

昆虫ウイルスが持つ宿主制御遺伝子の機能の解明と応用

勝間 進 (東京大学大学院農学生命科学研究科)

katsuma@ss.ab.a.u-tokyo.ac.jp

はじめに

昆虫ウイルスの一種であるバキュロウイルスは、80-180 kbp の環状 2 本鎖 DNA をゲノムとして持つ大型の DNA ウイルスである。古くから微生物農薬として利用されてきたが、1980 年代後半からその強力なポリヘドリンプロモーターを利用した外来タンパク質発現系 (バキュロウイルスベクター) としても広く用いられるようになった。一方、このような応用的な研究と平行して、ウイルスの全ゲノム解読、および個々の遺伝子の機能解析が急速に進められている。その結果、バキュロウイルスは自身の増殖、複製に必要な遺伝子のほかに多くの補助遺伝子 (Auxiliary genes) を持つことが明らかになった。例えば、エクダイソン UDP グルコース転移酵素遺伝子 (*egt*) は、昆虫の脱皮ホルモンであるエクダイソンの 22 位にグルコースを付加する酵素をコードし、エクダイソンを不活化することによって昆虫の脱皮を阻害することが知られている。また、*inhibitor of apoptosis (iap)* は、バキュロウイルス感染時に細胞が防御反応として引き起こすアポトーシスを阻害して、ウイルスを効率的に増殖させるために重要な分子である。バキュロウイルス感染によって引き起こされる宿主昆虫の死後溶解も、ウイルスが持つカテプシン (タンパク質分解酵素) やキチナーゼ (キチン分解酵素) によって積極的に引き起こされていることが明らかとなっている。本研究では、カイコとそのバキュロウイルスであるカイコ核多角体病ウイルス (*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus: BmNPV) を用いて、バキュロウイルスの宿主制御メカニズムを分子レベルで解明することを試みた。

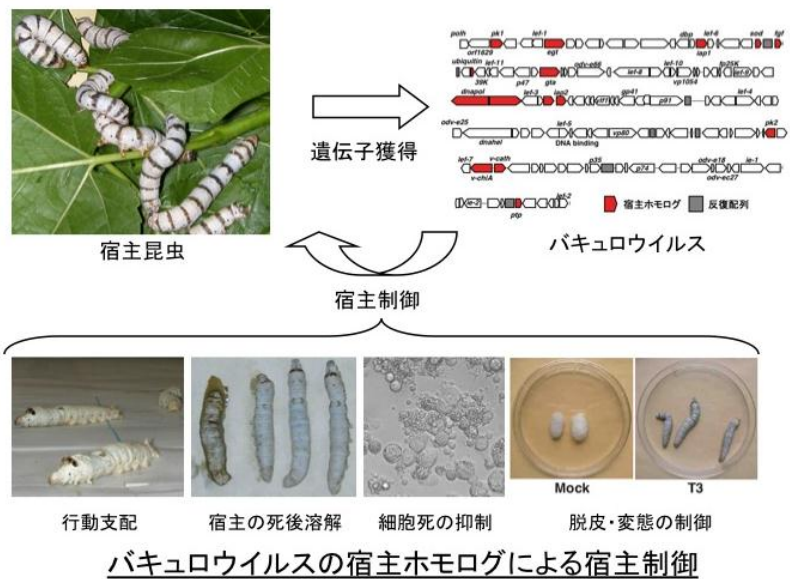
バキュロウイルスがコードする宿主ホモログの網羅的同定

ウイルスの感染戦略を考える上で、宿主生物のゲノム情報は非常に重要である。BmNPV の宿主であるカイコに関しては、2008 年にゲノム解読がほぼ完了した。その情報を用いて、バキュロウイルス遺伝子との比較解析を行った結果、バキュロウイルスには多くの宿主遺伝子相同分子 (宿主ホモログ) が存在することが判明した。実際、BmNPV の推定遺伝子 136 のうち 15 (11%) が宿主ホモログであった。ジーンターゲット法による遺伝子欠損ウイルスの作成により、そのうちの 9 遺伝子は、ウイルスの複製に関与しない補助遺伝子であることがわかった。その中には、上述の *egt*, *iap*, カテプシン, キチナーゼに加えプロテインフォスファターゼや繊維芽細胞成長因子などが含まれていた。他の機能が不明な遺伝子も、その欠損により昆虫個体における病原性の低下がみとめられたことから、宿主ホモログの多くは宿主制御やウイルスの効率的感染に関わっていると考えられた。つまり、バキュロウイルスは他の大型 DNA ウイルスと同じように、宿主ゲノムからの遺伝子獲得によって遺伝子数を増加させ、宿主昆虫の脱皮や細胞死の支配といった非常に高度な宿主制御機構を有するウイルスになったと推測される。

宿主の行動を制御するバキュロウイルス遺伝子

昆虫病理学分野では、「*Wipfelkrankheit* (梢頭病)」と呼ばれる病気が 100 年以上前から知られている。これは、バキュロウイルスに罹患したチョウ目昆虫の幼虫が木の枝の先でぶら下がって致死する病気

である。バキュロウイルスは、その感染末期に宿主の行動を活発にし、寄主植物の上方に移動させ、その場で致死させる。その結果、鳥などへの補食や風雨による死体からのウイルスの飛散が促進され、次代が広範囲に伝播する。つまり、ウイルスの利己的な行動制御であると考えられている。カリフォルニア大学のジョージ・カミタ博士らは、カイコと BmNPV を用いて、ウイルスの脱リン酸化酵素遺伝子 (*protein tyrosine phosphatase: ptp*) が行動制御に関わることを報告しているが、そのメカニズムは未解明であった。私は、様々な *ptp* 変異株を作成することにより、BmNPV の行動制御には、PTP タンパク質が持つ脱リン酸化酵素活性が不必要であることを証明した。また、酵母 2 ハイブリッド法と免疫沈降法を用いた解析から、PTP がウイルス粒子に含まれるタンパク質であることが明らかとなった。さらに、PTP 非存在下で形成されたウイルス粒子は感染力が低下し、特に感染幼虫の脳におけるウイルス増殖が低下していた。以上のことから、PTP は「酵素」としてではなく、「ウイルス粒子構成タンパク質」として機能し、行動惹起に必要な脳への感染に関与することが明らかとなった。*ptp* は宿主ホモログであることから、バキュロウイルスが宿主から「酵素」遺伝子を獲得後、別の機能で利用するようになった例であり、非常に興味深い。また、私のグループでは、遺伝子変異ウイルスライブラリーを活用して、*ptp* 以外の行動関連遺伝子の同定にも成功しており、今後それらの遺伝子の機能解析を行うことで、バキュロウイルスによる行動制御システムの一部を解明できると考えている。



宿主細胞のシグナル伝達系をハイジャックするバキュロウイルス遺伝子

繊維芽細胞成長因子 (fibroblast growth factor: FGF) は、線虫からヒトまで保存された成長因子の一つであり、細胞増殖や分化において重要な働きをする有名な成長因子である。ヒトにおいては、現在までに 22 種類の FGF が同定されており、そのうちの多くのが細胞外に分泌され、細胞膜上の受容体型チロシンキナーゼに結合することによって、細胞内シグナル伝達を引き起こすことにより生理活性を示すことが知られている。様々なバキュロウイルスのゲノム配列が決定された結果、バキュロウイルスにも FGF 様遺伝子が存在することが知られていた。FGF をゲノム上にコードするウイルスは、チョウ目昆虫に感染するバキュロウイルスのみであることから、特殊な機能を持つ宿主制御分子であると推測し、その機能解析を行った。その結果、バキュロウイルスの FGF (vFGF) は宿主昆虫の体液中に感染初期に分泌され、宿主の FGF 受容体を介して、血球細胞を感染組織に引き寄せることが判明した。すなわち、バキュロウイルスは vFGF を利用して宿主の FGF シグナル経路をハイジャックし、ケモタキシスによる血球細胞への感染促進を行っていることが明らかとなった。

バキュロウイルス感染に必要な宿主遺伝子の同定：カイコゲノム情報を用いた薬理的アプローチ
ウイルスによる宿主制御を考える場合、ウイルス側の因子だけではなく、ウイルス感染に関与する宿

主因子の解析も必須である。私は、バキュロウイルス感染に必要な宿主遺伝子を、カイコゲノム情報と薬理学的手法を用いて同定するスクリーニング系を確立した。まず、哺乳類や他生物で薬理学的特徴がはっきりしている低分子化合物のウイルス増殖、および多角体産生における影響を調査する。その結果、何らかの影響があった化合物を選択し、そのターゲット遺伝子のカイコホモログをゲノム情報を利用してクローニングする。最後に、培養細胞における RNA 干渉法により、その遺伝子が本当にウイルス感染に重要であるかを検討する、という流れである。現在までに、約 50 以上の典型的なシグナル分子の阻害剤について実験を行い、10 程度の候補分子を同定している。例えば、MAP キナーゼの阻害剤に関しては、U0126 と SP600125 がウイルス増殖を顕著に押さえることが判明した。実際、これらのターゲット分子である ERK と JNK は、ウイルス感染時に活性化（リン酸化）されており、RNA 干渉によるノックダウンによってウイルスの増殖は顕著に抑えられた。このスクリーニング系を利用すれば、ウイルス増殖に重要な役割をする宿主遺伝子を同定し、ウイルスの宿主制御戦略を宿主側から解明できるかもしれない。

ポリヘドリン遺伝子が高発現するメカニズム：関与するウイルス遺伝子の同定と改変型ベクターの開発

ポリヘドリンプロモーターを利用したバキュロウイルスベクターは、その発現効率の高さから獣医薬やワクチン生産に利用されている。しかしながら、このシステムの根幹をなす「ポリヘドリンプロモーターは何故強力なのか」という謎はまだ解明されていない。そのヒントを得るために、遺伝子変異ウイルスライブラリーを利用したスクリーニングを行い、プロモーター活性に関与する遺伝子領域を網羅的に同定した。その結果、現在までにいくつかの遺伝子を発見することに成功した。その1つが *fp25K* である。*fp25K* は、多角体形成数が減少する変異体（Few Polyhedra mutant）の原因遺伝子として同定されたチョウ目 NPV 特異的な遺伝子であり、その後の研究により、感染個体の溶解や出芽ウイルス形成等、多様な機能を有する分子であることが半明している。私は、組換えウイルスの作成により、ポリヘドリンプロモーターの転写に関わる FP25K ドメインの同定に成功した。また、その領域に活性向上型変異を導入することにより、高発現型の BmNPV 系ベクターの開発に成功した。一方、ポリヘドリン合成量を正に制御する新規分子として Bm34 と名付けたウイルスタンパク質を同定した。この分子は、10 kDa 程度の核タンパク質であり、*fp25K* の発現量を制御することにより、間接的にポリヘドリン遺伝子の転写に関与していることを明らかにした。現在、この分子を利用した改良型ベクターの開発を検討している。

おわりに

ウイルスの宿主制御機構の解明は、ウイルス研究において最もアトラクティブなテーマである。カイコとバキュロウイルスのゲノム情報、およびジェノミックツールを利用して、今までわからなかったウイルスによる利己的かつ巧みな宿主制御システムが明らかになった。また、低分子化合物を利用することで、ウイルス感染に必要な宿主遺伝子の同定も可能となった。このような研究の深化により、ウイルスと宿主のせめぎ合いの進化的側面を分子レベルで垣間みることが可能になると期待している。一方、ウイルスの宿主制御戦略を利用することで、新たな害虫管理技術の創成や高発現ベクターが開発できないかと日々考えている。

謝辞

日本農学進歩賞の受賞にあたっては、日本蚕糸学会から推薦を賜りました。日本蚕糸学会の小林迪弘会長をはじめ、関係の先生方に心より感謝申し上げます。本稿で紹介した研究は、名古屋大学・小林迪弘教授、農業生物資源研究所・三田和英博士、理化学研究所・姜媛瓊博士、今井典子博士、中央農業総合研究センター・後藤千枝博士、宇都宮大学・岩永将司准教授、カリフォルニア大学・ジョージカミタ博士らとの共同研究の成果に基づくものです。学生時代の恩師である小林正彦博士、および永田昌男博士には、昆虫学、ウイルス学を基礎から教えていただきました。また、嶋田透教授をはじめとする東京大学昆虫遺伝研究室の皆様、特に一緒にウイルス実験を行ってきた学生の皆さんには多大なるご協力をいただきました。ここに感謝の意を表します。最後に、「バキュロウイルス」という魅力的な材料で研究をする機会を与えていただき、独特のスタイルで叱咤激励いただいた前田進博士に感謝するとともに、さらにおもしろい研究を続けていくことを誓います。

参考文献

1. **Katsuma S**, Tsuchida A, Imai-Matsuda N, Kang W-K, and Shimada T., Role of the ubiquitin-proteasome system in *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus infection. *Journal of General Virology*, 2011, 92, 699-705.
2. **Katsuma S**, Kang W-K, Shin-i T, Ohishi K, Kadota K, Kohara Y, and Shimada T., Mass identification of transcriptional units expressed from the *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus genome. *Journal of General Virology*, 2011, 92, 200-203.
3. Nakanishi T, Goto C, Kobayashi M, Kang WK, Suzuki T, Dohmae N, Matsumoto S, Shimada T, and **Katsuma S**, Comparative studies of a lepidopteran baculovirus-specific protein FP25K: Development of a novel BmNPV-based vector with a modified *fp25K* gene. *Journal of Virology*, 2010, 84, 5191-5200.
4. **Katsuma S** and Shimada T., *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus ORF34 is required for efficient transcription of late and very late genes. *Virology*, 2009, 392, 230-237.
5. **Katsuma S**, Kawaoka S, Mita K, and Shimada T., Genome-wide survey for baculoviral host homologs using the *Bombyx* genome sequence. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, 38, 1080-1086.
6. **Katsuma S**, Mita K, and Shimada T., ERK- and JNK-dependent signaling pathways contribute to *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus infection. *Journal of Virology*, 2007, 81, 13700-13709.
7. **Katsuma S**, Horie S, Daimon T, Iwanaga M, and Shimada T., In vivo and in vitro analyses of a *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus mutant lacking functional *vfgf*. *Virology*, 2006, 355, 62-70.
8. **Katsuma S**, Daimon T, Mita K, and Shimada T., Lepidopteran ortholog of *Drosophila* Breathless is a receptor for the baculoviral fibroblast growth factor. *Journal of Virology*, 2006, 80, 5474-5481.
9. **Katsuma S**, Tanaka S, Omuro N, Takabuchi L, Daimon T, Imanishi S, Yamashita S, Iwanaga M, Mita K, Maeda S, Kobayashi M, and Shimada T. Novel macula-like virus identified in *Bombyx mori* cultured cells. *Journal of Virology*, 2005, 79, 5577-5584.

Molecular analysis of virus-host interaction during baculovirus infection

Susumu Katsuma (Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo)

katsuma@ss.ab.a.u-tokyo.ac.jp