

機関番号：12201

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20780035

研究課題名 (和文) Two-hybrid 法による BmMLV の分子応答機構の解明

研究課題名 (英文) Yeast two-hybrid study of BmMLV protein and host protein interactions

研究代表者

岩永 将司 (IWANAGA MASASHI)

宇都宮大学・農学部・准教授

研究者番号：40400717

研究成果の概要 (和文)：カイコ由来培養細胞へ持続感染している *Bombyx mori* macula-like virus の感染メカニズムを明らかにするために、酵母 two-hybrid 法を用い、ウイルスのタンパク質と結合する宿主因子を探索した。その結果、ウイルスのゲノム複製に関与するヘリカーゼタンパク質が、宿主の elongation factor 2 や eIF3 といった各種翻訳開始因子と結合する可能性が示唆された。更に、ウイルスのヘリカーゼ同士が結合する事が示唆された。また、BmMLV の感染性 cDNA クローンの構築に成功した。

研究成果の概要 (英文)： *Bombyx mori* macula-like virus (BmMLV) persistently infects to *B. mori*-derived cell lines. However, the mechanism of virus replication is unknown. To clarify this, yeast two-hybrid screening was performed and showed that the interaction of BmMLV HELICASE and several translational factor of *B. mori*. Also, the screening showed that the dimerization of BmMLV HELICASE. In addition, we developed an infectious full-length cDNA clone of BmMLV.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：ウイルス、培養細胞、持続感染、カイコ、感染性クローン、相互作用、ヘリカーゼ、two-hybrid

1. 研究開始当初の背景

Bombyx mori macula-like virus (BmMLV) は、2005年に発見された新規の RNA ウイルスである。興味深いことに、BmMLV は、鱗翅目昆虫であるカイコ由来培養細胞に特異的に持続感染しているにも関わらず、そのゲノム配列は植物ウイルスであるチモウイルス科マキュラウイルス属の *Grapevine fleck virus* に高い相同性を有す

る。しかしながら BmMLV の由来、及び持続感染メカニズムは全く明らかではない。

そこで、BmMLV の感染メカニズムを明らかにするために、我々はまず一般的な感染実験、並びにウイルスの検出を行うために、BmMLV のコートプロテイン (CP) の抗体を作製した。次に作製した抗体を利用し、種々のカイコ由来培養細胞を調査した結果、試験に供した7種類の培養細胞の全てが既に

BmMLV に持続感染している事が明らかとなった(図1)。そこで2007年、我々はカイコ胚より、新しく BmMLV フリーの培養細胞 BmVF 細胞を樹立した。感染実験の結果、BmVF 細胞は、BmMLV の持続感染を許容することが明らかとなり、本細胞によって BmMLV の感染実験系を構築することができた。

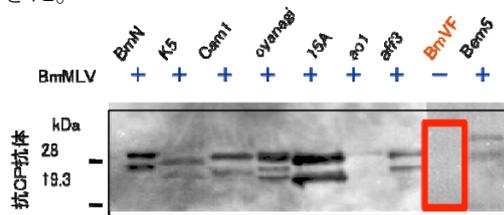


図1. カイコ由来各種培養細胞における BmMLV の感染調査の結果。新たに樹立した BmVF (赤枠) 細胞以外の全てでウイルスのコートプロテインシグナルが検出された。

一方で、宿主へ何ら病徴を呈することが無い、このような持続感染メカニズムにおいては、ウイルスがどのように宿主を制御し、或いは宿主側の生体防御機構を回避しているのか非常に興味深い。特に、ウイルスのゲノム複製はウイルスの増殖における要であり、ゲノム複製に関与するウイルス側のタンパク質が、どのような宿主側のタンパク質と結合して機能するのは、本ウイルスに限ったことではなく、このような持続感染型のウイルスという点で興味深い。

このような背景のもと、酵母 two-hybrid 法による、BmMLV のゲノム複製酵素に結合する宿主タンパク質のスクリーニング、及び、BmMLV の感染性クローンの構築に取り組むこととした。

2. 研究の目的

本研究では、BmMLV の持続感染メカニズムを明らかにすることを目的とし、BmMLV のゲノム複製酵素である RNA replicase 内に存在する HELICASE 領域が、どのような宿主タンパク質と結合するか、酵母 two-hybrid 法によって明らかにする。本研究によって、BmMLV のゲノム複製がどのようなメカニズムで宿主と相関するのか、その実像が明らかになるものと考えられる。

次に、BmMLV のコードする各遺伝子産物間の相互作用についても酵母 two-hybrid 法によって検証する。その結果、どのようなウイルス由来タンパク質同士がホモダイマー、或いはヘテロダイマーを形成しているのが明らかとなるものと考えられる。

更に本研究では、BmMLV の各種遺伝子の機能解析を目的として、感染性完全長 cDNA クローンの構築に取り組む。本感染性クローンの構築によって、当該遺伝子の欠損や機能

欠失が可能となり、上述の two-hybrid によってスクリーニングされた宿主タンパク質とのより詳細な相互作用解析が可能となると考えられる。

3. 研究の方法

酵母 two-hybrid は、インビトロジェン社の ProQuest Two-hybrid System を使用した。Bait には BmMLV の HELICASE 領域をクローニングし、Prey には BmMLV が持続感染しているカイコ卵巣由来培養細胞 BmN から構築した cDNA ライブラリーを用いた。スクリーニング過程では、栄養選択や 3AT の添加を行い、最終的に HELICASE 領域に結合すると考えられる宿主クローンを X- α -Gal によって発色することでスクリーニングを行った。

一方で、BmMLV の遺伝子産物間の相互作用の解析においては、BmMLV のメルトランスフェラーゼ領域、HELICASE 領域、RNA ポリメラーゼ領域、コートプロテイン、P15 の5つの遺伝子に関し、それぞれを Bait、Prey ベクターへ挿入し、Two-hybrid 法によるスクリーニングを行った。それぞれの結合能は、X- α -Gal によって調査した。

BmMLV の感染性クローンの構築に関しては、BmMLV の完全長 cDNA をまずクローニングし、本 cDNA をカイコ培養細胞において活性を有するショウジョウバエヒートショックプロモーターと、SV40 ターミネーターの間に挿入した plasmid DNA を構築する。構築した plasmid DNA を既に樹立した BmMLV フリー培養細胞へトランスフェクションにより導入し、導入後、新たなウイルス粒子が構築・放出されるかどうか観察することとした。

4. 研究成果

BmMLV のゲノム複製酵素の HELICASE 領域に結合する宿主因子の探索を、酵母 two-hybrid 法によって行った結果、最初の prey ライブラリーの形質転換の段階で、5000 個のコロニーを得ることができた。その後、栄養選択、3-AT によるスクリーニングを進め、最終的に X- α -Gal による発色試験を行った結果、6つのポジティブクローンを得ることができた(図2)。これらのクローンのシーケンス解析を行った結果、これらは translation elongation factor 2, eukaryote initiation factor 3, proteasome subunit β 5, heat shock cognate 70, ribosomal protein S17, ribosomal protein L6 であり、その多くがタンパク質の翻訳や恒常性に関連するものであることが明らかとなった。これらの結果は、BmMLV のゲノム複製酵素がウイルスのゲノム複製、特に転写産物を効率良く宿主リボソームで翻訳する機構を示唆するものかも知れない。現在、これらのポジティブクローンが本当にウイルスの HELICASE 領域に結合する

かどうか、Bait と Prey を逆に挿入したベクターを構築し、確認実験を進めている。

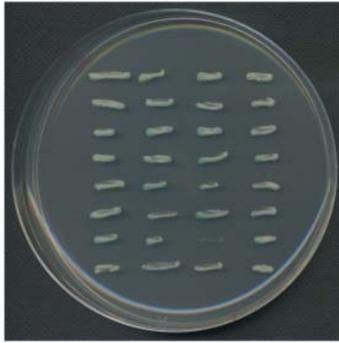


図2. 酵母 two-hybrid で得られたポジティブクローンのコロニー

次に、BmMLV の遺伝子産物同士の相互作用を確認するため、BmMLV の全遺伝子（ゲノム複製酵素のメルトランスフェラーゼ領域、HELICASE 領域、RNA ポリメラーゼ領域、コートプロテイン、P15 の5つ）を Bait、Prey のそれぞれにクローニングし、それぞれの結合能を酵母 Two-hybrid により調査した。その結果、特に HELICASE 領域同士の結合が示され、また HELICASE と RNA ポリメラーゼの結合についても示唆された（表1）。これらの結果は、BmMLV の HELICASE がホモダイマー、或いは RNA ポリメラーゼとヘテロダイマーを形成することで機能を果たしていることを示唆するものであった。

表1. BmMLV 各遺伝子間の相互作用の結果

Prey \ Bait	MTR	HELI	RdRp	cp	p15
MTR	-	+	+	-	++
HELI	++	++	-	-	-
RdRp	++	++	+	-	-
cp	+	-	-	-	-
p15	-	-	-	-	-

++・・・高レベルの発現が認められた
 +・・・発現が認められた
 -・・・発現が認められない

更に、BmMLV の感染性クローンを構築することを目的として、BmMLV の完全長 cDNA をク

ローニングし、ショウジョウバエヒートショックプロモーターと SV40 ターミネーターの間に挿入した plasmid DNA を構築した (pHMLV ; 図3)。構築した pHMLV を BmMLV フリーである BmVF ヘリポフェクチンによって導入した結果、BmMLV のコートプロテインの産生が確認された。更に、この際のコンドিশョンメディウムを回収し、再度 BmVF 細胞へ感染実験した結果、再びウイルスのコートプロテインの産生が確認されたことから、pHMLV が新たなウイルス粒子に成り得る、感染性クローンであることが示された（図4）。一般に RNA ウイルスの研究においては、各遺伝子の機能解析のために、遺伝子の欠損や機能欠失といった変異導入実験をすることが多い。その際、感染性 cDNA クローンを利用することで、容易にウイルスゲノムへの変異導入が可能となり、これはリバースジェネティクス法と呼ばれている。BmMLV が属する植物ウイルスであるマキュラウイルス属では感染性クローンの構築は未報告であり、本研究の成果はマキュラウイルス属で初めての感染性クローンの構築となる。

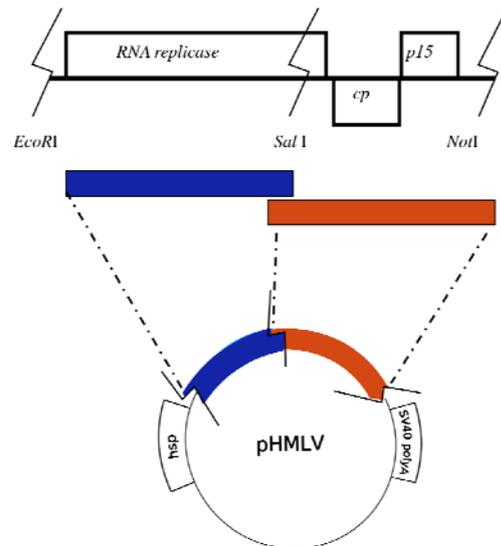


図3. BmMLV の完全長 cDNA の構築

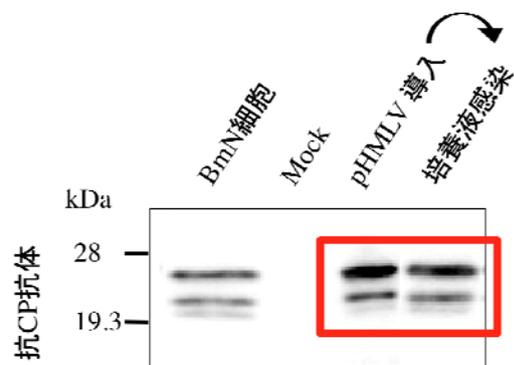


図4. pHMLV 導入による BmMLV CP の産生

今後は本研究によって示された、ウイルスタンパク質と相互作用する宿主因子に関し、構築した感染性クローンを駆使したリバースジェネティクスによって、機能解析を進めていく予定である。

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)

[学会発表] (計6件)

1. 石原玄基、印南克久、勝間進、松田典子、嶋田透、今西重雄、姜媛瓊、川崎秀樹、岩永将司「*Bombyx mori* macula-like virusの増殖メカニズム、及び宿主との分子応答機構の解析」日本蚕糸学会第80回学術講演会、2010年4月3日、長野県上田市信州大学繊維学部

2. 石原玄基、一ツ山知行、勝間進、今井典子、嶋田透、今西重雄、姜媛瓊、川崎秀樹、岩永将司「Detection of *Bombyx mori* macula-like virus by RT-PCR and analysis of virus-host interaction by yeast two-hybrid screening」第32回日本分子生物学会年会、2009年12月、神奈川県横浜市パシフィコ横浜

3. 石原玄基、一ツ山知行、勝間進、今井典子、嶋田透、今西重雄、姜媛瓊、川崎秀樹、岩永将司「ウイルスフリー細胞と感染性クローンをを用いたBmMLVの解析」第60回日本蚕糸学会関東支部大会、2009年11月17日、栃木県宇都宮市宇都宮大学

4. 石原玄基、一ツ山知行、上妻峻、奥田寛子、勝間進、嶋田透、今西重雄、川崎秀樹、岩永将司「BmMLVの感染性完全長cDNAクローンの構築」日本蚕糸学会第78回学術講演会、2009年3月、東京都府中市東京農工大学

5. 一ツ山知行、石原玄基、上妻峻、奥田寛子、勝間進、嶋田透、今西重雄、川崎秀樹、岩永将司「完全長cDNAプラスミドを用いたBmMLVの解析」日本蚕糸学会関東支部第59回学術講演会、2008年11月、茨城県つくば市国際会議場

6. 岩永将司「カイコ由来培養細胞へ慢性感染するBmMLVの解析」第8回昆虫病理研究会シンポジウム、2008年9月、山梨県富士吉田市人材開発センター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩永 将司 (IWANAGA MASASHI)

宇都宮大学・農学部・准教授

研究者番号：40400717