

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 6 月 10 日現在

機関番号： 36102
研究種目： 若手研究（B）
研究期間： 平成 23～24 年
課題番号： 23780051
研究課題名（和文） 蜂群崩壊症候群の原因候補ウイルスにおける構成遺伝子の
立体構造解析と機能解析
研究課題名（英文） Structural and functional analyses of capsid protein and RNA polymerase
in the candidate virus for honeybee colony collapse disorder
研究代表者
畠山 大（HATAKEYAMA DAI）
徳島文理大学・薬学部・薬学科 講師
研究者番号： 20514821

研究成果の概要（和文）：本研究ではミツバチ失踪（蜂群崩壊症候群）の原因の一つと考えられるウイルス IAPV に着目し、ウイルスを構成する殻タンパク質と RNA 合成酵素の組換えタンパク質を合成して、機能解析と立体構造解析を目的とした。殻タンパク質を構成する 4 種類のサブユニットのうち、複数種のタンパク質の組み合わせの共発現により、水溶性タンパク質として得ることができた。これらのタンパク質を用いて、殻タンパク質と相互作用するミツバチ由来因子の探索を行った結果、ミツバチの脳に含まれる 55 kDa と 100 kDa のタンパク質、および消化管に含まれる 100 kDa のタンパク質が検出され、IAPV の殻タンパク質と結合する候補因子であると予想された。RNA 合成酵素は 6 分割した部分組換えタンパク質の発現を行った。その結果、2 つの部分組換えタンパク質を溶出させることに成功した。今後はこの部分組換えタンパク質と相互作用するミツバチ由来因子を探索する。

研究成果の概要（英文）： Colony Collapse Disorder (CCD) is a serious problem threatening the health of honeybees and the economic stability of commercial beekeeping and pollination operations in the world. In this study, we focused on Israeli Acute Paralysis Virus (IAPV), which is considered as a candidate reason for CCD, and challenged to investigate the structure and function of the capsid protein and the RNA polymerase in IAPV. Recombinant proteins of the capsid proteins were expressed, solubilized and purified by combinational expression of 2 or 3 kinds of subunit proteins. Next, we found 2 proteins, which seemed to interact with these recombinant capsid protein subunits, from honeybee brains and guts. Two of 6 partial recombinant proteins of RNA polymerase was successful for expression and solubilization. We will try to isolate the proteins in honeybee tissues which interact with these recombinant proteins.

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	2,100,143	630,000	2,730,143

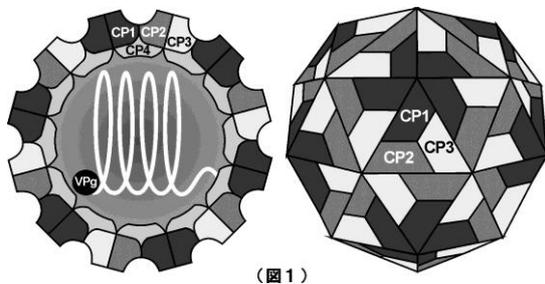
研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：昆虫病理

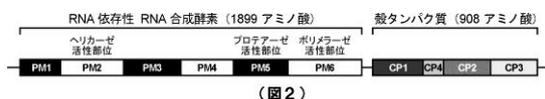
1. 研究開始当初の背景

近年、世界各地でセイヨウミツバチ *Apis mellifera* が失踪する蜂群崩壊症候群 (Colony Collapse Disorder: CCD) が確認されている。ミツバチは農作物の受粉に必要な家畜であり、これらの収穫に大きな被害を及ぼすことが懸念される。CCDの原因として様々な要因が挙げられるが、実際にはそれらが複合的に関与していると考えられる。そして、最近の研究により、CCDを発症した巣箱のおよそ96%からイスラエル急性麻痺ウイルス (Israeli acute paralysis virus: IAPV, 図1) が検出され、アメリカのいくつかの州ではこのウイルスをCCDのマーカーであるとの見解が示された。



(図1)

IAPVは主に昆虫類に感染するDicistrovirus科に分類される。IAPVに感染したミツバチは体が麻痺し、巣の外部で死に至る。IAPVのゲノムはプラス鎖の一本鎖RNAであり、RNAゲノムの複製やmRNAの転写を行うRNA合成酵素と、ウイルス粒子を構成する殻タンパク質のみがコードされる(図2)。これまでの研究により、RNA合成酵素と殻タンパク質の一次構造は解明されている。RNA合成酵素は始めに1899個のアミノ酸からなるポリペプチドとして合成され、プロテアーゼによって9~12個ほどに切断後、それぞれがサブユニットとしてRNA合成酵素を構築すると考えられる。一次構造から、ヘリカーゼ活性、プロテアーゼ活性、RNA合成活性の部位を持つことが予想されている。殻タンパク質も同様に、908個のアミノ酸のポリペプチドとして合成された後、プロテアーゼによりCP1からCP4の4個に分断され、各々が相互作用してウイルス粒子を構築すると考えられる。そして、殻タンパク質の何らかの立体構造によって侵入するミツバチの細胞を認識し、感染に導くことが予想される。



(図2)

2. 研究の目的

IAPVが独自に持つタンパク質はRNA合成酵素と殻タンパク質の2種類だけであるため、これらにはウイルスがミツバチの生体内で増殖するために、ミツバチの遺伝子やタンパク質を利用する巧妙なメカニズムが備わっていることが予想される。しかし、現在までにRNA合成酵素および殻タンパク質の一次構造までしか解明されておらず、また機能部位の存在が示唆されてはいるものの、立体構造や機能の詳細な解析には至っていない。そのため、IAPVの感染やミツバチ生体内での増殖のメカニズムはほとんど明らかにされていないままである。そこで、本研究では、IAPVの感染と増殖の分子機構を解明することを目的とし、RNA合成酵素と殻タンパク質の立体構造解析、および生化学的・生理学的な機能解析を行う。

3. 研究の方法

① IAPVのRNA合成酵素と殻タンパク質の組換えタンパク質の発現

まずIAPVのRNA合成酵素と殻タンパク質のクローニングを行った。RNA合成酵素のクローニングは、RNA合成酵素は非常に分子量の大きいタンパク質であるため、大腸菌で発現可能なサイズに分断して、これらをPM1からPM6と命名し、6種類の部分組換えタンパク質を作製した(図2)。PM2, PM5, PM6の部分タンパク質には、それぞれヘリカーゼ活性、プロテアーゼ活性、RNA合成活性が含まれると予想される。また、殻タンパク質は既にプロテアーゼによる切断部位が解析されているので、CP1からCP4までの4つのサブユニットを別個にクローニングした。これらのタンパク質はサイズが30-40 kDaであるため、大腸菌を用いて組み換えタンパク質の発現を行った。

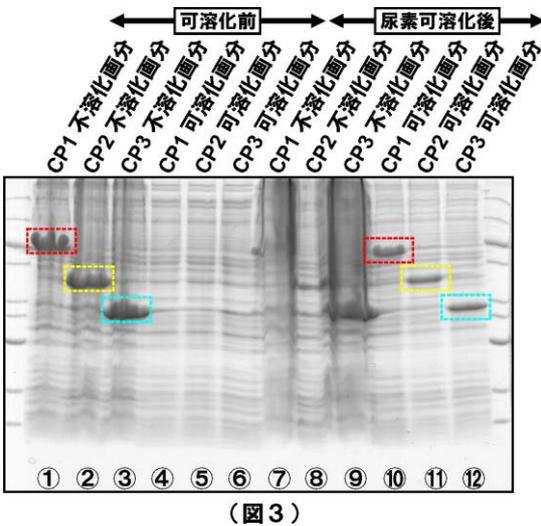
② RNAポリメラーゼおよび殻タンパク質と相互作用するミツバチ由来タンパク質の探索

Far-Western Blotting法により、RNAポリメラーゼや殻タンパク質と相互作用するミツバチ由来タンパク質を探索した。IAPVの感染源と考えられるミツバチの脳および消化管を摘出してホモジナイズし、SDS-PAGEで分離した。これに精製した殻タンパク質の組換えタンパク質を反応させ、殻タンパク質のサブユニット特異的な抗体で検出を行った。

4. 研究成果

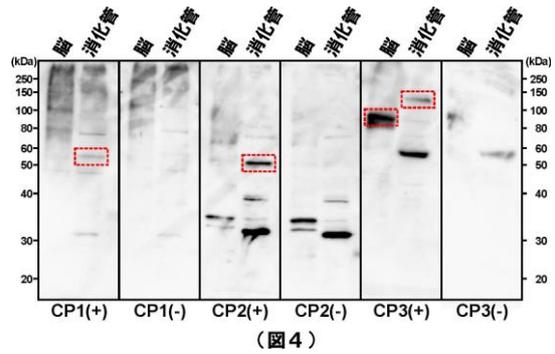
① 殻タンパク質の組換えタンパク質の発現とミツバチ由来相互作用因子の探索

始めに、殻タンパク質の組換えタンパク質を作製した。殻タンパク質を構成する CP1 から CP4 までの 4 種類のサブユニットの組換えタンパク質を個別に発現させた。その結果、CP1, CP2, CP3 は発現に成功したが、界面活性剤 NP40 では不溶化した (図 3, レーン①~③)。また、CP4 は発現させることができなかった。そして、尿素を用いることにより、CP1 から CP3 の組換えタンパク質を可溶化することに成功した (図 3, レーン⑩~⑫)。



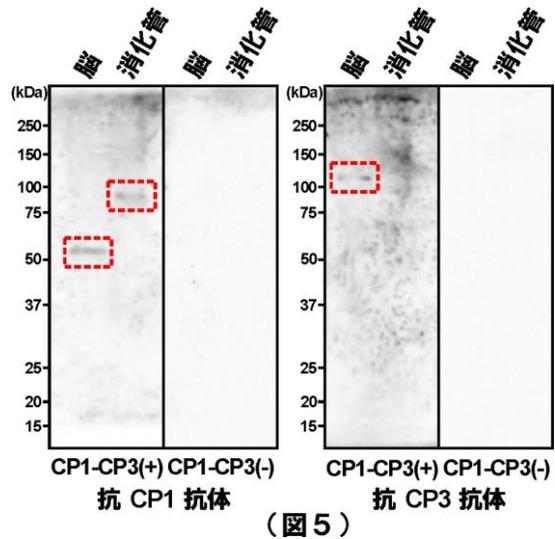
(図 3)

次に、これらの組換えタンパク質を用いて Far-Western Blotting を行い、殻タンパク質と相互作用するミツバチ由来のタンパク質の探索を行った。ミツバチの組織としては、脳と消化管を選択した。IAPV 感染によりミツバチの行動に支障を来すことから、脳が主要な感染源の一つであると考えられ、また、ミツバチが蜜を口移しすることから、消化管を介してウイルスが伝播すると考えたのが、脳と消化管を用いた理由である。実験の結果、ミツバチの脳に含まれる約 55 kDa のタンパク質が CP1 および CP2 と反応させたサンプルで検出された (図 4)。また、CP3 と反応させた実験群では、脳に含まれる約 100 kDa のタンパク質、および消化管に含まれる約 150 kDa のタンパク質が検出され (図 4)、IAPV の殻タンパク質と結合する候補因子であると予想された。そして、これらのタンパク質が、IAPV がミツバチの脳および消化管に感染するための受容体タンパク質であることが示唆された。



(図 4)

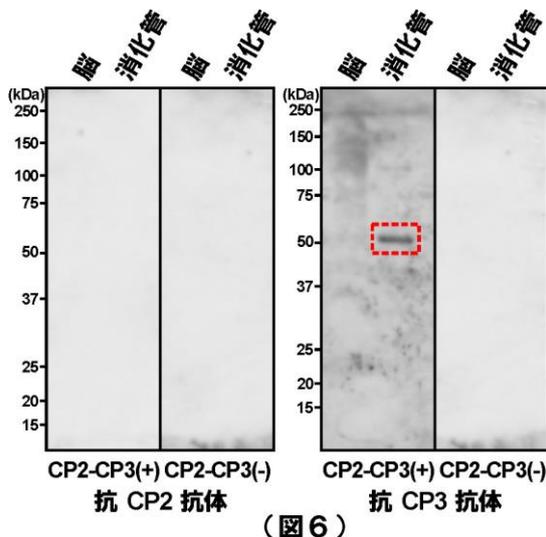
本来、殻タンパク質は各サブユニットタンパク質が結合した状態にある。そこで、CP1 と CP2, CP1 と CP3, CP2 と CP3 の組み合わせで共発現を行った。その結果、CP1 と CP3, CP2 と CP3 の組み合わせで組換えタンパク質の可溶化に成功した。CP1-CP3 共発現組換えタンパク質を用いて Far Western blotting を行った結果、抗 CP1 抗体を用いた際には脳での約 55 kDa と消化管での約 90 kDa のタンパク質が、抗 CP3 抗体を用いた際には脳での約 110 kDa のタンパク質が検出された (図 5)。



(図 5)

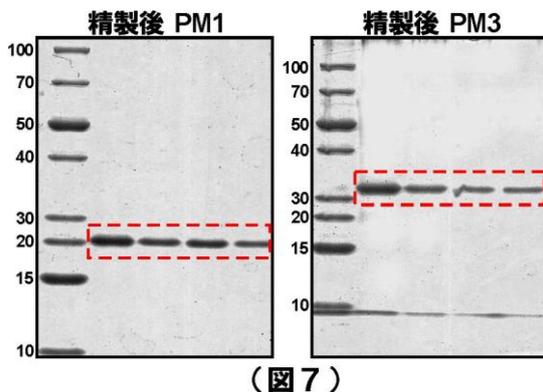
次に、CP2-CP3 共発現組換えタンパク質を用いて Far Western blotting を行った結果、抗 CP3 抗体を用いたときにのみ脳での約 55 kDa のタンパク質が検出された (図 6)。

今後は、液体クロマトグラフィー質量分析法 LC-MS/MS を用いて、これらのタンパク質を同定していく予定である。



② RNA 合成酵素の組換えタンパク質の発現

RNA 合成酵素は 6 分割した部分組換えタンパク質の発現を行った (図 2)。可溶化に界面活性剤サルコシンを用いた結果、PM1 と PM3 の 2 つの部分組換えタンパク質を可溶化させることに成功した (図 7)。今後はこの部分組換えタンパク質の精製を行い、Far Western blotting を行って相互作用するミツバチ由来因子を探索する。



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)

- Hiasa M, Kurokawa M, Ohta K, Esumi T, Akita H, Niki K, Yagi Y, Echigo N, Hatakeyama D, Kuzuhara T. (2013) Identification and purification of resorcinol, an antioxidant specific to Awa-ban (pickled and anaerobically fermented) tea. *Food Research International*. In press.
- Shoji M, Takahashi E, Hatakeyama D, Iwai Y, Morita Y, Okutani T, Echigo N, Kido H,

Nakamura S, Mashino T, Kuzuhara T. (2013) Anti-influenza activity of C60 fullerene derivatives. *PLoS One*. In press.

- Hatakeyama D, Okuta A, Otsuka E, Lukowiak K, Ito E. (2013) Consolidation of long-term memory by insulin in *Lymnaea* is not brought about by changing the number of insulin receptors. *Communicative & Integrative Biology*, 6: e23955.
 - Murakami J, Okada R, Sadamoto H, Kobayashi S, Mita K, Sakamoto Y, Yamagishi M, Hatakeyama D, Otsuka E, Okuta A, Sunada H, Takigami S, Sakakibara M, Fujito Y, Awaji M, Moriyama S, Lukowiak K, Ito E. (2013) Involvement of insulin-like peptide in long-term synaptic plasticity and long-term memory of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Journal of Neuroscience*, 33: 371-383 (Cover illustration of this issue).
 - Hiasa M, Isoda Y, Kishimoto Y, Saitoh K, Kimura Y, Kanai M, Shibasaki M, Hatakeyama D, Kirino Y, Kuzuhara T. (2013) Inhibition of monoamine oxidase A and stimulation of behavioural activities in mice by the inactive prodrug form of the anti-influenza agent oseltamivir. *British Journal of Pharmacology*, 169: 115-29
 - Ito E, Otsuka E, Hama N, Aonuma H, Okada R, Hatakeyama D, Fujito Y, Kobayashi S. (2012) Memory trace in feeding neural circuitry underlying conditioned taste aversion in *Lymnaea*. *PLoS One*, 7: e43151.
 - Iwai Y, Murakami K, Gomi Y, Hashimoto T, Asakawa Y, Okuno Y, Ishikawa T, Hatakeyama D, Echigo N, Kuzuhara T. (2011) Anti-influenza activity of marchantins, macrocyclic bisbibenzyls contained in liverworts. *PLoS One*, 6: e19825.
 - Kita S, Hashiba R, Ueki S, Kimoto Y, Abe Y, Gotoda Y, Suzuki R, Uraki E, Nara N, Kanazawa A, Hatakeyama D, Kawai R, Fujito Y, Lukowiak K, Ito E. (2011) Does conditioned taste aversion learning in the pond snail *Lymnaea stagnalis* produce conditioned fear? *Biological Bulletin*, 220: 71-81.
- [学会発表] (計 4 件)
- 畠山大, 岩井佑磨, 村上宏起, 五味康行, 奥谷武史, 橋本敏弘, 浅川義範, 奥野良信, 石川豊数, 越後典子, 葛原 隆「コケ植物由来の大環状ビスビベンジル分子による抗インフルエンザウイルス活性」第 49 回日本生物物理学会年会, 2011 年 9 月 16-18

日, 兵庫県立大学

研究者番号:

2. **畠山 大**, 廣田丈典, 柳澤 伸, 長江萌菜美, 庄司正樹, 葛原 隆「インフルエンザウイルス RNA 依存性 RNA 合成酵素の PB2 サブユニットにおける自己アセチル化能の構造学的および機能学的解析」第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 2012 年 11 月 13-15 日, 大阪市
3. **畠山 大**, 廣田丈典, 柳澤 伸, 長江萌菜美, 庄司正樹, 葛原 隆「インフルエンザウイルス RNA 合成酵素の PB2 サブユニットにおける自己アセチル化能の構造機能学的解析」第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 11-14 日, 福岡市
4. **畠山 大**, 廣田丈典, 柳澤 伸, 長江萌菜美, 庄司正樹, 葛原 隆「インフルエンザウイルス RNA 合成酵素における自己アセチル化能の発見」日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 27-30 日, 横浜市

[図書] (計 1 件)

1. **Hatakeyama D**, Tierling S, Kuzuhara T, Müller U. (2013) Epigenetic regulation of gene expression in the nervous system. In "Advanced Methods in Neuroethological Research", 10th chapter, Oka K and Ogawa H, Eds. Springer. In press.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

徳島文理大学 薬学部 生化学教室

<http://p.bunri-u.ac.jp/lab08/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

畠山 大 (HATAKEYAMA DAI)

徳島文理大学・薬学部・講師

研究者番号: 20514821

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()