することが示された(図 1)。一方、テトラスパニンを過剰発現させたカイコ培養細胞に BmNPV を感染させた場合では逆に有意に減少することが分かった(図 2)。インテグリンについても同様の結果であった(図 1, 2)。これらのことから、テトラスパニ

ン、インテグリンいずれもカイコ細胞内でのBmNPVの増殖の抑制に関わる因子であることが示された。

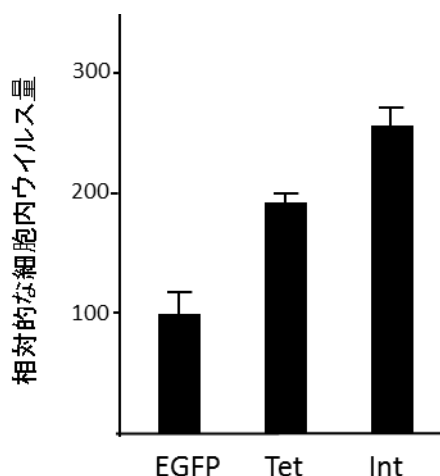


図1 カイコ培養細胞内で内在性Tetraspanin(Tet)及びIntegrin(Int)の遺伝子発現をRNA干渉法を用いてノックダウンすると細胞内のBmNPV量が上昇する

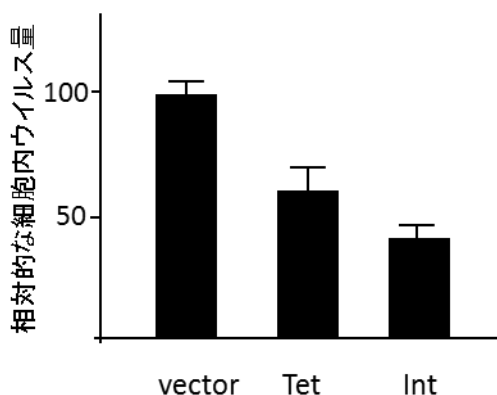


図2 カイコ培養細胞内の内在性Tetraspanin(Tet)及びIntegrin(Int)を過剰発現させると細胞内のBmNPV量が低下する

(2) テトラスパニン・インテグリンのBmNPVに対する増殖抑制機構

テトラスパニンがどのようにBmNPVの細胞内増殖抑制に関わるかについて解析を行った。これまでに、転写因子であるBmEtsはBmNPVに反応して遺伝子発現が増大すること、BmNPVの細胞内増殖を抑制すること、この増殖抑制はBmNPVの細胞内増殖に必要なウイルス前初期遺伝子の発現を抑制することで行われることが明らかとなっている。そこでまず、テトラスパニンがBmEts遺伝子の発現増大に直接関わるかを調査した。しかしながら、テトラスパニンを過剰発現させた培養細胞におけるBmEts遺伝子発現量は変動しなかったため、テトラスパニンはBmEts遺伝子の発現増大には直接関わらないと考えられた。次に、BmEtsと同様、ウイルス前初期遺伝子

の発現の抑制に関わるかを調べるため、カイコ培養細胞にウイルス前初期遺伝子プロモーターを挿入したレポータープラスミドを導入し、テトラスパニンを過剰発現させたときのプロモーター活性の影響を見てみた。その結果、このプロモーター活性が有意に減少することが明らかとなった。テトラスパニンの過剰発現によって減少するプロモーター活性は、BmEtsをノックダウンすることで逆に増大することから、BmEtsの上流にテトラスパニンが位置してウイルス前初期遺伝子プロモーター活性を制御していると予想された。

また、インテグリンの過剰発現によってもウイルス前初期遺伝子の発現の抑制がみられたことから、インテグリンとテトラスパニンは同様の働きを有することが示唆された。

(3) ウイルス前初期遺伝子プロモーターの制御に関わるEtsファミリー転写因子

カイコにはBmEtsを含め9種類のEtsファミリータンパク質遺伝子があることがゲノム解析より我々の解析から明らかとなっている。これまでの研究から、ウイルス前初期遺伝子プロモーターはこのプロモーター上の特定のEts転写因子認識配列をBmEtsとは異なる何らかのEtsファミリーが認識し、このプロモーター活性を増大させていること、BmEtsも同じ配列に競合的に結合することで、あるEts転写因子によるプロモーターの活性化を抑制することが示唆されている。そこで、カイコのEtsファミリータンパク質の中からこのプロモーター活性を増大させるタンパク質についてノックダウン法によりスクリーニングしたところ、ある一つのEtsファミリータンパク質がこのプロモーター活性を増大させる機能を有することが明らかになった。一方、BmEts以外にこのプロモーター活性を抑制するEtsファミリータンパク質も見いだすことができた。このタンパク質はカイコ抗菌性タンパク質遺伝子プロモーター活性も抑制する機能があることが示された。

(4) 宿主タンパク質間、宿主タンパク質とウイルスタンパク質との相互作用

インテグリンとテトラスパニンがいずれも膜タンパク質であることから、これらが相互作用するかについて、免疫沈降法で調査した。しかしながら両者の相互作用は確認できなかった。現在、再度他の手法で確認するとともに、細胞内局在性について解析を進めている。

(5) テトラスパニンを過剰発現するカイコおよび、テトラスパニンノックアウトカイコ

幼虫脂肪体においてテトラスパニンを過剰

発現するカイコ系統を作出した。作出したカイコに出芽型の BmNPV を経皮接種に、48 時間後のカイコ体液中の BmNPV の量を測定したところ、過剰発現によりウイルス量が減少する傾向にあることが示された。現在、脂肪体組織中でのウイルス量が減少するかについて解析を進めている。

一方、TALEN 法を用いてテトラスパニンノックアウトカイコを作出した。現在このホモノックアウト系統に BmNPV を経皮接種し、カイコ体内でのウイルス量に変動が見られるかを調査している。

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1件)

Tanaka H (2013) Construction of shRNA expression plasmids for silkworm cell lines using single-stranded DNA and *Bst* DNA polymerase ***Methods in Molecular Biology*** 942(18):347-355

[学会発表](計3件)

勾坂晶, 藤田幸輔, 石橋純, 田中博光 (2013) カイコ培養細胞を用いた BmNPV 感染応答遺伝子の機能解析 平成 25 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会-日本蚕糸学会第 83 回大会 2013 年 3 月 18 - 19 日 茨城県つくば市 農林水産技術会議事務局筑波事務所

五島正幸, 勾坂晶, 皆葉正臣, 石橋純, 松下操, 田中博光 (2013) 抗菌ペプチド産生抑制因子 BmPTD の機能解析 平成 25 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会-日本蚕糸学会第 83 回大会 2013 年 3 月 18 - 19 日 茨城県つくば市 農林水産技術会議事務局筑波事務所

田中博光, 勾坂晶 (2015) カイコの Imd 経路の活性化に関わるペプチドグリカン認識タンパク質 第 59 回日本応用動物昆虫学会大会 2015 年 3 月 26-28 日 山形県山形市 山形大小白川キャンパス

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中博光 (TANAKA Hiromitsu)
独立行政法人農業生物資源研究所 昆虫微生物機能研究ユニット ユニット長

研究者番号 : 30391577

(2)研究分担者

坪田拓也 (Tsubota takuya)
独立行政法人農業生物資源研究所 遺伝子組換えカイコ研究開発ユニット 任期

付研究員

研究者番号 : 00612772

(3)連携研究者

()

研究者番号 :