

## 2. 酵母を用いた動物ウイルスの研究

森川 裕子

北里大学北里生命科学研究所

大腸菌が原核細胞のモデルであるように、酵母は真核細胞のモデルとしてしばしば用いられる。古くから酵母は詳細に解析され、近年そのゲノムも完全解読された。高等真核細胞との類似性が高くかつ分子遺伝学や分子生物学の解析手法が応用できることから、酵母は真核細胞のモデル細胞として多用されている。こうした酵母細胞で動物ウイルスの複製が再現できることが近年明らかとなってきた。本稿では、酵母の遺伝子発現と酵母における動物ウイルスの複製を概説する。特筆すべきは、酵母における完全なウイルス複製過程の成立と酵母を用いたウイルス様粒子ワクチンの製造である。酵母を用いた近年の研究は、ウイルス複製に関与する宿主因子や宿主機構の同定を中心に展開されており、それらは酵母遺伝学の利用や酵母の全遺伝子破壊株ライブラリを用いた網羅的解析によって推進されている。

### 1. はじめに

酵母 Yeast は単細胞性の fungi であり、厳密にいうと「出芽・分裂によって増殖し、性接合を行う ascomycetous あるいは basidiomycetous fungi」の微生物細胞である。出芽酵母の代表として *Saccharomyces cerevisiae* (パン酵母) が、分裂酵母の代表として *Schizosaccharomyces pombe* がよく知られている。酵母は大腸菌のように取り扱いが簡単な細胞であるにもかかわらず、高等真核細胞との類似性が高くかつ分子生物学・細胞生物学の解析手法が応用できることから、真核細胞のモデル細胞として多用されている。特筆すべきは遺伝子破壊や変異導入などの分子遺伝学（特に、逆遺伝学）である。また、酵母 Two-Hybrid Assay は結合する蛋白質をライブラリから探索する方法としてよく知られているところである。

出芽酵母には内在性 RNA ウイルス (L-A ウイルスやレトロエレメント Ty1-5) が存在することが古くから知られている。これらは細胞外感染経路をもたず、接合などの細胞質混合で伝達される。酵母の細胞外からのウイルス感染を最初に報告したのはタバコモザイクウイルスを用いてで

ある<sup>5)</sup>。下等真核細胞である酵母は細胞壁があるという点では植物細胞であり、植物ウイルスの報告があるのはなるほどと思われる。しかし近年、動物ウイルスの増殖も酵母で再現できることが明らかとなってきた。本稿では、酵母が動物ウイルスの研究にどう利用されているのか、またどう利用できるのか、実例と利用の利点・注意点を概説する。

### 2. 酵母における遺伝子発現

ウイルス研究者にとって、高等真核細胞はウイルスを増殖させるための宿主細胞であり、大腸菌はウイルス遺伝子をクローニングするための細胞である。しかし、酵母には馴染みが薄いと思う。酵母におけるウイルス遺伝子の発現を紹介する前に、酵母自体の遺伝子発現について少し解説する。

#### 1) 酵母の遺伝子発現系

##### ① DNA 複製

出芽酵母は DNA 複製開始部位の構造がわかっている唯一の真核生物である。酵母細胞内で複製開始点となる DNA 配列を自律複製配列 (Autonomously Replicating Sequence: ARS) と呼び、5'-(T/A)TTTA (C/T) (A/G)TTT (T/A)-3' という共通配列が見出されている。ただし、分裂酵母の ARS とは一般的に交換できない。この ARS に加え、分極に関与するセントロメア CEN と染色体安定性に関与するテロメア TEL が染色体機能として必要である。酵母における DNA 複製機構の解析から同様の複製機構がヒト細胞で

#### 連絡先

〒108-8641 東京都港区白金5丁目9番1号  
北里大学北里生命科学研究所  
TEL: 03-5791-6129  
E-mail: morikawa@lisci.kitasato-u.ac.jp

も存在すると推測されている。

## ②転写

酵母から動物細胞まで、DNA 依存性 RNA ポリメラーゼの基本的な構造や機能は共通であり、酵母 RNA ポリメラーゼは Pol A, B, C (動物細胞の Pol I, II, III に相当) と呼ばれている。mRNA の 5' 末端には m<sup>7</sup>GpppN のキャップ構造が付加され、モノシストロニックである。

動物細胞に比べ、出芽酵母の遺伝子にはイントロン-エクソン構造が少ない (約 3%)。スプライシング機構は動物細胞の場合とほとんど同じであるが、スプライシングシグナルの配列がやや異なる。分裂酵母では遺伝子の 3-4 割がイントロンをもつ。

## ③翻訳

原核生物では翻訳開始点の上流にリボソーム結合部位が存在するのに対し、酵母を含め真核生物ではそれが認められない。また酵母では、転写開始点と翻訳開始コドン AUG の間の距離は長くても短くても翻訳レベルは変わらない。しかしながら、mRNA の 2 次構造 (特に、G と多く含む配列) は翻訳を強く阻害する。高等真核細胞では翻訳開始コドン AUG の周辺には Kozak のコンセンサス配列 CCACCAUGGC が認められるが、酵母ではこれが AAAAAAUGUCU である<sup>13)</sup>。ただし、変異させても翻訳効率の低下はわずかである<sup>3)</sup>。酵母のリボソームは一度翻訳を終結すると翻訳を再開できないといわれている。

## 2) 酵母におけるウイルス遺伝子の発現

### ①ウイルス遺伝子の複製・転写

一般的に DNA ウイルスの遺伝子の複製は、ウイルスゲノム長が短いウイルス (パポーバ科やパルボ科) では宿主細胞酵素系への依存性が高く、宿主の DNA ポリメラーゼを利用する。転写はポックス科を除いてすべての DNA ウイルスが宿主細胞の RNA Pol II に依存している。出芽酵母における DNA ウイルスの複製・転写は、最も宿主細胞依存性が高いと思われるパポーバ科のパピローマウイルスを用いて成功している<sup>2, 22, 49, 50)</sup>。酵母細胞内で安定して複製するには自律複製配列 ARS が必要であるが、パピローマウイルス DNA の L1-LCR 領域に酵母細胞内での自律複製に関与する配列<sup>22)</sup> つまり弱いながらも ARS との塩基配列相同性のある部位が見出されている<sup>49)</sup>。この酵母におけるウイルス mRNA の転写を直接証明した報告はないが、驚くべきことに、細胞壁を消化した酵母スフェロプラスト細胞にパピローマウイルス粒子を取り込ませると、ウイルスゲノム DNA がパッケージングされた感染性ウイルス粒子が回収されることから<sup>50)</sup>、酵母細胞で完全なウイルス複製過程が進行すると思われる。

出芽酵母における (+) 鎖 RNA ウイルスの複製・転写は、この分野の第 1 人者である P. Ahlquist らが植物ウイルスのプロモモザイクウイルス (BMV) を用いて精力的に

解析している。このウイルスの蛋白質 1a (RNA helicase とキャッピング機能をもつ) と蛋白質 2a (RNA 依存性 RNA 合成酵素) を共発現させた酵母細胞では、これら蛋白質がウイルスゲノム RNA と複合体を形成し、転写・複製がおこることが明らかになっている<sup>12, 19, 20, 39, 46)</sup>。さらに、酵母細胞における完全なウイルス複製過程がノダ科の昆虫ウイルスを用いて示されており、感染性ウイルス粒子が回収されている<sup>36, 37, 38)</sup>。これに対し、(-) 鎖 RNA ウイルスの複製・転写について詳細な報告はないが、水泡性口炎ウイルス (VSV) 粒子を取り込ませた酵母スフェロプラスト細胞ではウイルス蛋白質の発現が観察されている。ただし、その著者らはウイルスゲノムが複製されたとはあまり考えていないようである<sup>27)</sup>。

### ②ウイルス mRNA の翻訳

上記のように、酵母で感染性ウイルスが産生されることから、間接的ではあるが、多くのウイルス mRNA は正確に翻訳されると考えられる。気をつけねばならない点は Internal Ribosome Entry Site (IRES) である。上述したように、酵母では転写開始点と翻訳開始点の距離はさほど問題ではないが、mRNA の 2 次構造は翻訳に致命的である。そのせいなのか不明だが、酵母においてはヒト C 型肝炎ウイルス (HCV) IRES の翻訳成功例<sup>17, 40)</sup> とポリオウイルス IRES の翻訳不成功例<sup>6)</sup> が報告されている。後者の不成功例では、酵母細胞から La 自己抗原の IRES への結合を阻害する 60 塩基長 RNA が見出されている<sup>7, 8, 9)</sup>。筆者らもヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) mRNA が酵母で翻訳されないことを見出している。ウイルス mRNA と酵母の RNA helicase との相性も指摘されている<sup>33)</sup>。

## 3. 酵母を用いた蛋白質発現とその応用

酵母は真核細胞のモデルとして代用されるだけでなく、蛋白質産生の細胞としても利用されてきた。異種蛋白質発現のための酵母の遺伝子操作については多くの総説があると思うのでそれを参考にしてほしい。入門書としては柴垣と水本による総説「酵母発現系とその実際」がわかりやすい<sup>42)</sup>。

蛋白質発現のための細胞として、大腸菌や高等真核細胞など様々な細胞が用いられる。表 1 にそれらの特徴をまとめた。酵母も大腸菌と同じで操作は簡単であり、寒天プレートで形質転換コロニーを形成させ、これを液体培地で大量に振盪培養する。ただし、酵母の生育は大腸菌より遅いので各ステップは overnight ではなく 2 日はかかる。酵母の欠点として、①分厚い細胞壁をもつので細胞粉砕が困難である、②蛋白質分解酵素の活性が高く蛋白質を精製しづらい、③さほど発現量が高くないなどが挙げられる。昆虫細胞や哺乳類細胞での発現は、transfection による一過性発現 (大量発現に不向き) か、transfectant の細胞株を樹立する (時間がかかる) かであり、そうでなければウイル

表 1 蛋白質発現系の比較

	大腸菌	酵母	昆虫細胞	哺乳類細胞
培養形式	浮遊	浮遊	浮遊	接着
細胞倍加時間	30 分	90-180 分	24 時間	24 時間以上
蛋白質発現量	大	小	中	極小
蛋白質の翻訳後修飾				
糖鎖付加	なし	マンナン型	高マンノース型	複合型
リン酸化	His, Asp	Ser, Thr, Tyr	Ser, Thr, Tyr	Ser, Thr, Tyr
アシル化	なし	あり	あり	あり

スペクターに因らねばならないという難点があり、選択に迷うところである。

大腸菌とは異なる利点として、酵母では翻訳後修飾がおこることが挙げられる。ただし、酵母における糖鎖付加は問題で、その付加シグナル配列は高等真核細胞と同じであるが、マンナンと呼ばれる巨大なマンノースポリマー構造が形成される。例えば、HIV-1 のエンベロープ蛋白 gp120 (高等真核細胞では 120kDa の蛋白質として生成されこの分子量の約半分を糖鎖が占める) を酵母で発現させると 600kDa 以上になり抗体で認識されない<sup>14)</sup>。しかし、糖鎖付加部位が少ない場合は活性あるエンベロープ蛋白となるようで、VSV G 蛋白を発現させた酵母スフェロプラスト細胞では膜融合による多核巨細胞が形成される<sup>27)</sup>。酵母における糖鎖付加のもう 1 つの問題は、複合型の糖鎖付加がおこらないことである (ただし、この点は昆虫細胞で発現させた場合も同じで、昆虫細胞でも複合型の糖鎖付加はおこらない)。こうした問題点を解決する目的で、糖鎖改変酵母株の分子育種がさかんに行われている。すなわち、マンナン型糖鎖ができないように酵母染色体遺伝子 (OCH1, MNN1, MNN4 遺伝子など) を破壊し、さらに複合型糖鎖が生成されるようヒト遺伝子 (Mannosidase I, II を含む 7 つの遺伝子) を導入した酵母株の作出が試みられている<sup>4, 21, 32)</sup>。ヒト遺伝子をもたせた酵母株はまだ市販されていないが、酵母の糖鎖遺伝子破壊株は American Type Culture Collection (ATCC) から入手できる。

酵母の蛋白質発現系が大変有用であると認識されたのは、酵母を用いたヒト B 型肝炎ウイルス (HBV) ワクチンの製造によってである。当時はヒト感染血清から危険を冒しながら HBV 粒子を精製しそれを不活化してワクチンとしていた。しかし、P. Valenzuela らは HBV の表面抗原である HBsAg を酵母で発現させたところ、球状の HBsAg 粒子が形成されていることを見出した<sup>31, 45)</sup>。さらに、その細胞破碎液から精製したウイルス様粒子 (VLP) はヒト感染血

清由来不活化ワクチンと同等の力価をもつことが明らかにされ<sup>29)</sup>、現行の HBV ワクチンとなっている。酵母細胞における VLP 形成はパピローマウイルス<sup>15, 16)</sup> や BMV<sup>23)</sup> でも報告されている。また近年、HIV-1 でも示され<sup>41)</sup>、その VLP の免疫原性が検討されている<sup>43)</sup>。

### 3. 酵母における細胞生物学

#### 1) 細胞の構造と機能

酵母は核と細胞質が核膜で分離された真核細胞であるが、①有糸分裂の時も核膜 (ラミンの裏打ち構造はない) が消失しないこと、②細胞は厚い細胞壁に覆われていることが、動物細胞との決定的な違いである。しかし、その他の細胞内構造はよく似ている。粗面小胞体は核膜と連続したものと、網状のネットワークが形質膜近くに存在する。ゴルジ装置はシス・ミディウム・トランスに分かれた層状構造として認められる。初期エンドソームや後期エンドソームの存在も知られており、液胞は動物細胞のリソソームに相当する。酵母オルガネラマーカーの抗体は Molecular Probes から市販されている。

#### 2) 酵母細胞におけるウイルス蛋白質の動態

ウイルスの吸着・侵入過程の解析に酵母を積極的に用いた研究は少ない。酵母には細胞壁があるからである。しかしながら、酵母は細胞壁を除去しても活発にエンドサイトーシスがおこる細胞であり、それによると思われる酵母スフェロプラスト細胞へのウイルス感染成立が、パピローマウイルス<sup>49, 50)</sup> と VSV<sup>26, 28)</sup> で報告されている。特に VSV では、その感染成立が温度依存性・低 pH 依存性の膜融合によることが明らかにされている<sup>28)</sup>。

ウイルス蛋白質の細胞内輸送や局在は、その蛋白質がエンベロープ蛋白か、キャプシド蛋白か、複製・転写酵素かによって様々だが、それぞれ酵母でも解析されている。例えば、一般的に (+) 鎖 RNA ウイルスの RNA 依存性 RNA 合

成酵素は細胞内の膜小器官に結合して複製・転写複合体を形成するが、どの膜小器官に targeting するかは個々のウイルスによって異なっている。この膜小器官に対する特異性は酵母細胞でも再現され、かつこの複製・転写複合体を人為的に本来とは異なる膜小器官に retargeting させても活性ある複製・転写複合体として維持されることから、この膜小器官特異性はゲノムの複製・転写に必要な現象ではなく、その他の段階(ゲノムのパッケージングやアセンブリー)に必要な現象だと考えられるようになってきた<sup>25,30)</sup>。

脂質二重膜をもたないウイルスでは、ウイルス粒子は細胞質内で形成され細胞破壊によって放出される。これに対し、脂質二重膜をもつウイルスでは、キャプシド蛋白が小胞体やゴルジ体あるいは形質膜に targeting し粒子を形成しながら出芽する。筆者らはこのようなウイルスキャプシド蛋白の膜 targeting を酵母で解析し、HIV-1 のキャプシド蛋白が形質膜に targeting し、細胞壁を除去すると VLP が出芽することを報告している<sup>41)</sup>。

#### 4. 酵母遺伝学の利用

酵母をウイルスの宿主細胞として使用する、その真価は酵母の分子遺伝学(特に、逆遺伝学)の利用にあるといっても過言でないと思う。ウイルスは細胞内寄生物であり、その増殖過程において様々な宿主因子を利用する。こうした宿主因子を同定する目的で、ウイルスの研究に染色体遺伝子を破壊させた酵母株を宿主として用いる実験である。

##### 1) 遺伝子破壊株の利用

酵母は相同組換えの頻度が非常に高い生物であり、酵母の染色体遺伝子をクローニングしその遺伝子を改変(欠損

や点変異を導入)して再び酵母の染色体に戻すと、遺伝子改変の酵母が作出できる。自分が調べたい宿主因子がある程度予想できるならば、こうした遺伝子改変酵母株を分与してもらるか(大抵もらえる)あるいは作成して実験に使ってみると良い。筆者らも細胞内輸送に関連する遺伝子破壊株を分与してもらい実験に使っている。

##### 2) 突然変異株の分離

しかし、調べたい宿主因子が予想できない場合にはもっと積極的なアプローチが必要となる。すなわち、エチルメタン硫酸やニトロソグアニジンあるいは紫外線照射によって突然変異を誘発し、ウイルス増殖を許容しなくなった酵母細胞を分離する試みである。知恵を絞らねばならないのはその突然変異株の選択方法である。最も理想的なのは、ウイルス増殖を許容しなくなった突然変異株だけが生育してくるといった条件設定であるが、そんなに都合良くいかない。ウイルス遺伝子あるいはウイルス蛋白を薬剤耐性や栄養要求性のマーカーで標識し、それを指標に突然変異株を分離するのが現実的である。ただし、こうした変異誘発で分離された突然変異株は、その表現型が単一遺伝子の変異によるものか、戻し交配と四分体解析が必要となることが多い。前者は突然変異株と親株の backcross でまだ簡単だが、後者は慣れないと難しい。次に、その遺伝子を同定する。酵母では突然変異株が得られた場合、その遺伝子を特定するのは比較的容易である。酵母の遺伝子ライブラリを導入してその突然変異を相補するのである。すなわち、その突然変異株に親株のゲノム DNA ライブラリを導入し突然変異の表現型が打ち消されたものを分離するか(その突然変異が劣性の場合)(図1)、逆に、親株に突然変異株

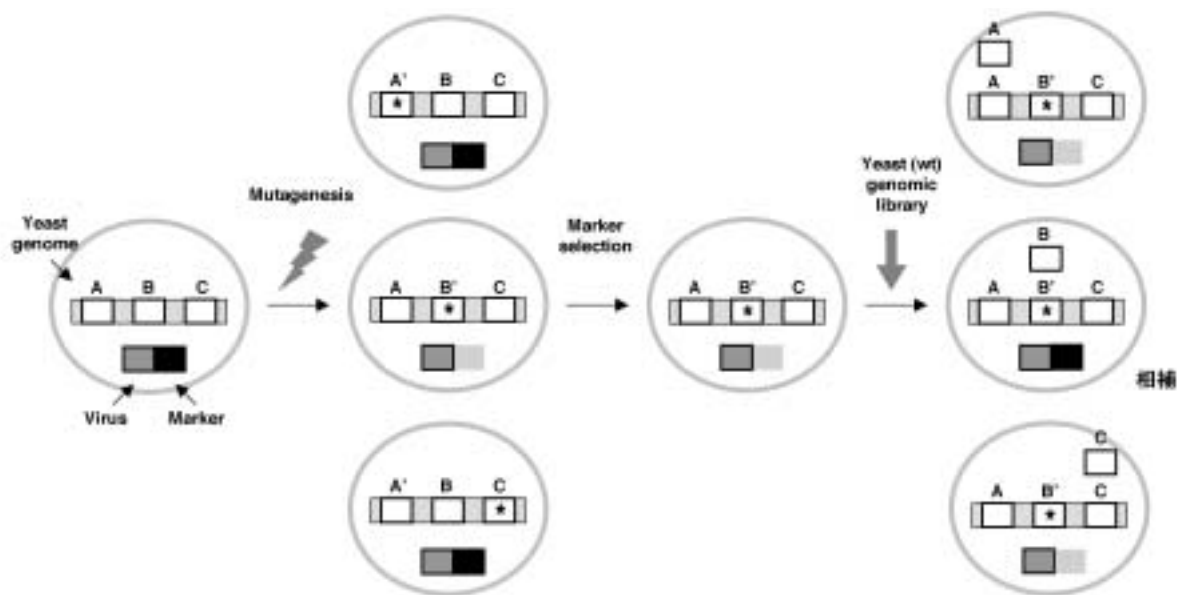


図1 酵母相補性試験による遺伝子の同定

のゲノム DNA ライブラリを導入し突然変異の表現型が出現したものを分離する（その突然変異が優性の場合）。こうした解析方法により、BMV ではウイルス mRNA の安定性に関与する宿主因子 Sm 蛋白<sup>10, 18)</sup> や転写・複製に関する分子シャペロン DNA J<sup>43)</sup> が同定されている<sup>1)</sup>。

### 3) 全遺伝子破壊株ライブラリを用いた網羅的解析

もっと全遺伝子を網羅的に調べたいという要求が出てくるかもしれない。これを可能にするのがここに述べる全遺伝子破壊株ライブラリの利用である。

出芽酵母のゲノム解析は 1988 年より国際共同プロジェクトとして開始され 1996 年に全塩基配列データが公開された。出芽酵母のゲノム長はリボソーム DNA の反復配列の長さによって幅があるものの、12-16 Mbp で真核生物の中で最も短い。出芽酵母のゲノムは 16 本の染色体から構成されており、全 ORF 数は 6000 以上でそれぞれに規則的な ID 番号がついている。出芽酵母のゲノムのデータベースとして <http://mips.gsf.de/genre/proj/yeast/>（欧州マックスプランク研究所）と <http://www.yeastgenome.org/>（米国スタンフォード大学）がある。一方、分裂酵母のゲノムは 14

Mbp であり、3 本の染色体から成り立っている。代表的なデータベースとして [http://www.sanger.ac.uk/Projects/S\\_pombe/](http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_pombe/)（英国サンガーセンター）がある。

これらのポストゲノム研究はすべての遺伝子の体系的機能解析研究であり、出芽酵母では European Functional Analysis Network (EUROFAN) プロジェクトにより全遺伝子破壊株コレクションが作成された。この遺伝子破壊株作製には、PCR 法による遺伝子破壊アレルの作製をベースとしながら、全遺伝子共通配列（約 20 bp）と個別識別のための分子バーコード（約 20 bp）の挿入などの技術を駆使して作製された<sup>11, 48)</sup>（図 2）。この破壊株ライブラリはゲノム解析によって明らかにされた約 6000 個の遺伝子 ORF をそれぞれ薬剤耐性遺伝子で破壊した 1 倍体あるいは 2 倍体のセット（96 穴フォーマット）で、Invitrogen やフナコシを通じて入手できる。この破壊株ライブラリを pooled で用いた場合には、遺伝子同定には蛍光標識分子バーコードをプローブとした DNA マイクロアレイが使用できる<sup>48)</sup>。こうした遺伝子破壊株ライブラリを用いて、細胞形態<sup>34)</sup> やヒト疾患<sup>47)</sup> に関与する遺伝子の high-throughput な解析が始まっている。2003 年にはこの酵母遺伝子破壊株ライブラ

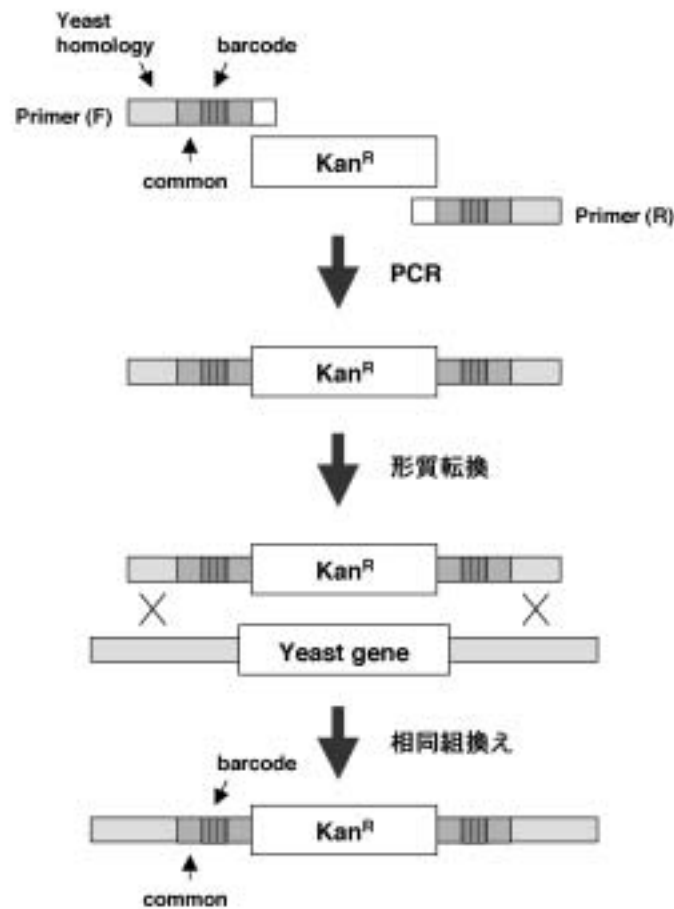


図 2 分子バーコードをもつ酵母遺伝子破壊株の作出法

リ (約 4500 株) を用いて BMV RNA の複製・転写に関与する宿主因子の網羅的解析が行われ, 約 100 個の宿主因子が発表された<sup>24)</sup>。

#### 4) 全遺伝子破壊株ライブラリ VS siRNA ライブラリ

上述のように, 酵母は真核生物における遺伝学研究を担ってきた。それは酵母では相同組換え頻度が高く gene targeting が容易だったからである。哺乳類細胞における相同組換え頻度は残念ながら今なお低く, 遺伝子破壊株ライブラリを作成できるまでに至っていない。しかし近年, RNA 干渉法による mRNA の knock-down 法が確立され, この技術は哺乳類細胞における標的宿主因子の depletion を可能にした。また, 網羅的解析を目的とした siRNA ライブラリの構築も開始された。それを用いて, VSV によるクラスリン依存性エンドサイトーシスと SV40 によるラフト/カベオラ依存性エンドサイトーシスに関与してくるキナーゼ群が解析されたところ, 調べた 590 個のキナーゼのうち 208 個がこれらのウイルス感染によるエンドサイトーシスに関与していることが明らかとなった<sup>35)</sup>。酵母の遺伝子破壊株か siRNA か, どちらが良いか筆者にはまだ結論が出せない。

### 5. おわりに

筆者はフツウのウイルス研究者であり, 酵母学者ではない。ただ, 当時ラボに来てくれた櫻木小百合博士 (現, 阪大微研) と「酵母から HIV-1 の粒子を出芽させる」といった実験を組んだことから酵母も扱うようになった。そうした経験から, ウイルス研究者が酵母に対して疑問に思うことや不安に思うことはできる限り書いたつもりであるが, 書き漏らしはあると思うし, 酵母学としては体系的に書いていないと思う。また, 酵母 Two-Hybrid Assay とその細胞質内 Assay バージョンである酵母 CytoTrap Two-Hybrid Assay の利用については紙面 (時間か?) の関係から書けなかった。これらの点はどうぞお許しいただければと願う。足りない点などご指摘いただければ幸いである。

### 文 献

- 1) Ahlquist P, Noueir AO, Lee WM, Kushner DB, Dye BT. : Host factors in positive-strand RNA virus genome replication. *J Virol* 77: 8181-8186, 2003.
- 2) Angeletti PC, Kim K, Fernandes FJ, Lambert PF. : Stable replication of papillomavirus genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Virol* 76: 3350-3358, 2002.
- 3) Baim SB, Sherman F. : mRNA structures influencing translation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 8: 1591-1601, 1988.
- 4) Chiba Y, Sakuraba H, Kotani M, Kase R, Kobayashi K, Takeuchi M, Ogasawara S, Maruyama Y, Nakajima T, Takaoka Y, Jigami Y. : Production in yeast of alpha-galactosidase A, a lysosomal enzyme applicable to enzyme replacement therapy for Fabry disease. *Glycobiol* 12: 821-828, 2002.
- 5) Coutts RH, Cocking EC, Kassanis B. : Infection of protoplasts from yeast with tobacco mosaic virus. *Nature* 240: 466-467, 1972.
- 6) Coward P, Dasgupta A. : Yeast cells are incapable of translating RNAs containing the poliovirus 5' untranslated region: evidence for a translational inhibitor. *J Virol* 66: 286-295, 1992.
- 7) Das S, Coward P, Dasgupta, A. : A small yeast RNA selectively inhibits internal initiation of translation programmed by poliovirus RNA: specific interaction with cellular proteins that bind to the viral 5'-untranslated region. *J Virol* 68: 7200-7211, 1994.
- 8) Das S, Kenan DJ, Bocskai D, Keene JD, Dasgupta A. : Sequences within a small yeast RNA required for inhibition of internal initiation of translation: interaction with La and other cellular proteins influences its inhibitory activity. *J Virol* 70: 1624-1632, 1996.
- 9) Das S, Ott M, Yamane A, Tsai W, Gromeier M, Lahser F, Gupta S, Dasgupta A. : A small yeast RNA blocks hepatitis C virus internal ribosome entry site (HCV IRES)-mediated translation and inhibits replication of a chimeric poliovirus under translational control of the HCV IRES element. *J Virol* 72: 5638-5647, 1998.
- 10) Diez J, Ishikawa M, Kaido M, Ahlquist P. : Identification and characterization of a host protein required for efficient template selection in viral RNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 3913-8, 2000.
- 11) Giaever G, Chu AM, Ni L, Connelly C, Riles L, Veroneau S, Dow S, Lucau-Danila A, Anderson K, Andre, B et al. : Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 418: 387-391, 2002.
- 12) Gopinath K, Dragnea B, Kao C. : Interaction between Brome mosaic virus proteins and RNAs: effects on RNA replication, protein expression, and RNA stability. *J Virol* 79: 14222-14234, 2005.
- 13) Hamilton R, Watanabe CK, de Boer HA. : Compilation and comparison of the sequence context around the AUG startcodons in *Saccharomyces cerevisiae* mRNAs. *Nucleic Acids Res* 15: 3581-3593, 1987.
- 14) Hitzeman RA, Chen CY, Dowbenko DJ, Renz ME, Liu C, Pai R, Simpson NJ, Kohr WJ, Singh A, Chisholm V. : Use of heterologous and homologous signal sequences for secretion of heterologous proteins from yeast. *Methods Enzymol* 185: 421-440, 1990.
- 15) Hofmann KJ, Cook JC, Joyce JG, Brown DR, Schultz LD, George HA, Rosolowsky M, Fife KH, Jansen KU. : Sequence determination of human papillomavirus type 6a and assembly of virus-like particles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Virology* 209: 506-518, 1995.
- 16) Hofmann KJ, Nepper MP, Markus HZ, Brown DR, Muller M, Jansen KU. : Sequence conservation within the major capsid protein of human papillomavirus (HPV) type 18 and formation of HPV-18 virus-like particles in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Virol* 77: 465-468, 1996.
- 17) Iizuka N, Najita L, Franzusoff A, Sarnow P. : Cap-dependent and cap-independent translation by internal initiation of mRNAs in cell extracts prepared from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 14: 7322-

- 7330, 1994.
- 18) Ishikawa M, Diez J, Restrepo-Hartwig M, Ahlquist P. : Yeast mutations in multiple complementation groups inhibit brome mosaic virus RNA replication and transcription and perturb regulated expression of the viral polymerase-like gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 13810-13815, 1997.
  - 19) Janda M, Ahlquist P. : RNA-dependent replication, transcription, and persistence of brome mosaic virus RNA replicons in *S. cerevisiae*. *Cell* 72: 961-970, 1993.
  - 20) Janda M, Ahlquist P. : Brome mosaic virus RNA replication protein 1a dramatically increases in vivo stability but not translation of viral genomic RNA3. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 2227-2232, 1998.
  - 21) 地神芳文, 貝沼真美 : 出芽酵母の分子育種による糖鎖の改変. *蛋白質 核酸 酵素* 43: 2604-2610, 1998.
  - 22) Kim K, Angeletti PC, Hassebroek, EC, Lambert, PF. : Identification of cis-acting elements that mediate the replication and maintenance of human papillomavirus type 16 genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Virol* 79: 5933-5942, 2005.
  - 23) Krol MA, Olson NH, Tate J, Johnson JE, Baker TS, Ahlquist P. : RNA-controlled polymorphism in the in vivo assembly of 180-subunit and 120-subunit virions from a single capsid protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 13650-13655, 1999.
  - 24) Kushner DB, Lindenbach BD, Grdzlishvili VZ, Noueiry AO, Paul SM, Ahlquist P. : Systematic, genome-wide identification of host genes affecting replication of a positive-strand RNA virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 15764-15769, 2003.
  - 25) Lee WM, Ahlquist P. : Membrane synthesis, specific lipid requirements, and localized lipid composition changes associated with a positive-strand RNA virus RNA replication protein. *J Virol* 77: 12819-12828, 2003.
  - 26) Makarow M. : Endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*: internalization of enveloped viruses into spheroplasts. *EMBO J* 4: 1855-1860, 1985.
  - 27) Makarow M, Nevalainen LT, Kaariainen L. : Expression of the RNA genome of an animal virus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 8117-8121, 1986.
  - 28) Makarow M, Sareneva H, von Bonsdorff CH. : Characterization of the fusion of enveloped viruses with the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae* spheroplasts. *J Biol Chem* 262: 1836-1841, 1987.
  - 29) McAleer WJ, Buynak EB, Maigetter RZ, Wampler DE, Miller WJ, Hilleman MR. : Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature* 307: 178-180, 1984.
  - 30) Miller DJ, Schwartz MD, Dye BT, Ahlquist P. : Engineered retargeting of viral RNA replication complexes to an alternative intracellular membrane. *J Virol* 77: 12193-12202, 2003.
  - 31) Miyanohara A, Toh-e A, Nozaki C, Hamada F, Ohtomo N, Matsubara K. : Expression of hepatitis B surface antigen gene in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 1-5, 1983.
  - 32) 仲山賢一, 千葉靖典, 地神芳文 : ヒト適応型糖タンパク質を生産する出芽酵母の分子育種. *Trends in Glycosci Glycotechnol* 13 : 421-431, 2001.
  - 33) Noueiry AO, Chen J, Ahlquist P. : A mutant allele of essential, general translation initiation factor DED1 selectively inhibits translation of a viral mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 12985-12990, 2000.
  - 34) Ohya Y, Sese J, Yukawa M, Sano F, Nakatani Y, Saito TL, Saka A, Fukuda T, Ishihara S, Oka S et al. : High-dimensional and large-scale phenotyping of yeast mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 19015-19020, 2005.
  - 35) Pelkmans L, Fava E, Grabner H, Hannus M, Habermann B, Krausz E, Zerial M. : Genome-wide analysis of human kinases in clathrin- and caveolae/raft-mediated endocytosis. *Nature* 436: 78-86, 2005.
  - 36) Price BD, Ahlquist P, Ball LA. : DNA-directed expression of an animal virus RNA for replication-dependent colony formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Virol* 76: 1610-1616, 2002.
  - 37) Price BD, Roeder M, Ahlquist P. : DNA-Directed expression of functional flock house virus RNA1 derivatives in *Saccharomyces cerevisiae*, heterologous gene expression, and selective effects on subgenomic mRNA synthesis. *J Virol* 74: 11724-11733, 2000.
  - 38) Price BD, Rueckert RR, Ahlquist P. : Complete replication of an animal virus and maintenance of expression vectors derived from it in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 9465-9470, 1996.
  - 39) Quadt R, Ishikawa M, Janda M, Ahlquist P. : Formation of brome mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase in yeast requires coexpression of viral proteins and viral RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 4892-4896, 1995.
  - 40) Rosenfeld AB, Racaniello V R. : Hepatitis C virus internal ribosome entry site-dependent translation in *Saccharomyces cerevisiae* is independent of polypyrimidine tract-binding protein, poly(rC)-binding protein 2, and La protein. *J Virol* 79: 10126-10137, 2005.
  - 41) Sakuragi, S, Goto, T, Sano, K, Morikawa, Y. : HIV type 1 Gag virus-like particle budding from spheroplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 7956-7961, 2002.
  - 42) 柴垣芳夫, 水本清久 : 酵母発現系とその実際. *タンパク実験プロトコール1 機能解析編* (秀潤社) : 63-88.
  - 43) Tsunetsugu-Yokota Y, Morikawa Y, Isogai M, Kawana-Tachikawa A, Odawara T, Nakamura T, Grassi F, Autran B, Iwamoto A. : Yeast-derived human immunodeficiency virus type 1 p55 (gag) virus-like particles activate dendritic cells (DCs) and induce perforin expression in Gag-specific CD8 (+) T cells by cross-presentation of DCs. *J Virol* 77: 10250-10259, 2003.
  - 44) Tomita Y, Mizuno T, Diez J, Naito S, Ahlquist P, Ishikawa M. : Mutation of host DnaJ homolog inhibits brome mosaic virus negative-strand RNA synthesis. *J Virol* 77: 2990-2997, 2003.
  - 45) Valenzuela P, Medina A, Rutter WJ, Ammerer G, Hall BD. : Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature* 298: 347-350,

- 1982.
- 46) Wang X, Lee WM, Watanabe T, Schwartz M, Janda M, Ahlquist P. : Brome mosaic virus 1a nucleoside triphosphatase/helicase domain plays crucial roles in recruiting RNA replication templates. *J Virol* 79: 13747-13758, 2005.
- 47) Willingham S, Outeiro TF, DeVit MJ, Lindquist SL, Muchowski PJ. : Yeast genes that enhance the toxicity of a mutant huntingtin fragment or alpha-synuclein. *Science* 302: 1769-1772, 2003.
- 48) Winzeler EA, Shoemaker DD, Astromoff A, Liang H, Anderson K, Andre B, Bangham R, Benito R, Boeke JD, Bussey H et al. : Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* 285: 901-906, 1999.
- 49) Zhao KN, Frazer IH. : Replication of bovine papillomavirus type 1 (BPV-1) DNA in *Saccharomyces cerevisiae* following infection with BPV-1 virions. *J Virol* 76: 3359-3364, 2002.
- 50) Zhao KN, Frazer IH. : *Saccharomyces cerevisiae* is permissive for replication of bovine papillomavirus type 1. *J Virol* 76: 12265-12273, 2002.

## Study of animal viruses in yeast

**Yuko MORIKAWA**

Kitasato University  
Shirokane 5-9-1, Minato-ku, Tokyo 108-8641  
(E-mail: morikawa@lisci.kitasato-u.ac.jp)

Yeast is often considered to be a model eukaryotic organism, in a manner analogous to *E. coli* as a model prokaryotic organism. Yeast has been extensively characterized and the genomes completely sequenced. Despite the small genome size, yeast displays most of features of higher eukaryotes. The facts that most of cellular machinery is conserved among different eukaryotes and that the powerful technologies of genetics and molecular biology are available have made yeast model eukaryotic cells in biological and biomedical sciences including virology. Cumulative data indicate that yeast can be a host for animal viruses. I briefly describe yeast gene expression and review viral replication in yeast. Great discovery include complete replication of animal viruses and production of virus-like particle vaccines in yeast. Current studies on yeast focus on identification of host factors and machinery used for viral replication. The studies are based on traditional yeast genetics and genome-wide identification using a complete set of yeast deletion strains.