

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20380111

研究課題名（和文）トランスポゾンタギング法によるウイルス感染増殖に関する宿主遺伝子の網羅的同定

研究課題名（英文）Systematic screening of viral host factors using a transposon-tagging method.

研究代表者

冲中 泰（YASUSHI OKINAKA）

広島大学・大学院生物圏科学研究科・准教授

研究者番号：80363034

研究成果の概要（和文）：

染色体数が25であるメダカ (*Oryzias latipes*) HNI-2細胞系（メダカの正常染色体数は $2n=48$ ）をクローニングし、それへのトランスポゾン挿入による遺伝子破壊およびベータノダウイルス感染実験を行った結果、ウイルスに耐性でかつGFP（トランスポゾンコードのマーカージ遺伝子）を発現する細胞系を17系統得た。これらウイルス耐性細胞からトランスポゾン近傍領域のDNA断片を11種取得し、その配列を用いてEnsemblメダカゲノムデータベースに対するblastn検索を行った結果、9系統のDNAに対応する配列が得られ、このうち5つがコード領域であった。

研究成果の概要（英文）：

We cloned a medaka (*Oryzias latipes*) HNI-2 cell line, the chromosome number of which was 25. We then introduced a transposon into the cells for gene disruption and obtained 17 betanodavirus-resistant and GFP-expressed cell lines (GFP expression indicates transposon insertion). DNA fragments adjacent to the inserted transposon were isolated from the genomic DNA prepared from each of the virus-resistant cells and used for blastn searches against the Ensembl medaka genome database. Nine sequences identified from the 17 resistant cell lines hit database sequences and five of which were revealed to encode proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2008年度 | 6,800,000 | 2,040,000 | 8,840,000 |
| 2009年度 | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |
| 2010年度 | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 14,200,000 | 4,260,000 | 18,460,000 |

研究分野：魚病学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：ベータノダウイルス・宿主因子・トランスポゾンタギング・遺伝子破壊系・魚類培養細胞

1. 研究開始当初の背景

ベータノダウイルスに関する研究論文は多数あるが、その中で感染メカニズムの分子生物学的解明を狙った研究では我々のグループが世界でも抜き出ている。魚介類ウイルスの基礎的研究の先鞭を付け、さらに得られた新しい知見を今までにないウイルス防除法の開発に繋げるという意味でも、本研究は非常に貴重なものである。魚介類ウイルス学の分野全般で唯一不足している情報は、ウイルス感染・増殖に関与する宿主側の因子（遺伝子）に関してであるが、本研究の成功によりその宿主側因子の情報不足も解消されると思われる。

トランスポゾンとは、生物のゲノム内に天然に存在する転移因子（遺伝子）であり、その切り出し・挿入を繰り返しながら生物ゲノム内を動き回る。トランスポゾンタギング法は、トランスポズンを生物ゲノムへ人為的に挿入し、遺伝子がランダムに破壊された変異体を体系的に作製する手法である。破壊された遺伝子にはトランスポゾンが必ず挿入されているため、ある表現型を示す変異体から目的の遺伝子を同定する際にトランスポゾン挿入が目印となる。トランスポゾンタギング法は、細菌や植物では既に遺伝子破壊ツールとして一般的に利用されているが、脊椎動物ではゲノムに効率良く挿入される（遺伝子を破壊する）トランスポゾンが発見されておらず、トランスポゾンタギング法は利用不可能である。しかし最近、川上らによりメダカ由来のトランスポゾン（*ToI2*）がメダカ以外の異種動物細胞ゲノムにも効率よく挿入されることが示された。川上らはこのメダカのトランスポズンをまだ遺伝子破壊実験に応用してはいないが、その高い挿入率から考えて本研究に十分利用可能と思われる。すなわち、本研究は動物細胞での初めてのトランス

ポゾンタギング実験である。

2. 研究の目的

- (1) トランスポズンの挿入によりウイルス感受性メダカ培養細胞の遺伝子をランダムに破壊する（トランスポゾン挿入細胞の作製）。
- (2) トランスポゾン挿入細胞にベータノダウイルスを感染させ、ウイルス感受性を失った細胞系（ウイルス耐性細胞）をスクリーニングする。
- (3) ウイルス耐性細胞から、トランスポズンの挿入された遺伝子（ターゲット遺伝子）の断片をクローニングし、その塩基配列を調べる。
- (4) メダカ個体から、無傷なターゲット遺伝子全長（cDNA）をクローニングする。
- (5) ウイルス耐性細胞にターゲット cDNA 全長を導入し、遺伝子の相補による表現型の回復を確認することで、ターゲット cDNA の生物学的重要性を確認する。また、siRNA を用いたノックダウン実験によりターゲット cDNA を評価する。
- (6) ウイルス耐性細胞ではウイルス感染・増殖ステップのどこに問題が生じているかを調べる。
- (7) ウイルス感染・増殖に関与することが判明したターゲット遺伝子およびその翻訳産物（ターゲットタンパク質）の性質を調べるため、①メダカ魚体におけるターゲット遺伝子の組織特異的発現様式を解析し、②ターゲットタンパク質とウイルスタンパク質との物理的相互作用を確認する。

3. 研究の方法

- (1) ベータノダウイルス感受性培養細胞ゲノムへのトランスポズンの挿入

メダカは様々なバイオリソースおよび研究手法が整ったモデル魚である。我々は当初の予定を変更し、マハタ培養細胞の代わりにメダカ培養細胞を研究材料に用いて研究を行った。メダカ細胞へのトランスポゾンの導入は川上らの方法を参考にした。具体的には、まずトランスポゾン転移酵素を発現するプラスミド (pCAGGST2TP) およびトランスポゾンを含むプラスミド (pT2AL200R150G) を同時に細胞に導入した。ゲノムにトランスポゾンが挿入された細胞 (以後、“トランスポゾン挿入細胞”) はトランスポゾン上の GFP (green fluorescent protein) 遺伝子の発現 (緑色蛍光) およびサザンハイブリダイゼーションにより確認した。

(2) ウイルス感受性を失った細胞系のスクリーニング

トランスポゾン挿入細胞にはベータノダウイルスを M.O.I.=1 で接種し、ウイルス感染・増殖に重要な遺伝子が破壊されて生き残る“ウイルス耐性細胞”をクローニングした。その際、トランスポゾンを含まないエスケープ細胞を防ぐため、GFP 発現を示しかつウイルス耐性である細胞のみを蛍光顕微鏡下で選抜した。

(3) トランスポゾン近傍遺伝子のクローニングおよび塩基配列の解読

各ウイルス耐性細胞からゲノム DNA を抽出し、トランスポゾンを切断しない適当な制限酵素で切断後、セルフライゲーションによる環状化を行った。この DNA を鋳型に、トランスポゾン末端に位置するプライマーを用いてインバース PCR を行い、トランスポゾン近傍の遺伝子 (以後、“ターゲット遺伝子”) 断片を増幅し、塩基配列を解読した。

(4) メダカ個体からのターゲット遺伝子 (cDNA) 全長配列のクローニング

ターゲット遺伝子の部分配列情報を基に

Ensembl メダカゲノムデータベースから全長配列を取得した。それを参考にプライマーをデザインし、メダカ個体より抽出した mRNA を鋳型に RT-PCR によりターゲット cDNA 全長配列を取得した。

(5) ターゲット遺伝子 (cDNA) の生物学的重要性の評価

ターゲット cDNA のコード領域を、RFP (red fluorescent protein) 遺伝子持つ発現ベクタープラスミド (pHcRed; Clontech 社) につないだ。作製したプラスミドは先のウイルス耐性細胞 (同ターゲット遺伝子がトランスポゾン挿入により破壊されているもの) へ導入した。得られたターゲット cDNA 発現細胞にはウイルスを接種し、cDNA の相補により細胞のウイルス感受性が復活したかを確認する。また、生物学的重要性の他の評価方法として、ターゲット cDNA に対する siRNA を合成してノックダウン実験を行い、同様にウイルス感染性の変化を調べる。

4. 研究成果

トランスポゾンタギングによりウイルス耐性細胞が得られた場合、次に行うことはトランスポゾン近傍配列の取得および候補遺伝子の生物学的重要性の評価である。当初予定していたマハタ培養細胞を実験材料に用いた場合、これらプロセスに多大なる時間と労力がかかることが予測された。改善策として我々はメダカ培養細胞を用いて研究を進めることとした。メダカは既に様々なバイオリソースおよび研究手法が整ったモデル魚である。

トランスポゾンタギング実験に先立ち、まずベータノダウイルス感染により細胞が完全に死滅するメダカ細胞株の選定を行った。東京大学大学院新領域創成科学研究科および理研ナショナルバイオリソースプロジェ

クトから分譲を受けた 10 種メダカ細胞株を供試した結果、HNI-2 細胞が最も高いウイルス感受性を示し、M. O. I. =1 でウイルス接種した 48 時間後には細胞は完全に死滅した。また、M. O. I. =10 で接種した場合はおよそ 24 時間後には HNI-2 細胞は全滅した。

HNI-2 細胞を用いてトランスポゾンタギング実験を行い、ベータノダウイルス耐性となった細胞の取得を試みた。タギング実験を繰り返し多くの GFP (トランスポゾンにコードされるマーカー遺伝子) 発現細胞は得られたが、その中からウイルス耐性細胞は得られなかった。サザンハイブリダイゼーションにより、トランスポゾンが培養細胞のゲノムに挿入されたことは確認された。本実験では、ある遺伝子にトランスポゾンが挿入されることで、その遺伝子に関して細胞が null mutant となり、ウイルス感受性を失うことを期待している。つまり、使用する培養細胞の相同染色体の片方になるべく多く欠落していることが望ましい。確認のため、実験に供試した HNI-2 細胞の染色体数をギムザ染色法により計測したところ、予想通り多くの細胞が 48 あるいはそれを上回り (正常なメダカ染色体数は $2n=48$)、HNI-2 細胞をそのまま使用することは非効率的と判断された。そこで、HNI-2 細胞から染色体数が少ない細胞をクローニングした。そのうち、染色体数が最も少ない 25 であった細胞系 (HNI-25) を用いて、以後トランスポゾン挿入実験を行うこととした。

HNI-25 細胞系を用いたトランスポゾン挿入実験により、ベータノダウイルスに耐性でかつ GFP を発現する細胞系を 17 系統得ることができた。この結果から、染色体数の少ない細胞系を材料に用いれば、トランスポゾン挿入によるウイルス耐性細胞の取得効率が上がることが明らかとなった。

これらウイルス耐性細胞を大量に培養してゲノム DNA を単離し、トランスポゾン内に存在しない制限酵素で切断後、インバース PCR を行った。その結果、17 系統中 11 系統でトランスポゾン挿入領域のメダカ DNA 断片を取得することができた。この部分配列を用いて Ensembl メダカゲノムデータベースに対する blastn 検索を行った結果、9 系統の DNA に対する類似配列が得られ、このうち 5 つがコード領域と予測された。今回、トランスポゾン挿入領域の配列が 9 種得られたが、このうち 4 種が非コード領域であった。この解釈として、トランスポゾン挿入領域以外に起きた突然変異によりウイルス耐性が付与されたか、あるいはこれら非コード領域も宿主因子遺伝子の発現調節などに関与する可能性が考えられる。

上記の 5 つの候補遺伝子の生物学的重要性を評価するため、それぞれの全長 cDNA を取得し、それぞれが由来するウイルス耐性細胞に導入して (相補実験)、ウイルス感受性が復帰するかを現在引き続き検討中である。また、生物学的重要性の他の評価方法として、siRNA によるノックダウン実験系を構築した。10 種の siRNA 導入試薬を供試した結果、X-treme gene siRNA transfection reagent (Roche 社) を用いることで最も高いノックダウン効率が得られた。現在、この方法で各候補遺伝子のノックダウンを行い、ウイルス感受性の低下がみられるかを検討中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

[1] Adachi, K., Sumiyoshi, K., Ariyasu, R., Yamashita, K., Zenke, K., and Okinaka, Y. (2010) Susceptibilities of medaka (*Oryzias latipes*) cell lines to a betanodavirus. *Virology*. 7:150. (査読有り)

[2] Hata N., Okinaka, Y., Iwamoto, T., Kawato, Y., Mori, K., and Nakai, T. (2010) Identification of RNA regions that determine temperature sensitivity in betanodaviruses. *Arch. Virol.* 155:1597–1606. (査読有り)

[3] Gomez, D. K., Mori, K., Okinaka, Y., Nakai, T., and Park, S. C. (2010) Trash fish can be a source of betanodaviruses for cultured marine fish. *Aquaculture*. 302:158–163. (査読有り)

[4] Sugaya, T., Mori, K., Nishioka, T., Masuma, S., Oka, M., Mushiake, K., Okinaka Y., and Nakai T. (2009) Genetic heterogeneity of betanodaviruses in juvenile production trials of Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis* (Temminck & Schlegel). *J. Fish Dis.* 32:815–823. (査読有り)

[5] Gomez, D. K., Matsuoka, S., Mori, K., Okinaka, Y., Park, S. C., and Nakai, T. (2009) Genetic analysis and pathogenicity of betanodavirus isolated from wild redspotted grouper *Epinephelus akaara* with clinical signs. *Arch. Virol.* 154:343–346. (査読有り)

[6] Okinaka, Y., and Nakai, T. (2008) Comparisons among the complete genomes of four betanodavirus genotypes. *Dis. Aquat. Org.* 80: 113–121. (査読有り)

[7] Ito, Y., Okinaka, Y., Mori, K., Sugaya, T., Nishioka, T., Oka, M., and Nakai, T. (2008) The variable region of RNA2 is sufficient to determine host specificity in betanodaviruses. *Dis. Aquat. Org.* 79:199–205. (査読有り)

[8] Sakamoto, T., Okinaka, Y., Mori, K.,

Sugaya, T., Nishioka, T., Yamashita, H., Oka, M., and Nakai, T. (2008) Phylogenetic analysis of betanodavirus RNA2 identified from wild marine fish in oceanic regions. *Fish Pathol.* 43:19–27. (査読有り)

[学会発表] (計 8 件)

[1] 善家孝介、冲中 泰、メダカ培養細胞におけるRNA干渉を利用した遺伝子ノックダウン法の最適化、日本魚病学会、三重大学、津、平成 22 年 9 月 21–22 日.

[2] 有安 亮、冲中 泰、ベータノダウウイルスの温度感受性機構の解明-III RGNV 型近縁株を用いた研究の効率化、日本魚病学会、三重大学、津、平成 22 年 9 月 21–22 日.

[3] 善家孝介、冲中 泰、メダカ培養細胞におけるRNA干渉誘導法の最適化、小型魚類研究会、プラザイースト、さいたま、平成 22 年 9 月 18–19 日.

[4] 足立 圭、有安 亮、住吉洸介、冲中 泰、メダカ由来細胞株におけるベータノダウイルス増殖性の検討. 日本ウイルス学会、都市センターホテル、東京、平成 21 年 10 月 25–27 日.

[5] 冲中 泰、足立 圭、有安 亮、住吉洸介、ベータノダウイルスの感染・増殖に適したメダカ培養細胞の同定. 小型魚類研究会、名古屋大学、名古屋、平成 21 年 9 月 12–13 日.

[6] 冲中 泰・端 直美・河東康彦・中井敏博、ベータノダウイルスの温度感受性機構の解明-II 温度感受性に関わるゲノム領域の特定. 日本水産学会、東京海洋大学、東京都、平成 21 年 3 月 27–31 日.

[7] 河東康彦・冲中 泰・中井敏博・山下浩史、ベータノダウイルスの宿主特異性決定機構の解明-III 細胞膜上レセプター以外

の決定機構の有無、日本水産学会、東京海洋大学、東京都、平成 21 年 3 月 27-31 日.

[8] Kawato, Y., Okinaka, Y., Yamashita, H., and Nakai, T., Genotype-specific binding of betanodaviruses to sevenband grouper cultured cells, SGF. *In* 7th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture, Taipei, Taiwan, 22-26 June, 2008.

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

冲中 泰 (YASUSHI OKINAKA)

広島大学・大学院生物圏科学研究科

・准教授

研究者番号： 80363034

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

中井 敏博 (TOSHIHIRO NAKAI)

広島大学・大学院生物圏科学研究科

・教授

研究者番号： 60164117

(H20 研究分担者)