

1. 昆虫培養細胞に潜在感染する *Bombyx mori latent virus*

岩永 将司

宇都宮大学農学部生物資源科学科昆虫機能利用学研究室

Bombyx mori latent virus (BmLV) はチモウイルス科に属する未分類のプラス鎖 RNA ウイルスである。BmLV は植物ウイルスに類縁性を示すものの、節足動物であるカイコの培養細胞でのみ旺盛に増殖する。また、生活環は未解明であるものの、BmLV はほとんど全てのカイコ由来培養細胞へと既に混入している。我々は、BmLV の増殖メカニズムを明らかにするために、BmLV の陰性培養細胞の樹立や不活化法の開発、宿主域の解析を進めてきた。更に、BmLV の持続感染メカニズムに着目し、BmLV の急性感染細胞では small interfering RNA (siRNA) を介した RNA サイレンシングが引き起こされること、そして BmLV の持続感染細胞では、siRNA だけではなく PIWI-interacting RNA (piRNA) を介した RNA サイレンシングが引き起こされることを見出した。本稿では、BmLV の発見からその持続感染メカニズムの一端の解明までを筆者らが得た知見を踏まえながら紹介する。

はじめに

培養細胞とは、組織、あるいは器官から分離された細胞の中で自律的に連続分裂を開始したものである。初めての連続継代性の培養細胞はヒト子宮癌から樹立された HeLa 細胞¹⁾ であり、その後、数多くの動物由来培養細胞が樹立されてきた。昆虫においては 1962 年にヤマユガ卵巣から初めての連続継代性の培養細胞が樹立され²⁾、その後、昆虫の培養細胞は 100 種以上の昆虫からおよそ 500 種類樹立されている³⁾。なかでも、チョウ目昆虫由来の培養細胞は、組換えバキュロウイルスによる外来タンパク質発現系 (Baculovirus Expression Vector System: BEVS) の宿主細胞として分子生物学の分野ではなくてはならないものとなっており、研究用試薬の他、ヒトパピローマウイルスワクチンやヒトインフルエンザワクチンの生産など医薬・獣医薬の生産においても実用化されている⁴⁾。

これら培養細胞は、バクテリアやマイコプラズマ、カビ

などの混入を避けるために無菌環境下で維持されており、これは昆虫由来培養細胞においても同様である。しかし近年、いくつかのウイルスが昆虫由来の培養細胞に混入していることが報告された。例えば、キイロショウジョウバエ由来 S1 細胞へのノダウイルス科 Black beetle virus の混入⁵⁾、イラクサギンウワバ由来 High Five 細胞へのノダウイルス科 Flock house virus の混入⁶⁾、ツマジロクサヨトウ由来 Sf9 及び Sf21 細胞へのラブドウイルス科 Sf-rabdovirus の混入⁷⁾ などが報告されている。これらのウイルスは不顕性感染であり目に見えるような病徴を示さないため、いつ、どのような経路で混入し宿主との共生状態に至ったのかは明らかでない。つまり、これまでに樹立されてきた 500 種類に及ぶ昆虫由来培養細胞の中に、既に何らかのウイルスが混入し潜在感染している可能性がある。このような潜在感染ウイルスが、どのようなメカニズムによって宿主の生体防御システムを回避し増殖を果たしているのかは、非常に興味深い。

BmLV の発見

昆虫の培養細胞は幅広い研究分野で利用されているが、中でもチョウ目のモデル生物であるカイコ由来培養細胞は、カイコ核多角体病ウイルス (*Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*: BmNPV) の宿主細胞として頻りに利用されている。BmNPV はカイコに特異的に感染するバキュロウイルス科の DNA ウイルスであり、感染昆虫の徘徊行動の惹起や、脱皮・変態、表皮の溶解など興味深い生活環を送

連絡先

〒321-8505

栃木県宇都宮市峰町 350 番地

宇都宮大学農学部生物資源科学科昆虫機能利用学研究室

TEL: 028-649-5454

FAX: 028-649-5401

E-mail: iwanaga@cc.utsunomiya-u.ac.jp

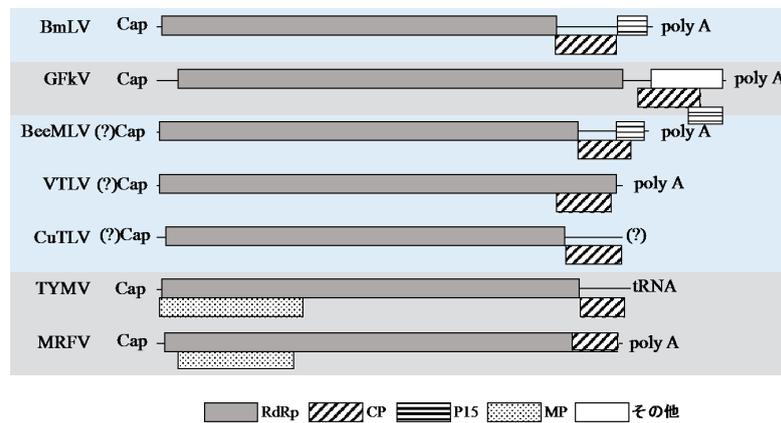


図1 BmLV とチモウイルス科のウイルスとのゲノム構造の比較

BmLV (NC_015524) のゲノム構造をマキユラウイルス属の GFkV (NC_003347), 未分類の BeeMLV (KT162925), VTLV (NC_027619.1), CuTLV (NC_018703), チモウイルス属の TYMV (NC_004063), マラフィウイルス属の MRFV (AF265566) と比較した。BmLV, BeeMLV, VTLV, CuTLV は節足動物を宿主とし, GFkV, TYMV, MRFV は植物を宿主とするウイルスである。

ることが知られている⁸⁾。そこで, BmNPV の増殖メカニズムを網羅的に解析するため, 2000 年に入ってから大規模な EST (expressed sequence tag) 解析⁹⁾ や cDNA サブトラクション解析¹⁰⁾, マイクロアレイ解析¹¹⁾ が行われた。その過程で, BmNPV に感染したカイコ卵巣由来 BmN4 細胞¹²⁾ のライブラリーの中から植物ウイルスであるチモウイルス科のウイルスに相同性を示すいくつかの EST が発見された⁹⁾。研究に用いた EST ライブラリーはカイコ由来培養細胞から構築されたものであったため, 当初これらの EST はウイルス由来のものではなく, ゲノム中の反復配列ではないかと推定されていた。しかし, 得られた EST を連結した結果, これらの EST が単なる反復配列ではなくプラス鎖 RNA をゲノムとするチモウイルス科のマキユラウイルス¹³⁾ に類似した構造であることが明らかとなった (図 1)。その後, カイコやカイコ由来培養細胞のゲノム上には本ウイルス様の配列が存在しないこと, そして, BmN4 細胞の中からウイルス RNA を含む直径約 30 nm の粒子が精製されたことから, この粒子がカイコ由来培養細胞に潜在感染している新規のウイルス *Bombyx mori latent virus* (BmLV) であることが明らかとなった¹⁴⁾。

BmLV は植物ウイルスに類縁性を示す

約 6.5 kb のプラス鎖 RNA ゲノムからなる BmLV のゲノム上には, RNA 合成酵素をコードする *RNA-dependent RNA polymerase* (*RdRp*), 外被タンパク質をコードする *coat protein* (*cp*), 機能未知の *p15* の 3 つの推定 open reading frame (ORF) が存在していた (図 1)¹⁴⁾。*RdRp* (ORF1) には *methyltransferase* (メチルトランスフェラー

ゼ), *helicase* (ヘリカーゼ), *RdRp* (RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ) のモチーフが存在したため, ウイルスのゲノム RNA やサブゲノム RNA の転写や複製を担っていると考えられた。*cp* (ORF2) は相同性検索の結果からウイルスの構造タンパク質であると考えられた。一方で, *p15* (ORF3) は相同性検索によってその機能を推定することは出来なかった。興味深いことに, CP のアミノ酸配列による系統解析の結果, BmLV はカイコ由来培養細胞に感染しているにもかかわらず植物ウイルスであるチモウイルス科マキユラウイルス属のタイプ種である Grapevine fleck virus (GFkV)¹⁵⁾ に最も近縁であった (図 2)。マキユラウイルス属は, 2002 年の The International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) によってチモウイルス科に新たに加えられた属であり, チモウイルス科には他にチモウイルス属とマラフィウイルス属が存在する¹³⁾。一方で, 類縁性を示した全てのウイルスが植物から単離された植物ウイルスという訳ではなく, セイヨウミツバチから単離された Bee macula-like virus (BeeMLV)¹⁶⁾ やイエカから単離された *Culex tympo-like virus* (CuTLV)¹⁷⁾, セイヨウミツバチに寄生するミツバチヘギイタダニから単離された *Varorra tympo-like virus* (VTLV)¹⁶⁾ なども BmLV に類縁性を示した。これら節足動物由来 RNA ウイルスの生活環は明らかではないが, もともとは植物ウイルスであったものが, 何らかの理由によって節足動物に入り込んだ, いわば植物ウイルス様ウイルスであると考えている。当初, BmLV に最も相同性が高いウイルスがマキユラウイルス属のタイプ種でありブドウを宿主とする GFkV であったことから, 筆者らは BmLV を *Bombyx mori macula-like latent virus* (BmMLV) と命名した¹⁴⁾。しかしながら, BmLV が

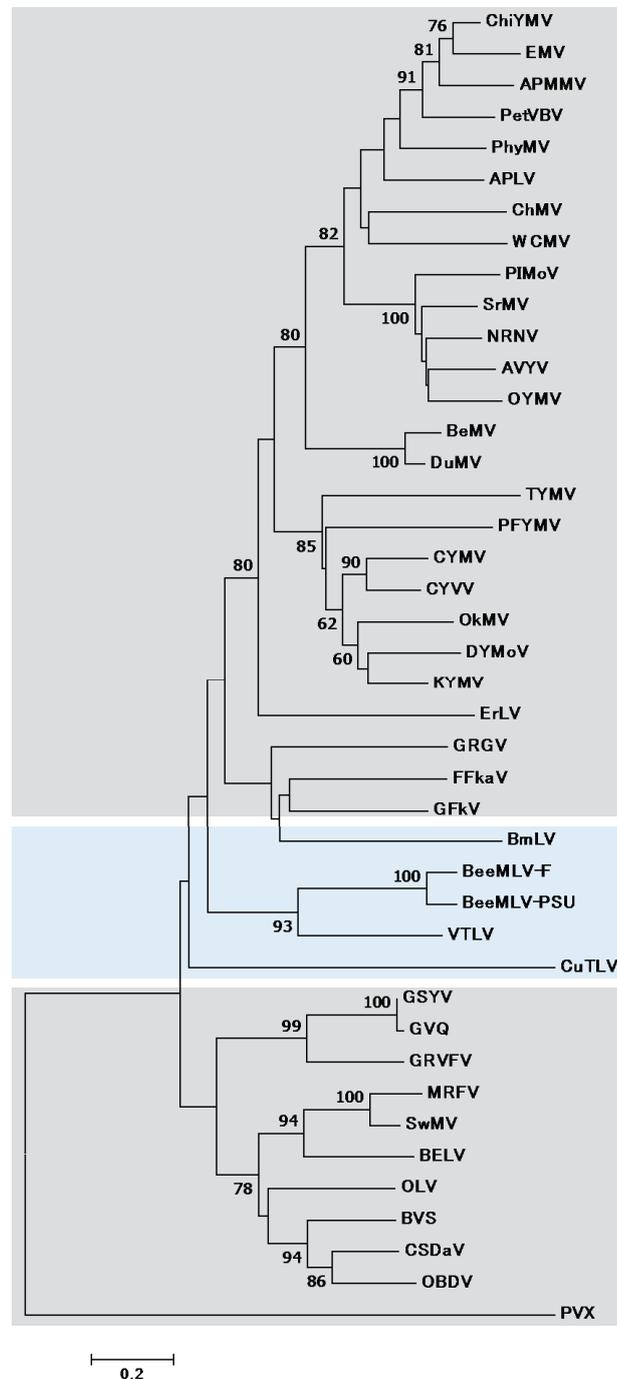


図2 近隣結合法による BmLV CP の系統解析

BmLV はチモウイルス科の多くのウイルスに類縁性を示し、特にマキュラウイルス属の GFkV に高い類縁性を有する。

BmLV, BeeMLV, VTLV, CuTLV は節足動物を宿主とし、それ以外のウイルスは全て植物ウイルスである。

カイコ培養細胞特異的であり植物に対する感染性を示さないことから、現在、本ウイルスは ICTV によって *Bombyx mori latent virus* (BmLV) と改名されている¹⁸⁾。今後、上述の節足動物由来の未分類チモウイルスと併せ BmLV を正式に分類する必要があるだろう。

チモウイルス科にはチモウイルス属、マキュラウイルス属、

マラフィウイルス属の3つが属している³⁾。図1にチモウイルス属のタイプ種 Turnip yellow mosaic virus (TYMV)¹⁹⁾、マキュラウイルス属のタイプ種 GFkV¹⁵⁾、マラフィウイルス属のタイプ種 Maize rayado fino virus (MRFV)²⁰⁾、そして節足動物から発見された未分類のチモウイルスのゲノム構造を比較した。興味深いことに、節足動物を宿主とす

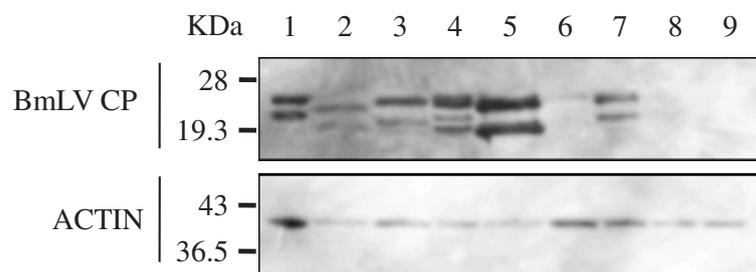


図3 BmMLV CP抗体を用いた各種培養細胞のウェスタン解析²⁴⁾

カイコ (1-7), およびツマジロクサヨトウ (8, 9) 由来培養細胞のウェスタン解析. 数字は, 各培養細胞の系統 (1: BmN, 2: SES-BoMo-J125K5, 3: NIAS-BoMo-Cam1, 4: NIAS-Bm-oyanagi, 5: SES-BoMo-15A, 6: NIAS-Bm-ao1, 7: NIAS-Bm-aff3, 8: Sf-9, 9: Sf-21) を示している.

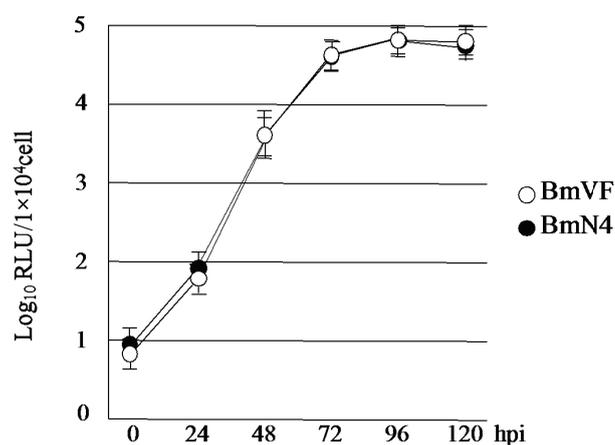


図4 BmLV 陰性 BmVF 細胞を用いた組換えホタルルシフェラーゼの発現²⁷⁾

ホタルルシフェラーゼを発現する組換え BmNPV を BmLV 陰性 BmVF 細胞と BmLV 陽性 BmN4 細胞へ接種し, 感染経時的なルシフェラーゼ活性を比較した.

る BmLV, BeeMLV, VTLV, CuTLV, 及びマキユラウイルス属の GFkV からは, ウイルスの細胞間移行に關与する移行タンパク質 (movement protein: MP) は見出されなかった. また, BmLV と類似したゲノム構造を有し, *p15* 遺伝子をコードすると考えられるのは, BmLV, GFkV, BeeMLV のみであった. そこで, BmLV, GFkV, BeeMLV の各 ORF の相同性を調査した結果, *RdRp*, *cp*, *p15* の相同性の平均値は塩基配列 (アミノ酸) でそれぞれ 48.9 (35.9), 48.6 (32.5), 37.1 (17.5) % となり, *p15* の相同性が最も低かった. 最近, 筆者らは BmLV の組換え P15 タンパク質の RNA サイレncing サプレッサー能を調査したが, その活性は認められず, 更に感染性クローンを用いたリバーシジェネティクスでは, そもそも *p15* がタンパク質へと翻訳されていない (しかし, 欠損することもある) 結果が得られている²¹⁾. このように考えると *p15* はタンパク質をコードする ORF ではなく, この領域にはそれぞれの宿主細胞でウイルスの増殖に關わる何か別

の役割があるのかも知れない.

BmLV の特徴

では, BmLV はどのような生活環を有するのであろうか. すでに述べたように, BmLV に最も類縁性が高いのは植物ウイルスの GFkV である. GFkV については, 接木で感染することは認められているものの²²⁾, その生活環についてはほとんど分かっておらず, 現在のところベクター昆虫も明らかになっていない. そこで, 筆者らはカイコが食草とするクワ葉からの BmLV の検出を試みたがウイルスの RNA は検出されなかった²³⁾. また, カーボランダムを用いた BmLV の接種試験を行ったが, モザイク症状などは観察されずウイルスのタンパク質も検出されなかった. 次に, カイコ培養細胞の樹立元であるカイコ幼虫への BmLV の接種試験を行った. まず, クワ葉からカイコへとウイルスが侵入したのであれば経口感染経路が考えられたため, カイコ幼虫へと BmLV ウイルス液を経口接種した. しか

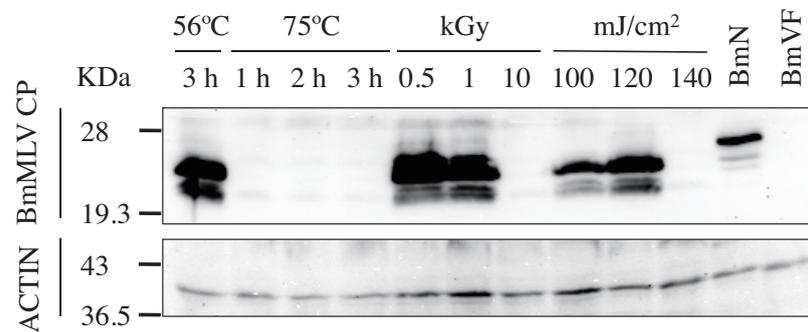


図5 物理的条件による BmLV の不活化²⁹⁾

BmLV を温度、ガンマ線、UV-C により処理した後、BmVF 細胞へ接種し、接種後7日の細胞抽出物を BmLV CP 抗体を用いてウェスタン解析した。

しながら、カイコ幼虫における BmLV の増殖は認められなかった。更に、BmLV をカイコ幼虫へと皮下接種しても接種したウイルスの RNA は検出されるものの、RNA 量の増加やウイルスタンパク質を確認することは出来なかった。そこで筆者らは、様々な昆虫由来培養細胞を用いて BmLV の検出を試みた。その結果、図3に示すように供試したカイコ由来培養細胞の全てから BmLV のシグナルが検出され、一方で他の昆虫由来培養細胞からはウイルスのシグナルを認めることは出来なかった²⁴⁾。これらの結果は、BmLV がカイコの培養細胞にのみ潜在感染していること、しかも、既に樹立されたカイコ培養細胞の多くに何らかの経路を通じて混入していることを示すものであった。

ウイルスの増殖メカニズムを理解するために、ウイルスの感染実験は必須のものである。しかしながら、上述のように、BmLV は既に樹立されたカイコ由来培養細胞へと混入しており、また、カイコ幼虫やクワ葉では増殖性を示さない。そこで、独立行政法人農業生物資源研究所（当時）の今西重雄博士と共同で、新規の培養細胞を樹立することにした。BmLV の混入源は不明であったものの、本ウイルスは垂直伝播しないことが明らかであった¹⁴⁾ ため、カイコ胚由来の培養細胞を樹立することにした。樹立した細胞は順調に生育し、RT-PCR やウェスタン解析によってウイルスの混入を調査した結果、樹立した培養細胞は BmLV 陰性であることが明らかとなったため、この細胞を BmVF (virus-free) 細胞と名付けた^{24, 25)}。BmVF 細胞の樹立後、早速 BmLV を接種した結果、ウイルス接種後36時間から細胞内で CP のシグナルが確認され、接種後72時間からは培地上清からも CP のシグナルが得られ、ウイルスが培養液中に放出されていることが明らかとなった。しかも、ウイルスを感染させた BmVF 細胞は、細胞変性効果が観察されたものの致死には至らず、そのまま持続感染の状態となった。つまり、BmVF 細胞は、BmLV に対する感受

性を有し、しかも持続感染を許容することが明らかになった。BmVF 細胞の樹立は筆者らにとって大きなブレイクスルーであり、本細胞の樹立によって初めてウイルスの感染実験を行うことができるようになった。

BmLV と BEVS

既に述べたように、カイコ由来培養細胞はバキュロウイルスによる組換えタンパク質発現系（カイコ BEVS）として利用され、研究用だけでなく、既に複数の獣医薬が生産、上市されている²⁶⁾。当然ながら、このような組換えタンパク質の生産の際には BmLV のようなウイルスの混入はできるだけ避けるべきである。そこで、樹立した BmVF 細胞を用いて効率的な組換えタンパク質の生産が可能かどうか調査した。その結果、BmVF 細胞におけるカイコバキュロウイルス (BmNPV) の増殖量は、BmN4 細胞と同様であった²⁷⁾。また、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た結果、BmVF 細胞は、BmN4 細胞と同様のルシフェラーゼ活性を示した（図4）。これらの結果から、BmVF 細胞は他のカイコ由来培養細胞と同様の、BmNPV に対する感受性と組換えタンパク質生産能を有することが明らかとなり、BmVF 細胞を用いることで BmLV 陰性の組換えタンパク質の生産が可能となった。

次に、BmLV の安全性の評価や不活化法の開発を行った。まず、BmLV が哺乳類由来培養細胞で増殖するかどうかを調査するため、様々な哺乳動物由来9種の培養細胞へと BmLV を接種し、ウイルスが増殖するかどうかを調査した。その結果、全ての哺乳類由来培養細胞において、ウイルスの RNA 量は接種直後をピークとして激減し、接種後2週間ではほぼ検出限界以下となった²⁸⁾。また、ウイルス増殖の際に観察されるサブゲノミック RNA は、ウイルス接種直後から全く検出されなかった。これらの結果から、BmLV は哺乳類由来培養細胞で増殖しないことが明らかとなった。更に、ウイルスの接種がこれら培養細胞の細胞増

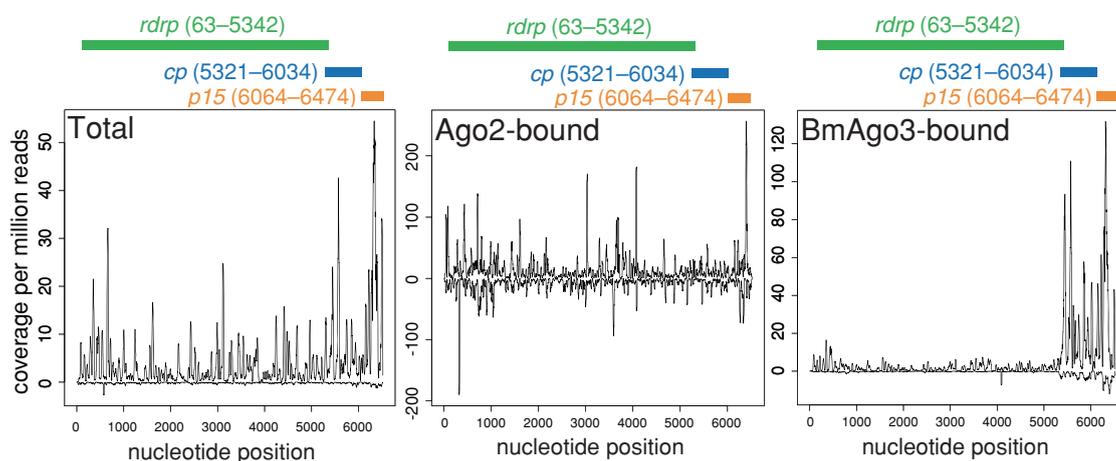


図6 BmN4細胞で産生されるBmLV由来小分子RNA²¹⁾

BmN4細胞で産生される小分子RNA, Ago2に結合したsiRNA, BmAgo3に結合したpiRNAをBmLVのゲノム配列へマッピングした。

殖能, 生育速度へ影響を及ぼさないことも明らかとなり, 少なくとも培養細胞レベルではBmLVの安全性が確認された。次に, 混入したBmLVの簡便な不活化法を開発した。一般に, 多くのウイルスは, UVなどの物理的条件や次亜塩素酸ナトリウムなどによる化学的条件によって不活化される。そこで筆者らは, BEVSによって生産された組換えタンパク質中に含まれるBmLVの不活化には物理的条件の方が容易であると考え, 熱, ガンマ線, UVによる不活化条件を検討した。その結果, 75度60分の温度処理, 10 kGyのガンマ線照射, 140 mJ/cm²のUV-C照射によってBmLVは完全に不活化することが明らかとなった(図5)²⁹⁾。これらの不活化条件は他の一般的なウイルスとほぼ同様であることから, 一般的なサンプルの処理によってBmLVは容易に不活化されると考えられた。

BmLV感染細胞のトランスクリプトーム解析

では, BmLVはどのようにして宿主細胞内で増殖しているのだろうか。一般に, ウイルス感染細胞においてウイルスの増殖が停止し無病徴となる感染を潜伏感染, ウイルスの増殖が停止せず緩やかに続く感染を持続感染, ウイルス増殖によって長期にわたり何らかの病徴が続く感染を慢性感染と呼ぶ。BmLVの場合, ウイルスは培養細胞において活発に増殖し, 培地上清へとウイルス粒子を放出している。一方, 宿主であるBmN4細胞はGraceによって1967年に樹立されて以来, 数多の研究に利用されている培養細胞であるが, 病徴発現に関する報告はこれまでにない。すなわち, BmLVは宿主のBmN4細胞において, 宿主に病徴を発現させることなく増殖を続ける持続感染型の感染様式を有するウイルスである。昆虫由来培養細胞に持続感染する昆虫ウイルスとして, BmLVの他にも, キイロシヨウジョウバエ由来培養細胞へ感染するノダウイルス科 Black beetle

virus⁵⁾, ハチノスツヅリガ由来培養細胞へ感染するピコルナウイルス科 *Galleria mellonella cell line virus*³⁰⁾, ヒトスジシマカ由来培養細胞へ感染するパルボウイルス科 *Aedes albopictus C6/36 cell densovirus*³¹⁾, カの一種である *Aedes pseudoscutellaris* 由来培養細胞へ感染するレオウイルス科 *Aedes pseudoscutellaris reovirus*³²⁾, ツマジロクサヨトウ由来 Sf9細胞へ感染するラブドウイルス科 *Sf rabdovirus*⁷⁾ などが報告されている。植物ウイルスにおいても, ヨコバイ由来培養細胞へ感染するレオウイルス科 *Wound tumor virus*³³⁾ の持続感染が報告されている。しかし, これらの報告の多くは接種試験による持続感染の成立や, 培養細胞からのウイルスの発見に関するものである。これら持続感染型の昆虫ウイルスが, 宿主細胞とどのように関連して効率的な増殖を成立させているのか, その分子応答メカニズムはほとんど明らかになっていない。特に, BmLVはゲノムの類縁性から植物ウイルス様ウイルスと考えられ, どのようなメカニズムでチョウ目昆虫であるカイコに由来する培養細胞へ侵入して適応したのか, 非常に興味深い。そこで筆者らは, BmLVの持続感染メカニズムについて, より詳細な解析を進めることにした。

近年では, リアルタイムPCRやトランスクリプトーム解析によって, 個々の遺伝子の転写量を比較することができる。そこで, BmLVが持続感染しているBmN4細胞をこれらの手法を用いて解析した結果, BmLVの外被タンパク質遺伝子であるcpの転写量は宿主細胞の恒常性に関するアクチンA3遺伝子とほぼ同量であること¹⁴⁾, 更に, BmLVの全RNA量は宿主全転写物の実に15.7%にも達することが明らかとなった²¹⁾。また, リードの多くはBmLVのサブゲノム領域にマップされ, 効率的なCPの生産に寄与していると考えられた。では, BmLVはどのようなスピードでウイルスRNAを転写・複製していくのだから

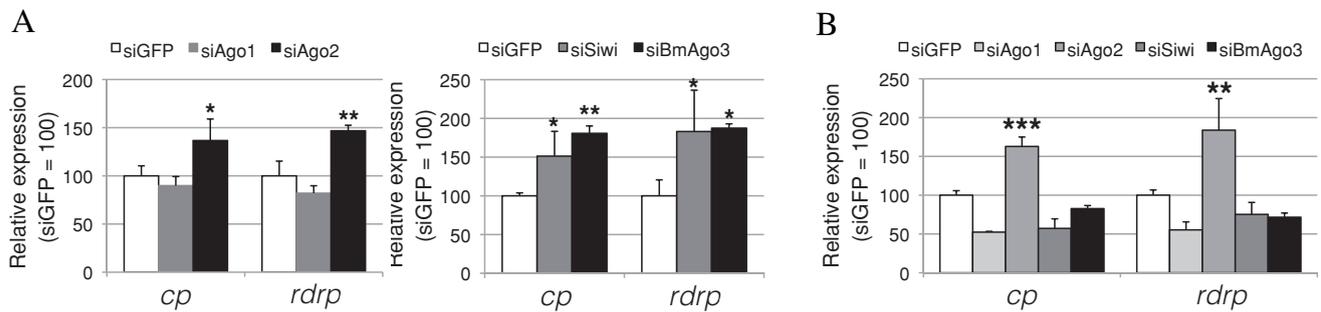


図7 BmLV 感染細胞で発動される RNA サイレンシング経路²¹⁾

(A) BmLV が持続感染している BmN4 細胞において、miRNA 経路に関与する *Ago1*、siRNA 経路に関与する *Ago2*、piRNA 経路に関与する *Siwi*、*BmAgo3* をノックダウンした。その後、BmLV の *cp*、及び *rdrp* の RNA 量を RT-qPCR により比較した。(B) BmLV 陰性の BmVF 細胞において、*Ago1*、*Ago2*、*Siwi*、*BmAgo3* をノックダウンした。その後、BmLV を接種し、BmLV の *cp*、及び *rdrp* の RNA 量を RT-qPCR により比較した。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。

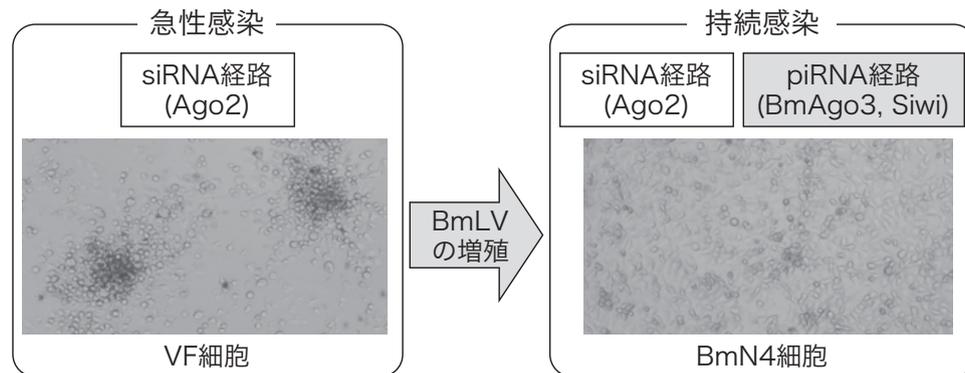


図8 BmLV の増殖を抑制するメカニズム

うか。筆者らは、前述の BmLV 陰性 BmVF 細胞へ BmLV を接種し、感染継時的なトランスクリプトーム解析を行った。その結果、BmLV の RNA 量はウイルス接種後 24 時間で宿主全転写物の 0.6% であったものが、接種後 96 時間で 11.7% まで増加していた。その後、BmLV の RNA 量は接種後 2 週間で 9.8%、接種後約 2 年においても 8.3% を占めていた²¹⁾。しかしながら、宿主細胞にとってウイルスは異物である。BmLV を排除するためにどのような生体防御メカニズムが発動されているのだろうか？

BmLV 持続感染のコアメカニズム

ウイルス由来 RNA に限らず、宿主由来 RNA を含め、様々な RNA 量を調整、抑制するメカニズムとして RNA サイレンシングが知られている^{34,35)}。RNA サイレンシングは、抑制・分解するターゲット RNA ごとに microRNA (miRNA)、small interfering RNA (siRNA)、PIWI-interacting RNA (piRNA) という異なる小分子 RNA を介した経路が存在

する。miRNA は生物のゲノム上にコードされている小分子 RNA であり、各種遺伝子の発現量を調節している。siRNA はウイルスなどの外来二本鎖 RNA をもとに作られ、ウイルスなどの寄生体の RNA を分解する生体防御メカニズムに関与している。piRNA は、生殖組織で発現している小分子 RNA であり、転移因子であるトランスポゾンの発現抑制に関わると共に、カイコでは性決定にも関与することが知られている³⁶⁾。そこで、BmLV が持続感染している BmN4 細胞で産生されている小分子 RNA^{37, 38)} を BmLV ゲノムにマップした結果、長さ 20 塩基をピークに有する BmLV 由来の siRNA (vsiRNA) が BmLV ゲノム全体にマップされることが明らかとなった (図 6)²¹⁾。これは、BmN4 細胞で siRNA 経路を阻害すると BmLV の RNA 量が増加するという先行研究³⁹⁾ を裏付けるものであった。一方で、興味深いことに、siRNA とは異なる、長さ 27-28 塩基をピークに有する BmLV 由来の piRNA (vpiRNA) が BmLV のサブゲノム RNA に特異的にマップ

されることが明らかとなった(図6)²¹⁾。そこで、各RNAサイレンシング経路に関わる因子をノックダウンした結果、siRNA経路に関与するAgo2、piRNA経路に関与するBmAgo3とSiwiのノックダウンによって、BmLVのRNA量が有意に増加した(図7A)²¹⁾。これらの結果は、BmLVが持続感染しているBmN4細胞では、siRNA経路とpiRNA経路の両方が発動されていることを示していた。次に、ウイルス陰性のBmVF細胞にBmLVを接種した急性感染においてもBmN4細胞と同様のRNAサイレンシング経路が発動されているのかどうかを調査した。その結果、ウイルスの持続感染状態にあるBmN4細胞とは異なり、BmVF細胞では、siRNA経路のみが発動されていることが明らかになった(図7B)²¹⁾。これらの結果から、BmLVの急性感染に対しては、vsiRNAを介したRNAサイレンシング経路が発動されてウイルス増殖の抑止に働くこと、そして、それでもなお、ウイルスの増殖を抑止できずに持続感染状態となった際に、vpiRNAを介した新たなRNAサイレンシング経路が発動されることが明らかとなった(図8)。最近、イラクサギンウワバ由来High Five細胞へジストロウイルス科Cricket paralysis virusを急性感染した際のウイルスRNAの抑止、そしてカイコ由来Bm5細胞⁴⁰⁾に持続感染しているBmLVのRNAの抑止にもvsiRNAを介したRNAサイレンシング経路が発動されることが報告された⁴¹⁾。このように、RNAサイレンシング経路は多くのウイルスによる急性感染、及び持続感染に対して発動されているのだろう。このようなvsiRNAとvpiRNAを介したRNAサイレンシング経路が、どのようなメカニズムで選択的に発動されるのかは、ウイルス増殖に対する生体防御メカニズムとして非常に興味深いものである。更に、このような2重のRNAサイレンシング経路による抑止を受けながらもBmLVは増殖を果たしており、そのせめぎ合いの結果が、BmN4細胞における15.7%という旺盛なRNA量となっている。つまり、BmLVは極めて効率的な増殖メカニズムを有すると考えられ、今後、BmLVと宿主の緻密な相関を明らかにし、その増殖メカニズムを解明したいと考えている。

おわりに

本稿では、BmLV発見の経緯と特徴や、ウイルス陰性培養細胞の樹立、BEVSにおけるBmLVの安全性やBmLV持続感染のコアメカニズムについて概説した。現在筆者らは、BmLVと宿主細胞がどのように相互作用しているのか解析を進めている。例えば、ウイルスの増殖に伴って宿主細胞集塊の形成が促される現象を見出しており、これがウイルスの増殖にどのような影響を及ぼしているのか解析を進めている。これらの研究を通して、BmLVの持続感染メカニズムを詳らかにしたいと考えている。また、昆虫の培養細胞にはBmLVのみならず、他にも複数のRNAウイル

スが混入し、潜在感染しているようである。これら潜在感染ウイルスが宿主細胞の中でどのような世界を形成しているのか、今後明らかにしていきたいと考えている。

そもそもBmLVはどのようにしてカイコ由来の、それもほとんど全ての培養細胞へ侵入したのだろうか。そして、なぜBmLVはカイコ幼虫では増殖しないのにも関わらず、培養細胞では持続感染を成立させることができるのだろうか。BmLVがカイコ培養細胞特異的に持続感染することは偶然の賜なのだろうか、それとも、まだ明らかでないBmLV本来のライフサイクルと密接に関わるのだろうか。いずれも、極めて興味深い問題であり、是非これらの問題に解答を与えたいと考えている。

謝辞

本研究を進めるにあたり東京大学大学院の勝間進博士には終始ご協力頂いた。また、BmVF細胞の樹立では農業生物資源研究所(当時)の今西重雄博士に多大なるご支援を頂いた。更に、トランスクリプトーム解析では東京大学大学院の鈴木稜博士、庄司佳祐博士、川本宗考氏にご協力頂いた。そして、本研究は多くの学部生、大学院生の協力によって進められたものである。誌面の都合上、個々のお名前を挙げて謝辞を述べることはできないが、この場を借りて厚く御礼申し上げる。

利益相反に関する開示

本稿に関し、開示すべき利益相反状態にある企業等はありません。

参考文献

- 1) Gey GO, Coffman WD, Kubicek MT.: Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res* 12:264-5, 1952.
- 2) Grace TD.: Establishment of four strains of cell from insect tissues growth in vitro. *Nature* 195:788-789, 1962.
- 3) Lynn DE.: Development of insect cell lines; Virus susceptibility and applicability to prawn cell culture. *Methods Cell Sci* 21:173-181, 1999.
- 4) Kost TA, Kemp CW.: Fundamentals of Baculovirus Expression and Applications., pp.187-197. In Vega M (eds), *Advanced Technologies for Protein Complex Production and Characterization*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 896, Springer, Cham, 2016.
- 5) Friesen P, Scotti P, Longworth J, Rueckert R.: Black beetle virus: propagation in Drosophila line 1 cells and an infection-resistant subline carrying endogenous black beetle virus-infected particles. *J Virol* 35:741-747, 1980.
- 6) Li TC, Scotti PD, Miyamura T, Takeda N.: Latent infection of a new alphanodavirus in an insect cell

- line. *J Virol* 81:10890–10896, 2007.
- 7) Ma H, Galvin TA, Glasner DR, Shaheduzzaman S, Khan AS.: Identification of a novel rhabdovirus in *Spodoptera frugiperda* cell lines. *J Virol* 88:6576–6585, 2014.
 - 8) 岩永将司:バキュロウイルスの特性と増殖, pp.134–145. 最新昆虫病理学 (国見裕久・小林迪弘編) 講談社, 東京, 2014.
 - 9) Okano K, Shimada T, Mita K, Maeda S.: Comparative expressed-sequence-tag analysis of differential gene expression profiles in BmNPV-infected BmN cells. *Virology* 282:348–356, 2001.
 - 10) Iwanaga M, Shimada T, Kobayashi M, Kang W.: Identification of differentially expressed host genes in *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus infected cells by using subtractive hybridization. *Appl Entomol Zool* 42:151–159, 2007.
 - 11) Sagisaka A, Fujita K, Nakamura Y, Ishibashi J, Noda H, Imanishi S, Mita K, Yamakawa M, Tanaka H.: Genome-wide analysis of host gene expression in the silkworm cells infected with *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Virus Res* 147:166–175, 2010.
 - 12) Grace TD.: Establishment of a line of cells from the silkworm *Bombyx mori*. *Nature* 216:613, 1967.
 - 13) Martelli GP, Sabanadzovic S, Abou Ghanem-Sabanadzovic N, Saldarelli P.: Maculavirus, a new genus of plant viruses. *Arch Virol* 147:1847–1853, 2002.
 - 14) Katsuma S, Tanaka S, Omuro N, Takabuchi L, Daimon T, Imanishi S, Yamashita S, Iwanaga M, Mita K, Maeda S, Kobayashi M, Shimada T.: Novel macula-like virus identified in *Bombyx mori* cultured cells. *J Virol* 79:5577–5584, 2005.
 - 15) Sabanadzovic S, Ghanem-Sabanadzovic NA, Saldarelli P, Martelli GP.: Complete nucleotide sequence and genome organization of Grapevine fleck virus. *J Gen Virol* 82:2009–2015, 2001.
 - 16) de Mirand JR, Cornman RS, Evans JD, Semberg E, Haddad N, Neumann P, Gauthier L.: Genome characterization, prevalence and distribution of a macula-like virus from *Apis mellifera* and *Varroa destructor*. *Viruses* 7:3586–3602, 2015.
 - 17) Wang, L, Lv X, Zhai Y, Fu S, Wang D, Rayner S, Tang Q, Liang G.: Genomic characterization of a novel virus of the family Tymoviridae isolated from mosquitoes. *PLoS ONE* 7:E39845, 2012.
 - 18) King AMQ, Lefkowitz EJ, Mushegian AR, Adams MJ, Dutilh BE, Gorbalenya AE, Harrach B, Harrison RL, Junglen S, Knowles NJ, Kropinski AM, Krupovic M, Kuhn JH, Nibert ML, Rubino L, Sabanadzovic S, Sanfacion H, Siddell SG, Simmonds P, Varsani A, Zerbini FM, Davison AJ.: Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol* 163:2601–26131, 2018.
 - 19) Morch MD, Boyer JC, Haenni AL.: Overlapping open reading frames revealed by complete nucleotide sequencing of turnip yellow mosaic virus genomic RNA. *Nucleic Acids Res* 16:6157–6173, 1988.
 - 20) Hammond RW, Ramirez P.: Molecular characterization of the genome of Maize rayado fino virus, the type member of the genus Marafivirus. *Virology* 282:338–347, 2001.
 - 21) Katsuma S, Kawamoto M, Shoji K, Aizawa T, Kiuchi T, Izumi N, Ogawa M, Mashiko T, Kawasaki H, Sugano S, Tomari Y, Suzuki Y, Iwanaga M.: Transcriptome profiling reveals infection strategy of an insect maculavirus. *DNA res* 25:277–286, 2018.
 - 22) Sabanadzovic S, Abou Ghanem N, Castellano MA, Digiario M, Martelli GP.: Grapevine fleck virus-like viruses in vitis. *Arch Virol* 145:553–565, 2000.
 - 23) 岩永将司. カイコ培養細胞へ持続感染する *Bombyx mori* macula-like virus (BmMLV). 蚕糸・昆虫バイオテック 81:139–148, 2012.
 - 24) Iwanaga M, Hitotsuyama T, Katsuma S, Ishihara G, Daimon T, Shimada T, Imanishi S, Kawasaki H.: Infection study of *Bombyx mori* macula-like virus (BmMLV) using a BmMLV-negative cell line and an infectious cDNA clone. *J Virol Methods* 179:316–324, 2012.
 - 25) 今西重雄, 岩永将司, 勝間進. RNA ウィルス BmMLV 陰性カイコ培養細胞株. 特許 5546107, 2008.
 - 26) Kato T, Kajikawa M, Maenaka K, Park EY.: Silkworm expression system as a platform technology in life science. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:459–470, 2010.
 - 27) 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* 123:34–37, 2014.
 - 28) 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* 229:24–26, 2016.
 - 29) 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* 52:265–270, 2016.
 - 30) Lery X, Fediere G, Taha A, Salah M, Giannotti J.: A new small RNA virus persistently infecting an established cell line of *Galleria mellonella*, induced by a heterologous infection. *J Invertebr Pathol* 69:7–13, 1997.
 - 31) Chen S, Cheng L, Zhang Q, Lin W, Lu X, Brannan J, Zhou ZH, Zhang J.: Genetic, biochemical, and structural characterization of a new densovirus isolated from a chronically infected *Aedes albopictus* C6/36 cell line. *Virology* 318:123–133, 2004.
 - 32) Attoui H, Mohd Jaafar F, Belhouchet M, Biagini P, Cantaloube JF, de Micco P, de Lamballerie X.: Expansion of family reoviridae to include nine-segmented dsRNA viruses: isolation and characterization of a new virus designated *Aedes pseudoscutellaris* reovirus assigned to a proposed genus (Dinovernavirus). *Virology* 343:212–223, 2005.
 - 33) Peterson AJ, Nuss DL.: Wound tumor virus polypeptide synthesis in productive noncytopathic infection of cultured insect vector cells. *J Virol* 56:620–624, 1985.
 - 34) Obbard DJ, Gordon KHJ, Buck AH, Jiggins FM.: The evolution of RNAi as a defence against viruses and

- transposable elements. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364:99–115, 2009.
- 35) Kobayashi H, Tomari, Y.: RISC assembly: Coordination between small RNAs and Argonaute proteins. *Biochem Biophys Acta* 1859:71–81, 2016.
- 36) Kiuchi T, Koga H, Kawamoto M, Shoji K, Sakai H, Arai Y, Ishihara G, Kawaoka S, Sugano S, Shimada T, Suzuki Y, Suzuki MG, Katsuma S. A single female-specific piRNA is the primary determiner of sex in the silkworm. *Nature* 509:633–636, 2014.
- 37) Izumi N, Shoji K, Sakaguchi Y, Honda S, Kirino Y, Suzuki T, Katsuma S, Tomari Y.: Identification and functional analysis of the pre-piRNA 3' Trimmer in silkworms. *Cell* 164:962–973, 2016.
- 38) Nie Z, Zhou F, Li D, Lv Z, Chen J, Liu Y, Shu J, Sheng Q, Yu W, Zhang W, Jiang C, Yao Y, Yao J, Jin Y, Zhang Y.: RIP-seq of BmAgo2-associated small RNAs reveal various types of small non-coding RNAs in the silkworm, *Bombyx mori*. *BMC Genomics* 14:661, 2013.
- 39) Zhu L, Li Z, Tatsuke T, Cheng D, Xu J, Yoshimura K, Mon H, Iiyama K, Lee JM, Xia Q, Kusakabe T.: Genome-wide identification of Argonaute 1- and Argonaute 2-regulating genes revealed an inhibition of macula-like virus by RNAi pathway in the silkworm, *Bombyx mori*. *J Insect Biotech Sericol* 82:19–23, 2013.
- 40) Stavroulakis DA, Kalogerakis N, Behie LA, Iatrou K.: Growth characteristics of a *Bombyx mori* insect cell line in stationary and suspension cultures. *Can J Chem* 69:457–464, 1991.
- 41) Santos D, Wynant N, Van den Brande S, Verdonck TW, Mingels L, Peeters P, Koliopoulou A, Swevers L, Vanden Broeck J.: Insights into RNAi-based antiviral immunity in Lepidoptera: acute and persistent infections in *Bombyx mori* and *Trichoplusia ni* cell lines. *Sci Rep* 8:2423, 2018.

Persistent virus in the silkworm cell lines: *Bombyx mori* latent virus

Masashi IWANAGA

Department of Agrobiological and Bioresources, School of Agriculture, Utsunomiya University,
Mine-machi 350, Utsunomiya-shi, Tochigi 321-8505, Japan

E-mail: iwanaga@cc.utsunomiya-u.ac.jp

Bombyx mori latent virus (BmLV) is a positive, single-stranded insect RNA virus with a close relationship to plant tymoviruses and currently classified as an “unclassified” tymovirus. BmLV is accumulated at extremely high levels only in cell lines derived from the silkworm, *Bombyx mori*, but it does not lead to lethality and establishes persistent infections. It was unknown whether BmLV affects the Baculovirus Expression Vector System using *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus, and how BmLV replicates and establishes persistent infections in insect cell lines. In this review, I introduce the discovery of BmLV, the establishment of virus-free cultured cells and the safety aspect of this virus. I also describe that two distinct small RNA-mediated pathways maintain the virus level in BmLV-infected cells, thereby allowing the virus to establish persistent infection. Virus-derived small interfering RNAs (vsiRNAs) and PIWI-interacting RNAs (vpiRNAs) are both produced as the BmLV infection progressed. We revealed that while siRNA pathway functions in both acute and persistent infection of BmLV, piRNA pathway functions only in the persistent infection of this virus.