

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20580051

研究課題名(和文) 転写産物調節性タンパク質の遺伝子操作による昆虫の分子育種

研究課題名(英文) Molecular characterization of the TIA-1 like RNA binding protein of the silk worm, *Bombyx mori*.

研究代表者

小谷 英治 (KOTANI EIJI)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・准教授

研究者番号：10273541

研究成果の概要(和文)：

カイコの TIA-1 相同性タンパク質 (BmTRN-1) は、RNA 認識領域 (RRM) を有する RNA 結合タンパク質である。BmTRN-1 の発現を人為的に増減させた細胞や個体では、バキュロウイルス感染時のタンパク質発現量に影響が見られた。またウイルス感染の際に、細胞質において BmTRN-1 を含む凝集体の形成も観察された。BmTRN-1 と共沈する因子としてカイコを宿主とする nucleopolyhedrovirus 由来の核酸認識タンパク質が見いだされた。したがって、BmTRN-1 はウイルス由来のタンパク質と相互作用して細胞質凝集体形成に関わるとともに、ウイルスのタンパク質発現量を低下させることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：

BmTRN-1 from the silkworm, *Bombyx mori*, is an RNA-binding protein homologous to mammalian TIA-1/TIAR, that possesses three RNA recognition motifs (RRMs) followed by a C-terminal auxiliary domain. Previous studies showed that the function of the BmTRN-1 is possibly involved in several mechanisms of RNA metabolism including the regulation of transcripts in the *Bombyx* cultured cells. In this study, the RRM2 and RRM1 domain of BmTRN-1 were found to be related to its nuclear export and nuclear accumulation, respectively. Also, Analyses by using the expressed GFP-BmTRN-1 fusion protein in the cells indicated that the BmTRN-1 distribution is drastically changed, and further indicated that the protein is distributed in the cytoplasm and forms aggregate structure, especially when the cells are infected by a baculovirus, *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV). Protein expression level of a BmNPV reporter protein was shown to be altered both by the BmTRN-1-overexpression and BmTRN-1-knockdown in the cultured cells and the transgenic individual tissues. In addition, we found that BmTRN-1 interacts with one of the BmNPV's nucleic acid-binding protein and the C-terminal auxiliary domain of BmTRN-1 is important for its interaction with the viral protein. Thus, it was indicated from these findings that the interaction between BmTRN-1 and the viral protein relates to the possible cellular function of resisting baculovirus proliferation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：昆虫分子生物学

科研費の分科・細目：農学 ・ 応用昆虫学

キーワード：チョウ目昆虫、RNA結合蛋白質、転写産物制御

1. 研究開始当初の背景

すでに昆虫細胞・個体は、天然型に近い有用外来タンパク質を合成させるパイオリアクターとして活用されてきている。従来から、バキュロウイルスベクターの強力なプロモーターが利用される。

カイコ培養細胞を用いた申請者の以前の研究から、RNA結合タンパク質(BmTRN-1)の一時的ノックダウンによって、プラスミドベクターからの外来レポーター遺伝子産物が最大20倍の生産率上昇することが示されていた。

すなわち、転写産物調節性RNA結合タンパク質であるBmTRN-1の働きにより、外来タンパク質の種類によっては転写産物(メッセンジャーRNA)が細胞内で排除されるため、結果として産物タンパク質合成率が低下するケースのあることがわかってきた。

また最近ではBmTRN-1を過剰発現する細胞内で、バキュロウイルス自体の増殖も抑制されることが明らかとなった。ウイルス感染過程でBmTRN-1が細胞質顆粒をつくり、この場所でウイルス転写産物の機能を阻害していることが示された。

BmTRN-1タンパク質の細胞内における具体的な役割として、タンパク質翻訳の鋳型となる転写産物-タンパク質複合体(翻訳複合体)の形成の妨害または安定性制御による転写産物不安定化が考えられる。

BmTRN-1の細胞内標的となるのは、不要化した不適合翻訳複合体や細胞内で不適合性を有するウイルス遺伝子など外来遺伝子由来の翻訳複合体などが考えられる。

2. 研究の目的

昆虫の個体内で転写産物調節性の

BmTRN-1を人為的に抑制することが可能となれば、外来タンパク質生産効率化とウイルス増殖性上昇効果を個体の中で同時に実現できた最適有用タンパク質生産用カイコを作り出すことも可能と考えられる。これまでに生産量の点で問題があった外来タンパク質の生産効率を改善することに貢献することができる。

逆にBmTRN-1や同類タンパク質の過剰発現を起こす操作によってその機能を強化することにより、ウイルス耐性カイコの作出も可能である。したがって、個体の形質転換によるBmTRN-1の継続的なノックダウン操作方法と継続的な過剰発現方法を模索し、その有効性を調べることを課題目標として設定した。課題は以下の通りである。

- ①培養細胞内BmTRN-1の人為抑制および過剰発現が及ぼすウイルス転写産物に対する影響の解析
- ②昆虫個体内におけるBmTRN-1過剰発現およびノックダウンが及ぼすウイルス感染への影響
- ③ウイルス感染過程におけるBmTRN-1相互作用タンパク質の検索

3. 研究の方法

- ①BmTRN-1変異体発現細胞およびBmTRN-1ノックダウン細胞における外来タンパク質生産量

BmTRN-1完全長タンパク質、RNA結合領域に点突然変異を持つ変異体BmTRN-1、C末端タンパク質相互作用領域に変異を持つ変異体BmTRN-1を培養細胞で発現させた。これらの細胞において、発現タンパク質の細胞内分布を調べた。また、BmTRN-1のmRNAに対してRNAi効果を示す配列も細胞内で発現させた。こうした細胞にウイルスベクターを感染させ、このウイルス由来のルシフェラーゼ酵

素の生産量の比較を行った。用いたウイルスベクターはカイコを宿主とする BmNPV であり、その強力なプロモーター制御でルシフェラーゼ酵素を生産する。

②分子育種により作り出した BmTRN-1 過剰発現カイコ個体における外来タンパク質生産

トランスジェニック技術により作り出した育種個体のうち、2代目継代区の幼虫にウイルスベクターを感染させ、ベクター由来のルシフェラーゼ活性の比較検討をおこなった。

③BmTRN-1 ノックダウン絹糸腺における増殖因子の生産

幼虫期絹糸腺において RNAi 法により BmTRN-1 ノックダウンの処理を行った。この絹糸腺におけるウイルスベクター由来の絹糸タンパク質-FGF2 の融合タンパク質 (fibroin-H-FGF2) の生産量を対照区と比較検討した。

④BmTRN-1 と相互作用するタンパク質の検索

アミノ末端に GFP を融合させた BmTRN-1 (GFP-TRN-1) を過剰発現する培養細胞に BmNPV を感染させ、培養後、細胞のタンパク質を可溶化させ、これをセファロース樹脂に固定化させた GFP 抗体と抗原抗体反応させた。緩衝液で洗浄後、樹脂に吸着したタンパク質を電気泳動で解析した。ウイルス感染細胞に特異的に検出された BmTRN-1 相互作用タンパク質についてアミノ酸配列の解析、遺伝子の翻訳可能域の配列解析を行った。見出された遺伝子の産物と BmTRN-1 との相互作用を調べた。

4. 研究成果

① BmTRN-1 変異体発現細胞および BmTRN-1 ノックダウン細胞における外来タンパク質生産量

BmTRN-1 完全長タンパク質およびその変異体を発現する細胞を用いた解析から、このタンパク質は RNA 結合ドメインの働きにより、RNA と結合した状態で核-細胞質間をシャト

リングしているタンパク質であることが判明した。また、RNA 結合領域の中で核内蓄積と核外輸送に関わる領域を見出し、哺乳類 TIA-1 とは異なる輸送機構であると判明した。

一方、C 末端側のドメインを削った変異体を過剰発現する細胞や、RNAi による BmTRN-1 ノックダウン細胞内ではウイルスベクターのルシフェラーゼ活性は対照区に比べて上昇する傾向が見られた。一方、この BmTRN-1 過剰発現細胞において、対照区細胞に比べて BmNPV のルシフェラーゼの生産量が低下することが明らかとなった。さらに、BmTRN-1 過剰発現細胞ではウイルスの感染初期および後期に発現する一部のウイルスタンパク質の mRNA 量が減少することも示された。ウイルス感染過程の BmTRN-1 過剰発現細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、BmTRN-1 の凝集によって作られた明確な構造物が細胞質に現れることが示された。この凝集体構造物は、ウイルスに感染していない細胞ではほとんど出現しなかった。さらに、C 末端に見られるドメインの働きは、細胞内の凝集体構造物を形成する上で重要であることも見出した。このような結果から、カイコ細胞において存在する BmTRN-1 には、ウイルスの転写産物に作用し、細胞内で凝集体を作ることにより転写産物の働きを抑制することが示唆された。この際、RNA 結合領域の働きで分布の変化がおり、また、凝集体形成には C 末端領域が重要な働きを持つことも考えられる。

②分子育種により作り出した BmTRN-1 過剰発現および BmTRN-1 変異体過剰発現カイコ個体における外来タンパク質生産

個体における BmTRN-1 人為操作の影響を見るため、全ての組織・細胞で完全長 BmTRN-1 を強く発現するカイコ個体をトランスジェニック技術で作りに出した。選抜した組換え個体は世代を経ても遺伝的な変化が無いことがわかり、遺伝子組換え操作による致死性も認められなかった。選抜後 2 世代目にウイルスを接種し、ウイルスが生産するルシフェラーゼ活性を対照区と比較した。その結果、検

討した脂肪体や血球細胞でウイルス感染後 4-5 日後に対照区個体よりも低いウイルス由来ルシフェラーゼ活性が検出された。このような結果から、BmTRN-1 を過剰に発現するカイコ個体を用いた場合、同タンパク質を過剰発現する培養細胞と同様にウイルス転写産物の働きの抑制によるウイルスタンパク質生産の抑制も起こることが示された。

③BmTRN-1 ノックダウン絹糸腺における増殖因子の生産

遺伝子組換え技術を用いて、絹糸腺で特異的に BmTRN-1 遺伝子発現の RNAi によるノックダウンが起きるように遺伝子操作したカイコに、ウイルスベクターを感染させた。用いたウイルスは *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus を組換えたものであり、このウイルスベクターの働きにより絹糸腺で fibroin-H-FGF2 が発現するようデザインされていた。この結果、BmTRN-1 ノックダウン処理を施したカイコの絹糸腺において、対照区である BmTRN-1 正常発現個体よりも多量の fibroin-H-FGF2 が生産されていることを確認した。

以上の結果から、培養細胞および個体で RNA 結合タンパク質である BmTRN-1 の発現量を人為的に操作する遺伝子操作や育種が可能であることが明らかとなり、タンパク質生産における転写後調節機構を人為的に操作できることも示された。また、本研究の結果から、ウイルスに対しての抵抗性や感受性についても人為的に操作できることもわかり、こうした遺伝子組換えの操作はウイルスベクターを用いた外来タンパク質発現の宿主としての昆虫の利用性を上昇させるにとどまらず、ウイルスに強いカイコの育種にもつながることが期待される。

④BmTRN-1 がウイルス感染時に相互作用するウイルス由来タンパク質の解析

Bombyx mori nucleopolyhedrovirus (BmNPV) 感染時における BmTRN-1 の役割、および BmTRN-1 と相互作用するタンパク質の役割の解析を行った。BmTRN-1 に関する分子生物学的解析の結果、BmTRN-1 と相互

作用するタンパク質を同定した。BmTRN-1 は平常時には RNA と結合して核一細胞質間をシャトリングしているが、転写産物の構成が劇的に変化するバキュロウイルス感染時に、ウイルス由来の核酸結合タンパク質と相互作用して凝集体を形成することが示された。この核酸結合タンパク質 (bro-b および bro-e) は、ウイルスの転写産物やウイルスゲノムの核一細胞質間輸送に関わることが考えられている。また、この核酸結合タンパク質により翻訳効率の上昇が起きることも示された。さらに、このウイルス核酸結合タンパク質との凝集体形成には BmTRN-1 自身が持つ C 末端の凝集関連ドメインが強く関わっていることが示された。また、BmTRN-1 とウイルス核酸結合タンパク質との相互作用が起っている際に、ウイルスのタンパク質合成量が低く抑えられた。したがって、カイコにおいて BmTRN-1 タンパク質はウイルスの核酸結合タンパク質と相互作用した転写産物と反応すること、次にウイルス核酸結合タンパク質との相互作用により凝集体を作り出すことによって、これら転写産物の機能を抑制する働きを持つと示唆される。

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 4 件)

①Ijiri, H., Nakatani, T., Ido, H., Hamada, N., Kotani, E., Mori, H. : Immobilization of protein kinase C into cypovirus polyhedra. *J. Insect Biotech. Sericol.* 79, 15-20.(2010) (査読有り)

②Ijiri, H., Coulibaly, F., Nishimura, G., Nakai, D., Chiu, E., Takenaka, C., Ikeda, K., Nakazawa, H., Hamada, N., Kotani, E., Metcalf, P., Kawamata, S., Mori, H. : Structure-based targeting of bioactive proteins into cypovirus polyhedra and application to immobilized-cytokines for mammalian cell culture. *Biomaterials* 30, 4297-4308. (2009) (査読有り)

③Muto, S., Matsumoto, E., Tanabe, T., Mori, H., Kotani, E. : Functional analysis of the gene of BmTRN-1, an RNA-binding protein homologous to mammalian TIA-1 from the silkworm, *Bombyx mori*; a study of its overexpression and sub-cellular distribution during the baculovirus infection process. *J. Insect Biotech. Sericol.* 78, 39-51. (2009) (査読有り)

④Muto, S., Tanabe, T., Matsumoto, E., Mori, H., Kotani, E. : Molecular Characterization of a TIA-1 like RNA-binding protein in the cells derived from the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 73, 648-656. (2009) (査読有り)

[学会発表] (計 6 件)

①小谷 英治. ウイルス感染に伴うカイコ TIA-1 相同性タンパク質の細胞内分布変化の解析. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (2010 年 12 月 8 日, 神戸ポートアイランド)

②武藤清佳, 松本恵実, 田辺 徹, 中村 仁, 山本賢二, 森 肇, 小谷 英治. バキュロウイルス感染によるカイコ RNA 結合タンパク質 (BmTRN-1) の局在変化. 平成 22 年度日本蚕糸学会第 80 回記念大会蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 (2010 年 4 月 4 日, 信州大学)

③小谷 英治, 武藤清佳, 森肇 カイコ細胞における TIA-1 様 RNA 結合タンパク質の機能解析. 第 32 回日本分子生物学会年会 (2009 年 12 月 9 日, パシフィコ横浜)

④武藤清佳, 松本恵実, 田辺徹, 森肇, 小谷英治. カイコ細胞における RNA 結合タンパク質 (BmTRN-1) の細胞内分布の解析. 平成 21 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 (2009 年 3 月 23 日, 東京農工大)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小谷 英治 (KOTANI EIJI)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・

准教授

研究者番号 : 10273541

(2) 研究分担者 ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ()

研究者番号 :