

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450274

研究課題名(和文) 魚類ノダウイルスの感染増殖における宿主の熱ショックタンパク質の役割解明

研究課題名(英文) Investigation of roles of heat shock proteins for multiplication of Betanodavirus

研究代表者

冲中 泰 (Okinaka, Yasushi)

広島大学・生物圏科学研究科・准教授

研究者番号：80363034

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：魚類ノダウイルスはウイルス性神経壊死症の原因体であり、水産業に多大なる損失をもたらす。本ウイルスゲノムやコードされるタンパク質に関する研究は進展が目覚ましい一方、ウイルス増殖を助ける宿主側の因子の研究はほとんど進んでいない。熱ストレスはHSP70およびHSP90のあるアイソフォームの発現を誘導し、ウイルス増殖も促進した。HSP70およびHSP90アイソフォーム遺伝子のノックダウンおよび過剰発現実験の結果、HSP70-1、HSP70-2、HSP70-5、HSP90-1、HSP90-2およびHSP90-3が魚類ノダウイルスの増殖に重要な働きを示すことが判明した。

研究成果の概要(英文)：Betanodaviruses are the causative agents of viral nervous necrosis in cultured marine fish, causing very high mortality and resulting economic loss in aquatic industry. Although the functions of the viral genome and encoded proteins have been characterized extensively, there is barely any information on host factors required for multiplication of these viruses. HSPs comprise a large family of molecular chaperon proteins induced by various stressors. Thermal stress up-regulated some isoforms of HSP70 and HSP90, and facilitated virus multiplication. Virus infection also up-regulated some HSP70 and HSP90 isoforms. Furthermore, overexpression and knockdown experiments on the HSP isoforms revealed that HSP70-1, HSP70-2, HSP70-5, HSP90-1, HSP90-2, and HSP90-3 played important roles in multiplication of a betanodavirus. These results indicate that some HSP70 and HSP90 isoforms support betanodavirus multiplication, probably by promoting host and/or viral protein production.

研究分野：水族病理

キーワード：魚類ノダウイルス 熱ショックタンパク質 分子シャペロン 相互作用 ウイルス増殖 遺伝子ノックダウン 遺伝子の過剰発現

## 1. 研究開始当初の背景

魚類ノダウイルスを原因とするウイルス性神経壊死症は、多くの海産増養殖魚に発生する極めて致死性が高い病気である。本病の抜本的な防除方法の確立にはウイルス側だけでなく宿主側の学術情報の蓄積も必要である。しかしながら、本ウイルスも含め魚類ウイルスの研究分野では、研究手法の容易さから未だウイルス自体を対象とした研究がほとんどを占め、宿主側の探求はほぼ手付かずの片手落ちの状態である。

## 2. 研究の目的

メダカ (*Oryzias latipes*) をモデル感染宿主に用いた申請者の最近の研究で、メダカのある熱ショックタンパク質 (HSP) 遺伝子は、本ウイルスが感染増殖の際に必要とする宿主の遺伝子 (いわゆる “宿主因子遺伝子”) であると予測された。そこで本研究では HSP に焦点を当て、まずこれが本ウイルスの感染増殖に必要であることを再確認し、次に HSP がウイルス感染増殖過程のどこをどのようにサポートするのかをウイルス学的に詳細に検討した。

## 3. 研究の方法

- (1) HSP70 および HSP90 に属する各アイソフォーム遺伝子をメダカ培養細胞内で過剰発現させ、魚類ノダウイルスの感染増殖への影響を調べた。
- (2) HSP70 および HSP90 に属する各アイソフォーム遺伝子の発現を siRNA を用いて抑制 (ノックダウン) し、魚類ノダウイルスの感染増殖への影響を調べた。
- (3) 魚類ノダウイルスの感染増殖に重要と判明した HSP アイソフォームに関しては、熱ストレスまたはウイルス感染による誘導性を調べた。
- (4) 魚類ノダウイルスの感染増殖に重要

な HSP アイソフォームが、3種の魚類ノダウイルスタンパク質のどれと特異的に相互作用を示すかを調べた。

- (5) 特異的相互作用を示した HSP アイソフォーム遺伝子の過剰発現処理やノックダウン処理を行い、当該ウイルスタンパク質の合成レベルに期待される変化が起こるかを検討した。

## 4. 研究成果

- (1) HSP70 および HSP90 に属する数種アイソフォームのウイルス学的重要性を調べる目的で、各アイソフォーム遺伝子をメダカ培養細胞内で過剰発現させ、ベータノダウイルスの感染増殖への影響を調べた。まず、HSP70 アイソフォーム (HSP70-1, HSP70-2, HSP70-5, HSP70-8, HSP70-9) および HSP90 アイソフォーム (HSP90- $\alpha$ 1, HSP90- $\alpha$ 2, HSP90- $\beta$ , GRP-94, TRAP1) の cDNA を発現ベクターにクローニングした。次に、ベータノダウイルスが良好に感染増殖する OLHNI-2 メダカ培養細胞に作製した各 HSP 発現ベクターを導入 (トランスフェクション) した後、本ウイルスを感染させた。その結果、HSP70-1、HSP70-2、HSP70-5、HSP90- $\alpha$ 1、HSP90- $\alpha$ 2、HSP90- $\beta$  の過剰発現区でウイルス増殖レベルが 1.69-3.63 倍に高まった。
- (2) 他方、同様の目的で、今度は各 HSP アイソフォーム遺伝子の発現を siRNA を用いてノックダウンし、ウイルス感染増殖への影響を調べた。まず、HSP70-1、HSP70-2、HSP70-5、HSP90- $\alpha$ 1、HSP90- $\alpha$ 2、HSP90- $\beta$  の mRNA 配列を基に siRNA を合成した。次に、OLHNI-2 細胞に各 siRNA をトランスフェクションした後、本ウイル

スを感染させた。その結果、全ての siRNA 処理区でウイルス増殖レベルが低下し、その程度はコントロールの 0.26-0.55 倍であった。

これらの結果から、HSP70 および HSP90 isoform のうち、HSP70-1、HSP70-2、HSP70-5 および HSP90- $\alpha$ 1、HSP90- $\alpha$ 2、HSP90- $\beta$  はベータノダウイルスの感染・増殖に関与する(宿主因子である)ことが判明した。

(3) メダカ培養細胞 (OLHNI-2) に一過性の熱 (42 ) 処理を行った後にベータノダウイルス接種を行うと、ウイルス増殖レベルがコントロール区の約 5 倍に高まった。同様に熱処理を行った OLHNI-2 細胞では、HSP70-1、HSP70-2、HSP70-5 および HSP90- $\alpha$ 1、HSP90- $\alpha$ 2 が誘導され、それら以外の isoform はほぼ恒常的な発現を示した。HSP70-1、HSP70-2、HSP70-5 および HSP90- $\alpha$ 1、HSP90- $\alpha$ 2 は、上述のノックダウン実験および過剰発現実験でウイルス学的に重要と判明した isoform であることから、熱処理でこれら isoform の発現が誘導された結果、ウイルス増殖レベルが高まったという解釈が可能である。また、HSP70-1、HSP70-2、HSP90- $\alpha$ 1、HSP90- $\alpha$ 2 はベータノダウイルス感染により誘導されることから、本ウイルスは自らの増殖の為にこれら isoform の発現を誘導する可能性も示唆された。

(4) Hsp はタンパク質の安定化に関与するシャペロンタンパク質であり、ほ乳類ウイルスや昆虫ウイルスの報告と同様に、本ウイルスタンパク質の安定的合成にも寄与する可能性が高い。そこで、HSP70-1、HSP70-2、HSP70-5、HSP90- $\alpha$ 1、HSP90- $\alpha$ 2、HSP90- $\beta$  がどのウイルスタンパク質と直接相互作用するかを調べるため、酵母 Two-Hybrid

System を用いてスクリーニングを行った。その結果、ベータノダウイルスタンパク質のうち protein B2 は HSP70-1、HSP70-2、HSP70-5 それぞれと相互作用を示した。その中でも HSP70-5 との相互作用が最も強かった。それ以外のウイルスタンパク質および Hsp アイソフォーム間の相互作用は確認されなかった。

(5) Protein B2 と相互作用を示すことが判明した HSP70-1、HSP70-2、HSP70-5 をメダカ細胞内で過剰発現またはノックダウンし、それが protein B2 の合成レベルと相関するかを検討した。方法は、まず発現ベクターまたは siRNA を用いて OLHNI-2 細胞内で HSP70-1、HSP70-2、HSP70-5 遺伝子をそれぞれ過剰発現またはノックダウン処理を行った。次に、これら細胞に pCI-neo にクローニングした protein B2 遺伝子を導入し、発現を促した。その後、ウェスタンブロットティング解析により、protein B2 の増減レベルを調べた。HSP70-1、HSP70-2、HSP70-5 遺伝子の過剰発現またはノックダウン効果は、リアルタイム PCR により正確にモニターすることができた。Protein B2 は His タグ、GST タグまたは HA タグとの融合タンパク質として発現させ、それぞれのタグの抗体を用いたウェスタンブロットティング解析を行ったが、いずれのタグ抗体を用いた解析でも HSP70-1、HSP70-2、HSP70-5 遺伝子の発現レベルとの明確な相関は確認されなかった。その主な原因は protein B2 の検出に用いたタグの検出感度が低く、実験結果の再現性が得られなかったことにある。今後はより検出感度の高いタグを用い、同様の実験を行う必要がある。

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)

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

冲中 泰 (Okinaka Yasushi)  
広島大学・生物圏科学研究科・准教授  
研究者番号：80363034

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：