

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450482

研究課題名(和文) BmMLVの安定的遺伝子発現機構の解明と遺伝子発現ベクターの開発

研究課題名(英文) Studies on the mechanism of persistent infection of Bombyx mori macula-like virus in silkworm-derived cell lines.

研究代表者

岩永 将司 (Iwanaga, Masashi)

宇都宮大学・農学部・准教授

研究者番号：40400717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Bombyx mori macula-like virus (BmMLV) は、カイコ由来培養細胞から発見された持続感染型RNAウイルスである。本研究では、BmMLVの持続感染メカニズムを明らかにするため、まずBmMLVの新規サブゲノミックRNAを同定した。次に、本ウイルスの安全性を確保するため、本ウイルスの物理的不活化法を開発するとともに、本ウイルスが哺乳類由来培養細胞では増殖しないことを明らかにした。加えて、本ウイルスの感染継時的なRNA-seq解析を行った結果、ウイルスの増殖に伴って変動する多数の宿主遺伝子を同定した。

研究成果の概要(英文)：The Bombyx mori macula-like virus (BmMLV) is a member of the genus Maculavirus, family Tymoviridae, and contains a positive-sense single-stranded RNA genome. Previously, we reported that almost all B. mori-derived cell lines have already been contaminated with BmMLV via an unknown infection route. To understand the mechanism of BmMLV propagation, we identified a novel subgenomic RNA of BmMLV. Also, we determined several viral inactivation methods by using the physical conditions. Furthermore, we revealed that BmMLV did not replicate in nine mammalian-derived cell lines. RNA-seq analysis was also performed to clarify the mechanism of BmMLV persistent infection.

研究分野：昆虫ウイルス学

キーワード：BmMLV マキュラウイルス カイコ 持続感染 培養細胞 チモウイルス

1. 研究開始当初の背景

Bombyx mori macula-like virus (BmMLV) は、2005年にカイコ培養細胞から発見されたプラス鎖 RNA ウイルスである。興味深いことに、本ウイルスは昆虫の培養細胞に感染するものの、そのゲノム配列は植物ウイルスに最も高い類似性を示している。更に、培養細胞を死滅させることなく大量のウイルス粒子を産生する持続感染型の感染様式を取っている。即ち、BmMLV は昆虫の培養細胞で持続感染を成立させている植物ウイルス様ウイルスである。しかしながら、本ウイルスの混入源や安全性、並びに増殖メカニズムについては不明な点が多い。

特に、BmMLV が幅広く混入しているカイコ由来培養細胞は、昆虫バキュロウイルス発現系で頻りに利用される細胞株である、バキュロウイルス発現系とは、節足動物に特異的に感染するバキュロウイルスの特徴である巨大な封入体の構成遺伝子を組換えることで、封入体の代わりに所望の有用タンパク質を発現させる手法である。本発現法は既にバイオテクノロジーに無くてはならない技術となっており、インフルエンザワクチンや子宮頸がんワクチン等が開発・上市されている。中でもカイコバキュロウイルスを利用した発現系は、組換えタンパク質の生産量に優れており、種々の獣医薬や愛玩動物向け減感作療法薬が開発・上市されている。これらバキュロウイルスへの外来遺伝子の導入は、野生株のゲノム DNA とトランスファーベクターと呼ばれるプラスミド DNA を培養細胞へと同時に導入し、相同組換えさせることで行う。そのため、バキュロウイルスに感受性を示す昆虫由来培養細胞は、本発現系において必須のものとして利用されている。

即ち、カイコ由来培養細胞はカイコバキュロウイルス発現系において利用される培養細胞である。このような培養細胞へ上述の植物ウイルス様ウイルスである BmMLV が混入・持続感染していることは大きな課題であり、本ウイルスの増殖メカニズムや宿主域、不活化法を明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、BmMLV 陰性カイコ由来 BmVF 細胞が、カイコバキュロウイルスに感受性を示し、BmMLV 陰性条件下において安全な物質生産を可能とするかどうかを明らかにすること、カイコバキュロウイルスを利用した組換えタンパク質がイヌや猫を対象とした獣医薬として上市されている現状を踏まえ、種々の哺乳類培養細胞において BmMLV が増殖するかどうか、その安全性を明らかにすること、BmMLV を容易に不活化する事のできる物理的な条件を明らかにすること、BmMLV のベクター化を目指し、サブゲノミックプロモーターを明らかにすること、BmMLV 感染継時的な RNA-seq 解析によってウイルスの増殖メカニズムを明らかにすること、

と、の5点である。これら5点の研究によって、本ウイルスがカイコバキュロウイルス発現系に及ぼす影響を詳らかにすることが出来る。加えて、本ウイルスは宿主を致死させない持続感染型のウイルスであることから、サブゲノミックプロモーターの同定は、バキュロウイルスとは異なるタイプの発現系の構築に繋がるものと考えられた。

3. 研究の方法

BmMLV 陰性 BmVF 細胞の優位性を明らかにするため、BmVF がカイコバキュロウイルスに感受性を示すかどうかについては、まず、BmVF 細胞へとカイコバキュロウイルスを接種し、十分な感受性を示すかどうかを確認した。その上で、実用化に値するかどうかを判断するために、ホタルルシフェラーゼを発現する組換えバキュロウイルスを用いた発現実験、並びに、マウス IL3 を発現する組換えウイルスを用いた発現実験を行った。加えて、ツニカマイシン処理による N 型糖鎖修飾の有無やシグナルペプチドを有するタンパク質を発現した場合の分泌能について調査した。また、BmVF 細胞については、より高い優位性を目指して無血清培地への順化について取り組んだ。

BmMLV が、種々の哺乳類培養細胞において増殖するかどうか明らかにすること、については、ブタやイヌ、猫、サル、ハムスターなどの哺乳類由来培養細胞へと BmMLV を接種し、ウイルスが増殖するかどうかノーザンブロット解析を行った。更に、より詳細にウイルス RNA 量の変動を調査するため、qRT-PCR 解析を行った。また、BmMLV の添加がこれら哺乳類由来培養細胞へ与える影響を調査するため MTT による細胞増殖試験を行った。

BmMLV を容易に不活化する事のできる物理的な条件を明らかにすること、については、通常のウイルス不活化法で用いられる熱、UV、線処理について、BmMLV に及ぼす影響を調査した。熱については、56度から100度までの処理、UV については、0 から 180mJ/cm² までの処理、線については、0 から 40kGy までの処理を施した。これら種々の処理を施した後、BmMLV をウイルス陰性培養細胞へと接種し、ウイルスの不活化をウイルス RNA の増加量を qRT-PCR で調査することによって評価した。

BmMLV のベクター化を目指し、サブゲノミックプロモーターを明らかにすること、については、サブゲノミック RNA の配列上に設計した primer を用いた primer extension によって BmMLV サブゲノミック RNA の転写開始点を明らかにした。更に、様々な位置に設計した primer による primer extension によって、これまで知られていなかった別のサブゲノミック RNA の探索に取り組んだ。

BmMLV 感染継時的な RNA-seq 解析によってウイルスの増殖メカニズムを明らかにすること、については、ウイルス陰性細胞へと

BmMLV を接種し、継時的にサンプリングした RNA を用いて RNA-seq 解析を行った。その結果を解析し、ウイルス増殖にともなって転写量が変動すると考えられた遺伝子については qRT-PCR による検証を進めた。

4. 研究成果

BmMLV 陰性 BmVF 細胞の優位性を明らかにするため、BmVF がカイコバキュロウイルスに感受性を示すかどうかについては、まず、BmVF 細胞へとカイコバキュロウイルスを接種した結果、十分な量のウイルス封入体の形成が観察された。そこで、ホタルルシフェラーゼを発現する組換えバキュロウイルスを接種して産生タンパク質量を調査した結果、既存の BmN 細胞と遜色ないことが明らかとなった。更に、マウス IL3 を発現させた結果、細胞外への分泌や糖鎖修飾能についても確認することが出来、BmVF 細胞が従来の培養細胞と同等の、そして BmMLV 陰性条件下でタンパク質の発現を行うことが可能であることを明らかにした。また、種々の無血清培地への順化についても取り組み、BmVF 細胞は、生育は遅くなるものの、無血清培地においても維持可能であることを明らかにした（〔雑誌論文 3〕〔学会発表 1,3,4,6〕）。

BmMLV が、種々の哺乳類培養細胞において増殖するかどうか明らかにすること、については、ブタやイヌ、猫、サル、ハムスターなどの種々の哺乳類由来培養細胞へと BmMLV を接種し、ウイルスが増殖するかどうかノーザンブロット解析、及び qRT-PCR 解析を行った結果、本ウイルスはカイコ培養細胞でのみ増殖することが判明した。特に、これまで増殖可能と考えられてきたツマジロクサヨトウ由来培養細胞においても増殖は認められず、本ウイルスはカイコの培養細胞でのみ持続感染することが明らかとなった。また、BmMLV の添加がこれら哺乳類由来培養細胞の生育へ影響を与えないことも MTT アッセイによって明らかにした（〔雑誌論文 2〕〔学会発表 1,3〕）。

BmMLV を容易に不活化する事のできる物理的な条件を明らかにすること、については、通常のウイルス不活化法で用いられる熱、UV、線処理について、BmMLV に及ぼす影響を調査した。その結果、熱については、75 度 1 時間以上の処理、UV については、140mJ/cm² 以上の処理、線については、10kGy 以上の処理によってウイルスが不活化することを見出した（〔雑誌論文 1〕〔学会発表 1,3,8〕）。

BmMLV のベクター化を目指し、サブゲノミックプロモーターを明らかにすること、については、primer extension を行った結果、既知のサブゲノミック RNA 以外にも新たに 2 つの短いサブゲノミック RNA が合成されていることを明らかにした。更に、この結果はノーザン解析によっても裏付けられた（〔学会発表 7〕）。

BmMLV 感染継時的な RNA-seq 解析によっ

てウイルスの増殖メカニズムを明らかにすること、については、ウイルス陰性細胞へと BmMLV を接種し継時的な RNA-seq 解析を行った結果、ウイルス増殖にともなって種々の宿主遺伝子の転写量が変動することが判明した。既に、20 個程の宿主遺伝子については、qRT-PCR による検証を終えており、これら宿主遺伝子の転写量変動が、ウイルスの持続感染にどの様に関係しているのか、その持続感染メカニズムについて今後、明らかにする予定である（〔学会発表 2〕）。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Uchiyama, K., Fujimoto, H., Katsuma, S., Imanishi, S., Kato, A., Kawasaki, H., Iwanaga, M. Inactivation of *Bombyx mori* macula-like virus under physical conditions. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, 査読有, 52, 2016 年, 265-270 DOI: 10.1007/s11626-015-9972-1.
2. Innami, K., Aizawa, T., Tsukui, T., Katsuma, S., Imanishi, S., Kawasaki, H., Iwanaga, M. Infection studies of nontarget mammalian cell lines with *Bombyx mori* macula-like virus. *J. Virol. Methods*, 査読有, 229, 2016 年, 24-26 DOI: 10.1016/j.jviromet.2015.12.002.
3. Iwanaga, M., Tsukui, K., Uchiyama, K., Katsuma, S., Imanishi, S., Kawasaki, H. Expression of recombinant proteins by BEVS in a macula-like virus-free silkworm cell line. *J. Invertebr. Pathol.*, 査読有, 123, 2014 年, 34-37. DOI: 10.1016/j.jip.2014.09.004

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 藤本 正太、伊作 唯志、川崎 秀樹、岩永 将司、昆虫ウイルスによる外来タンパク質発現系の改良、第 9 回宇都宮大学企業交流会、2015 年 9 月 11 日、栃木県宇都宮市マロニエプラザ
2. 相澤 昂洋、川本 宗考、内山 航大、鈴木 穰、今西 重雄、川崎 秀樹、勝間 進、岩永 将司、*Bombyx mori* macula-like virus 感染細胞のトランスクリプトーム解析、平成 27 年度 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会日本蚕糸学会第 85 回大会、2015 年 9 月 26 日、北海道大学農学部
3. 藤本 正太、掛水 陽佳、川崎 秀樹、岩永 将司、昆虫ウイルスを利用した有用物質生産系の改良、第 8 回宇都宮大学企業交流会、2014 年 9 月 8 日、栃木県宇都宮市マロニエプラザ
4. 藤本 正太、安達 由佳、掛水 陽佳、勝間 進、今西 重雄、川崎 秀樹、岩永 将司、大量かつ高品質な有用物質生産を目指したカイコバキュロウイルス発現系

- の改良、第 37 回日本分子生物学会年会、
2014 年 11 月 27 日、パシフィコ横浜
5. 今瀬 諒司、津久井 啓多、藤本 正太、
勝間 進、今西 重雄、川崎 秀樹、岩永 将司、BmMLV のサブゲノミックプロモーターの同定とその利用に関する研究、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 27 日、パシフィコ横浜
 6. 掛水 陽佳、川崎 秀樹、岩永 将司、有用物質生産を目指した昆虫バキュロウイルス発現系 (BEVS) の改良、第 3 回宇都宮大学オプトバイオシンポジウム、2013 年 12 月 18 日、宇都宮大学
 7. 津久井 啓多、内山 航大、山口 裕太、勝間 進、今西 重雄、川崎 秀樹、岩永 将司、BmMLV のサブゲノミックプロモーターの同定、及び遺伝子解析、平成 26 年度 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会日本蚕糸学会第 84 回大会、2014 年 3 月 11 日、日本大学湘南キャンパス
 8. 内山 航大、勝間 進、今西 重雄、川崎 秀樹、岩永 将司、温度、UV、pH による BmMLV の不活化法の研究、平成 26 年度 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会日本蚕糸学会第 84 回大会、2014 年 3 月 11 日、日本大学湘南キャンパス

()
研究者番号 :
(3) 連携研究者
()
研究者番号 :

〔図書〕(計 0 件)

〔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

岩永 将司 (Iwanaga, Masashi)

宇都宮大学・農学部・准教授

研究者番号 : 40400717

(2) 研究分担者