昆虫培養細胞における核多角体病ウイルスの種特異性に関する研究

II. トランスフェクションによるウイルス DNA の感染

津田勝男¹⁾・水城英一²⁾・河原畑勇・鮎沢啓夫

九州大学農学部

Infectivity of Nuclear Polyhedrosis Virus in Continuous Cell Cultures. I. Transfection with Virus DNA to Permissive and Nonpermissive Cells. Katsuo TSUDA,³⁾ Eiichi MIZUKI,⁴⁾ Takeshi KAWARABATA and Keio AIZAWA (Institute of Biological Control, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812, Japan). *Jpn. J. Appl. Ent. Zool.* **34**: 303–308 (1990)

Transfection with *Xestia c-nigrum* NPV DNA produced plaques on both permissive *Spodoptera frugiperda* (1,153 PFU/ μ g DNA) and S. P. C. Bm36 cells (QUIOT, 1982: 1,236 PFU/ μ g DNA) employing the calcium phosphate precipitation technique. Nonpermissive *Mamestra brassicae* cells were not transfected with *X. c-nigrum* NPV DNA. *B. mori* NPV DNA was only infectious to S. P. C. Bm 36 cells (454 PFU/ μ g DNA) and was not infectious to nonpermissive *S. frugiperda* and *M. brassicae* cells by transfection. The *in vitro* host range of the infectious DNA paralleled that of NOV.

緒 言

核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus: 以下 NPV) は、昆虫類および甲殻類を宿主とする無脊椎動物に特有なウイルスである。これまで 300 種以上の NPV が、主として鱗翅目昆虫から分離されている (MARTIGNONI and IWAI, 1981) が、大部分の NPV の宿主特異性および宿主範囲に関しては、十分な知見が得られていない。また、一般に宿主昆虫から分離される NPV の多くは、遺伝的に相同でないウイルス粒子の集団で構成されていると考えられている。したがって、NPV の種間差異、種の変異、感染と増殖、宿主範囲および病原性などの問題は、遺伝子型が相同な純系 (ウイルスクローン) の NPV 間で検討する必要がある。

昆虫培養細胞と NPV の *in vitro* の実験系では、宿主昆虫の影響を排除できるため、実験条件を比較的均一に調整できる利点があり、細胞とウイルスだけの相互関係について検討することができる。また、ブラック形成が可能な系では、ブラック純化によるクローニングおよびブラック検定によるウイルス定量に利用価値が高い。

シロモンヤガ *Xestia c-nigrum* NPV は、ヨトウムシ類に広い宿主範囲と強い病原性を持ち、さらに、昆虫培養細胞にも広い宿主範囲を持っている。一方、カイコ *Bombyx mori* NPV は、昆虫および昆虫培養細胞に対して特異性が高い。しかし、その特異性の発現については、第 1 報 (津田ら, 1990) で報告したとおり、*B. mori* NPV は非許容性細胞に対して、まったく吸着しない場合と吸着後の過程で感染が起こらない場合があることが示唆された。本研究では、昆虫培養細胞と NPV の系で、ウイルス感染の第一段階と考えられるウイルス粒子の細胞への吸着の段階を省略し、ウイルス DNA をトランスフェクションすることにより、NPV のビリオンと NPV DNA の感染性の差異を検討した。

なお、本文に入るに先立ち、貴重なウイルス試料を分譲していただき、数々のご助言を賜った現北海道農業試験場・岡田齊夫博士に厚く御礼申し上げる。また、昆虫培養細胞およびウイルスの取扱については現蚕糸・昆虫農業技術研究所・佐藤威博士に、また、ウイルス DNA の扱いについては現佐賀大学農学部神田康三博士に有益なご助言を賜った。紙面を借りて厚く御礼申し上げます。

1) 現在 福岡県農業総合試験場生産環境研究所

2) 現在 福岡県工業技術センター材料開発研究所

3) Present address: Institute of Agro-Environmental Science, Fukuoka Agricultural Research Center, Chikushino, Fukuoka 818, Japan.

4) Present address: Material Research Institute, Fukuoka Industrial Technology Center, Yame, Fukuoka 834, Japan.

1990 年 4 月 8 日受領 (Received April 8, 1990)

1990 年 7 月 13 日登載決定 (Accepted July 13, 1990)

材料および方法

1. 昆虫培養細胞および細胞培養

ツマジロクサヨトウ *Spodoptera frugiperda* 細胞系 IPLB-SF-21AE II 細胞, カイコ *B. mori* 細胞系と称する S. P. C. Bm 36 細胞 (QUIOT, 1982) およびヨトウガ *Mamestra brassicae* 細胞系 NIAS-Mb-32 細胞は, 第 1 報 (津田ら, 1990) と同じ方法で培養した。

2. ウイルス

ウイルスは第 1 報でクローニングした *X. c-nigrum* NPV T-3 株および *B. mori* NPV K-4 株をそれぞれ *S. frugiperda* 細胞および S. P. C. Bm 36 細胞で増殖させた。

3. nonoccluded virus の精製

接種 4 日後の感染細胞浮遊液を Spinco SW 25-1 ローターで, 5,000 rpm, 4°C, 10 分間遠心し, 細胞を沈澱させた。上清をさらに SW 25-1 ローターで, 17,000 rpm, 4°C, 45 分間遠心し, NOV を沈澱させた。沈澱を 0.05 M Tris-HCl (pH 7.6) 0.2 ml に浮遊し, 同じ緩衝液で調製した 30~80% (w/w) のショ糖密度勾配に重層し, SW 41 Ti ローターで 26,000 rpm, 4°C, 17 時間平衡密度勾配遠心した (TSUDA et al., 1988)。ショ糖密度勾配中に形成されたバンドを注射器で採取し, -80°C に保存し, 使用直前に凍結融解した。

4. 多角体および occlude-1 virus (CV) の精製

X. c-nigrum NPV T-3 の多角体をハスモンヨトウ *Spodoptera litura* 幼虫に経口接種し, 病死幼虫の磨砕液を調整した。また, *B. mori* の 5 齢幼虫または蛹に *B. mori* NPV K-4 の感染幼虫病血上清または, S. P. C. Bm 36 細胞培養上清をガラス毛细管で 5 μ l ずつ経皮接種し, 5~6 日後に病血を採取した。これらの多角体を多量に含む病死虫磨砕液および病血を 3,000 rpm, 10 分および 600 rpm, 5 分の遠心を反復して, 多角体をフェニルチオウレアを添加した 1 M NaCl 水溶液で遠心洗浄し, 部分精製した。部分精製多角体は, 凍結乾燥した後, -20°C に貯蔵した。部分精製した多角体より河原畑・岡田 (1978) の方法を一部改変して OV を精製した。多角体 600 mg を 9 ml の 0.05 M NaCl 水溶液に浮遊し, カイコ消化液 2 ml を加え, さらに 0.16 M Na₂CO₃ 水溶液 9 ml を加えて, 27°C で約 30 分溶解した。溶解終了後, 3,000 rpm, 5 分遠心して残さを除き, 上清を 10~40% (w/w) ショ糖密度勾配 (0.05 M Tris-HCl, pH 7.6) に重層し, Spinco SW 28 Ti ローターで 15,000 rpm, 4°C, 30 分遠心し OV をバンディングさせた。OV のバンドをパスツールピペットで採取し, 再蒸留水で希釈し,

SW 28 Ti ローターで 20,000 rpm, 4°C, 40 分遠心を 2 回反復し, 遠心洗浄し, ショ糖を除去した。精製 OV は, 再蒸留水に浮遊し, -80°C に保存した。精製した OV 浮遊液の蛋白量は, マイクロビュレット法 (ITZHAKI and GILL, 1964) で定量した。

5. ウイルス DNA の抽出

NPV DNA は, フェノール法 (BURAND et al., 1980) で抽出した。ウイルス試料の蛋白量を 1 mg/ml に調整し, 1% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) で 37°C, 30 分処理した。さらに 37°C, 30 分自己消化したプロテアーゼ K (Merck) 水溶液を 1 mg/ml 加え, 37°C で 3 時間反応させた。反応後に TE 緩衝液 (0.01 M Tris, 0.001 M EDTA, pH 7.5) で飽和したフェノールを等量混合し, フェノール抽出を 2 回反復し, 水層を採取した。次に水層をクロロホルム・イソアミルアルコール混液 (24:1) で 2 回抽出した。水層に 0.4 M 酢酸アンモニウムを加え, 2 倍量の 99.5% エタノールを加え -80°C でエタノール沈澱を行った。DNA の沈澱は, 70% エタノールで 15,000 rpm, 4°C, 7 分間遠心洗浄した後, 再蒸留水に浮遊し, 4°C に保存した。また, これらのウイルス DNA は 1% アガロースゲル電気泳動によって, 断片ではなく, 完全な状態であることを確認した。

6. トランスフェクション

NPV DNA による昆虫培養細胞へのトランスフェクションは, CARSTENS et al. (1980) の方法を一部改変して行った。まず, 0.021 M HEPES 緩衝液 [0.021 M HEPES (和光純薬), 0.137 M NaCl, 0.005 M KCl, 0.7 mM Na₂HPO₄-2 H₂O, 5.5 mM グルコース, pH 7.0] に 50 μ g/ml のサケ精子 DNA (和光純薬) を溶解後, ウイルス DNA を加えた。この DNA 混合液 1 量に 2.5 M CaCl₂ 水溶液を 1/10 量加え, 27°C, 20 分反応させ, 磷酸カルシウムゲルで DNA を共沈澱させた。これをマルチウェルプレート中の昆虫培養細胞の confluent monolayer に 0.3 ml/穴接種し, 2,000 rpm, 20°C, 30 分遠心した。遠心後, 10% 熱処理ウシ胎児血清を含む IPL-41 液を 0.5 ml/穴ずつ加え, 27°C で 4 時間培養した。次に培養上清をアスピレーターで除去し, 25% DMSO (ジメチルスルホキシド) で 5 分間ブースト処理を行った。昆虫培養細胞の confluent monolayer を IPL-41 液で 2 回洗浄し, 0.5% アガロース重層液を加えた。27°C で 5~6 日培養後, ニュートラルレッドを含む 0.4% アガロース重層液で二次重層を行い, プラック数を測定した。

また, アガロース重層の代りに 10% 熱処理ウシ胎児血清を含む IPL-41 液を 1.0 ml/穴ずつ加え, 27°C で

6～7 日培養し、培養上清をブラック検定し、培養液中への NOV の産生を検討した。

結 果

X. c-nigrum NPV DNA を用いたトランスフェクションにより、*S. frugiperda* 細胞および S. P. C. Bm 36 細胞にブラックが形成された (Fig. 1, 2A)。また、*X. c-nigrum* NPV DNA の 1 μ g 当りの感染価 (Table 1) は、*S. frugiperda* 細胞で 1,153 PFU、S. P. C. Bm 36 細胞で 1,236 PFU であり、両細胞間でほとんど差異はみられなかった。しかし、*M. brassicae* 細胞には、*X. c-nigrum* NPV DNA によるブラックは形成されなかった。さらに培養上清への NOV 産生および *M. brassicae* 細胞における多角体形成は観察されなかった。

B. mori NPV DNA を用いた 3 種の昆虫培養細胞に対するトランスフェクションでは、S. P. C. Bm 36 細胞に

のみ 1 μ g 当り 455 個のブラックが形成された (Fig. 2B) が、*S. frugiperda* 細胞および *M. brassicae* 細胞では、ブラックは形成されなかった (Table 2)。また、S. P. C. Bm 36 細胞の培養上清からは、*B. mori* NPV の NOV が検出されたが、*S. frugiperda* 細胞および *M. brassicae* 細胞の培養上清には NOV 産生は認められなかった。

X. c-nigrum NPV DNA を用いた昆虫培養細胞に対するトランスフェクションの場合は、*S. frugiperda* 細胞には多数の多角体産生を伴ったブラックが形成された (Fig. 1B)。一方、S. P. C. Bm 36 細胞に形成されたブラックでは、多角体形成は顕著ではなかった。

同様に、*B. mori* NPV DNA で S. P. C. Bm 36 細胞をトランスフェクションした場合もブラック中の多角体形成は不良であった (Fig. 2B)。

いずれの NPV DNA による昆虫培養細胞のトランスフェクションも、carrier DNA 添加および DMSO 処理

Fig. 1. *Xestia c-nigrum* NPV DNA plaques formed on *Spodoptera frugiperda* cells. (A) Plaques formed in a Multiwellplate well (arrow). Bar represents 3 mm. (B) A MP plaque composed of cells containing many polyhedra (arrow). Bar represents 50 μ m.

Fig. 2. Plaques formed on *Bombyx mori* cells caused by transfection with NPV DNA. (A) *Xestia c-nigrum* NPV DNA plaques formed in a Multiwellplate well (arrow). Bar represents 3 mm. (B) A plaque of *Bombyx mori* NPV DNA composed of cells containing few polyhedra (arrow). Bar represents 50 μ m.

Table 1. Number of plaques formed on monolayers of insect cell lines after transfection with *Xestia c-nigrum* NPV DNA

Treatment	Insect cell lines		
	<i>Spodoptera frugiperda</i> (IPLB-SF-21AEII)	S.P.C. Bm36	<i>Mamestra brassicae</i> (NIAS-Mb-32)
<i>Xestia c-nigrum</i> NPV DNA (72 ng/well) with carrier DNA ^a and DMSO ^b	83 ^c	89	0
<i>Xestia c-nigrum</i> NPV DNA (7.2 ng/well) with carrier DNA and DMSO	10	10	0
<i>Xestia c-nigrum</i> NPV DNA (72 ng/well) with carrier DNA only	0	0	0
with DMSO only	0	0	0
without carrier DNA and DMSO	0	0	0

^a Salmon sperm DNA: 15 µg/well.^b A 25% dimethylsulfoxide boost for 5 min.^c Average of two assays.Table 2. Number of plaques formed on monolayers of insect cell lines after transfection with *Bombyx mori* NPV DNA

Treatment	Insect cell lines		
	<i>Spodoptera frugiperda</i> (IPLB-SF-21AEII)	S.P.C. Bm36	<i>Mamestra brassicae</i> (NIAS-Mb-32)
<i>Bombyx mori</i> NPV DNA (44 ng/well) with carrier DNA ^a and DMSO ^b	0 ^c	20	0
<i>Bombyx mori</i> NPV DNA (44 ng/well) with carrier DNA only	0	0	0
with DMSO only	0	0	0
without carrier DNA and DMSO	0	0	0

^a Salmon sperm DNA: 15 µg/well.^b A 25% dimethylsulfoxide boost for 5 min.^c Average of three assays.

を行った場合に、ブラック形成が観察された (Table 1, 2)。

考 察

昆虫培養細胞を NPV DNA でトランスフェクションし、ブラック形成に成功した例は、まだ少数である (BURAND et al., 1980; CARSTENS et al., 1980; BUD and KELLY, 1980; KELLY and WANG, 1981)。トランスフェクションが成功した NPV DNA と昆虫培養細胞の組合せは、おもに *A. californica* NPV とこれにごく近縁な *Rachiplusia ou* NPV および *Trichoplusia ni* NPV の DNA と *S. frugiperda* 細胞および *T. ni* 細胞の系にかぎられ、これ以外には、*A. californica* NPV DNA が、*Manduca sexta* 細胞および *Malacosoma disstria* 細胞に感染した例がある (BURAND et al., 1980)。また、組換え型 NPV を選抜するために *B. mori* 細胞系が *B. mori* NPV DNA のトランスフェクションに用いられている (MAEDA et al., 1985)。本研究では、*S. frugiperda* 細胞に *X. c-nigrum*

NPV DNA、また、S. P. C. Bm 36 細胞に対し *X. c-nigrum* NPV DNA および *B. mori* NPV DNA のトランスフェクションに成功した。さらに、トランスフェクションによって形成されたブラックおよびトランスフェクションした細胞の培養上清をブラック検定し、これらの NPV DNA の増殖による NOV の産生を確認した。

ここで、トランスフェクションに用いた NPV DNA 試料に感染性のあるウイルス粒子が混入する可能性については、次のような方法で検討を行った。SDS 処理およびフェノール法で抽出した NPV DNA を 1% アガロースゲル電気泳動した結果、単一のバンドが見られ、ほとんどの DNA は断片でない完全な状態であった。また、トランスフェクションの際、carrier DNA としてサケ精子 DNA を加えない場合、または DMSO 処理を行わない場合には、いずれの場合もブラック形成はまったく観察されなかったため、感染性ウイルス粒子が NPV DNA 試料に混入していた可能性はきわめて低い。

BURAND et al. (1980) は、*A. californica* NPV DNA お

および *R. ou* NPV DNA で *T. ni* 細胞をトランスフェクションし、carrier DNA としてのウシ胸腺 DNA の最適濃度条件を検討した。また、DMSO 処理によってトランスフェクションによるブラック形成の効率が 2.5 倍上昇すると報告し、*A. californica* NPV DNA では、3,600 PFU/ μ g DNA および *R. ou* NPV DNA では、2,900 PFU/ μ g DNA であった。CARSTENS et al. (1980) は、*S. frugiperda* 細胞を *A. californica* NPV DNA でトランスフェクションする際、carrier DNA にサケ精子 DNA を用い、DMSO 処理を併用しているが、ブラック形成効率は、 $3 \times 10^3 \sim 6.1 \times 10^4$ PFU/ μ g DNA であった。一方、BUD and KELLY (1980) および KELLY and WANG (1981) は、*T. ni* NPV DNA で *S. frugiperda* 細胞をトランスフェクションし、carrier DNA にサケ精子 DNA は使用しているが、DMSO 処理は行っていない。この場合の効率は、約 30~200 infectious foci/ μ g DNA (BUD and KELLY, 1980) および 300~500 PFU/ μ g DNA (KELLY and WANG, 1981) であった。

本研究では、*X. c-nigrum* NPV DNA で *S. frugiperda* 細胞をトランスフェクションした効率は、1,153 PFU/ μ g DNA で、*A. californica* NPV グループと比較して、とくに目だった相違点は認められなかった。第 1 報で述べたように、*S. frugiperda* 細胞は、*A. californica* NPV、*T. ni* NPV および *X. c-nigrum* NPV の NOV に許容性で、これらの NPV の DNA にも許容性である。また、*S. frugiperda* 細胞は、*B. mori* NPV の NOV に非許容性であると同時に *B. mori* NPV の DNA に対しても非許容性であった。

また、S. P. C. Bm 36 細胞は、*X. c-nigrum* NPV および *B. mori* NPV の NOV に許容性であるが、これらの NPV の DNA によるトランスフェクションにも許容性で、これらの NPV DNA の遺伝情報は、宿主細胞内で完全に発現され、ブラック形成が見られた。しかし、*M. brassicae* 細胞は、*X. c-nigrum* NPV および *B. mori* NPV の NOV および両 NPV の DNA に非許容性で、*M. brassicae* 細胞では、これらの NPV の DNA の遺伝情報の完全な発現は認められず、ブラック形成、多角体形成および NOV の産生は見られなかった。

BURAND et al. (1980) は、*A. californica* NPV DNA を 5 種の昆虫 (鱗翅目) 培養細胞にトランスフェクションして、NPV DNA の特異性を検討したが、NPV の NOV と NPV の DNA の宿主範囲は一致していた。KELLY and WANG (1981) は、*T. ni* NPV DNA を許容性および非許容性の昆虫培養細胞、さらには乳類、鳥類、両性類

および魚類の培養細胞に対してもトランスフェクションし、その特異性を検討した。この場合、NPV DNA の宿主範囲は、NPV の NOV よりせばまり、*T. ni* NPV の NOV には許容性の *M. brassicae* 細胞およびマイマイガ *Lymantria dispar* 細胞では、*T. ni* NPV DNA のトランスフェクションによるブラック形成が見られず、他の非許容性細胞にも *T. ni* NPV DNA による感染は成立しなかった。

本研究では昆虫培養細胞における *X. c-nigrum* NPV および *B. mori* NPV の NOV と DNA の宿主範囲が一致した。NPV の昆虫培養細胞への感染は、NOV の細胞への吸着は、必要条件であるが、第 1 報で報告したように NOV が吸着しても感染が成立しない場合もあり、十分条件ではない。また、NPV DNA を NOV 非許容性の細胞に直接導入しても、感染の成立が見られなかったことから、昆虫培養細胞での NPV の複製は、外来の遺伝子である NPV DNA が宿主細胞内で完全にその遺伝情報を発現できるかどうか大きく依存していると考えられる。

摘 要

X. c-nigrum NPV および *B. mori* NPV からフェノール法で DNA を抽出し、リン酸カルシウム法で 3 種の昆虫培養細胞 (*S. frugiperda* 細胞、S. P. C. Bm 36 細胞および *M. brassicae* 細胞) へトランスフェクションし、NPV のビリオンと NPV DNA の昆虫培養細胞に対する感染性の差異を検討した。

X. c-nigrum NPV DNA は、*X. c-nigrum* NPV に許容性である *S. frugiperda* 細胞および S. P. C. Bm 36 細胞に感染性を示し、非許容性である *M. brassicae* 細胞には感染は認められなかった。また、*B. mori* NPV DNA も許容性の S. P. C. Bm 36 細胞にのみ感染性を示し、非許容性である *S. frugiperda* 細胞および *M. brassicae* 細胞には感染は認められなかった。以上のことから、NPV に非許容性の細胞に対する組合せでは、NPV DNA の感染は成立せず、NPV DNA の宿主範囲と NPV NOV の宿主範囲が一致した。

引 用 文 献

- BUD, H.M. and D.C. KELLY (1980) Nuclear polyhedrosis virus DNA is infectious. *Microbiologica* **3**: 103—108.
 BURAND, J.P., M.D. SUMMERS and G.E. SMITH (1980) Transfection with baculovirus DNA. *Virology* **101**: 286—290.
 CARSTENS, E.B., S.T. TJIA and W. DOERFLER (1980) Infec-

- tious DNA from *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* **101**: 311—314.
- ITZHAKI, R.F. and D.M. GILL (1964) A micro-biuret method for estimating proteins. *Anal. Biochem.* **9**: 401—410.
- 河原畑勇・岡田斉夫 (1978) ヨトウガ核多角体病ウイルス精製法の再検討. 九病虫研会報 **24**: 118—120.
- KELLY, D.C. and X. WANG (1981) The infectivity of nuclear polyhedrosis virus DNA. *Ann. Virol. (Inst. Pasteur)* **132**: E: 247—259.
- MAEDA, S., T. KAWAI, M. OGINATA, H. FUJIWARA, T. HORIUCHI, Y. SAEKI, Y. SATO and M. FURUSAWA (1985) Production of human α -interferon in silkworm using a bavulovirus vector. *Nature, London* **315**: 592—594.
- MARTIGNONI, M.E. and P.J. IWAIR (1981) A catalogue of viral diseases of insects, mites and ticks. *In: Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970—1980*. (H. D. BURGESS ed.), London: Academic Press, pp. 897—911.
- QUIOT, J.M. (1982) Establishment of a cell line (S.P.C. Bm36) from the ovaries of *Bombyx mori* L. (Lepidoptera). *Sericologia* **22**: 25—31.
- TSUDA, K., E. MIZUKI, T. KAWARABATA and K. AIZAWA (1988) Comparative neutralization of nuclear polyhedrosis viruses infectious to the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae), in a cell line of *Spodoptera frugiperda*. *J. Invertebr. Pathol.* **52**: 248—252.
- 津田勝男・水城英一・河原畑勇・鮎沢啓夫 (1990) 昆虫培養細胞における核多角体病ウイルスの種特異性に関する研究. I. nonoccluded virus の細胞への吸着と感染の成立. 応動昆 **34**: 297—302.
-