

トピックス

1. 昆虫細胞の抗ウイルス応答

池田 素子

名古屋大学大学院生命農学研究科資源昆虫学研究室

1. はじめに

昆虫細胞における抗ウイルス応答の研究は、主にハエ目昆虫（ハエやカ）とチョウ目昆虫（チョウやガ）が進められている。ショウジョウバエやカを宿主とするウイルスはRNAゲノムをもつウイルスが圧倒的に多く、ハエ目昆虫ではRNAサイレンシングが関与する抗ウイルス応答についての研究が主流となっている^{1,2)}。最近では、真菌や細菌に対する免疫経路として知られているToll経路やImd経路、JAK/STAT経路などを通じて抗ウイルス応答を誘導していることが報告されてきているが、免疫経路によって誘導される遺伝子の同定や機能解析はあまり進んでいない^{3,4)}。一方、チョウ目昆虫では、主にバキュロウイルスに対する抗ウイルス応答についての研究が進められており、アポトーシス、全タンパク質合成停止、rRNA分解、ならびにRNAサイレンシングが抗ウイルス応答として報告されている⁵⁻¹⁰⁾ (図1)。

バキュロウイルスは、80~180 kbpの2本鎖環状DNAをゲノムとするエンベロープをもつ大型のウイルスで、核多角体病ウイルス (nucleopolyhedrovirus, NPV) と顆粒病ウイルス (granulovirus, GV) を含んでいる。このウイルスは昆虫を中心とする節足動物のみを宿主とする特異なウイルスで、相同のウイルスは節足動物以外の生物では見つかっていない^{6,11)}。一般には、真核細胞における外来遺伝子のタンパク質発現ベクターとして利用されているウイルスである¹²⁾。また、バキュロウイルスは、ほ乳動物細胞に侵入はするが増殖できないことや、自然免疫を誘発することを利用して、遺伝子治療のための遺伝子導入ベク

ターや^{13,14)}、ワクチンベクター¹⁵⁻¹⁹⁾への利用が検討されている。農業分野では、環境にやさしいウイルス農薬として様々なバキュロウイルスを素材とした農薬が開発されている^{20,21)}。一方、バキュロウイルスは、抗アポトーシス遺伝子*iap* (*inhibitor of apoptosis*) が最初に同定されたウイルスでもある。バキュロウイルスからはもう1つの抗アポトーシス遺伝子*p35*も見つけられており、この2つの遺伝子はアポトーシス関連研究者には馴染みの深い遺伝子としてアポトーシスの制御機構の解析によく利用されている。

本稿では、バキュロウイルス感染細胞における抗ウイルス応答について、著者らの研究成果を交えながら概説する。

2. アポトーシス

バキュロウイルス感染細胞におけるアポトーシスは、1991年に*p35* 遺伝子に欠損をもつ変異体 AcMNPV (Autographa californica multiple (M) NPV, ヤガ科の一種のMNPV) に感染したヨトウガの一種 (*Spodoptera frugiperda*) に由来するSf21細胞で示された²²⁾。その後、野生型NPVも特定の培養細胞においてはアポトーシスを誘導することが示された (表1)。さらに、増殖感染が成立するウイルス感染細胞でも、ウイルスゲノムがコードする抗アポトーシス遺伝子の*p35*や*iap*を欠損させるとアポトーシスが誘導され、ウイルス増殖が阻害されることから²³⁻²⁶⁾、バキュロウイルス感染細胞は、抗ウイルス応答としてごく一般的にアポトーシスを誘導していると考えられている。

2.1. バキュロウイルス感染細胞におけるアポトーシス誘導機構

バキュロウイルス感染細胞におけるアポトーシスは、ウイルスの細胞への吸着のみでは誘導されず、ウイルスが細胞内へ侵入して、ウイルス増殖を開始することによって誘導される²⁷⁾。感染細胞では、アポトーシスを特徴づける細胞膜のblebbingや、細胞のクロマチンDNAのヌクレオソームサイズへの断片化、エフェクターカスパーゼの活性化などがウイルスDNA合成の開始時期と一致することや²⁷⁾、ウイルスDNA合成に関与するウイルス遺伝子の発現をRNAiによってノックダウンするとアポトーシスが誘導さ

連絡先

〒464-8601

愛知県名古屋市千種区不老町1

名古屋大学大学院生命農学研究科

資源昆虫学研究室

TEL: 052-789-4040

E-mail: mochiko@agr.nagoya-u.ac.jp

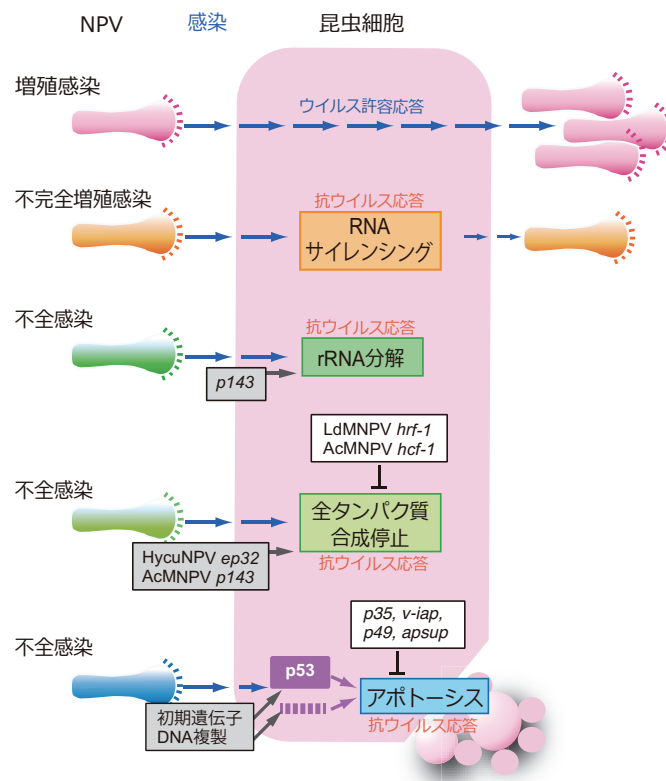


図1 核多角体病ウイルスの感染と昆虫培養細胞の抗ウイルス応答

NPVが感染した昆虫細胞では、抗ウイルス応答としてRNAサイレンシング、rRNA分解、全タンパク質合成停止、およびアポトーシスが誘導される。その結果、ウイルスの増殖が抑えられ、NPVは不完全増殖感染や不全感染となる。抗ウイルス応答の誘導と抑制にはたらくNPVの因子を示す。

れなくなることから^{28,29}、ウイルスDNAの合成開始、あるいはウイルスDNAの合成に関与するウイルスの遺伝子産物の発現によってアポトーシスの引き金が引かれると考えられている。遺伝子の一過性発現実験では、初期遺伝子産物であるIE1^{30,31}やP143³²によってアポトーシス誘導の引き金が引かれ、同じく初期遺伝子産物であるPE38によってアポトーシスが增強されることが報告されている³³。

Sf21細胞やSf9細胞にAcMNPVが感染すると、感染初期にDNA損傷応答(DNA damage response)が誘起されるが、DNA損傷応答はアポトーシス誘導には至らず、むしろウイルス増殖を促進していることが報告されている^{34,35}。

一方、AcMNPVが感染したSf21細胞では、ウイルスDNAの合成開始にともなって、細胞のIAPが急激に減少することが示された³⁶。細胞IAPは非感染細胞ではイニシエーターカスパーゼの活性化を阻止してアポトーシスの誘導を抑制しており³⁷、ウイルス感染によって細胞IAPが減少すると、カスパーゼ・カスケードが活性化し、感染細胞をアポトーシスへと誘導する。このことにより、細胞IAPはウイルス感染を感知するセンサーとして働いていると考えられている³⁶。キイロシヨウジョウバエでは、

*reaper*や*grim*、*hid*をはじめとするいくつかのIAPアンタゴニスト遺伝子の発現が増加し、細胞IAPタンパク質を分解することが示されている。チョウ目昆虫のカイコ(*Bombyx mori*)では*grim*と*hid*のオルソログは見つっていないが³⁸、*reaper*のオルソログとして*ibm1*(IAP-binding motif 1)遺伝子が同定されている。カイコ由来のBM-N細胞での一過性発現実験によって、IBM1タンパク質は*B. mori* IAP1(BmIAP1)に結合し、BmIAP1をユビキチン・プロテアソーム経路によって分解することによりアポトーシスを誘導することが示されている³⁹。BmNPV(*Bombyx mori* NPV, カイコNPV)が感染したBM-N細胞で、感染後2時間に*ibm1*遺伝子の発現が一過的に上昇することから、ウイルス感染の初期のアポトーシス誘導に関与していることが示唆されている⁴⁰。

ウイルス感染細胞がアポトーシスを誘導すると、イニシエーターカスパーゼ(initiator caspase)とエフェクターカスパーゼ(effector caspase)がプロセッシングを受けて活性化することがいくつかのNPV感染細胞で認められることから⁴¹⁻⁴³、NPV感染細胞におけるアポトーシスの実行にはカスパーゼが関与していると考えられる。*p35*遺伝

表 1. 野生型核多角体病ウイルス感染によってアポトーシスが誘導される昆虫培養細胞系

培養細胞系	昆 虫	核多角体病ウイルス ^{*1}	文 献
BM-5	<i>Bombyx mori</i>	AgNPV	120
CcE-1	<i>Chrysodeixis chalcites</i>	AcMNPV, AgMNPV, HearSNPV	121, 122
CF-203	<i>Choristoneura fumiferana</i>	AcMNPV	123
CLS-79	<i>Spodoptera littoralis</i>	SeMNPV	124
High Five	<i>Trichoplusia ni</i>	HaSNPV, HearSNPV NNG1	125, 未発表 ^{*2}
Hv-AM1	<i>Heliothis virescens</i>	BmNPV, SeMNPV	126
Hv-AM1	<i>Heliothis zea</i>	SeMNPV	127
Ld652Y	<i>Lymantria dispar</i>	BmNPV, HycuMNPV, SeMNPV, OpMNPV, SpltMNPV	26
SL2	<i>Spodoptera littoralis</i>	AcMNPV	128
SpIm	<i>Spilosoma imparilis</i>	SeMNPV	未発表
Splt hemocytes	<i>Spodoptera litura</i>	AcMNPV	129

*1 核多角体病ウイルス：AgMNPV, *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus (MNPV); AcMNPV, *Autographa californica* MNPV; BmNPV, *Bombyx mori* NPV; HearSNPV, *Helicoverpa armigera* single nucleopolyhedrovirus (SNPV); HycuMNPV, *Hyphantria cunea* MNPV; LdMNPV, *Lymantria dispar* MNPV; OpMNPV, *Orgyia pseudotsugata* MNPV; SeMNPV, *Spodoptera exigua* MNPV; SpltMNPV, *Spodoptera litura* MNPV.

*2 未発表：著者らの未発表結果。

子を欠損させた BmNPV に感染した BM-N 細胞では、がん抑制遺伝子 *p53* ホモログの産物がカスパーゼ・カスケードの上流でアポトーシスの誘導に関与することが示されているが⁴⁴⁾、AcMNPV 感染 Sf21 細胞では DNA 損傷応答によって *p53* タンパク質の著しい増加が認められるものの、*p53* タンパク質はアポトーシス誘導には関与しないと結論づけられている^{34,45)}。また、*Anagrapha falcifera* MNPV に感染したハスモンヨトウ (*Spodoptera litura*) 由来の SL-1 細胞において、アポトーシスの誘導にシトクローム c の関与が指摘されているが^{46,47)}、詳細な研究は進んでいない。

2.2. バキュロウイルスによるアポトーシス阻止機構

前述のように、バキュロウイルス感染細胞では一般にアポトーシスが誘導され、増殖感染はウイルスの抗アポトーシス因子がアポトーシスを抑制することによって成立していると考えられている。これまでに、バキュロウイルスがもつ抗アポトーシス遺伝子として、*p35*、*p49*^{48,49)}、*iap*^{50,51)}、*apsup*⁵²⁻⁵⁴⁾ が見出されている (図 2)。それぞれのバキュロウイルスはこれらのアポトーシス抑制因子のいずれかを用いてウイルス感染細胞が誘導したアポトーシスを抑制している。

P35：*p35* 遺伝子はバキュロウイルスで最初に発見された抗アポトーシス遺伝子である²²⁾。その後、*p35* 遺伝子のホモログが BmNPV や SpltMNPV (*Spodoptera litura* MNPV, ハスモンヨトウ MNPV) および TnMNPV (*Trichoplusia ni* MNPV, イラクサギンウワバ MNPV) など、合計 8 種のバ

キュロウイルスで見出されたが⁵⁵⁾、この遺伝子をコードしているバキュロウイルスは全体から見ればごく一部である。P35 タンパク質はエフェクターカスパーゼの活性を阻害する基質としてはたらいっている。すなわち、P35 タンパク質はエフェクターカスパーゼによって切断され、その切断断片がエフェクターカスパーゼの活性部位に不可逆的に結合するために、エフェクターカスパーゼの活性が阻害される⁵⁵⁾。

P49：*p49* 遺伝子は、*p35* 欠損 AcMNPV に感染した Sf9 細胞のアポトーシスを抑制するウイルス因子として、ヤガ科の一種 (*Spodoptera littoralis*) の NPV (SINPV) で発見された⁴⁸⁾。P49 は P35 と約 50% のアミノ酸配列同一性があるため、P35 のホモログとして扱われているが、P35 がエフェクターカスパーゼ活性のみを阻害するのに対して、P49 はエフェクターカスパーゼとイニシエーターカスパーゼの両活性を阻害する^{56,57)}。P49 は、P35 と同様、カスパーゼの活性を阻害する基質として機能している⁵⁷⁾。

IAP：IAP は *p35* 欠損 AcMNPV が感染した Sf21 細胞のアポトーシスを回避させるウイルス因子としてハマキガ科の一種 (*Cydia pomonella*) の GV (CpGV)⁵¹⁾ と OpMNPV (*Orgyia pseudotsugata* MNPV, ドクガ科の一種の MNPV) で発見された⁵⁰⁾。IAP タンパク質は、N 末端側に 1-3 個の BIR (baculoviral IAP repeat) ドメイン、C 末端側に 1 個の RING (really interesting new gene) ドメインをもっている。BIR は約 70 アミノ酸残基からなるドメインで、タンパク質とタンパク質との相互作用に関与しており、個々の BIR は異なる因子と結合することによってアポトー

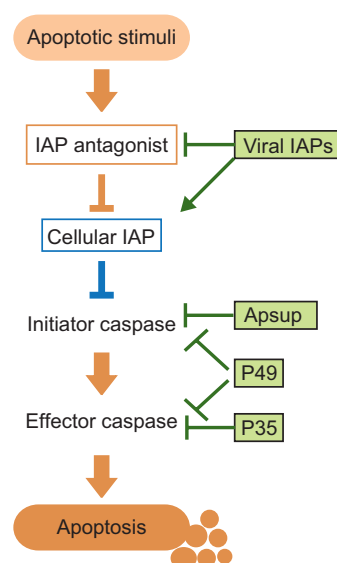


図2 バキュロウイルスのアポトーシス抑制因子

バキュロウイルスのアポトーシス抑制因子として、P35、P49、IAPおよびApsupが同定されている。昆虫細胞のアポトーシス誘導経路におけるそれぞれの作用点を示す。正常細胞では、細胞のIAPがinitiator caspaseの活性化を阻害することによりアポトーシスが抑制されている。アポトーシス誘導経路はオレンジで、抑制作用は青で示す。

シスを制御していると考えられている。RINGは40-60アミノ酸残基からなるドメインで、ユビキチンリガーゼ(E3)活性をもっており、プロテアソームを介したタンパク質の分解に関与していると考えられている。バキュロウイルスのIAPでは、BmNPV IAP2とOpMNPV IAP3がE3活性をもっていることが示されている^{58,59}。バキュロウイルスのIAPは、アミノ酸配列の相同性から、IAP1からIAP6の6つのグループに分類されており⁶⁰、それぞれのバキュロウイルスは異なるグループに属する1-4個のIAPをコードしている。同一グループのIAPを2個以上もっているバキュロウイルスは認められていないことから、バキュロウイルスは進化の過程でそれぞれのグループの*iap*遺伝子を独立して宿主昆虫から獲得したと考えられている⁶⁰。各ウイルスにおいてアポトーシスの抑制に与かるIAPはそのうちの1つであることがほとんどで、昆虫細胞のIAPとの相同性が最も高いIAP3である場合が多いが、ウイルスによってはIAP1やIAP2がアポトーシス抑制活性をもっている場合もある⁷。バキュロウイルスIAPのホモログは酵母からほ乳動物にいたる広範な生物に存在していて、ほ乳動物細胞のIAPはアポトーシスの抑制のみならず、多くは様々な細胞機能に関与するシグナル伝達物質として働いている^{61,62}。アポトーシス抑制に関与しないバキュロウイルスIAPについては、BmNPVのIAP2が正常なウイルス増殖に必要であることと⁶³、その機能発現にはBIRドメインとBIR様ドメインが貢献していることが報告されているのみである⁶⁴。一過性発現実験では、いくつかのNPVのIAP1とLdMNPV(Lymantria dispar MNPV、マイ

マイガMNPV)のIAP2とIAP3はアポトーシスを誘導することが報告されている^{65,66}。

昆虫細胞のIAPは、非感染細胞においてはホモ二量体を形成し、イニシエーターカスパーゼに結合して活性化を阻止することによりアポトーシスを抑制している。しかし、細胞IAPは、ウイルスのIAPと異なって、N末端側にタンパク質分解モチーフを含むリーダー配列をもっているために半減期が30分以下ときわめて不安定で^{67,68}、ウイルス感染によって誘導されたアポトーシスを抑制することはできない。一方、バキュロウイルスのIAPにはリーダー配列が存在せず、細胞内に安定に蓄積してアポトーシスを阻害することができる⁶⁸。しかし、バキュロウイルスのIAPはカスパーゼに直接結合することも、カスパーゼ活性を阻害することもできないため⁶⁹⁻⁷¹、バキュロウイルスIAPによるアポトーシス抑制のメカニズムは長らく不明であった。唯一、OpMNPVのIAP3(Op-IAP3)の機能解析から、キイロシヨウジョウバエのIAPアンタゴニストであるHIDと結合し、ユビキチン化することによって分解を誘導することによりアポトーシス誘導活性を抑制していることが示されていた⁵⁸。最近、Op-IAP3は、Sf21細胞の*S. frugiperda* IAP(SfIAP)とヘテロ二量体を形成してSfIAPを安定化することにより、アポトーシスを抑制していることが報告された^{68,72}。

Apsup：バキュロウイルスの最初の抗アポトシス遺伝子*p35*が発見されて20年後に、第4のバキュロウイルス抗アポトシス遺伝子*apsup*(*apoptosis suppressor*)がLdMNPVで発見された⁵³。最近になって、同じドクガ科のMNPV

表 2. 全タンパク質合成停止の関連遺伝子とウイルスの増殖

ウイルス ^{*1}	培養細胞系 ^{*2}	誘導因子	回避因子	ウイルス DNA合成	ウイルス 遺伝子転写	全タンパク質 合成停止	文 献
AcMNPV	Ld652Y	?	<i>hrf-1</i> ^{*3}	+	+	12 hpi ^{*4}	73-76
AcMNPV	BmN-4	<i>p143</i>		+	+	5 hpi	85
vAcΔhcf-1	Tn368		<i>hcf-1</i>	-	-	12~18 hpi	91, 130
HycuMNPV	BmN-4	<i>ep32</i>		+	-	8 hpi	93, 95

*1 AcMNPV, *Autographa californica* MNPV; vAc Δ *hcf-1*, *hcf-1* 遺伝子を欠損した AcMNPV; HycuMNPV, *Hyphantria cunea* MNPV.

*2 Ld652Y, *Lymantria dispar* 由来細胞; BmN-4, *Bombyx mori* 由来細胞; Tn368, *Trichoplusia ni* 由来細胞.

*3 *Lymantria dispar* MNPV (LdMNPV) がコードする遺伝子.

*4 hours post infection.

である *Lymantria xyliana* MNPV が *apsup* ホモログをコードしていることが明らかにされ、相同性検索により、20種のバキュロウイルスが *apsup* 相同体を保有していることが示されているが、いずれの相同体についても機能解析は充分に行われていない⁵²⁾。Apsup タンパク質は、エフェクターカスパーゼのプロセッシングを阻害し、カスパーゼの活性化を阻止することによってアポトーシスを抑制することが示されているが⁵⁴⁾、その機能を推察できるような特別なドメインは見出されていない。

3. 全タンパク質合成停止

バキュロウイルス感染にともなって、ウイルスのみならず感染細胞のタンパク質合成も停止させてウイルスの増殖を阻止する現象、いわゆる全タンパク質合成停止 (global protein synthesis shutdown) は、最初 AcMNPV に感染したマイマイガ (*Lymantria dispar*) 由来の Ld652Y 細胞で認められた (表 2)。その後、AcMNPV ならびに HycuMNPV (*Hyphantria cunea* MNPV, アメリカシロヒトリ MNPV) に感染したカイコ由来の BmN-4 細胞や、*hcf-1* (*host cell-specific factor 1*) 遺伝子を欠損した AcMNPV に感染したイラクサギンウワバ (*Trichoplusia ni*) 由来の Tn368 細胞においても全タンパク質合成停止が誘導されることが認められた⁸⁾。興味深いことに、これまでに明らかになっているこれらの全タンパク質合成停止のメカニズムはすべて異なっている。

3.1. AcMNPV 感染マイマイガ Ld652Y 細胞における全タンパク質合成停止

AcMNPV 感染 Ld652Y 細胞では、ウイルス DNA の合成ならびに細胞とウイルスの遺伝子の転写は継続して進行するが、感染後およそ 12 時間になると全翻訳停止が誘導される⁷³⁻⁷⁶⁾。全翻訳停止の誘導機構として、AcMNPV 感染 Ld652Y 細胞のライセートを用いた無細胞タンパク質合成実験により、ある種の tRNA の欠乏による可能性が報告された⁷⁷⁾。しかし、AcMNPV 感染 Ld652Y 細胞における

tRNA の欠乏がどのようなメカニズムで起こるかは不明である。全翻訳停止の直接の誘因は、現在のところ特定されていない。

機能欠損 *p35* をもつ AcMNPV (AcMNPV/Δ*p35*) に感染した Ld652Y 細胞では全翻訳停止ではなく、アポトーシスが誘導される。また、AcMNPV/Δ*p35* 感染 Ld652Y 細胞のアポトーシスを、P35 とは異なる作用点をもつ、NPV の抗アポトーシス因子 IAP (v-IAP) や P49 で抑制すると全翻訳停止となるが、ペプチドのカスパーゼ阻害剤ではアポトーシスのみではなく全翻訳停止も起きなくなる。これらのことから、全翻訳停止には P35 の積極的な関与が示唆されているが^{78,79)}、メカニズムの詳細は不明である。

一方、LdMNPV は AcMNPV 感染による Ld652Y 細胞の翻訳停止を回避させる遺伝子 *hrf-1* (*host range factor 1*) をコードしていることが明らかになった⁸⁰⁾。この遺伝子を AcMNPV に導入した組換えウイルスは Ld652Y 細胞において多量のウイルス粒子と包埋体を産生する⁷³⁾。また、AcMNPV は *hrf-1* 遺伝子をもつことによってマイマイガの幼虫でも致死感染するようになる⁸¹⁾。Hrf-1 タンパク質の機能を知るために詳細なドメイン解析が行われたが、Hrf-1 が翻訳停止を回避させるメカニズムについては明らかになっていない⁸²⁾。

Ld652Y 細胞はきわめて宿主特異性が高く、LdMNPV 以外ほとんどの NPV の増殖を許容しないが、興味深いことに、Ld652Y 細胞に前もって Hrf-1 を一過性発現させておくと、AcMNPV のみならず、本来増殖不可能な BmNPV や HycuMNPV、SeMNPV (*Spodoptera exigua* MNPV, シロイチモジヨトウ MNPV) が増殖するようになる⁸³⁾。また、*hrf-1* 遺伝子を導入した組換え HycuMNPV と BmNPV は実際に Ld652Y 細胞で増殖可能となる^{83,84)}。このことは、Ld652Y 細胞は独自の細胞特異的な抗ウイルス応答を発達させており、Hrf-1 は Ld652Y 細胞で特異的に機能して全翻訳停止を解除するウイルス因子であることを意味している。

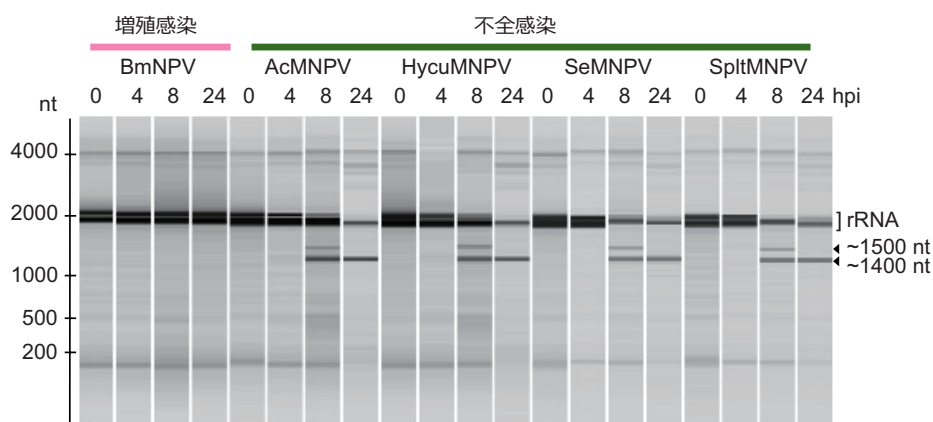


図3 各種 NPV 感染にともなう BM-N 細胞の rRNA 分解

BmNPV, AcMNPV, HycuMNPV, SeMNPV および SpltMNPV に感染した BM-N 細胞から、感染後 0, 4, 8, 24 時間に RNA を抽出し、MultiNA マイクロチップ電気泳動システム (Shimadzu) で解析した。正常な BM-N 細胞の rRNA をパネル右端の角括弧で示した。rRNA は、約 2000 ヌクレオチド (nt) 付近に 3 本のバンドとして泳動される (28S rRNA の “hidden break” により生じた 2 本のバンドと 18S rRNA の 1 本のバンド)。rRNA 分解の中間産物をパネル右端の矢尻で示した (約 1500 nt と 1400 nt)。RNA サイズマーカーをパネル左端に示した。Hamajima et al. (2013) を改変。

3.2. AcMNPV 感染カイコ BmN-4 細胞における全タンパク質合成停止

AcMNPV と BmNPV は、ゲノムの構成や含有する各遺伝子の塩基配列がよく似ているにもかかわらず、宿主域に重複が認められない。AcMNPV が BmNPV の宿主細胞である BmN-4 細胞に感染すると、感染後 12 時間頃までにウイルスと細胞のタンパク質合成がほぼ完全に停止する⁸⁵⁾。この場合も、感染細胞においてウイルス遺伝子は転写されることから、この全タンパク質合成停止は翻訳段階での停止である。この原因遺伝子として AcMNPV の *p143* (*ac-p143*) が特定された^{85,86)}。Ac-P143 は、1221 個のアミノ酸からなる比較的大きなタンパク質で、DNA ヘリカーゼ活性をもっており⁸⁷⁾、ウイルス DNA 合成に必須のウイルス因子であるが、このタンパク質の一部 (ScH 領域: アミノ酸 412-603) を BmNPV の P143 (Bm-P143) の相同部分と置換した P143 タンパク質を発現する AcMNPV は BmN-4 細胞でよく増殖するようになる⁸⁶⁾。その後、Ac-P143 の ScH 領域のアミノ酸の 1-3 個を Bm-P143 の相同部分のアミノ酸に置換することにより、AcMNPV の BmN-4 細胞での増殖が可能になることが報告されている⁸⁸⁻⁹⁰⁾。

3.3. *hcf-1* 欠損 AcMNPV 感染イラクサギンウワバ Tn368 細胞における全タンパク質合成停止

野生型の AcMNPV は Sf21 細胞でも Tn368 細胞でも増殖可能であるが、機能欠損した *hcf-1* (*host cell-specific factor 1*) をもつ AcMNPV (AcMNPV/ Δ *hcf-1*) は、Sf21 細胞では増殖するが、Tn368 細胞では全タンパク質合成停止を引き起こして増殖できない⁹¹⁾。AcMNPV/ Δ *hcf-1* 感染

Tn368 細胞では、ウイルス DNA の合成やウイルスの後期遺伝子の転写も起こらない。バキュロウイルス感染細胞では、ウイルス DNA の合成が開始しないと後期遺伝子の発現へは進まないことから、ウイルス DNA の合成が起こらないことがタンパク質合成停止の原因であると考えられる。*hcf-1* 遺伝子が Tn368 細胞におけるウイルス DNA 合成に関与していることは、*Hcf-1* を一過性発現させた Tn368 細胞では HycuMNPV や BmNPV, OpMNPV などのウイルス DNA の合成が可能になることから支持される⁹²⁾。さらに、*hcf-1* 遺伝子を導入した遺伝子組換え HycuMNPV は Tn368 細胞で増殖できるようになる⁹²⁾。

これらの結果は、前述の *Hrf-1* と同様、*Hcf-1* が細胞特異的に機能するウイルス因子であることを示している。*hcf-1* 遺伝子は AcMNPV と AcMNPV にごく近縁な数種の NPV 以外では認められていない⁸⁾。

3.4. HycuMNPV 感染カイコ BmN-4 細胞における全タンパク質合成停止

HycuMNPV が BmN-4 細胞に感染すると、ウイルス DNA は合成されるが感染 8 時間後には全タンパク質合成停止が誘導されて不全感染になる⁹³⁾。この HycuMNPV の不全感染は、BmN-4 細胞で増殖可能な BmNPV を共感染させても回復せず、逆に BmNPV の増殖が損なわれることから⁹³⁾、BmN-4 細胞では HycuMNPV 感染により BmNPV の増殖を許容しない状態が生じていることが考えられた。HycuMNPV のコスミド・ライブラリーを用いた遺伝子のスクリーニングにより、全タンパク質合成停止に関与している遺伝子が 1 つ特定された^{94,95)}。この遺伝子の

ホモログは OpMNPV に存在してすでに *ep32* (early protein 32) と命名されていたが⁹⁶⁾, その機能は不明であった。この遺伝子を欠損した HycuMNPV (HycuMNPV/ Δ ep32) と BmNPV を共感染させた BmN-4 細胞では、全タンパク質合成停止は誘導されず、BmNPV はよく増殖する⁹⁵⁾。HycuMNPV/ Δ ep32 は、野生型の HycuMNPV の宿主細胞として用いている SpIm (*Spilosoma imparilis*, クワゴマダラヒトリ) では野生型と同様によく増殖する。また、この HycuMNPV/ Δ ep32 を BmN-4 細胞や Sf9 細胞, Se301 細胞 (*Spodoptera exigua*, シロイジモジヨトウ), SpIm 細胞に感染させても、野生型 HycuMNPV を感染させた場合と異なるところは認められなかった(菅沼・池田, 未発表)。

さらに、HycuMNPV/ Δ ep32 を感染させた BM-N 細胞において、rRNA 分解が誘導されることが示された(Hamajima et al. 未発表)。このことから、Hycu-EP32 は、後述の BM-N 細胞における rRNA 分解には関与していないことが考えられた。*hycu-ep32* は初期遺伝子で、HycuMNPV と BmNPV を同時感染した BmN-4 細胞では、感染後 4 時間にはすでに十分量が発現し、BmNPV の増殖はウイルス DNA 複製以前の段階で停止する⁹⁵⁾。Hycu-EP32 は 312 アミノ酸からなる約 35.6 kDa のタンパク質で、コイルド・コイル・ドメイン (アミノ酸 122-149) をもち、感染細胞では核に局在する。しかし、データベース検索では特定の機能をもつ既知のモチーフやドメインを見出すことはできなかった。したがって Hycu-EP32 のウイルス増殖に果たす役割についての手がかりは得られていない。

4. rRNA 分解

AcMNPV に感染したカイコ由来 BmN 細胞では rRNA が急激に減少する⁹⁷⁾。その後、AcMNPV のみではなく、HycuMNPV や SeMNPV, SplitMNPV の感染によっても、BM-N 細胞の rRNA は約 1500 nt と 1400 nt の中間体を経て急激に分解することが明らかになり、rRNA 分解を引き起こす因子としてそれぞれのウイルスがコードしている P143 タンパク質が特定された^{28,98)} (図 3)。AcMNPV の P143 (Ac-P143) タンパク質について、rRNA 分解に関与するアミノ酸残基を探索したところ、Ac-P143 タンパク質を構成する 1221 個のアミノ酸のうち 6 個のアミノ酸残基が関与していることが明らかになり、これらのアミノ酸を BmNPV の P143 タンパク質の相同するアミノ酸に置換すると (H514N, T528V, V556L, S564N, F577L, および A599T), Ac-P143 タンパク質による BM-N 細胞の rRNA 分解能は消失する⁹⁹⁾。

AcMNPV 感染による BM-N 細胞の rRNA 分解は、ウイルス DNA の合成開始以前に引き金が引かれ¹⁰⁰⁾, かつ Ac-P143 タンパク質の一過性発現によって誘導されるアポトーシスをカスパーゼ阻害剤で阻止しても引き起こされる

ことから⁹⁸⁾, アポトーシス誘導の結果として起きる現象ではない。また、この rRNA の分解はカイコ由来のいくつかの細胞株とカイコの祖先型と考えられているクワコ (*Bombyx mandarina*) 由来の Boma-529b 細胞では認められるが、Sf9 細胞や Se301 細胞, SpIm 細胞, Ld652Y 細胞, S2 細胞 (*Drosophila melanogaster*, キイロショウジョウバエ), AnPe-428 細胞 (*Antheraea pernyi*, サクサン) では認められない^{98,101)}。BM-N 細胞と Boma-529b 細胞は BmNPV 以外の様々な NPV の P143 タンパク質を感知して全タンパク質合成停止を誘導するメカニズムを獲得し、BmNPV は全タンパク質合成停止の誘導を回避することができる P143 タンパク質を発達させたと考えられる。これらのことから、rRNA 分解はカイコとその近縁種が発達させたきわめて特異的な抗ウイルス応答であるといえる。

前述のように、AcMNPV の P143 タンパク質は BM-N 細胞における全タンパク質合成停止を誘導するが、rRNA 分解と全タンパク質合成停止に関与するシグナル伝達経路が未解明のため、rRNA 分解が全タンパク質合成停止の直接的な原因になっているか否かは不明である。

5. 小分子 RNA が関与する抗ウイルス応答

バキュロウイルス感染細胞における RNA サイレンシングを介した抗ウイルス応答については、バキュロウイルスが DNA ウイルスであることもあって暫く遅れ、2012 年に初めて報告された⁹⁾。HearSNPV (*Helicoverpa armigera* single (S) NPV, オオタバコガ SNPV) に感染したオオタバコガ幼虫において、HearSNPV の構造タンパク質遺伝子の open reading frame (ORF, 読み枠) や感染後期に発現する補助遺伝子 (auxiliary gene) の ORF にマッピングされる 16-26 nt の小分子 RNA が数多く検出された。siRNA (small interfering RNA, 小分子干渉 RNA) の産生に必須な *Dicer-2* 遺伝子¹⁰²⁾ を RNAi でサイレンシングしたオオタバコガ由来の細胞に HearSNPV が感染すると、感染細胞におけるウイルス DNA や特定のウイルスタンパク質の転写が増加する。miRNA (microRNA, マイクロ RNA) の産生に関与する *Dicer-1* のサイレンシングでは、このような現象は認められなかったことから、検出された小分子 RNA は、miRNA ではなく、v-siRNA (virus-derived small interfering RNA, ウイルス由来小分子 RNA) であることが確認された。また、AcMNPV 感染 Sf9 細胞においては、感染後 *Dicer-2* と、siRNA 経路においても 1 つの必須因子 *Argonaute 2* の転写レベルが上昇し、この 2 つの遺伝子を RNAi でサイレンシングするとウイルス DNA の合成と特定のウイルスタンパク質遺伝子の転写が上昇することが示された¹⁰⁾。これらの結果は、ウイルス感染細胞が抗ウイルス応答として積極的に v-siRNA を生産していることを示している。AcMNPV 感染 Sf9 細胞においては、ウイルス感染によって抗ウイルス応答として活性化された

細胞の RNAi 経路を、前述の抗アポトーシス因子 P35 が抑制することも明らかになっている¹⁰³⁾。興味深いことに、P35 タンパク質のこの機能はアポトーシス抑制機能とは独立の機能として稼働している。

miRNA は昆虫細胞にもバキュロウイルスにもコードされている。ウイルスにコードされている miRNA は、細胞の遺伝子やウイルス自身の遺伝子の発現を抑制することによって、ウイルス自身の増殖の最適化を図っている¹⁰⁴⁻¹⁰⁹⁾。一方、細胞由来の miRNA は、特定のウイルス遺伝子の発現を阻止して、ウイルス増殖を抑制することにより、抗ウイルス応答因子としての役割を果たしている。カイコの bmo-miR-8 は BmNPV の重要な初期遺伝子 *ie-1* を¹⁰⁶⁾、bmo-miR-390 は包埋体の形成に関係する *cg30* 遺伝子を標的として遺伝子発現を阻止する¹¹⁰⁾。また、Sf9 細胞では主要な miRNA の 1 つとして *bantam* が検出されている¹¹¹⁾。AcMNPV が Sf9 細胞やハスモンヨトウ幼虫に感染すると、感染にともなって *bantam* が著しく増加する¹¹²⁾。感染細胞や幼虫に *bantam* の相補鎖 RNA オリゴヌクレオチドを阻害剤として処理すると、いくつかのウイルス遺伝子の転写とウイルス DNA の合成が増加し、致死までの感染時間が短縮される。逆に、*bantam* と同じ配列の RNA オリゴヌクレオチドをミミックとして投与すると、いくつかのウイルス遺伝子の転写が減少する。これらの結果は、キイロシヨウジョウバエやカイコ、ハスモンヨトウなどの昆虫で一般的に認められる *bantam* が様々なウイルス遺伝子の発現を阻止してウイルス増殖を抑制していることを示している。カイコ細胞において増殖感染を示す BmNPV と不全感染となる AcMNPV を感染させると、感染細胞間で異なる種類の miRNA の発現誘導が認められることから、BmNPV 感染細胞で誘導される miRNA はウイルス増殖に適した細胞内環境を構築し、一方 AcMNPV 感染細胞に誘導される miRNA はウイルス増殖に適さない、複製を阻害する環境を構築していることが示唆されている¹¹³⁾。

6. おわりに

バキュロウイルスは、完全変態昆虫の出現と時をほぼ同じくして、およそ 3 億 1 千万年前に地球上に現れたと推定されている¹¹⁴⁾。したがって、バキュロウイルスと昆虫は、現在に至る長い歴史を、複雑かつ多様な相互関係を保ちつつ歩んできたことになる。とりわけ、抗ウイルス応答に関わる相互関係は、その成否がウイルスと昆虫の双方にとっての生き残りに直接関係することから、バキュロウイルスと昆虫との間には共進化に裏打ちされた絶え間のない熾烈な攻防が展開されてきたことが推察される。

本稿では、バキュロウイルス感染細胞で認められる、アポトーシス、全タンパク質合成停止、rRNA 分解、ならびに RNA サイレンシングの 4 種の細胞内抗ウイルス応答を概観した。バキュロウイルス感染によって発動されるこれ

らの抗ウイルス応答については、現象の記載にとどまっているものが多く、メカニズムの完全解明にはほど遠い状態であるが、これまでの研究からはきわめて多様な抗ウイルス応答戦略とそれに関わる細胞とウイルスの多彩な作用因子を垣間見ることができる。この多様性は、個別の昆虫種とウイルス種との間におけるきわめて特異性の高いものがほとんどである。ちなみに、バキュロウイルスのゲノムはおよそ 130-160 個の遺伝子をコードしており、バキュロウイルス全体では 900 種近い遺伝子が同定されている¹¹⁵⁾。そのほとんどはウイルス増殖に直接必要のない補助遺伝子であり、そこにはウイルスの系譜や種に特異的な多くの遺伝子が含まれている¹¹⁶⁾。また、このような特異的な遺伝子のなかには、今回バキュロウイルスがもつ抗アポトーシス遺伝子として紹介した *p35* や *iap*、*p49*、*apsup* などのように、宿主や他の生物から獲得したと考えられる遺伝子も多く含まれる¹¹⁷⁻¹¹⁹⁾。これらの補助遺伝子のいくつかは、細胞が発動する抗ウイルス応答を回避するために稼働して、重要な役割を果たしていることが考えられる。

昆虫は、多様化によって様々な環境によく適応し、その種数と個体数のいずれをとっても地球最大の生物群へと発展してきた。今後、昆虫とバキュロウイルスを用いた研究がさらに進展することにより、いっそう多様な抗ウイルス応答が見出されることが予想され、様々な生物とウイルスにおける抗ウイルス応答研究に新たな視点を提供することが期待される。

謝辞

本稿をまとめるにあたりご指導とご校閲をいただきました名古屋大学名誉教授小林迪弘先生に心から感謝申し上げます。また本稿の執筆の機会を与えて下さいました「ウイルス」編集委員長・長谷川秀樹先生に厚くお礼申し上げます。

利益相反開示について

本稿に関連し、開示すべき利益相反関係にある企業等はありません。

参考文献

- 1) Samuel GH, Adelman ZN, Myles KM (2018) Antiviral immunity and virus-mediated antagonism in disease vector mosquitoes. *Trends in Microbiology* 26, 447-461.
- 2) Xu J, Cherry S (2014) Viruses and antiviral immunity in *Drosophila*. *Developmental and Comparative Immunology* 42, 67-84.
- 3) Goto A, Okado K, Martins N, Cai H, Barbier V, Lamiable O, Troxler L, Santiago E, Kuhn L, Paik D, Silverman N, Holleufer A, Hartmann R, Liu J, Peng T, Hoffmann JA, Meignin C, Daeffler L, Imler JL (2018) The kinase IKKbeta regulates a STING- and NF-kappaB-

- dependent antiviral response pathway in *Drosophila*. *Immunity* 49, 225-234.e4.
- 4) Mussabekova A, Daeffler L, Imler JL (2017) Innate and intrinsic antiviral immunity in *Drosophila*. *Cellular and Molecular Life Sciences* 74, 2039-2054.
 - 5) Ikeda M, Yamada H, Hamajima R, Kobayashi M (2013) Baculovirus genes modulating intracellular innate antiviral immunity of lepidopteran insect cells. *Virology* 435, 1-13.
 - 6) Ikeda M, Hamajima R, Kobayashi M (2015) Baculoviruses: diversity, evolution and manipulation of insects. *Entomological Science* 18, 1-20.
 - 7) 池田素子・山田早人・小林迪弘 (2011) バキュロウイルス感染細胞におけるアポトーシス誘導とバキュロウイルスにおける抗アポトーシス応答. *蚕糸・昆虫バイオテック* 80, 181-192.
 - 8) 浜島りな・小林迪弘・池田素子 (2015) 核多角体病ウイルス感染細胞における抗ウイルス応答: 全タンパク質合成停止. *蚕糸・昆虫バイオテック* 84, 221-236.
 - 9) Jayachandran B, Hussain M, Asgari S (2012) RNA interference as a cellular defense mechanism against the DNA virus baculovirus. *Journal of Virology* 86, 13729-13734.
 - 10) Karamipoura N, Fathipoura Y, Talebia AA, Asgarib S, Mehrabadian M (2018) Small interfering RNA pathway contributes to antiviral immunity in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) cells following *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus infection. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 101, 24-31.
 - 11) 小林迪弘・池田素子・勝間進・姜媛瓊 (2007) バキュロウイルス概説—特集「展開するバキュロウイルス・バイオサイエンス」にあたって— . *蚕糸・昆虫バイオテック* 76, 107-114.
 - 12) Summers MD (2006) Milestones leading to the genetic engineering of baculoviruses as expression vector systems and viral pesticides. *Advances in Virus Research* 68, 3-73.
 - 13) Hu YC (2006) Baculovirus vectors for gene therapy. *Advances in Virus Research* 68, 287-320.
 - 14) Mansouri M, Berger P (2018) Baculovirus for gene delivery to mammalian cells: past, present and future. *Plasmid* 98, 1-7.
 - 15) 阿部隆之 (2012) ウイルス感染による宿主自然免疫応答の解析と感染制御への応用. *ウイルス* 62, 103-112.
 - 16) Abe T, Takahashi H, Hamazaki H, Miyano-Kurosaki N, Matsuura Y, Takaku H (2003) Baculovirus induces an innate immune response and confers protection from lethal influenza virus infection in mice. *Journal of Immunology* 171, 1133-1139.
 - 17) Gronowski AM, Hilbert DM, Sheehan KCF, Garotta G, Schreiber RD (1999) Baculovirus stimulates antiviral effects in mammalian cells. *Journal of Virology* 73, 9944-9951.
 - 18) Heinimäki S, Tamminen K, Malm M, Vesikari T, Blazevic V (2017) Live baculovirus acts as a strong B and T cell adjuvant for monomeric and oligomeric protein antigens. *Virology* 511, 114-122.
 - 19) Ono C, Okamoto T, Abe T, Matsuura Y (2018) Baculovirus as a tool for gene delivery and gene therapy. *Viruses* 10, 510.
 - 20) Haase S, Sciocco-Cap A, Romanowski V (2015) Baculovirus insecticides in Latin America: historical overview, current status and future perspectives. *Viruses* 7, 2230-2267.
 - 21) Lacey LA, Grzywacz D, Shapiro-Ilan DI, Frutos R, Brownbridge M, Goettel MS (2015) Insect pathogens as biological control agents: back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology* 132, 1-41.
 - 22) Clem RJ, Fechtmeier M, Miller LK (1991) Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science* 254, 1388-1390.
 - 23) Clarke TE, Clem RJ (2003) *In vivo* induction of apoptosis correlating with reduced infectivity during baculovirus infection. *Journal of Virology* 77, 2227-2232.
 - 24) Clem RJ, Miller LK (1993) Apoptosis reduces both the *in vitro* replication and the *in vivo* infectivity of a baculovirus. *Journal of Virology* 67, 3730-3738.
 - 25) Griffiths CM, Barnett AL, Ayres MD, Windass J, King LA, Possee RD (1999) *In vitro* host range of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus recombinants lacking functional *p35*, *iap1* or *iap2*. *Journal of General Virology* 80, 1055-1066.
 - 26) Ishikawa H, Ikeda M, Yanagimoto K, Alves CA, Katou Y, Lavina-Caoili BA, Kobayashi M (2003) Induction of apoptosis in an insect cell line, IPLB-Ld652Y, infected with nucleopolyhedroviruses. *Journal of General Virology* 84, 705-714.
 - 27) LaCount DJ, Friesen PD (1997) Role of early and late replication events in induction of apoptosis by baculoviruses. *Journal of Virology* 71, 1530-1537.
 - 28) Hamajima R, Saito A, Makino S, Kobayashi M, Ikeda M (2018) Antiviral immune responses of *Bombyx mori* cells during abortive infection with *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus. *Virus Research* 258, 28-38.
 - 29) Schultz KL, Friesen PD (2009) Baculovirus DNA replication-specific expression factors trigger apoptosis and shutoff of host protein synthesis during infection. *Journal of Virology* 83, 11123-11132.
 - 30) Prikhod'ko EA, Miller LK (1996) Induction of apoptosis by baculovirus transactivator IE1. *Journal of Virology* 70, 7116-7124.
 - 31) Schultz KL, Wetter JA, Fiore DC, Friesen PD (2009) Transactivator IE1 is required for baculovirus early replication events that trigger apoptosis in permissive and nonpermissive cells. *Journal of Virology* 83, 262-272.
 - 32) Hamajima R, Kobayashi M, Ikeda M (2017) P143 proteins from heterologous nucleopolyhedroviruses induce apoptosis in BM-N cells derived from the silkworm *Bombyx mori*. *Virus Research* 233, 70-76.
 - 33) Prikhod'ko EA, Miller LK (1999) The baculovirus PE38 protein augments apoptosis induced by transactivator IE1. *Journal of Virology* 73, 6691-6699.
 - 34) Huang N, Wu W, Yang K, Passarelli L, Rohrmann GF, Clem RJ (2011) Baculovirus infection induces a DNA damage response that is required for efficient viral replication. *Journal of Virology* 85, 12547-12556.

- 35) Mitchell JK, Friesen PD (2012) Baculoviruses modulate a proapoptotic DNA damage response to promote virus multiplication. *Journal of Virology* 86, 13542–13553.
- 36) Vandergaast R, Schultz KL, Cerio RJ, Friesen PD (2011) Active depletion of host cell inhibitor-of-apoptosis proteins triggers apoptosis upon baculovirus DNA replication. *Journal of Virology* 85, 8348–8358.
- 37) Hamajima R, Iwamoto A, Tomizaki M, Suganuma I, Kitaguchi K, Kobayashi M, Yamada H, Ikeda M (2016) Functional analysis of inhibitor of apoptosis 1 of the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 79, 97–107.
- 38) Zhang JY, Pan MH, Sun ZY, Huang SJ, Yu ZS, Liu D, Zhao DH, Lu C (2010) The genomic underpinnings of apoptosis in the silkworm, *Bombyx mori*. *BMC Genomics* 11, 611.
- 39) Bryant B, Zhang Y, Zhang C, Santos CP, Clem RJ, Zhou L (2009) A lepidopteran orthologue of reaper reveals functional conservation and evolution of IAP antagonists. *Insect Molecular Biology* 18, 341–351.
- 40) Wu Y, Wu Y, Hui T, Wu H, Wu Y, Wang W (2013) Reaper homologue IBM1 in silkworm *Bombyx mori* induces apoptosis upon baculovirus infection. *FEBS Letters* 587, 600–606.
- 41) Huang N, Covicristov S, Hawkins CJ, Clem RJ (2013) Sfdronc, an initiator caspase involved in apoptosis in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 43, 444–454.
- 42) Suganuma I, Ushiyama T, Yamada H, Iwamoto A, Kobayashi M, Ikeda M (2011) Cloning and characterization of a *dronc* homologue in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 43, 444–454.
- 43) Kitaguchi K, Hamajima R, Yamada H, Kobayashi M, Ikeda M (2013) Cloning and functional characterization of the *Lymantria dispar* initiator caspase *dronc*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 436, 331–337.
- 44) Makino S, Hamajima R, Saito A, Tomizaki M, Iwamoto A, Kobayashi M, Yamada H, Ikeda M (2018) *Bombyx mori* homolog of tumor suppressor p53 is involved in apoptosis-mediated antiviral immunity of *B. mori* cells infected with nucleopolyhedrovirus. *Developmental and Comparative Immunology* 84, 133–141.
- 45) Huang N, Clem RJ, Rohrmann GF (2011) Characterization of cDNAs encoding p53 of *Bombyx mori* and *Spodoptera frugiperda*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 41, 613–619.
- 46) Liu L, Peng J, Liu K, Yang H, Li Y, Hong H (2007) Influence of cytochrome c on apoptosis induced by *Anagrapha (Syngrapha) falcifera* multiple nuclear polyhedrosis virus (AfMNPV) in insect *Spodoptera litura* cells. *Cell Biology International* 31, 996–1001.
- 47) Liu K, Shu D, Song N, Gai Z, Yuan Y, Li J, Li M, Guo S, Peng J, Hong H (2012) The role of cytochrome c on apoptosis induced by *Anagrapha falcifera* multiple nuclear polyhedrosis virus in insect *Spodoptera litura* cells. *PLoS One* 7, e40877.
- 48) Du Q, Lehavi D, Faktor O, Qi Y, Chejanovsky N (1999) Isolation of an apoptosis suppressor gene of the *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus. *Journal of Virology* 73, 1278–1285.
- 49) Pei Z, Reske G, Huang Q, Hammock BD, Qi Y, Chejanovsky N (2002) Characterization of the apoptosis suppressor protein P49 from the *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus. *Journal of Biological Chemistry* 277, 48677–48684.
- 50) Birnbaum MJ, Clem RJ, Miller LK (1994) An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *Journal of Virology* 68, 2521–2528.
- 51) Crook NE, Clem RJ, Miller LK (1993) An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *Journal of Virology* 67, 2168–2174.
- 52) Chang JC, Chang ZT, Huang YF, Lee SJ, Kim JS, Nai YS (2018) Characterization and functional assay of apsup (Lyxy105) from *Lymantria xyliina* multiple nucleopolyhedrovirus (LyxyMNPV). *Virus Genes* 54, 578–586.
- 53) Yamada H, Shibuya M, Kobayashi M, Ikeda M (2011) Identification of a novel apoptosis suppressor gene from the baculovirus *Lymantria dispar* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *Journal of Virology* 85, 5237–5242.
- 54) Yamada H, Kitaguchi K, Hamajima R, Kobayashi M, Ikeda M (2013) Novel apoptosis suppressor Apsup from the baculovirus *Lymantria dispar* multiple nucleopolyhedrovirus precludes apoptosis by preventing proteolytic processing of initiator caspase *dronc*. *Journal of Virology* 87, 12925–12934.
- 55) Clem RJ (2007) Baculoviruses and apoptosis: a diversity of genes and responses. *Current Drug Targets* 8, 1069–1074.
- 56) Jabbour AM, Ekert PG, Coulson EJ, Knight MJ, Ashley DM, Hawkins CJ (2002) The p35 relative, p49, inhibits mammalian and *Drosophila* caspases including DRONC and protects against apoptosis. *Cell Death and Differentiation* 9, 1311–1320.
- 57) Zoog SJ, Schiller JJ, Wetter JA, Chejanovsky N, Friesen PD (2002) Baculovirus apoptotic suppressor P49 is a substrate inhibitor of initiator caspases resistant to P35 *in vivo*. *EMBO Journal* 21, 5130–5140.
- 58) Green MC, Monser KP, Clem RJ (2004) Ubiquitin protein ligase activity of the anti-apoptotic baculovirus protein Op-IAP3. *Virus Research* 105, 89–96.
- 59) Imai N, Matsuda N, Tanaka K, Nakano A, Matsumoto S, Kang W (2003) Ubiquitin ligase activities of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus RING finger proteins. *Journal of Virology* 77, 923–930.
- 60) Clem RJ (2015) Viral IAPs, then and now. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 39, 72–79.
- 61) Srinivasula SM, Ashwell JD (2008) IAPs: what's in a name? *Molecular Cell* 30, 123–135.
- 62) Fulda S (2014) Regulation of cell migration, invasion and metastasis by IAP proteins and their antagonists. *Oncogene* 33, 671–676.
- 63) Ono C, Kamagata T, Taka H, Sahara K, Asano S,

- Bando H (2012) Phenotypic grouping of 141 BmNPVs lacking viral gene sequences. *Virus Research* 165, 197–206.
- 64) Ito H, Bando H, Shimada T, Katsuma S (2014) The BIR and BIR-like domains of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus IAP2 protein are required for efficient viral propagation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 454, 581–587.
 - 65) Ikeda M, Yamada H, Ito H, Kobayashi M (2011) Baculovirus IAP1 induces caspase-dependent apoptosis in insect cells. *Journal of General Virology* 92, 2654–2663.
 - 66) Yamada H, Shibuya M, Kobayashi M, 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.
 - 67) Cerio RJ, Vandergaast R, Friesen PD (2010) Host insect inhibitor-of-apoptosis SfiIAP functionally replaces baculovirus IAP but is differentially regulated by its N-terminal leader. *Journal of Virology* 84, 11448–11460.
 - 68) Vandergaast R, Mitchell JK, Byers NM, Friesen PD (2015) Insect inhibitor-of-apoptosis (IAP) proteins are negatively regulated by signal-induced N-terminal degrons absent within viral IAP proteins. *Journal of Virology* 89, 4481–4493.
 - 69) Tenev T, Ditzel M, Zachariou A, Meier P (2007) The antiapoptotic activity of insect IAPs requires activation by an evolutionarily conserved mechanism. *Cell Death and Differentiation* 14, 1191–1201.
 - 70) Wilkinson JC, Wilkinson AS, Scott FL, Csomos RA, Salvesen GS, Duckett CS (2004) Neutralization of Smac/Diablo by inhibitors of apoptosis (IAPs). A caspase-independent mechanism for apoptotic inhibition. *Journal of Biological Chemistry* 279, 51082–51090.
 - 71) Wright CW, Means JC, Penabaz T, Clem RJ (2005) The baculovirus anti-apoptotic protein Op-IAP does not inhibit *Drosophila* caspases or apoptosis in *Drosophila* S2 cells and instead sensitizes S2 cells to virus-induced apoptosis. *Virology* 335, 61–71.
 - 72) Byers NM, Vandergaast RL, Friesen PD (2016) Baculovirus inhibitor-of-apoptosis Op-IAP3 blocks apoptosis by interaction with and stabilization of a host insect cellular IAP. *Journal of Virology* 90, 533–544.
 - 73) Du X, Thiem SM (1997) Characterization of host range factor 1 (*hrf-1*) expression in *Lymantria dispar* M nucleopolyhedrovirus- and recombinant *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus-infected IPLB-Ld652Y cells. *Virology* 227, 420–430.
 - 74) Guzo D, Dougherty EM, Lynn DE, Braun SK, Weiner RM (1991) Changes in macromolecular synthesis of gypsy moth cell line IPLB-Ld652Y induced by *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus infection. *Journal of General Virology* 72, 1021–1029.
 - 75) Guzo D, Rathburn H, Guthrie K, Dougherty E (1992) Viral and host cellular transcription in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus-infected gypsy moth cell lines. *Journal of Virology* 66, 2966–2972.
 - 76) McClintock JT, Dougherty EM, Weiner RM (1986) Semipermissive replication of a nuclear polyhedrosis virus of *Autographa californica* in a gypsy moth cell line. *Journal of Virology* 57, 197–204.
 - 77) Mazzacano CA, Du X, Thiem SM (1999) Global protein synthesis shutdown in *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected Ld652Y cells is rescued by tRNA from uninfected cells. *Virology* 26, 222–231.
 - 78) Du X, Thiem SM (1997) Responses of insect cells to baculovirus infection: protein synthesis shutdown and apoptosis. *Journal of Virology* 71, 7866–7872.
 - 79) Thiem SM, Chejanovsky N (2004) The role of baculovirus apoptotic suppressors in AcMNPV-mediated translation arrest in Ld652Y cells. *Virology* 319, 292–305.
 - 80) Thiem SM, Du X, Quentin ME, Berner MM (1996) Identification of baculovirus gene that promotes *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus replication in a nonpermissive insect cell line. *Journal of Virology* 70, 2221–2229.
 - 81) Chen CJ, Quentin ME, Brennan LA, Kukel C, Thiem SM (1998) *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus *hrf-1* expands the larval host range of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. *Journal of Virology* 72, 2526–2531.
 - 82) Ikeda M, Reimbold EA, Thiem SM (2005) Functional analysis of the baculovirus host range gene, *hrf-1*. *Virology* 332, 602–613.
 - 83) Ishikawa H, Ikeda M, Felipe Alves CA, Thiem SM, Kobayashi M (2004) Host range factor 1 from *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus (NPV) is an essential viral factor required for productive infection of NPVs in IPLB-LD652Y cells derived from *L. dispar*. *Journal of Virology* 78, 12703–12708.
 - 84) Ishikawa H, Ogasawara T, Ikeda M, Kobayashi M (2006) A recombinant *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus possessing *hrf-1* gene replicates in nonpermissive *Lymantria dispar* IPLB-Ld652Y cell line. *Journal of Insect Biotechnology and Sericology* 75, 31–38.
 - 85) Kamita SG, Maeda S (1993) Inhibition of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus (NPV) replication by the putative DNA helicase gene of *Autographa californica* NPV. *Journal of Virology* 67, 6239–6245.
 - 86) Maeda S, Kamita SG, Kondo A (1993) Host range expansion of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (NPV) following recombination of a 0.6-kilobase-pair DNA fragment originating from *Bombyx mori* NPV. *Journal of Virology* 67, 6234–6238.
 - 87) McDougal VV, Guarino LA (2000) The *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus *p143* gene encodes a DNA helicase. *Journal of Virology* 74, 5273–5279.
 - 88) Argaud O, Croizier L, Lopez-Ferber M, Croizier G (1998) Two key mutations in the host-range specificity domain of the *p143* gene of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus are required to kill *Bombyx mori* larvae. *Journal of General Virology* 79, 931–935.
 - 89) Croizier G, Croizier L, Argaud O, Poudevigne D (1994) Extension of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus host range by interspecific replacement of a short DNA sequence in the *p143* helicase gene.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91, 48–52.
- 90) Kamita SG, Maeda S (1997) Sequencing of the putative DNA helicase-encoding gene of the *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus and fine-mapping of a region involved in host range expansion. *Gene* 190, 173–179.
 - 91) Lu A, Miller LK (1996) Species-specific effects of the *hcf-1* gene on baculovirus virulence. *Journal of Virology* 70, 5123–5130.
 - 92) Tachibana A, Hamajima R, Tomizaki M, Kondo T, Nanba Y, Kobayashi M, Yamada H, Ikeda M (2017) HCF-1 encoded by baculovirus AcMNPV is required for productive nucleopolyhedrovirus infection of non-permissive Tn368 cells. *Scientific Reports* 7, 3807.
 - 93) Shirata N, Ikeda M, Kamiya K, Kawamura S, Kobayashi M (2004) Restriction of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (NPV) replication by *Hyphantria cunea* NPV in a cell line from *B. mori*. *Journal of Insect Biotechnology and Sericulture* 73, 23–33.
 - 94) Ikeda M, Shikata M, Shirata N, Chaeychomsri S, Kobayashi M (2006) Gene organization and complete sequence of the *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology* 87, 2549–2562.
 - 95) Shirata N, Ikeda M, Kobayashi M (2010) Identification of a *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus (NPV) gene that is involved in global protein synthesis shutdown and restricted *Bombyx mori* NPV multiplication in a *B. mori* cell line. *Virology* 398, 149–157.
 - 96) Ahrens CH, Russell RL, Funk CJ, Evans JT, Harwood SH, Rohrmann GF (1997) The sequence of the *Orgyia pseudotsugata* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus genome. *Virology* 229, 381–399.
 - 97) Fujita R, Asano S, Sahara K, Bando H (2005) Marked decrease of ribosomal RNA in BmN cells infected with AcMNPV. *Journal of Insect Biotechnology and Sericulture* 74, 125–128.
 - 98) Hamajima R, Ito Y, Ichikawa H, Mitsutake H, Kobayashi J, Kobayashi M, Ikeda M (2013) Degradation of rRNA in BM-N cells from the silkworm *Bombyx mori* during abortive infection with heterologous nucleopolyhedroviruses. *Journal of General Virology* 94, 2102–2111.
 - 99) Hamajima R, Kobayashi M, Ikeda M (2015) Identification of amino acid residues of AcMNPV P143 protein involved in rRNA degradation and restricted viral replication in BM-N cells from the silkworm *Bombyx mori*. *Virology* 485, 244–251.
 - 100) Hamajima R, Kobayashi M, Ikeda M (2014) *p143*-mediated rRNA degradation in AcMNPV-infected BM-N cells is not associated with viral DNA replication. *Journal of Insect Biotechnology and Sericulture* 83, 19–23.
 - 101) Hamajima R, Yasunaga-Aoki C, Iwanaga M, Imanishi S, Kobayashi J, Sasaki K, Kusakabe T, Lee JH, Mon H, Kobayashi M, Ikeda M (2016) rRNA degradation in *Bombyx mori* and *Bombyx mandarina* cells infected with heterologous nucleopolyhedroviruses. *Journal of Insect Biotechnology and Sericulture* 85, 73–77.
 - 102) Zhou R, Rana TM (2013) RNA-based mechanisms regulating host-virus interactions. *Immunological Reviews* 253, 97–111.
 - 103) Mehrabadi M, Hussain M, Matindoost L, Asgari S (2015) The baculovirus antiapoptotic p35 protein functions as an inhibitor of the host RNA interference antiviral response. *Journal of Virology* 89, 8182–8193.
 - 104) Kharbada N, Jalali SK, Ojha R, Bhatnagar RK (2015) Temporal expression profiling of novel *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus-encoded microRNAs upon infection of Sf21 cells. *Journal of General Virology* 96, 688–700.
 - 105) Singh J, Singh CP, Bhavani A, Nagaraju J (2010) Discovering microRNAs from *Bombyx mori* nucleopolyhedrosis virus. *Virology* 407, 120–128.
 - 106) Singh CP, Singh J, Nagaraju J (2012) A baculovirus-encoded miRNA suppresses its host miRNAs biogenesis by regulating the Exportin-5 co-factor Ran. *Journal of Virology* 86, 7867–7879.
 - 107) Singh CP, Singh J, Nagaraju J (2014) *bmnpv-miR-3* facilitates BmNPV infection by modulating the expression of viral P6.9 and other late genes in *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 49, 59–69.
 - 108) Zhu M, Wang J, Deng R, Xiong P, Liang H, Wang X (2013) A microRNA encoded by *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus regulates expression of viral gene ODV-E25. *Journal of Virology* 87, 13029–13034.
 - 109) Zhu M, Wang J, Deng R, Wang X (2016) Functional regulation of an *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-encoded microRNA, AcMNPV-miR-1, in baculovirus replication. *Journal of Virology* 90, 6526–6537.
 - 110) Kang L, Wang M, Cao X, Tang S, Xia D, Shen X, Zhao Q (2018) Inhibition of expression of BmNPV *cg30* by *bmo-miRNA-390* is a host response to baculovirus invasion. *Archives of Virology* 163, 2719–2725.
 - 111) Mehrabadi M, Hussain M, Asgari S (2013) MicroRNAome of *Spodoptera frugiperda* cells (Sf9) and its alteration following baculovirus infection. *Journal of General Virology* 94, 1385–1397.
 - 112) Shi X, Ran Z, Li S, Yin J, Zhong J (2016) The effect of microRNA *bantam* on baculovirus AcMNPV infection *in vitro* and *in vivo*. *Viruses* 8, 136.
 - 113) Chen YW, Wu CP, Wu TC, Wu YL (2018) Analyses of the transcriptome of *Bombyx mori* cells infected with either BmNPV or AcMNPV. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 21, 37–45.
 - 114) Thézé J, Bézier A, Periquet G, Drezen JM, Herniou EA (2011) Paleozoic origin of insect large dsDNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 15931–15935.
 - 115) Miele SA, Garavaglia MJ, Belaich MN, Ghiringhelli PD (2011) Baculovirus: molecular insights on their diversity and conservation. *International Journal of Evolutionary Biology* 2011, 379424.
 - 116) van Oers MM, Vlak JM (2007) Baculovirus genomics. *Current Drug Targets* 8, 1051–1068.
 - 117) Hughes AL (2002) Evolution of inhibitors of apoptosis in baculoviruses and their insect hosts. *Infection*,

- Genetics and Evolution 2, 3–10.
- 118) Hughes AL, Friedman R (2003) Genome-wide survey for genes horizontally transferred from cellular organisms to baculoviruses. *Molecular Biology and Evolution* 20, 979–987.
 - 119) Katsuma S, Kawaoka S, Mita K, Shimada T (2008) Genome-wide survey for baculoviral host homologs using the *Bombyx* genome sequence. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38, 1080–1086.
 - 120) Castro ME, Souza ML, Araujo S, Bilimoria SL (1997) Replication of *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus in four lepidopteran cell lines. *Journal of Invertebrate Pathology* 69, 40–45.
 - 121) Xu F, Lynn DE, Roode EC, Munoz D, van Lent JW, Vlaskovic JM, van Oers MM (2010) Establishment of a cell line from *Chrysodeixis chalcites* permissive for *Chrysodeixis chalcites* and *Trichoplusia ni* nucleopolyhedrovirus. *Journal of Invertebrate Pathology* 105, 56–62.
 - 122) Morgado FDS, Ardisson-Araujo DMP, Ribeiro BM (2017) Real-time expression analysis of selected *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus gene promoters during infection of permissive, semi-permissive and nonpermissive cell lines. *Viruses* 9, 132.
 - 123) Palli SR, Caputo GF, Sohi SS, Brownwright AJ, Ladd TR, Cook BJ, Primavera M, Arif BM, Retnakaran A (1996) CfMNPV blocks AcMNPV-induced apoptosis in a continuous midgut cell line. *Virology* 222, 201–213.
 - 124) Yanase T, Yasunaga C, Kawarabata T (1998) Replication of *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus in permissive and non-permissive lepidopteran cell lines. *Acta Virologica* 42, 293–298.
 - 125) Dai X, Shi X, Pang Y, Su D (1999) Prevention of baculovirus-induced apoptosis of BTI-Tn-5B1-4 (Hi5) cells by the *p35* gene of *Trichoplusia ni* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology* 80, 1841–1845.
 - 126) Ogembo JG, Chaeychomsri S, Caoili LB, Ikeda M, Kobayashi M (2008) Susceptibility of the cell line Hv-AM1 from *Heliothis virescens* to eight selected nucleopolyhedroviruses. *Journal of Insect Biotechnology and Sericulture* 77, 141–150.
 - 127) Ogembo JG, Chaeychomsri S, Caoili LB, Ikeda M, Kobayashi M (2008) Susceptibility of newly established cell lines from *Helicoverpa armigera* to homologous and heterologous nucleopolyhedroviruses. *Journal of Insect Biotechnology and Sericulture* 77, 25–34.
 - 128) Chejanovsky N, Gershburg E (1995) The wild-type *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus induces apoptosis of *Spodoptera littoralis* cells. *Virology* 209, 519–525.
 - 129) Zhang P, Yang K, Dai X, Pang Y, Su D (2002) Infection of wild-type *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus induces *in vivo* apoptosis of *Spodoptera litura* larvae. *Journal of General Virology* 83, 3003–3011.
 - 130) Lu A, Miller LK (1995) Differential requirements for baculovirus late expression factor genes in two cell lines. *Journal of Virology* 77, 2227–2232.

