

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450467

研究課題名(和文) 昆虫ウイルスのイントロンレスmRNA調節機構の解明

研究課題名(英文) Study on the post-transcriptional regulation of mRNA by the insect virus proteins.

研究代表者

小谷 英治 (Kotani, Eiji)

京都工芸繊維大学・応用生物学系・准教授

研究者番号：10273541

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：カイコに感染するBombyx mori nucleopolyhedro virusのBROファミリータンパク質は、mRNAの配列依存的にmRNAからのタンパク質翻訳を制御することが考えられる。本研究では、培養細胞を用いた解析からBRO-B/Eタンパク質が宿主の翻訳制御RNA結合タンパク質の一つと相互作用することにより特定mRNAからのタンパク質翻訳を低下させることを明らかにした。さらに、BRO-Aタンパク質をカイコ中部絹糸腺において発現させた結果、特定タンパク質の発現に影響を及ぼし、体外に吐き出されるセリシン量を著しく低下させることもわかった。

研究成果の概要(英文)：Bombyx mori nucleopolyhedrovirus nucleic acid-binding protein BRO family likely supports the regulation of mRNA. We have shown that BRO-B and BRO-E associate with cellular TIA-1 homolog (BmTRN-1), a translational regulator in silkworm cells during viral infection. Co-expression of BRO-B and BRO-E synergistically led to a significant decrease in protein synthesis from a designed transcript carrying the 5' UTR of a cellular mRNA with no significant change of the transcript abundance. BRO family proteins were also shown to be involved in the regulation of protein synthesis by the study using the transgenic silkworms with middle silk glands expressing the BRO-A that influenced the sericin cocoon production of the silkworms. These results suggest that the BRO family could regulate protein synthesis in the silkworm individuals and the application to obtain the silkworms with a useful trait.

研究分野：Insect molecular biology

キーワード：カイコ バキュロウイルス タンパク質発現 遺伝子組換え

1. 研究開始当初の背景

バキュロウイルスは二本鎖環状 DNA ゲノムを持つウイルスであり、ほとんど全ての遺伝子は、イントロンを持たない。このうち、カイコに感染する BmNPV は、個体や細胞の中で活性のある有用タンパク質を多量に生産するための発現ベクターとして用いられる。このウイルスの mRNA は通常の真核生物のものとは異なる産生過程を持つことから、ウイルス増殖過程に特徴的な mRNA 機能調節の機構があるものと考えられる。これまでの研究から、カイコ細胞の内性タンパク質である TIA-1 (BmTRN-1) と BmNPV の baculovirus repeated ORF タンパク質 (BRO ファミリー) のうち BRO-B/E がともに免疫沈降で共沈すること、両タンパク質には共に mRNA の転写後過程の調節に関わる可能性のあることが考えられた。BmNPV ゲノム上には A-E までの 5 つの BRO タンパク質がコードされており、各タンパク質は相同性を持つ。これまでに、バキュロウイルス感染過程の mRNA からのタンパク質生産調節の仕組みは調べられてこなかった。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、この BRO-B/E タンパク質と BmTRN-1 の相互作用が細胞内の mRNA からのタンパク質生産に及ぼす影響を明らかにする。

(2) BRO ファミリーの転写後調節との関わりを見出す。

(3) BRO ファミリータンパク質によるカイコ個体の形質転換と、得られる表現型の評価を行う。以上について実施した。

3. 研究の方法

(1) 免疫沈降：培養細胞 BM-N に、BmTRN-1 と、BRO-B および BRO-E を発現するプラスミドをトランスフェクトした。BmTRN-1 には FLAG を、BRO タンパク質には V5 タグをそれぞれ C 末端に付加した。培養後、可溶化された細胞タンパク質を anti-V5 抗体の結合したビーズとともに 4 1 時間インキュベートした。洗浄後、ビーズに結合しているタンパク質を、anti-V5 抗体と anti-Flag 抗体を用いたウエスタンブロットングにより分析した。

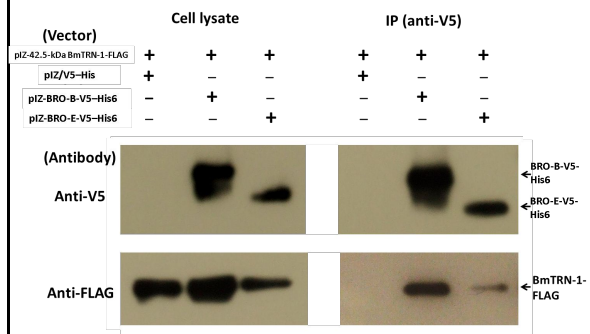
(2) 細胞内タンパク質局在の検出：BmTRN-1 と、BRO-B および BRO-E を発現した細胞をパラフォルムアルデヒドで固定後、RNase 処理とブロッキング処理を行った。それぞれのタンパク質のタグに特異的な蛍光ラベル抗体と細胞を反応させた後、核を TOTO3 により染色した。BmTRN-1 は Cy3 ラベルした anti-FLAG 抗体、BRO タンパク質は FITC ラベルした anti-V5 抗体を用いた。細胞は共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

(3) リポーターアッセイ：培養細胞への BRO タンパク質や BmTRN-1 のトランスフ

ェクションの際に、ルシフェラーゼを発現するプラスミドを検定用のプラスミドの 5% 分だけ細胞にコトランスフェクトした。このレポーター遺伝子には、カイコアクチン A3 の 5' UTR を含むものを用い、また、この配列に第一イントロンを含むものと含まないものを使用した。

(4) カイコ形質転換：BRO ファミリーの一つである BRO-A をコードするプラスミドベクターと、ピギーバックを発現するプラスミドをカイコ発生卵にマイクロインジェクションした。得られる次世代から、ピギーバックの転移配列に含まれるマーカー遺伝子を持つ個体を選抜し、その転移遺伝子を持つ純系個体を得た。この形質転換個体では、BRO-A 遺伝子は UAS プロモーターの制御を受けるようデザインされている。この形質転換個体を、中部絹糸腺で GAL4 を発現する系統と掛け合わせ、マーカー遺伝子による選抜を行い、中部絹糸腺で BRO-A を発現するカイコを得た。このカイコと、後部絹糸腺でピエリシン 1A を発現し、フィブロインをほとんど作らなくなったセリシン繭系統を交配させ、選抜により、転移遺伝子をすべて純系で持つ系統を得た。この得られた交配系統の繭に現れる表現型を調べた。

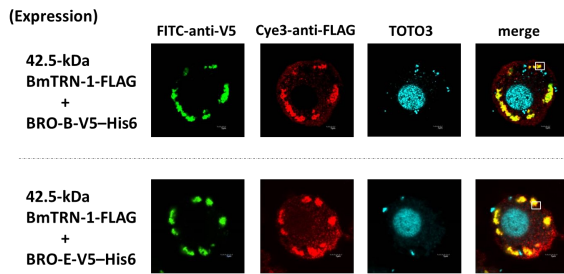
(図 1)



4. 研究成果

(1) BRO ファミリーと BmTRN-1 との関連

BmNPV 感染過程の BM-N 細胞において、BmTRN-1 と関連するタンパク質の候補として BRO-B/E タンパク質が見つかった。この BRO-B/E と BmTRN-1 をともに BM-N 細胞内で発現させ、免疫沈降により両タンパク質間での関連を調べた。その結果、両タンパク質はともに共沈するタンパク質フラクションに含まれることが明らかになった (図 1)。さらに、免疫染色法を実施したところ、それぞれ単独で発現させた BRO-B/E と BmTRN-1 は細胞質に広く分布したが、両タンパク質をともに同時に発現させた場合、BRO-B/E と BmTRN-1 は細胞質の特定の領域に共局在することが判明した (図 2)。これらの結果から、核酸結合タンパク質である両タンパク質は、細胞



(図 2)

質の特定領域で RNA 転写産物と結合してできた凝集体の中に局在するようになることが考えられる。

(2) BRO ファミリータンパク質によるレポータータンパク質発現への影響

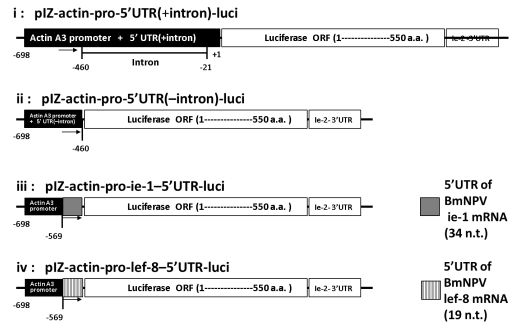
図 3 に示すようなレポーターシフェラーゼを発現するプラスミドを作製し、BRO タンパク質や BmTRN-1 発現プラスミドとともに BM-N 細胞へトランスフェクトした。その結果、対照区 (図 4 カラム 1) に比べ、BRO-B (カラム 2)、BRO-E (カラム 3)、BRO-B/E (カラム 4) を発現させた細胞では、図 3 の (i) にあるイントロンを含むアクチン A3 の 5' 非翻訳領域を持つレポーターシフェラーゼの発現を有意に減少させた (図 4 パネル i)。一方、イントロンの無いアクチンやバキュロウイルス由来の 5' 非翻訳領域を用いた場合には、このような有意な変化は認められなかった。さらに BmTRN-1 の RNAi を発現するプラスミドとともに用いた場合に、図 5 に示されるようにこのような BRO-B/E の効果が弱くなることがわかった。

(3) 絹糸腺における BRO ファミリータンパク質の発現

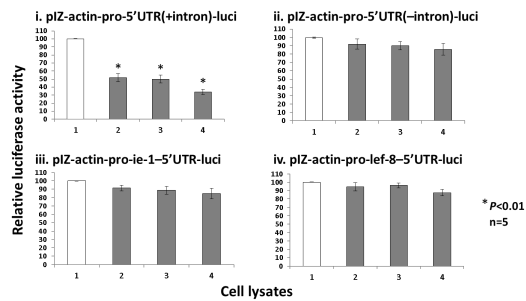
後部絹糸腺においてモンシロチョウピエリシン 1A タンパク質 (P1A) を FibH プロモーターの制御により発現するカイコを作成することに成功した。このカイコの後部絹糸腺においてフィブロイン mRNA の転写量が著しく低下することにより、フィブロイン産生量がほぼ完全に抑制される。このカイコの中後部絹糸腺では異常が見られず、セリシンが通常通り作られて吐き出されるため、このカイコはセリシン繭を産生するようになる。後部絹糸腺で P1A を幼虫期に発現させた場合、後部絹糸腺の組織表面に凹凸を生じる形態異常が認められた。絹糸腺細胞は非増殖性であり、幼虫期の間肥大化成長しかなしいが、P1A の影響でフィブロイン以外にも遺伝子の発現が抑制されることで後部絹糸腺の肥大化成長に異常がでるものと考えられる。

また、BRO ファミリーの中で、BRO-B/E とは異なり、イントロンの無いアクチン 5' 非翻訳領域を持つレポーターシフェラーゼの発現を上昇させる働きを持つことが培養

細胞で示された BRO-A を UAS プロモーターの下流につないだ転移配列を持つカイコを作成した (未発表)。この BRO-A 系統と、中部絹糸腺で GAL4 を発現する系統を掛け合わせた。この中部絹糸腺 BRO-A 発現カイコと後部絹糸腺 P1A 発現カイコを掛け合わせ、純系を得た。得られたカイコはセリシンも含めて、全く繭糸成分は吐き出さなかった (未発表)。この系統のカイコの後部絹糸腺と中部絹糸腺の両方を形態観察したところ、後部絹糸腺のみならず中部絹糸腺にも P1A 発現絹糸腺に特徴的な凹凸を生じる形態異常が観察された。



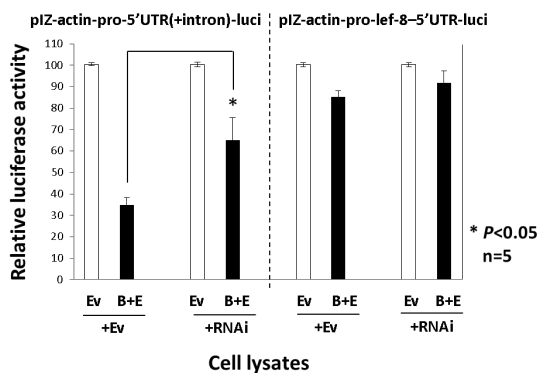
(図 3)



(図 4)

(4) BmNPV BRO ファミリータンパク質のカイコにおける役割

培養細胞を用いた解析から、BRO-B および BRO-E は、カイコ細胞の BmTRN-1 と関連しながら、ともに細胞質の一部に局在するようになり、特定の mRNA からの転写後過程を調節する役割を持つことが示唆される。この実験の中では、標的となる mRNA 配列は 5' 非翻訳領域にあることが考えられる。この両タンパク質が関連しながら、宿主 mRNA の 5' 非翻訳領域内のイントロン配列を認識して mRNA からの翻訳の抑制に関与することも示唆される。さらに、バキュロウイルスの BRO は、宿主の翻訳制御タンパク質と相互関連しながら、感染過程において宿主の mRNA の転写後過程の制御に関わることも示唆される。このような機構は、バキュロウイルスの感染過程



(図5)

で起こる顕著な宿主タンパク質の発現抑制の機構と関連があることも推察される。さらなるレポーターアッセイにより、認識配列の特定が待たれる。

後部絹糸腺でP1Aを発現するようデザインされた遺伝子組換えカイコの中部絹糸腺において、形態異常とセリシン吐出し抑制が起こったのは、中部絹糸腺においてもBRO-Aの働きによりわずかながらP1Aが作用するようになったことを示唆している。すなわち、中部絹糸腺において、BRO-Aの働きにより、もともとわずかに存在したP1A mRNAから、翻訳されるタンパク質量が増大したことも推察される。このことは、生体の組織において、このような翻訳制御を人為的に行えば、P1Aを用いた細胞の機能制御を行うことが可能であることを示唆している。

本研究では、バキュロウイルス感染過程でのmRNA転写後調節過程を明らかにするとともに、生体における組織の機能制御への応用の可能性も見出すことができたと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

[1] Otsuki, R., Yamamoto, M., Matsumoto, E., Iwamoto, S., Sezutsu, H., Suzui, M., Takaki, K., Wakabayashi, K., Mori, H., Kotani, E. Bioengineered silkworms with butterfly cytotoxin-modified silk glands produce sericin cocoons with a utility for a new biomaterial. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. vol.114, in press. DOI/10.1073/pnas.1703449114. (2017).

[2] Yamamoto-Kihara, M., Yukuhiro, F., Yasue, H., Kotani, E., Mori, H.:

Identification of a novel secretory gland producing C-type lectin in the flesh fly, *Sarcophaga peregrina*, and its characterization. Japan Agricultural Research Quarterly 50, 57-62 (2015)

[3] Kotani, E., Muto, S., Ijiri, H., Mori, H.: *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus nucleic acid-binding proteins BRO-B and BRO-E associate with host TIA-1 homolog BmTRN-1 to influence protein synthesis during infection. J. Gen. Virol. 96, 1947-1956 (2015)

[4] Kotani, E., Yamamoto, N., Kobayashi, I., Uchino, K., Muto, S., Ijiri, H., Shimabukuro, J., Tamura, T., Sezutsu, H., Mori, H.: Cell proliferation by silk gut incorporating FGF-2 protein microcrystals. Scientific Reports 5: 11051, DOI: 10. 1038 (2015)

〔学会発表〕(計5件)

[1]小谷英治・大槻亮輔・瀬筒秀樹・高木圭子・森 肇。モンシロチョウサイトトキシンの後部絹糸腺発現によるセリシン蚕の作出とセリシン繭の応用。平成29年度蚕糸昆虫機能利用学術講演会(日本蚕糸学会第87回大会)(2017年3月,つくば市,農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター)。

[2]小谷英治。遺伝子組換え技術によるカイコ絹糸タンパク質の細胞培養基材化技術の開発。公益財団法人京都産業21北部支援センター平成28年度新事業オープンセミナー招待講演(2017年3月,京丹後市,京都産業21北部支援センター)。

[3]Eiji Kotani. Application of modified silk materials for the control of cell proliferation. Seminar on Asia Insect and Biomedical Research 2016 (2016年9月, Chiang Mai city, Chiang Mai University).

[4]大槻亮輔・森 肇・瀬筒秀樹・小谷英治。モンシロチョウ由来ピエリシン遺伝子導入による昆虫細胞および個体組織への影響。平成28年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会(日本蚕糸学会第86回大会)(2016年3月,京都市,京都工芸繊維大学)。

[5]小谷英治・武藤清佳・森 肇。核多角体病ウイルスの BRO タンパク質による宿主タンパク質発現制御。平成 27 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会(日本蚕糸学会第 85 回大会)(2015 年 9 月,札幌市,北海道大学)。

(産業財産権)

出願状況(計 1 件)

名称:ピエリシン1AのADPリボシル化ドメイン遺伝子及びセリシン繭

発明者:小谷英治・大槻亮輔・森 肇

権利者:国立大学法人京都工芸繊維大学

番号:特願 2016-136614

出願年月日:2016/07/11

国内外の別:国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

小谷英治(Eiji Kotani)

京都工芸繊維大学・応用生物学系・

准教授

研究者番号:10273541