



Title	膜融合タンパク質GP64のアミノ酸多型とカイコ核多角体病ウイルスの増殖・病原性に関する研究
Author(s)	関口, 真理
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第15297号
Issue Date	2023-03-23
DOI	<a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k15297">https://doi.org/10.14943/doctoral.k15297</a>
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/89557">https://hdl.handle.net/2115/89557</a>
Type	doctoral thesis
File Information	Sekiguchi_Mari.pdf



膜融合タンパク質 GP64 のアミノ酸多型と  
カイコ核多角体病ウイルスの増殖・病原性に関する研究

北海道大学 大学院農学院

生命フロンティアコース 博士後期課程

関口 真理

## 謝辞

本編に入るに先立ち、本研究を進めるにあたって多大なご指導並びにご鞭撻を賜り、さらに本論文をご校閲頂きました、北海道大学大学院農学研究院 応用分子昆虫学研究室准教授 佐藤昌直博士に厚く御礼申し上げます。

また、本研究を進めるにあたり、ご指導・ご助言いただきました本研究室教授 浅野眞一郎博士、本研究室名誉教授 伴戸久徳博士、北海道大学大学院農学研究院 分子酵素学研究室教授 奥山正幸博士、北海道大学大学院農学研究院 分子酵素学研究室助教 田上貴祥博士に心より御礼申し上げます。

カイコを飼育・供与して下さった北海道大学北方圏フィールド科学センター耕地圏ステーション生物生産研究農場 山田恭裕技術専門職員、*Gamillus-pRSET<sub>B</sub>*を分譲して下さった大阪大学産業科学研究所 生体分子機能科学研究分野 永井健治栄誉教授、カイコ 106 系統を分譲して下さった九州大学大学院農学研究院遺伝資源開発研究センター 九州大学農学研究院 生命機能科学部門 システム生物学教授 伴野豊博士、九州大学農学研究院 生命機能科学部門 システム生物学助教 山本幸治博士に厚く御礼申し上げます。

共焦点レーザー顕微鏡 TCS SP5 (Leica Microsystems)、リアルタイム PCR 装置 LightCycler480 (Roche) の利用にあたり、北海道大学農学研究院 生物構造解析センター、並びに顕微鏡での撮影に際して技術指導して下さった安井雅範担当職員に御礼申し上げます。

研究室の皆様には日々の生活、研究のなかでとてもお世話になり、心から感謝しています。カイコへのウイルス注射や細胞実験を教えてくださいました本研究室 OB の九州大学農学研究院准教授 藤田龍介博士にお礼申し上げます。画像解析の面では後輩の中西登志紀君、藤村大樹君、前田麻亜子さんに多くのご助言・ご協力をいただき、感謝しています。また、カイコの実験においては佐藤拓海君、黒光玲緒奈さん、川満龍平くん、恩田昂輝くん、木村弥優さんに大きくのご協力をいただき、ありがとうございました。

最後に、9 年間にわたる学生生活を支えてくれた両親に心から感謝申し上げます。

2023 年 3 月

関口 真理

## 目次

I. 序論 .....	1 ~ 6
II. 材料と方法 .....	7 ~ 18
1. 培養細胞、ウイルス、昆虫	7
a) 供試細胞	7
b) 供試ウイルス	7
c) 試供昆虫	7
2. BmNPV の GP64 のアミノ酸配列のアライメント	7
a) BmNPV と Group I アルファバキュロウイルスの GP64 のアミノ酸配列のアライメント	8
b) BmNPV の GP64 のアミノ酸配列のアライメント	8
3. BmNPV の近縁ウイルスの系統樹推定	8
4. GP64 <sup>T3</sup> の立体構造予測	8
5. GP64 変異組み合わせウイルスの作製	8
5-1. ドナープラスミドの作製	8
a) pFastbac-Luc-gp64 <sup>T3/L99M,Y172H</sup> 、pFastbac-Luc-gp64 <sup>T3/Y172H,V181I</sup> の作製	8
b) pFastbac-Luc-gp64 <sup>T3/G158S,V181I,R191K</sup> の作製	9
c) pFastbac-Luc-gp64 <sup>T3/A30Δ,G158S,V181I,R191K</sup> 、 pFastbac-Luc-T3gp64 <sup>T3/A30Δ,G158S,Y172H,V181I,R191K</sup> の作製	9
d) pFastbac-Luc-gp64 <sup>H4/M99L</sup> 、pFastbac-Luc-gp64 <sup>H4/H172Y</sup> の作製	10
5-2. 各種 gp64 遺伝子復帰バクミドの作製	10
5-3. BmN 細胞への各種 gp64 遺伝子復帰バクミドのトランスフェクション	11
5. 膜融合試験プラスミドの作製と膜融合試験	11
a) Opie2 プロモーター制御下に緑色蛍光タンパク質 Gamillus を発現するプラスミド (Opie2-NLS-gamillus) の作製	11
b) 膜融合試験プラスミドの作製	12
c) 各 GP64 の膜融合活性の比較	12
6. プラークアッセイとプラークサイズの定量	13
7. BmN 細胞およびカイコ個体におけるウイルス増殖の解析	13
a) 培養上清中のウイルス DNA 量の定量	13
b) カイコ体液中のウイルス DNA 量の定量	14
c) ルシフェラーゼアッセイ	14
d) カイコの生存時間解析	14
e) カイコの体重測定と病徴の撮影	15
Table 1	16

<b>III. 結果</b> .....	<b>19 ~ 67</b>
1. BmNPV と代表的な Group I アルファバキュロウイルスの GP64 のアミノ酸配列 のアライメント	19
2. BmNPV の近縁ウイルスの系統樹推定	20
3. GP64 <sup>T3</sup> の立体構造予測	20
4. GP64 変異組み合わせウイルスの作製理由	20
5. 膜融合活性試験	21
6. GP64 変異組み合わせウイルスのプラークサイズの比較	23
7. GP64 組み合わせウイルスの BmN 細胞での増殖と組換えタンパク質発現	24
a) 培養細胞での GP64 変異組み合わせウイルスの増殖の比較	24
b) 培養細胞での GP64 変異組み合わせウイルスのルシフェラーゼ発現量の比較	25
8. GP64 組み合わせウイルスのカイコでの増殖と組換えタンパク質発現	26
a) カイコでの GP64 変異組み合わせウイルスの増殖の比較	26
b) カイコでの GP64 変異組み合わせウイルスのルシフェラーゼ発現量の比較	27
9. 生存時間解析	28
10. 病徴解析	29
a) 体重測定	29
b) 形態的病徴の比較	30
Table 2 ~ 6	33, 35, 54, 61, 67
Fig. 1 ~ 10	31, 32, 34, 36 ~ 53, 55 ~ 60, 62 ~ 66
<b>IV. 考察</b> .....	<b>68 ~ 79</b>
Table 7	78
Fig. 11	79
<b>V. 要旨</b> .....	<b>80 ~ 82</b>
<b>VI. 参考文献</b> .....	<b>83 ~ 93</b>
<b>VII. サプリメンタルデータ</b> .....	<b>94 ~ 114</b>
Supplementary Table 1 ~ 5	94
Supplementary Fig.1 ~ 7	101
<b>VIII. 付録</b> .....	<b>115 ~ 126</b>
遺伝子実験の基本操作	115
Appendix table 1 ~ 10, Script 1 ~ 2	117

## 略語一覧

GP64 <sup>T3</sup>	T3 株の GP64
GP64 <sup>H4</sup>	H4 株の GP64
GP64 <sup>Ac</sup>	AcMNPV の GP64
A30 Δ	GP64 <sup>T3</sup> の A30 を欠失させた
L99M	GP64 <sup>T3</sup> の L99 を H4 型のメチオニンに置換した
G158S	GP64 <sup>T3</sup> の G158 を H4 型のセリンに置換した
Y172H	GP64 <sup>T3</sup> の Y172 を H4 型のヒスチジンに置換した
V181I	GP64 <sup>T3</sup> の V181 を H4 型のイソロイシンに置換した
R191K	GP64 <sup>T3</sup> の R191 を H4 型のリシンに置換した
BT3 control virus	T3 株に相当するコントロールウイルス: T3 Δ gp64 バクミドのポリヘドリンローカスに GP64 <sup>T3</sup> をレスキューしたウイルス
BT3/GP64 <sup>H4</sup>	GP64 <sup>H4</sup> をもつ T3 株キメラウイルス: T3 Δ gp64 バクミドのポリヘドリンローカスに T3gp64 のプロモーターと GP64 <sup>H4</sup> の orf をレスキューしたウイルス
BT3/GP64 <sup>T3/A30Δ</sup>	GP64 <sup>T3/A30Δ</sup> をもつ T3 control virus
BT3/GP64 <sup>T3/L99M</sup>	GP64 <sup>T3/L99M</sup> をもつ T3 control virus
BT3/GP64 <sup>T3/G158S</sup>	GP64 <sup>T3/G158S</sup> をもつ T3 control virus
BT3/GP64 <sup>T3/Y172H</sup>	GP64 <sup>T3/Y172H</sup> をもつ T3 control virus
BT3/GP64 <sup>T3/V181I</sup>	GP64 <sup>T3/V181I</sup> をもつ T3 control virus
BT3/GP64 <sup>T3/R191K</sup>	GP64 <sup>T3/R191K</sup> をもつ T3 control virus
BT3/GP64 <sup>T3/L99M,Y172H</sup>	GP64 <sup>T3/L99M,Y172H</sup> の変異の組み合わせをもつ T3 control virus
BT3/GP64 <sup>T3/Y172H,V181I</sup>	GP64 <sup>T3/Y172H,V181I</sup> の変異の組み合わせをもつ T3 control virus
BT3/GP64 <sup>T3/G158S,V181I,R191K</sup>	GP64 <sup>T3/G158S,V181I,R191K</sup> の変異の組み合わせをもつ T3 control virus
BT3/GP64 <sup>T3/A30Δ,G158S,V181I,R191K</sup>	GP64 <sup>T3/A30Δ,G158S,V181I,R191K</sup> の変異の組み合わせをもつ T3 control virus
BT3/GP64 <sup>T3/A30Δ,G158S,Y172H,V181I,R191K</sup>	GP64 <sup>T3/A30Δ,G158S,Y172H,V181I,R191K</sup> の変異の組み合わせをもつ T3 control virus
BH4 control virus	H4 株に相当するコントロールウイルス: H4 Δ gp64 バクミドのポリヘドリンローカスに GP64 <sup>H4</sup> をレスキューしたウイルス
BH4/GP64 <sup>T3</sup>	GP64 <sup>T3</sup> をもつ H4 キメラウイルス: H4 Δ gp64 バクミドのポリヘドリンローカスに H4gp64 のプロモーターと GP64 <sup>T3</sup> の orf をレスキューしたウイルス
BH4/GP64 <sup>H4/M99L</sup>	GP64 <sup>H4/M99L</sup> の変異をもつ H4 control virus
BH4/GP64 <sup>H4/H172Y</sup>	GP64 <sup>H4/H172Y</sup> の変異をもつ H4 control virus

## I.序論

ウイルスの適応進化とは変異獲得と自然選択を通じて生存環境に適応的となる進化を指す。宿主の生態や生活環などの選択圧により、多様な変異をもつウイルス集団の中から、子孫ウイルス生産に有利な形質をもったウイルスが集団中で優位になり、適応的な変異ウイルスが選抜される。一般的にウイルスの子孫ウイルス生産量（伝搬性）と病原性（宿主の致死性）の間にはトレードオフの関係が存在し、伝搬性が小さくなると適応的でなくなり、逆に伝搬性が増加し過ぎても宿主集団内の死亡率も増加するため適応的でなくなる。このため、最大の適応度を得られるウイルスの伝搬性と病原性は中程度で最適化される（Anderson and May, 1982、Doumayrou *et al.*, 2012、高倉、2009）。

バキュロウイルスは病原性が高く、他のウイルスとは違う適応進化戦略をとっている可能性がある。バキュロウイルス科に属するウイルス（以後、バキュロウイルス）は病原性が高く、感染宿主を殺して子孫ウイルスを放出させる。バキュロウイルスはウイルスの感染サイクルにおいて、経口感染にかかわる包埋体由来ウイルス（occlusion-derived virus: ODV）と細胞間感染にかかわる出芽ウイルス（Budded virus: BV）という2種類のウイルス粒子を作る。宿主に食下された包埋体は中腸内でアルカリ性の消化液によって溶解し、消化管に放出されたODVが中腸細胞へと感染する（経口感染）。その後、中腸細胞から出芽したBVは他の組織へ感染を広げる（細胞間感染）。感染後期になると、ウイルスは包埋体の主成分である結晶構造タンパク質ポリヘドリンを生産し、子孫ウイルスは核内でその結晶中に包埋される（Rohrmann, 2019）。感染末期に感染個体は行動が異常に活発化する徘徊行動（Goulson, 1997、Katsuma *et al.*, 2012）をとり、包埋体を含んだ体液を滲出しながら歩きまわり、さらに感染個体は死後すみやかにウイルスの持つ分解酵素によって溶解されることで、包埋体は環境中に拡散される（Slack *et al.*, 1995、Hawtin *et al.*, 1997）。放出された包埋体は新たな幼虫に食下され、感染が拡大する。

バキュロウイルスは主に昆虫を宿主とする環状二本鎖DNAウイルスであり、鱗翅目に感染するアルファバキュロウイルスとベータバキュロウイルス、膜翅目に感染するガンマバキュロウイルス、双翅目に感染するデルタバキュロウイルスの4属に分類される。このうちアルファ、ガンマ、デルタバキュロウイルスは多角体を産生するため核多角体病ウイルス(Nucleopolyhedrovirus: NPV)、ベータバキュロウイルスは顆粒を産生するため顆粒病ウイルス(Granulovirus: GV)と命名されている（Herniou *et al.*, 2003、Rohrmann,

2019)。アルファバキュロウイルスに属する NPV は更に Group I と Group II に分類される。Group I は膜融合タンパク質 GP64 を介して宿主細胞に侵入するが、Group II は GP64 を持たず、F タンパク質を介して宿主細胞に侵入すると考えられている (Zanotto *et al.*, 1993、Pearson and Rohrmann, 2002)。既知の NPV のほとんどは宿主域が狭く、NPV が分離された昆虫種とそのごく近縁種に感染性をもつのみであり、複数の科の昆虫を宿主とする NPV はまれである。宿主が種分化していく過程で、ウイルスも宿主依存進化と呼ばれる進化を遂げたと考えられている (Rohrmann *et al.*, 1981)。

バキュロウイルスの適応進化については、超並列シーケンスによるゲノム変異、変異遺伝子の網羅的解析により報告があるが (Chateigner *et al.*, 2015)、適応進化のメカニズムについての実験的検証はなされていない。ウイルスの宿主への適応進化のメカニズムはインフルエンザウイルスでよく研究されており、特にウイルスの宿主への侵入に必須な膜融合タンパク質であるヘマグルチニン (HA) タンパク質に注目して研究されている。パンデミックの原因ウイルスが獲得した HA タンパク質のアミノ酸変異、または自然宿主以外の宿主にウイルスを感染させた過程で獲得した変異を網羅的に探索し、同定された変異を導入したウイルスの表現型を評価することで、ウイルスの宿主適応進化機構の分子基盤が調査されてきた。インフルエンザウイルスの宿主適応進化のメカニズムは、HA タンパク質内の変異が選抜・固定され、宿主細胞のレセプターとの結合特異性や結合効率、膜融合活性、pH 安定性が変化した結果、ウイルスの増殖や伝搬性が変化したことであった (Narasaraju *et al.*, 2009、Mair *et al.*, 2014、Cotter *et al.*, 2014、Shao *et al.*, 2017、Watanabe *et al.*, 2018、Dreier *et al.*, 2019)。

ウイルスの膜融合タンパク質は、ウイルスの宿主細胞への侵入に必須な役割を持ち、膜融合タンパク質がウイルスのエンベロープと宿主細胞膜との膜融合を媒介することでウイルスの感染が成立する。膜融合タンパク質はその構造的な特徴から Class I、II、III の 3 種類に分類される。インフルエンザウイルスの HA タンパク質やコロナウイルスのスパイクタンパク質が属する Class I の融合タンパク質は、 $\alpha$ ヘリックスを中心とした coiled-coil 構造のホモ 3 量体を形成する。フラビウイルスの E タンパク質やアルファウイルスの E1 タンパク質が属する Class II 融合タンパク質は、fusion loop を含む  $\beta$  シート構造を主としたホモまたはヘテロ 3 量体を形成する。ラブドウイルスの G タンパク質やバキュロウイルスの GP64 を含む Class III の膜融合タンパク質は、Class I、II

の両方の特徴をもち、3 量体形成の要である  $\alpha$  ヘリックスからなる coiled-coil 構造と、fusion loop を含む  $\beta$  シート構造をもつ。異なる Class に分類された膜融合タンパク質は構造的特徴が異なるが、これらの膜融合を媒介するメカニズムは共通しており、宿主レセプターとの結合や、低 pH 条件などでウイルスの膜融合タンパク質の構造変化が起こる。膜融合タンパク質が pre-fusion 構造から post-fusion 構造へと構造変化する過程では、まず、宿主膜と相互作用する fusion loop や fusion peptide がタンパク質の表面に露出し、宿主細胞膜へと挿入される。その後、融合タンパク質がリフォールディングし、post-fusion 構造へと構造変化する過程で、宿主細胞膜がウイルスのエンベロープに近づき、宿主細胞膜とウイルスのエンベロープの脂質二重膜の外側の膜同士が融合したヘミフュージョン状態になる。さらに膜融合タンパク質の構造変化が進み、構造的に安定した post-fusion 構造になると、ウイルスのエンベロープと宿主細胞膜の脂質二重膜の内側の膜同士が融合することで fusion pore が形成され、細胞膜同士が融合する (Backovic and Jardetzky, 2009、Kim *et al.*, 2017)。

Class III 膜融合タンパク質に属し、Group I アルファバキュロウイルスの膜融合タンパク質である GP64 は、宿主細胞への侵入に必須なタンパク質である。GP64 は BV の主要な膜タンパク質であり、宿主細胞レセプターとの結合 (Hefferon *et al.*, 1999) や膜融合 (Blissard and Wenz, 1992) に必須であり、子孫ウイルスの出芽 (Oomens and Blissard, 1998) にも関与している。GP64 は膜上ではジスルフィド結合を介したホモ三量体を形成しており (Kadlec *et al.*, 2008)、宿主細胞膜と相互作用する領域である GP64 のドメイン I は 3 つの fusion loop を含み、そのうち fusion loop1 と fusion loop2 が膜融合に関与している (Dong and Blissard, 2012)。宿主細胞への侵入の際、BV は細胞膜上のリン脂質やタンパク質のレセプターと結合し、Group I アルファバキュロウイルスで最もよく研究されている *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) はクラスリンを介したエンドサイトーシス (Volkman and Goldsmith, 1985、Hefferon *et al.*, 1999、Long *et al.*, 2006)、カイコに感染するカイコ核多角体病ウイルス (*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus: BmNPV) ではエンドサイトーシスの 1 種であるコレステロール依存性のマクロピノサイトーシスによって宿主細胞内に取り込まれる (Huang *et al.*, 2014)。エンドサイトーシスまたはマクロピノサイトーシスによって宿主細胞内に取り込まれた BV は、後期エンドソーム内の酸性条件下で BV 膜の GP64 のヒスチジン残基がプロトン化されることで GP64 の構造変化が引き起こされ、GP64 の構造変化により BV の

エンベロープとエンドソーム膜が膜融合を起こし、ウイルスのヌクレオカプシドが細胞質中に放出される (Blissard and Wenz, 1992, Zhou and Blissard, 2008, Li and Blissard, 2011, Dong and Blizzard, 2012)。細胞質中に放出されたヌクレオカプシドは、アクチン重合により核まで輸送され、その後核膜孔複合体を介して核内に輸送される (Granados and Lawler, 1981, Roncarati and Knebel-Moersdorf, 1997)。その後、産生されたヌクレオカプシドは核膜をエンベロープとして出芽し、その後細胞質中で膜を失い、ヌクレオカプシドはアクチン重合を介して細胞膜まで輸送され、細胞膜をエンベロープとして出芽する (Oomens and Blissard, 1998, Blissard and Theilmann, 2018)。

以上のような GP64 の分子生物学的な解析は AcMNPV の GP64 を対象に研究が進んでいるが、AcMNPV はゲノム配列が同定されている既知系統が C6 系統、E2 系統に限られており、遺伝的多様性の研究には適していない。一方で AcMNPV に近縁の BmNPV はこれまでに 15 系統について分離、ゲノム配列同定や性状解析がなされている。BmNPV は Group I アルファバキュロウイルスのなかで最もよく研究されているウイルスの 1 つである。BmNPV はカイコに感染し、その病原性の高さから養蚕業で問題となるウイルスとして同定された。また、BmNPV は他のバキュロウイルスと異なり、人類によって家畜化されたカイコを宿主としている。BmNPV および近縁ウイルスの GP64 アミノ酸配列を比較すると、H4 株に他の株とは異なる特有の変異が見つかった (Sakai *et al.* 2021)。BmNPV H4 株は北海道大学応用分子昆虫学研究室で BmNPV の標準株である T3 株とは異なる増殖特性を示す株として分離された (角谷、2006)。BmN 細胞では H4 株は T3 株よりウイルス増殖能が低く、プラークの大きさも小さく、ポリヘドリン生産量も少なかったが、カイコ幼虫では、H4 株は T3 株と比較して増殖能が高く、ポリヘドリン生産量も多かった。一方、ウイルス感染カイコの死亡時間に T3 株と H4 株の差はなかった (角谷、2006, Sakai *et al.*, 2021)。H4 株の GP64 (GP64<sup>H4</sup>) と T3 株の GP64 (GP64<sup>T3</sup>) はアミノ酸置換もしくは欠失の多型を計 6 つ (A30 $\Delta$ 、L99M、G158S、Y172H、V181I、R191K) 持ち (酒井、2012)、これらアミノ酸残基は、シグナルペプチド上の疎水性領域にある A30 $\Delta$  を除いて全てレセプター結合や膜融合に関わるドメイン I 上に存在する (関口、2020)。これら 6 つのアミノ酸のうち、機能が明らかになっているものは次の 2 アミノ酸であり、残りは機能が解析されていない。1 つ目は、L99 である。GP64<sup>T3</sup> の L99 に相当するアミノ酸残基である AcMNPV の GP64 (GP64<sup>Ac</sup>) の L82 は宿主膜と相互作用する fusion loop1 に存在し、膜融合過程での fusion pore 拡大、宿主細胞

とのレセプター結合に関与している (Kadlec *et al.*, 2008、 Dong and Blissard, 2012)。2 つ目は Y172 である。GP64<sup>T3</sup> の Y172 に相当する GP64<sup>Ac</sup> の H155 はレセプター結合に必須なアミノ酸 F153、H156 (Zhou and Blissard, 2008) の間で fusion loop2 の隣に位置する。また、H155 は膜融合に関わるヒスチジンクラスター残基であり、H155 を含む領域 F153~H156 は膜融合過程におけるヘミフュージョンに関わるアミノ酸残基であることが分かっている (Li and Blissard, 2011、 Dong and Blissard, 2012)。また、BmNPV N9 株の GP64 (GP64<sup>N9</sup>) では、本研究での GP64<sup>T3</sup> の Y172 に相当するアミノ酸残基である Y153 をヒスチジンに置換すると、膜融合活性が高まり、カイコ卵巣由来細胞 (BmN-4 細胞) 以外の様々な宿主由来の細胞に侵入可能になることが報告されている (Katou *et al.*, 2006、 Katou *et al.*, 2010)。

T3 株と H4 株はウイルス感染カイコの生存時間や病原性には差がないが (角谷, 2006)、GP64 を実験的に交換することで増殖や生存時間が変化した (石川, 2016、本研究)。また、GP64<sup>T3</sup> の 172 番目のアミノ酸をヒスチジンに置換したウイルス BT3/GP64<sup>T3/Y172H</sup> は、T3 株と比較してカイコでの増殖が低く、感染カイコの生存時間も長くなることが報告されている (Sekiguchi *et al.*, 2020)。これら先行研究の結果から、T3 株と H4 株の間の 6 つのアミノ酸多型は、ウイルスの増殖や病原性の指標である感染カイコの生存時間に影響を与え、T3 株、H4 株間の GP64 の 6 つのアミノ酸多型は T3 株と H4 株の増殖特性の違いと適応進化に関与していることが示唆された。

本研究では、T3 株と H4 株の GP64 の 6 つのアミノ酸多型のどのアミノ酸またはアミノ酸多型の組み合わせが T3 株と H4 株の増殖特性や適応進化に影響しているのかを突き止めることを目的に、以下の実験を行った。① T3 株と H4 株の GP64 の 6 つのアミノ酸がウイルスの増殖に与える影響を突き止めるため、6 つのアミノ酸を 1 つずつ T3 株型から H4 型に置換したウイルス (BT3/GP64<sup>T3/A30Δ</sup>、BT3/GP64<sup>T3/L99M</sup>、BT3/GP64<sup>T3/G158S</sup>、BT3/GP64<sup>T3/Y172H</sup>、BT3/GP64<sup>T3/V181I</sup>、BT3/GP64<sup>T3/R191K</sup>)、アミノ酸多型を組み合わせた 5 種類 ( BT3/GP64<sup>T3/L99M,Y172H</sup> 、 BT3/GP64<sup>T3/Y172H,V181I</sup> 、 BT3/GP64<sup>T3/G158S,V181I,R191K</sup> 、 BT3/GP64<sup>T3/A30Δ,G158S,V181I,R191K</sup>、BT3/GP64<sup>T3/A30Δ,G158S,Y172H,V181I,R191K</sup>)、6 つのアミノ酸のうち、機能が既知の 2 アミノ酸をそれぞれ H4 株型から T3 型に置換したウイルス 2 種類 (BH4/GP64<sup>H4/M99L</sup>、BH4/GP64<sup>H4/H172Y</sup>) の計 13 種類の GP64 変異ウイルスを作製し、その増殖をカイコ卵巣由来細胞 (BmN 細胞) とカイコで比較した。さらに、ウイルスに

感染したカイコの生存時間と病徴を比較した。

②膜タンパク質の膜融合活性はウイルスの増殖に影響を及ぼすことが様々なウイルスで知られており (Fredericksen and Whitt, 1995、Jeetendra *et al.*, 2003、Samal *et al.*, 2013、Ji *et al.*, 2017、Dreier *et al.*, 2019)、AcMNPV でも GP64 の膜融合活性が低下した変異体は培養細胞でのウイルスの増殖が低下した (Li and Blissard, 2011)。このため、GP64 の機能の 1 つである膜融合活性の違いが T3 株と H4 株の増殖特性の差異に貢献しているかどうかを確認するため、変異 GP64 を発現する発現プラスミドを作製し、これら変異 GP64 の膜融合活性を測定し、ウイルスの増殖との相関を推定した。

## II. 材料および方法

### 1. 培養細胞、ウイルス、昆虫

#### a) 供試細胞

カイコ (*Bombyx mori*) 卵巣由来の BmN 細胞をウイルス感染実験に用いた。BmN 細胞は 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (biosera) を含む TC-100 培地 (Applichem) (Appendix table 1) を用い、26°C で培養した。

#### b) 供試ウイルス

供試ウイルスとして、BmNPV T3 株 (Gomi *et al.*, 1999) に由来し、北海道大学農学部応用分子昆虫学研究室でバクミドとしてクローンした株 (Ono *et al.*, 2007) および本研究室で分離された BmNPV H4 株 (角谷、2006) を用いた。

#### c) 試供昆虫

試供昆虫は、春嶺×鐘月 (愛媛蚕種株式会社) の 5 齢起蚕を用いた。北海道大学北方圏フィールド科学センター耕地圏ステーション生物生産研究農場の桑と人工飼料くわのはな (稚蚕人工飼料センター) で飼育した。カイコの体液の pH 測定には九州大学大学院農学研究院遺伝資源開発研究センターから分譲された 4 齢のカイコ 106 系統を使用した。

### 2. BmNPV の GP64 のアミノ酸配列のアライメント

#### a) BmNPV と Group I アルファバキュロウイルスの GP64 のアミノ酸配列のアライメント

H4 株と T3 株の GP64 の 6 つのアミノ酸多型について、BmNPV や他の Group I アルファバキュロウイルスの間でアミノ酸配列が保存されているのかどうかを検証するため、BmNPV (H4、C2、India、Guangxi、Zhejiang、Cubic、T3、La、C1、Brazilian、C6 株)、AcMNPV (E2、C6 株)、クワコを宿主とする *Bombyx mandarina* nucleopolyhedrovirus (BomaNPV S1、S2 株)、リンゴウスチャイロハマキを宿主とする *Epiphyas postvittana* nucleopolyhedrovirus (EppoMNPV)、マメノメイガを宿主とする *Maruca vitrata* nucleopolyhedrovirus (MaviNPV)、コナガを宿主とする *Plutella xylostella* multiple nucleopolyhedrovirus (PXMNPV CL3 株)、ドクガを宿主とする *Orgyia pseudotsugata* multiple nucleopolyhedrovirus (OpMNPV)、サクサンを宿主とする *Antheraea pernyi* nucleopolyhedrovirus (AnpeNPV) の GP64 のアミノ酸配列を NCBI protein データベース

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) から取得した。EBI ウェブサーバーの多重配列比較ツール MUSCLE (Edgar, 2004) (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) を使ってアミノ酸配列のアライメントを行った (Fig.1)。各ウイルスの略称、NCBI Accession number、ウイルスの名称と宿主は Table 2 に示した。

#### b) BmNPV の GP64 のアミノ酸配列のアライメント

H4 株と T3 株の GP64 の 6 つのアミノ酸多型について、BmNPV の間でアミノ酸配列の保存性を検証するため、NCBI に登録されている BmNPV (Supplementary Table 1) と AcMNPV C6 株、BomaNPV (S1、S2 株) の GP64 のアミノ酸配列を前述の NCBI protein データベースから取得し、MUSCLE を使ってアライメントを行った (Supplementary Fig. 1)。各ウイルスの略称、NCBI Accession number、ウイルスの名称と宿主は Supplementary Table 1 に示した。

### 3. BmNPV の近縁ウイルスの系統樹推定

NCBI から BmNPV (Brazilian、C1、C2、C6、Cubic、Guangxi、H4、India、T3、Zhejiang 株)、BomaNPV (S1、S2 株)、AcMNPV (C6、E2 株)、PxMNPV (CL3 株) のゲノム配列を取得し、IQ TREE (Nguyen *et al.*, 2015) により最尤法を用いて系統樹を推定した。

### 4. GP64<sup>T3</sup> の構造予測

タンパク質の立体構造予測ツールである AlphaFold2 (Jumper *et al.*, 2021) を用いて GP64<sup>T3</sup> の構造予測を行った。PyMOL (DeLano, 2002) (<http://www.pymol.org>) で GP64<sup>T3</sup> の構造を表示した。

### 5. GP64 変異組み合わせウイルスの作製

#### 5-1. ドナープラスミドの作製

##### a) pFastbac-Luc-gp64<sup>T3/L99M,Y172H</sup>、pFastbac-Luc-gp64<sup>T3/Y172H,V181I</sup> の作製

GP64 のアミノ酸変異を組み合わせたウイルスを作製するため、pFastbac-Luc-gp64<sup>T3/L99M</sup>、pFastbac-Luc-gp64<sup>T3/Y172H</sup> (関口、2020) をそれぞれテンプレートとして、Y172H 変異を導入するプライマー (OL0573、OL0574) を用いて PCR により変異を導入した (Supplementary Table 2)。PCR 産物を T4PNK 処理した後、ライゲーションを行い、ライゲーション産物で DH5  $\alpha$  を形質転換した。QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) を用

い、説明書に従ってプラスミドを抽出、pFastbac-Luc-gp64<sup>T3/L99M,Y172H</sup>、pFastbac-Luc-gp64<sup>T3/Y172H,V181I</sup>を得た。変異が導入されたことはシーケンス用プライマー (Table 1-17~31) を用いて T3gp64 プロモーターと gp64 の全塩基配列をサンガーシーケンスにより配列を確認した。

b) pFastbac-Luc-gp64<sup>T3/G158S,V181I,R191K</sup> の作製

pFastbac-Luc-gp64<sup>T3/G158S</sup> (関口、2020) をテンプレートとして、V183I/R191K 変異 (Supplementary Table 2) を導入するプライマー (OL0575、OL0576) を用いて PCR により gp64 の開始コドンから R191K までの領域を増幅した。pFastbac-LucT3gp64 を制限酵素 *Spe* I、*Hind*III で処理したものと PCR 産物を SLiCE 法で連結し、pFastbac-Luc-gp64<sup>T3/G158S,V181I,R191K</sup> を得た。サンガーシーケンス用プライマー (Table 1-17~31) を用いてシーケンシングにより T3gp64 プロモーターと gp64 の全塩基配列を確認した。

c) pFastbac-Luc-gp64<sup>T3/A30Δ,G158S,V181I,R191K</sup>、pFastbac-Luc-gp64<sup>T3/A30Δ,G158S,Y172H,V181I,R191K</sup> の作製

5-1. b) で作製した pFastbac-Luc-gp64<sup>T3/G158S,V181I,R191K</sup> をテンプレートにし、A30Δ 変異を導入するプライマー (Table 1-5、6) を用いて PCR により変異を導入し (Supplementary Table 2)、pFastbac-Luc-gp64<sup>T3/A30Δ,G158S,V181I,R191K</sup> を作製した。変異が導入されたことはプライマー (Table 1-17~31) を用いてシーケンシングにより配列を確認した。さらに、前述で作製した pFastbac-Luc-gp64<sup>T3/A30Δ,G158S,V181I,R191K</sup> をテンプレートにして Y172H 変異を導入するプライマー (OL0573、OL0574) を用いて PCR により変異を導入し (Supplementary Table 2)、pFastbac-Luc-gp64<sup>T3/A30Δ,G158S,Y172H,V181I,R191K</sup> を作製した。変異が導入されたことは上述のプライマーを用いてシーケンシングにより確認した。

d) pFastbac-Luc-gp64<sup>H4/M99L</sup>、pFastbac-Luc-gp64<sup>H4/H172Y</sup> の作製

H4GP64 のアミノ酸変異をもつウイルスを作製するため、pFastbac-Luc-gp64<sup>H4</sup> (関口、2020) をテンプレートとして、M99L、H172Y の変異を導入するプライマー (OL0119、OL0120、OL0121、OL0122) をそれぞれ用いて PCR により変異を導入した (Supplementary Table 3)。PCR 産物を T4PNK 処理した後、ライゲーションを行い、ライゲーション産物で DH5α を形質転換した。QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) を用い、説明書に従ってプラスミドを抽出、pFastbac-Luc-gp64<sup>H4/M99L</sup>、pFastbac-Luc-gp64<sup>H4/H172Y</sup> を得た。変異が導入された

ことはシーケンス用プライマー (Table 1-17 ~ 31) を用いて H4gp64 プロモーターと gp64 の全塩基配列をサンガーシーケンスにより確認した。

## 5-2. 各種 gp64 遺伝子復帰バクミドの作製

T3  $\Delta$  gp64 バクミド (小野, 2011) または H4  $\Delta$  gp64 バクミド (関口, 2020) と Tn7 トランスポゼースをコードするヘルパープラスミド pMON7124 を含む大腸菌 *E.coli* DH10B 株をエレクトロコンピテントセル化したものに、各種ドナープラスミド (Supplementary Table 4, Supplementary Fig. 4) を 200 ng 加え、エレクトロポレーション (200  $\Omega$ 、250  $\mu$ Fd、2.5 V) により形質転換を行い、その後 SOC 培地 (Appendix table 7) を 1 ml 加えて 37°C で 4 時間以上振盪培養することでトランスポゼースによる転移反応を誘導した。遠心分離 (3,000 rpm, 3 分, 4°C) 後、上清を少量残して除去し、菌体を懸濁したものに 30  $\mu$ l の X-gal 溶液および 30  $\mu$ l の IPTG 溶液を加え LB-Kan/Gen/Tet plate (Kanamycin 50  $\mu$ g/ml、Gentamycin 50  $\mu$ g/ml、Tetracycline 50  $\mu$ g/ml) (Appendix table 8) に塗布した。37°C で約 36 時間培養し、白いコロニーを選抜した。gp64 がノックアウトされていることは、プライマー (OL0123、OL0124、OL0577、OL0578)、gp64 がレスキューされていることは、プライマー (OL0579、OL0580) を用いたコロニー PCR により確認した。トランスポジション反応が起こったことはプライマー (Table 1-32、33) を用いた PCR で確認した (Supplementary Fig. 5)。

このコロニーを培養して QIAGEN Plasmid Mini Kit (Qiagen) により説明書に従いプラスミドを精製し、各 gp64 レスキューバクミド、ドナープラスミド、pMON7124 の混合物を得た。次にバクミドのみをもつ大腸菌株を得るため、この三種のプラスミド混合物 400 ng を DH10B エレクトロコンピテントセルにエレクトロポレーション (200  $\Omega$ 、250  $\mu$ Fd、2.5 V) し、LB-Kan (Kanamycin 50  $\mu$ g/ml) プレートに植菌した。生じたコロニーのうち LB-Amp、LB-Tet 感受性のものを選抜することで gp64 レスキューバクミドのみを含むコロニーを得た。この選抜コロニーを培養して QIAGEN Plasmid Midi Kit (Qiagen) を用いて説明書に従ってバクミド抽出を行い、各 gp64 遺伝子復帰バクミドを得た (Supplementary Table 4)。

## 5-3. BmN 細胞への各種 gp64 遺伝子復帰バクミドのトランスフェクション

6-well-plate (Iwaki) に 1 ウェルあたり  $1.0 \times 10^6$  個になるよう BmN 細胞を播種し、26°C で 2 時間培養した。無血清 TC-100 培地で 2 度洗浄した後、1 ml の無血清 TC-100

培地を加えた。XtremeGENE9 (Roche) 3  $\mu$ l と無血清 TC-100 培地 97  $\mu$ l の混合液 100  $\mu$ l を各種 GP64 遺伝子復帰バクミド (Supplementary Table 4) DNA 1  $\mu$ g を含む無血清 TC-100 培地 100  $\mu$ l と混合し、室温で 20 分間静置した。これを上記の 6-well-plate の培養細胞に加え、26°C で 6 時間培養した後、培地を全て除き、10% FBS を含む TC-100 培地 3 ml を加えて培養を続けた。TC-100 培地を加えた時間をトランスフェクション後 0 時間とした。トランスフェクション後 120 時間で培養上清を回収し、この上清を GP64 遺伝子復帰ウイルスとして実験に供試した (Supplementary Table 4)。

## 6. 膜融合試験プラスミドの作製

### a) Opie2 プロモーター制御下に緑色蛍光タンパク質 Gamillus を発現するプラスミド (Opie2-NLS-gamillus) の作製

膜融合試験の際、プラスミドがトランスフェクションされた細胞を緑色蛍光タンパク質 Gamillus (Shinoda *et al.*, 2017) の蛍光で観察するため、まずは Opie2 プロモーター制御下に核局在シグナル (NLS) を付加した Gamillus を発現するプラスミド (Opie2-NLS-gamillus) (Supplementary Fig. 6) を作製した。Gamillus はハナガサクラゲ *Olindias formosa* 由来の緑色蛍光タンパク質を改良した耐酸性の緑色蛍光タンパク質で、 $pK_a=3.4$  と低い  $pK_a$  を持ち、従来の GFP が pH 6.0 で蛍光が消失するのに対し、低 pH 条件での蛍光安定性が高く (Shinoda *et al.*, 2017)、低 pH 条件で処理する必要のある膜融合試験に適したタンパク質である。NLS には、BmNPV の IE 遺伝子のコドン頻度で最適化した SV40 核局在シグナル (PKKKRKV) の 5'末端に、黄色ショウジョウバエでの N 端融合型の NLS に多く使われている 2 アミノ酸を付加した配列 (MP PKKKRKV : 5'-ATGCCGCCGAAGAAGAAACGTAAGGTG-3') を用いた。Gamillus-pRSET<sub>B</sub> (Shinoda *et al.*, 2017) をテンプレートとして NLS 配列を付加したプライマーと Opie2 ターミネーターに相同配列をもつプライマー (OL0647、OL0648) を用いて PCR を行い、gamillus 遺伝子を増幅した。pIE2-EGFP-Luc (Mitsunobu *et al.*, 2006) を NLS を付加したプライマー (OL0649、OL0650) を用いて PCR で増幅し、PCR 産物同士を SLiCE 法で連結し、Opie2-NLS-gamillus を得た (Supplementary Fig. 6)。作製した Opie2-NLS-gamillus の Opie2 プロモーター、NLS、gamillus、Opie2 ターミネーターまでの配列はプライマー (OL0653、OL0654、OL0655、OL0656、OL0657、OL0658、OL0659、OL0660、OL0661、OL0662) を用いてシーケンシングにより確認した。

## b) 膜融合試験プラスミドの作製

SK16 プロモーター (小島, 1997) で制御される GP64 発現プラスミドがトランスフェクションされたかどうかを *Gamillus* の蛍光で測定するため、まず GP64<sup>T3</sup> と *Gamillus* を同時に発現するプラスミド pSK-gamillus-gp64<sup>T3</sup> を作製した。まず、6-a) で作製した Opie2-NLS-gamillus の Opie2 プロモーター、NLS、gamillus、Opie2 ターミネーターまでをプライマー (Table 1-50、51) を用いて PCR で増幅した。pSK-gp64<sup>T3</sup> (関口, 2020) を制限酵素 *Dra*III、*Psi* I で処理したものと増幅した PCR 産物を SLiCE 法で連結し、pSK-gamillus-gp64<sup>T3</sup> を得た。作製した pSK-gamillus-gp64<sup>T3</sup> の Opie2 プロモーター、NLS、gamillus、Opie2 ターミネーターまでの配列はプライマー (OL0653、OL0654、OL0655、OL0656、OL0657、OL0658、OL0659、OL0660、OL0661、OL0662) を用いてシーケンシングにより確認した。

次に、ドナープラスミド (Supplementary Table 5) をそれぞれテンプレートとして、プライマー (Table 1-52、53) を用いて PCR で gp64 の ORF 配列を増幅した。また、pSK-GP64<sup>Ac</sup> (関口, 2020) をプライマー (OL0127、OL0128) を用いて PCR で gp64 の ORF 配列をそれぞれ増幅した。前述で作製した pSK-gamillus-gp64<sup>T3</sup> を *Spe* I、*Pst* I で処理したものと増幅した PCR 産物を SLiCE 法で連結し、膜融合試験プラスミド 16 種類 (Supplementary Table 5, Supplementary Fig. 7) を得た。作製した各 pSK ベクターの gp64 の全塩基配列はプライマー (Table 1-17 ~ 31、56 ~ 63) を用いてシーケンシングにより確認した。

## c) 各 GP64 の膜融合活性の比較

24-well-plate (Iwaki) に無血清 TC-100 培地で 2 度洗浄した BmN 細胞を各ウェルあたり  $2.0 \times 10^5$  個になるように播種し、26°C で 2 時間静置した。GP64 発現プラスミド 17 種類 (Supplementary Table 5) 各 400  $\mu$ g を DNA1  $\mu$ g あたり FuGENE Transfection Reagent (Promega) 3  $\mu$ l の比率で混合し、BmN 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション後 48 時間で pH を 6.0、5.5、5.0、4.5、4.0、3.5 に調製した PBS 0.5 ml (Appendix table 9) に交換後 5 分間静置し、低 pH 処理を行った。無血清培地で 1 回洗浄し、終濃度が 0.25% になるように Hoechst を添加した 500  $\mu$ l の 10% 血清培地に交換し、遮光して 26°C で 1 時間培養した。2% PFA で細胞を固定し、共焦点レーザー顕微鏡 TCS SP5 (Leica) で撮影した。撮影した画像は、Python モジュールの OpenCV2 を用いて、Z-stack 画像からベストフォーカス画像を選択した。低 pH 処理により細胞同士が結合したシン

シンシウムに含まれる核の数は Fiji (ImageJ) (Schindelin *et al.*, 2012) を用いて測定した。pH 3.5 の条件で撮影した緑色蛍光画像について、Fiji で背景処理をしたのち二値化を行い、ROI Manager により膜融合試験プラスミドがトランスフェクションされ、シンシウムを形成した細胞の座標を抽出した。緑色蛍光画像で決定した各 ROI について青色蛍光画像を用いて Particle Analysis を行い、緑色蛍光細胞に含まれている核の数を測定し、核の数が 2 つ以上含まれていたものをシンシウムとした。膜融合試験で撮影した画像の画像処理のスク립トは Appendix Script にまとめた。

## 7. プラークアッセイとプラークサイズの定量

12-well-plate (Iwaki) に BmN 細胞を各ウェルあたり  $7.0 \times 10^5$  個になるように播種し、 $26^\circ\text{C}$  で 2 時間以上培養した。無血清 TC-100 培地で 2 度細胞を洗浄し、無血清 TC-100 培地で  $10^3 \sim 10^6$  に段階希釈したウイルス液を各ウェルあたり  $450 \mu\text{l}$  加えて  $26^\circ\text{C}$  で 1 時間培養した。その後ウイルス液を除き、2% SeaPlaque Agarose (Lonza) 10 ml と 20% 血清 2×TC-100 培地 10 ml の混合物をウェルあたり 1 ml 加えた。これを  $26^\circ\text{C}$  で培養し、4 日後に 0.15% ニュートラルレッドで細胞を染色した。形成されたプラークの数から plaque forming unit (PFU) / ml を算出した。染色後の細胞を蛍光実体顕微鏡 SteREOLumar V12 (ZEISS) を用いて、倍率 12 倍でウェル全体を撮影した。撮影した画像は、Fiji を用いて背景処理をしたのち、二値化を行い、Particle Analysis によりプラークの面積を定量した。

## 8. BmN 細胞およびカイコ個体におけるウイルス増殖の解析

### a) 培養上清中のウイルス DNA 量の定量

12-well-plate (Iwaki) に無血清 TC-100 培地で 2 度洗浄した BmN 細胞を各ウェルあたり  $4.0 \times 10^5$  個になるように播種し、 $26^\circ\text{C}$  で 2 時間培養した後、多重感染度 multiplicity of infection (MOI) = 1、となるように無血清 TC-100 培地で希釈したウイルス液をそれぞれのウェルに加えて  $26^\circ\text{C}$  で 1 時間培養した。その後、ウイルス液を除き、10% 血清 TC-100 培地をウェルあたり 1 ml 加え培養を続けた。血清培地を加えた時点を 0 時間とし、0、6、12、18、24、36、48、60、72、96 時間で培養上清を回収した。回収した培養上清のうち  $10 \mu\text{l}$  を等量の 0.1% SDS 溶液と混合し、 $95^\circ\text{C}$  で 5 分間熱変性を行い、氷中に 2 分間静置した後、遠心分離 (3,000 rpm, 10 分,  $4^\circ\text{C}$ ) を行った。この上清  $3 \mu\text{l}$  を  $1.2 \mu\text{l}$  の滅菌水、 $0.4 \mu\text{l}$  ずつのプライマー溶液 ( $10 \mu\text{M}$ )、 $5 \mu\text{l}$  の LightCycler 480 SYBR Green

I Master (Roche) を混合したものに加えて、Applied Biosystems ViiA 7 リアルタイム PCR システム (Applied biosystems) を用いて qPCR (95°C, 5 分/1 cycle, 95°C, 10 秒, 60°C, 10 秒, 72°C, 4 秒, / 40 cycles) でウイルスゲノム DNA 量を定量した。ウイルス DNA の定量には、ウイルスゲノム中で最も多い 4 つの *Dpn* I 認識部位を含む *gp41* 中の約 100 bp を増幅するプライマー (Table 1-34, 35) を用いた。スタンダードに *gp41* primer で BmGFP (小野、2011) を増幅した断片を TA クローニングで pGEM-Teasy ベクター (Promega) にクローニングしたものを段階希釈して用いた。

#### b) カイコ体液中のウイルス DNA 量の定量

各ウイルス液を無血清 TC-100 培地で希釈し、100 PFU 相当 (3 µl) を 5 齢起蚕の春嶺鍾月カイコに注射し、注射でできたカイコの傷が治った時点の注射後 3 時間を 0 時間とし、感染後 0 時間から 24、36、48、60、72、84、96、108、120、132、144 時間で各 8 個体から体液を採取した。体液は即座に滅菌水で 20 倍希釈し、遠心分離 (3,000 rpm, 3 分, 4°C) を行い、その上清をサンプルとし、前述と同様に反応を行い、LightCycler 480 System II (Roche) を用いて qPCR でウイルスゲノム DNA 量を定量した。

#### c) ルシフェラーゼアッセイ

BmN 細胞の感染実験で回収した培養上清を滅菌水で 2 倍希釈したサンプル 35 µl に Renilla-Glo Luciferase Assay Substrate/Buffer Reagent (Promega) を 35 µl 混合し、10 分間室温でインキュベートした後、GloMAX 96 Microplate Luminometer (Promega) を用いて、1 分間の発光量 (cps: counts/ second) を測定した。

カイコ体液の場合は、カイコ個体から採取した体液を滅菌水で 20 倍希釈し、遠心分離 (3,000 rpm, 3 分, 4 °C) を行い、その上清を 2 倍希釈したサンプルを用いて上述と同様の方法で発光量を測定した。

#### d) カイコの生存時間解析

各ウイルス液を無血清 TC-100 培地で希釈し、100 PFU 相当 (3 µl) をカイコに注射したものと、対照として無血清 TC-100 培地を 3 µl 注射したカイコをそれぞれ 12 匹ずつ用意し、時間経過での死亡数を計測し、記録した。カイコの背脈管の脈拍がない状態を死亡判定とした。統計解析ソフト R の Survival パッケージを用いて、生存時間解析を行った。

e) カイコの体重測定と病徴の撮影

各ウイルス液を 100 PFU 相当 (3  $\mu$ l) をカイコに注射したものと、対照として無血清 TC-100 培地を 3  $\mu$ l 注射したカイコの写真を 24 時間から 1 日おきに 7 日目まで撮影した。撮影と同時にカイコの体重を測定した。体重測定時に電子天秤のメモリをウェブカメラ (logicool HD1080p、300 万画素) で撮影し、物体検出のデータを作成するためのアノテーションツール labelImg (Tzutalin, 2015) ("LabelImg." GitHub Repository 6) により、電子天秤のメモリの数字の学習データを作成した。作成した学習データをもとに YOLOv5 (Jocher *et al.*, 2020) (<https://github.com/ultralytics/yolov5>) により深層学習を行い、天秤のメモリの数字を推論させ、カイコの体重とした。

Table 1 Oligonucleotide primers for PCR.

1	OL0573	5'- GCACCACACGTGCAACAAATCG -3'
2	OL0574	5'- GCAAAGTGATTGTTATTCTGCCGTTTC -3'
3	OL0575	5'- GCGGTCCGGTATATAAGATGCCTCAGGTACCATGCTACTAGT AAATCAGTCATACCAAGGCTTC -3'
4	OL0576	5'- GACACTCGTCGGTGTCTGTCGTGGCACTCGAGCTTGCTGTAC ATTTTCGAAGTAGAAATGCCGCATCGCCACGATTTG -3'
5	m1_for_primer_sekiguchi	5'- CATTCTGCCTTTGCGGCGGAG -3'
6	m1_rev_primer_sekiguchi	5'- CGCCGCCAAAAGCACGTATAAAAC -3'
7	OL0119	5'- ACTCTCCTGAATCGCACACAG -3'
8	OL0120	5'- GAAGCAGCTCCAGCCTACAC -3'
9	OL0121	5'- CTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATG -3'
10	OL0122	5'- GCGACTATCCATACGAAGCAGAC -3'
11	OL0123	5'- GCTACTAGTAAATCAGTCATACCAAGGCTTC -3'
12	OL0124	5'- GTACTCGAGCCTGCTGTACATTTTCG -3'
13	OL0577	5'- GCTGGATCCCAACACACGC -3'
14	OL0578	5'- GAGCCTCCGTTGTACGCATACG -3'
15	OL0579	5'- GTACCACACGTGCAACAAATCGTG -3'
16	OL0580	5'- GCAAAGTGATTGTTATTCTGCCGTTTC -3'
17	Seq-f1	5'- TAACAACGTGCCTTGTGTCAC -3'
18	Seq-f2	5'- TGGGCGTCCGTTTTCATAATCC -3'
19	Seq-r1	5'- TGAACGTAGACTTTTGTGTTGAGAATCATAC -3'
20	Seq-r2	5'- TGTCATCTTTAATGAGCAGACACG -3'
21	seq-f11_sekiguchi	5'- CCCATAAGCAAGTCGCTAATAATC -3'
22	seq-r11_sekiguchi	5'- GCGATCACGATGGCTATTTGGAAC -3'
23	seq-r12_sekiguchi	5'- CTTGGTATGACTGATTTACTAGTAGCATG -3'
24	seq-r13_sekiguchi	5'- GTACGGACCCGTTTTTCATTTGCG -3'
25	seq-f21_sekiguchi	5'- GTTTTTCGCGACAACGAAGGC -3'
26	seq-f22_sekiguchi	5'- GCGTGTCTGCTCATTAAGATGAC -3'
27	seq-f23_sekiguchi	5'- GTGGAATTGCAGGTTTAACAGATGC -3'
28	seq-f31_sekiguchi	5'- CACCAGTAATTGCTACAACAACAGC -3'
29	seq-r21_sekiguchi	5'- GCTGTTGTTGTAGCAATTACTGGTG -3'

30	seq-f32_sekiguchi	5'- GGATTCCGACCATCGGCAAC -3'
31	seq-r22_sekiguchi	5'- GTTGCCGATGGTTCGGAATCC -3'
32	pUC_M13primer_fw_sekiguchi	5'- CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG
33	pUC_M13primer_rv_sekiguchi	5'- AGCGGATAACAATTTACACACAGG
34	gp41_qPCR_fw_sekiguchi	5'- CAACACGTAGTGATAGTAATCGCCG
35	gp41_qPCR_rv_sekiguchi	5'- GCGTCGCTTTCCGCACATC
36	OL0647	5'- CTTATGCCGCCGAAGAAGAAACGTAAGGTGATGGTGAGCA AGGGCGAGGAG -3'
37	OL0648	5'- CGAGGAGAGGGTTAGGGATAGGCTTACCTTCGAACCGCGGT TACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG -3'
38	OL0649	5'- CGAAGGTAAGCCTATCCCTAACCCCTC -3'
39	OL0650	5'- CACCTTACGTTTCTTCTTCGGCGGCATAAGCTTTAAATTCGA ACAGATGCTGTTCAACTGTG -3'
40	OL0653	5'- GACGATATCCCGCAAGAGGC -3'
41	OL0654	5'- GTACGTGTCGGCAGTCACGTAG -3'
42	OL0655	5'- GACCAGCAAGATCGAGCTGAACG -3'
43	OL0656	5'- CTGCCTAACGAGGTGAAGATCAC -3'
44	OL0657	5'- CCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACG -3'
45	OL0658	5'- CTATGGAAAAACGCCAGCAACG -3'
46	OL0659	5'- CGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGG -3'
47	OL0660	5'- GTGATCTTCACCTCGTTAGGCAG -3'
48	OL0661	5'- CGTTCAGCTCGATCTTGCTGGTC -3'
49	OL0662	5'- CTACGTGACTGCCGACACGTAC -3'
50	pSK-psi1/Dra3-insert-f	5'- CCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTAGATCTCATGATGAT AAACAATGTATGGTGC -3'
51	pSK-psi1/Dra3-insert-r	5'- CCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTATTACCGCCTT TGAGTGAGCATC -3'

52	pSKgp64ORF-slice-f-sekiguchi	5'- GAAAGAAGAACTCACACACAAAGCTCGGATCCAAATGCTA CTAGTAAATCAGTCATACCAAGGCTTC -3'
53	pSKgp64ORF-slice-r-sekiguchi	5'- TTAGCTATTCACACAAGGCAGTCGACCTGCAGTTAATATTGT CTACTATTACGGTTTCTAACC -3'
54	OL0127	5'- GAAAGAAGAACTCACACACAAAGCTCGGATCCAAATGGTA AGCGCTATTGTTTTATATGTG -3'
55	OL0128	5'- TTAGCTATTCACACAAGGCAGTCGACCTGCAGTTAATATTGT CTATTACGGTTTCTAATCATAACAG -3'
56	OL0141	5'- CAAGGAAACGCTGCAAAAGGACG -3'
57	OL0142	5'- CTTCGAAAATGTACAGCAGGCTCG -3'
58	OL0143	5'- GAGGAGCTGATGTACGAAAACG -3'
59	OL0144	5'- GCAACCTCATAACCACCATGGAGAAC -3'
60	OL0145	5'- CGTCCTTTTGCAGCGTTTCCTTG -3'
61	OL0146	5'- CGAGCCTGCTGTACATTTTCGAAG -3'
62	OL0147	5'- CGTTTTTCGTACATCAGCTCCTC -3'
63	OL0148	5'- GTTCTCCATGGTGGTTATGAGGTTGC -3'

### Ⅲ. 結果

GP64 は宿主細胞への侵入（レセプター結合・膜融合）、出芽を担う、バキュロウイルスの生活環に必須な遺伝子である（Zhou and Blissard, 2008、Blizzard and Wenz, 1992、Oomens and Blissard, 1998、Blizzard and Theilmann, 2018）。石川(2016) は、GP64 を T3 株と H4 株で交換したキメラウイルスの増殖が細胞およびカイコで変化することを示し、GP64 が T3 株と H4 株の増殖特性の違いに関与する遺伝子であることを明らかにした。T3 株、H4 株の GP64 には 6 箇所のアミノ酸多型が存在する（酒井、2012）。この 6 つのアミノ酸残基のうちの 1 つである GP64<sup>T3</sup> の 172 番目の Y を H4 型の H に置換したウイルス BT3/GP64<sup>T3/Y172H</sup> は、T3 株と比較してカイコでの増殖が低く、感染カイコの生存時間も長くなった（Sekiguchi *et al.*, 2020）。よって、これら 6 つのアミノ酸多型が単独もしくは組み合わせにより T3 株と H4 株の増殖特性の違いに関与していると示唆された。本研究では、T3 株と H4 株の GP64 におけるアミノ酸多型と増殖特性の関係を明らかにするため、1) 膜融合活性、2) プラークサイズ、3) BmN 細胞での増殖と組換えタンパク質発現、4) カイコ個体での増殖と組換えタンパク質発現、5) ウイルス感染カイコの生存時間・体重について GP64 アミノ酸多型の影響を評価した。

#### 1. BmNPV と Group I アルファバキュロウイルスの GP64 のアミノ酸配列のアライメント

T3 株と H4 株の GP64 の 6 つのアミノ酸多型が BmNPV や他のバキュロウイルスで保存されているかを比較する目的で、T3 株、H4 株を含む BmNPV とその他の Group I アルファバキュロウイルスの GP64 の配列を比較した (Fig.1、Table 2、Supplementary Fig. 1、Supplementary Table 1)。T3 株と H4 株の GP64 の 6 つのアミノ酸多型すべてにおいて、BmNPV では T3 型が広く保存されていた。A30 の周辺の配列は保存性が低く、アラニンの数やアミノ酸配列に多様性が見られた。L99 は H4 株以外の BmNPV、バキュロウイルスで保存されており、L99M は BmNPV の中で H4 株のみが獲得した特徴的なアミノ酸残基であった。G158 の位置は、H4 株と韓国で分離された BmNPV C2 株のみがシステインであった。Y172 は H4 株を除くすべての BmNPV で保存されているが、BmNPV 以外のバキュロウイルスの多くは H4 型のヒスチジンが保存されていた。V181 は、H4 株、C2 株、ラオスで分離された BmNPV La 株、また AcMNPV E2 株、C6 株、PxMNPV CL3 株、BomaNPV S2 株においてイソロイシンへと置換されていた。R191 は、

H4 株、C2 株、PxMNPV CL3 株、EppoMNPV においてリシンへと置換されていた。これらの結果から、H4 株がもつ 6 つのアミノ酸多型は他の BmNPV 系統と比較して H4 株特異的であることが示唆された。

## 2. BmNPV の近縁ウイルスの系統樹推定

H4 株はどのような進化的経路をたどったかを推定する目的で、H4 株、T3 株を含む BmNPV 各株と、BomaNPV、アウトグループとして AcMNPV、PxMNPV のゲノムの系統樹を最尤法により推定した (Fig.2、Table 3)。H4 株は T3 株と近縁であり、6 つのアミノ酸多型のうち 3 つを GP64<sup>H4</sup> と共有した BmNPV C2 株より進化的に近縁であると推定された。また、カイコの野生種であるクワコに感染するウイルス BomaNPV S1 株は系統的に BmNPV と近縁であると推定された。

## 3. GP64<sup>T3</sup> の立体構造予測

T3 株と H4 株の 6 つのアミノ酸多型が GP64 の構造上のどの位置に存在するのかを突き止めるため、GP64<sup>T3</sup> の立体構造をタンパク質の構造予測ツールである AlphaFold2 (Jumper *et al.*, 2021) を用いて予測し、6 つのアミノ酸多型の位置を予測された構造上に示した (Fig.3-(a)、(b))。A30 はシグナルペプチド上の疎水性領域に存在し、残り 5 つのアミノ酸残基はすべて GP64 のドメイン I 上に存在した (Fig.3-(a)、(b))。先行研究で、BmNPV の GP64 のシグナルペプチドは切断されずにウイルス粒子に取り込まれる可能性が示唆されており (Hao *et al.*, 2022)、シグナルペプチドも含めて表示した。GP64 のドメイン I は 2 つのサブドメインに分けられ、βバレル構造からなるドメイン I b とレセプター結合や膜融合に関わる fusion loop1、2 を含むドメイン I a に分けられる (Backovic and Jardetzky, 2009)。L99、G158、Y172 は GP64 のドメイン I a に存在し、特に L99 は fusion loop1 に存在した (Fig.3-(c))。また、Y172 は fusion loop2 の近傍に存在し、膜融合やレセプター結合に重要なアミノ酸に隣接していた (Fig.3-(c))。V181、R191 はドメイン I b 上に存在した。

## 4. GP64 変異組み合わせウイルスの作製理由

GP64 のアミノ酸配列アライメントとの構造予測の結果から、H4 株特異的なアミノ酸多型の組み合わせ、他の BmNPV やバキュロウイルスと共通しているアミノ酸多型の組み合わせ、GP64 の構造上重要な位置に存在するアミノ酸残基を中心に GP64 変異組み

合わせウイルスを作製した。本研究で作製した GP64 変異ウイルス（または変異 GP64 発現プラスミド）のアミノ酸多型の組み合わせ (Fig.4) と作製理由を以下に示す。

- BT3/GP64<sup>T3/L99M,Y172H</sup> : L99M、Y172H はともに BmNPV の中では H4 株のみが獲得した H4 株特異的なアミノ酸残基であり (Fig.1、Supplementary Fig. 1)、99 番目のロイシン、172 番目のヒスチジン残基にあたるアミノ酸 (AcMNPV の GP64 の L82、H155 に相当) は fusion loop やその近傍に存在し (Fig.3)、宿主のレセプターとの結合や膜融合に関与する (Kadlec *et al.*,2008、Li and Blissard, 2011、Dong and Blissard, 2012)。また、これら 2 つのアミノ酸を単独で T3 型から H4 型へ置換すると T3 株の増殖に大きく影響した (関口、2020、Sekiguchi *et al.*, 2020)。
- BT3/GP64<sup>T3/Y172H,V181I</sup> : T3 株と H4 株の GP64 がもつ 6 つのアミノ酸多型の位置に限定した場合、AcMNPV、PxMNPV、BomaNPV S2 株がもつアミノ酸多型の組み合わせである (Fig.1)。
- BT3/GP64<sup>T3/G158S,V181I,R191K</sup> : T3 株と H4 株の GP64 がもつ 6 つのアミノ酸多型の位置に限定した場合、韓国で分離された BmNPV C2 株に見られる変異の組み合わせである。(Fig.1)
- BT3/GP64<sup>T3/A30Δ,G158S,V181I,R191K</sup> : T3 株と H4 株の GP64 がもつ 6 つのアミノ酸多型の中で、機能が未知のアミノ酸多型の組み合わせであり、同時に BT3/GP64<sup>T3/G158S,V181I,R191K</sup> に A30 Δ を追加した組み合わせでもある。
- BT3/GP64<sup>T3/A30Δ,G158S,Y172H,V181I,R191K</sup> : H4 株の GP64 が H4 株特異的なアミノ酸残基 M99 (Fig.1) を獲得する前の祖先ウイルスの配列であると考えられる。
- BH4/GP64<sup>H4/M99L</sup> : H4 株が特異的に獲得したアミノ酸残基である M99 (Fig.1、Supplementary Fig. 1) が H4 株の増殖に与える影響を調査する。
- BH4/GP64<sup>H4/H172Y</sup> : BmNPV のなかで H4 株が特異的に獲得したアミノ酸残基である H172 (Fig.1、Supplementary Fig. 1) が H4 株の増殖へ与える影響を調査する。

## 5. 膜融合活性試験

エンベロープを持つウイルスは膜融合タンパク質による膜融合を介して宿主細胞へ侵入するため、膜融合活性はウイルスの増殖に影響を与える (Fredericksen and Whitt, 1995、Jeetendra *et al.*, 2003、Samal *et al.*, 2013、Ji *et al.*, 2017、Dreier *et al.*, 2019)。そこで本研究でも膜融合活性の強さにアミノ酸多型が影響するかを検証した。GP64<sup>T3</sup>、GP64<sup>H4</sup>、

GP64<sup>T3</sup>に変異導入して作製した変異体 11 種類 (GP64<sup>T3/A30Δ</sup>、GP64<sup>T3/L99M</sup>、GP64<sup>T3/G158S</sup>、GP64<sup>T3/Y172H</sup>、GP64<sup>T3/V181I</sup>、GP64<sup>T3/R191K</sup>、GP64<sup>T3/L99M,Y172H</sup>、GP64<sup>T3/Y172H,V181I</sup>、GP64<sup>T3/G158S,V181I,R191K</sup>、GP64<sup>T3/A30Δ,G158S,V181I,R191K</sup>、GP64<sup>T3/A30Δ,G158S,Y172H,V181I,R191K</sup>)、GP64<sup>H4</sup>に変異導入した変異体 2 種類 (GP64<sup>H4/M99L</sup>、GP64<sup>H4/H172Y</sup>)、pH5.0 での膜融合が確認されている AcMNPV の GP64 を発現する各プラスミドを用いて GP64 を BmN 細胞に発現させた。GP64 発現プラスミド導入 BmN 細胞を pH 6.0、5.5、5.0、4.5、4.0、3.5 の PBS 緩衝液で処理し、①シンシチウム形成 pH (シンシチウムが形成される最も高い pH; Blissard and Wenz, 1992、Katou *et al.*, 2010)、②シンシチウム内核数 (pH3.5 における 1 シンシチウムあたりの核の数; Li and Blissard, 2009、Yu *et al.*, 2016、Yu *et al.*, 2020) の 2 指標を膜融合活性の指標として比較した。シンシチウム形成 pH は各 GP64 の pH 感受性を、シンシチウム内核数は膜融合能の強度の指標とした。

GP64<sup>T3</sup>、GP64<sup>H4</sup> は pH4.0 で膜融合が観察され (Fig.5-(a))、これは先行研究 (角谷、2006、石川、2016) の結果と一致した。次に、GP64<sup>T3</sup> 改変変異体について比較した。BT3/GP64<sup>T3/Y172H</sup>、BT3/GP64<sup>T3/L99M,Y172H</sup>、BT3/GP64<sup>T3/Y172H,V181I</sup> が一番シンシチウム形成 pH が高く、pH 5.0 でシンシチウムが観察された。BT3/GP64<sup>T3/Y172H</sup> は Katou *et al.*, (2010) における Bm-GP64-Y153 に相当し、このアミノ酸を T3 型のチロシンからヒスチジン (=H4 型、AcGP64H155 に相当) に置換すると、膜融合する pH が 3.75 から 5.0 になると報告されており、今回の結果でも一致していた。2 番目にシンシチウム形成 pH が高かった変異体は、GP64 のアミノ酸多型組み合わせ変異体である BT3/GP64<sup>T3/A30Δ,G158S,Y172H,V181I,R191K</sup> であり、pH 4.5 で膜融合が観察された (Fig.5-(a))。膜融合が pH4.0 で観察された変異体は、BT3/GP64<sup>T3/A30Δ</sup>、BT3/GP64<sup>T3/G158S</sup>、BT3/GP64<sup>T3/V181I</sup> の 3 つであった。pH3.5 でシンシチウムが観察された変異体は、BT3/GP64<sup>T3/L99M</sup>、BT3/GP64<sup>T3/R191K</sup>、BT3/GP64<sup>T3/G158S,V181I,R191K</sup>、BT3/GP64<sup>T3/A30Δ,G158S,V181I,R191K</sup> の 4 種類であった。GP64<sup>H4</sup> 改変変異体では、BH4/GP64<sup>H4/M99L</sup> のシンシチウム形成 pH が一番高く、pH5.0 でシンシチウムが観察された (Fig.5-(a))。一方、BH4/GP64<sup>H4/H172Y</sup> はシンシチウム形成 pH が低く、pH3.5 でシンシチウムが観察された (Fig.5-(a))。これらの結果から、BT3/GP64<sup>T3/Y172H</sup> をもつ GP64 変異体の膜融合活性が高く、L99M、R191K を含む変異体の膜融合活性は低かった。

シンシチウム内核数の比較では、含まれる核数が多いほど膜融合活性が高いと評価した。BH4/GP64<sup>H4/M99L</sup>、BT3/GP64<sup>T3/A30Δ,G158S,Y172H,V181I,R191K</sup> は 1 シンシチウム中に含まれ

る核の数の中央値がそれぞれ 5 個、4.5 個であり、GP64T3 と比較して膜融合活性が有意に高かった (Fisher の正確検定  $p$  値=0.01、0.04) (Fig.5-(b))。1 シンシチウム中に含まれる核の数の中央値が 4 個の GP64 変異体は BT3/GP64<sup>T3/L99M,Y172H</sup>、BT3/GP64<sup>T3/Y172H</sup>、BT3/GP64<sup>T3/Y172H,V181I</sup>、H4GP64 であった (Fig.5-(b))。1 つのシンシチウムに含まれる核の数が 3 個の変異体は GP64<sup>T3</sup>、BT3/GP64<sup>T3/A30Δ</sup>、BT3/GP64<sup>T3/G158S</sup>、BT3/GP64<sup>T3/V181I</sup>、BT3/GP64<sup>T3/R191K</sup> であり、GP64<sup>T3</sup> と同程度の膜融合活性を示した (Fig.5-(b))。BT3/GP64<sup>T3/L99M</sup>、BT3/GP64<sup>T3/G158S,V181I,R191K</sup>、BT3/GP64<sup>T3/A30Δ,G158S,V181I,R191K</sup>、BH4/GP64<sup>H4/H172Y</sup> はシンシチウムに含まれる核の数が 3 個以下であり、GP64<sup>T3</sup> と比較して有意に膜融合活性が低かった ( $p$  値=0.04、0.04、0.01、0.02) (Fig.5-(b))。

シンシチウム形成 pH とシンシチウム内核数には高い正の相関 (相関係数=0.87) があり、膜融合が可能となる pH が高いほど、1 シンシチウム内の核の数が多くなる傾向が見られた (Fig.5-(c))。

## 6. GP64 変異組み合わせウイルスのプラークサイズの比較

GP64 のアミノ酸置換によってウイルスが形成するプラークサイズが変化することが報告されており、H4 株の GP64 に存在するアミノ酸残基 H172 に相当するアミノ酸置換を持たせた BmNPV はプラークのサイズが大きくなることが示されている (Katou *et al*, 2010)。そこで本研究で作製した GP64 変異体ウイルスについても感染後 96 時間後のプラークの面積を測定した (Fig.6-(a)、(b)、(c))。BT3 control virus、BH4 control virus のプラーク面積の中央値はそれぞれ 40905.74  $\mu\text{m}^2$ 、35509.20  $\mu\text{m}^2$  であり、BT3 control virus の方が 1.2 倍大きかったが統計的に有意差ではなかった (Fisher の正確検定、 $p$  値= 0.25) (Fig.6-(a)、(b))。H4 株は T3 株よりプラークサイズが小さいウイルスとして分離されたが (角谷、2006)、本研究での結果は角谷の結果と一致しなかった。

次に、BT3 control virus と T3 系統の GP64 変異組み合わせウイルスが形成したプラークの面積を比較すると、BT3/GP64<sup>T3/Y172H</sup>、BT3/GP64<sup>T3/L99M,Y172H</sup>、BT3/GP64<sup>T3/A30Δ,G158S,Y172H,V181I,R191K</sup> は有意差はないが BT3 control virus よりプラークサイズが大きかった (それぞれ 1.2 倍、1.3 倍、1.4 倍 (Fisher の正確検定  $p$  値=0.16、0.69、0.91)) (Fig.6-(b)、(c))。これら 4 つの変異体以外は BT3 control virus よりもプラーク面積が小さく、GP64<sup>T3/A30Δ</sup> (0.61 倍)、GP64<sup>T3/L99M</sup> (0.08 倍)、GP64<sup>T3/G158S</sup> (0.53 倍)、GP64<sup>T3/V181I</sup> (0.57 倍)、GP64<sup>T3/R191K</sup> (0.34 倍)、GP64<sup>T3/Y172H,V181I</sup> (0.62 倍)、GP64<sup>T3/G158S,V181I,R191K</sup> (0.18

倍)、GP64<sup>T3/A30Δ,G158S,V181I,R191K</sup> (0.21 倍) は BT3 control virus よりプラークの面積が有意に小さかった ( $p$  値<0.05) (Fig.6-(b)、(c))。またプラークサイズが小さくなったアミノ酸の組み合わせ BT3/GP64<sup>T3/L99M</sup>、BT3/GP64<sup>T3/A30Δ,G158S,V181I,R191K</sup>、GP64<sup>T3/V181I</sup> に Y172H 変異を加えた BT3/GP64<sup>T3/L99M,Y172H</sup>、BT3/GP64<sup>T3/A30Δ,G158S,Y172H,V181I,R191K</sup>、GP64<sup>T3/Y172H,V181I</sup> のプラークサイズは Y172H がない場合よりも大きくなった (それぞれ 14.8 倍、6.0 倍、1.1 倍) (Fig.6-(b)、(c))。このことから、T3 系統の GP64 変異ウイルスでは、Y172H 変異はプラークサイズを大きくし、その他の変異はプラークを小さくすることが示唆された。

H4 系統の GP64 変異ウイルスでは、BH4/GP64<sup>L99M</sup>、BH4/GP64<sup>T3</sup> のプラークは BH4 control virus と同等の大きさであった (1.11 倍、 $p$  値=0.28、0.93 倍、 $p$  値=0.76)。BH4/GP64<sup>H4/H172Y</sup> は BH4 control virus より有意に小さいプラークを形成した (0.11 倍、 $p$  値=2.26×10<sup>-62</sup>) (Fig.6-(b)、(c))。

これらプラーク面積と膜融合活性の指標とした①シンシチウム形成 pH、②シンシチウム内核数の間の相関係数はそれぞれ 0.89、0.77 であり、膜融合活性が高い GP64 をもつウイルスのプラークは大きく (Fig.6-(d)、(e))、また、Y172H 置換がプラーク面積の増加に寄与していた (Fig.6-(a)、(b)、(c))。

7. GP64 変異組み合わせウイルスの BmN 細胞での増殖と組換えタンパク質発現  
次にウイルス増殖にも GP64 アミノ酸多型が影響するか評価した。これまでに膜融合活性が高い GP64 をもつ BT3/GP64<sup>T3/Y172H</sup> は T3 より培養細胞での増殖が高いことが報告されている (Katou *et al.*, 2010、Sekiguchi *et al.*, 2020)。

#### a) 培養細胞での GP64 変異組み合わせウイルスの増殖の比較

MOI=1 で GP64 変異組み合わせウイルス 17 種類を細胞に接種し、ウイルスの増殖を qPCR によるウイルスゲノム DNA を定量することで解析した (Fig.7-(a) ~ (g))。コントロールウイルス BT3 control virus、BH4 control virus、キメラウイルス BT3/GP64<sup>H4</sup>、BH4/GP64<sup>T3</sup> の間に有意な増殖の差はなかった ( $p$  値>0.05、ステューデントの  $t$  検定) (Fig.7-(a)、(b))。T3 系統の GP64 変異のウイルス 11 種類の増殖も BT3 control virus と比較して有意な差はなく ( $p$  値 > 0.05、ステューデントの  $t$  検定)、BT3 control virus の増殖量と同等か、BT3 control virus よりやや低かった (Fig.7-(a)、(c) ~ (f))。H4 系統の GP64 変異ウイルス 2 種類の増殖を BH4 control virus と比較した。BH4/GP64<sup>H4/M99L</sup> は

BH4 control virus と同等の増殖を示した。一方、BH4/GP64<sup>H4/H172Y</sup> は BH4 control virus の約 100 分の 1 と有意に低い増殖を示した ( $p$  値<0.050、ステューデントの  $t$  検定) (Fig.7-(a)、(g))。

ここまでの結果をまとめると、BH4/GP64<sup>H4/H172Y</sup> のみがコントロールウイルス BH4 control virus と比較して顕著に低い増殖を示し、それ以外の GP64 変異ウイルスすべてにおいて BT3 control virus と増殖に有意な差は見られなかった (Fig.7-(a)~(g))。

培養細胞でのウイルスの増殖と膜融合活性の相関を、シンシチウム形成 pH、シンシチウム内核数の 2 種類との間で評価した。ウイルス感染後早いタイムポイントとウイルス増殖がプラトーに達した 72 時間以降のタイムポイントではウイルスの増殖と膜融合活性には相関は見られなかった。ウイルスの感染が進み、子孫ウイルスが培養上清中に十分蓄積した時間帯であると考えられるウイルス感染後 36~60 時間においては、ウイルスの増殖量と膜融合活性には正の相関がみられた (Fig.7-(i)、Table 4)。また、ウイルスの増殖と形成されたプラークの大きさにもウイルス感染後 36~72 時間において、正の相関があった (Fig.7-(i)、Table 4)。

#### b) 培養細胞での GP64 変異組み合わせウイルスのルシフェラーゼ発現量の比較

バキュロウイルスはポリヘドリンプロモーターの高発現能を利用したタンパク質発現ベクターとして利用されている (Smith *et al.*, 1983、Miyajima *et al.*, 1987)。GP64 のアミノ酸多型の組み合わせが培養細胞での組換えタンパク質発現ベクターとしての性質に影響を与えるか、多角体遺伝子プロモーターから発現する分泌型ルシフェラーゼ (Markova *et al.*, 2004) 活性によって評価した。ウイルス感染後 48 時間、72 時間で培養上清を回収し、培養上清中の分泌型ルシフェラーゼの活性を測定した (Fig.7-(h))。

感染後 48 時間において BT3/GP64<sup>T3/A30Δ,G158S,Y172H,V181I,R191K</sup>、BT3/GP64<sup>T3/A30Δ,G158S,V181I,R191K</sup> は T3 control virus よりルシフェラーゼ活性が有意に増加した。ルシフェラーゼ発現量が有意に減少したのは、BH4 control virus、BT3/GP64<sup>T3/Y172H</sup>、BT3/GP64<sup>T3/V181I</sup>、BH4/GP64<sup>H4/H172Y</sup> であった。感染後 72 時間において、BT3 control virus と比較してルシフェラーゼ活性が有意に増加した GP64 変異ウイルスは、BH4/GP64<sup>T3</sup>、BT3/GP64<sup>T3/A30Δ,G158S,Y172H,V181I,R191K</sup>、BH4/GP64<sup>H4/M99L</sup> の 3 種類であった。ルシフェラーゼ発現量が有意に減少したのは、BT3/GP64<sup>T3/L99M</sup>、BT3/GP64<sup>T3/R191K</sup>、BT3/GP64<sup>T3/A30Δ,G158S,V181I,R191K</sup>、BH4/GP64<sup>H4/H172Y</sup> であった。

培養細胞におけるウイルスの増殖とルシフェラーゼ活性の間の相関を、全タイムポイ

ントのウイルスの増殖量とウイルス感染後 48 時間、72 時間での培養上清中のルシフェラーゼ活性を用いて評価した。ウイルス感染後 36 ~ 60 時間のウイルス増殖と感染後 72 時間後のルシフェラーゼ発現量には正の相関がみられた。その他のタイムポイントでは、相関関係はみられなかった (Fig.7-(i)、Table 4)。

## 8. GP64 組み合わせウイルスのカイコでの増殖と組換えタンパク質発現

先行研究では、培養細胞での BmNPV 増殖は必ずしもそれらウイルスのカイコ個体での増殖と相関しないことを示されており (Sekiguchi *et al.*, 2020)、本研究でも GP64 のアミノ酸多型の組み合わせウイルスのカイコ幼虫での増殖を評価した。また、カイコ体液への組換えタンパク質分泌についても評価した。

### a) カイコでの GP64 変異組み合わせウイルスの増殖の比較

作製した GP64 変異組み合わせウイルス計 17 種類をカイコ 5 齢起蚕幼虫の血体腔に 1 匹あたり 100 PFU 相当量注射し、カイコの体液中のウイルスゲノム DNA 量を qPCR で定量し、増殖を比較した (Fig.8-(a)~(g))。ウイルス 17 種類すべての体液中ウイルス DNA 量は感染後 24 時間から 72 時間まで増加し、その後 96 時間までは増加せず、感染後 96 時間以降に再度、増加する傾向を示した (Fig.8-(a)~(g))。BH4 control virus のウイルス量は BT3 control virus より感染後 36 時間では 18 倍高かった ( $p$  値=0.007)。また、感染後 108 時間では 4.9 倍、120 時間では 2.5 倍、132 時間では 4.6 倍の増殖を示した。(Fig.8-(a)、(b)) これらの結果は角谷 (2006) の結果を支持するものであった。

H4 株の GP64 をもつ T3 系統であるキメラウイルス BT3/GP64<sup>H4</sup> は、BT3 control virus と同等の増殖を示した。一方、T3 株の GP64 をもつ H4 系統であるキメラウイルス BH4GP64<sup>T3</sup> は感染後 36 ~ 48 時間で BH4 control virus より有意に増殖が高く、その他のタイムポイントにおいては、BH4 control virus と同等の増殖を示した。(Fig.8-(a)、(b))。

次に、T3 系統の GP64 変異組み合わせウイルス 11 種類の増殖をそれぞれ BT3 control virus と比較した。BT3 control virus より有意に増殖が低かった変異体は BT3/GP64<sup>T3/Y172H</sup> のみであった。残りの GP64 変異ウイルス 10 種類の増殖は、BT3 control virus と同等か、BT3 control virus より高い増殖を示した (Fig.8-(a)、(c)~(f))。感染後早いタイムポイントで BT3 control virus より有意に増殖が増加したのは、1 アミノ酸置換変異ウイルスでは BT3/GP64<sup>T3/L99M</sup>、BT3/GP64<sup>T3/V181I</sup>、BT3/GP64<sup>T3/R191K</sup> の 3 種類、組みあわせウイルスでは BT3/GP64<sup>T3/L99M,Y172H</sup>、BT3/GP64<sup>T3/G158S,V181I,R191K</sup>、BT3/GP64<sup>T3/A30A,G158S,V181I,R191K</sup>、

BT3/GP64<sup>T3/A30Δ,G158S,Y172H,V181I,R191K</sup> の 4 種類であった。また、感染後早いタイムポイントで増殖が高い変異体ウイルスは、感染後遅いタイムポイントでも増殖が高い傾向が見られた。BT3/GP64<sup>T3/A30Δ</sup>、BT3/GP64<sup>T3/G158S</sup> は BT3 control virus と同等の増殖を示した (Fig.8-(a)、(c)~(f))。

H4 系統の GP64 変異ウイルス 2 種類の増殖を BH4 control virus と比較した。BH4/GP64<sup>H4/M99L</sup>、BH4/GP64<sup>H4/H172Y</sup> とともに BH4 control virus より有意に高い増殖を示した (Fig.8-(a)、(g))。

これらの結果を総合すると、カイコでのウイルス増殖は、H4 系統のウイルス 4 種類の増殖は、すべて BT3 control virus よりも顕著に高かった。BT3 control virus と比較して顕著に増殖が高かった変異体は、1 アミノ酸置換変異ウイルスでは BT3/GP64<sup>T3/L99M</sup>、BT3/GP64<sup>T3/V181I</sup>、BT3/GP64<sup>T3/R191K</sup> の 3 種類、組みあわせウイルスでは BT3/GP64<sup>T3/L99M,Y172H</sup>、BT3/GP64<sup>T3/G158S,V181I,R191K</sup>、BT3/GP64<sup>T3/A30Δ,G158S,V181I,R191K</sup>、BT3/GP64<sup>T3/A30Δ,G158S,Y172H,V181I,R191K</sup> の 4 種類であった。BT3 control virus と比較してウイルスの増殖が低下した変異体は、BT3/GP64<sup>T3/Y172H</sup> の 1 種類であった (Fig.8-(a)~(g))。

ウイルスのカイコでの増殖と膜融合活性の相関を、ウイルス感染後全タイムポイントでの増殖と膜融合活性の指標とした①シンシチウム形成 pH、②pH3.2 におけるシンシチウム内核数を用いて評価した。その結果、感染後 24~48 時間において、シンシチウム形成 pH とカイコでのウイルス増殖には弱い負の相関がみられ、膜融合活性が高くなると、カイコでの増殖が減少する傾向があると示唆された (Fig.8-(i)、Table 5)。しかし、感染後 60~120 時間では、ウイルスの増殖と膜融合活性に相関は見られなかった (Fig.8-(i)、Table 5)。

#### b) カイコでの GP64 変異組み合わせウイルスのルシフェラーゼ発現量の比較

上記ウイルス DNA 量を測定した体液の内、96 時間、108 時間、120 時間に関して分泌型ルシフェラーゼの活性化を測定し、これらウイルスの組換えタンパク質を測定した (Fig.8-(h))。

感染後 96~120 時間において、BT3 control virus と比較して有意にルシフェラーゼ発現量が高い GP64 変異ウイルスは、BH4 control virus、キメラウイルス BH4/GP64<sup>T3</sup>、BH4/GP64<sup>H4/M99L</sup>、BH4/GP64<sup>H4/H172Y</sup>、BT3/GP64<sup>T3/A30Δ,G158S,V181I,R191K</sup> の 5 種類であった。また、感染後 96~120 時間において BT3 control virus と比較して有意にルシフェラーゼ発現量が低かったのは、BT3/GP64<sup>T3/Y172H</sup>、BT3/GP64<sup>T3/Y172H,V181I</sup> であった。

ここまでの結果をまとめると、H4 系統のウイルス 4 種類すべてのルシフェラーゼ発現量は BT3 control virus より高かった。また、T3 系統の GP64 変異ウイルスでは BT3/GP64<sup>T3/A30Δ,G158S, V181I,R191K</sup> が BT3 control virus よりもルシフェラーゼ発現量が高く、BT3/GP64<sup>T3/Y172H</sup>、BT3/GP64<sup>T3/Y172H,V181I</sup> はルシフェラーゼ発現量が低かった。(Fig.8-(h))。

ウイルスの増殖とルシフェラーゼ発現量に相関があるかを、ウイルス感染後 24 ~ 120 時間における増殖とウイルス感染後 96 ~ 108 時間のルシフェラーゼ発現量で検証した。その結果、ウイルスの感染後 36 ~ 48 時間、96 ~ 120 時間においてウイルスの増殖量とルシフェラーゼ発現量に正の相関が見られた (Fig.8-(i)、Table 5)。よって、カイコでのウイルス増殖が高いと、ポリヘドリンプロモーター下流の遺伝子の発現量が多くなることが示唆された。

## 9. 生存時間解析

GP64 変異によってカイコ個体でのウイルス増殖の違いが生まれ、更にカイコの生存時間に影響を与えるか、ウイルス増殖と生存時間との相関を調べるため、ウイルスを注射したカイコを注射後 125 時間から 1 分おきにカイコを撮影して死亡時刻を記録し、生存時間解析を行った (Fig.9-(a))。BT3 control virus、BH4 control virus を感染させたカイコの生存時間に差はなく (ログランク検定、 $p$  値=0.74)、この結果は角谷 (2006)、石川 (2016)、関口 (2020) の結果と一致した (Fig.9-(a))。また、GP64<sup>H4</sup> をもつ T3 系統であるキメラウイルス BT3/GP64<sup>H4</sup> は、BT3 control virus と生存時間に差はなかった ( $p$  値=0.19) (Fig.9-(a))。GP64<sup>T3</sup> をもつ H4 系統であるキメラウイルス BH4/GP64<sup>T3</sup> は BH4 control virus より有意に生存時間が短かった ( $p$  値=0.03) (Fig.9-(a))。

次に、T3 系統の GP64 変異のウイルス 11 種類をそれぞれ感染させたカイコの生存時間を BT3 control virus を感染させたカイコと比較した (Fig.9-(b)~(e))。BT3 control virus を感染させたカイコと比較して有意に生存時間が短かった変異ウイルスは、1 アミノ酸置換ウイルスでは BT3/GP64<sup>T3/L99M</sup> ( $p$  値=0.008)、BT3/GP64<sup>T3/G158S</sup> ( $p$  値=0.007)、BT3/GP64<sup>T3/R191K</sup> ( $p$  値=0.03)、組み合わせウイルスでは BT3/GP64<sup>T3/A30ΔG158S,V181I,R191K</sup> ( $p$  値=0.002)、BT3/GP64<sup>T3/G158S,V181I,R191K</sup> ( $p$  値=0.004) の 5 種類であった。生存時間が BT3 control virus を感染させたカイコより有意に長かった変異ウイルスは、1 アミノ酸置換ウイルスでは BT3/GP64<sup>T3/Y172H</sup> ( $p$  値=0.003)、BT3/GP64<sup>T3/V181I</sup> ( $p$  値=0.005)、組み合わせウイルスでは BT3/GP64<sup>T3/L99M,Y172H</sup> ( $p$  値=0.04)、BT3/GP64<sup>T3/Y172H,V181I</sup> ( $p$  値=0.001) であった (Fig.9-(b)~(e))。

H4 系統の GP64 変異ウイルス 2 種類をそれぞれ感染させたカイコの生存時間を BH4 control virus が感染したカイコと比較した。BH4/GP64<sup>H4/M99L</sup>、BH4/GP64<sup>H4/H172Y</sup> を感染させたカイコは、ともに BH4 control virus を感染させたカイコより生存時間が短かった ( $p$  値=0.03、 $p$  値=0.001) (Fig.9-(f))。

ウイルス増殖と生存時間に相関があるかを、ウイルス感染後 24 ~ 120 時間における増殖量と生存時間の中央値で検証した。その結果、ウイルスの感染後 24~48 時間でウイルスの増殖量と生存時間に負の相関が見られた (Fig.8-(i)、Table 5)。カイコでのウイルス増殖が高いと生存時間が短くなること、感染の比較的初期の体液中ウイルス量の方が生存時間と相関が高かった。

## 10. 病徴解析

### a) 体重測定

BmNPV が感染したカイコは感染後期に食欲の衰えや吐液、下痢症状、BmNPV の病徴による体液の漏出で体重が減少する。また、体重減少は死亡よりも早期のウイルス感染の影響を評価できる。そこで、ウイルスが感染したカイコの体重の減少はウイルスによる病徴を定量的に示す指標として測定した。カイコに GP64 変異ウイルス 17 種類を注射し、注射後 2 日目から 7 日目まで一日おきに電子天秤でカイコの体重を測定し、体重の変化を記録した。ウイルスを注射していないカイコの体重は、2 日目から 7 日目まで増加し続けた。ウイルスを感染させたカイコの体重は、感染後 5 日目もしくは 6 日目で最大になり、その後減少した (Fig.10-(a))。病徴の進行が遅いウイルスが感染していると、摂食不良になる時間が遅れるためその分体重が増加すると考え、GP64 変異ウイルス 17 種類を感染させたカイコの体重の最大値を比較した (Fig.10-(b))。BH4/GP64<sup>H4/H172Y</sup>、BH4/GP64<sup>T3</sup> に感染したカイコの体重の最大値はウイルスを感染させていないカイコの 0.7 倍であり、体重は有意に減少した (ステューデントの  $t$  検定、BH 法による多重補正、 $p$  値 < 0.1)。よって、これら 2 種類のウイルスに感染したカイコは十分に摂食を行う前に病徴が進行し、体重が増加できなかったと考えられた。それら以外の GP64 変異ウイルス (15 種類) を感染させたカイコはウイルスを感染させていないカイコの体重の約 0.8 倍に減少したが、有意差はなかった (Fig.10-(b))。

ウイルスの増殖、生存時間とカイコの体重に相関があるかを、体重の最大値とウイルス感染後 24~120 時間での増殖、生存時間の中央値で検証した。その結果、ウイルスの

感染後 36~48 時間においてウイルスの増殖量とカイコの体重の最大値に負の相関が見られた (Fig.8-(i)、Table 5)。また、生存時間とカイコの体重の最大値には弱い正の相関があった (Fig.10-(d)、Table 6)。よって、カイコでのウイルス増殖が高いと、カイコの体重が減少する傾向にあり、また生存時間が短いと体重も減少したことが示唆された。

## b) 形態的病徴の比較

ウイルスの増殖とカイコの病徴、死亡時間の関係を調べる目的で、カイコに GP64 変異ウイルス 17 種類を注射し、注射後 2 日目から 7 日目まで一日おきにウェブカメラ (logicool HD 1080p、300 万画素) でカイコの全身の撮影を行った (Supplementary Fig.2)。ウイルスを感染させていない mock、T3 control virus、体重減少が多かった BH4/GP64<sup>H4/H172Y</sup>、BH4GP64<sup>T3</sup>、生存時間が長い BT3/GP64<sup>T3/Y172H</sup> を感染させたカイコの 5~7 日目の写真を Fig.10-(c) に示した。生存時間が短いウイルスと T3 control virus を含む生存時間が中程度のウイルスを感染させたカイコは、感染後 7 日目までにはカイコが死亡し、メラニン化により体色が黒く変色した (Fig.10-(c))。体重減少が大きかった BH4/GP64<sup>H4/H172Y</sup>、BH4GP64<sup>T3</sup> を感染させたカイコの形態的病徴は、感染後 6 日目において BT3 control virus、BH4 control virus と比較して激しかった (Fig.10-(c))。また、BT3/GP64<sup>T3/R191K</sup>、BT3/GP64<sup>T3/G158S,V181I,R191K</sup>、BT3/GP64<sup>T3/A30Δ,G158S,V181I,R191K</sup> の R191K 変異を持つ 3 種類のウイルスについても感染後 6 日目の形態的病徴が激しく、生存時間も短かった (Supplementary Fig.2、Fig.9-(b)、(e))。一方、BT3/GP64<sup>T3/A30Δ</sup>、BT3/GP64<sup>T3/Y172H</sup>、BT3/GP64<sup>T3/Y172H,V181I</sup>、BT3/GP64<sup>H4</sup> の 4 種類を感染させたカイコは感染後 7 日目でもカイコが生存し、病徴出現から病徴が進行するまでの時間が長かった (Fig.10-(c)、Supplementary Fig.2)。生存時間の短かったものほどカイコの体の縮み、表皮のハリの喪失、体表色の黄化、節間膜の腫れなどの形態的病徴が現れる時間が早く、生存時間が長いものほど形態的病徴が現れるのが遅い傾向が見られた (Supplementary Fig.2)。

Fig.1

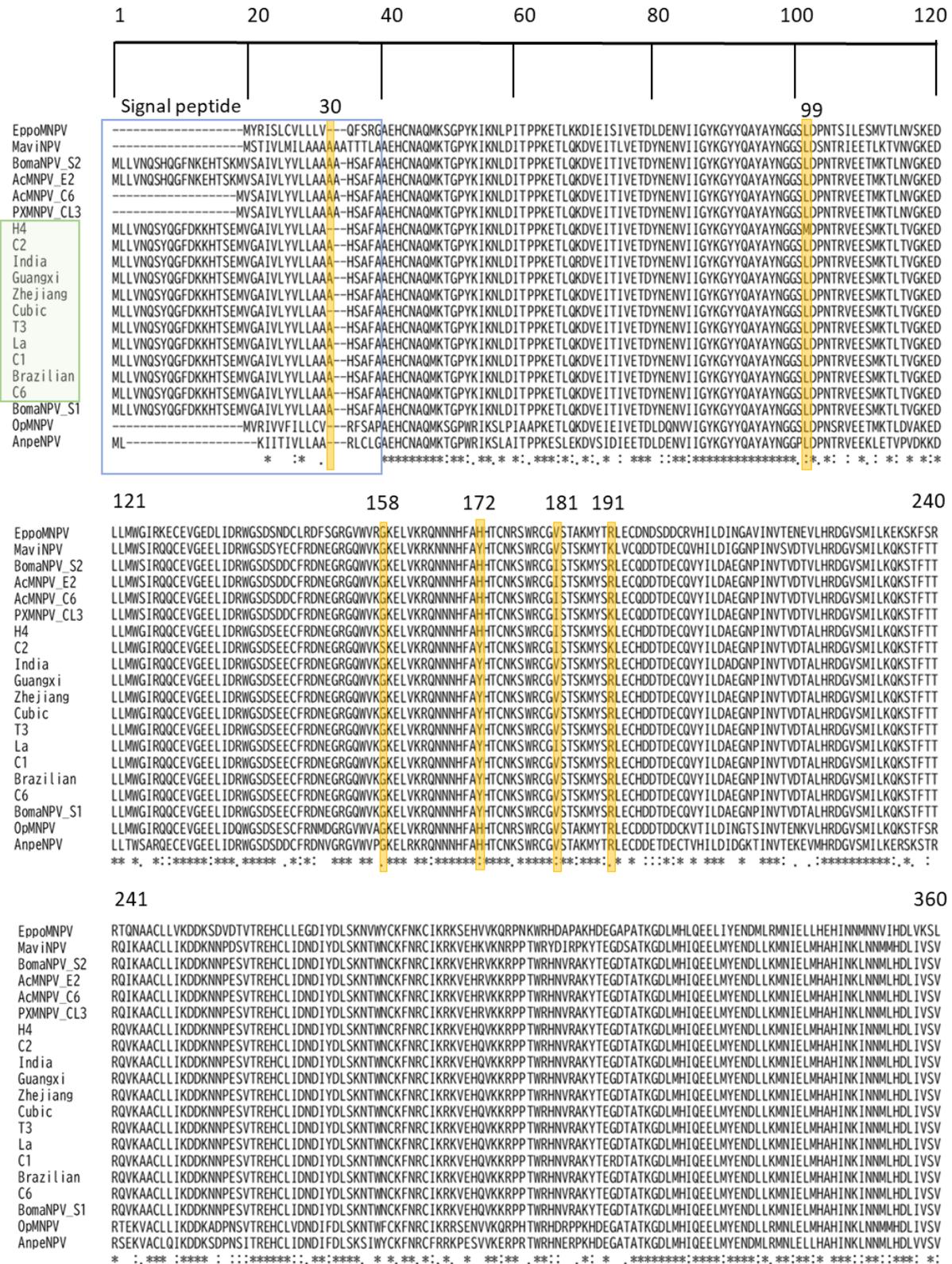




Table 2 The viruses used for amino acid sequence alignment of GP64.

abbreviation	Accession No.	Virus name	Host (larvae)
EppoMNPV	AAK85676	<i>Epiphyas postvittana</i> nucleopolyhedrovirus	light brown apple moth
MaviNPV	ABL76049	<i>Maruca vitrata</i> nucleopolyhedrovirus	bean pod borer
BomaNPV_S2	AFO10080	<i>Bombyx mandarina</i> nucleopolyhedrovirus S2	wild silk moth
AcMNPV_E2	AIU56980	<i>Autographa californica</i> multiple nucleopolyhedrovirus E2	alfalfa looper
AcMNPV_C6	AAA66758	<i>Autographa californica</i> multiple nucleopolyhedrovirus C6	alfalfa looper
PxMNPV_CL3	ABE68511	<i>Plutella xylostella</i> multiple nucleopolyhedrovirus CL3	cabbage moth
H4	BBA20610	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus H4	silkworm
C2	AGX01332	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus C2	silkworm
India	AFN21223	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus India	silkworm
Guangxi	AFN21363	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus Guangxi	silkworm
Zhejiang	AFN21083	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus Zhejiang	silkworm
Cubic	AFN09034	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus Cubic	silkworm
T3	AAC63794	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus T3	silkworm
La	BBN66156	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus La	silkworm
C1	AGX01204	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus C1	silkworm
Brazilian	AIS92844	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus Brazilian	silkworm
C6	AGX01460	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus C6	silkworm
BomaNPV_S1	ACQ57301	<i>Bombyx mandarina</i> nucleopolyhedrovirus S1	wild silk moth
OpMNPV	AAC59125	<i>Orgyia pseudotsugata</i> multiple nucleopolyhedrovirus	Douglas-fir tussock moth
AnpeNPV	ABF50270	<i>Antheraea pernyi</i> nucleopolyhedrovirus	Chinese tussar moth

Fig.2

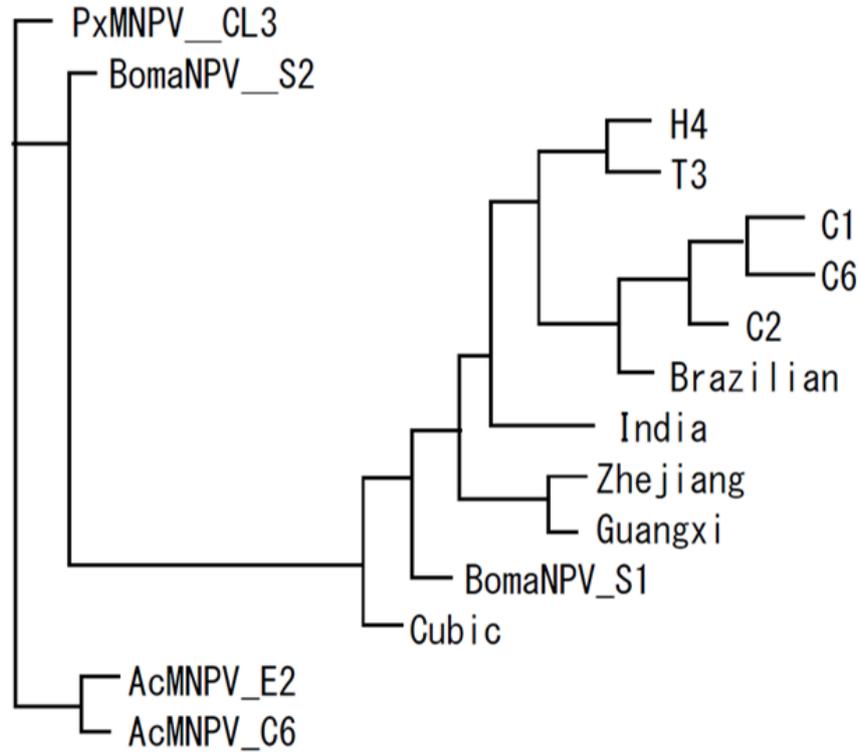


Figure 2 A phylogenetic tree of BmNPV and related group I alphabaculoviruses.

A phylogenetic tree was estimated using the maximum likelihood method and the genome sequence (NCBI) of each strain of BmNPV and related group I alphabaculoviruses, BomaNPV, AcMNPV, and PxMNPV. The NCBI accession numbers of the viruses used for sequence alignment are listed in Table 3. IQ TREE was used for phylogenetic estimation.

Table 3 The information of viruses used for phylogenic tree.

abbreviation	Accession No.	Virus name	Host (larvae)
PxMNPV_CL3	DQ457003	<i>Plutella xylostella</i> multiple nucleopolyhedrovirus CL3	cabbage moth
BomaNPV_S2	JQ071499	<i>Bombyx mandarina</i> nucleopolyhedrovirus S2	wild silk moth
H4	LC150780	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus H4	silkworm
T3	L33180	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus T3	silkworm
C1	KF306215	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus C1	silkworm
C6	KF306217	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus C6	silkworm
C2	KF306216	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus C2	silkworm
Brazilian	KJ186100	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus Brazilian	silkworm
India	JQ991010	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus India	silkworm
Zhejiang	JQ991008	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus Zhejiang	silkworm
Guangxi	JQ991011	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus Guangxi	silkworm
BomaNPV_S1	FJ882854	<i>Bombyx mandarina</i> nucleopolyhedrovirus S1	wild silk moth
Cubic	JQ991009	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus Cubic	silkworm
AcMNPV_E2	KM667940	<i>Autographa californica</i> multiple nucleopolyhedrovirus E2	alfalfa looper
AcMNPV_C6	L22858	<i>Autographa californica</i> multiple nucleopolyhedrovirus C6	alfalfa looper

Fig.3 (a)

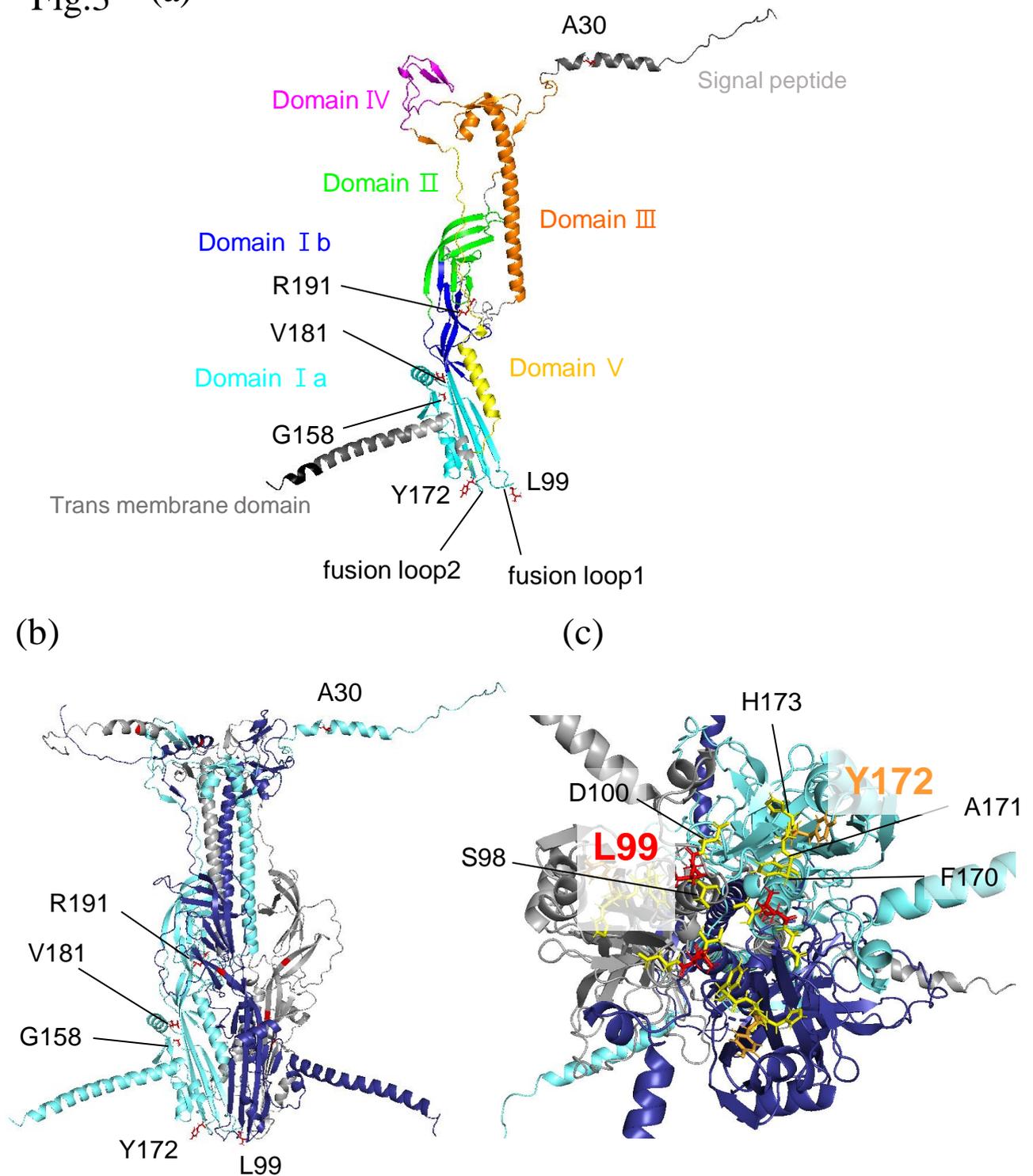


Figure 3 Inferred structure of GP64<sup>T3</sup> and positions of amino acid residues on the analyzed in this study.

(a) The protomer of GP64<sup>T3</sup> inferred by AlphaFold2. Each known functional domain is colored and the position of amino acid residues differed between/in H4 and T3 are indicated. (b) The trimer of GP64<sup>T3</sup> inferred in AlphaFold2. Individual protomers are color-coded by blue, light blue, and gray. Positions of amino acid variants are indicated only in one protomer. (c) GP64 fusion loop. L99 (red), S98, D100, F170, and A171 are in the fusion loop. Y172 (orange) are adjacent to the fusion loop. S98, L99, D100, F170, A171 and Y172 are amino acid residues important for GP64 membrane fusion. F170 and H173 are amino acid residues important for host receptor binding.

Fig.4

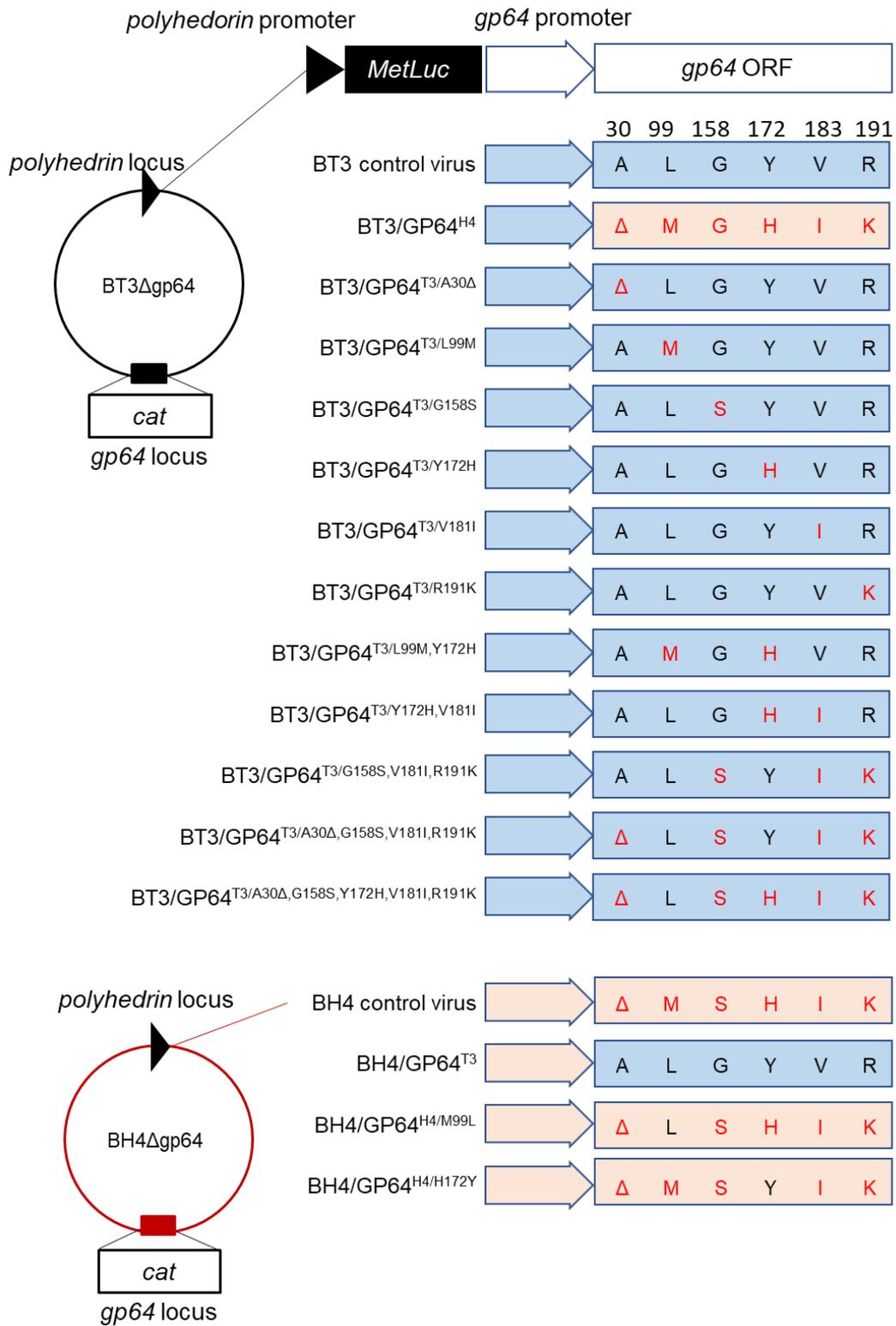


Figure 4 The constructs for chimeric or mutated BmNPV used in this study.

The gp64 promoter and coding sequence, and amino acid variants are colored based on the origin of strains (blue, T3; red, H4). All the viruses were derived from the gp64 knock-out bacmids (left top, BT3Δgp64; left bottom, BH4Δgp64) and were rescued with the indicated gp64 expression cassette. The transfer of the gp64 expression cassette into the bacmid was carried out using the Bac-to-Bac system. *MetLuc*, *Metridia Luciferase* gene; *cat*, *Chloramphenicol acetyltransferase* gene.

Fig.5 (a)

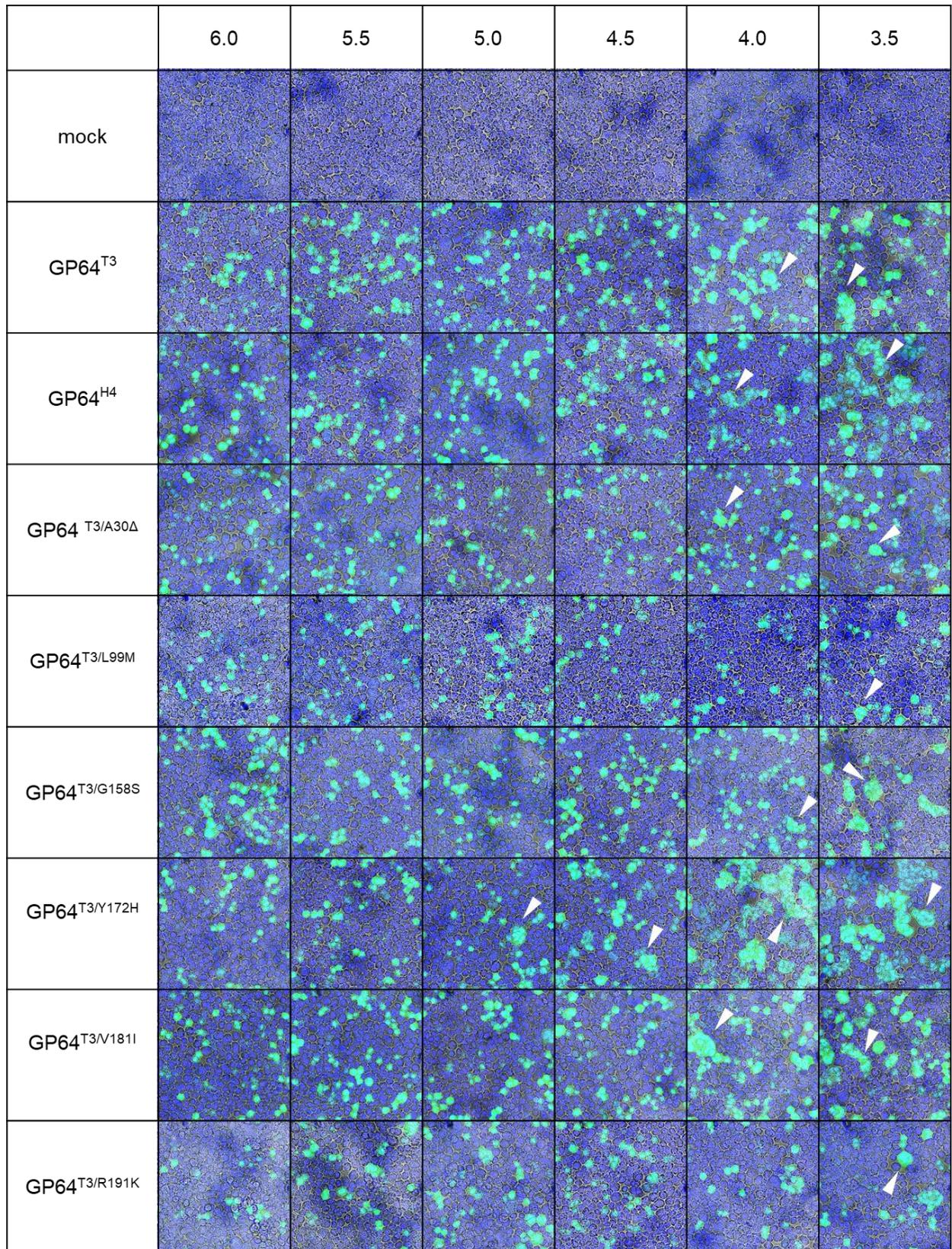


Fig.5 (a)

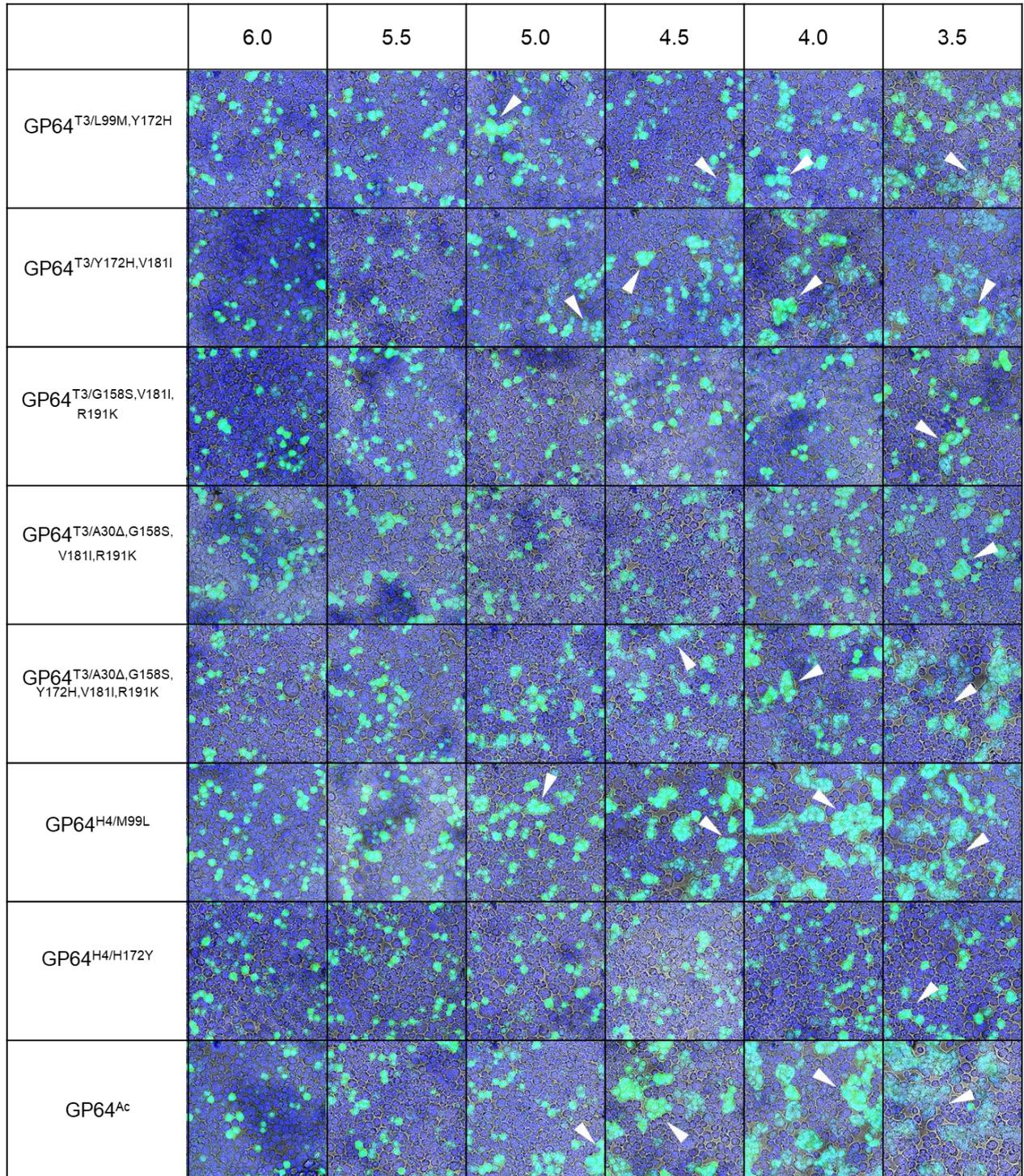
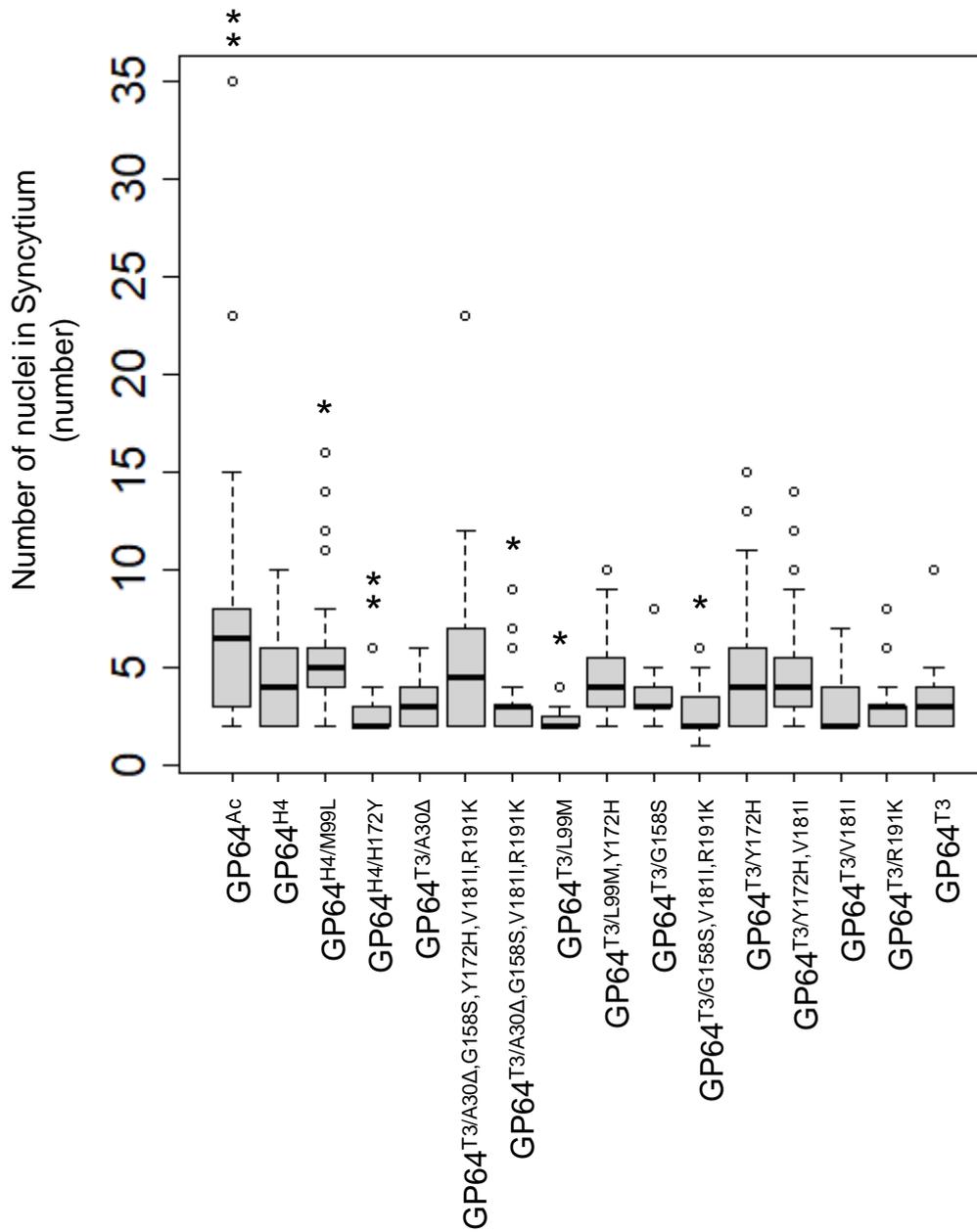


Figure 5 Syncytium formation of the GP64 variants.

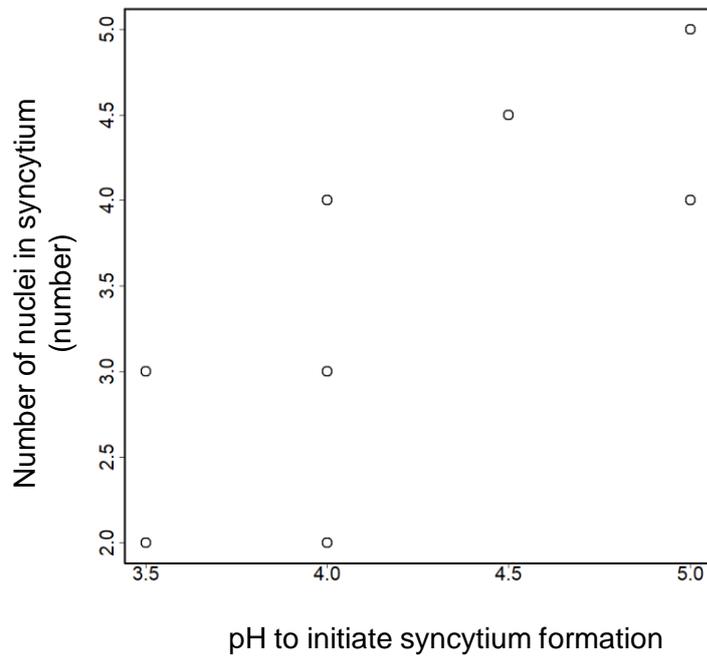
(a) pH sensitivity of GP64 variants to initiate membrane fusion. Syncytia are shown with arrow heads. BmN cells were transfected with 400ng of a plasmid carrying the indicated GP64 variant. After 48 hours, supernatant was removed and the cells were treated with PBS prepared at the indicated pH for 5 minutes. After treatment to the lower pH, cells were cultured with TC-100 supplemented with 10% FBS for 1 hour. Then, cells were washed and fixed for imaging. Imaging was performed using a confocal laser scanning microscope. Mock, transfected only transfection reagent.

Fig.5 (b)



(b) The number of nuclei in syncytium formed with pH 3.5. When syncytium formation assay conducted at pH3.5, the number of nuclei in syncytium was counted. Statistically significant difference of number of nuclei compared to that of GP64<sup>T3</sup> were shown (Fisher's exact test: \*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*,  $p < 0.05$ ; ·,  $p < 0.1$ ).

Fig.5 (c)



(c) Correlation between pH to initiate syncytium formation and number of nuclei in syncytium. Polyserial correlation coefficient ( $R= 0.87$ ) was calculated for pH to initiate syncytium formation (x axis) and the number of nuclei in syncytium (y axis).

Fig.6

(a)

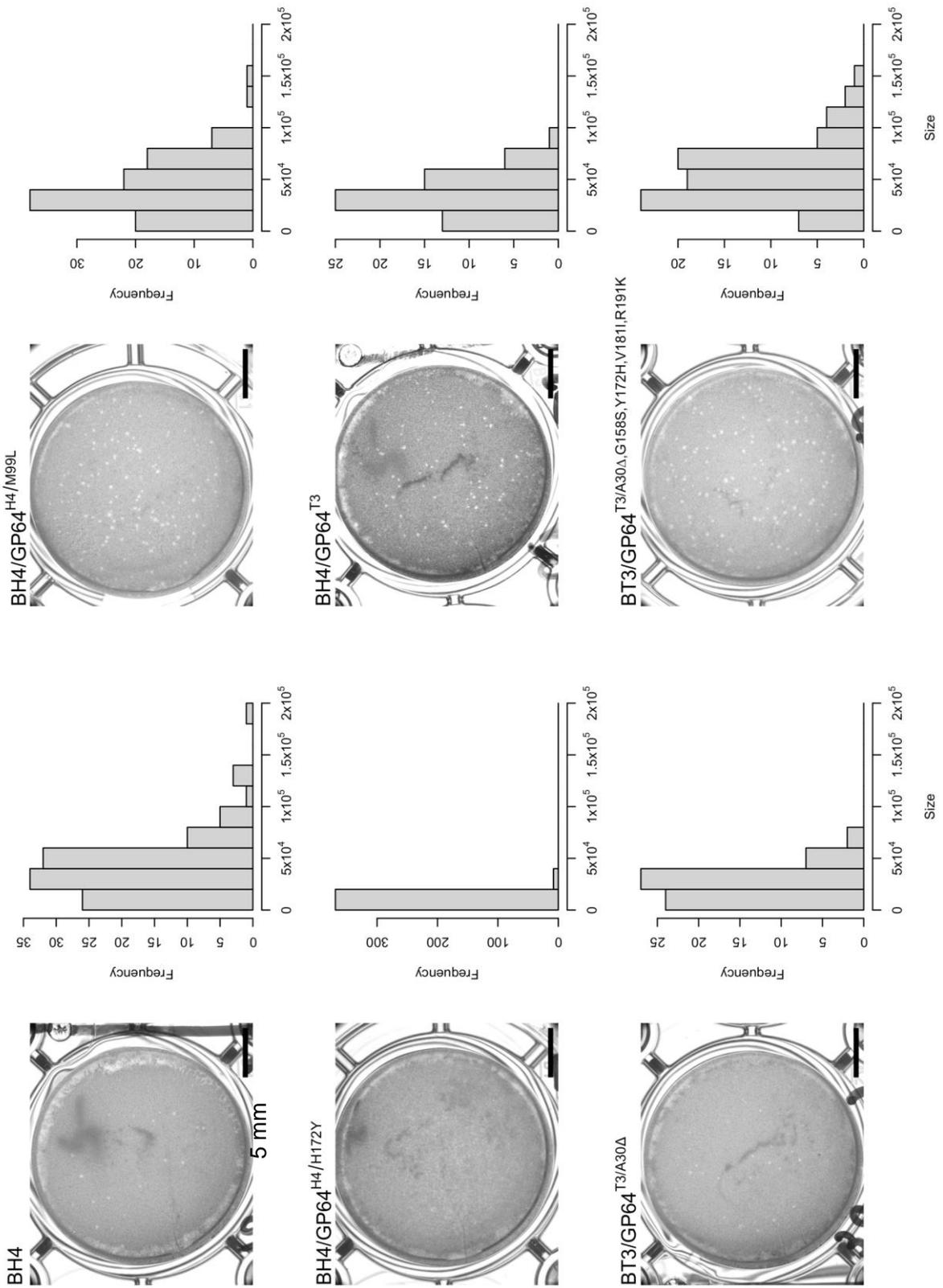


Fig.6

(a)

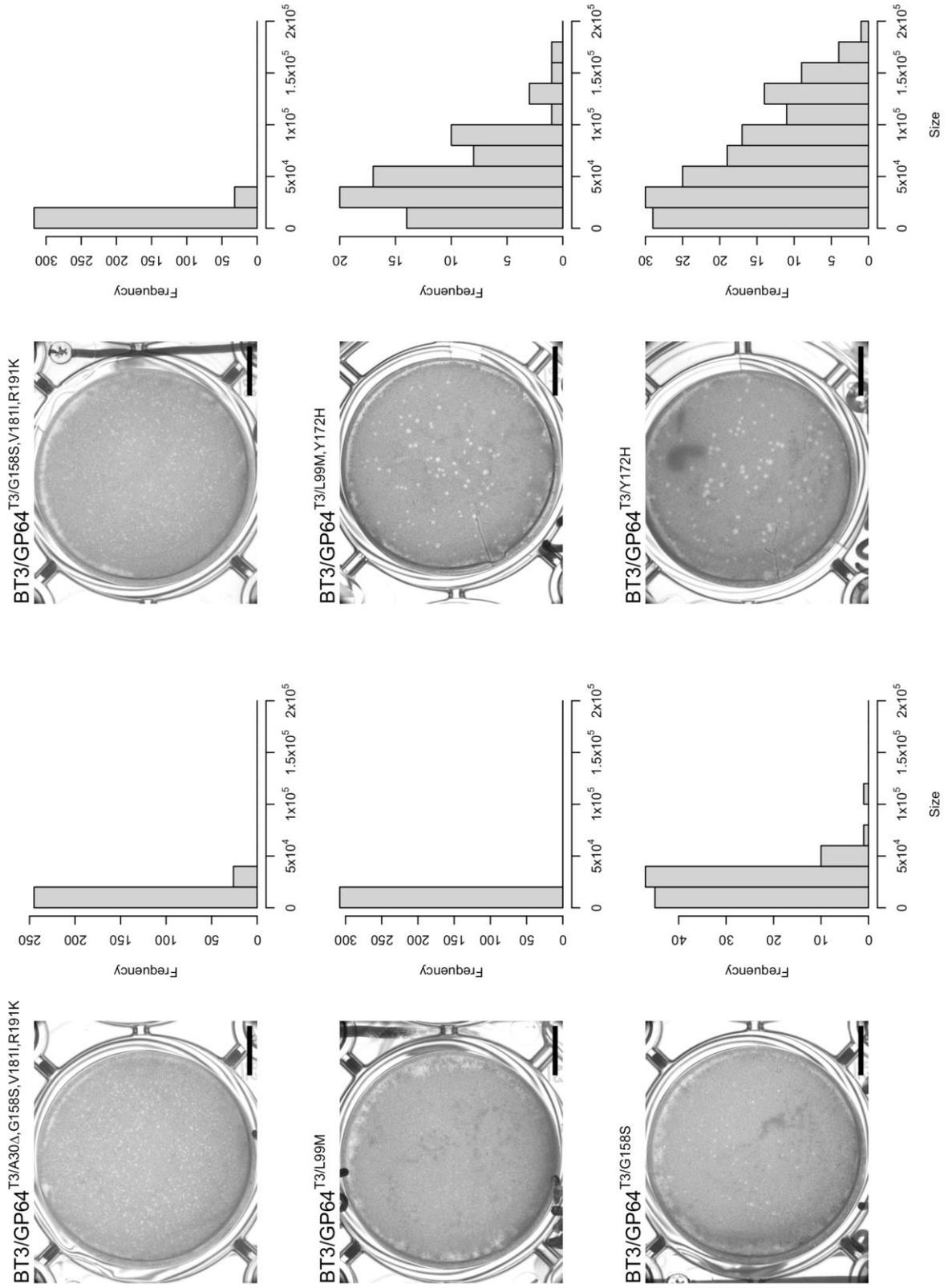


Fig.6

(a)

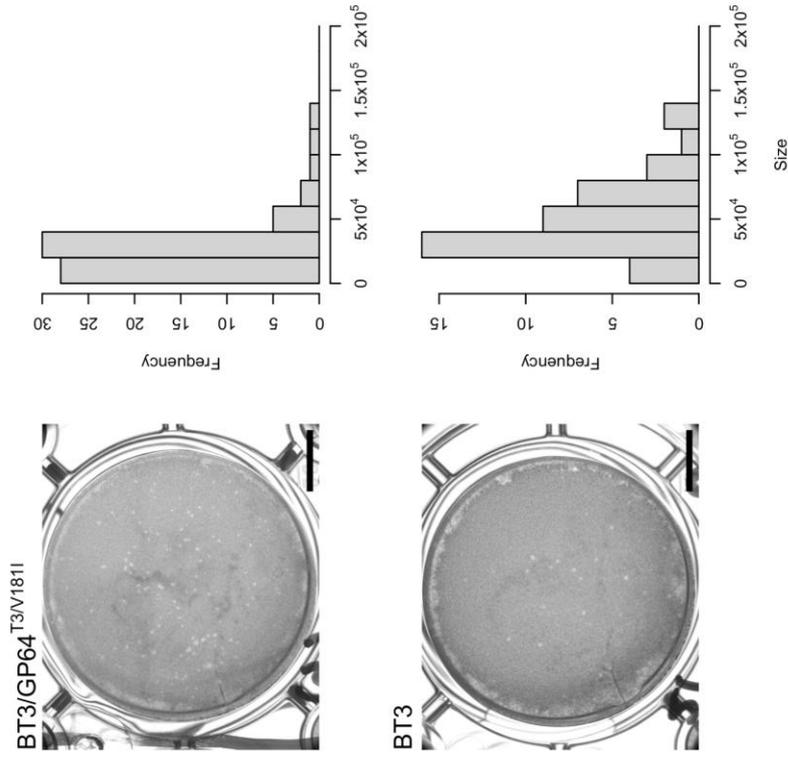
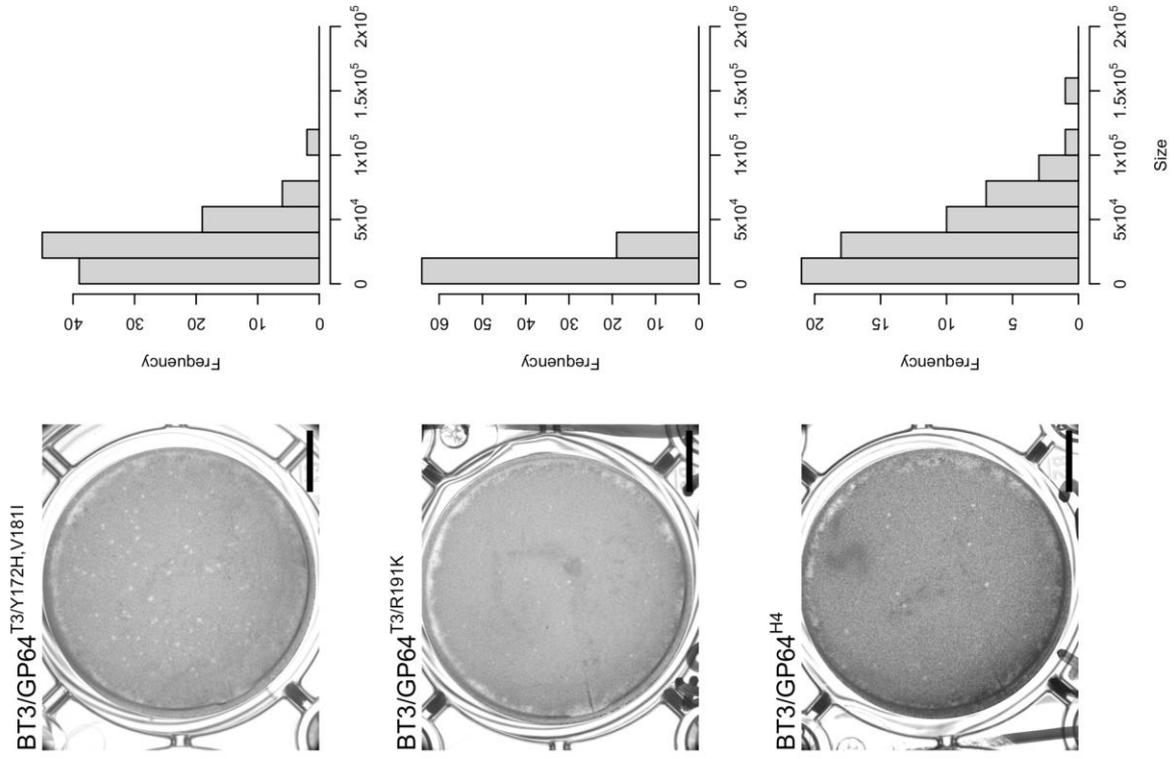
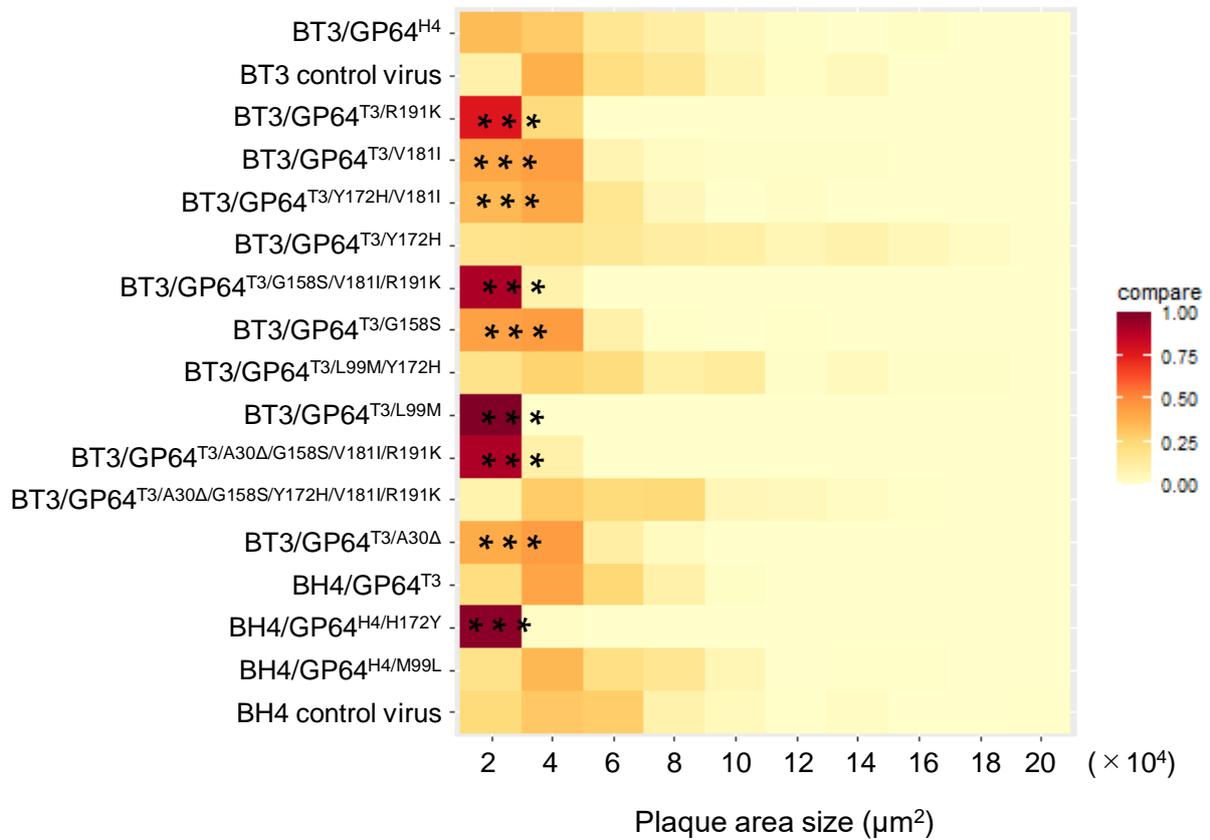


Figure 6 Plaque size of the gp64-mutant BmNPV.

The parental and the 15 mutant gp64-mutant viruses was diluted to  $10^3$ - $10^6$  and infect in BmN cells. After 96 hours, BmN cells were stained with neutral red for imaging.

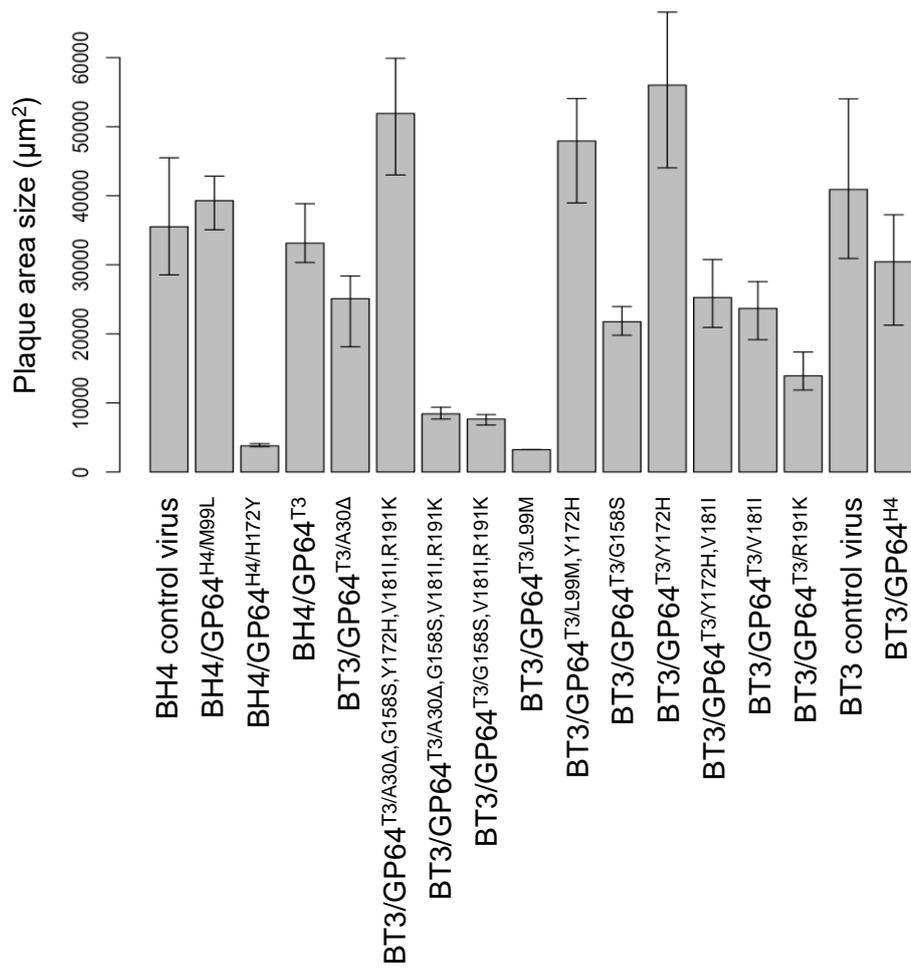
a) Photographs of plaques 96 hours after infection with the parental and the 15 mutant gp64-mutant viruses and histograms of plaque areas. The vertical axis represents frequency, and the horizontal axis represents area. Scale bar = 5 mm.

Fig.6 (b)



(b) A heatmap showing normalized plaque area frequencies per virus. The vertical and the horizontal axes represent the viral genotypes and the area in 20,000  $\mu\text{m}^2$  increments, respectively. Higher percentages were represented in red and lower percentages in yellow. Mutant viruses of which plaque area size frequencies were different from those of T3 were analyzed with Fisher's exact test (\*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*,  $p < 0.05$ ; ·,  $p < 0.1$ ).

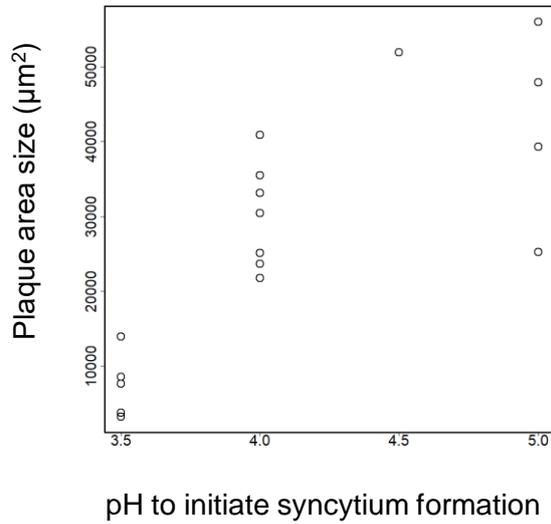
Fig.6 (c)



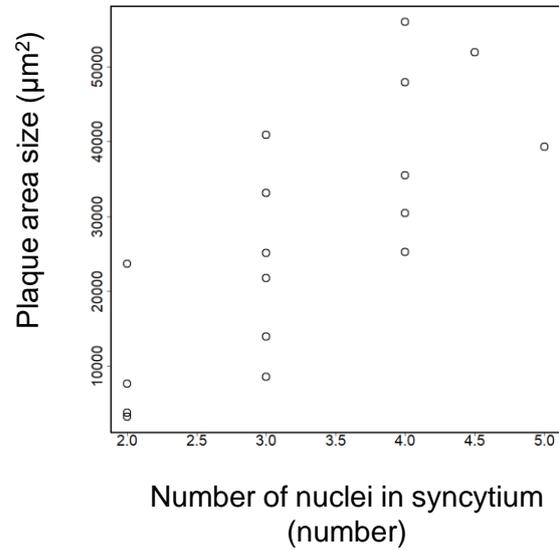
(c) The median area of plaques of the parental and the 15 mutant viruses. The vertical and the horizontal axes represents the median area of the plaque and viral genotypes, respectively. The error bars indicate 95% confidence interval of the median.

Fig.6

(d)



(e)



(d) Correlation between pH to initiate syncytium formation and plaque size. Syncytium formation pH (x axis) and plaque size (y axis) are shown. Polyserial correlation coefficient ( $R= 0.89$ ).

(e) Correlation between number of nuclei in syncytium and plaque size. The number of nuclei in syncytium (x axis) and plaque size (y axis) are shown. Polyserial correlation coefficient ( $R= 0.77$ ).

Fig.7

(a)

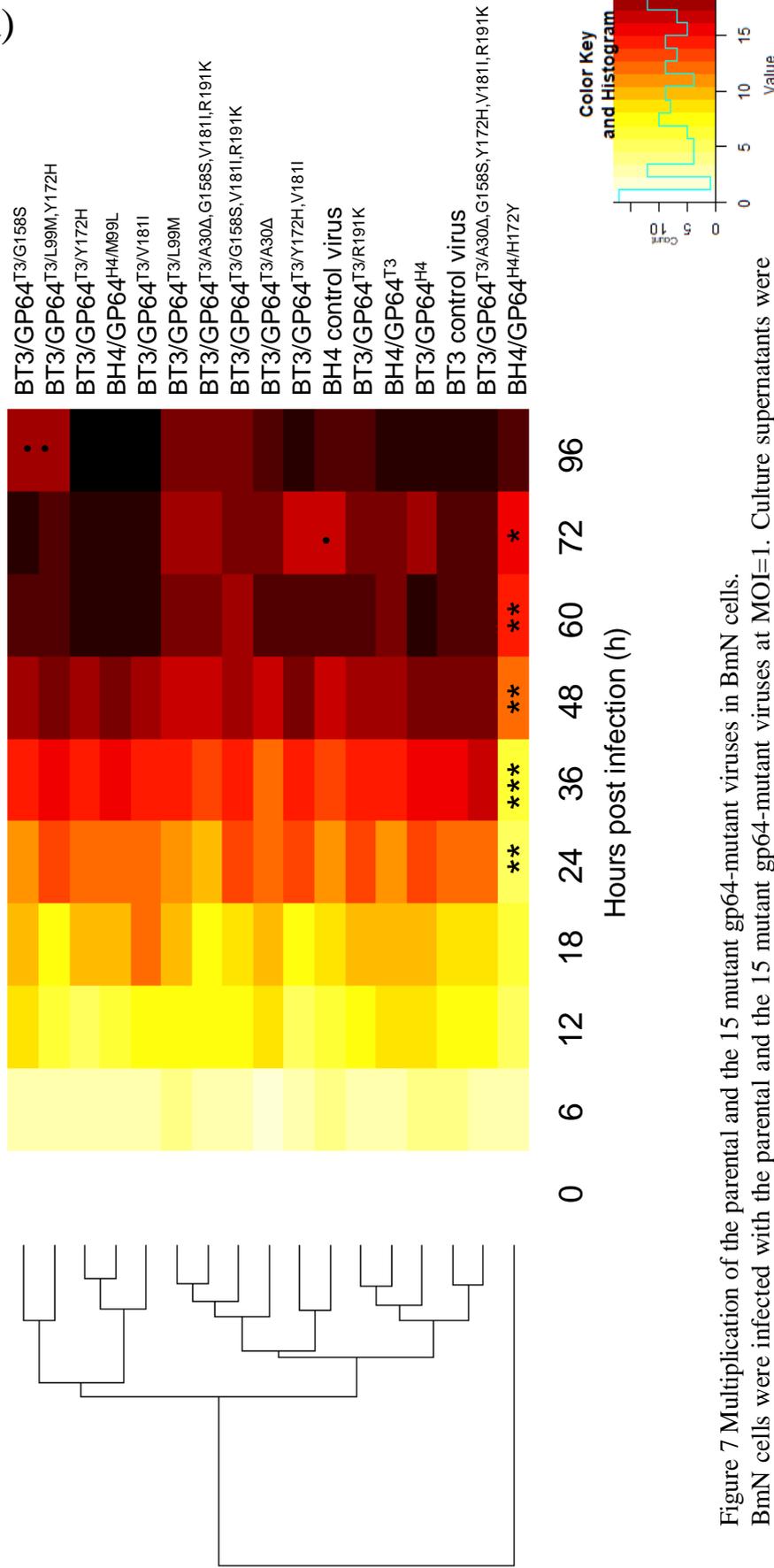
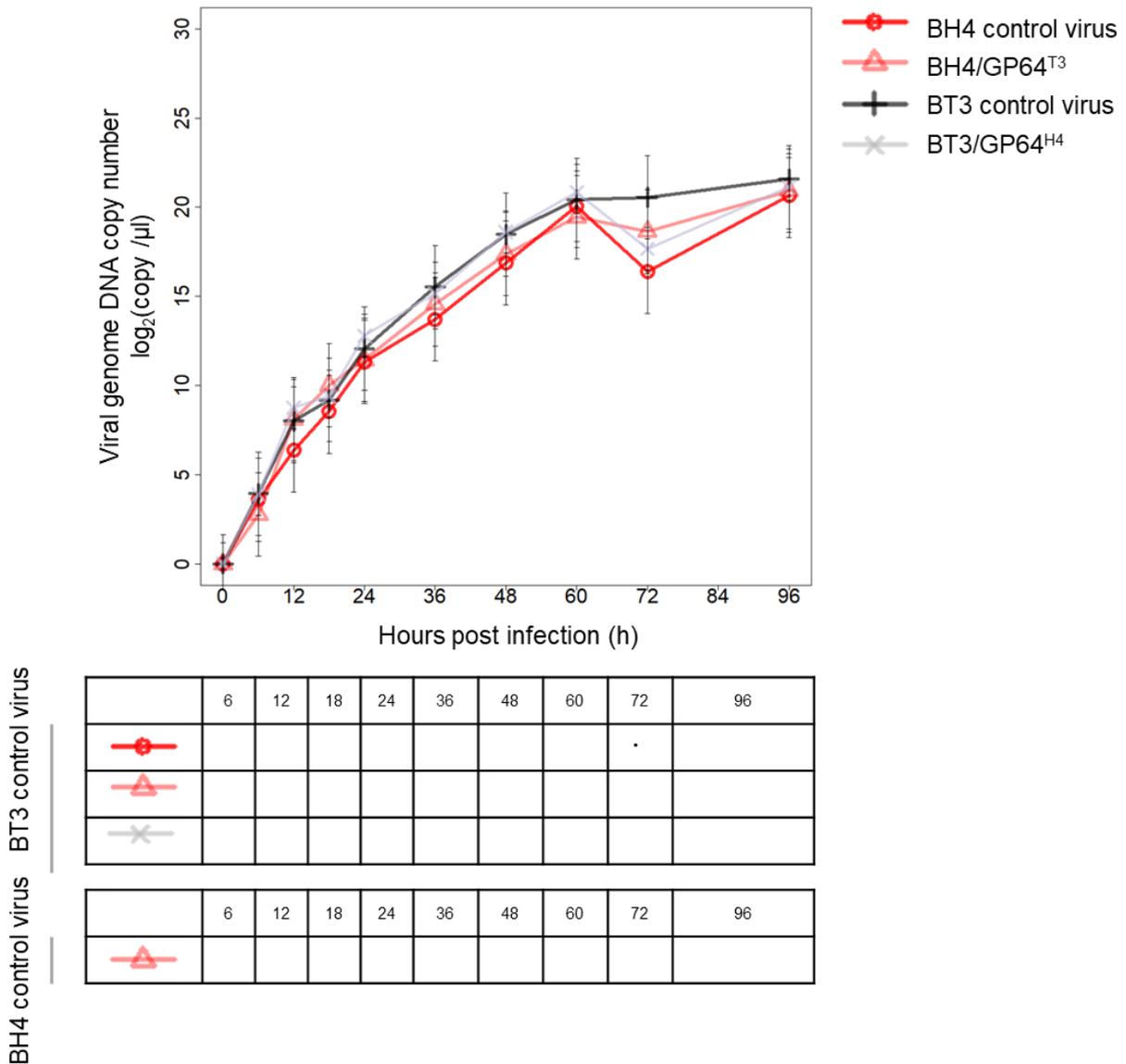


Figure 7 Multiplication of the parental and the 15 mutant gp64-mutant viruses in BmN cells. BmN cells were infected with the parental and the 15 mutant gp64-mutant viruses at MOI=1. Culture supernatants were collected indicated time points after infection. Biological replicates were performed in triplicates. The copy number of the viral genome was measured by qPCR. (a) Mean estimates were obtained by fitting a linear model and are represented in a heat map. The logarithm of the bottom 2 copy numbers of viral DNA in 1  $\mu$ l of culture supernatants is represented by relative color (low, white; high, black). The vertical axis represents the viral genotypes and the horizontal axis represents time (hour post infection). Statistically significant difference of multiplication of a virus compared to that of BT3 control virus were shown (Student's *t*-test: \*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*,  $p < 0.05$ ; •,  $p < 0.1$ ).

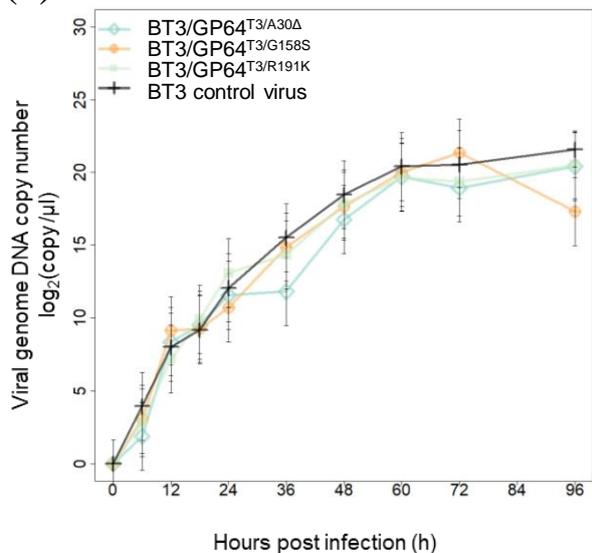
Fig.7 (b)



(b-g) Comparison of subset of mutant viruses to the parental virus. (b) gp64 chimeric viruses: BT3 control virus, BH4 control virus, BT3/GP64<sup>H4</sup> and BH4/GP64<sup>T3</sup>. (c) Single mutant viruses: BT3 control virus, BT3/GP64<sup>T3/A30Δ</sup>, BT3/GP64<sup>T3/G158S</sup> and BT3/GP64<sup>T3/R191K</sup>. (d) Y172H and L99M mutant viruses: BT3 control virus, BT3/GP64<sup>T3/L99M</sup>, BT3/GP64<sup>T3/Y172H</sup> and BT3/GP64<sup>T3/L99M,Y172H</sup>. (e) Y172H and V181I mutant viruses: BT3 control virus, BT3/GP64<sup>T3/Y172H</sup>, BT3/GP64<sup>T3/V181I</sup> and BT3/GP64<sup>T3/Y172H,V181I</sup>. (f) triple, quadruple, and quintuple mutant viruses: BT3 control virus, BT3/GP64<sup>T3/G158S,V181I,R191K</sup>, BT3/GP64<sup>T3/A30Δ,G158S,V181I,R191K</sup>, GP64<sup>T3/A30Δ,G158S,Y172H,V181I,R191K</sup> and BT3/GP64<sup>H4</sup>. (g) H4-based mutant viruses: BT3 control virus, BH4 control virus, BH4/GP64<sup>H4/M99L</sup>, BH4/GP64<sup>H4/H172Y</sup> and BH4/GP64<sup>T3</sup>. The upper tables (b-g) and the lower tables (b, g) show statistical significance of the differences compared to BT3 and BH4 control viruses, respectively (\*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*,  $p < 0.05$ ; •,  $p < 0.1$ ).

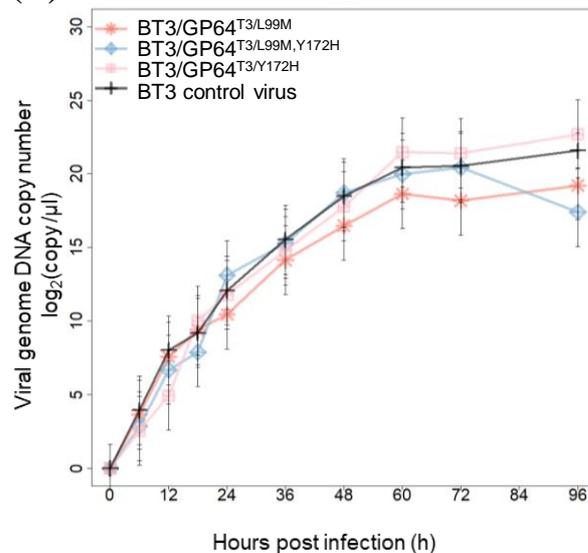
Fig.7

(c)



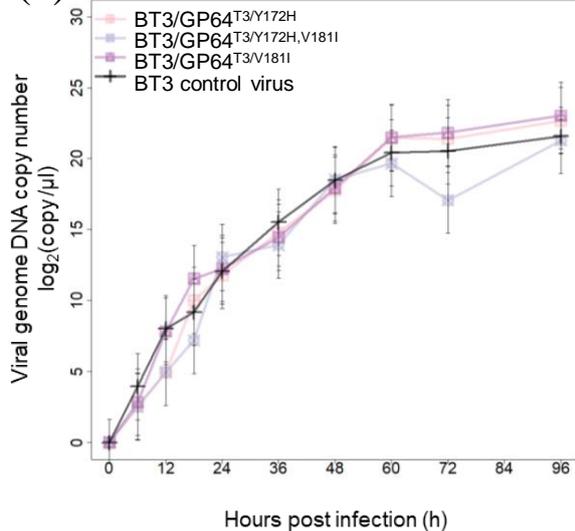
	6	12	18	24	36	48	60	72	96
BT3/GP64 <sup>T3/A30Δ</sup>									
BT3/GP64 <sup>T3/G158S</sup>									
BT3/GP64 <sup>T3/R191K</sup>									

(d)



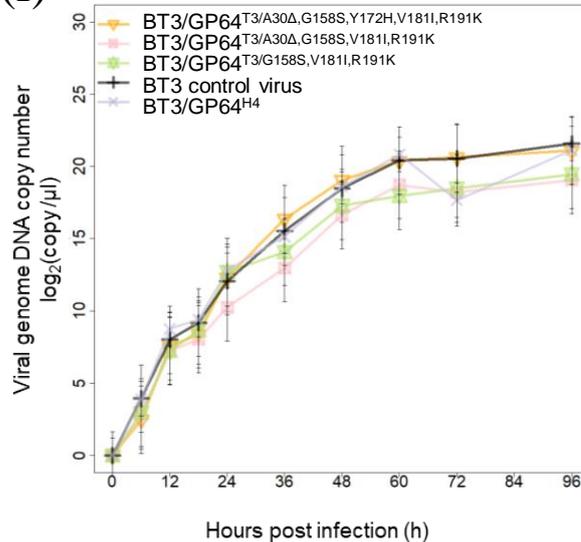
	6	12	18	24	36	48	60	72	96
BT3/GP64 <sup>T3/L99M</sup>									
BT3/GP64 <sup>T3/L99M,Y172H</sup>									
BT3/GP64 <sup>T3/Y172H</sup>									

(e)



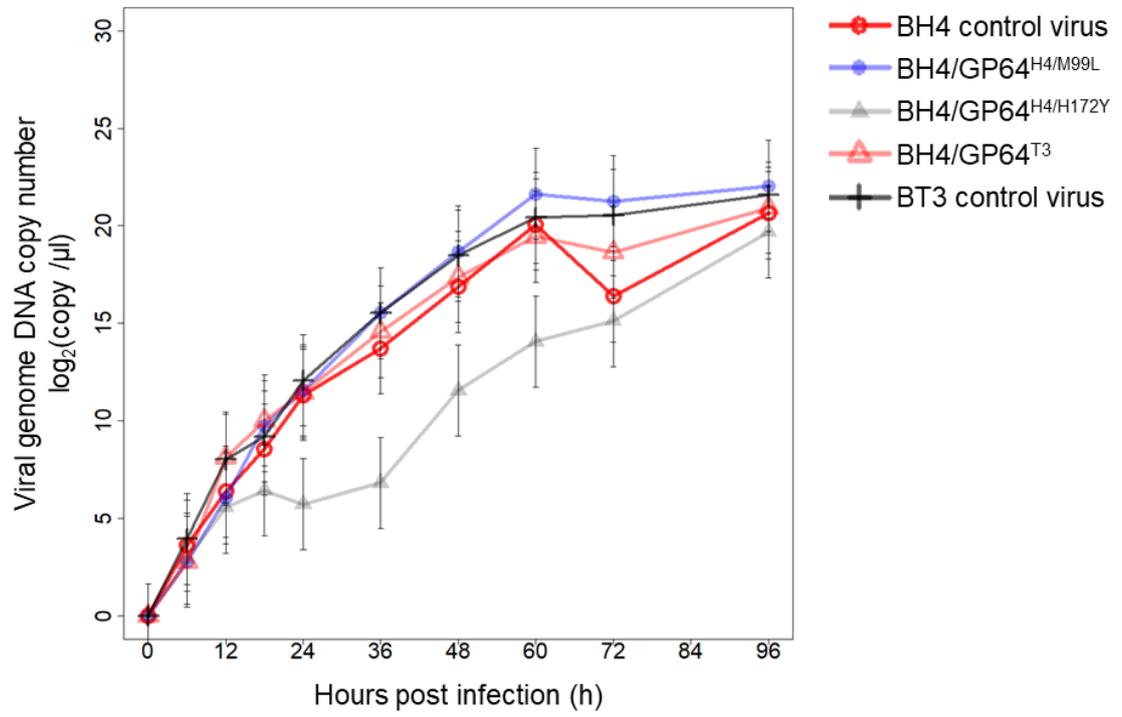
	6	12	18	24	36	48	60	72	96
BT3/GP64 <sup>T3/Y172H</sup>									
BT3/GP64 <sup>T3/Y172H,V181I</sup>									
BT3/GP64 <sup>T3/V181I</sup>									

(f)



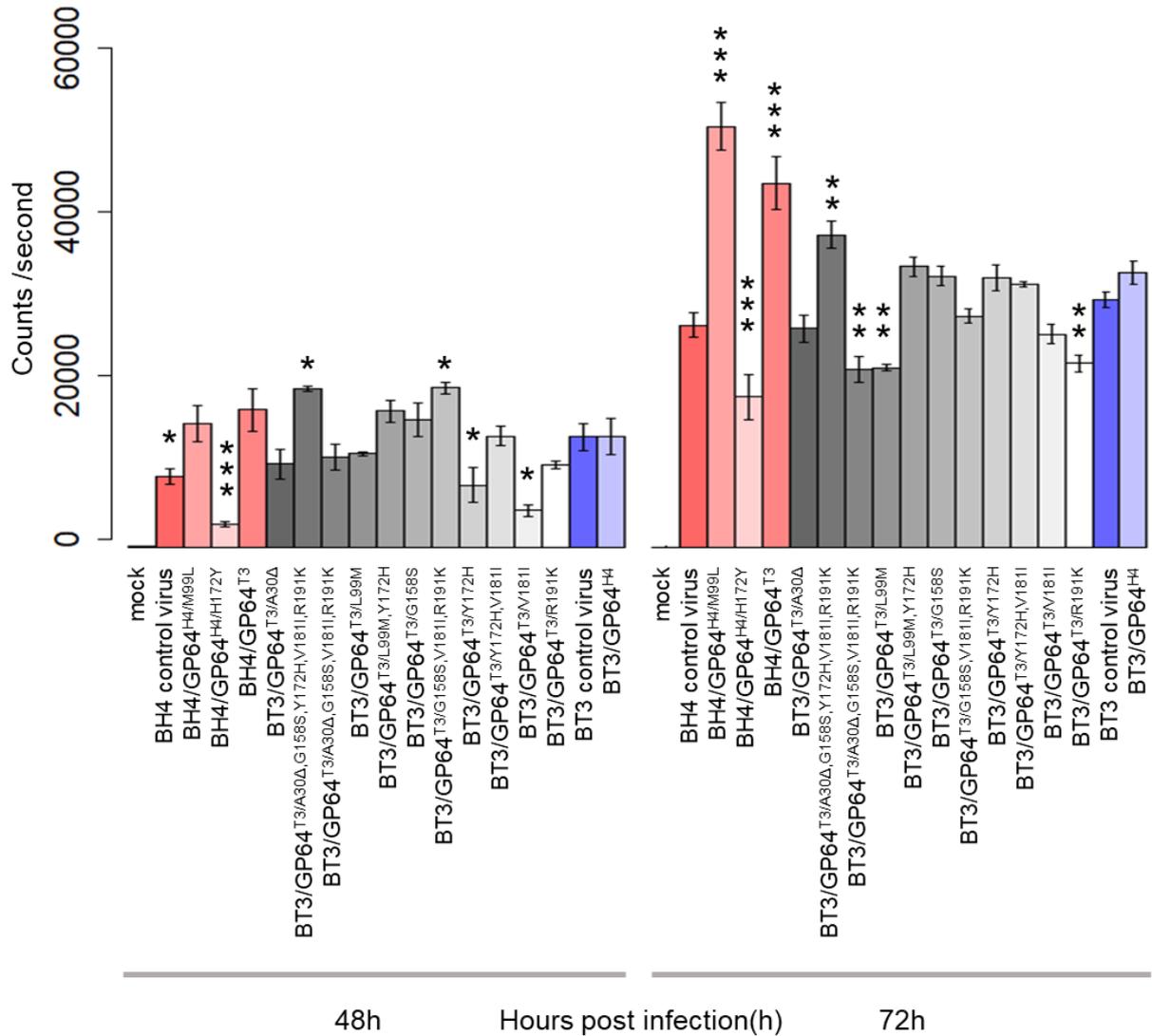
	6	12	18	24	36	48	60	72	96
BT3/GP64 <sup>T3/A30Δ,G158S,Y172H,V181I,R191K</sup>									
BT3/GP64 <sup>T3/A30Δ,G158S,V181I,R191K</sup>									
BT3/GP64 <sup>T3/G158S,V181I,R191K</sup>									
BT3 control virus									
BT3/GP64 <sup>H4</sup>									

Fig.7 (9)



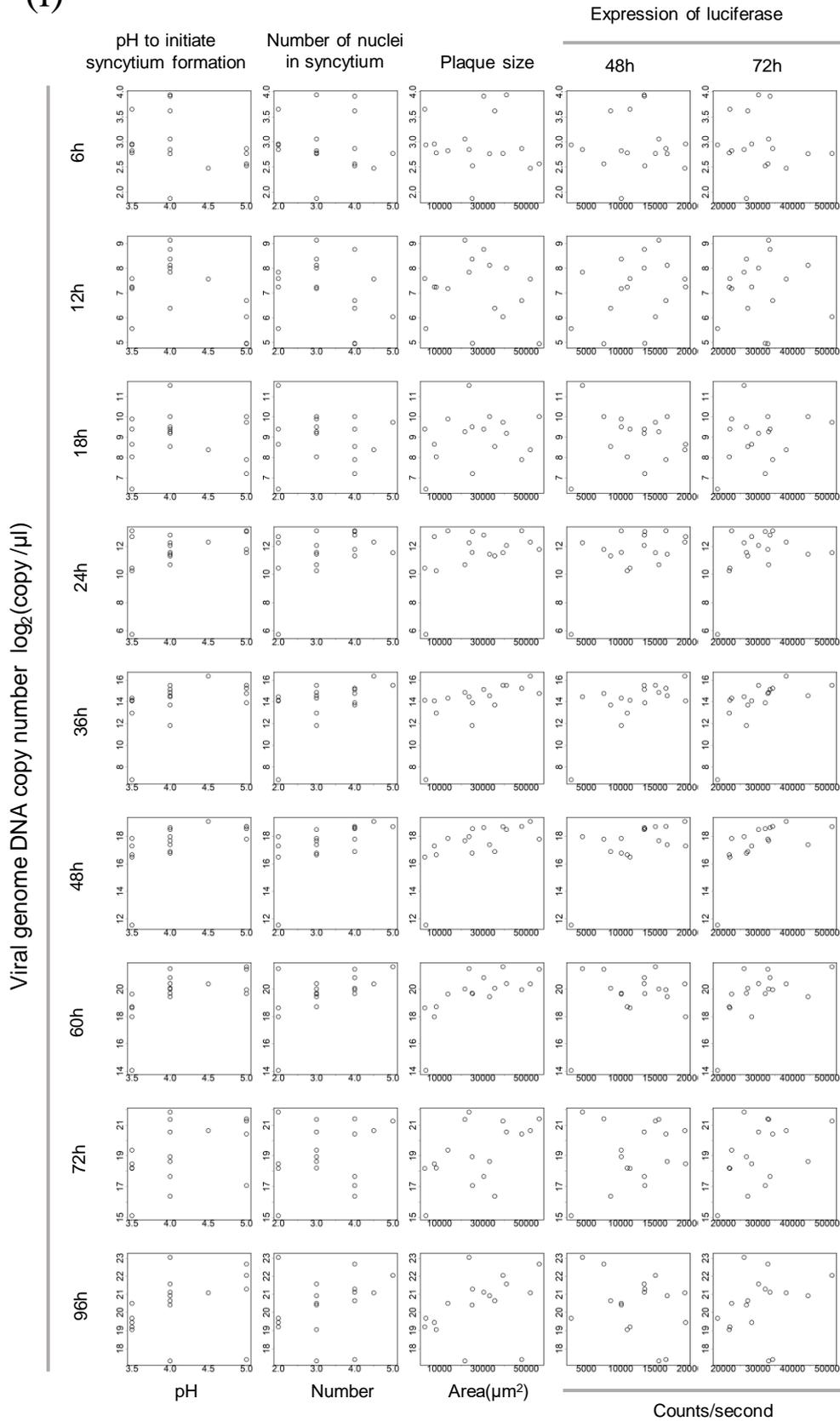
		6	12	18	24	36	48	60	72	96
BT3 control virus									.	
					**	***	***	**	*	
BH4 control virus									*	
					.	*	.	*		

Fig.7 (h)



(h) Expression levels of luciferase in BmN cells of the parental and the 15 mutant gp64-mutant viruses. Culture supernatants were collected at 48 and 72 hours post infection, and luciferase activity in 1  $\mu$ l of culture supernatants was measured. The vertical axis represents luciferase luminescence and the horizontal axis represents time (hours post infection). Error bars indicates standard errors of the means. Each experiment was performed three times. Viruses of which luciferase expression was significantly different compared to BT3 control virus were shown (\*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*,  $p < 0.05$ ;  $\cdot$ ,  $p < 0.1$ ). mock, infection procedure was performed with only TC-100 medium.

Fig.7 (i)



(i) Relationship between phenotypes and viral multiplication in BmN cells of the viruses. Scatter plots of viral multiplication at 6-96 hours after infection (y axis) versus pH to initiate syncytium formation, the number of nuclei in syncytium, plaque size and expression of luciferase 48 and 72 hours post infection (x axis), respectively.

Table 4 Correlation coefficient of viral multiplication in BmN cells versus pH to initiate syncytium formation, number of nuclei in syncytium, plaque size and luciferase expression.

		pH to initiate syncytium formation	Number of nuclei in syncytium	Plaque size	Expression of luciferase	
					48h	72h
Viral genome DNA copy number $\log_2(\text{copy}/\mu\text{l})$	6h	-0.35 <sup>a</sup>	-0.16 <sup>a</sup>	-0.10 <sup>b</sup>	-0.011 <sup>b</sup>	-0.14 <sup>b</sup>
	12h	-0.52 <sup>a</sup>	-0.30 <sup>a</sup>	-0.15 <sup>b</sup>	0.31 <sup>b</sup>	0.011 <sup>b</sup>
	18h	-0.019 <sup>a</sup>	-0.053 <sup>a</sup>	0.19 <sup>b</sup>	-0.073 <sup>b</sup>	0.24 <sup>b</sup>
	24h	0.39 <sup>a</sup>	0.38 <sup>a</sup>	0.37 <sup>c</sup>	0.32 <sup>c</sup>	0.36 <sup>c</sup>
	36h	0.56 <sup>a·</sup>	0.52 <sup>a*</sup>	0.67 <sup>c*</sup>	0.51 <sup>c·</sup>	0.78 <sup>c***</sup>
	48h	0.73 <sup>a**</sup>	0.59 <sup>a**</sup>	0.70 <sup>c***</sup>	0.45 <sup>c</sup>	0.73 <sup>c**</sup>
	60h	0.68 <sup>a*</sup>	0.60 <sup>a*</sup>	0.71 <sup>c***</sup>	-0.074 <sup>c</sup>	0.53 <sup>c*</sup>
	72h	0.47 <sup>a</sup>	0.29 <sup>a</sup>	0.52 <sup>b*</sup>	0.26 <sup>b</sup>	0.45 <sup>b·</sup>
	96h	0.31 <sup>a</sup>	0.28 <sup>a</sup>	0.37 <sup>b</sup>	-0.31 <sup>b</sup>	0.26 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Polyserial correlation coefficient

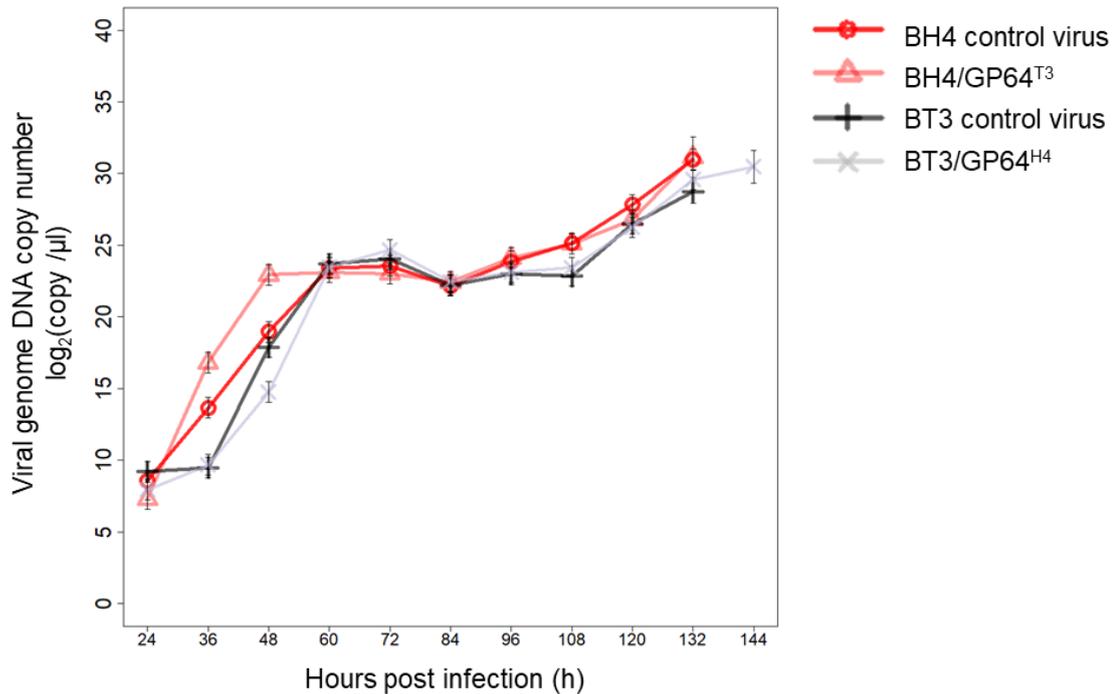
<sup>b</sup> Pearson's correlation coefficient

<sup>c</sup> Spearman's correlation coefficient

Significant correlation were shown (\*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*,  $p < 0.05$ ; ·,  $p < 0.1$ ).



Fig.8 (b)

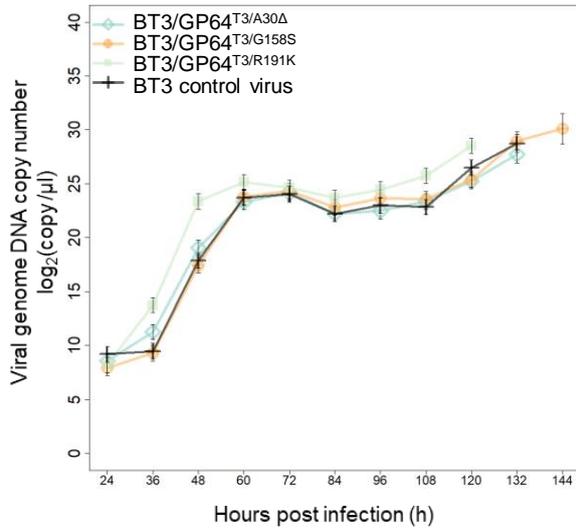


	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144
BT3 control virus			*								
		.	*	*						.	
				.							**
BH4 control virus			*	*							

(b-g) Comparison of subset of mutant viruses to the parental virus. (b) gp64 chimeric viruses: BT3 control virus, BH4 control virus, BT3/GP64<sup>H4</sup> and BH4/GP64<sup>T3</sup>. (c) Single mutant viruses: BT3 control virus, BT3/GP64<sup>T3/A30Δ</sup>, BT3/GP64<sup>T3/G158S</sup> and BT3/GP64<sup>T3/R191K</sup>. (d) Y172H and L99M mutant viruses: BT3 control virus, BT3/GP64<sup>T3/L99M</sup>, BT3/GP64<sup>T3/Y172H</sup> and BT3/GP64<sup>T3/L99M,Y172H</sup>. (e) Y172H and V181I mutant viruses: BT3 control virus, BT3/GP64<sup>T3/Y172H</sup>, BT3/GP64<sup>T3/V181I</sup> and BT3/GP64<sup>T3/Y172H,V181I</sup>. (f) triple, quadruple, and quintuple mutant viruses: BT3 control virus, BT3/GP64<sup>T3/G158S,V181I,R191K</sup>, BT3/GP64<sup>T3/A30Δ,G158S,V181I,R191K</sup>, GP64<sup>T3/A30Δ,G158S,Y172H,V181I,R191K</sup> and BT3/GP64<sup>H4</sup>. (g) H4-based mutant viruses: BT3 control virus, BH4 control virus, BH4/GP64<sup>H4/M99L</sup>, BH4/GP64<sup>H4/H172Y</sup> and BH4/GP64<sup>T3</sup>. The upper tables (b-g) and the lower tables (b, g) show statistical significance of the differences compared to BT3 and BH4 control viruses, respectively (\*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*,  $p < 0.05$ ; ·,  $p < 0.1$ ).

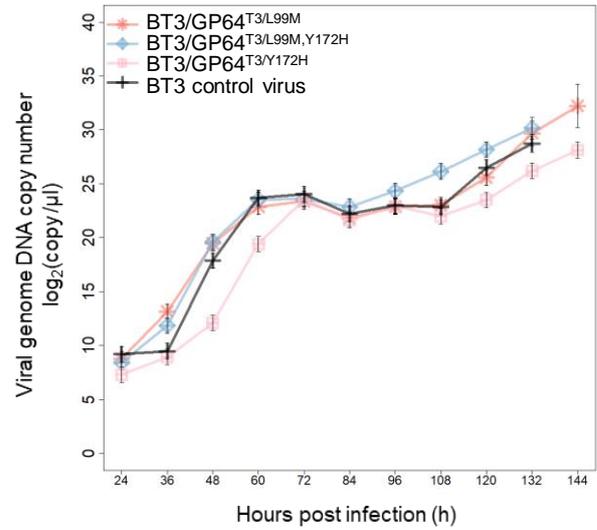
Fig.8

(c)



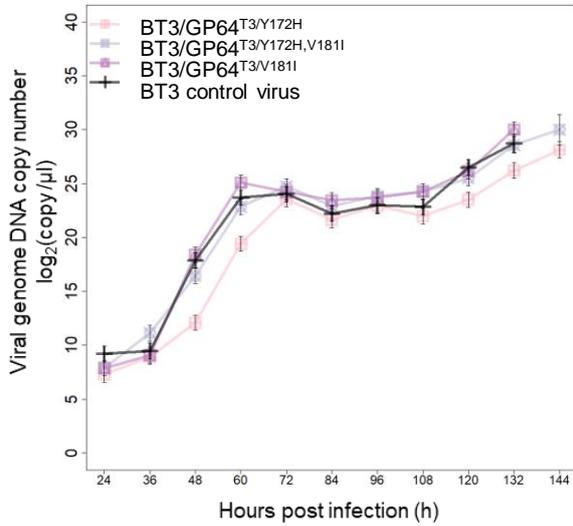
	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144
BT3/GP64 <sup>T3/A30Δ</sup>											
BT3/GP64 <sup>T3/G158S</sup>		*								*	**
BT3/GP64 <sup>T3/R191K</sup>		**	**	*		*	*	**	*		
BT3 control virus											

(d)



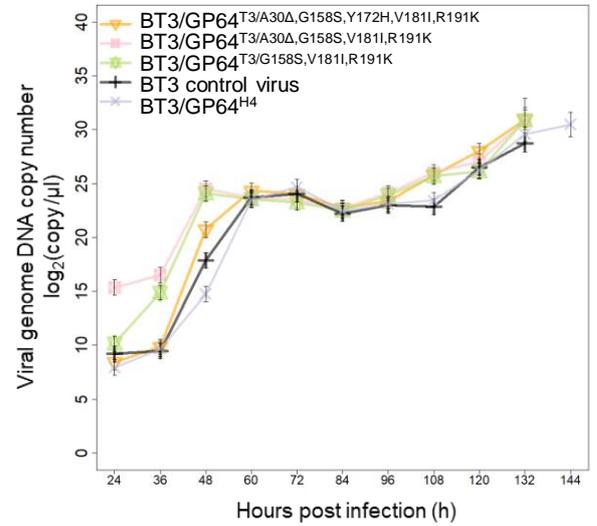
	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144
BT3/GP64 <sup>T3/L99M</sup>		*									*
BT3/GP64 <sup>T3/L99M,Y172H</sup>		*						**			
BT3/GP64 <sup>T3/Y172H</sup>			**	*		*			*		**
BT3 control virus											

(e)



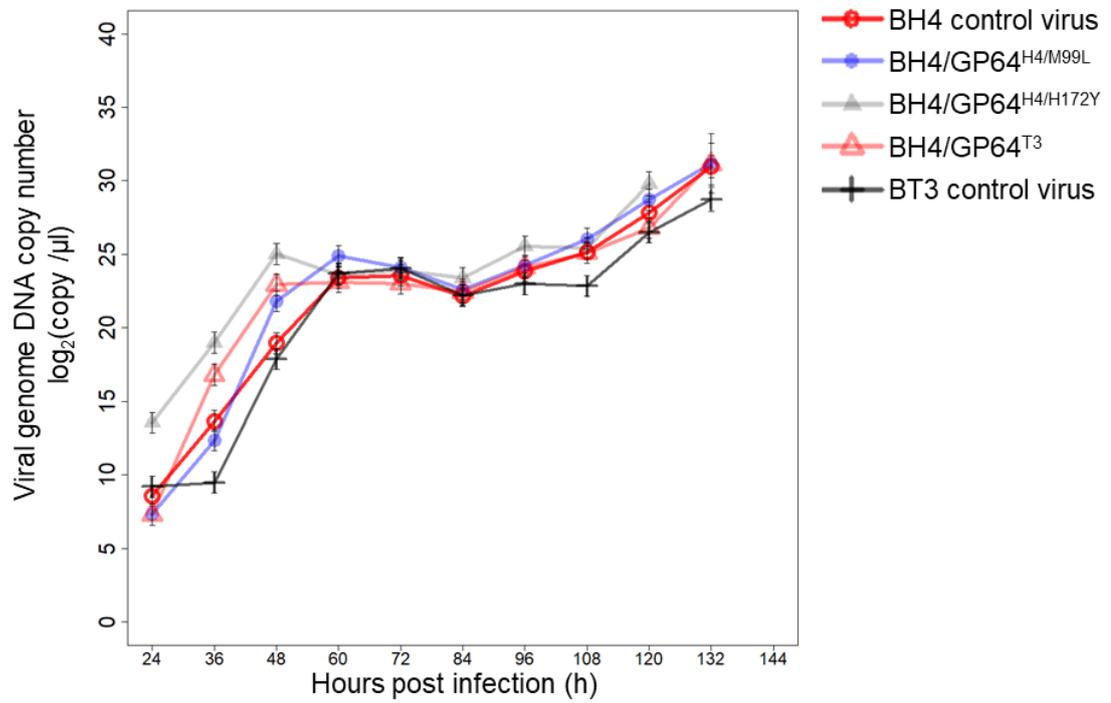
	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144
BT3/GP64 <sup>T3/Y172H</sup>			*	*							*
BT3/GP64 <sup>T3/Y172H,V181I</sup>		*									*
BT3/GP64 <sup>T3/V181I</sup>			*	*		*	*	*	*	*	*
BT3 control virus											

(f)



	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144
BT3/GP64 <sup>T3/A30Δ,G158S,Y172H,V181I,R191K</sup>		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
BT3/GP64 <sup>T3/A30Δ,G158S,V181I,R191K</sup>	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
BT3/GP64 <sup>T3/G158S,V181I,R191K</sup>		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
BT3 control virus											
BT3/GP64 <sup>H4</sup>			*								**

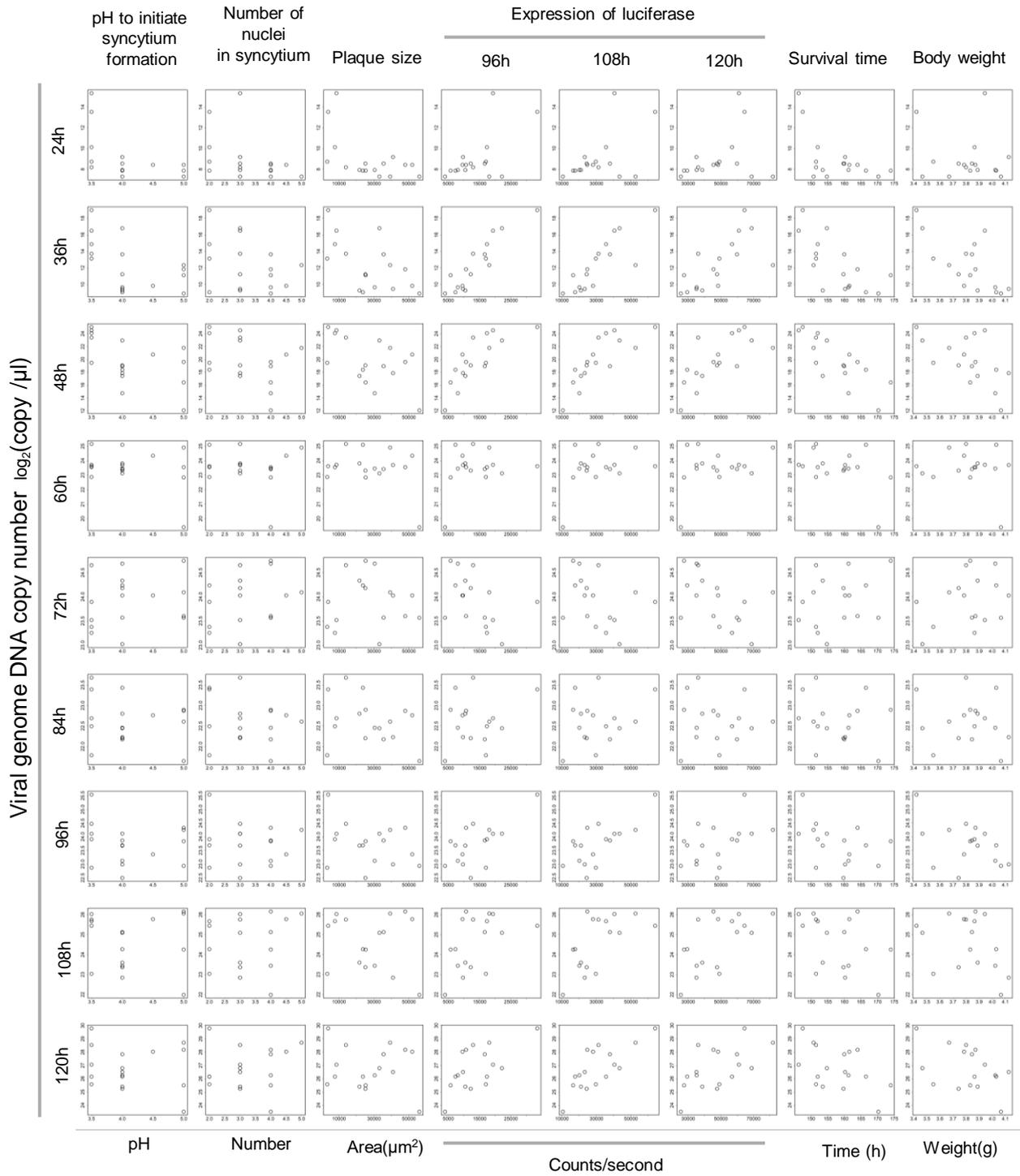
Fig.8 (g)



	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144
BT3 control virus			*								
			*	*	.		.	*	*	.	
		*	*	*			*	*	*	*	
		.	*	*						.	
BH4 control virus			*	*	*	.		*	.		
		*	*	*			.		.	*	
			*	*							



Fig.8 (i)



(i) Relationship between phenotypes and viral multiplication in silkworm larvae of the viruses. Scatter plots of viral multiplication at 24-120 hours after infection (y axis) versus pH to initiate syncytium formation, the number of nuclei in syncytium, plaque size, expression of luciferase 96-120 hours post infection, survival time, body weight of silkworm larvae (x axis), respectively.

Table 5 Correlation coefficient of viral multiplication in silkworm larvae versus pH to initiate syncytium formation, number of nuclei in syncytium, plaque size, luciferase expression, survival time and body weight of larvae.

	pH to initiate syncytium formation	Number of nuclei in syncytium	Plaque size	Expression of luciferase			Survival time	Body weight
				96h	108h	120h		
24h	-0.60 <sup>a*</sup>	-0.42 <sup>a·</sup>	-0.49 <sup>c·</sup>	0.43 <sup>c·</sup>	0.37 <sup>c</sup>	0.30 <sup>c</sup>	-0.48 <sup>c·</sup>	-0.044 <sup>c</sup>
36h	-0.57 <sup>a·</sup>	-0.36 <sup>a</sup>	-0.58 <sup>b*</sup>	0.91 <sup>b***</sup>	0.84 <sup>b***</sup>	0.70 <sup>b**</sup>	-0.69 <sup>b**</sup>	-0.70 <sup>b**</sup>
48h	-0.60 <sup>a·</sup>	-0.29 <sup>a</sup>	-0.55 <sup>b*</sup>	0.79 <sup>b***</sup>	0.81 <sup>b***</sup>	0.71 <sup>b***</sup>	-0.78 <sup>b***</sup>	-0.582 <sup>b*</sup>
60h	-0.35 <sup>a</sup>	-0.0096 <sup>a</sup>	-0.12 <sup>c</sup>	0.13 <sup>c</sup>	0.25 <sup>c</sup>	0.13 <sup>c</sup>	-0.34 <sup>c</sup>	0.096 <sup>c</sup>
72h	0.19 <sup>a</sup>	0.25 <sup>a</sup>	0.018 <sup>b</sup>	-0.45 <sup>b·</sup>	-0.34 <sup>b</sup>	-0.51 <sup>b·</sup>	0.31 <sup>b</sup>	0.31 <sup>b</sup>
84h	-0.19 <sup>a</sup>	-0.16 <sup>a</sup>	-0.31 <sup>b</sup>	0.19 <sup>b</sup>	0.25 <sup>b</sup>	-0.029 <sup>b</sup>	-0.17 <sup>b</sup>	-0.12 <sup>b</sup>
96h	-0.15 <sup>a</sup>	-0.072 <sup>a</sup>	-0.31 <sup>b</sup>	0.66 <sup>b**</sup>	0.71 <sup>b**</sup>	0.46 <sup>b</sup>	-0.43 <sup>b</sup>	-0.45 <sup>b·</sup>
108h	-0.072 <sup>a</sup>	0.22 <sup>a</sup>	-0.15 <sup>b</sup>	0.48 <sup>b·</sup>	0.63 <sup>b*</sup>	0.61 <sup>b*</sup>	-0.43 <sup>b</sup>	-0.35 <sup>b</sup>
120h	-0.17 <sup>a</sup>	0.19 <sup>a</sup>	-0.12 <sup>b</sup>	0.62 <sup>b*</sup>	0.76 <sup>b***</sup>	0.59 <sup>b*</sup>	-0.49 <sup>b·</sup>	-0.44 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Polyserial correlation coefficient

<sup>b</sup> Pearson's correlation coefficient

<sup>c</sup> Spearman's correlation coefficient

Significant correlation were shown(\*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*,  $p < 0.05$ ; ·,  $p < 0.1$ ).

Fig.9 (a)

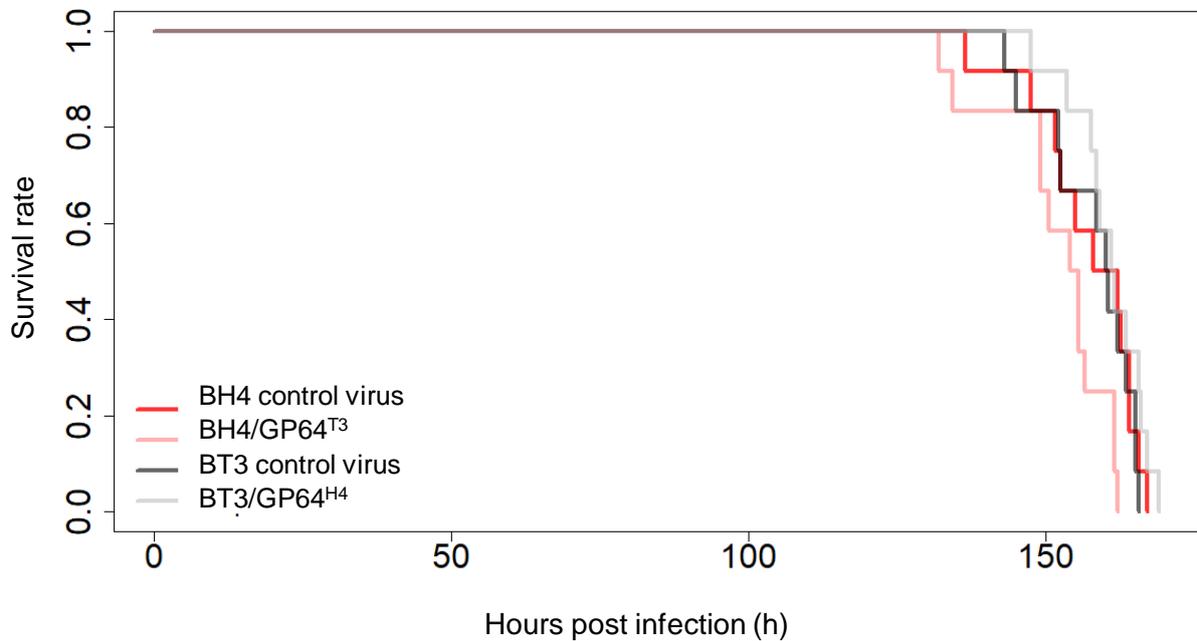
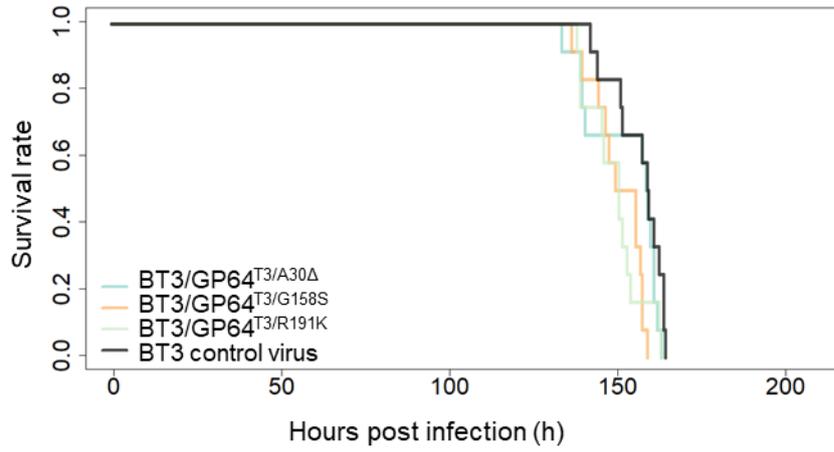


Figure 9 Survival curves for fifth instar silkworm larvae infected with the parental and the 15 mutant gp64-mutant viruses. Fifth instar silkworm larvae (n=12) were infected with the parental and the 15 mutant gp64-mutant viruses at 100 PFU. Death was recorded at 1-hour intervals.

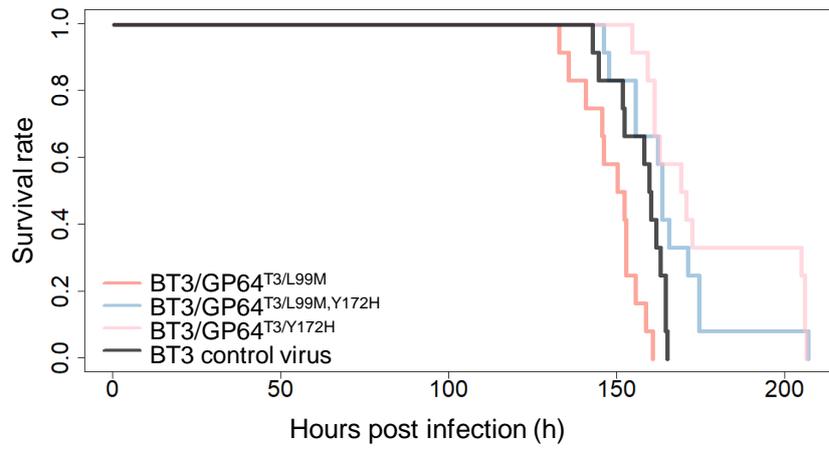
(a-f) Comparison of subset of mutant viruses to the parental virus. (a) gp64 chimeric viruses: BT3 control virus, BH4 control virus, BT3/GP64<sup>H4</sup> and BH4/GP64<sup>T3</sup>. (b) Single mutant viruses: BT3 control virus, BT3/GP64<sup>T3/A30Δ</sup>, BT3/GP64<sup>T3/G158S</sup> and BT3/GP64<sup>T3/R191K</sup>. (c) Y172H and L99M mutant viruses: BT3 control virus, BT3/GP64<sup>T3/L99M</sup>, BT3/GP64<sup>T3/Y172H</sup> and BT3/GP64<sup>T3/L99M,Y172H</sup>. (d) Y172H and V181I mutant viruses: BT3 control virus, BT3/GP64<sup>T3/Y172H</sup>, BT3/GP64<sup>T3/V181I</sup> and BT3/GP64<sup>T3/Y172H,V181I</sup>. (e) triple, quadruple, and quintuple mutant viruses: BT3 control virus, BT3/GP64<sup>T3/G158S,V181I,R191K</sup>, BT3/GP64<sup>T3/A30Δ,G158S,V181I,R191K</sup>, GP64<sup>T3/A30Δ,G158S,Y172H,V181I,R191K</sup> and BT3/GP64<sup>H4</sup>. (f) H4-based mutant viruses: BT3 control virus, BH4 control virus, BH4/GP64<sup>H4/M99L</sup>, BH4/GP64<sup>H4/H172Y</sup> and BH4/GP64<sup>T3</sup>.

Fig.9

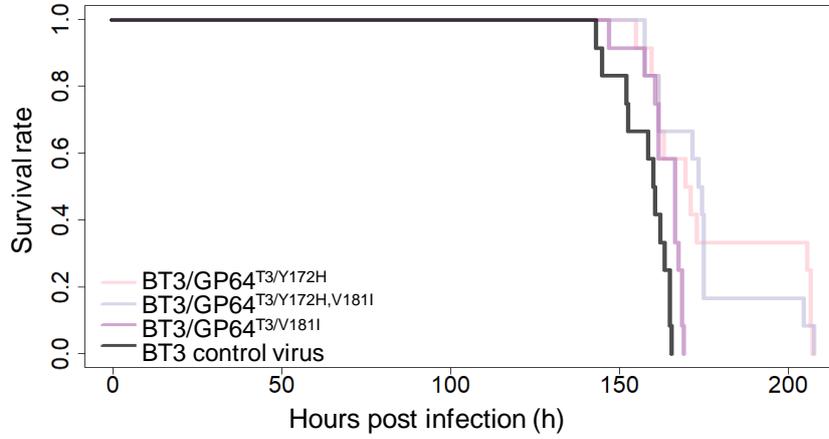
(b)



(c)



(d)



(e)

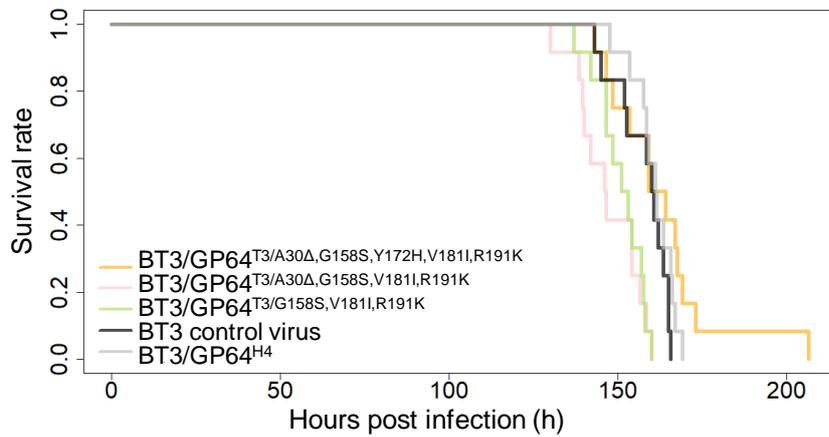


Fig.9 (f)

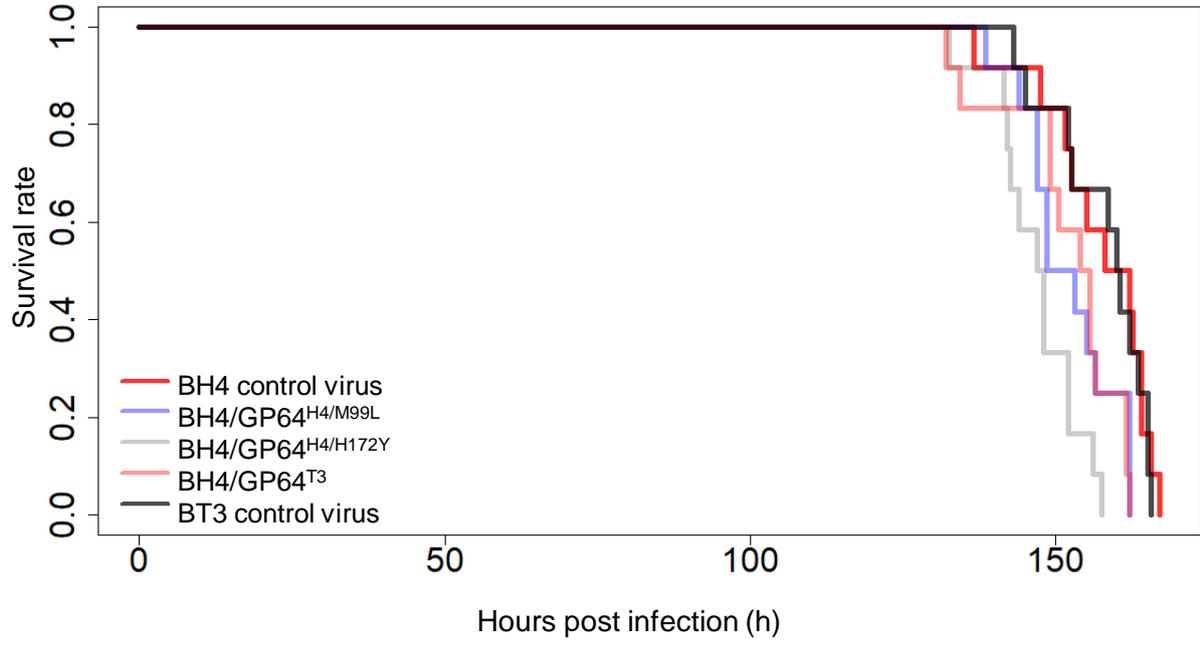


Fig.10 (a)

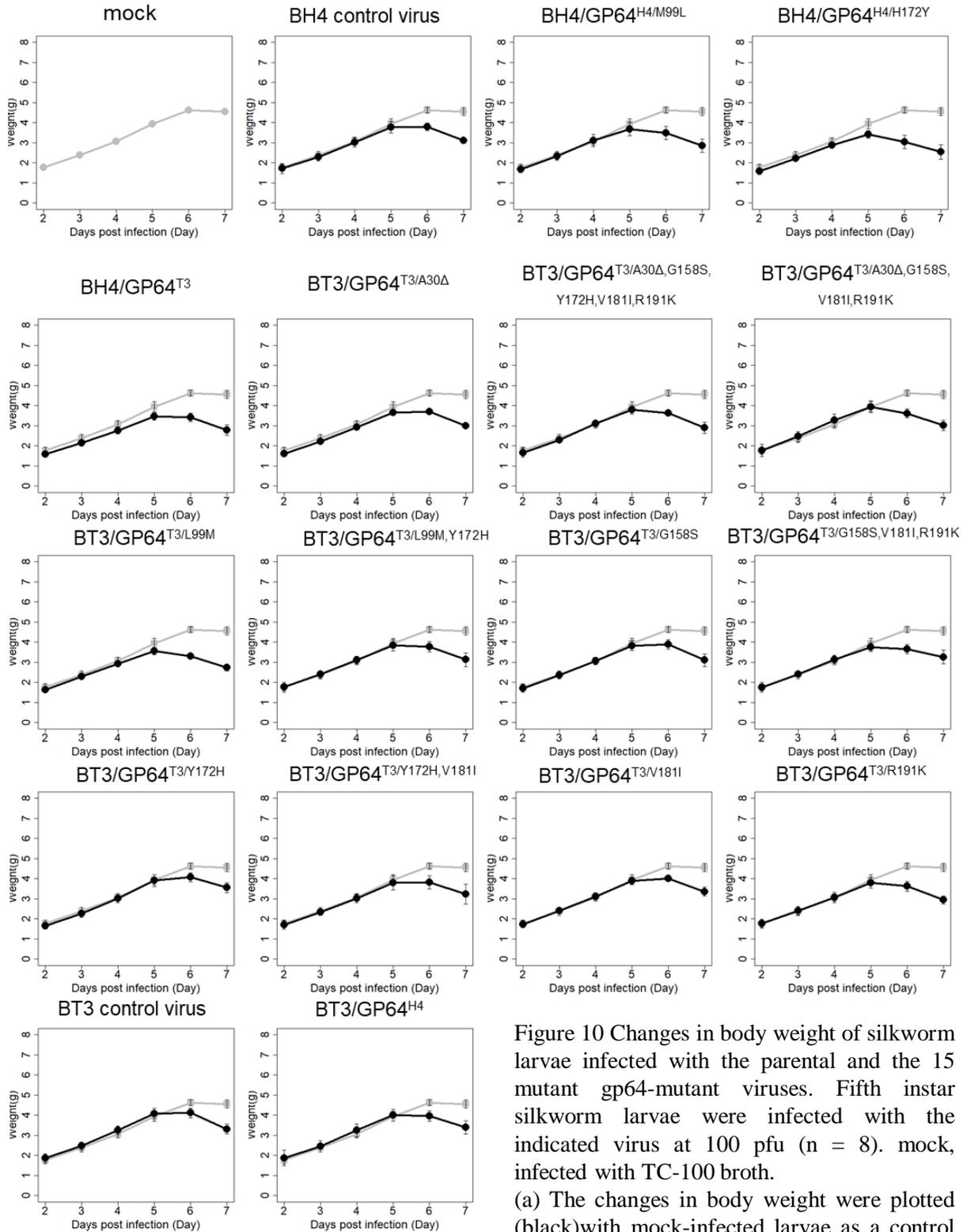
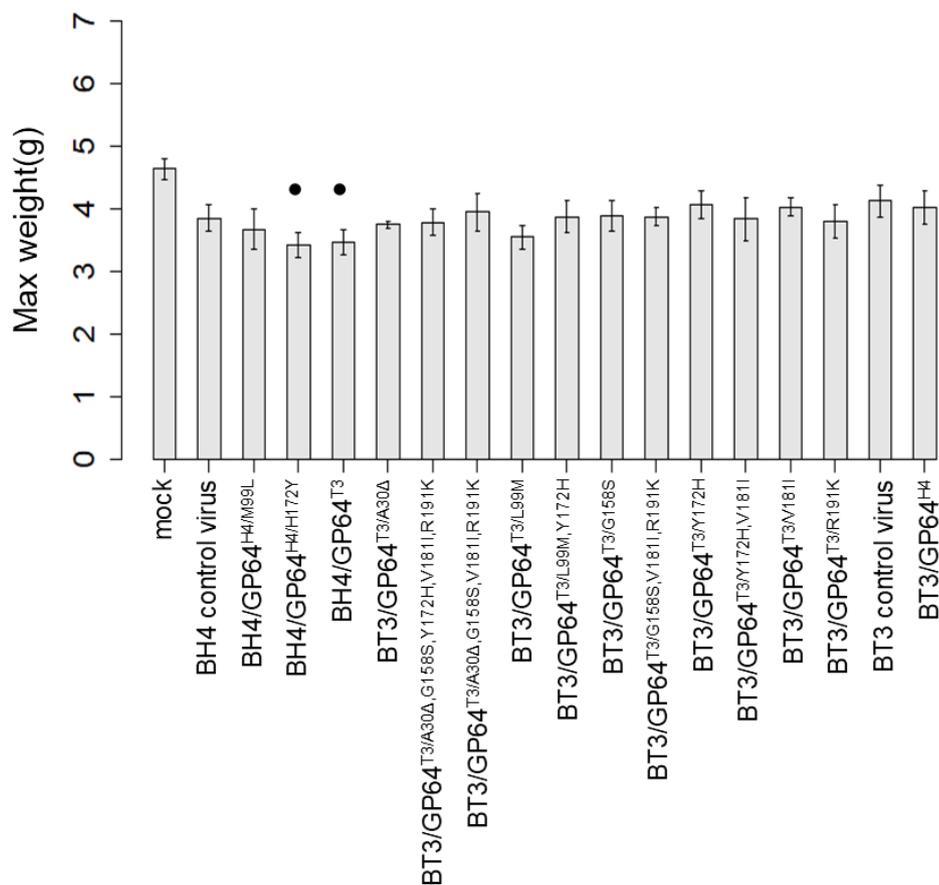


Figure 10 Changes in body weight of silkworm larvae infected with the parental and the 15 mutant gp64-mutant viruses. Fifth instar silkworm larvae were infected with the indicated virus at 100 pfu (n = 8). mock, infected with TC-100 broth.

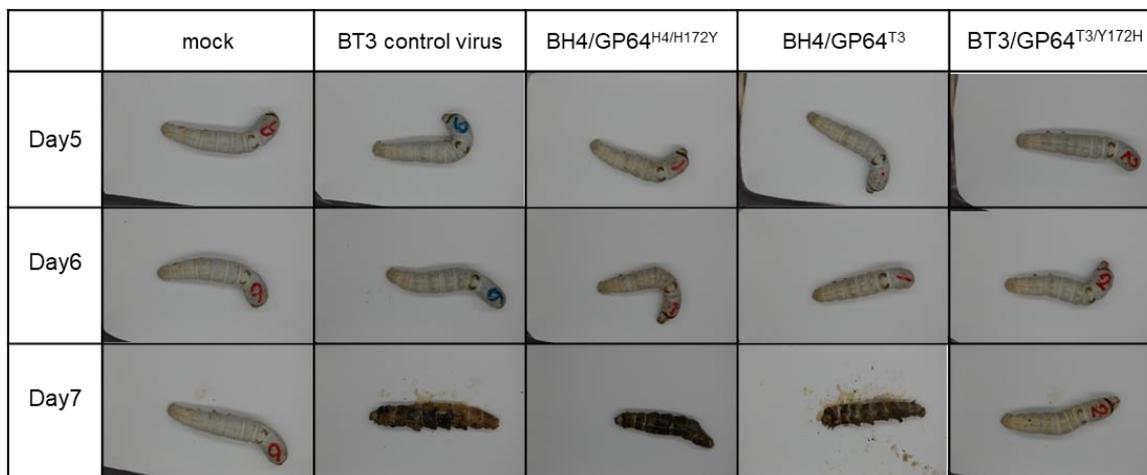
(a) The changes in body weight were plotted (black)with mock-infected larvae as a control (gray). The vertical axis represents the body weight of the silkworm infected with the virus, the horizontal axis represents the time point (day), and the error bars indicate standard errors of the means. Each experiment was performed three times.

Fig.10

(b)



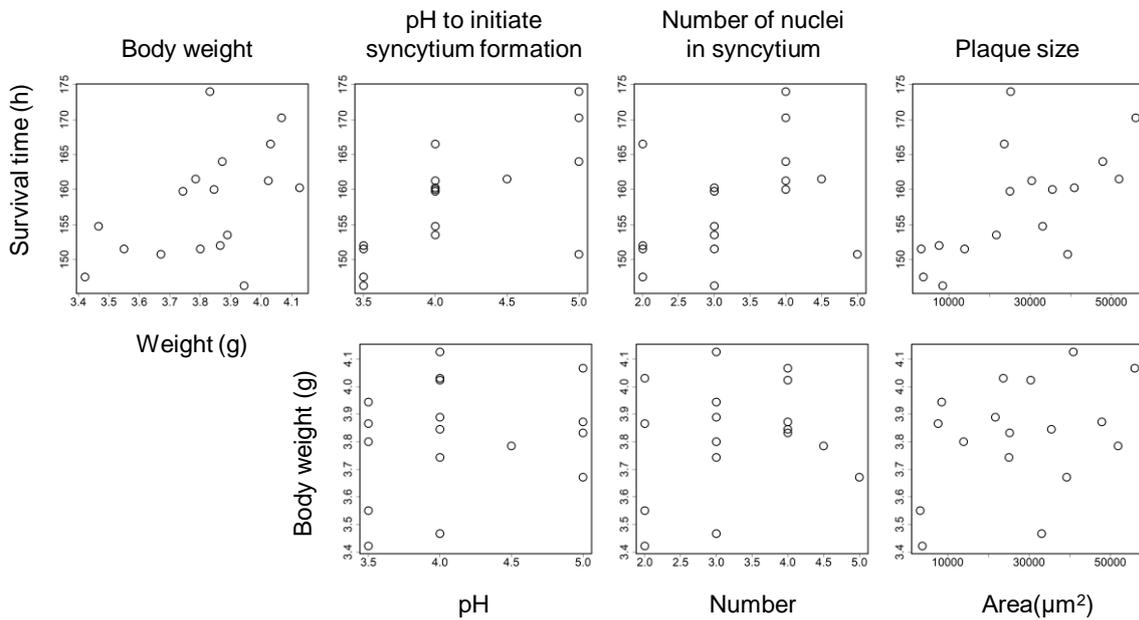
(c)



(b) Maximum body weight of silkworm larvae infected with the parental and the 15 mutant gp64-mutant viruses. The vertical axis represents the body weight of the silkworm infected with the virus, the horizontal axis represents the time point (day), and the error bars indicate standard errors of the means. Each experiment was performed three times. Viruses that were significantly different compared to mock infected were shown. (\*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*,  $p < 0.05$ ; •,  $p < 0.1$ ).

(c) Photographs of larvae infected with mock, BT3 control virus, BH4/GP64<sup>H4/H172Y</sup>, BH4/GP64<sup>T3</sup> and BT3/GP64<sup>T3/Y172H</sup> at 5, 6 and 7 days post-infection.

Fig.10 (d)



(d) Relationships between survival time and weight of infected silkworm larvae, and cellular phenotypes of the viruses. Scatter plots median of survival time or max weight of infected silkworm larvae (y axis) versus or max weight of silkworm larvae, pH to initiate syncytium formation, the number of nuclei in syncytium and plaque size (x axis), respectively.

Table 6 Correlation coefficient of survival time or body weight of silkworm larvae versus pH to initiate syncytium formation, number of nuclei in syncytium, plaque size and body weight of larvae.

	Body weight	pH to initiate syncytium formation	Number of nuclei in syncytium	Plaque size
Survival time	0.50 <sup>b</sup> ·	0.76 <sup>a*</sup>	0.30 <sup>a</sup>	0.62 <sup>b*</sup>
Body weight	-	0.24 <sup>a</sup>	0.13 <sup>a</sup>	0.38 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Polyserial correlation coefficient

<sup>b</sup> Pearson's correlation coefficient

Significant correlation were shown (\*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*,  $p < 0.05$ ; ·,  $p < 0.1$ ).

## IV. 考察

GP64 は膜融合タンパク質として同定され、それゆえ、その機能解析の実験材料として培養細胞を用いた細胞学的・生化学的研究が GP64 研究の中心であった。機能ドメイン同定や各アミノ酸残基の役割などの遺伝学的解析においても画一的にアラニンに置換するアラニンスキャニングと培養細胞での実験を組み合わせで解析されてきた (Dong and Blissard, 2012、Zhou and Blissard, 2008、Li and Blissaed, 2008、Li and Blissard, 2009a、Li and Blissard, 2009b、Li and Blissard, 2011、Yu *et al.*, 2016、Yu *et al.*, 2020)。それらが主流となっている学術的背景があり、宿主昆虫体内でのウイルス増殖への GP64 の貢献は注目を集めてこなかった。また、進化学的着眼点での GP64 アミノ酸残基の解析は BmN 細胞における Katou *et al.* (2010)、Xu *et al.* (2012) の 2 報のみであり、細胞より高次の生物学的コンテキストで GP64 は解析されてこなかった。

本研究では GP64 にユニークなアミノ酸多型を持つ BmNPV H4 株に着目し、標準株 T3 系統と H4 系統の GP64 の間で異なる 6 つのアミノ酸残基について、個体でのウイルス表現型を含めた増殖特性に単独あるいは組み合わせでのアミノ酸置換が与える影響を調査した。本研究の主たる観察結果として以下の 4 点が明らかになった：①T3 系統、H4 系統の間では GP64 の違いがそれ以外のゲノムの違いよりもウイルス増殖に貢献する因子であった。②Y172H が膜融合活性の上昇、プラークサイズの増加だけでなく、カイコでのウイルス増殖能の低下、感染カイコの生存時間の延長、病徴の軽減に大きく影響した。③L99M 等の H4 系統が持つ Y172H 以外のアミノ酸多型は、Y172H との相加的・相乗的な相互作用を膜融合活性、プラークサイズ、感染カイコの生存時間、病徴発現に関して示すことを明らかにした。④アミノ酸多型によって変化する細胞レベル、個体レベルでの表現型の間に関連関係が観察され、GP64 の細胞レベルでの機能が高次の表現型に影響している可能性が示唆された。

### カイコでのウイルス増殖への GP64 の貢献度

H4 株は T3 株と比較してカイコ個体においてウイルス増殖が高く、ポリヘドリン生産量が多いなどの表現型の違いを持つ。H4 株と T3 株のゲノムを比較すると、GP64 以外に 1193 個のアミノ酸残基の違いを持ち (酒井、2012)、GP64 以外にも多くの多型が存在する。GP64 とそれ以外の遺伝子群の多型がカイコでのウイルス増殖に対する貢献度は、BT3 control virus と T3 系統の GP64 変異ウイルスの増殖量の差、GP64<sup>T3</sup> をもつ H4

キメラウイルス (BH4/GP64<sup>T3</sup>) と BT3 control virus のウイルス増殖量の差の大きさの違いから推定できる。感染後 24~120 時間のすべてのタイムポイントにおいて T3 系統の GP64 変異ウイルス間の増殖量の変化の大きさが、BH4/GP64<sup>T3</sup> と BT3 control virus との増殖量の差を上回った (Fig. 8-(a)~(f); それぞれ 71.5、6.6、234.6、79.6、6.6、3.5、3.8、3.8、63.7 倍)。つまり、GP64 のアミノ酸変異による増殖への影響が、T3 株、H4 株における GP64 以外の遺伝子の多型やその組み合わせが増殖に与える影響より大きかった。この結果から、GP64 は BmNPV のカイコでの増殖に大きく影響する重要遺伝子であると考えられる。

### Y172H がウイルスの表現型に与える影響

本研究で解析を行った GP64 アミノ酸置換のうち、Y172H は膜融合活性の上昇、プラークサイズの増大、またカイコでのウイルス増殖の減少、ウイルス感染カイコの生存時間の延長、病徴の軽減に最も影響を与えた。先行研究で、GP64<sup>T3</sup> の Y172 に相当する GP64<sup>Ac</sup> の H155 は膜融合に関わるヒスチジンクラスター残基の 1 つであり、H155 を含む領域 F153~H156 は膜融合過程におけるヘミフュージョンに関わる (Li and Blissard, 2011、Dong and Blissard, 2012)。また、BmNPV N9 株の GP64 では、本研究での GP64<sup>T3</sup> の Y172 に相当するアミノ酸残基である Y153 をヒスチジンに置換すると、膜融合活性が高まり、BmNPV の宿主細胞以外の様々な宿主由来の細胞に侵入可能になった (Katou *et al.*, 2006、Katou *et al.*, 2010)。さらに、カイコ個体においてはウイルスの増殖の減少、感染カイコの生存時間を延長させることを報告しており (Sekiguchi *et al.*, 2020)、これらからも、172 番目のアミノ酸残基は GP64 の膜融合能、BmNPV 増殖、宿主域決定に重要なアミノ酸残基であることが支持される。では、172 番目のチロシンとヒスチジンはどのように選択されたのだろうか。BmNPV 以外のバキュロウイルスでは GP64<sup>T3</sup> の Y172 に相当するアミノ酸残基はヒスチジンが保存されているが (Kadlec *et al.*, 2008)、BmNPV 系統群では H4 株以外のすべての BmNPV 系統でチロシンに置換されている (Fig.1、Supplementary Fig. 1)。カイコの近縁種のクワコから単離された BomaNPV では、BomaNPV S1 株では GP64<sup>T3</sup> の 172 番目に相当するアミノ酸残基はチロシンであるが、BomaNPV S2 株 (Xu *et al.*, 2012) では他のバキュロウイルスと同様ヒスチジンである。BomaNPV S1 株はゲノム配列を用いて推定した系統樹 (Fig.2) では BmNPV 系統群と同じクレードに属し、BmNPV と同様な進化を経た株であると考えられる。これらを併せ

て考察すると、BmNPV は進化の過程で BomaNPV との共通祖先がカイコに感染する機会を得た後、BT3/GP64<sup>T3/Y172H</sup> で観察されたカイコでの増殖性の低さから、Y172 への置換を獲得した変異体がカイコへ適応し、現在の BmNPV では Y172 が固定された可能性が高い (Fig.2)。つまり、バキュロウイルスのカイコへの適応には、GP64 の 172 番目のアミノ酸残基がチロシンに変異したことが主要な因子であったことが示唆される。

#### H4 株の Y172H 以外の他の 5 つのアミノ酸多型の役割

H172Y が BmNPV の祖先ウイルスにとってカイコへの適応進化における重要因子だったと仮定すると、H4 株はそれに反しており、他の BmNPV 系統とは異なる独自の進化を経たことが想像される。H4 株と T3 株を比較すると、H172 以外にも Δ30、M99、S158、I181、K191 の多型を持つ (Fig.1)。なかでも、M99 は H4 株の GP64 のみが獲得したユニークなアミノ酸残基である (Fig.1、Supplementary Fig. 1)。これらアミノ酸置換の間の関係性を次に考察する (Table 7)。

#### BT3/GP64<sup>T3/L99M,Y172H</sup>

L99M、Y172H の組み合わせは H4 株の GP64 特異的なアミノ酸多型の組み合わせである。BT3/GP64<sup>T3/L99M,Y172H</sup> と BT3/GP64<sup>T3/L99M</sup>、BT3/GP64<sup>T3/Y172H</sup> の表現型を比較すると、Y172H は膜融合活性、培養細胞でのウイルス増殖をそれぞれ増加、促進させるが、L99M はそれらに対して低下、減少の効果を持っていた。また、カイコ幼虫においても Y172H によるウイルス増殖低下、生存時間延長を L99M のカイコでの増殖の促進や生存時間の短縮の効果で打ち消したと予想された。よって、BT3/GP64<sup>T3/L99M,Y172H</sup> は、1 アミノ酸置換体同士の足し算の表現型で表されることが示唆された。また、Y172H は細胞では、膜融合活性やプラークサイズにおいて L99M より形質に与える影響が強く、カイコでは L99M が増殖、感染カイコの生存時間などのウイルスの形質に与える影響が Y172H より強かった (Table 7)。これら 2 つのアミノ酸は機能が既知であり、GP64 の膜融合タンパク質としての機能に重要な役割をもつ。バキュロウイルスで高度に保存されている L99 に相当する AcGP64 の L82 は、GP64 融合ドメイン上の細胞膜と相互作用する領域である fusion loop1 に存在し、膜融合の過程 fusion pore 拡大に関与する膜融合に必須なアミノ酸残基である (Kadlec *et al.*,2008、Dong and Blissard, 2012)。また、レセプター結合にも関与している (Dong and Blissard, 2012)。Y172 に相当する AcMNPV の H155 は

レセプター結合に必須なアミノ酸 F153、H156 (Zhou and Blissard, 2008) の間で fusion loop2 の隣に位置し、さらに、H155 は膜融合に関わるヒスチジンクラスター残基であり、H155 を含む領域 F153~H156 は膜融合過程におけるヘミフュージョンに関わるアミノ酸残基であることが分かっている (Li and Blissard, 2011、Dong and Blissard, 2012)。これら 2 つのアミノ酸残基は宿主膜との相互作用に重要な fusion loop に位置し、膜融合に関与する機能をもつことから、膜融合活性試験の結果からも支持されるように、これら 2 つのアミノ酸が GP64 の膜融合活性に影響を与えたことによりウイルス増殖や感染カイクの生存時間などのウイルスの表現型に対して相互作用したと考えられる。

#### BT3/GP64<sup>T3/Y172H,V181I</sup>

V181 は GP64 を持つ GroupI アルファバキュロウイルスで広く保存されているアミノ酸残基である。Y172H、V181I の組み合わせは AcMNPV、BomaNPV S2 株の GP64 にも存在する。BT3/GP64<sup>T3/Y172H,V181I</sup> の表現型を見ると、Y172H が持つ培養細胞での膜融合活性、プラークサイズの増大、ウイルス増殖の促進の効果は、V181I と組み合わせることで減少した。カイク個体でのウイルス増殖、生存時間に関しては、Y172H による増殖低下を V181I が補う効果が観察された。これら結果から、ウイルスの表現型における優位性は V181I が Y172H より上位にあると結論された (Table 7)。V181I、Y172H はどちらも GP64 の融合ドメイン (ドメイン I) に存在するが、構造上離れた位置にある (Fig.3-(a)、(b))。先行研究で GP64 のドメインIVにあり、残基同士の距離が近いアミノ酸残基のペアについて相互作用が調べられたが (Yu *et al.*, 2020)、本研究の結果から、タンパク質の構造上、相互作用する距離にはない離れたアミノ酸残基同士でもウイルスの表現型に対しては相互作用し、ウイルスの表現型に影響を与える可能性があることを示唆した。

#### BT3/GP64<sup>T3/G158S,V181I,R191K</sup>

G158、V181、R191 も、H172 と同様に GP64 を持つ GroupI アルファバキュロウイルスで広く保存されている。また、この 3 つのアミノ酸の組み合わせは韓国で分離された BmNPV C2 株にも見られる変異である。BT3/GP64<sup>T3/G158S,V181I,R191K</sup> の培養細胞・またはカイクでの表現型はおおむね BT3/GP64<sup>T3/R191K</sup> の特徴と同じであり、G158S、V181I の効果はほとんど反映されなかった (Table 7)。

## BT3/GP64<sup>T3/A30Δ,G158S,V181I,R191K</sup>

A30 Δ は GP64 のシグナルペプチドの疎水性領域上に存在し、H4 株の GP64 が新しく獲得したアミノ酸変異であるが、この部位はバキュロウイルスの間で保存性が低く、アラニンの数やアミノ酸残基の種類に多様性が見られる (Fig.1)。BT3/GP64<sup>T3/A30Δ,G158S,V181I,R191K</sup> の表現型は、培養細胞・カイコの両方において BT3/GP64<sup>T3/G158S,V181I,R191K</sup> と BT3/GP64<sup>T3/A30Δ</sup> の相加的な相互作用であった。この組み合わせにおいては R191K がウイルスの膜融合活性や細胞・カイコでの増殖、感染カイコの生存時間に主たる効果をもつアミノ酸置換であり、A30 Δ、G158S、V181I はほとんど影響を与えなかった (Table 7)。

## BT3/GP64<sup>T3/A30Δ,G158S,Y172H,V181I,R191K</sup>

Y172 は BmNPV で高度に保存されているが、BmNPV 以外のバキュロウイルスでは H172 が保存されている。A30 Δ/S158/Y172H/I181/K191 の組み合わせは、H4 株の GP64 が H4 株特異的なアミノ酸残基 M99 を獲得する前の祖先ウイルスを仮定して実験的検証を行えるアミノ酸残基の組み合わせである。BT3/GP64<sup>T3/A30Δ,G158S,Y172H,V181I,R191K</sup> のカイコ個体での表現型は、おおむね BT3/GP64<sup>T3/A30Δ,G158S,V181I,R191K</sup> と BT3/GP64<sup>T3/Y172H</sup> の形質が相加的に相互作用している表現型を示した。しかし、培養細胞での膜融合活性やウイルス増殖では、Y172H 単独での膜融合活性の増加、プラークサイズの増大などの影響が BT3/GP64<sup>T3/A30Δ,G158S,V181I,R191K</sup> の組み合わせによる膜融合活性の低下、プラークサイズの縮小などの影響より強く、培養細胞でのウイルスの表現型はおおむね BT3/GP64<sup>T3/Y172H</sup> の特徴と同じであった。よって、この結果から、Y172H は培養細胞において、A30 Δ、G158S、V181I、R191K より表現型に与える影響が大きいことが示唆された。

## BT3/GP64<sup>H4</sup>

GP64<sup>H4</sup> をもつ T3 であるキメラウイルス BT3/GP64<sup>H4</sup> の膜融合活性、細胞での増殖はおおむね BT3/GP64<sup>T3/A30Δ,G158S,Y172H,V181I,R191K</sup> と BT3/GP64<sup>T3/L99M</sup> の表現型の足し算で表された。カイコでは、BT3/GP64<sup>H4</sup> は BT3 control virus とほぼ同程度の増殖、感染カイコの生存時間を示したが、BT3/GP64<sup>T3/L99M</sup> と BT3/GP64<sup>T3/A30Δ,G158S,Y172H,V181I,R191K</sup> は T3 control virus と比較してウイルス増殖が高く、感染カイコの生存時間も短縮した。よって、カイコにおける T3 control virus の表現型は BT3/GP64<sup>T3/L99M</sup> と

BT3/GP64<sup>T3/A30A,G158S,Y172H,V181I,R191K</sup>の表現型の足し合わせでは説明ができなかった。ここまでの結果から、カイコでは BT3/GP64<sup>H4</sup> は個々のアミノ酸の表現型の足しあわせから推定される表現型よりもウイルスの病原性が弱くなると考えられた。

以上を総合すると、H4 株が持つ GP64 多型は、H172 のカイコでの増殖低下、感染カイコの生存時間延長の効果に対し、それを緩衝する形で、ウイルスのカイコ個体での表現型、特にウイルス感染個体の生存時間を T3 株に近くしていると示唆された。また、M99 は H172 の効果を緩衝するだけではなく、カイコ個体でのウイルス表現型に単独でも増殖の増加や生存時間の短縮に有意な効果を持ち、H4 株が特異的に M99 を獲得したことは H4 株の進化を考えるもう 1 つの鍵であることを想像させる。本研究で作成した BH4/GP64<sup>H4/M99L</sup> は、H4 株が M99 を獲得する前の祖先ウイルスを実験的に評価できるウイルスである。BH4/GP64<sup>H4/M99L</sup> は BH4 control virus と比較すると、カイコ個体のウイルス増殖の増加、感染カイコ生存時間の短縮、高病原性の表現型が観察された。感染カイコ生存時間の短縮、高病原性は関連した表現型として考えられ、ウイルス増殖量も生存時間と相関があった (Fig.8-(i)、Table 5)。また、生存時間が延長された場合にウイルス増殖が低い傾向が観察されているが、細胞破壊的な生活環を持つバキュロウイルスの感染において、生存時間を伸ばすメカニズムがウイルス増殖メカニズムに先行して機能し、ウイルス増殖を低下させる現象は考えにくい。よって、進化的シナリオとしては、BmNPV はウイルス増殖の増減を介して感染個体の生存時間を調節していると考えられる。この仮説の下では、H4 株は L99M 変異を獲得し、個体でのウイルス増殖量を低下させ、カイコの生存時間を延長したと考えられる。T3 株と H4 株は現存するウイルスであるため、これら 2 つのウイルスは宿主であるカイコに適応進化した結果、共通する表現型を持っていると考えられる。T3 株と H4 株に共通する表現型は中程度の生存時間である。よって、BmNPV での適応進化を駆動する生物学的現象は、感染個体の生存時間だと考えられた。

## ウイルス感染個体の生存時間と適応進化

では、感染個体の生存時間が何故、カイコへの適応進化に重要なのかを考察する。BmNPV に感染したカイコは、感染後期にウイルスによって行動が活発になり、BmNPV のウイルス粒子を含んだ包埋体を体液とともに周囲にまき散らしながら徘徊行動をとり、子孫ウイルスを別のカイコ個体へと伝搬する (Goulson, 1997、Katsuma *et al.*, 2012、

カイコの科学、日本蚕糸学会[編]。カイコは完全に家畜化されており、5 齢カイコでは 10 cm 四方の面積で 5 匹の高密度で飼育されている（カイコの実験単、日本蚕糸学会[編]）。包埋体はカイコ幼虫に食下されることで新たな個体へと感染するため、BmNPV に感染し、徘徊行動をとるまで感染ステージが進んだカイコの周囲に桑を食べる幼虫が存在することが BmNPV の個体間感染に重要である。本研究の観察結果から、カイコの病徴の進行速度はウイルスの種類によって差があり、またカイコの病徴を表す指標である感染カイコの体重減少はカイコの生存時間の短縮と弱い正の相関がある（Fig.8-(i)、Table 5）。感染カイコの生存時間を短くする特徴をもつウイルスに感染したカイコは病徴の進行がはやいため、カイコが徘徊行動をとり、子孫ウイルスを伝搬する前にカイコを飼育する人間によって病徴を発見され取り除かれてしまうため、子孫ウイルスを伝搬できない（Fig. 11）。一方、感染カイコの生存時間を延長させる特徴をもつウイルスに感染したカイコは、ウイルスの増殖が低いため病徴の進行も遅いため、感染カイコが徘徊行動をとり、周囲のカイコにウイルスを伝搬する前に周囲のカイコが桑の摂食をやめ上族してしまうと考えられた（Fig. 11）。カイコの品種にもよるが、カイコは 5 齢起蚕から 5~7 日目で桑の摂食量が減り、6~8 日で吐糸し蛹化する（カイコの実験単、日本蚕糸学会[編]）。Y172H は感染後 7 日目でもカイコの病徴が弱く、(Fig.10-(c)、Supplementary Fig.2) まだウイルスを伝搬できないと予想された。

よって、カイコの生存時間が T3 株、H4 株のような中程度を示す表現型が BmNPV の子孫ウイルスの伝搬において最も宿主に適応していると考えられた。したがって、感染カイコの生存時間は BmNPV の適応進化を駆動する生物学的に重要な因子であると結論づけた。膜融合タンパク質である GP64 がカイコ個体でのウイルス増殖を介して生存時間を最適化するシナリオは本研究での観察データの相関結果からも示唆される。GP64 の膜融合活性とカイコでのウイルスの増殖、生存時間に弱い負の相関がみられ（Fig.8-(i)、Table 5）、膜融合活性が高くなると、カイコでの増殖が減少する傾向が観察された。このように GP64 が持つタンパク質としての機能が個体レベルでの増殖や生存時間を制御し、ウイルスのカイコへの適応進化につながると考えられた。よって、GP64 の変異の獲得はウイルス進化のドライバーあるいは制約となったと考えられる。

## 膜融合活性と培養細胞・カイコでのウイルス増殖との相関

本研究の結果から、感染後 48~60 時間で培養細胞において GP64 の膜融合活性とプラークサイズ、ウイルスの増殖量には相互に正の相関が認められた (Fig7-(i)、Table 4)。先行研究で、鳥インフルエンザウイルスの H5N1 株のヒト呼吸上皮細胞での複製過程で獲得する HA タンパク質の変異の網羅的解析において、HA タンパク質の膜融合活性とウイルスの SAE 細胞での増殖には正の相関があり、膜融合する pH の閾値が高くなったことでヒト呼吸器細胞での増殖性を高めていることが報告された (Watanabe *et al.*, 2018)。さらに、エンドサイトーシス阻害剤を用いてウイルスの細胞への取り込みを阻害した際、膜融合活性が上昇した BmGP64 をもつ AcMNPV 組換えウイルスの細胞への取り込み効率が BmGP64 WT をもつ組換えウイルスより高かった (Katou *et al.*, 2010)。さらに、フラビウイルスでプラークサイズが大きいウイルスは培養細胞でのウイルスの増殖が高いことが報告されている (Mandary *et al.*, 2019)。よって、膜融合活性が高い GP64 をもつウイルスは細胞への取り込み効率が上昇したことにより、培養細胞での増殖が高くなったと考えられた。これら先行研究は本研究の結果を支持するものであった。

一方、カイコでは GP64 の膜融合活性とカイコでのウイルスの増殖、生存時間に弱い負の相関がみられ (Fig.8-(i)、Table 5)、膜融合活性が高くなると、カイコでの増殖が減少する傾向があると示唆された。この結果は培養細胞の結果とは逆であり、膜融合活性の上昇により細胞への取り込み効率が上がった細胞での結果とは直観的に矛盾する。

GP64 の膜融合活性の上昇に大きく貢献するアミノ酸残基は Y172H である。多くのウイルスの膜融合タンパク質は低 pH 条件下で構造変化し、ウイルスのエンベロープと宿主膜との膜融合を媒介する。膜融合タンパク質の構造変化はインフルエンザウイルスやフラビウイルスでよく研究されており、これらのウイルスでは、膜融合タンパク質のヒスチジン残基が pH 依存性膜融合のトリガーの役割を持つ (Harrison, 2015)。膜融合タンパク質の pre-fusion 構造においては、膜融合タンパク質のヒスチジン残基は正電荷をもったアミノ酸残基の近くに位置し、それらと相互作用している。しかし、低 pH 条件下 (pH 4.5~6.5) では、ヒスチジン残基はプロトン化され正に荷電し、プロトン化されて正に荷電したヒスチジン残基は周囲の負に帯電した側鎖をもつアミノ酸残基と静電相互作用を増加させて塩橋を形成することで膜融合タンパク質の構造を変化させ、post-

fusion 構造の安定性を高める (Kampmann *et al.*, 2006、Mueller *et al.*, 2008)。AcMNPV において、本研究の Y172H に相当するアミノ酸残基である H155 は低 pH 依存性の GP64 の構造変化を引き起こす pH センサーの機能があり、H155 は低 pH での GP64 の pre-fusion 構造を不安定化させることで pH への感受性を高め、GP64 の構造変化を促進する (Li and Blissard, 2011)。よって、BT3/GP63<sup>T3/Y172H</sup> では、Y172 のヒスチジンへの置換により、プロトン化されるヒスチジン残基の数が増加したことで GP64 の pre-fusion 構造の安定性が低下し、膜融合活性が高くなったと推測される。

次に、カイコでのウイルス増殖と膜融合活性の間の負の相関について考察する。インフルエンザウイルスの HA タンパク質の先行研究では、膜融合能が高い (=膜融合タンパク質の構造変化が高い pH で起こる) ウイルスは細胞に感染する前にヒト気管内の周囲の pH 環境に影響を受け、HA タンパク質が構造変化する前の構造である pre-fusion 構造から構造変化後の構造である post-fusion 構造に構造変化することで、ウイルスの感染性が低下することが報告されている (Singanayagam *et al.*, 2019)。また、カイコの体液の pH は他のチョウ目昆虫と比べると比較的低い (Supplementary Fig.3-(a), (b))。これらと膜融合活性に大きく影響を与え、カイコへの適応過程でチロシンに変異し固定されたと仮定される GP64 の Y172 について考えると、インフルエンザウイルスでの例と同様な現象がカイコ体内でも起きていると想像される。つまり、pH5 付近でも膜融合活性を示す GP64<sup>H172</sup> をもつウイルスは、他の昆虫への感染過程ではエンドソーム内で起きる膜融合タンパク質の構造変化が体液 pH が低いカイコでは体液あるいはエンドソーム以外で生じ、結果として post-fusion 構造への転換が細胞に感染する前に起こってしまい、ウイルスの感染性が低下することでカイコ内での増殖低下につながったという仮説が考えられる。

カイコ体内の pH が GP64 の構造変化に影響し、BmNPV の増殖に影響することでカイコへの適応進化に貢献している可能性があり、またこれまでの結果から、BT3/GP64<sup>T3/Y172H</sup> はカイコ個体での増殖量の低下・感染カイコの生存時間の延長などの表現型を示すことから、H4 株が H172 を新たに獲得することは進化的には不利であることが想像される。よって、H4 株が T3 株との共通祖先から Y172H 置換を新たに獲得したとは考えにくい。また、G158、H172、V181、R191 は GP64 を持つ GroupI アルファバキュロウイルスで広く保存されているアミノ酸残基であるため、おそらく H4 株の

*gp64* 遺伝子は他の Group I アルファバキュロウイルス、想定されるウイルスとしてはクワコに感染できるウイルスから H4 株の祖先ウイルスに水平伝播したのではないかと予想された。BomaNPV、BmNPV はクワコ、カイコ両方に感染する (Xu *et al.*, 2012、Kokusho and Katsuma, 2021) ため、これらのウイルスは遺伝子の水平伝播が起こると考えられる。そして、カイコでの適応進化の過程で H172 を維持するために新規に L99M をはじめとした他の 5 つのアミノ酸多型を獲得したシナリオが有力ではないだろうか。

総括として、本研究は BmNPV T3 株と BmNPV H4 株の膜タンパク質 GP64 に存在する 6 つのアミノ酸多型とウイルス増殖における表現型との関係について調査し、GP64 が BmNPV のカイコへの適応進化の主要因の 1 つである可能性、GP64 を介した BmNPV のカイコへの適応進化・メカニズムについて議論した。BmNPV GP64 の進化についての解釈には、より進化的観点に特化した研究による検証が必要となるが、本研究では H4 株の GP64 に存在するアミノ酸多型の単独・組み合わせとウイルス表現型との関係性から推測される進化シナリオを提案した。本研究の発展性として、本研究では解析されていないアミノ酸多型の組み合わせのウイルス増殖への影響の予測がこれらから予測できる可能性がある。現在ではウイルスの個体感染における特性をウイルスタンパク質の配列から予測する研究が開始されている (Ogden *et al.*, 2019)。今後、本研究の成果を基盤として発展させ、GP64 のアミノ酸配列からバキュロウイルスの表現型的设计・制御、バキュロウイルス進化の理解に展開されていくことが期待される。

Table 7 Fusion activity, plaque size, viral multiplication and luciferase expression in BmN cells and silkworm larvae, survival time and body weight were ranked.

	BT3 /GP64 T3/A30Δ	BT3 /GP64 T3/L99M	BT3 /GP64 T3/G158S	BT3 /GP64 T3/Y172H	BT3 /GP64 T3/V181I	BT3 /GP64 T3/R191K	BT3 /GP64 T3/L99M, Y172H	BT3 /GP64 T3/Y172H, V181I	BT3 /GP64 T3/G158S, V181I, R191K	BT3 /GP64 T3/A30Δ, G158S, Y172H, V181I, R191K	BT3 /GP64 H4	BH4 control virus	BH4 /GP64 H4/M99L	BH4 /GP64 H4/H172Y	BH4 /GP64 H4
Fusion activity		--		++++		--	++++	++++	--	++++	++	++	++++	--	
Plaque size	--	-----	-	++	--	---	+	-	---	++	-	-		----	-
Viral growth in BmN cells	-	-		+	+	-			-			-	+	----	-
Luciferase expression in BmN cells		--			-	--				++		-	+++	--	++
Viral growth in silkworm larvae		+		---	+	+++	+		++	+	-	++	+++	++++	+++
Luciferase expression in silkworm larvae		++		--	-	+	+	-	+++	+		++	+++	++++	++
Survival time		++		-----	-	+++	--	---	++	-	-		+++	++++	++
Weight of silkworm larvae	+	+				+				+			+	++	++
virulence	-	+		--	-	+	--	--	++		-		+	+++	++

Fig.11

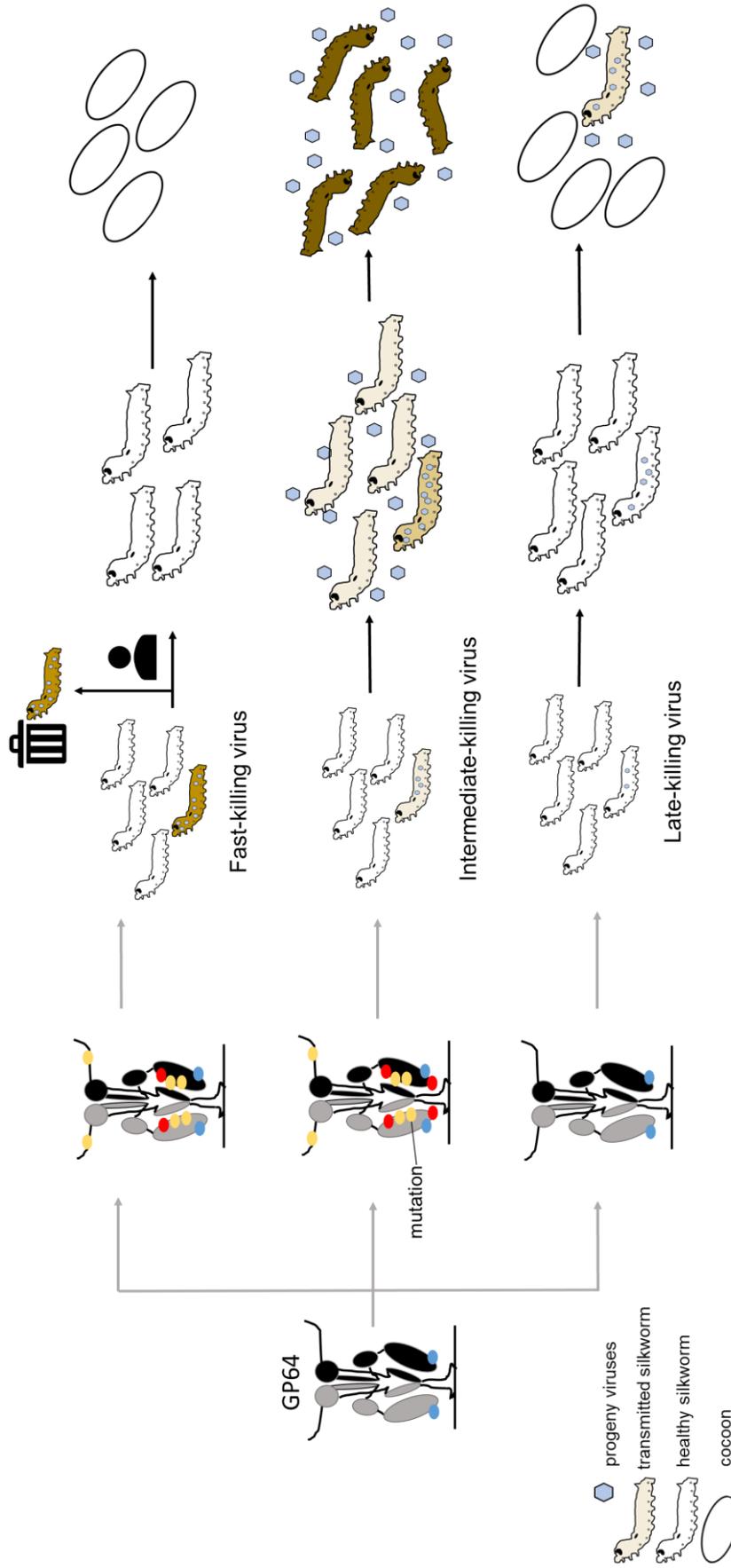


Figure 11 A hypothesis on adaptive evolution of the ancestral virus or a variant of BmNPV to silkworm through control of host survival time with mutations in GP64.

A GP64 affects levels of viral multiplication in host insects, which alters the timing of symptom development and death (collapse to release progeny viruses) of the infected larvae. This study proposes that symptom development and host survival time are the critical factors for selecting GP64 mutations during the life cycle with silkworm rearing. If virus multiplication in silkworms is high and symptoms develop early with a fast-killing virus, the infected larvae are likely to be found and removed from the population. As a result, the transmission of progeny viruses to the population fails. On the other hand, if viral multiplication in silkworms is low and symptom development and death are delayed, uninfected larvae in the population metamorphose to pupae, and the late-killing virus misses the chance to transmit. Thus, the viruses infecting silkworm larvae must adjust the timing of symptom development and release of progeny viruses.

## V. 要旨

適応進化とは変異獲得と自然選択を通じて生存環境に適応的となる進化を指す。ウイルスの適応進化研究では、適応進化への膜融合タンパク質の関与が報告されている。ウイルスの膜融合タンパク質は、ウイルスの宿主細胞への侵入に必須な役割を持ち、様々なウイルスにおいて膜融合活性がウイルス増殖に影響を与えることが知られている。カイコ核多角体病ウイルス *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV)においても、膜融合タンパク質 GP64 は宿主細胞のレセプターとの結合、膜融合、出芽を担う、ウイルスの生活環に必須な遺伝子である。北海道大学で分離された BmNPV H4 株と標準株 T3 株の GP64 には 6 箇所のアミノ酸多型 A30Δ、L99M、G158S、Y172H、V181I、R191K が存在する。GP64 を T3 株と H4 株で交換したキメラウイルスの増殖が細胞およびカイコで変化することが先行研究で示された。また、これらアミノ酸残基の 1 つである 172 番目のチロシンを T3 型から H4 型アミノ酸残基置換した GP64<sup>T3/Y172H</sup> を持つ BmNPV である BT3/GP64<sup>T3/Y172H</sup> は、T3 株 (BT3 control virus) と比較してカイコ幼虫個体での増殖が低く、感染カイコの生存時間も長くなることが示されていた。172 番目のチロシンは T3 を含むほぼ全ての BmNPV 系統で保存されているが、172 番目のチロシンはカイコに感染する BmNPV に特異的な変異であり、H4 株が持つヒスチジンは祖先型である。これらの結果から、BmNPV の祖先ウイルスがカイコへの適応する過程で H172 から Y172 へと GP64 が変異した可能性が示唆された。

本研究では、GP64 のこれらのアミノ酸多型について、膜タンパク質としての機能からウイルス・感染個体の表現型までを総合的に評価し、各アミノ酸多型の生物学的意義を検討した。

### 1. GP64 のアミノ酸多型が膜融合活性に与える影響

タンパク質レベルの機能解析として、膜融合活性とアミノ酸多型の関係を評価した。アミノ酸多型を組み合わせた GP64 変異体を発現するプラスミドを BmN 細胞に導入し、シンシチウム形成 pH、シンシチウム内核数の 2 指標を膜融合活性として定量し、比較した。どちらの指標においても、T3 系統型 GP64 にアミノ酸置換 Y172H を含む変異体 GP64<sup>T3/Y172H</sup>、GP64<sup>T3/L99M,Y172H</sup>、GP64<sup>T3/Y172H,V181I</sup>、GP64<sup>T3/A30Δ,G158S,Y172H,V181I,R191Y</sup> の膜融合活性が高かった。近縁ウイルスでの研究により、T3 系統型 GP64 の 172 番目 に相当するヒスチジン残基は低 pH 依存性の GP64 の構造変化を引き起こす pH センサーの機能が

報告されており、GP64<sup>T3/Y172H</sup>では172番目のアミノ酸がチロシンからヒスチジンへと置換され、ヒスチジン残基の数が増加したことでGP64のpre-fusion構造の安定性が低下し、膜融合活性が高くなったと推測される。また、GP64<sup>H4/M99L</sup>の膜融合活性はH4系統のGP64変異体の中で一番高かった。L99MとY172HはGP64の膜融合に重要な領域であるfusion loopに存在し、L99MとY172Hの間には相互作用があると考えられた。

## 2. アミノ酸多型が培養細胞でのウイルス増殖に与える影響

ウイルスの培養細胞での増殖効率の1つの指標として、プラークサイズがある。本研究で作製したGP64変異体ウイルス17種類について感染後96時間後のプラーク面積を測定した。その結果、T3系統のゲノムおよびGP64にY172Hをもつ組み合わせウイルスBT3/GP64<sup>T3/Y172H</sup>、BT3/GP64<sup>T3/L99M,Y172H</sup>、BT3/GP64<sup>T3/A30Δ,G158S,Y172H,V181L,R191K</sup>のプラークの面積がBT3 control virusと比較して大きかった。また、膜融合活性とプラークの面積の中央値には正の相関が見られ、膜融合活性が高くなると、プラークサイズが大きくなることが示唆された。

次に培養細胞でのウイルス増殖について評価した。MOI=1の濃度でウイルスを細胞に接種し、培養上清中のウイルスゲノムコピー数をqPCRで測定した。GP64変異ウイルス17種類の増殖の結果をまとめると、BH4/GP64<sup>H4/H172Y</sup>のみがBH4 control virusと比較して100分の1と顕著に低い増殖を示したが、それ以外の供試変異ウイルスはBT3 control virusと同等かそれより低い増殖を示し、増殖に有意な差は見られなかった。培養細胞でのウイルス増殖と膜融合活性には正の相関が見られ、膜融合活性が高いとウイルスの増殖が高いことが示唆された。

## 3. アミノ酸多型がカイコ個体でのウイルス増殖、ウイルス感染カイコの生存時間に与える影響

GP64変異ウイルス17種類を、5齢起蚕の血体腔に100 PFUの濃度で注射し、経時的に体液を採取、体液中のウイルスゲノムコピー数をqPCRで測定し、ウイルスの増殖を比較した。BT3 control virusより増殖が低かった変異体はBT3/GP64<sup>T3/Y172H</sup>のみであり、特に感染後48時間で0.018倍と有意に増殖が減少した。

GP64変異によるウイルス増殖の違いが、カイコの生存時間に影響を与えるかを調べるため、ウイルスを注射したカイコの死亡時刻を記録し、生存時間解析を行った。BT3 control virusと比較して、BT3/GP64<sup>T3/Y172H</sup>が感染したカイコの生存時間が最も長く、

次いで BT3/GP64<sup>T3/L99M,Y172H</sup>、BT3/GP64<sup>T3/Y172H,V181I</sup>、BT3/GP64<sup>T3/A30A,G158S,Y172H,V181I,R191K</sup> の感染カイコの生存時間が長かった。カイコでのウイルス増殖とウイルス感染カイコの生存時間の結果をまとめると、Y172H を持つウイルスの生存時間は長くなる傾向があり、その他のアミノ酸多型を持つと生存時間が短くなる傾向があった。またウイルス増殖と生存時間には弱い負の相関が見られ、カイコでのウイルス増殖が高いと生存時間が短くなった。

これらを総合すると、H4 系統が持つ Y172H 以外の 5 つのアミノ酸多型は、Y172H 置換によるカイコにおけるウイルスの増殖低下、感染カイコの生存時間延長の効果に対し、それを緩衝していることが示された。また、カイコでのウイルス増殖と GP64 の膜融合活性には弱い負の相関がみられ、膜融合活性が高くなると、カイコでの増殖が減少する傾向があった。Y172 はカイコに感染する BmNPV の系統では高度に保存されており、また祖先型の H172 を持たせたウイルス感染カイコの生存時間が長くなったことから、GP64 の変異を通じてカイコを宿主とした生活環に有利な変異として Y172 が選択されたと考えられる。ウイルス感染カイコの生存時間が長くなった場合は、病原性の低下により子孫ウイルスを伝搬する前に、周囲のカイコが蛹化し、次の個体への感染の機会を逸する可能性が高い。したがって、ウイルス感染カイコの生存時間は BmNPV の祖先ウイルスにとってカイコを宿主とした生活環に影響する形質であり、GP64 はその適応進化を駆動する重要な因子であると結論づけた。

以上をまとめると、本研究は、①GP64 の Y172H アミノ酸置換が培養細胞での膜融合活性の上昇、プラークサイズを増加だけではなく、カイコ個体でのウイルス増殖能の低下、感染カイコの生存時間の延長にも大きく影響し、②H4 系統が持つその他の 5 つのアミノ酸多型は、Y172H をもつウイルスのカイコでの増殖低下、感染カイコの生存時間延長の効果に対し、それを緩衝する形で相加的・相乗的な効果を持つことを明らかにした。更に③アミノ酸多型によって変化する表現型の間では、培養細胞での膜融合活性とカイコ個体でのウイルス増殖・生存時間に相関を見出し、細胞レベルでの表現型と個体レベルでの表現型の関連を明らかにした。

これらの結果から BmNPV 祖先ウイルスのカイコへの適応進化の 1 つのシナリオとして、膜融合活性に影響する GP64 の変異が、個体レベルでのウイルス増殖、感染カイコの生存時間の調節につながり、カイコへの適応度の向上につながった変異が選択されたことを提案する。

## VI. 参考文献

### **Anderson RM and May RM (1982)**

Coevolution of hosts and parasites.

*Parasitology*, 85(2), p411-426

### **Backovic M and Jardetzky TS (2009)**

Class III viral membrane fusion proteins.

*Current Opinion in Structural Biology*, 19(2), p189-196

### **Blissard GW and Theilmann DA (2018)**

Baculovirus entry and egress from insect cells.

*Annual Review of Virology*, 5, p113-139

### **Blissard GW and Wenz JR (1992)**

Baculovirus GP64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion.

*Journal of Virology*, 66(11), p6829-6835

### **Chateigner A, Bézier A, Labrousse C, Jiolle D, Barbe V and Herniou EA (2015)**

Ultra deep sequencing of a baculovirus population reveals widespread genomic variations.

*Viruses*, 7, p3625-3646

### **Cotter CR, Jin H and Chen Z (2014)**

A single amino acid in the stalk region of the H1N1pdm influenza virus ha protein affects viral fusion, stability and infectivity.

*PLOS Pathogens*, 10(1), e1003831

### **DeLano WL (2002)**

The PyMOL molecular graphics system.

<http://www.pymol.org>

### **Dong S and Blissard GW (2012)**

Functional analysis of the *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus GP64 terminal fusion loops and interactions with membranes.

*Journal of Virology*, 86(2), p9617-9628

**Doumayrou J, Avellan A, Froissart R and Michalakis Y (2012)**

An experimental test of the transmission-virulence trade-off hypothesis in a plant virus.

*Evolution*, 67(2), p477-486

**Dreier C, Resa-Infante P, Thiele S, Stanelle-Bertram S, Walendy-Gnirß K, Speiseder T, Preuss A Müller Z, Klenk HD, Stech J and Gabriel G (2019)**

Mutations in the H7 HA and PB1 genes of avian influenza A viruses increase viral pathogenicity and contact transmission in guinea pigs.

*Emerging Microbes & Infections*, 8, p1324-1336

**Edgar RC (2004)**

MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput.

*Nucleic Acids Research*, 32(5), p1792-1797

**Fredericksen BL and Whitt MA (1995)**

Vesicular stomatitis virus glycoprotein mutations that affect membrane fusion activity and abolish virus infectivity.

*Journal of Virology*, 69(3), p1435-1443

**Gomi S, Majima K and Maeda S (1999)**

Sequence analysis of the genome of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus.

*Journal of General Virology*, 80(5), p1323-1337

**Goulson DW (1997)**

Modification of host behaviour during baculoviral infection.

*Oecologia*, 109, p219-228

**Granados RR and Lawler KA (1981)**

In vivo pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection.

*Virology*, 108, p297-308

**Hao B, Liu L, Liu N, Sun L, Fan F and Huang J (2022)**

The *Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus GP64 Retains the Transmembrane Helix of Signal Peptide to Contribute to Secretion across the Cytomembrane.

*Microbiology Spectrum*, 10(4), e01913-22

**Harrison SC (2015)**

Viral membrane fusion.

*Virology*, 479-480, p498-507

**Hawtin RE, Zarkowska T, Arnold K, Thomas CJ, Gooday GW, King LA, Kuzio JA and Possee RD (1997)**

Liquefaction of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected insects is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes.

*Virology*, 238, p243-253

**Hefferon KL, Oomens AGP, Monsma SA, Finnerty CM and Blissard GW (1999)**

Host cell receptor binding by baculovirus GP64 and kinetics of virion entry.

*Virology*, 258, p455-468

**Herniou EA, Olszewski JA, Cory JS and O'Reilly DR (2003)**

The genome sequence and evolution of baculoviruses.

*Annual Review of Entomology*, 48(1), p211-234

**Huang J, Hao B, Cheng C, Liang F, Shen X and Cheng X (2014)**

Entry of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus into BmN cells by cholesterol-dependent macropinocytic endocytosis.

*Biochemical and Biophysical Research Communications*, 453(1), p166-171

**石川 小百合(2016)**

カイコ核多角体病ウイルス (BmNPV) 膜タンパク質 GP64 の構造変化がウイルス増殖に及ぼす影響について

北海道大学大学院 修士論文

**Jeetendra E, Ghosh K, Odell D, Li J, Ghosh HP and Whitt MA (2003)**

The membrane-proximal region of vesicular stomatitis virus glycoprotein G ectodomain is critical for fusion and virus infectivity.

*Journal of Virology*, 77, p12807-12818

**Ji Y, Liu T, Jia Y, Liu B, Yu Q, Cui X, Guo F, Chang H and Zhu Q (2017)**

Two single mutations in the fusion protein of Newcastle disease virus confer hemagglutinin-neuraminidase independent fusion promotion and attenuate the pathogenicity in chickens.

*Virology*, 509, p146-151

**Jocher G, Nishimura K, Mineeva T and Vilariño R (2020)**

YOLOv5, <https://github.com/ultralytics/yolov5>

**Jumper J, Evans R, Pritzel A, et al. (2021)**

Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold.

*Nature*, 596(7873), p583-589

**Kadlec J, Loureiro S, Abrescia NGA, Stuart DI and Jones IM (2008)**

The postfusion structure of baculovirus gp64 supports a unified view of viral fusion machines.

*Nature Structural & Molecular Biology*, 15, p1024-1030

**角谷 聡 (2006)**

BmNPV 新規分離株の性状解析

北海道大学農学部 卒業論文

**Kampmann T, Mueller DS, Mark AE, Young PR and Kobe B (2006)**

The role of histidine residues in hypothesis low-pH-mediated viral membrane fusion.

*Structure*, 14, p1481-1487

**Katou Y, Ikeda M and Kobayashi M (2006)**

Abortive replication of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus in Sf9 and high five cells: defective nuclear transport of the virions.

*Virology*, 347 p455-465

**Katou Y, Yamada H, Ikeda M and Kobayashi M (2010)**

A single amino acid substitution modulates low-pH-triggered membrane fusion of GP64 protein in *Autographa californica* and *Bombyx mori* nucleopolyhedroviruses.

*Virology*, 404(2), p204-214

**Katsuma S, Koyano Y, Kang W, Kokusho R, Kamita SG and Shimada T (2012)**

The baculovirus uses a captured host phosphatase to induce enhanced locomotory activity in host caterpillars.

*PLOS Pathogens*, 8, e1002644

**Kim IS, Jenni S, Stanifer ML, et al. (2017)**

Mechanism of membrane fusion induced by vesicular stomatitis virus G protein.

*Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(1), e28-36

**Kokusho R and Katsuma S (2021)**

*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus *ptp* and *egt* genes are dispensable for triggering enhanced locomotory activity and climbing behavior in *Bombyx mandarina* larvae.

*Journal of Invertebrate Pathology*, 183, p107604

**小島 桂 (1997)**

バキュロウイルス初期遺伝子プロモ-タ-を利用した外来遺伝子高発現系の構築

北海道大学大学院農学院 博士論文

**Li Z and Blissard GW (2008)**

Functional analysis of the transmembrane (TM) domain of the *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus GP64 protein: substitution of heterologous TM domains.

*Journal of Virology*, 82(7), p3329-3341

**(a) Li Z and Blissard GW (2009)**

The *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus GP64 protein: analysis of transmembrane domain length and sequence requirements.

*Journal of Virology*, 83(9), p4447-4461

**(b) Li Z and Blissard GW (2009)**

The pre-transmembrane domain of the *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus GP64 protein is critical for membrane fusion and virus infectivity.

*Journal of Virology*, 83(21), p10993-11004

**Li Z and Blissard GW (2011)**

*Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus GP64 protein: roles of histidine residues in triggering membrane fusion and fusion pore expansion.

*Journal of Virology*, 85(23), p12492-12504

**Long G, Pan X, Kormelink R and Vlak JM (2006)**

Functional entry of baculovirus into insect and mammalian cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis.

*Journal of Virology*, 80(17), p8830-8833

**Mair CM, Ludwig K, Herrmann A and Sieben C (2014)**

Receptor binding and pH stability — How influenza A virus hemagglutinin affects host-specific virus infection.

*Biochimica et Biophysica Acta*, 1838, p1153-1168

**Mandary B, Masomian M and Poh CL (2019)**

Impact of RNA virus evolution on quasispecies formation and virulence.

*International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), p4657

**Markova SV, Golz S, Frank LA, Kalthof B and Vysotski ES (2004)**

Cloning and expression of cDNA for a luciferase from the marine copepod *metridia longa*: a novel secreted bioluminescent reporter enzyme.

*Journal of Biological Chemistry*, 279(5), p3212-3217

**Mitsunobu H, Sakashita K, Mon H, et al. (2006)**

Construction of gateway-based destination vectors for detecting subcellular localization of proteins in the silkworm, *Bombyx mori*.

*Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, 75, p141-145

**Miyajima A, Schreurs J, Otsu K, Kondo A, Arai K and Maeda S (1987)**

Use of the silkworm, *Bombyx mori*, and an insect baculovirus vector for high-level expression and secretion of biologically active mouse interleukin-3.

*Gene*, 58, p273-281

**Motohashi K (2015)**

A simple and efficient seamless DNA cloning method using SLiCE from *Escherichia coli* laboratory strains and its application to SLiP site-directed mutagenesis.

*BMC Biotechnology*, 15(47), p1-9

**Mueller DS, Kampmann T, Yennamalli R, Young PR, Kobe B and Mark AE (2008)**

Histidine protonation and the activation of viral fusion proteins.

*Biochemical Society Transactions*, 36, p43-45

**Narasaraju T, Sim MK, Ng HH, Phoon MC, Shanker N, Lal SK and Chow VTK (2009)**

Adaptation of human influenza H3N2 virus in a mouse pneumonitis model: insights into viral virulence, tissue tropism and host pathogenesis.

*Microbes and Infection*, 11, p2-11

**Nguyen LT, Schmidt HA, von Haeseler A and Minh BQ (2015)**

IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies.

*Molecular Biology and Evolution*, 32(1), p268-274

カイコの科学 (2020)、日本蚕糸学会[編], p110-111

カイコの実験単 (2019)、日本蚕糸学会[編], p.27, p.3

**Ogden PJ, Kelsic ED, Sinai S and Church GM (2019)**

Comprehensive AAV capsid fitness landscape reveals a viral gene and enables machine-guided design.

*Science*, 366, p1139-1143

**Ono C, Nakatsukasa T, Nishijima Y, Asano S ichiro, Sahara K and Bando H (2007)**

Construction of the BmNPV T3 bacmid system and its application to the functional analysis of BmNPV he65.

*Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, 76, p161-167

**小野 慎子 (2011)**

ノックアウトウイルスを用いたバキュロウイルスの遺伝子機能解析  
北海道大学大学院農学院 博士論文

**Oomens AGP and Blissard GW (1998)**

Requirement for GP64 to drive efficient budding of *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus.

*Virology*, 254(2), p297-314

**Pearson MN and Rohrmann GF (2002)**

Transfer, incorporation, and substitution of envelope fusion proteins among members of the Baculoviridae, Orthomyxoviridae, and Metaviridae (insect retrovirus) families.

*Journal of Virology*, 76, p5301-5304

**Rohrmann GF (2019)**

Baculovirus Molecular Biology 4th edition.

National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda (MD)

**Rohrmann G, Pearson M, Bailey T, Becker R and Beaudreau G (1981)**

N-terminal polyhedrin sequences and occluded Baculovirus evolution.

*Journal of Molecular Evolution*, 17, p329-333

**Roncarati R and Knebel-Moersdorf D (1997)**

Identification of the early actin-rearrangement-inducing factor gene, *arif-1*, from *Autographa californica* multicapsid nuclear polyhedrosis virus.

*Journal of Virology*, 71(41), p7933-7941

**酒井 真美 (2012)**

BmNPV 新規分離株 (H4 株) の fusion protein の機能解析

北海道大学大学院 修士論文

**Sakai M, Kakutani S, Asano S, Sato M and Bando H (2021)**

Proliferation of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus strain H4 in BmN cells is enhanced by exchange of the F gene sequence with type strain T3.

*Virus Research*, 291, p198195

**Samal S, Khattar SK, Paldurai A, Palaniyandi S, Zhu X, Collins PL and Samal SK (2013)**

Mutations in the cytoplasmic domain of the Newcastle disease virus fusion protein confer hyperfusogenic phenotypes modulating viral replication and pathogenicity.

*Journal of Virology*, 87, p10083-10093

**Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. (2012)**

Fiji: an open-source platform for biological-image analysis.

*Nature Methods*, 9(7), p676-682

**関口 真理 (2020)**

BmNPV における膜タンパク質(GP64)のアミノ酸バリエーションが増殖に与える影響

北海道大学大学院 修士論文

**Sekiguchi M, Ishikawa S, Asano S, Bando H and Sato M (2020)**

A single amino acid replacement of tyrosine with histidine at position 172 in BmNPV T3 GP64 decreases viral proliferation in silkworm larvae despite increasing membrane fusion activity with BmN cells.

*Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, 89, p45-53

**Shao W, Li X, Goraya MU, Wang S and Chen JR (2017)**

Evolution of Influenza A virus by mutation and re-assortment.

*International Journal of Molecular Sciences*, 18(8), p1650

**Shinoda H, Ma Y, Nakashima R, Sakurai K, Matsuda T and Nagai T (2017)**

Acid-Tolerant Monomeric GFP from *Olindias Formosa*.

*Cell Chemical Biology* 25, p330-338

**Singanayagam A, Zambon M and Barclay WS (2019)**

Influenza virus with increased pH of hemagglutinin activation has improved replication in cell culture but at the cost of infectivity in human airway epithelium.

*Journal of Virology*, 93(17), e00058-19

**Slack JM, Kuzio J and Faulkner P (1995)**

Characterization of *v-cath*, a cathepsin L-like proteinase expressed by the baculovirus *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus.

*Journal of General Virology*, 76, p1091-1098

**Smith GE, Summers MD and Fraser MJ (1983)**

Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector.

*Molecular and Cellular Biology*, 3(12), p2156-2165

**高倉耕一 (2009)**

感染症の病毒性に関する進化生態学とその制御

*生活衛生*, 53(3), p145-152

**Tzutalin D (2015)**

"LabelImg" GitHub Repository 6

**Volkman LE and Goldsmith PA (1985)**

Mechanism of neutralization of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus by a monoclonal antibody: inhibition of entry by adsorptive endocytosis.

*Virology*, 143, p185-195

**Watanabe Y, Arai Y, Kawashita N, Ibrahim MS, Elgendy EM, Daidoji T, Kajikawa J, Hiramatsu H, Sriwilaijaroen N, Ono T, Takagi T, Takahashi K, Shioda T, Matsumoto K, Suzuki Y and Nakaya T (2018)**

Characterization of H5N1 influenza virus quasispecies with adaptive hemagglutinin mutations form single-virus infections of human airway cells.

*Journal of Virology*, 92(11), e02004-

**Xu YP, Gu LZ, Lou YH, et al. (2012)**

A baculovirus isolated from wild silkworm encompasses the host ranges of *Bombyx mori* nucleopolyhedrosis virus and *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus in cultured cells.

*Journal of General Virology*, 93(11), p2480-2489

**Yu Q, Bai L, Ji N, Yue X, Jiang Y and Li Z (2020)**

Critical Residues and Contacts within Domain IV of *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus GP64 Contribute to Its Refolding during Membrane Fusion.

*Journal of Virology*, 94(19), e01105-20

**Yu Q, Blissard GW, Liu TX and Li Z (2016)**

*Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus GP64 protein: Analysis of domain I and V amino acid interactions and membrane fusion activity.

*Virology*, 488, p259-270

**Zanotto P, Kessing B and Maruniak J (1993)**

Phylogenetic interrelationships among baculoviruses: evolutionary rates and host associations.

*Journal of Invertebrate Pathology*, 62, p147-164

**Zhou J and Blissard GW (2008)**

Identification of a GP64 subdomain involved in receptor binding by budded virions of the baculovirus *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus.

*Journal of Virology*, 82(9), p4449-4460

## VII. サプリメンタルデータ

Supplementary Table 1 The viruses used for amino acid sequence alignment of GP64.

abbreviation	Accession No.	Virus name	Host (larvae)
AcMNPV_C6	AAA66758	<i>Autographa californica</i> multiple nucleopolyhedrovirus C6	alfalfa looper
BomaNPV_S1	ACQ57301	<i>Bombyx mandarina</i> nucleopolyhedrovirus S1	wild silk moth
BomaNPV_S2	AFO10080	<i>Bombyx mandarina</i> nucleopolyhedrovirus S2	wild silk moth
H4	BBA20610	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus H4	silkworm
C2	AGX01332	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus C2	silkworm
India	AFN21223	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus India	silkworm
Guangxi	AFN21363	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus Guangxi	silkworm
Zhejiang	AFN21083	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus Zhejiang	silkworm
Cubic	AFN09034	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus Cubic	silkworm
T3	AAC63794	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus T3	silkworm
La	BBN66156	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus La	silkworm
C1	AGX01204	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus C1	silkworm
Brazilian	AIS92844	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus Brazilian	silkworm
C6	AGX01460	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus C6	silkworm
Mysore BmNPV-My (Mysore)	QWC64763	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus Mysore BmNPV-My	silkworm
GXZZ	QRM12746	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXZZ	silkworm
GXZS	QRM12745	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXZS	silkworm
GXZP	QRM12744	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXZP	silkworm
GXYZ2	QRM12743	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXYZ2	silkworm
GXYJ	QRM12742	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXYJ	silkworm
GXYF	QRM12741	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXYF	silkworm
GXXZ	QRM12740	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXXZ	silkworm
GXXD1	QRM12739	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXXD1	silkworm
GXWX	QRM12738	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXWX	silkworm
GXUA	QRM12737	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXUA	silkworm
GXTY	QRM12736	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXTY	silkworm
GXNN	QRM12735	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXNN	silkworm
GXMS2	QRM12734	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXMS2	silkworm

GXLuoC2	QRM12733	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXLuoC2	silkworm
GXLeY	QRM12732	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXLeY	silkworm
GXJX	QRM12731	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXJX	silkworm
GXHP	QRM12730	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXHP	silkworm
GXHJ	QRM12729	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXHJ	silkworm
GXFM	QRM12728	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXFM	silkworm
GXCW	QRM12727	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXCW	silkworm
N9	BAF32568	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus N9	silkworm
Shaanxi	AVP27270	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus Shaanxi	silkworm
GXTL	AQL59269	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXTL	silkworm
GXSL	AQL59268	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXSL	silkworm
GRRX	AQL59267	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GRRX	silkworm
GXRS	AQL59266	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXRS	silkworm
GXQT	AQL59265	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXQT	silkworm
GXPN	AQL59264	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXPN	silkworm
GXPB	AQL59263	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXPB	silkworm
GXNP	AQL59262	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXNP	silkworm
GXNM	AQL59261	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXNM	silkworm
GXLS	AQL59260	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXLS	silkworm
GXLJ	AQL59259	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXLJ	silkworm
GXLiuC	AQL59258	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXLiuC	silkworm
GXLingY	AQL59257	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXLingY	silkworm
GXHX	AQL59256	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXHX	silkworm
GXHS	AQL59255	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXHS	silkworm
GXGN	AQL59254	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXGN	silkworm
GXGB	AQL59253	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXGB	silkworm
GXDA	AQL59252	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXDA	silkworm
GXBB	AQL59251	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXBB	silkworm
GXLJ-19	UQJ80989	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXLJ-19	silkworm
GXLiuC-19	UQJ80988	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXLiuC-19	silkworm
GXHZ-19	UQJ80987	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXHZ-19	silkworm
GXHX-19	UQJ80986	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXHX-19	silkworm
GXHX2	UQJ80985	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXHX2	silkworm

GXHJ2-19	UQJ80984	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXHJ2-19	silkworm
GXHJ1-19	UQJ80983	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXHJ1-19	silkworm
GXZS2-19	UQJ80982	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXZS2-19	silkworm
GXZS1-19	UQJ80981	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXZS1-19	silkworm
GXZP-19	UQJ80980	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXZP-19	silkworm
GXYZ1	UQJ80979	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXYZ1	silkworm
GXYN	UQJ80978	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXYN	silkworm
GXXZ2	UQJ80977	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXXZ2	silkworm
GXXD2	UQJ80976	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXXD2	silkworm
GXXC-19	UQJ80975	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXXC-19	silkworm
GXXC	UQJ80974	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXXC	silkworm
GXWX-19	UQJ80973	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXWX-19	silkworm
GXTX	UQJ80972	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXTX	silkworm
GXRA-19	UQJ80971	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXRA-19	silkworm
GXRA	UQJ80970	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXRA	silkworm
GXPG-19	UQJ80969	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXPG-19	silkworm
GXPG	UQJ80968	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXPG	silkworm
GXMS3	UQJ80967	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXMS3	silkworm
GXMS1	UQJ80966	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXMS1	silkworm
GXLZ2-19	UQJ80965	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXLZ2-19	silkworm
GXLZ1-19	UQJ80964	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXLZ1-19	silkworm
GXLuoC-19	UQJ80963	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXLuoC-19	silkworm
GXLuoC1	UQJ80962	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus GXLuoC1	silkworm

Supplementary Table 2 nucleotide position of GP64<sup>T3</sup> mutated by PCR for construction of GP64 mutant viruses.

	A30	L99	G158	Y172	V181	R191
	--84-92--	--292-300--	--469-477--	--511-519--	--544-552--	--568-576--
		-	-	-	-	-
GP64 <sup>T3/L99M,Y172H</sup>	-TTTGGCGGC-	-TCGATGGAT-	-AAAGGCAAA-	-GCGCACCAC-	-GGCGTTTCT-	-AGCAGGCTC-
GP64 <sup>T3/Y172H,V183I</sup>	-TTTGGCGGC-	-TCGCTGGAT-	-AAAGGCAAA-	-GCGCACCAC-	-GGCATTCT-	-AGCAGGCTC-
GP64 <sup>T3/G158S,V183I,R191K</sup>	-TTTGGCGGC-	-TCGCTGGAT-	-AAAAGCAAA-	-GCGTACCAC-	-GGCATTCT-	-AGCAAGCTC-
GP64 <sup>T3/A30Δ,G158S,V183I,R191K</sup>	-TTT---GGC-	-TCGCTGGAT-	-AAAAGCAAA-	-GCGTACCAC-	-GGCATTCT-	-AGCAAGCTC-
GP64 <sup>T3/A30Δ,G158S,Y172H,V183I,R191K</sup>	-TTT---GGC-	-TCGCTGGAT-	-AAAAGCAAA-	-GCGCACCAC-	-GGCATTCT-	-AGCAAGCTC-

Supplementary Table 3 nucleotide position of GP64<sup>H4</sup> mutated by PCR for construction of GP64 mutant viruses.

	Δ 30	M99	S158	H172	I181	K191
	--84-89--	--289-397--	--466-474--	--508-516--	--541-549--	--565-573--
GP64 <sup>H4/M99L</sup>	-TTT---GGC-	-TCGCTGGAT-	-AAAAGCAAA-	-GCGCACCAC-	-GGCATTCT-	-AGCAAGCTT-
GP64 <sup>H4/H172Y</sup>	-TTT---GGC-	-TCGATGGAT-	-AAAAGCAAA-	-GCGTACCAC-	-GGCATTCT-	-AGCAAGCTT-

Supplementary Table 4 Full description, Donor plasmid, bacmid genotype, constructed gp64 mutant bacmid, name of GP64 mutant viruses.

	Full description *	Donor plasmid	Bacmid genotype	Constructed gp64 mutant bacmid	Name of GP64 mutant viruses
1	BT3/gp64Δcat,Bac<Tn7(aph,polhp:MetLuc-,gp64 <sup>T3</sup> <sub>p</sub> :gp64 <sup>T3</sup> :SV40 <sub>i</sub> )	pFastbac-Luc-gp64 <sup>T3</sup> (関口、2020)	T3Δgp64	BT3 control bacmid	BT3 control virus
2	BT3/gp64Δcat,Bac<Tn7(aph,polhp:MetLuc-,gp64 <sup>T3</sup> <sub>p</sub> :gp64 <sup>H4</sup> :SV40 <sub>i</sub> )	pFastbac-Luc-T3Pgp64 <sup>H4</sup> (関口、2020)	T3Δgp64	BT3/GP64 <sup>H4</sup> bacmid	BT3/GP64 <sup>H4</sup>
3	BT3/gp64Δcat,Bac<Tn7(aph,polhp:MetLuc-,gp64 <sup>T3</sup> <sub>p</sub> :gp64 <sup>T3/A30Δ</sup> :SV40 <sub>i</sub> )	pFastbac-Luc-gp64 <sup>T3/A30Δ</sup> (関口、2020)	T3Δgp64	BT3/GP64 <sup>T3/A30Δ</sup> bacmid	BT3/GP64 <sup>T3/A30Δ</sup>
4	BT3/gp64Δcat,Bac<Tn7(aph,polhp:MetLuc-,gp64 <sup>T3</sup> <sub>p</sub> :gp64 <sup>T3/L99M</sup> :SV40 <sub>i</sub> )	pFastbac-Luc-gp64 <sup>T3/L99M</sup> (関口、2020)	T3Δgp64	BT3/GP64 <sup>T3/L99M</sup> bacmid	BT3/GP64 <sup>T3/L99M</sup>
5	BT3/gp64Δcat,Bac<Tn7(aph,polhp:MetLuc-,gp64 <sup>T3</sup> <sub>p</sub> :gp64 <sup>T3/G158S</sup> :SV40 <sub>i</sub> )	pFastbac-Luc-gp64 <sup>T3/G158S</sup> (関口、2020)	T3Δgp64	BT3/GP64 <sup>T3/G158S</sup> bacmid	BT3/GP64 <sup>T3/G158S</sup>
6	BT3/gp64Δcat,Bac<Tn7(aph,polhp:MetLuc-,gp64 <sup>T3</sup> <sub>p</sub> :gp64 <sup>T3/Y172H</sup> :SV40 <sub>i</sub> )	pFastbac-Luc-gp64 <sup>T3/Y172H</sup> (関口、2020)	T3Δgp64	BT3/GP64 <sup>T3/Y172H</sup> bacmid	BT3/GP64 <sup>T3/Y172H</sup>
7	BT3/gp64Δcat,Bac<Tn7(aph,polhp:MetLuc-,gp64 <sup>T3</sup> <sub>p</sub> :gp64 <sup>T3/V181I</sup> :SV40 <sub>i</sub> )	pFastbac-Luc-gp64 <sup>T3/V181I</sup> (関口、2020)	T3Δgp64	BT3/GP64 <sup>T3/V181I</sup> bacmid	BT3/GP64 <sup>T3/V181I</sup>
8	BT3/gp64Δcat,Bac<Tn7(aph,polhp:MetLuc-,gp64 <sup>T3</sup> <sub>p</sub> :gp64 <sup>T3/R191K</sup> :SV40 <sub>i</sub> )	pFastbac-Luc-gp64 <sup>T3/R191K</sup> (関口、2020)	T3Δgp64	BT3/GP64 <sup>T3/R191K</sup> bacmid	BT3/GP64 <sup>T3/R191K</sup>
9	BT3/gp64Δcat,Bac<Tn7(aph,polhp:MetLuc-,gp64 <sup>T3</sup> <sub>p</sub> :gp64 <sup>T3/L99M,Y172H</sup> :SV40 <sub>i</sub> )	pFastbac-Luc-gp64 <sup>T3/L99M,Y172H</sup>	T3Δgp64	BT3/GP64 <sup>T3/L99M,Y172H</sup> bacmid	BT3/GP64 <sup>T3/L99M,Y172H</sup>
10	BT3/gp64Δcat,Bac<Tn7(aph,polhp:MetLuc-,gp64 <sup>T3</sup> <sub>p</sub> :gp64 <sup>T3/Y172H,V181I</sup> :SV40 <sub>i</sub> )	pFastbac-Luc-gp64 <sup>T3/Y172H,V181I</sup>	T3Δgp64	BT3/GP64 <sup>T3/Y172H,V181I</sup> bacmid	BT3/GP64 <sup>T3/Y172H,V181I</sup>
11	BT3/gp64Δcat,Bac<Tn7(aph,polhp:MetLuc-,gp64 <sup>T3</sup> <sub>p</sub> :gp64 <sup>T3/G158S,V181I,R191K</sup> :SV40 <sub>i</sub> )	pFastbac-Luc-gp64 <sup>T3/G158S,V181I,R191K</sup>	T3Δgp64	BT3/GP64 <sup>T3/G158S,V181I,R191K</sup> bacmid	BT3/GP64 <sup>T3/G158S,V181I,R191K</sup>
12	BT3/gp64Δcat,Bac<Tn7(aph,polhp:MetLuc-,gp64 <sup>T3</sup> <sub>p</sub> :gp64 <sup>T3/A30Δ,G158S,V181I,R191K</sup> :SV40 <sub>i</sub> )	pFastbac-Luc-gp64 <sup>T3/A30Δ,G158S,V181I,R191K</sup>	T3Δgp64	BT3/GP64 <sup>T3/A30Δ,G158S,V181I,R191K</sup> bacmid	BT3/GP64 <sup>T3/A30Δ,G158S,V181I,R191K</sup>

13	BT3/gp64 $\Delta$ cat,Bac<Tn7(aph, polhp:MetLuc-,g p64 <sup>T3</sup> ,p:gp64 <sup>T3/A30A,G158S,Y172H,V181I,R191K</sup> :SV40 <sub>t</sub> )	pFastbac-Luc-T3gp64 T3/A30A,G158S,Y172H,V181I,R191K	T3 $\Delta$ gp64	BT3/GP64 <sup>T3/A30A,G158S,Y172H,V181I,R191K</sup> bacmid	BT3/GP64 <sup>T3/A30A,G158S,Y172H,V181I,R191K</sup>
14	BH4/gp64 $\Delta$ cat,Bac<Tn7(aph, polhp:MetLuc-,g p64 <sup>H4</sup> ,p:gp64 <sup>H4</sup> :SV40 <sub>t</sub> )	pFastbac-Luc-gp64 <sup>H4</sup> (関口、2020)	H4 $\Delta$ gp64	BH4 control bacmid	BH4 control virus
15	BH4/gp64 $\Delta$ cat,Bac<Tn7(aph, polhp:MetLuc-,g p64 <sup>H4</sup> ,p:gp64 <sup>H4/M99L</sup> :SV40 <sub>t</sub> )	pFastbac-Luc-H4Pgp64 <sup>T3</sup> (関口、2020)	H4 $\Delta$ gp64	BH4/GP64 <sup>T3</sup> bacmid	BH4/GP64 <sup>T3</sup>
16	BH4/gp64 $\Delta$ cat,Bac<Tn7(aph, polhp:MetLuc-,g p64 <sup>H4</sup> ,p:gp64 <sup>H4/H172Y</sup> :SV40 <sub>t</sub> )	pFastbac-Luc-gp64 <sup>H4/M99L</sup>	H4 $\Delta$ gp64	BH4/GP64 <sup>H4/M99L</sup> bacmid	BH4/GP64 <sup>H4/M99L</sup>
17	BH4/gp64 $\Delta$ cat,Bac<Tn7(aph, polhp:MetLuc-,g p64 <sup>H4</sup> ,p:gp64 <sup>T3</sup> :SV40 <sub>t</sub> )	pFastbac-Luc-gp64 <sup>H4/H172Y</sup>	H4 $\Delta$ gp64	BH4/GP64 <sup>H4/H172Y</sup> bacmid	BH4/GP64 <sup>H4/H172Y</sup>

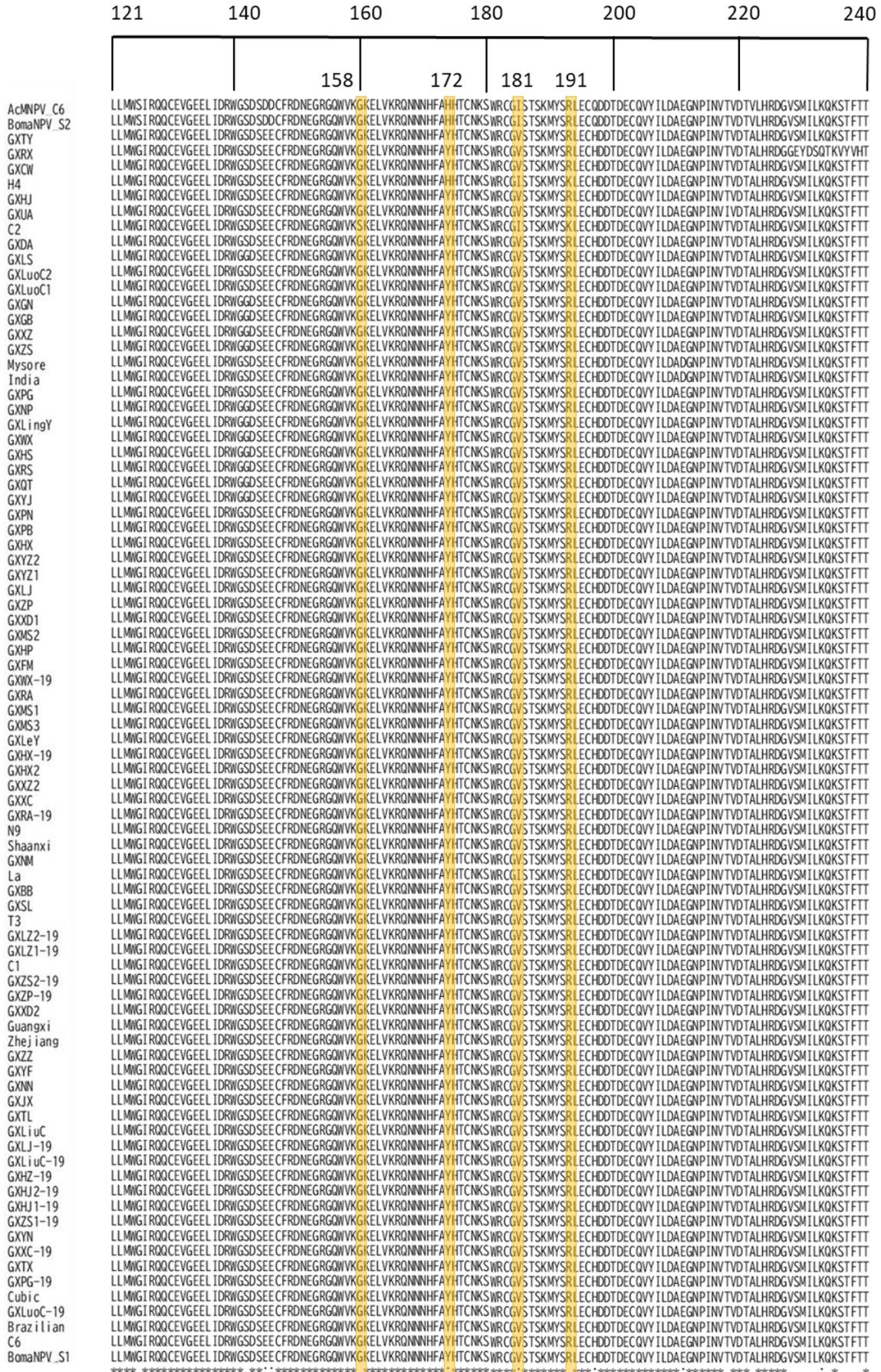
\* The full description of a bacmid genotype is written as follows: "A/B,C" indicates that B and C modifications were made in the A genetic background. Gene level modifications follow this rule, but the code is written as superscript like "D<sup>E,F,G</sup>." Commas between B and C, or F and G indicate B and C modifications or F and G were made in different loci or positions, respectively. "(H,I,J)" indicates that H, I, and J are contained in the same locus. "B $\Delta$ K" indicates B was removed and replaced with K. "C<L" indicates that L was inserted into the C locus. The sequence of C is split by L but not removed. Promoters and terminators are represented as the subscripts "p" and "t," respectively, following the source of the gene name. The regulatory sequence codes are concatenated with the gene to be expressed by the regulatory sequence using ":" like "M<sub>p</sub>:N:O<sub>t</sub>." Sequences for fusion protein consisting of P and Q are described as "P::Q." Amino acid substitutions are described like "R10S" indicating that arginin was substituted to serine at the position 10 of the protein. The "Bac" locus code indicates the region of bacmid vector.

Supplementary Table 5 Template plasmid for PCR to construct plasmids for fusion assay and constructed plasmids for fusion assay.

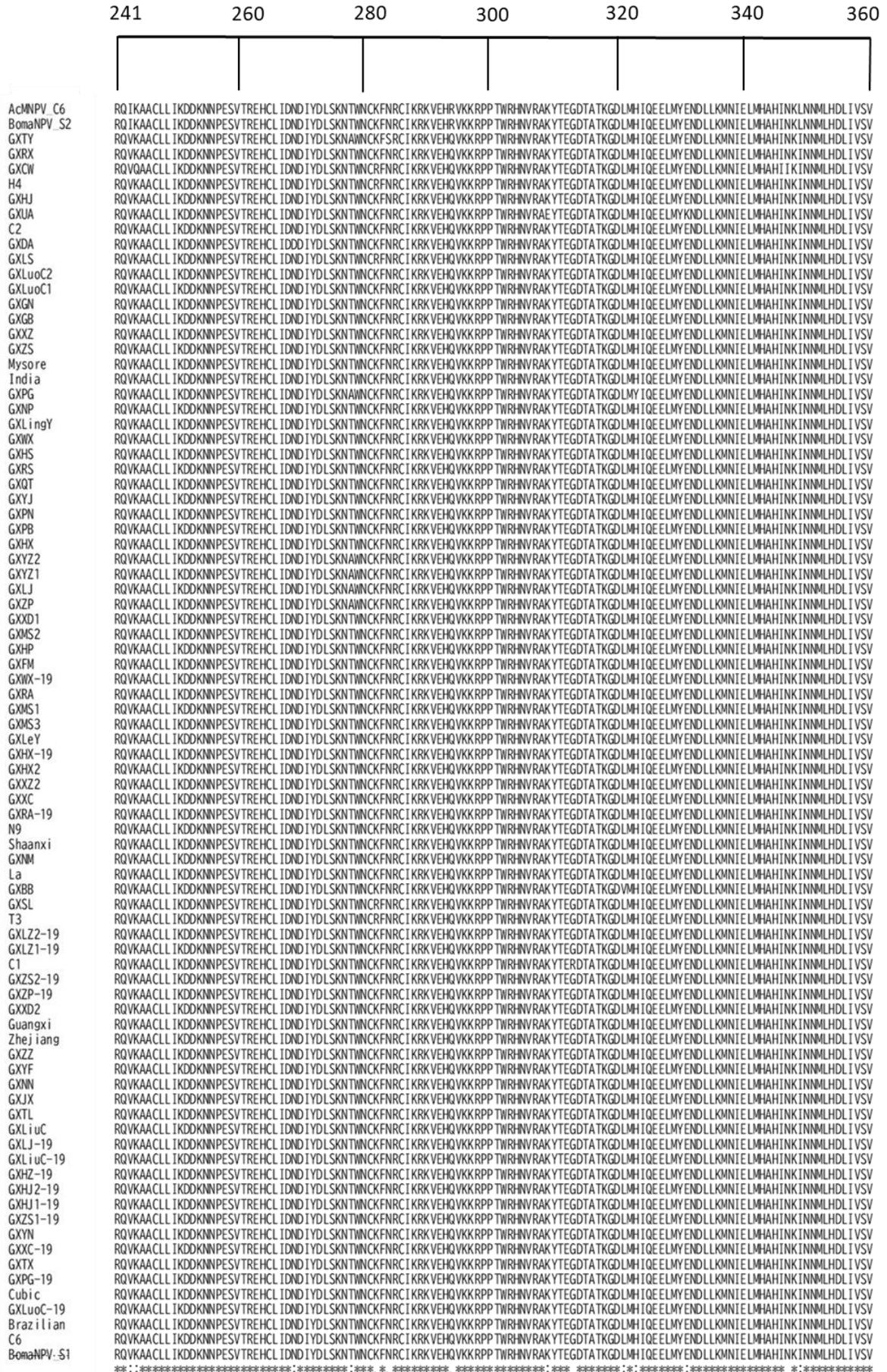
	Template plasmid	Plasmid for fusion assay
1	pFastbac-Luc-gp64 <sup>T3</sup> (関口、2020)	pSK-gamillus-gp64 <sup>T3</sup>
2	pFastbac-Luc-gp64 <sup>T3/A30Δ</sup> (関口、2020)	pSK-gamillus-gp64 <sup>T3/A30Δ</sup>
3	pFastbac-Luc-gp64 <sup>T3/L99M</sup> (関口、2020)	pSK-gamillus-gp64 <sup>T3/L99M</sup>
4	pFastbac-Luc-gp64 <sup>T3/G158S</sup> (関口、2020)	pSK-gamillus-gp64 <sup>T3/G158S</sup>
5	pFastbac-Luc-gp64 <sup>T3/Y172H</sup> (関口、2020)	pSK-gamillus-gp64 <sup>T3/Y172H</sup>
6	pFastbac-Luc-gp64 <sup>T3/V181I</sup> (関口、2020)	pSK-gamillus-gp64 <sup>T3/V181I</sup>
7	pFastbac-Luc-gp64 <sup>T3/R191K</sup> (関口、2020)	pSK-gamillus-gp64 <sup>T3/R191K</sup>
8	pFastbac-Luc-gp64 <sup>T3/L99M,Y172H</sup>	pSK-gamillus-gp64 <sup>T3/L99M,Y172H</sup>
9	pFastbac-Luc-gp64 <sup>T3/Y172H,V181I</sup>	pSK-gamillus-gp64 <sup>T3/Y172H,V181I</sup>
10	pFastbac-Luc-gp64 <sup>T3/G158S,V181I,R191K</sup>	pSK-gamillus-gp64 <sup>T3/G158S,V181I,R191K</sup>
11	pFastbac-Luc-gp64 <sup>T3/A30Δ,G158S,V181I,R191K</sup>	pSK-gamillus-gp64 <sup>T3/A30Δ,G158S,V181I,R191K</sup>
12	pFastbac-Luc-T3gp64 <sup>T3/A30Δ,G158S,Y172H,V181I,R191K</sup>	pSK-gamillus-gp64 <sup>T3/A30Δ,G158S,Y172H,V181I,R191K</sup>
13	pFastbac-Luc-gp64 <sup>H4</sup> (関口、2020)	pSK-gamillus-gp64 <sup>H4</sup>
14	pFastbac-Luc-gp64 <sup>H4/M99L</sup>	pSK-gamillus-gp64 <sup>H4/M99L</sup>
15	pFastbac-Luc-gp64 <sup>H4/H172Y</sup>	pSK-gamillus-gp64 <sup>H4/H172Y</sup>
16	pSK-GP64 <sup>Ac</sup> (関口、2020)	pSK-gamillus-gp64 <sup>Ac</sup>



# Supplementary Fig. 1



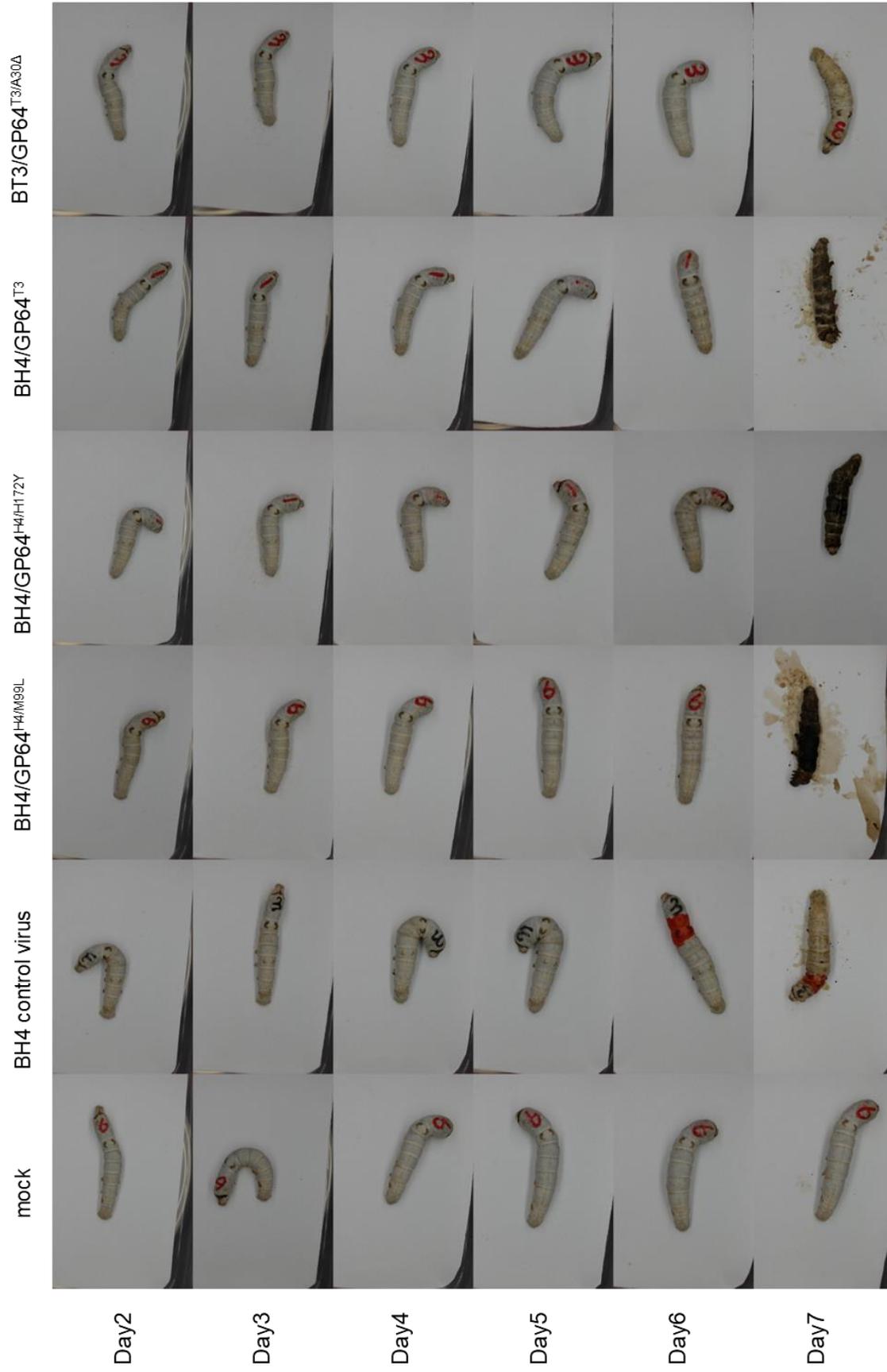
# Supplementary Fig. 1







Supplementary Fig. 2



Supplementary Figure 2 Photographs of larvae infected with mock, the parental and the 15 mutant gp64-mutant viruses at 2-7 days post-infection.

Supplementary Fig. 2

BT3/GP64<sup>T3/A30Δ,G158S,  
Y172H,V181I,R191K</sup>    BT3/GP64<sup>T3/A30Δ,G158S,  
V181I,R191K</sup>    BT3/GP64<sup>T3/G158S</sup>    BT3/GP64<sup>T3/G158S,V181I,R191K</sup>



Day2

Day3

Day4

Day5

Day6

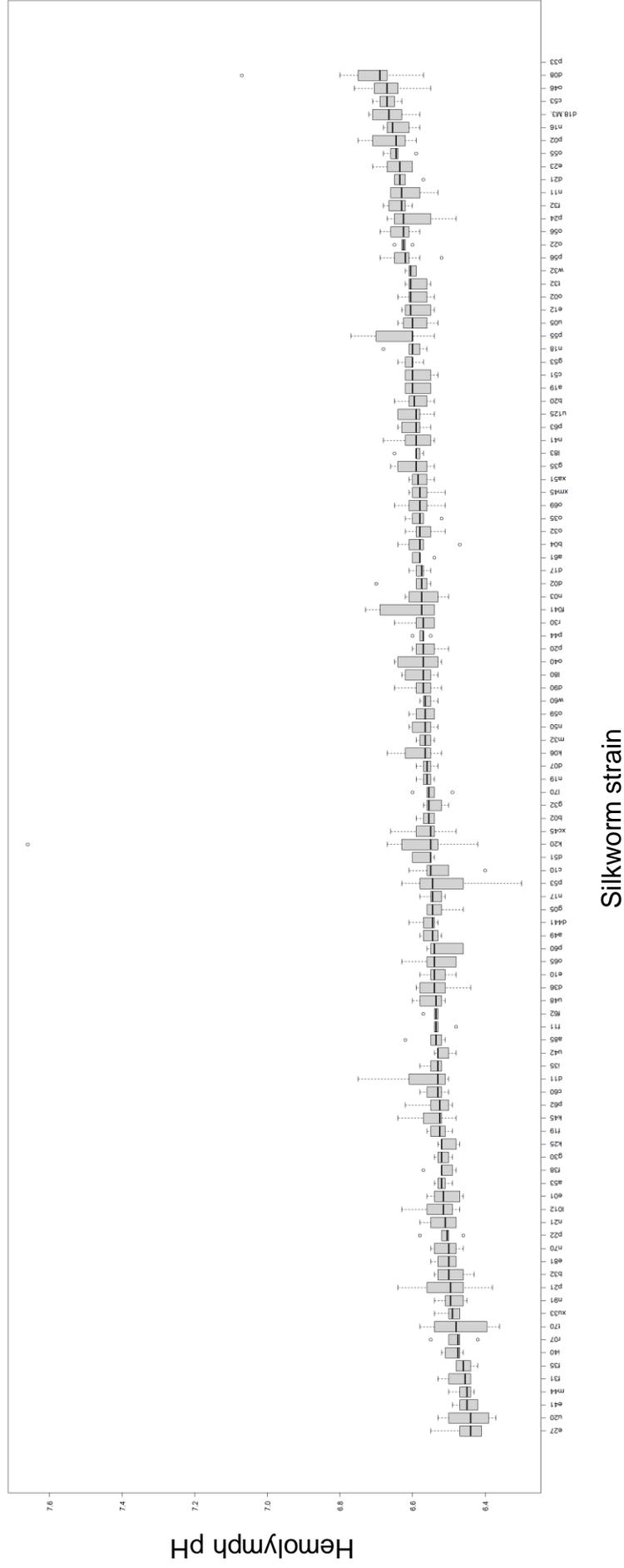
Day7

Supplementary Fig. 2



### Supplementary Fig. 3

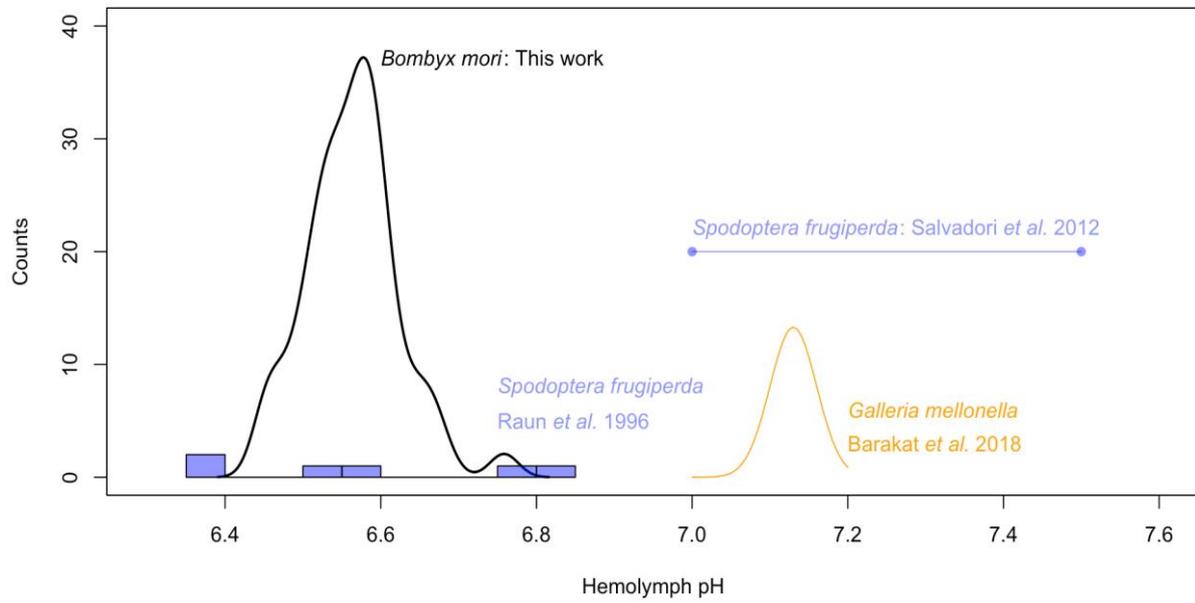
(a)



Supplementary Figure 3 Compare with hemolymph pH of silkworm larvae and the host of AcMNPV.  
(a) Hemolymph pH of 106 silkworm lines. Day-5 fifth instar larvae hemolymphs (n=6) were collected and measured for pH.

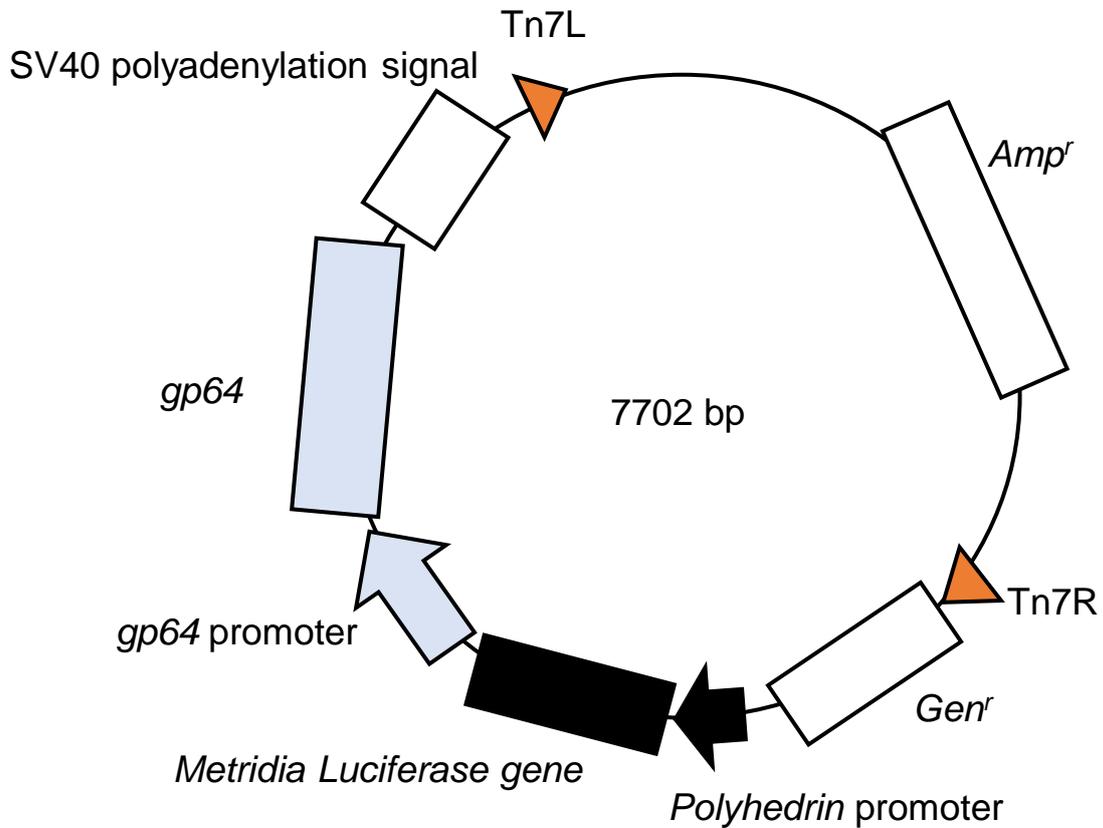
## Supplementary Fig. 3

(b)



(b) Comparing the distribution of hemolymph pH of silkworm larvae measured in this study with the distribution of hemolymph pH of AcMNPV hosts obtained from the literature.

Supplementary Fig. 4



Supplementary Figure 4 Structure of donor plasmid.

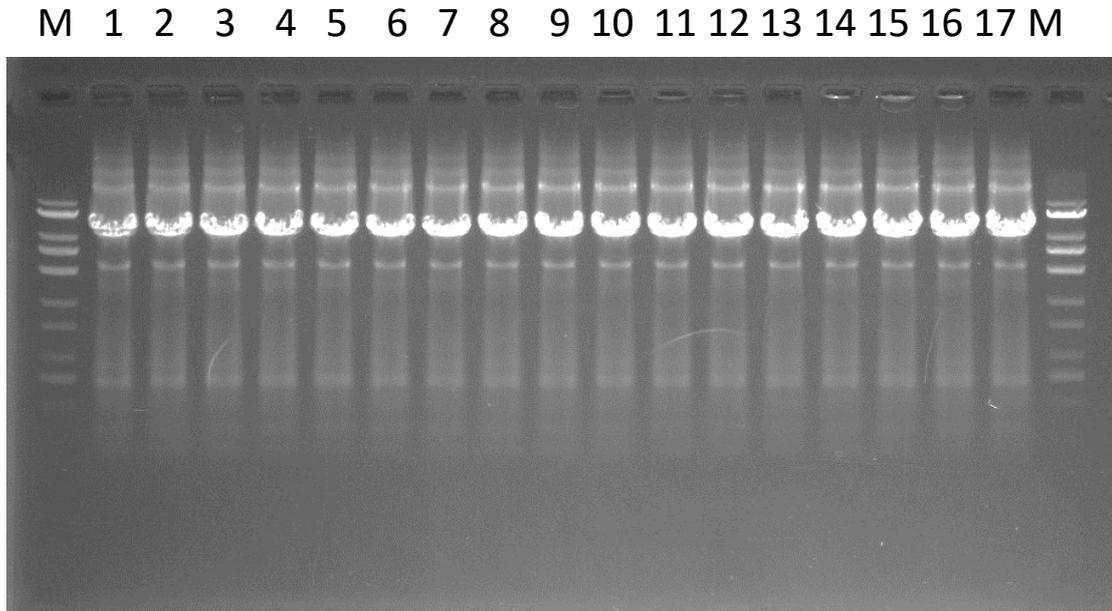
The structure of pFastbac-luc-gp64<sup>T3</sup> is shown representing of the donor plasmid.

*MetLuc*, *Metridia Luciferase* gene;

*Gen<sup>r</sup>*, *Gentamicin resistant* gene;

*Amp<sup>r</sup>*, *Ampicillin resistant* gene;

## Supplementary Fig. 5

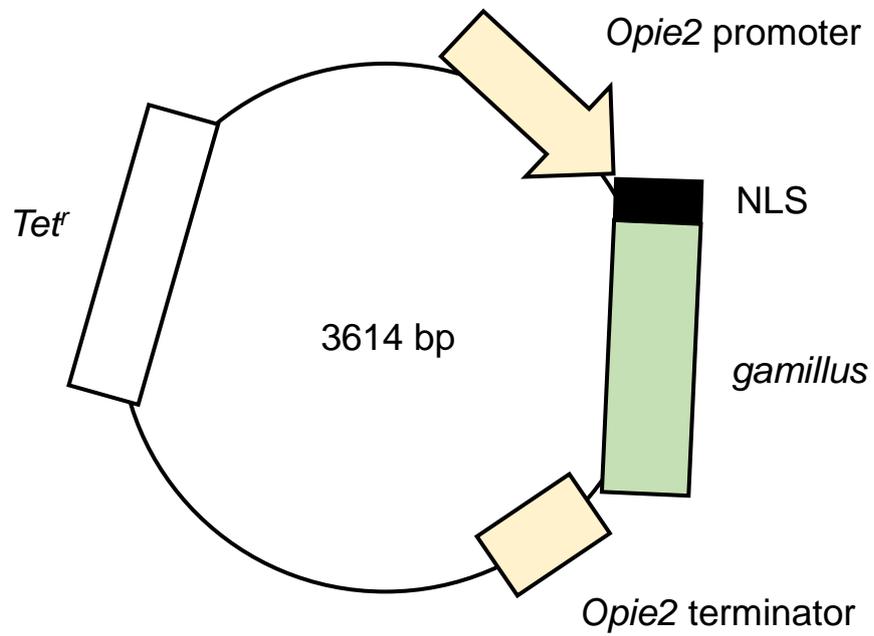


Supplementary Figure 5 Transposition from donor plasmid to bacmid were confirmed by PCR and 1% agarose gel electrophoresis.

M, 1 kbp ladder;

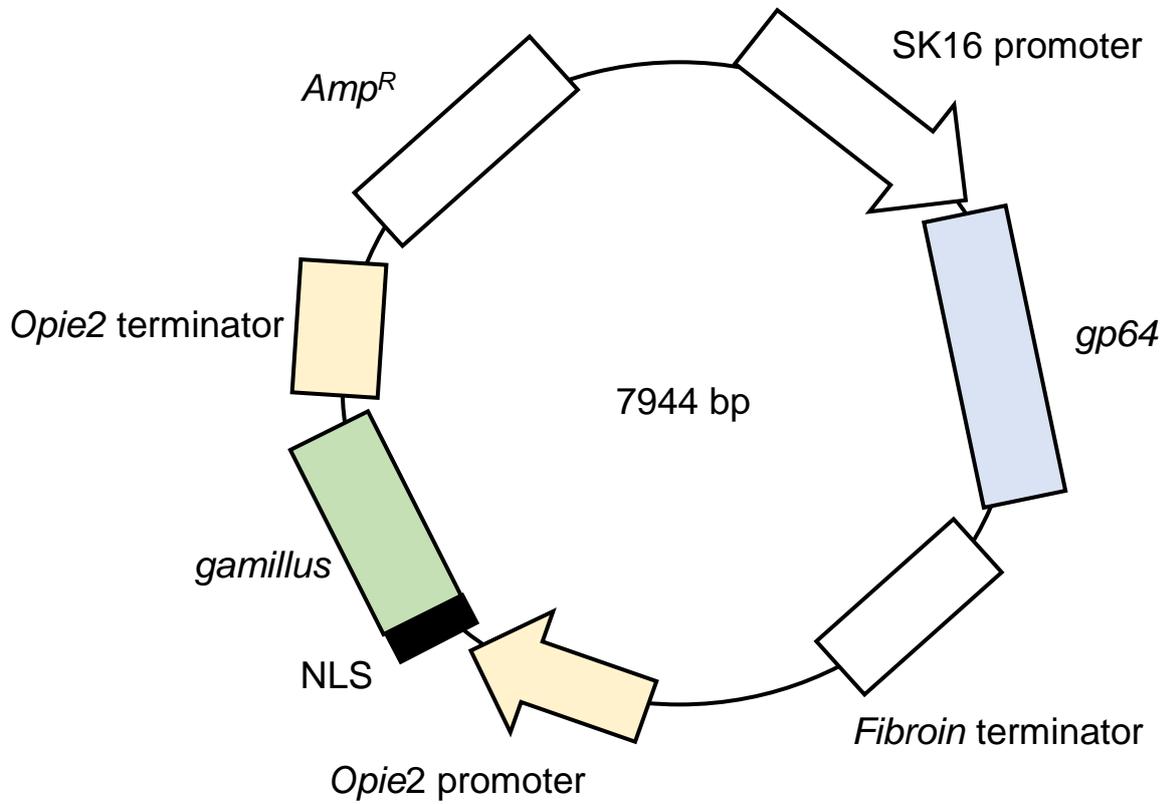
- 1, BT3 control virus;
- 2, BH4 control virus;
- 3, BT3/GP64<sup>H4</sup>;
- 4, BH4/GP64<sup>T3</sup>;
- 5, BT3/GP64<sup>T3/A30Δ</sup>;
- 6, BT3/GP64<sup>T3/L99M</sup>;
- 7, BT3/GP64<sup>T3/G158S</sup>;
- 8, BT3/GP64<sup>T3/Y172H</sup>;
- 9, BT3/GP64<sup>T3/V181I</sup>;
- 10, BT3/GP64<sup>T3/R191K</sup>;
- 11, BT3/GP64<sup>T3/L99M,Y172H</sup>;
- 12, BT3/GP64<sup>T3/Y172H,V181I</sup>;
- 13, BT3/GP64<sup>T3/G158S,V181I,R191K</sup>;
- 14, BT3/GP64<sup>T3/A30Δ,G158S,V181I,R191K</sup>;
- 15, BT3/GP64<sup>T3/A30Δ,G158S,Y172H,V181I,R191K</sup>;
- 16, BH4/GP64<sup>H4/M99L</sup>;
- 17, BH4/GP64<sup>H4/H172Y</sup>

Supplementary Fig. 6



Supplementary Figure 6 Structure of Opie2-NLS-gamillus.  
The structure of plasmid Opie2-NLS-gamillus is shown.  
*Tet<sup>r</sup>*, Tetracycline resistant gene:

Supplementary Fig. 7



Supplementary Figure 7 Structure of plasmid for fusion assay.  
The structure of pSK-gamillus-gp64<sup>T3</sup> is shown representing of the plasmid for fusion assay.  
*Amp<sup>r</sup>*, Ampicillin resistant gene

## VIII. 付録

### 遺伝子実験の基本操作

#### a) ケミカルコンピテントセルの調製

大腸菌 DH5 $\alpha$  株、gp64 ノックアウトバクミドを保持している大腸菌 *E.coli* DH10B 株 (小野, 2011) をケミカルコンピテントセル化した。試験管に用意した LB 培地 (Appendix table 2) 1.5 ml に大腸菌のコロニーを植菌し、37°C で 16 時間振盪培養した。その後、100 ml の L 培地に培養液を添加し、OD 600 が 0.3~0.4 になるまで 37°C で振盪培養した。氷中で冷却した後、2 本の 50 ml チューブに分注し遠心分離 (3,000 rpm, 15 分, 4°C) を行った。上清を 1 ml 程度残して取り除き、菌体をおだやかに懸濁後、Tfb I (Appendix table 3) を 20 ml 加え 10 分静置、遠心分離 (3,000 rpm, 15 分, 4°C) を行った。上清を完全に取り除き、Tfb II (Appendix table 4) を 2 ml 加えて菌体を懸濁し、氷中に 5 分間静置したのちあらかじめ冷却しておいた 1.5 ml チューブに懸濁液を 100  $\mu$ l ずつ分注し、-80°C で保存した。

#### b) SLiCE

SLiCE 溶液は (Motohashi, 2015) の方法に従い、DH5 $\alpha$  株を用いて作製した。1.0 ml の L 培地に大腸菌を植菌し、37°C で 3 時間振盪培養した。その培地を 50 ml の 2 $\times$ TY 培地 (Appendix table 5) に加え、37°C で OD 600 が 1.8 になるまで 5 時間程度振盪培養し、50 ml ファルコンチューブに移した後、遠心分離 (5000 $\times$ g, 10 分, 4°C) でペレットを回収した。回収したペレットを氷上で冷やしておいた滅菌水 50 ml で洗浄し、再度遠心分離 (5000 $\times$ g, 10 分, 4°C) した。ペレットを CellLytic B Cell Lysis Reagent (Sigma, B7435) 1.5 ml で穏やかに溶解し、1.5 ml チューブに移し替えた。室温で 10 分間静置した後、遠心分離 (20,000 $\times$ g, 2 分, 4°C) を行い、その上清に等量の 80%グリセロールを混合した後、0.2 ml PCR チューブに 50  $\mu$ l ずつ分注し、-80°C で保存した。

SLiCE 反応は以下の手順で行った。インサート DNA とベクターをモル比 3:1 で含む DNA 溶液に作製した SLiCE 1  $\mu$ l と 10 $\times$ SLiCE buffer (Appendix table 6) 1  $\mu$ l を加え、滅菌蒸留水で 10  $\mu$ l に調整した後、これを 37°C で 15 分反応させることで行った。大腸菌の形質転換には、SLiCE 反応液 5  $\mu$ l を DH5 $\alpha$  ケミカルコンピテントセル 100  $\mu$ l に加え、30 分氷上に静置した。その後 42°C で 50 秒間熱処理をし、2 分間氷中に保持した後 SOC 培地 (Appendix table 7) を 1 ml 加えて 37°C で 20 分振盪培養した。遠心分離 (2,000 rpm,

3 分, 4°C) 後、上清を 900  $\mu$ l 除去し、菌体を懸濁したものを LB-plate (Ampicillin 50 mg/ml) (Appendix table 8) に塗布した。37°C で約 16 時間培養した。

c) 制限酵素処理

制限酵素処理は、DNA 溶液を含む溶液 (DNA 1  $\mu$ g 以下) に、2  $\mu$ l の 10 $\times$ Cut smart Buffer (NEB) と 1  $\mu$ l の制限酵素を加え、滅菌蒸留水で総量を 20  $\mu$ l に調整し、37°C で 2 時間反応させた。

d) T4 Polynucleotide Kinase (T4PNK) 処理

T4PNK 処理は DNA を 1~50 pmol 含む溶液に、5  $\mu$ l の 10 $\times$ T4 Polynucleotide Kinase Buffer (Takara) 2  $\mu$ l と 10 mM ATP 2  $\mu$ l、T4PNK 2  $\mu$ l を加え、滅菌蒸留水で 50  $\mu$ l に調整し、37°C で 30 分反応させた。その後さらに T4PNK を 1  $\mu$ l 加えて 30 分反応させた。

e) ライゲーション

ライゲーションは T4 DNA Ligase (enzymatics) を用いて行った。インサート DNA とベクター DNA をモル比 1 : 5 で含む DNA 溶液に 2 $\times$ rapid ligation buffer 10  $\mu$ l と T4 DNA Ligase 1  $\mu$ l (約 600 U) を混合し、滅菌蒸留水で 20  $\mu$ l に調整した。これを 16°C で一晩反応させた。

f) エレクトロコンピテントセルの調製

LB-plate の大腸菌 DH10B 株のコロニーを試験管に用意した LB 培地 1.5 ml に植菌し、37°C で 16 時間振盪培養した。その後、100 ml の LB 培地に植えつき、OD600 が 0.4 になるまで 37°C で振盪培養した。氷中で冷却した後、培養液を 2 本の 50 ml チューブに分注し、遠心分離 (2,500 rpm, 15 分, 4°C) を行った。上清を除き、滅菌蒸留水を加え、遠心分離 (2,500 rpm, 15 分, 4°C) を行った。上清除去から遠心までの一連の作業を 2 回行った。さらに 10%グリセロールで 2 回洗浄した後、1 ml の 10%グリセロールで菌体を懸濁し、氷中に 5 分間静置した。あらかじめ冷却しておいた 1.5 ml チューブに懸濁液を 50  $\mu$ l ずつ分注し、-80°C で保存した。

Appendix table 1 Composition of TC-100

---

TC-100	20.57 g
NaHCO <sub>3</sub>	0.35 g
Adjust to pH 6.2 with NaOH	
Add dH <sub>2</sub> O to make up to 1 L	
Filtrate with 0.2 µm nitrocellulose membrane	

---

Appendix table 2 Composition of L broth

---

Bacto tryptone	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	5 g
Make up to 1 L with dH <sub>2</sub> O and autoclave	

---

Appendix table 3 Composition of Tfb I

---

KOAc	30 mM
RbCl	100 mM
CaCl <sub>2</sub>	10 mM
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	60 mM
Glycerol 15%	
Make up to 100 ml with dH <sub>2</sub> O	
Adjust to pH 5.8 with CH <sub>3</sub> COOH	
Filtrate with 0.2 µm nitrocellulose membrane	

---

Appendix table 4 Composition of Tfb II

---

MOPS	10 mM
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	75 mM
RbCl	10 mM
Glycerol	15%
Make up to 100 ml with dH <sub>2</sub> O	
Adjust to pH 6.5 with KOH	
Filtrate with 0.2 µm nitrocellulose membrane	

---

Appendix table 5 Composition of 2 × YT broth

Bacto Tripton	16 g
Yeast Extract	10 g
NaCl	5 g
1 N NaOH	5 ml
Add dH <sub>2</sub> O to make up to 1 L	

Appendix table 6 Composition of 10 × SLiCE buffer

500mM Tris-HCl (pH7.5)
100mM MgCl <sub>2</sub>
10mM ATP
10mM DTT
Filtrate with 0.2 μm nitrocellulose membrane

Appendix table 7 Composition of SOC broth

sol. A	
Bacto tryptone	2 g
Yeast extract	0.5 g
2M KCl	125 μl
5M NaCl	200 μl
Make up to 93 ml with dH <sub>2</sub> O	
sol. B	
1 M MgCl <sub>2</sub>	1 ml
1 M MgSO <sub>4</sub>	1 ml
0.4 M Glucose	5 ml
After autoclaving, add sol. B to sol. A	
Filtrate with 0.2 μm nitrocellulose membrane	

Appendix table 8 Composition of LB-plate

---

Bacto tryptone	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	5 g
1.5% agar	
Make up to 1 L with dH <sub>2</sub> O and autoclave	

---

Appendix table 9 Composition of 10×PBS

---

NaCl	40 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	14.5g
KCl	1 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
Make up to 500 ml with dH <sub>2</sub> O and autoclave	

---

Appendix table 10 実験ノートとの対応

図表	ノート番号	ページ
Fig.1	AME0040	182-184
Fig.2	AME 0040	166-169
Fig.3	AME 0012	113
Fig.4	AME0062	131
Fig.5	AME0062	01, 02, 03, 64-72, 87-96
Fig.6	AME0062	115-122
Fig.7	AME0062	73-80
Fig.8	AME0059	74-92
Fig.9	AME0059	191-198
Fig.10	AME0059	191-198
Supplementary Fig. 1	AME0005	10-22
Supplementary Fig. 2	AME0059	162-181
Supplementary Fig. 3	AME0040	83, 84, 95, 96
Supplementary Fig. 4	AME0014	106-115
Supplementary Fig. 5	AME0062	132
Supplementary Fig. 6	AME0032	38-49
Supplementary Fig. 7	AME0050	194-200
	AME0059	3-11

Appendix Script 1 Selecting the best focus image from z-stack images in python.

#python で z-stack 画像からベストフォーカス画像を選択

```
import glob
import re
import os
import shutil
```

#まずは、1-1~24-3 ディレクトリの中に ch00~ch03 までのディレクトリをそれぞれ作成

#1-1~24-3 までのリスト作成

```
number_list=[]
for i in range(1,25):
    for m in range(1,4):
        number_list.append(str(i)+"-"+str(m))
```

#1-1~24-3 までのディレクトリ作成

```
for number in number_list:
    os.mkdir("C:/Users/Owner/fusionassay/A1Ac/"+number)
```

#1-1~24-3 までのディレクトリの中に、ch00~ch03 ディレクトリを作成

```
for number in number_list:
    for n in ["ch00","ch01","ch02","ch03"]:
        os.mkdir("C:/Users/Owner/fusionassay/A1Ac/"+number+"/"+n)
```

#画像ファイルを読み込む (ファイルのみ、ディレクトリは含まず)

```
files_from = [p for p in glob.glob(r"C:/Users/Owner/fusionassay/220926-A1Ac/*",
recursive=True)
               if os.path.isfile(p)]
```

#プレートの ID(1-1~24-3 まで)、chID(ch00~ch03)までリスト化

```
plateID=number_list
chID=["ch00","ch01","ch02","ch03"]
```

#それぞれのプレート ID、chID において、z-stack の枚数分該当ディレクトリにコピーして格納

```
for file in files_from:
    for plate in plateID:
        for ch in chID:
            result=re.findall("_"+plate+"_S001_z"+"%d{2}"+ "_RAW_"+ch,file)
            if result:
                print(result)
                print(file)
                shutil.copy(file,"C:/Users/Owner/fusionassay/A1Ac/"+plate+"/"+ch)
```

```

#ここからベストフォーカスを選ぶスクリプト

#control,m2,m6,m1356, A1Ac を一気に行う
import numpy as np
import cv2
import sys

import glob
import re
import os
import shutil

#1-1~24-3 までのリスト作成
number_list=[]
for i in range(1,25):
    for m in range(1,4):
        number_list.append(str(i)+"-"+str(m))

#サンプルのリスト作成
sample_list=["control","m2","m6","m1356","A1Ac"]

#ラプラシアンフィルタ
kernel_lap8 = np.array([[1, 1, 1],
                        [1, -8, 1],
                        [1, 1, 1]])

#ここからループを回してベストフォーカスを選ぶスクリプト開始

for sample in sample_list:
    for number in number_list:
        #まずは gamillus の写真
        #明視野 ch01 のファイルの読み込み
        files_from1 = [p for p in glob.glob (r"C:/Users/Owner/fusionassay/"
            +sample+"/"+"number+"/ch01/*", recursive=True)
            if os.path.isfile(p)]

        #明視野 ch01 にラプラシアンフィルタかけて、輝度値の平均が一番高い画像を
        #選んで保存
        values = []
        zz=[]
        for file in files_from1:
            image = cv2.imread(file, cv2.IMREAD_GRAYSCALE)
            image_lap8 = cv2.filter2D(image, cv2.CV_64F, kernel_lap8)
            image_lap8_abs = np.uint8(np.abs(image_lap8))
            img = np.array(image_lap8_abs).flatten()

```

```

        keys=re.findall("z"+"%d{2}" , file)
        zz.append(keys[0])

        mean = img.mean()
        values.append(mean)
items = dict(zip(zz, values))
max_k = max(items, key=items.get)
print(items)
print(max_k)

for file in files_from1:
    if str(max_k) in file:
        result=file

shutil.copy(result,"C:/Users/Owner/fusionassay/bestfocus/"+sample+"/"+number)

#暗視野 ch00 のファイルを読み込む
files_from2 = [p for p in glob.glob (r"C:/Users/Owner/fusionassay/"
+sample+"/"+number+"/ch00/*", recursive=True)
if os.path.isfile(p)]

#明視野 ch01 でのベストフォーカスを暗視野でも選び、画像を保存
for file in files_from2:
    if str(max_k) in file:
        result=file

shutil.copy(result,"C:/Users/Owner/fusionassay/bestfocus/"+sample+"/"+number)

#ここから DAPI の写真
#明視野 ch03 のファイルの読み込み
files_from3 = [p for p in glob.glob (r"C:/Users/Owner/fusionassay/"
+sample+"/"+number+"/ch03/*", recursive=True)
if os.path.isfile(p)]

#明視野 ch03 にラプラシアンフィルタかけて、輝度値の平均が一番高い画像
を選んで保存
values = []
zz=[]
for file in files_from3:
    image = cv2.imread(file, cv2.IMREAD_GRAYSCALE)
    image_lap8 = cv2.filter2D(image, cv2.CV_64F, kernel_lap8)
    image_lap8_abs = np.uint8(np.abs(image_lap8))
    img = np.array(image_lap8_abs).flatten()

    keys=re.findall("z"+"%d{2}" , file)
    zz.append(keys[0])

```

```

        mean = img.mean()
        values.append(mean)
items = dict(zip(zz, values))
max_k = max(items, key=items.get)
print(items)
print(max_k)

for file in files_from3:
    if str(max_k) in file:
        result=file

shutil.copy(result,"C:/Users/Owner/fusionassay/bestfocus/"+sample+"/"+number)

#暗視野 ch02 のファイルを読み込む
files_from4 = [p for p in glob.glob (r"C:/Users/Owner/fusionassay/"
        +sample+"/"+number+"/ch02/*", recursive=True)
        if os.path.isfile(p)]

#明視野 ch02 でのベストフォーカスを暗視野でも選び、画像を保存
for file in files_from4:
    if str(max_k) in file:
        result=file

shutil.copy(result,"C:/Users/Owner/fusionassay/bestfocus/"+sample+"/"+number)

```

Appendix Script 2 Count the number of nuclei (blue fluorescence) in the syncytium (green fluorescence) using ImageJ with ROI Manager.

//緑色蛍光画像の各 ROI を抽出し、青色蛍光画像を使って核の数をカウントする。

```
bestfocusdir= "C:/Users/Owner/fusionassay/bestfocus/";
sample_name=newArray(5);
sample_name[0]="control";
sample_name[1]="m2";
sample_name[2]="m6";
sample_name[3]="m1356";
sample_name[4]="A1Ac";

function getFileListRecursively(d,pattern){
  lst_fnms = newArray();
  list = d ;
  for(i = 0; i < list.length; i++){
    if(matches(list[i], pattern)){
      lst_fnms = Array.concat(lst_fnms,list[i]);
      //lst_fnms = getFileListRecursively("'" + dir + list[i], lst_fnms);
    }else{
    }
  }
  return lst_fnms;
}

for (i = 0; i < sample_name.length; i++) {
  sample1=sample_name[i];
  for (j = 0; j < 24; j++) {
    for (k = 0; k < 3; k++) {
      number=""+(j+1)+"-"+(k+1);
      cd=bestfocusdir+sample1+"/"+number;
      prefiles=getFileList(cd);
      bluefile=getFileListRecursively(prefiles,".*ch02.*");
      greenfile=getFileListRecursively(prefiles,".*ch04.*");
      grayfile=getFileListRecursively(prefiles,".*ch01.*");

      //ROI の初期化
      roiCount = roiManager("count");
      if(roiCount > 0){
        roiManager("Deselect");
        roiManager("Delete");
      }

      //まずは緑画像で ROI 設定
      //selectWindow("Mask of "+"元の画像"+);
      openfilenamegreen=cd+"/"+greenfile[0];
      open(openfilenamegreen);
      selectWindow(greenfile[0]);
      run("8-bit");
      run("Subtract Background...", "rolling=50");
    }
  }
}
```

```

run("Despeckle");
run("Sharpen");
run("Gaussian Blur...", "sigma=2");
setAutoThreshold("Default dark");
//run("Threshold...");
setAutoThreshold("Default dark");
setOption("BlackBackground", true);
run("Convert to Mask");
run("Analyze Particles...", "size=150.00-Infinity show=[Overlay
Masks] display include summarize add composite");

roiCount = roiManager("count");

//青色蛍光画像の処理
openfilenameblue=cd+"/"+bluefile[0];
open(openfilenameblue);
selectWindow(bluefile[0]);
run("Duplicate...", "title=blue");
selectWindow("blue");
run("8-bit");
run("Subtract Background...", "rolling=50");
run("Despeckle");
run("Sharpen");
run("Gaussian Blur...", "sigma=2");
setAutoThreshold("Default dark");
//run("Threshold...");
setAutoThreshold("Default dark");
setOption("BlackBackground", true);
run("Convert to Mask");
run("Watershed");
run("Erode");

//緑色蛍光画像の ROI ごとに青色蛍光画像で核をカウント
for (m = 0; m < roiCount; m++) {
    selectWindow(bluefile[0]);
    run("Duplicate...", "title=blue1");
    roiCount1=m;
    selectWindow("blue");
    roiManager("Select", m);
    run("Analyze Particles...", "size=30.00-Infinity show=
[Overlay Masks] display include summarize add
    composite");
}
selectWindow("Summary");
saveAs("Results", "C:/Users/Owner/fusionassay/bestfocus/
221222-trim/"+sample1+"_"+number+".csv");
run("Close All");
}
}
}

```