

3. マリンビルナウイルスの培養細胞における感染機構

大嶋 俊一郎, 今城 雅之, 平山 健史

高知大学 大学院

黒潮圏海洋科学研究科 生物構造機能分野

マリンビルナウイルス (MABV) は、直径約 60nm のエンベロープを持たない 2 分節 2 本鎖の RNA ウイルスである。本ウイルスの分節 A にコードされている NH₂-preVP2-NS-VP3-COOH 前駆体ポリプロテインは、NS プロテアーゼ活性により切断され VP2 および VP3 になることが知られている。

我々は、感染後 MABV 粒子を産生する感受性の CHSE-214 細胞, RSBK-2 細胞と粒子を産生しない非感受性の FHM 細胞, EPC 細胞を用いて MABV の感染機構と細胞内動態について検討している。

MABV は細胞表面の 250kDa のレセプターを介してエンドサイトーシスにより細胞内に侵入することが明らかになった。感染 4 時間後には VP2, NS ならびに VP3 は細胞質画分に検出され、さらに、VP3 は CHSE-214 ならびに RSBK-2 細胞内でプロセッシングを受け 3 つに分断されることを明らかにした。この VP3 の N 末端側のタンパク質は、ウイルス粒子構築時に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。今後、この 4 つの魚類細胞を用いた感染実験系により、さらに詳細な MABV の感染機構と細胞内動態が明らかになるものと期待される。

はじめに

わが国における魚類の感染症に関する研究は、水産増養殖が始まり出した 1960 年代後半から各種感染症の報告が多くなされるようになり、これに伴って本格的に実施されるようになった。なかでも、海面ではブリ養殖が最も盛んに行われ、ブリに関する感染症が多数報告されるようになったのもこの頃からである。

これまでに国内で問題になる魚類の感染症の背景には食糧自給率の問題があり、海外からの水産動物の輸入により各種病原体が国内に侵入し、大きな被害を出している。これらのうち、ウイルス感染症の多くは外来種であると考えられている。また、水産増養殖において発生するウイルス感染症に対する有効な薬剤は今のところ存在しない。

水産増養殖におけるウイルス感染症は、世界的に見ても

増加の一途を辿っている。これまでに、魚類のウイルス感染症に対するワクチンとして実用化されたものは、その被害やウイルスの種類に比べて少なく、この原因としてウイルス感染に関わる基本的な情報が少ないために、有効性の高いワクチンの開発に至らないことが一因に挙げられる。今後、水産増養殖においてウイルス感染症に対する有効性の高い予防法、診断法ならびに治療法の開発が益々求められることが予測されるが、そのためには基本となるウイルスの増殖機構や、宿主との相互作用についての正確な理解が不可欠である。

そこで、本稿では国内においてはブリ類で、海外においてはサケ科魚類に対して産業的に大きな被害を出し、今後さらに水産増養殖で脅威となることが予測される魚病ウイルスの 1 グループであるアクアビルナウイルス (Infectious Pancreatic Necrosis Virus IPNV と Marine birna virus : MABV) のうちのマリンビルナウイルスを研究対象とし、その感染機構を明らかにしようとする試みについてこれまでに得られた我々の知見を紹介する。

連絡先

〒 783-8502 高知県南国市物部乙 200

TEL : 088-864-5214

FAX : 088-864-5214

E-mail : s-oshima@cc.kochi-u.ac.jp

マリンビルナウイルス (MABV) の分類

ビルナウイルス科は、図 1 に示すとおり鳥類を宿主とする アビビルナウイルス属 (Infectious Bursal Disease

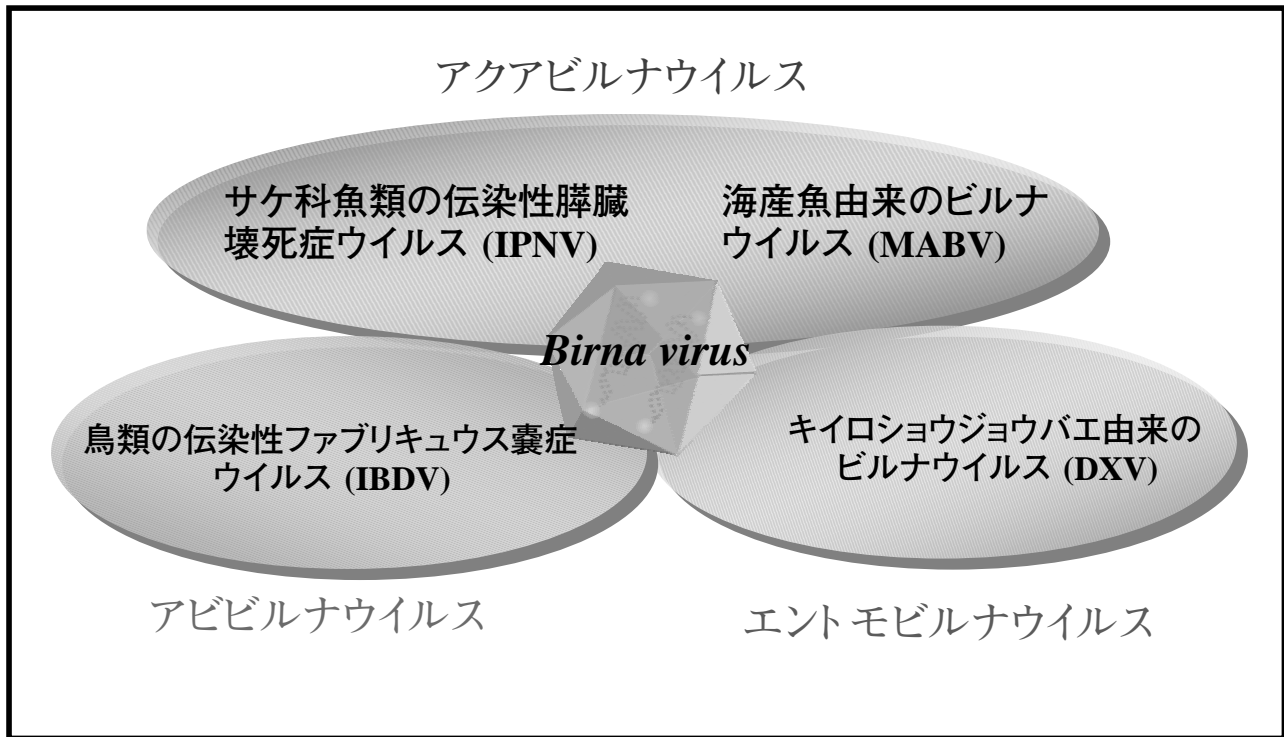


図1 ビルナウイルス科の構成

Virus : IBDV), 魚類を宿主とするアクアビルナウイルス属 (IPNV, MABV) およびショウジョウバエを宿主とするエントモビルナウイルス属 (Drosophila X Virus : DXV) から現在は構成されている¹⁾。

このうちアクアビルナウイルス属は、ニジマスや大西洋サケなどのサケ・マス類に感染し発症すると腭臓の壊死を特徴とした症状を引き起こし、産業的に大きな被害を出す (IPNV)。また、ブリ類に感染し発症すると腹水が著しく貯留し、魚体への奇形形成を引き起こすことがこれまでの知見で明らかになっており、産業的に大きな問題となっている (MABV)^{2),3),4),5)}。

IPNV は、魚類の病原ウイルスとして1960年に初めて報告されたウイルスであり、アクアビルナウイルスの Type species でもある。本ウイルスの血清型による分類は、これまでの中和抗体試験、酵素免疫試験の成績によりA型とB型が存在しA型はさらにA1~A9に分類される。

一方、MABVは1985年に日本で初めてブリから分離されたウイルスであり、様々な魚介類からもこれまでに検出されていることから、国内の海産魚介類から分離されたアクアビルナウイルスは、特にマリンビルナウイルスとして総称されている⁶⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾。

これまでにMABVは魚体内で持続的な感染を引き起こすことや、海水中などに広く分布することが報告されており、日和見的な感染様式を示す病原体と考えられている¹²⁾¹³⁾。また、IPNVも魚体内で持続感染することが知られており、

スコットランドなど欧州の養殖場において、ウイルスキャリアーとなった個体により被害が更に広がることが報告されている¹⁴⁾¹⁵⁾。

MABVの血清学的な分類は、各種試験成績の結果からA1 (strain VR-299 antiserum), A2 (strain Sp antiserum) ならびにA3 (strain Ab antiserum) の3つの古典的な血清型に分類され、アジアで検出されるMABVはこれら3型が多いとされている⁸⁾¹⁶⁾¹⁷⁾。これらとは別に、近年、魚類から分離された Blotched snakehead virus (BSNV) はIPNVとは血清型が全く異なり、アミノ酸レベルでの相同性はIPNVよりもむしろIBDVに近いとされ、本ウイルスは新しいgenusに位置づけられるという報告もあり¹⁸⁾、今後、まだまだビルナに関する新種のウイルスが出現する可能性が示唆されている。

マリンビルナウイルス (MABV) の 粒子ならびに遺伝子構造

マリンビルナウイルスは、エンベロープを持たず、キャプシドは正20面体構造で、ウイルス粒子の直径は約60nm (図2A, B.に示す) である。本ウイルス粒子内のゲノムは、分節AおよびBのdsRNAから成っている。

ビルナウイルスの分節Aには、主要キャプシドタンパク質であるVP2の前駆体pVP2、ウイルスプロテアーゼであるNS、およびキャプシドタンパク質であるVP3が、5'末端から順に一つのopen reading frame (ORF) としてコード

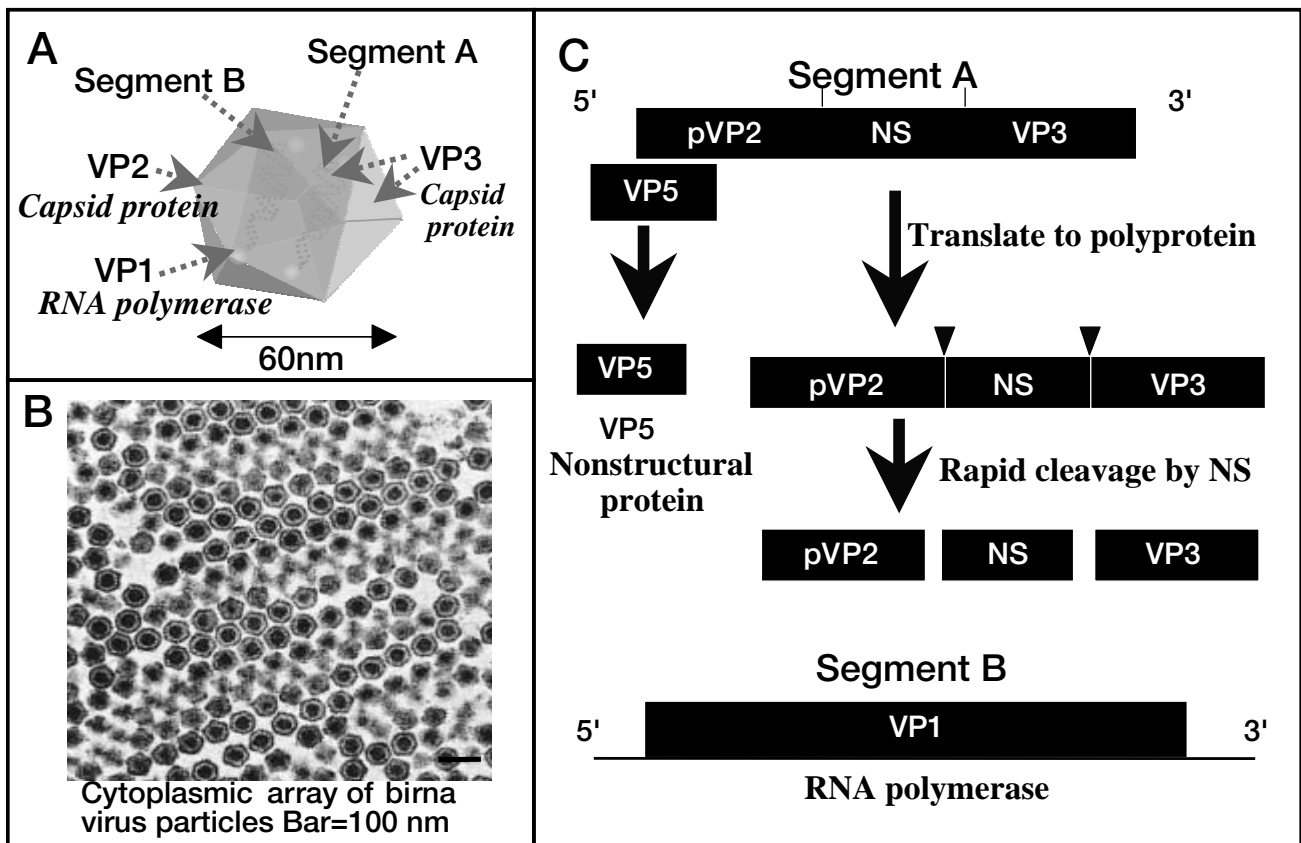


図2 アクアビルナウイルスの粒子ならびに遺伝子構造
A：ウイルス粒子構造 B：電子顕微鏡像 C：遺伝子構造

されている ($\text{NH}_2\text{-pVP2-NS-VP3-COOH}$) (図 2C)¹⁹⁾²⁰⁾。また、pVP2 に重複する形で、非ウイルス構成タンパク質である VP5 が別の ORF にコードされている (図 2C)²¹⁾。さらに、分節 B には、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼである VP1 がコードされている²²⁾²³⁾。本ポリメラーゼは 2 つの様式で存在し、一つは free polypeptide として、もう一方は、セリン-5 'GMP phosphodiester bond' によってセグメント A と B の 5' 末端に結合してウイルス粒子内に存在するとされている (図 2A)²⁴⁾。

分節 A のポリプロテインは、NS タンパク質のプロテアーゼ活性により pVP2 および VP3 に切断される (図 2C)。この NS タンパク質は、セリン・リジン触媒基を持つことが IPNV ならびに IBDV において知られている。pVP2-NS および NS-VP3 境界領域には、Ser/Thr-X-Ala ↓ Ser/Ala-Gly (IPNV)、Thr/Ala-X-Ala ↓ Ala モチーフ (IBDV) および Ala/Gly-X-Ser ↓ Ala (DXV) のモチーフが存在することが知られている²⁵⁾²⁶⁾²⁷⁾²⁸⁾。

MABV では、NS タンパク質のプロテアーゼ活性部位ならびに pVP2-NS および NS-VP3 境界領域のモチーフは明らかにされていないことから、我々は site-directed mutagenesis 法によりこれらを明らかにした。

分節 A の N 末端メチオニンから 681 残基目のヒスチジンおよび 703 残基目のセリンを変異させた場合、変異を挿入させなかった場合と同様に切断されることが明らかになった。しかし、543 残基目のイソロイシン、633 残基目のセリン、674 残基目のリシンおよび 686 残基目のバリンを変異させた場合、変異を挿入させなかった場合と同様の切断パターンではなかったことから、MABV ではこの 4 残基が NS プロテアーゼ活性に必須であることが明らかになった。特にイソロイシンおよびバリンは、これまでビルナウイルスでは報告のない活性部位であることが判明した (論文投稿中)。また、pVP2-NS および NS-VP3 境界領域のモチーフは、今回の検討の結果から、Ser/Thr-X-Ala ↓ Ser/Ala-Gly モチーフであることが確認され、これは既に報告されている IPNV と全く同じであった。

MABV の感染機構

1. MABV の魚類由来細胞への吸着と侵入

我々は MABV の細胞への吸着、侵入、脱核、タンパク質合成ならびに粒子形成の一連の流れを、現在、4 種類 (CHSE-214²⁹⁾、RSBK-2³⁰⁾、FHM³¹⁾、EPC³²⁾) の魚類由来

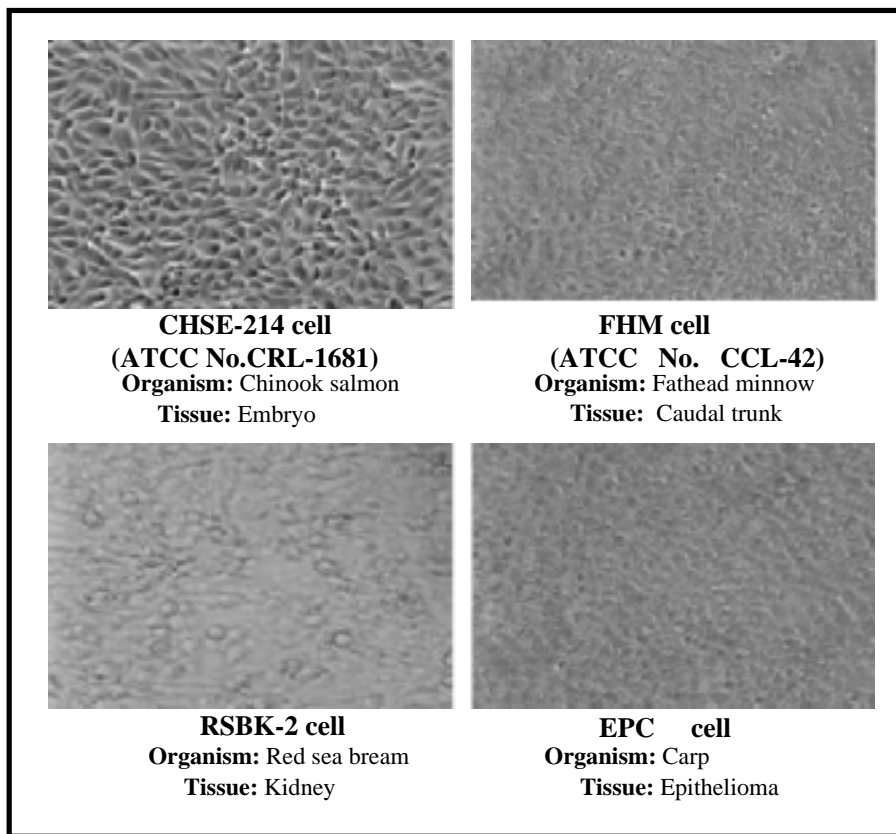


図3 実験に用いた各種魚類の細胞

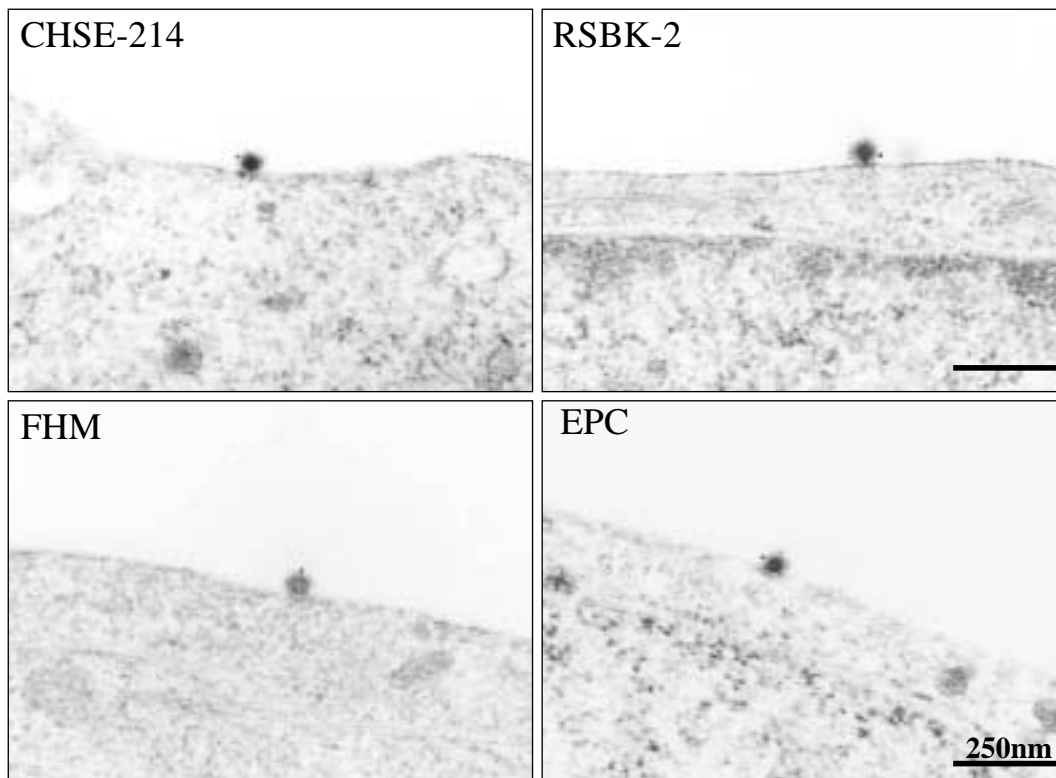


図4 MABVの各種魚類細胞に対する吸着
10nm金コロイドを用いたウイルス粒子の検出

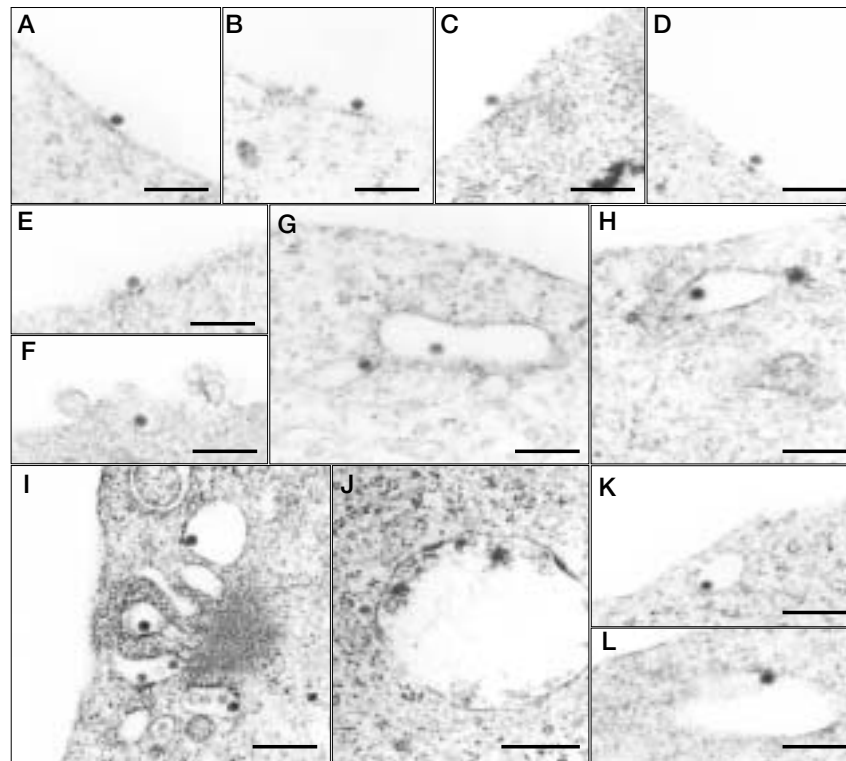


図5 MABVの各種魚類細胞への侵入

(A-D) : CHSE-214, RSBK-2, FHM, EPC (E,F) : CHSE-214の細胞膜上に検出 (G,H) : CHSE-214の小胞内に検出 (I) : 吸着40分後に空胞内に検出 (J) : 空胞内での粒子崩壊 (K,L) : RSBK-2, FHMの小胞内で検出

培養細胞を用いて解析している(図3)。なお、魚類細胞は通常20℃で培養し各種実験に用いる。

まず、我々はこれら魚類細胞を用いてMABVの吸着と侵入について調べた。MABVに対するウサギ抗体を作製後、金コロイド法により電子顕微鏡観察を行った結果、MABV粒子は4種類の魚類細胞全てにおいて吸着後20分で細胞膜上に検出された(図4)。その後の経過について電子顕微鏡観察した結果を図5に示した。吸着後30分前後で、CHSE-214細胞表面にpit beneath virionが観察された(図5E,F)。さらに、細胞内にはウイルス粒子を含む小胞ならびに空胞が時折観察されるようになり、吸着40分後には空胞内に確実にウイルス粒子が認められるようになった(図5I)。その後、迅速に空胞内でウイルス粒子が崩壊していく像が観察された。また、図5のK,Lに示したとおりRSBK-2細胞ならびにFHM細胞においてもウイルス粒子が細胞の小胞内に観察された。しかし、EPC細胞では、ウイルス粒子はその細胞表面に吸着することは確認されたが、細胞内に侵入している電子顕微鏡像は認められなかった。多くのウイルスは、Endosomal pathwayによって細胞内に侵入することがこれまでに報告されており³³⁾、IPNVにおいてもCHSE-214細胞に対してEndocytosisによって細胞内に侵

入することが知られている^{34),35)}。以上の結果から、MABVがCHSE-214細胞、RSBK-2細胞、ならびにFHM細胞に侵入する過程は、Endocytosisによることが明らかとなった。

2. MABV レセプターの同定

各種ウイルスの細胞レセプターは、これまでにVOPBA (Virus overlay protein blotting assays) 分析により多く同定されている³⁶⁾³⁷⁾³⁸⁾³⁹⁾⁴⁰⁾。我々もこの方法を用いて、4種類の魚類細胞由来のMABV結合タンパク質の同定を試みた。その結果、MABVは4種類の魚類細胞由来の約250kDaのタンパク質と結合することが明らかになった(図6)⁴¹⁾。なお、CHSE-214細胞由来のウイルス結合タンパク質は、他の3種類の細胞よりも若干大きい分子量であった。現在、この250kDaのタンパク質の同定を実施している。

EPC細胞では、MABVの細胞表面への吸着は電子顕微鏡観察の結果でも確認されていることから、今回のVOPBAの結果はこれを支持するものとなった。しかし、細胞内では全くウイルス粒子は認められないことから、EPC細胞にMABVが侵入するためには、もう一つ別のレセプターが必要なのかも知れないが、現在これらについても検討中である。

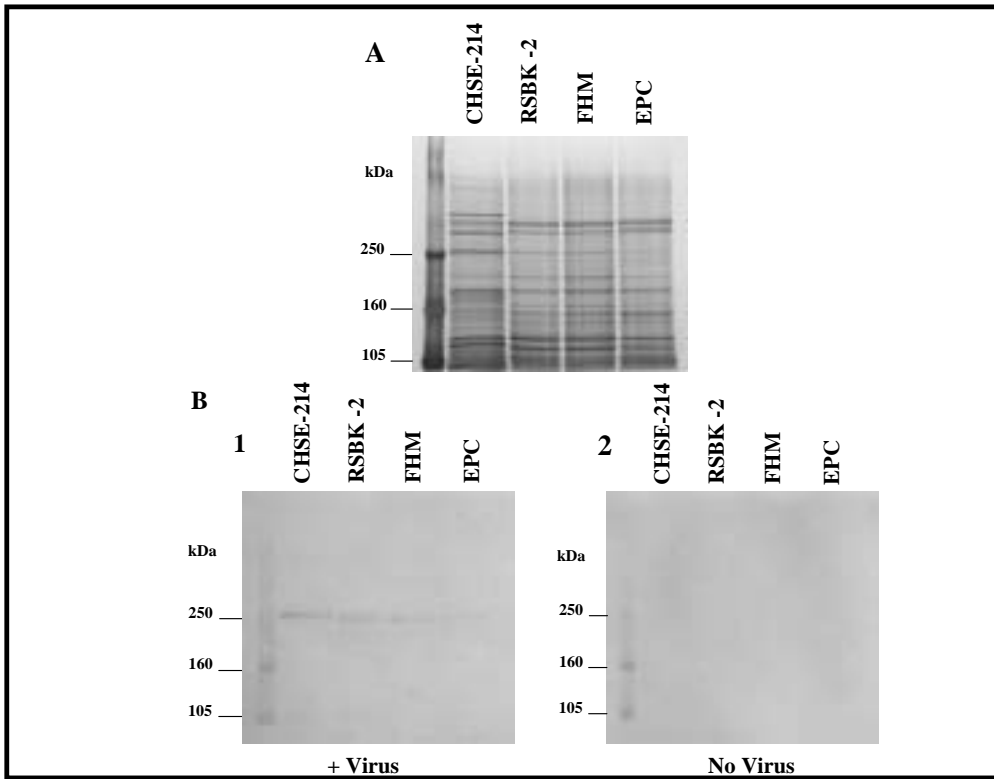


図6 VOPBA 法による MABV 結合タンパクの同定
A : SDS-PAGE B : VOPBA の結果

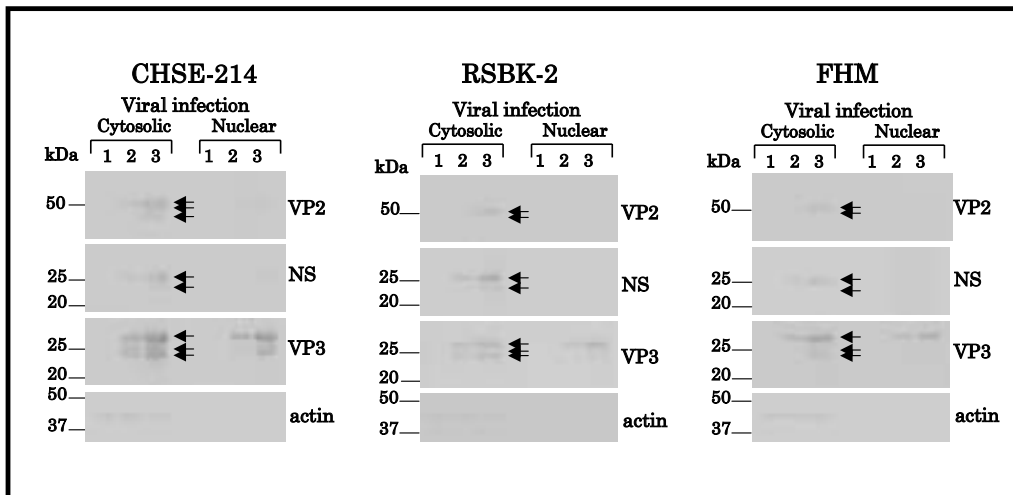


図7 MABV 感染後の各種魚類細胞内のウイルス遺伝子産物の発現
1 : 感染 0 時間 2 : 感染 4 時間 3 : 感染 8 時間

3 : 培養細胞内での MABV 遺伝子産物の発現

各種魚類細胞に感染後の MABV 遺伝子産物の発現について検討するために、まず、Segment A にコードされている VP2, NS ならびに VP3 の各遺伝子組換え体に対するウサギ抗血清を作製した。これら作製した抗体を用いて、

ウイルス感染後の各種培養細胞内における遺伝子産物の発現をウエスタンブロット法により解析した。その結果を図 7 に示した。

ウイルス粒子の産生量が多い CHSE-214 細胞を用いた場合には、VP2 は感染 4 時間後に Segment A の全長遺伝子

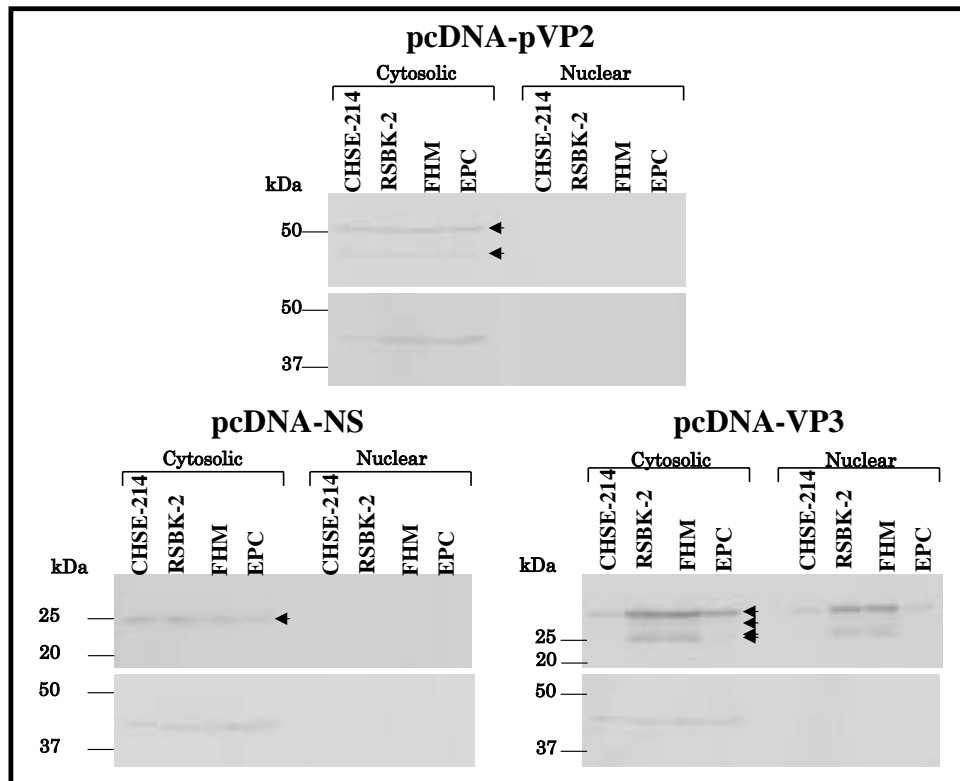


図8 MABVのpVP2,NSならびにVP3の各種魚類細胞における単独発現

が翻訳されたポリプロテインとして検出され始め、感染8時間後にはプロセッシングを受け成熟型のVP2が出現を始める(ポリプロテインの分子量: 52k, pVP2の分子量: 49k, 成熟型VP2の分子量: 46k)。ウイルス粒子の産生量が比較的少ないRSBK-2細胞では、感染8時間後のポリプロテインは、ほとんどプロセッシングを受けず、成熟型のVP2の産生はほとんど認められない。さらに、ウイルス粒子を全く産生しないFHM細胞でも同様の傾向が認められた。このSegment A由来のポリプロテインは、CHSE-214細胞ならびにRSBK-2細胞で核と会合していることもこの実験から明らかとなった。NS(分子量: 25k)の発現も基本的にはCHSE-214細胞、RSBK-2細胞ならびにFHM細胞で同じパターンを示したが、FHM細胞内では核とは会合しなかった。

VP3(分子量: 28k, 25k, 23k)は、CHSE-214細胞で感染4時間後に既にプロセッシングを受け、感染8時間後では産生量は増えていることが明らかとなった。また、RSBK-2やFHM細胞と比較して、プロセッシングを受けたVP3の多くが核と会合していることが明らかになった。なお、EPC細胞については、先にも述べたとおりMABVは細胞表面に吸着するが、その後の侵入は起こらなかった。

次に、Segment Aに含まれる各遺伝子(pVP2, NS, VP3)をクローニングし、これら遺伝子を各細胞で単独に発現させた場合、どのような挙動を示すかについて検討

した。その結果を、図8に示した。VP2ならびにNSはどの細胞でも同じように発現したが、CHSE-214細胞ならびにRSBK-2細胞ではどちらの遺伝子産物も核と会合しておらず、通常のウイルス感染とは異なる経路で挙動していることが明らかとなった。また、VP3の発現については、単独発現の場合CHSE-214細胞では通常のウイルス感染の際の挙動と全く正反対の結果となり、プロセッシングは認められなかった。しかし、RSBK-2ならびにFHM細胞では、産生量も多くさらにプロセッシングを受けて核にもその多くが会合していることが明らかとなった。通常のウイルス感染で発現する遺伝子産物の挙動と、単独発現系で認められた遺伝子産物の挙動を単純には比較できないが、両者で得られた結果のギャップを埋めるために、現在、ウイルスゲノムの挙動についても各魚類細胞で解析を進めている。

また、先にも記述したとおり今回の実験によりVP3が3つに分断されることを確認した。我々はこのVP3の分断領域を決定するために、VP3遺伝子をクローニング後、プロセッシングを受けたタンパク質を回収し、アミノ酸シーケンスを行った。その結果、VP3はSegment AのN末端から数えて735番目、795番目、ならびに882番目のアミノ酸領域で分断されることが明らかになった(図9)²⁷⁾⁴²⁾⁴³⁾⁴⁴⁾⁴⁵⁾。

これらプロセッシングを受けたVP3のウイルス粒子形成に及ぼす機能について解析するために、pVP2とVP3全長、

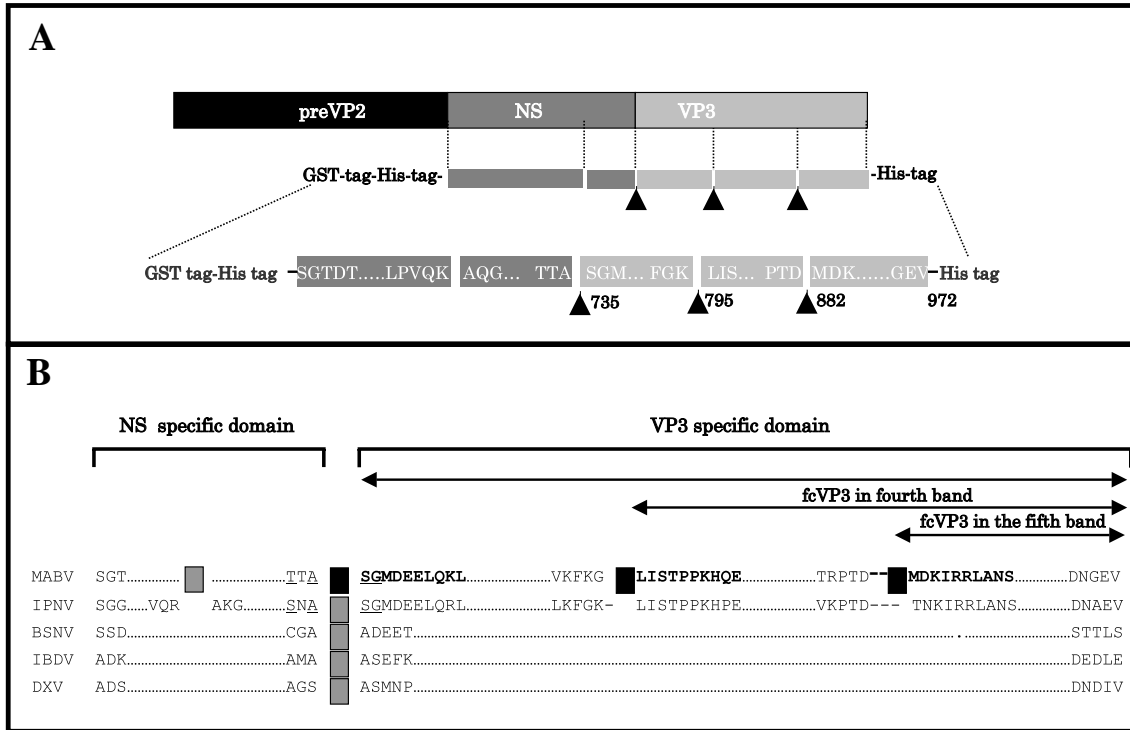


図9 MABVのNS-VP3結合領域の分断部位の同定

A: 矢印の部位がVP3の決定した分断領域
 B: 各種ビルナウイルスとの分断領域の比較 ■: 新規分断領域 □: 既知分断領域

pVP2 と 795 から C 末端の VP3, pVP2 と 882 から C 末端の VP3 をそれぞれ CHSE-214 細胞内で共発現させた。その結果を図 10 に示した。pVP2 と全長の VP3 を共発現させた場合には、予想されるウイルス粒子が構築されたが、pVP2 と 795 から C 末端の VP3, pVP2 と 882 から C 末端の VP3 をそれぞれ共発現させた場合には、直径約 22nm のチューブ様構造が細胞質内に多数認められるだけで、ウイルス粒子は一切検出できなかった。

しかし、pVP2 と全長の VP3 を共発現させた場合でも、粒子形成以外にこのチューブ構造が認められることから⁴⁶⁾⁴⁷⁾このチューブ形成もウイルス粒子の構築時に何らかの重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

これまでに、IBDV の VP3 はウイルス複製時に VP1 とヘテロダイマーを形成することで IBDV 遺伝子のパッケージングに重要な役割を果たしていると考えられている⁴⁸⁾⁴⁹⁾。また、VP3 の N 末端側にはウイルス遺伝子と結合する領域が高度に保存されており⁵⁰⁾ VP3 の C 末端側には VP3 とホモダイマーを形成する領域が保存されていることも知られている⁵¹⁾。現在、VP3 の N 末端から 735 番目～795 番目のプロセッシング領域の役割についても、検討中である。

おわりに

我々は MABV の感染について、細胞への吸着、侵入、脱核、タンパク質合成ならびに粒子形成の一連の流れを、現

在、4 種類の魚類由来培養細胞を用いて解析している。その結果、各細胞で特徴的な遺伝子発現の挙動が認められた(図 11)。今後、この感染モデル系を用いて、さらに詳細に比較検討していくことで MABV の感染機構と細胞内動態のメカニズムが明らかになることもさる事ながら、興味深い細胞側の各種因子も同定されることが期待される。

また、一方で魚類を用いた実験では、アクアビルナウイルスの定量系の確立⁵²⁾や病原性⁵³⁾についてもいくつかの知見が得られており、培養細胞を用いた実験で得られた情報とあわせて総合的に理解することを更に推進することで、今後、持続感染のメカニズムの解明や有効性の高いワクチンの開発が期待される。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、有益なご助言とご支援を頂きました名古屋大学大学院医学系研究科の西山幸廣先生ならびに高知大学医学部の今井章介先生に心よりお礼申し上げます。なお、本研究は高知大学 農学部 水族病理学研究室の後藤寿明君をはじめ多くの研究スタッフにより遂行致しました。

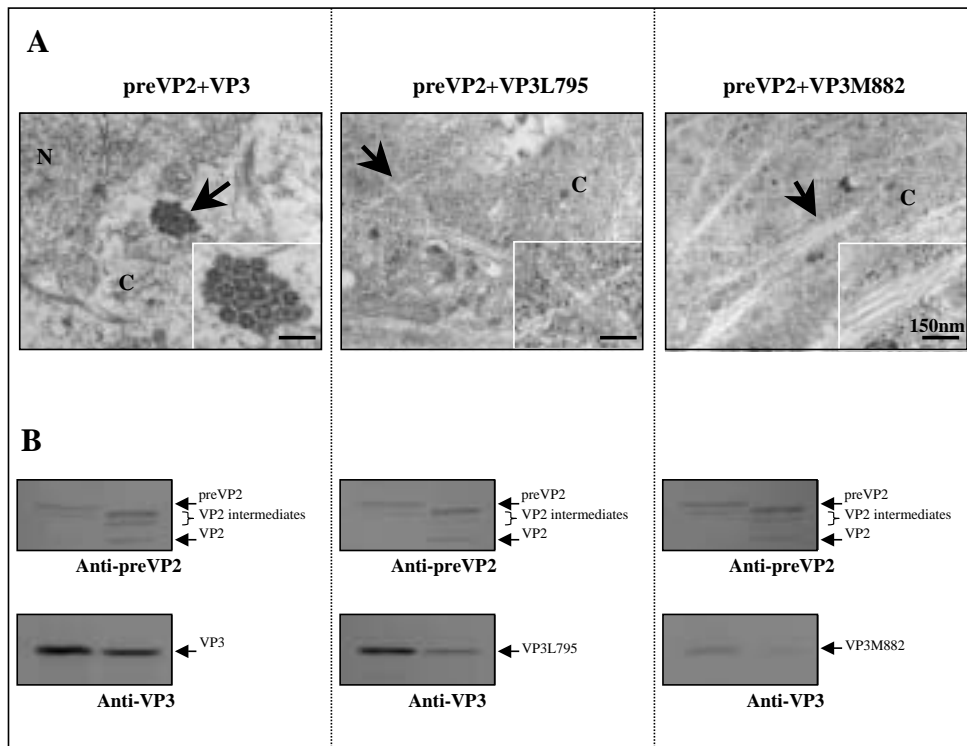


図 10 CHSE-214 細胞内での preVP2, VP3 の共発現による粒子形成
 A : 電子顕微鏡観察 B : ウエスタンブロットによる各遺伝子産物の細胞内での発現の確認

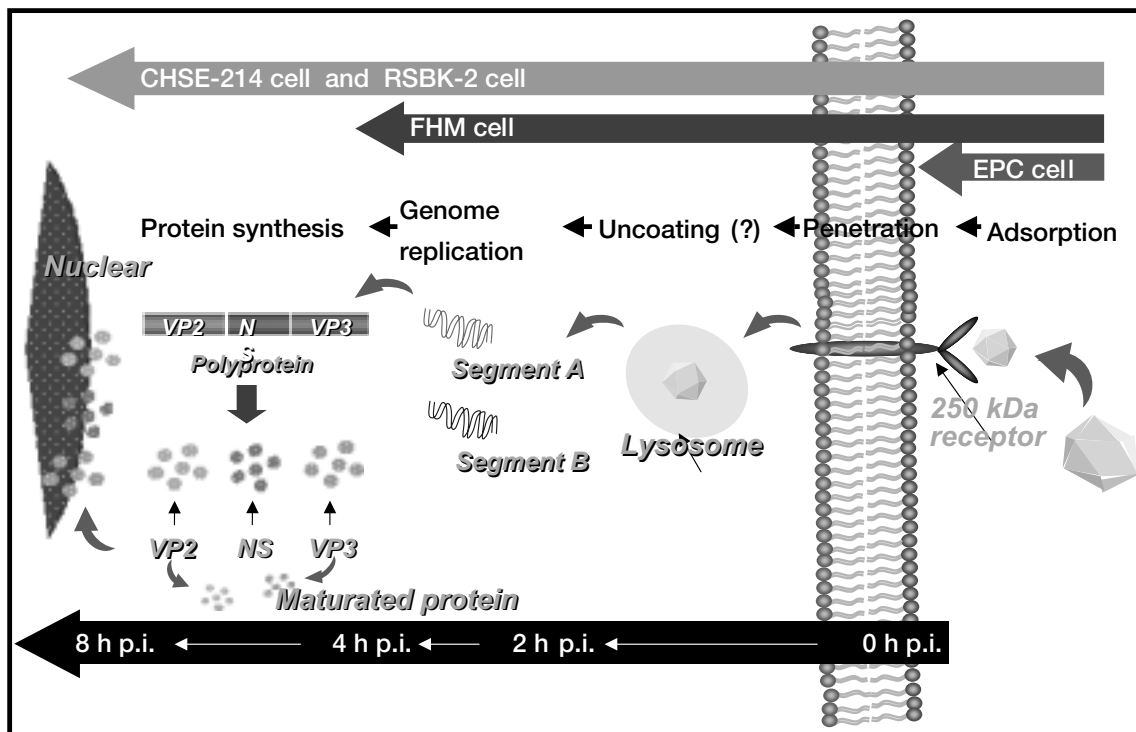


図 11 MABV の各種魚類細胞に対する感染機構

文 献

- 1) Dobos P, BJ Hill, R Hallett, DT Kells, H Becht, D Teninges.: Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. *J Virol* 32: 593-605, 1979.
- 2) Sorimachi M, Hara T.: Characteristics and pathogenicity of a virus isolated from yellowtail fingerlings showing ascites. *Fish Pathol* 19: 231-238, 1985.
- 3) Sorimachi M, Egusa S.: Experimental infection of yellowtail ascites virus (YTAV) to yellowtail fingerlings. *Fish Pathol* 21: 133-134, 1986.
- 4) Nakajima K, Maeno Y, Arimoto M, Inouye K, Sorimachi M.: Viral deformity of yellowtail fingerlings. *Fish Pathol* 28: 125-129, 1993.
- 5) Nakajima K, Sorimachi M.: Serological and biochemical characterization of two birnaviruses; VDV and YAV isolated from cultured yellowtail. *Fish Pathol* 29: 183-186, 1994.
- 6) Kusuda R, Kado K, Takeuchi Y, Kawai K.: Characteristics of two virus strains isolated from young Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Suisanzoshoku* 37: 115-120, 1989.
- 7) Kusuda R, Nishi Y, Hosono N, Suzuki S.: Serological comparison of birnaviruses isolated from several species of marine fish in south west Japan. *Fish Pathol* 28: 91-92, 1993.
- 8) Kusuda R, Nagato K, Kawai K.: Characteristics of a virus isolated from red sea bream, *Pagrus major* showing exophthalmos. *Suisanzoshoku* 42: 145-149, 1994.
- 9) Suzuki S, Nakata T, Kamakura M, Yoshimoto M, Furukawa Y, Yamashita Y, Kusuda R.: Isolation of birnavirus from Agemaki (jack knife clam) *Sinonovacula constricta* and survey of the virus using PCR technique. *Fish Sci* 63: 563-566, 1997.
- 10) Suzuki S, Kamakura M, Kusuda R.: Isolation of birnavirus from Japanese pearl oyster *Pinctada fucata*. *Fish Sci* 64: 342-343, 1998.
- 11) Wolf K, S Snieszko, C Dunbar, E.: Pyle Virus nature of infectious pancreatic necrosis in trout. *Proc Soc Exp Biol Med* 104: 105-108, 1960.
- 12) Kitamura S, S Suzuki.: Occurrence of marine birnavirus through the year in coastal seawater in the Uwa Sea. *Mar Biotechnol*, 2: 188-194, 2002.
- 13) Kitamura S, S Kamata, S Nakano, S Suzuki.: Detection of marine birnavirus genome in zooplankton collected from the Uwa Sea, Japan. *Dis Aquat Org* 54: 69-72, 2003.
- 14) Murray AG, CD Busby, DW Bruno.: Infectious pancreatic necrosis virus in Scottish Atlantic salmon farms, 1996-2001 *Emerg. Infect Dis* 9: 455-60, 2003.
- 15) Knuesel R, H Segner, T Wahli.: A survey of viral disease in farmed and feral salmonids in Switzerland. *J Fish Dis* 26: 167-82, 2003.
- 16) Hill BJ, K Way.: Serological classification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus and other aquatic birnaviruses. *Annu Rev Fish Dis* 5: 55-77, 1995.
- 17) Hosono N, SSuzuki, R Kusuda.: Evidence for relatedness of Japanese isolates of birnaviruses from marine fish to IPNV. *J Fish Dis* 17: 433-437, 1994.
- 18) John KR, RH Richards.: Characteristics of a new birnavirus associated with a warm-water fish cell line. *J Gen Virol* 80: 2061-2065, 1999.
- 19) Nagy E, Duncan R, Krell P, Dobos P.: Mapping of the large RNA genome segment of infectious pancreatic necrosis virus by hybrid arrested translation. *Virology* 158: 211-217, 1987.
- 20) Heppell J, Tarrab E, Berthiaume L, Lecomte J, Arella M.: Characterization of the small open reading frame on genome segment A of Infectious pancreatic necrosis virus. *J Gen Virol* 76: 2091-6, 1995.
- 21) Duncan R, Doboie P.: The nucleotide sequence of infectious pancreatic necrosis virus(IPNV) ds RNA segment A reveals one large ORF encoding a precursor polyprotein. *Nucl Acids Res* 14: 5934, 1986.
- 22) Gorbalenya AE, EV Koonin.: Birnavirus RNA polymerase is related to polymerase of positive stranded RNA virus. *Nucleic Acids Res* 16: 7735, 1988.
- 23) Duncan R, CL Mason, E Nagy, JA Leong, Dobos.: Sequence analysis of infectious pancreatic necrosis virus genome segment B and its encoded VP1 protein: a putative RNA-dependent RNA polymerase lacking the Gly-Asp-Asp motif. *Virology* 181: 522-541, 1991.
- 24) Calvert JG, E Nagy, M Soler, P Dobos.: Characterization of the VPg-dsRNA linkage of infectious pancreatic necrosis virus. *J Gen Virol* 72: 2563-2567, 1991.
- 25) Chung HK, S Kordyban, L Cameron, P Dobos.: Sequence analysis of the bicistronic *Drosophila X* virus genome segment A and its encoded polypeptides. *Virology* 225: 359-368, 1996.
- 26) Sanchez, AB, Rodriguez JF.: Proteolytic processing in infectious bursal disease virus: identification of the polyprotein cleavage sites by site-directed mutagenesis. *Virology* 262: 190-199, 1999.
- 27) Petit S, N Lejal, JC Huet, B Delmas.: Active residues and viral substrate cleavage sites of the protease of the birnavirus infectious pancreatic necrosis virus. *J Virol* 74: 2057-2066, 2000.
- 28) Lejal N, B Da Costa, JC Huet, B Delmas.: Role of Ser-652 and Lys-692 in the protease activity of infectious bursal disease virus VP4 and identification of its substrate cleavage sites. *J Gen Virol* 81: 983-992, 2000.
- 29) Fryer JL, Yusha A, Pilcher KS.: The in vitro cultivation of tissue and cells of Pacific salmon and steelhead trout. *Ann N Y Acad Sci* 126: 566-586, 1965.
- 30) Kusuda R, Kawarasaki A.: Establishment and characterization of a cell line derived from the kidney of red sea bream, *Pagrus major*. *Suisanzoshoku* 41: 455-460, 1993.
- 31) Gravell M, Malsberger RG.: A permanent cell line from the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Ann N Y Acad Sci* 126: 555-565, 1965.
- 32) Fijan N, Sulimanovic D, Bearzotti M, Muzinic D, Zwillenberg LO, Chilmonczyk S, Vautherot JF, de Kinkelin P.: Some properties of the epithelioma papulosum cyprini (EPC) cell line from carp *Cyprinus carpio*. *Annales de d'Institut Pasteur. Virology* 137: 207-220,

- 1983.
- 33) Sieczkarski SB, Whittaker GR.: Dissecting virus entry via endocytosis. *J Gen Virol* 83: 1535-1545, 2002.
 - 34) Couve E, Kiss J, Kuznar J.: Infectious pancreatic necrosis virus internalization and endocytic organelles in CHSE-214 cells. *Cell Biol Int Rep* 16: 899-906, 1992.
 - 35) Granzow H, Weiland F, Fichtner D, Enzmann PJ.: Studies of the ultrastructure and morphogenesis of fish pathogenic viruses grown in cell culture. *J Fish Dis* 20: 1-10, 1997.
 - 36) Borrow P, Oldstone MB.: Characterization of lymphocytic choriomeningitis virus-binding protein(s): a candidate cellular receptor for the virus. *J Virol* 66: 7270-7281, 1992.
 - 37) de Verdugo UR, Selinka HC, Huber M, Kramer B, Kellermann J, Hofschneider PH, Kandolf R.: Characterization of a 100-kilodalton binding protein for the six serotypes of coxsackie B viruses.: *J Virol* 69: 6751-6757, 1995.
 - 38) Ludwig GV, Kondig JP, Smith JF.: A putative receptor for Venezuelan equine encephalitis virus from mosquito cells.: *J Virol* 70: 5592-5599, 1996.
 - 39) Mizukami H, Young NS, Brown KE.: Adeno-associated virus type 2 binds to a 150-kilodalton cell membrane glycoprotein.: *Virology* 217: 124-130, 1996.
 - 40) Salas-Benito JS, del Angel RM.: Identification of two surface proteins from C6/C36 cells that bind dengue type 4 virus.: *J Virol* 71: 7246-7252, 1997.
 - 41) Imajoh M, KI Yagyu, SI Oshima.: Early interactions of marine birnavirus infection in several fish cell lines. *J. Gen. Virol.* 84: 1809-1816, 2003.
 - 42) Lawrence WR, Nagy E, Duncan R, Krell P, Dobos P.: Expression in *Escherichia coli* of the major outer capsid protein of infectious pancreatic necrosis virus. *Gene* 79, 369-374 1989
 - 43) Manning DS, Leong JC.: Expression in *Escherichia coli* of large genomic segment of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* 179: 16-25 1990.
 - 44) Magyar G, Dobos P.: Evidence for the detection of the infectious pancreatic necrosis virus polyprotein and the 17-kDa polypeptide in infected cells and of the NS protease in purified virus. *Virology* 204: 580-589, 1994.
 - 45) Rogel A, Benvenisti L, Sela I, Edelbaum O, Tanne E, Shachar Y, Zanberg Y, Gontmakher T, Khayat E, Stram Y.: Vaccination with *E. coli* recombinant empty viral particles of infectious bursal disease virus (IBDV) confer protection. *Virus Gene* 27: 169-175, 2003.
 - 46) Espinoza JC, A Hjalmarsson, E Everitt, J Kuznar.: Temporal and subcellular localization of infectious pancreatic necrosis virus structural proteins. *Arch. Virol.* 145: 739-748, 2000.
 - 47) Romero-Brey I, WN Batts, I Bandin, JR Winton, CP Dopazo.: Molecular characterization of birnaviruses isolated from wild marine fishes at the Flemish Cap (Newfoundland). *Dis Auat Org* 61: 1-10, 2004.
 - 48) Tacke MG, PJ Rottier, AL Gielkens, BP Peeters.: Interactions in vivo between the proteins of infectious bursal disease virus: capsid protein VP3 interacts with the RNA-dependent RNA polymerase, VP1. *J Gen Virol* 81: 209-218, 2000.
 - 49) Tacke MGJ, Peeters BPH, Thomas AAM, Rottier PJM, Boot HJ.: Infectious bursal disease virus capsid protein VP3 interacts both with VP1, the RNA-dependent RNA polymerase, and with viral double-stranded RNA. *J Virol* 76: 11301-11311, 2002.
 - 50) Kochan G, D Gonzalez, J. Rodriguez.: Characterization of the RNA-binding activity of VP3, a major structural protein of Infectious bursal disease virus. *Arch Virol* 148: 723-744, 2003.
 - 51) Maraver A, R Clemente, JF Rodriguez, E Lombardo.: Identification and molecular characterization of the RNA polymerase-binding motif of infectious bursal disease virus inner capsid protein VP3. *J Virol* 77: 2459-2468, 2003.
 - 52) Hirayama T, M Imajoh, SI Oshima.: Quantification of aquabirnaviruses isolated from different host species by real-time RT-PCR *Microbiol. Immunol.*, 49(4): 361-371, 2005.
 - 53) Imajoh M, T Hirayama, SI Oshima.: Frequent occurrence of apoptosis is not associated with pathogenic infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) during persistent infection. *Fish & Shellfish Immunology* 18: 163-177, 2005.

The interaction mechanism of marine birnavirus (MABV) in fish cell lines.

Syun-ichirou Oshima, Masayuki Imajoh, and Takeshi Hirayama

Laboratory of Cell Structure and Function, Division of Marine Bioresource Science,
Graduate School of Kuroshio Science, Kochi University, Nankoku Kochi 783-8502, Japan
E-mail:s-oshima@cc.kochi-u.ac.jp

Marine birnavirus (MABV) is a member of the genus Aquabirnavirus of the family Birnaviridae. MABV is an unenveloped icosahedral virus about 60 nm in diameter with two genomes of double-stranded RNA. MABV adsorbed not only onto the cell surfaces of susceptible (CHSE-214 and RSBK-2) cells but also onto resistant (FHM and EPC) cells. Furthermore, the virus entered into the cytoplasm through the endocytotic pathway in CHSE-214, RSBK-2 and FHM cells but did not penetrate EPC cells. The virus was found to bind to an around 250 kDa protein on CHSE-214, RSBK-2, FHM and EPC cells. The syntheses of viral proteins pVP2, NS and VP3 and further proteolytic processing after viral infection were examined by using Western blot analysis. pVP2, NS and VP3 were detected in the cytosolic fractions of CHSE-214, RSBK-2 and FHM cells at 4 h after infection. At this time, VP3 underwent further proteolytic processing in the cytosolic fractions of CHSE-214 and RSBK-2 cells. The expression of pVP2, NS and VP3 increased and pVP2 and NS also underwent further proteolytic processing similar to VP3 in the cytosolic fractions of CHSE-214, RSBK-2 and FHM cells at 8 h after infection. The further proteolytic processing of VP3 was detected in the nuclear fractions of CHSE-214, RSBK-2, but VP3 was detected as a single band in the nuclear fraction of FHM cells. pVP2 and NS were detected as thin bands only in the nuclear fractions of CHSE-214 cells.

The results of Western blot analysis demonstrated that pVP2, NS and VP3 are localized in the nuclear fraction when they were independently expressed in CHSE-214, RSBK-2, FHM and EPC cells. The expression pattern in the cytosolic fraction was identical among the four cell lines when pVP2 and NS were independently expressed. However, pVP2 and NS were not detected in the nuclear fraction of CHSE-214 cells. Further proteolytic processing of VP3 was detected in both cytosolic and nuclear fractions of RSBK-2, FHM and EPC cells (Low level in EPC cell), but not in CHSE-214 cells when VP3 was independently expressed. Then, the processes of preVP2 to form morphological assemblages in the presence of VP3 or the cleavage of VP3 into two proteins in CHSE-214 cells were studied. When preVP2- and VP3 were co-expressed, virion like particles (64 nm, diameter) were observed close to the nuclear membrane by electron microscopy. The co-expression of preVP2 and the cleaved VP3 proteins led to an efficient assembly of tubules (22 nm, diameter).

Further important finds will be obtained by this infection system using 4 fish cell lines in the next couple of years.