

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 29 日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657076

研究課題名（和文） 有害赤潮の終息を司る海洋天然ウイルスの宿主認識機構の解明

研究課題名（英文） Specific host recognition mechanisms of marine virus, a dinoflagellate-infecting virus

研究代表者

和田 啓 (WADA KEI)

宮崎大学テニユアトラック推進機構・助教

研究者番号：80379304

研究成果の概要（和文）：微細藻類の大量増殖により引き起こされる赤潮は、しばしば水産資源に危機的な被害を与える。近年、有害赤潮原因藻ヘテロシグマに感染する海洋天然ウイルス HaV が単離され、その諸性質が明らかにされた。驚くべきことに、HaV の宿主特異性は極めて高く、ヘテロシグマの株の違いまでも識別して感染するという機構を備えていた。本研究では、その特異的に宿主認識に関与する Vp183 蛋白質の性状解析を目的に、大量発現系の構築を行った。

研究成果の概要（英文）：*Heterosigma akashiwo* virus (HaV) is a large virus specifically infecting the harmful bloom-forming flagellate *Heterosigma akashiwo*. Based on field surveys and cross-reactivity tests between the host clones and HaV clones, suggesting that this strain-dependent infection may play an important role in determining the clonal composition and maintaining the intraspecies diversity of natural *H. akashiwo* populations. In this study, to elucidate the mechanism of the specific host infection, the Vp183 protein, the specific host recognition protein, was overproduced.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：分子認識および相互作用

1. 研究開始当初の背景

これまでの赤潮に関する分子生態学研究により、その発生原因や原因生物、環境要因に関する様々な知見が蓄積されてきた。有害赤潮の代表種として知られる *Heterosigma akashiwo* (以下ヘテロシグマ) は、初夏に異常増殖することで濃密(40万細胞/ml)な有害赤潮を引き起こし、水産資源に甚大な被害を与える。その後、赤潮は突如として終息することが知られている。この赤潮消滅(崩壊)現象には、海洋ウイルスが深く関与するとい

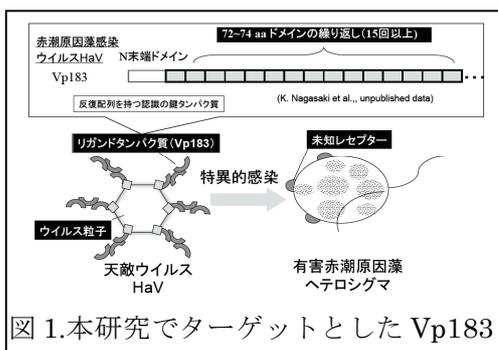
う重大な事実が明らかになった。さらに、ヘテロシグマに特異的に感染・殺菌する天然のウイルス HaV が発見・同定され、このウイルス感染が赤潮の終息を支配していることが解明された。注目すべきは、HaV はヘテロシグマの株の違いまでも識別して感染するという極めて厳密な宿主特異性を持つことである。植物ウイルスのブロードな感染特性を踏まえると、宿主の株の差異まで識別する特異性は驚きである。

2. 研究の目的

近年、有害赤潮原因藻ヘテロシグマに感染する海洋天然ウイルス HaV が単離され、その諸性質が明らかにされた。驚くべきことに、HaV の宿主特異性は極めて高く、ヘテロシグマの株の違いまでも識別して感染するという機構を備えていた。この厳密な感染特異性は、ウイルス粒子と宿主表面のレセプターとの特異的な相互作用に基づいている。本研究では、宿主認識の鍵タンパク質 (Vp183) をターゲットとし、特異的感染の分子機構を解き明かすことを最終目標としている。宿主特異的な感染メカニズムの全容解明は、これらの知見に基づいた赤潮駆除技術の基盤構築に大きく貢献することが期待される。

3. 研究の方法

本研究では、HaV のゲノム配列 (全配列決定途上) の検索から見出された反復配列をもつ Vp183 に着目した。このタンパク質はウイルス表面に局在しており、宿主結合に関与していること予想している。HaV の宿主認識を司ると予想している鍵タンパク質 Vp183 は、N 末端ドメインと約 74 アミノ酸を一つのモチーフとする 15 以上の繰り返しを持つ。複数ドメインを持つこの鍵タンパク質は、200 kDa 以上のフレキシブルな巨大単一ポリペプチドとなることが予想され、結晶化には不向きである (図 1)。そこで本研究では、まず N 末端ドメインおよび繰り返しモチーフを一個〜数個持つタンパク質の構造・機能解析を目指す。既に、大腸菌による発現ベクターを構築し、微量ながらも Vp183 ドメイン (一つ分) を得ている。平成 23 年度には、vp183 遺伝子中に含まれるレアコドン配列の改変 (全遺伝子人工合成) により、収量の改善を試みる。さらに、複数個のドメインをタンデムに連結させた蛋白質の発現系も構築する。これと並行して結晶化スクリーニングを進める。機能解析に向けて、この鍵タンパク質の繰り返しドメインを認識するポリクローナル抗体を作製する。



4. 研究成果

(1) 大腸菌での Vp183 発現

① Vp183 ドメインの発現

HaV の宿主認識を司ると予想している鍵タンパク質 Vp183 は、N 末端ドメインと約 74 アミノ酸を一つのモチーフとする 15 以上の繰り返しを持つ。複数ドメインを持つこの鍵タンパク質は、200 kDa 以上のフレキシブルな巨大単一ポリペプチドとなることが予想される。そこで、この繰り返し領域を一個または二個のコンストラクトを作製し、様々な大腸菌ホストを用いて発現実験を行った。ここでは、大腸菌発現ベクターとして常用される pET 系ベクターの他に、低温誘導を可能とする pCold ベクターも用いた。Vp183 遺伝子を挿入したベクターを大腸菌内に形質転換し、様々な培養温度、誘導条件を試みたが、いずれの発現系においても Vp183 の発現は見られなかった。

② Vp183 反復配列の改変

Vp183 をコードする遺伝子には、大腸菌におけるレアコドンが多数含まれていた。これが、大腸菌で Vp183 蛋白質が発現しない根本的な理由と考えられたため、vp183 コード遺伝子の全配列を合成した。この人工合成遺伝子を用いて発現を試みた。さらに、可溶性タグとして知られる GST との融合蛋白質としての発現も試みた。その結果、遺伝子を改変し、さらに GST と融合されることによって、可溶性蛋白質として Vp183 を初めて得ることに成功した。さらに、GST を利用して精製し、プロテアーゼを用いて融合蛋白質を消化したところ、Vp183 のみのバンドを純度良く得ることができた。ただ、一回の精製で得られる Vp183 が数マイクログラムと少なく、更なる発現・精製系の改善を必要とすることがわかった。

(2) 昆虫細胞および酵母での Vp183 発現
発現量の改善を目指し、昆虫細胞および酵母での Vp183 発現を進めた。それぞれの発現ベクターに遺伝子配列を改変した vp183 遺伝子を挿入し、発現系を構築した。昆虫細胞発現において微量ながら Vp183 を得ることができたが、大腸菌を用いた系の方がより多くの Vp183 蛋白質が得られることがわかった。

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)

(1) Wada, K., Kimura, K., Hasegawa, H., Fukuyama, K. and Nagasaki, K. Establishment of a Bacterial Expression System and Immunoassay Platform for the Major Capsid Protein of HcRNAV, a Dinoflagellate- Infecting RNA Virus. *Microbes Environ.* 査読有、27, 483-489 (2013).

(2) Ho T.V, Kamei, K. Wada, K., Fukuyama, K. and Suzuki, H. Thermal denaturation and renaturation of γ -glutamyltranspeptidase of *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有、77, 409-4012 (2013)

(3) Inoue, T., Yoshida, Y., Wada, K., Daifuku, T., Fukuyama, K., Sako, Y. A simple, large-scale overexpression method of deriving carbon monoxide dehydrogenase II from the thermophilic bacterium *Carboxidotherrmus hydrpgeformans*. *Biosci. Biotech. Biochem.*、査読有、75, 1382-1394 (2011)

(4) Kameda, H., Hirabayashi, K., Wada, K., Fukuyama K. Mapping of protein-protein interaction sites in the plant-type [2Fe-2S] ferredoxin. *PLoS ONE*, 査読有、e21947 (2011)

[学会発表] (計10件)

(1) Tanaka, E, Hasegawa, A., Kimura, K., Nakaniwa, T., Tomaru, Y, Fukuyama, K., Nagasaki, K., Wada, K. Preliminary X-ray diffraction analysis and establishment of the immunoassay platform of the dinoflagellate-infecting marine virus HcRNAV. The Asian Crystallographic Society and the Society of Crystallographers in Australia and New Zealand, 2012年12月2日~2012年12月5日、Adelaide Convention Centre (オーストラリア アデレード)

(2) 長谷川昭文、木村圭、外丸裕司、長崎慶三、福山恵一、和田啓. 有害赤潮原因藻に感染するウイルスHcRNAV粒子の結晶学的研究および特異的抗体の性状解析. 日本結晶学会平成24年度年会、2012年10月25日~2012年10月26日、東北大学片平キャンパス.

(3) 長谷川昭文、木村圭、外丸裕司、福山恵一、長崎慶三、和田啓. 有害赤潮原因藻に感染するウイルスHcRNAVの精製と結晶化、第12回蛋白質科学会年会、2012年06月20日~2012年06月22日、名古屋国際会議場.

(4) 木村 圭、和田 啓、長谷川昭文、福山恵二、外丸裕司、長崎慶三. 有害渦鞭毛藻ヘテロカプサに感染する HcRNAV を検出する抗体の開発と実用性の検証. 平成 24 年度日本水産学会春季大会, 平成24年3月29日, 東京海洋大学品川キャンパス

(5) Wada K. Structural biology of the SUF machinery involved in de novo iron-sulfur cluster biosynthesis. 4th FEBS Special Meeting, ATP-Binding Cassette Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases, 平成24年3月4日、Hotel Grauer Bar (オーストリア インスブルック)

(6) Wada K., Hagiwara Y., Fukuyama, K. One residue substitution in PcyA leads to unexpected changes in tetrapyrrole substrate binding. XXII Congress and General Assembly International Union of Crystallography, 平成 23 年 8 月 27 日, Palacio Municipal de Madrid(スペイン マドリード)

(7) Hirabayashi, K., Takahashi, Y., Fukuyama, K., Wada, K. Crystallographic analyses of the ISC proteins involved in de novo Fe-S cluster biogenesis. XXII Congress and General Assembly International Union of Crystallography, 平成23年8月27日, Palacio Municipal de Madrid(スペイン マドリード)

(8) 和田啓、萩原義徳、入川鉄平、油谷裕子、福山恵一. フェレドキシン依存的ビリル還元酵素PcyA変異体-ビリベルジン複合体の構造解析. 第84回日本生化学会大会. 平成23年9月22日、国立京都国際会館

(9) 長谷川昭文、田中悠喜、外丸裕司、長崎慶三、福山恵一、和田啓. 有害赤潮原因藻に感染するウイルスHcRNAV粒子の結晶学的研究. 第61回日本結晶学会年会、平成23年11月24日、北海道大学

(10) 平林佳、岩永朋子、高橋康弘、福山恵一、和田啓. 超好熱菌*Aquifex aeolicus*の鉄硫黄クラスター生合成に関わる脱硫黄酵素

IscSの構造解析. 第11回日本蛋白質科学会
年会、平成23年6月7日、ホテル阪急エキスポ
パーク.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.cc.miyazaki-u.ac.jp/keiwada/
index.htm](http://www.cc.miyazaki-u.ac.jp/keiwada/index.htm)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 啓 (WADA KEI)

宮崎大学テニユアトラック推進機構・助教

研究者番号: 80379304

(2) 研究分担者

福山 恵一 (FUKUYAMA KEIICHI)

大阪大学大学院理学研究科・教授

研究者番号: 80032283