3. 酵母を用いた Two-hybrid system の ウイルス学分野での利用法

川口 寧

(東京医科歯科大学難治疾患研究所ウイルス免疫疾患部門腫瘍ウイルス)

1. はじめに

生体内のタンパク質のほとんどはそれ唯一では機能をもちえない。つまり、タンパク質は他のタンパク質と相互作用することによってはじめて生理学的に機能を発揮する。そういった点において、タンパク質間の相互作用を研究することはいかなる分野の生物学を研究する者にとっても重要である。ウイルス研究も同様であり、ウイルス因子はそれ単独では機能せず、他のウイルス因子や宿主細胞因子と相互作用することによってその機能を発現していると考えられる。さらに、ウイルスはそれ自体では複製できないという性質ゆえに、ウイルス因子を様々な宿主細胞制御機構と相互作用させその活性を制御していると考えられる。よってウイルス自体およびそれによって引き起こされる病態を根本的に理解するにはウイルスがどの宿主細胞機構と相互作用し、それをどの様に制御する(のっとる)かを知ることが必須となってくる。その第一歩がウイルス因子が相互作用する宿主細胞因子の同定であることは明白であるので、タンパク質間の相互作用検出、特にウイルス因子と宿主細胞因子の相互作用はウイルス研究においては大きな意義をもつ。過去に、免疫沈降法、GST-Pull Down 法といったテクニックが開発され、タンパク質間相互作用の検出が試みられてきた。しかし、これらには特異性に問題を有することが多く、また、目的タンパク質と相互作用する未知のタ

ンパク質を探索する際には、タンパク質精製、マイクロペプチドシーケンス、それを基にした cDNA ライブラリーのスクリーニングといった気の重い実験を行わなければならないという欠点があった。また、このようなスクリーニング系として West-Western 法があるが、大腸菌を用いた系なので目的のタンパク質が真核細胞の翻訳後修飾を受けた時のみにその相互作用が検出できる場合には適さないといった欠点があった。この様な状況の中、本稿で紹介する酵母を用いた Two-hybrid system が今より約10年前に Fields 等によって開発された⁷⁾。本システムは今までの実験系の短所の多くを補うものであり、また、この10年間で改良が重ねられ、簡便な“Kit”等も発売されたので、世界中の多くの研究室に一気に普及した。本稿では、酵母を用いた Yeast two-hybrid 法を筆者の実験の実験データに基に概説したい。なお、詳細な実験法のプロトコル等は他に多くの総説が出版されているのでそれらを参照していただきたい^{8,15,16)}。

2. 酵母 Two-hybrid system とは？

2-1 酵母 Two-hybrid 法の原理

図1Aに酵母 Two-hybrid 系の原理を表す模式図を示す。酵母 two-hybrid 法はタンパク質のドメイン構造を利用した系である。GAL 4 ははじめとする転写因子は、プロモーター上の特異配列を認識する DNA 結合ドメインと基本転写因子群と相互作用し実際に転写を活性化させる活性化ドメインより構成されている。興味深いことに、転写因子はこれら2つのドメイン間の距離に比較的影響されずに機能する。この性質を利用して相互作用を調べたい2種類のタンパク質を GAL 4 のそれぞれ異なる機能ドメインとの融合タンパク質として発現させる。すると、2種類のタンパク質が相互作用する場合にはその複合体が転写因子

Application of Yeast Two-Hybrid System in Virology
Yasushi Kawaguchi

Department of Tumor Virology, Division of Virology and Immunology, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45, Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8510, Japan.

〒113-8510 東京都文京区湯島 1-5-45

図1 酵母 Two-hybrid 法

(A) 酵母 Two-hybrid 法の原理。(B) 酵母 Two-hybrid 法を用いたウイルス因子と宿主細胞因子との相互作用の解析の手順。(C) 酵母 Two-hybrid screening における代表的な偽陽性例。

として機能し、酵母に組み込まれているリポーター遺伝子 (lacZ, HIS 3) を活性化する。そのリポーター遺伝子産物の活性 (β-ガラクトシダーゼ活性、ヒスチジン要求性) を指標にすることにより相互作用の検出が可能である。現在では、1つの酵母に2つのリポーター遺伝子が組み込まれているのが一般的であるので、ヒスチジン欠損培地で生育可能であるか、または、X-Gal 添加によりコロニーが青く染まるかによって相互作用を検出する。

この系は、目的のタンパク質と相互作用するタンパ

ク質のスクリーニングにも威力を発揮する。この場合、まず目的のタンパク質をコードする cDNA を GAL 4 の DNA 結合ドメインと融合したかたちで酵母に導入し発現させる。その後、GAL 4 の活性化ドメインと融合するかたちで構築した cDNA ライブラリーを酵母に導入し、ヒスチジン欠損培地で生育可能でかつ X-Gal 添加で青く発色するコロニーを単離するといったダブルセレクションを行い、目的のタンパク質と相互作用する cDNA を有しているコロニーを単離する。

2-2 Two-hybrid 法の長所

この系の長所は以下の3つである。

(i) 生理的条件に近い条件で、比較的弱い、または、トランジェントな相互作用の検出が可能である。

この系は免疫沈降等のように、複合体を検出するのに界面活性剤を用いて細胞抽出液を作製するという矛盾した操作が無く、また、真核細胞である酵母を用いるので哺乳細胞のような高等真核細胞中で起こりうるタンパク質の翻訳後修飾等がある程度期待される。よって相互作用の検出感度は非常に高いと考えられている。

(ii) 目的のタンパク質の cDNA クローンさえあればタンパク質の精製、マイクロシーケンスを経なくても、相互作用するタンパク質の cDNA を同定することが可能である。

(iii) 高価な設備は必要なく、また、比較的短期間で実験が終了する。

必要最小限な設備は酵母培養用の30度のインキュベーターとシェイカーのみである。エレクトロポレーターがあると酵母からの cDNA プラスミドの単離が楽になるが、必ずしも必須ではない。また、既知の cDNA クローンがコードするタンパク質間の相互作用の確認・定量化ならば1週間程度、未知の結合タンパクをスクリーニングする場合でも市販の cDNA ライブラリーを利用すれば2～3カ月でスクリーニングは完了する。

3. 酵母 Two-hybrid 法の実際

図1Bに酵母 Two-hybrid 法を利用したウイルス因子と相互作用する宿主細胞因子同定のフローチャートを示す。我々は基本的には Clontech 社の販売する“Kit”, MATCHMAKER Two-hybrid system のプロトコールに従って実験を行っている。実験を始めるのに当たって、“酵母は大腸菌とは大きく異なる”ということを認識することが肝要である。酵母を扱ったことのない場合には、出芽酵母のエキスパートや Two-hybrid 系を実際に動かしている人にちょっとした“酵母の扱い方のコツ”を聞いておくとい非常に役に立つ。以下に Two-hybrid 法の実際を我々が過去に行ったスクリーニングの結果をもとに解説する。

我々は、Two-hybrid 法を用いて単純ヘルペスウイルス1型 (HSV-1) の制御因子である ICP0 と相互作用する宿主細胞因子の同定を試みた。ICP0 は HSV-1 の lytic な感染時の遺伝子発現を制御しているだけでなく、潜伏感染からの再活性化をも制御していると

考えられている重要なウイルス制御因子である^{5,13,14,18}。これまで、ICP0 は転写レベルでのみ HSV-1 の遺伝子発現を制御すると考えられていた。しかし、以下に述べる我々の報告¹¹も含め ICP0 と相互作用する細胞因子が近年次々に同定され、ICP0 が宿主の翻訳⁹、細胞周期¹⁰、タンパク質分解系⁴、転写（筆者等未発表）といった様々な細胞機構を制御する“Multifunctional Protein”であることが明らかにされつつある。

3-1 “Bait” プラスミドの構築

HSV-1 ICP0 は分子量が110kDa と比較的大きなリン酸化タンパク質である。既に、ICP0 の機能ドメインとして Ring Finger motif を含む exonII の部位が ICP0 の機能発現には最重要であることが知られていた。そこで、我々は ICP0 の Ring Finger motif を含む exonII の C 末領域 (pRB4986) を pGBT9 (Clontech) に GAL4 の DNA 結合領域と融合させるかたちでクローニングし、“Bait” (魚釣りのエサ) として (図2A) 指定の酵母 (HF7C) に導入した。

ここでのポイントは、“Bait” とする領域が大きすぎないこととその領域に酸性ドメインがある場合その部位を“Bait”に含めないことである。ウイルス因子は酵母系で発現しにくいものも多く、また、酸性ドメインはこの系のバックグラウンドを著しく上昇させ、スクリーニングが実質不可能になるというのがその理由である。我々の場合も、ICP0 が110kDa と大きなタンパク質であったので機能ドメインのみを用い (ExonII), さらに、その機能ドメインには高い酸性領域 (ExibII の N 末領域) が存在していたのでその領域を除去したもの (ExonII の C 末領域) を“Bait”とした。我々の場合はこの酸性ドメインが ICP0 の機能にそれほど重要でなかったため除去しても問題はなかったが、酸性ドメインが目的のタンパク質の機能に必須の場合は残念ながらこの系は適さない。

3-2 “Bait” プラスミドおよび cDNA ライブラリーの酵母への導入

次に、“Bait” プラスミドを酢酸リチウム法にて酵母に導入後、さらに、cDNA ライブラリーを導入し、スクリーニングを行った。cDNA ライブラリーとしては、Epstein-Barr virus でトランスフォームされた末梢血リンパ球由来の cDNA ライブラリー (Clontech 社) を用いた。4.6x10⁶個の酵母をスクリーニングした結果、240個のヒスチジン陽性のコロニーが得られ、

図2 酵母 Two-hybrid 法を用いた HSV-1 ICP0 と相互作用する宿主細胞因子の同定 (文献11を改変)

(A) "Bait" プラスミドの構築図。1, HSV-1 ゲノム。2, ICP0 をコードする $\alpha 0$ 遺伝子の構造。3, "Bait" に用いた ICP0 の領域。(B) GST-Pull Down 法による ICP0 とサイクリン D3 の相互作用の検出。GST はサイクリン D3 と相互作用しないが (レーン 1) GST-サイクリン D3 融合タンパク質は特異的に ICP0 と複合体を形成する (レーン 2)。(C) HSV-1 感染細胞中でのサイクリン D3 の発現。感染 8 時間後では野生株感染細胞中 (レーン 6), Repair virus 感染細胞中 (レーン 8) ではサイクリン D3 の発現が明らかに検出されるのに対し, ICP0 欠損ウイルス感染細胞中では (レーン 7) サイクリン D3 の発現が検出されない。

その全てのコロニーが β -ガラクトシダーゼ活性を有していた。その中で、31個の酵母が非常に強い β -ガラクトシダーゼ活性を示した。

cDNA ライブラリーの選択は重要である。数多くのライブラリーが市販されているが、この系をよく利用している人に評判のよいライブラリーを聞いたり、実際の論文で頻度よく使用されているものを使うことが重要である。我々が使用したライブラリーは³⁾、リンパ球由来のライブラリーであるので転写因子等の発現が低くウイルス制御因子に結合する宿主因子の同定といった目的には適さないと考えられがちだが、実際には非常に評判の良いライブラリーであり、様々な分野の数多くの論文でこのライブラリーが使用されている。どのライブラリーを使用するか全くアイデアがないといった場合は、とりあえずこのライブラリーを試してみるのも1つの手である。また、ライブラリーの質にもよるがトランスフォーメーション効率は最低でも10⁶は必要である。我々はこのラインをスクリーニングのトランスフォーメーション効率の良し悪しの判断としている。

3-3 cDNA を含むプラスミドの単離と同定、相互作用の特異性の確認

強い β -ガラクトシダーゼ活性を示した31個の陽性酵母より cDNA を含むプラスミドを単離し、それを大腸菌に形質転換させることでプラスミドを精製した。次に、得られた cDNA プラスミドが ICP0 と特異的に相互作用するタンパク質をコードしているかを“Kit”に含まれているコントロールプラスミドを用いて検定した。コントロールプラスミドとしては、pGBT9、マウスの p53、ヒトのラミンをコードする cDNA を有するものを用いた。その結果、得られた cDNA 産物は全て特異的に ICP0 と酵母内で相互作用することが明らかになった。その後、それぞれの cDNA の 5' 末端領域の部分的塩基配列を決定し、その情報をジーンバンクに転送しホモロジー検索を行った。その結果、得られた cDNA は転写因子、細胞の基本代謝に関与する主要酵素、ゴルジ関連因子、サイクリン D3、未知のタンパク1種をコードしていることが明らかになった（サイクリン D3 以外は現在解析中であるので抽象的な表現になってしまったことをお詫びしたい）。

3-4 さらに解析を行うクローンの決定

Two-hybrid 法を行うと、我々の例のように複数の

陽性クローンが単離される場合が多い。これらの陽性クローンの中には偽陽性が含まれている可能性がある。また、人間の働く能力には限界があるので、数多くの陽性クローンを単離した場合にはある特定の陽性クローンを選び、さらなる解析を行うことになる。よって、偽陽性の判断およびさらなる解析を行うクローンの選択は非常に重要である。筆者自身の考えでは、この時点での見極めがこの系で最も重要で困難な点であると思えてならない。偽陽性を見極める目安としてインターネット上に公開されている“Two-hybrid system を行う者のための home page (<http://www.fccc.edu/research/labs/golemis/InteractionTrapInWork.html>)”は参考になる。そこに示された偽陽性リストを図1Cに示すが、我々もこのリストに挙げられているタンパク質を陽性クローンとして得た経験が少なからずある。

我々は、数ある陽性クローンよりさらに解析する相互作用の候補としてサイクリン D3 を選択した。その理由は過去の報告にあった²⁾。その論文は、“ICP0 欠損ウイルスは G1/S 期にその増殖性が活性化されるのに対し、野生株は細胞周期依存性を示さない”という現象を報告したものであり“ICP0 は G1/S 期に特異的にその機能を発現する細胞因子の発現または活性を制御している”ということを示唆していた。サイクリン D3 は G1 期に特異的に発現しその機能を発現することが知られている。よって我々は“ICP0 はサイクリン D3 と相互作用し、その活性または発現を制御しているのではないか”という仮説をたててさらなる解析を行った。

3-5 Two-hybrid 法で得られた相互作用の他の系の確認

Two-hybrid 法で得られた相互作用が偽陽性によるものでないと受け入れられるためには、他の生化学的手法でその相互作用が確認されることが必要となる。その場合によく利用される系が“GST-Pull Down 法”である。この系は、相互作用すると思われる一方のタンパク質をグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として発現し、グルタチオンビーズに固相化することによって精製する。それを用いて、感染細胞中や in vitro translation system で得られたもう一方のタンパク質が共沈するかを調べることにより、in vitro での相互作用を調べる系である。我々も、“GST-Pull Down 法”を行い、GST のみでは感染細胞抽出液中の ICP0 と結合しないが

GST-サイクリン D3 融合タンパク質は特異的に ICP 0 と結合するという結果を得た (図 2 B)。この結果によって Two-hybrid 法で得られた相互作用が確認されたばかりでなく、サイクリン D3 が “Native” で “Full-length” の ICP 0 と *in vitro* で相互作用することが示めされたことになる。これはすなわち ICP 0 の一部のみが偶然サイクリン D3 と相互作用しうるといふ可能性を否定するものであり、我々の例のように、ある目的タンパクの部分的なドメインを “Bait” とする場合には確認すべき事象である。

さらに、培養細胞レベルでの相互作用を示すことは、Two-hybrid 法で得た相互作用の知見が *in vivo* において実際に起こっていることをより強く示唆する。この場合よく利用される方法としては、免疫沈降法と二重染色蛍光抗体法である。我々は、サイクリン D3 を過剰発現する組み換え HSV-1 (R7801) を作製し、R7801 感染細胞中でサイクリン D3 と ICP 0 が共局在しているかを蛍光抗体法にて調べた。ICP 0 は感染時期に依存して ND10 (別名 POD) と呼ばれる核構造に局在することが知られている¹⁷⁾。R7801 感染細胞中ではサイクリン D3 は ND10 様核構造に ICP 0 と共局在することが明らかになった。このことは、ICP 0 とサイクリン D3 が細胞レベルにおいて実際に相互作用していることを示唆している。しかし、タンパク質間相互作用が弱かったりトランジェントな場合や目的のタンパク質の局在がドット状でなく “defuse” 状に局在する場合には細胞レベルでの相互作用を示すことが困難な場合も少なくない。

3-6 Two-hybrid 法で得られた相互作用の生物学的意義の解析

次に我々は ICP 0 とサイクリン D3 の相互作用の生物学的意義の解明を試みた。サイクリン D3 は細胞周期特異的 (G1 期) に発現し、すぐさま分解されてしまう不安定なタンパク質である。ICP 0 欠損組み換え HSV を作製し、そのウイルス感染細胞中のサイクリン D3 の発現を調べた。その結果、感染 8 時間後には野生株感染細胞中ではサイクリン D3 の発現が明らかに観察されるのに対し、ICP 0 欠損ウイルス感染細胞中ではサイクリン D3 の発現が検出されなかった (図 2 C)。以上の知見は、ICP 0 はサイクリン D3 と相互作用しその発現を安定化させていることを示唆している。現段階では仮説の域をでないが、我々の知見は “ICP 0 は G1/S 期に特異的にその機能を発現する細胞因子の発現または活性を制御している” という過去

の報告²⁾とも合致する。

ウイルス因子と宿主細胞因子との相互作用の生物学的意義の解明は興味ある課題である。ウイルス研究では目的のウイルス因子の変異ウイルスを利用することが多いようである。また、相互作用に関与するウイルス因子の最小領域を決定しそこに部位特異変異を導入したウイルス因子の機能の変化を調べ、その機能と相互作用を結びつけるといった解析法も用いられている。ただ、ウイルス因子は多機能因子である場合が多く、同定した部位に 1 種類以上のタンパク質が相互作用することも考えられるので注意が必要である。

4. 酵母 Two-hybrid 法の応用例

この系は、ウイルス因子と相互作用する未知の宿主因子をスクリーニングするという目的の他にも様々な利用法がある。例えば、ウイルス制御因子は多くの場合 2 量体または多量体を形成することが知られているが、この系を用いれば 2 量体を形成することを簡単に証明できるだけでなく、ウイルス因子のどの部位を通じて 2 量体を形成するかを同定することが可能である。この様に、ある 2 種の既知のタンパク質の相互作用をちょっと調べてみたい場合や、相互作用に関与する部位を短時間に同定したい場合に威力を発揮する。また、この系をもとに改良された高度なシステムも開発されている。“Reverse Two-hybrid 法”²¹⁾、“Three-hybrid 法”^{1,19)}、“Competitive two-hybrid 法”²⁰⁾、“Mammalian Two-hybrid 法”⁶⁾などがそれにあたる。

5. おわりに

以上、我々の実験結果をもとに酵母 Two-hybrid 法を概説した。ウイルス因子と相互作用する宿主細胞因子の同定は我々の例のように過去に報告された知見に関連し、そのメカニズムを示唆するような結果をもたらす場合もある。一方、それとは異なり今まで想像もしえなかったウイルス因子の機能を見いだせる場合や同定した宿主細胞因子に関して思わぬ方向に研究が進展することもある。我々もその様な例を経験している。今回は紙面の都合上紹介はしないが我々の論文を参照していただきたい^{9,10,12)}。しかし、この酵母 Two-hybrid 法も万能ではなく問題点もある。我々もよく経験するが “Bait” によってはこの系がまったく役に立たないこともある。しかし、このような “ハイリスク、ハイリターン型” の実験系としては比較的技術も簡単であり、短期間で白黒がつくので、とりあえず一

度試してみる価値はあると考える。ウイルスの宿主依存性を考えればウイルス因子と宿主細胞因子の相互作用の研究の重要性は今後ますます増すことが考えられる。多くの方々がこの系を上手に利用し、ウイルス研究に貢献することを期待して筆をおきたい。

謝 辞

ここで紹介した筆者らのデータは主にシカゴ大学マージョリー B. コブラー癌研究所で行われたものであり、指導をしていただいた Bernard Roizman 博士および実際の Two-hybrid 法の“コツ”を伝授していただいた William O. Ogle, Renato Bruni 両博士に深謝いたします。また、東京医科歯科大学難治疾患研究所腫瘍ウイルス学教室で Two-hybrid 法のノウハウの蓄積に協力していただいた平井莞二教授をはじめ研究室の皆様方に深謝します。ここで紹介した筆者等の研究の一部は金原一郎財団および稲森財団の支援で行われたものである。

文 献

- 1) Aelst, L. V., Barr, M., Marcus, S., Polverino, A., and Wigler, M. (1993) Complex formation between RAS and RAF and other protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 6213-6217.
- 2) Cai, W., and Shaffer, P. A. (1991) A cellular function can enhance gene expression and plating efficiency of a mutant defective in the gene for ICP 0, a transactivating protein of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.*, **65**, 4078-4090.
- 3) Durfee, T., Becherer, K., Chen, P. -L., Yeh, S. -H., Yang, T., Kikburn, A. E., Lee, W. -H., and Elledge, S. J. (1993) The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev.*, **7**, 555-569.
- 4) Everett, R. D., Meredith, M., Orr, A., Cross, A., Kathoria, M., and Parkinson, J. (1997). A novel ubiquitin-specific protease is dynamically associated with the PML nuclear domain and binds to a herpesvirus regulatory protein. *EMBO J.*, **16**, 566-577.
- 5) Everett, R. D., Preston, C. M., and Stow, N. D. (1991) Functional and genetic analysis of the role of Vmw110 in herpes simplex virus replication. p. 50-76. In E. K. Wagner (ed), *Herpesvirus transcription and its regulation*. CRC press, Boston.
- 6) Fearon, E. R., Finkel, T., Gillison, M. L., Kennedy, S. P., Casella, J. F., Tomaselli, G. F., Morrow, J. S., and Dang, C. V. (1992) Karyoplasmic interaction selection strategy: A general strategy to detect protein-protein interactions in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 7958-7962.
- 7) Fields, S., and Song, O.-K. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, **340**, 245-246.
- 8) Fields, S., and Sternglanz, R. (1994) The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet.*, **10**, 286-292.
- 9) Kawaguchi, Y., Bruni, R., and Roizman, B. (1997) Interaction of herpes simplex virus 1 α regulatory protein ICP 0 with elongation factor 1 δ : ICP 0 affects translational machinery. *J. Virol.*, **71**, 1019-1024.
- 10) Kawaguchi, Y., Matsumura, T., Roizman, B., and Hirai, K. (1999) Cellular elongation factor 1 δ is modified in cells infected with representative alpha-, beta-, or gammaherpesviruses. *J. Virol.*, **73**, (in press).
- 11) Kawaguchi, Y., Van Sant, C., and Roizman, B. (1997) Herpes simplex virus 1 α regulatory protein ICP 0 interacts with and stabilizes the cell cycle regulator cyclin D 3. *J. Virol.*, **71**, 7328-7336.
- 12) Kawaguchi, Y., Van Sant, C., and Roizman, B. (1998) Eukaryotic elongation factor 1 δ is hyperphosphorylated by the protein kinase encoded by the UL13 gene of herpes simplex virus 1. *J. Virol.*, **72**, 1731-1736.
- 13) 川口 寧. (1997) 単純ヘルペスウイルスの遺伝子発現制御因子—ウイルス制御因子の驚くべき多機能性と宿主因子との相互作用. 実験医学 (増刊, ウイルス最前線), **15**, 2329-2335.
- 14) 川口 寧 (1999) 単純ヘルペスウイルス感染における転写制御因子. 実験医学 (増刊, 転写因子研究1999), **17**, 405-411.
- 15) 川畑正博. (1995) Two-hybrid system による蛋白-蛋白相互作用の検出とそのスクリーニングへの応用. 実験医学, **13**, 2111-2120.
- 16) 久下周佐, 岩井 淳, 加藤宏幸. (1994) 酵母分子生物学実験法 Two-Hybrid System の実際. 細胞工学, **13**, 847-853.
- 17) Maul, G. G., Guldner, H. H., and Spivack, J. G. (1993) Modification of discrete nuclear domains induced by herpes simplex virus type 1 immediate early gene 1 product (ICP 0). *J. Gen. Virol.*, **74**, 2679-2690.
- 18) Roizman B., and Sears, A. E. (1996) The replication of herpes simplex viruses. p. 2231-2295. In B.N. Fields, D.M. Knipe, P. Howley, R.M. Chanock, M.S. Hirsch, J.L. Melnick, T. P. Monath and B. Roizman, (ed), *Virology*, 3rd ed. Raven Press, New York.
- 19) SenGupta, D. J., Zhang, B., Kraemer, B., Pochart,

- P., Fields, S., and Wickens, M. (1996) A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 8496-8501.
- 20) Vidal, M., Brachmann, R. K., Fattaey, A., Harlow, E., and Boeke, J. D. (1996) Reverse two-hybrid and one hybrid systems to detect dissociation of protein-protein and DNA-protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 10315-10320.
- 21) Vidal, M., Braun, P., Chen, E., Boeke, J. D., and Harlow, E. (1996) Genetic characterization of a mammalian protein-protein interaction domain by using a yeast reverse two-hybrid system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 10321-10326.