

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04608

研究課題名(和文)バキュロウイルス増殖戦略研究の新展開：非必須遺伝子群に秘められた必須性の解明

研究課題名(英文) New approach for studying functional importance of baculovirus nonessential genes

研究代表者

伴戸 久徳 (Bando, Hisanori)

北海道大学・農学研究院・教授

研究者番号：20189731

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では非必須遺伝子群に潜む必須性を指標に抽出した非必須遺伝子セットを対象に、非必須遺伝子の相互作用と重要性について解析を進め、それらの集合体としての重要性を確認すると共に、遺伝子間相互作用に関する新たな知見を得た。さらに、ウイルス増殖機構の理解に不可欠な遺伝子間相互作用の詳細な解析を進めると共に、ここで得られた知見を基にした論理的デザインに基づくBmNPVベクターの再構築を行うために、ギブソンアッセムブリ法を利用してBmNPVゲノム人工合成(再構築)システムを確立した。

研究成果の概要(英文)：In *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) genome comprised of 143 genes, more than 60 % of them are nonessential genes for efficient multiplication in *Bombyx mori* cell line BmN. However, a combination of nonessential genes was found to play a critical role in efficient viral multiplication, suggested essentiality of nonessential genes as a collected gene. A study using reverse genetics identified genetic interactions among nonessential genes in such a combination and emphasized importance of a methodology to advance the reverse combinatorial genetics of BmNPVs; thus we established a platform for BmNPV genome assembly from PCR-amplified DNA fragments using Gibson Assembly for further analysis of the essentiality of nonessential genes and for reconstruction of BmNPV vector system based on logical design.

研究分野：応用分子昆虫学

キーワード：昆虫機能利用 バキュロウイルス

1. 研究開始当初の背景

バキュロウイルスは、特定宿主に対して高度に適応進化してきたウイルスと考えられている。バキュロウイルスは一般に特定の宿主でのみ増殖可能であり、宿主範囲は狭いが、高い増殖能および致死性を持つ。様々な宿主昆虫から単離された既知のバキュロウイルス全種からは 926 種の遺伝子が同定されているが、個々のバキュロウイルス種はそのうち 90-181 個の遺伝子を保持しているのみである (Miele *et al.* 2011)¹⁾。狭い宿主範囲、高い増殖能を持つことと併せて考えると、個々のバキュロウイルス種はある特定遺伝子セットを獲得・選択することによって特定宿主で効率よく感染増殖するように適応進化してきたと推定される。また、我々は 143 遺伝子を持つカイコのバキュロウイルス (BmNPV) ゲノムに存在する遺伝子のうち、約 2/3 の遺伝子は感染サイクルを達成するのに必須ではない非必須遺伝子であることを明らかにしている (Ono *et al.* 2012)²⁾。必須遺伝子は DNA ポリメラーゼなどの「DNA ウィルスであるために必要な遺伝子」群が多い。一方で非必須遺伝子群は近縁のウィルス群で保存されている物が多いことから、これらの遺伝子は進化の過程で宿主特異的に集積・選択され、その宿主での増殖の効率化に貢献していることが推定される。我々は、BmNPV の増殖に一見不必要に見える非必須遺伝子が、ある組み合わせで欠失するとウィルスは増殖能を失うことを見出した。これらのことから、我々は、非必須遺伝子群は、ウィルス増殖戦略としてさらに重要な分子基盤を担っていると考えている。しかし、その詳細については明らかではない。

2. 研究の目的

BmNPV は、カイコ細胞で極めて効率よく増殖し、感染末期にはウィルスの包埋体タンパク質 (ポリヘドリン: Polh) が細胞タンパク質の 50% を占めるほど大量に産生される。この特性により BmNPV は、遺伝子発現ベクターとしてカイコ細胞/個体を宿主としたタンパク質発現に利用されている。現在、この BmNPV ベクターシステムは真核細胞における最も効率の良いタンパク質発現系の一つとして知られている。一方、BmNPV ベクターシステムも万能ではなく、タンパク質によりその発現量は異なり、また糖鎖修飾においても哺乳動物とは異なるなど、克服すべき課題が残されている。これら克服すべき質と量の課題において、特に量 (難発現性) の問題は、ウィルスの増殖機構と密接に関係していると考えられ、その克服にはウィルスの増殖機構を分子レベルで理解することが不可欠である。特に、非必須遺伝子群が持つ増殖戦略上の重要性については、これまでに無い新しい視点であり、その実体の把握はウィルス増殖機構の理解に不可欠である。

我々は、ウィルスの増殖能を崩壊させる非

必須遺伝子の組み合わせを逆遺伝学的手法で特定し、それらの遺伝子間の相互作用を解析すると共に、増殖機構における作用点と定量的な貢献度を解明することで、BmNPV の増殖システムにロバストネスを生み出す機構を理解し、BmNPV ベクターの論理的なデザインに応用するための技術の蓄積を目的として研究を進める。

3. 研究の方法

BmNPV ゲノム上には非必須遺伝子が隣接して存在する遺伝子クラスターが 10 ヶ所存在する。各クラスターを欠失し、多角体遺伝子座位に組み込んだ GFP の発現を指標に、ウィルスの増殖への影響を調べたところ、非必須遺伝子クラスター ORF32-38 を欠失させた場合、ウィルスの感染能が消失した (図 1 矢印)。

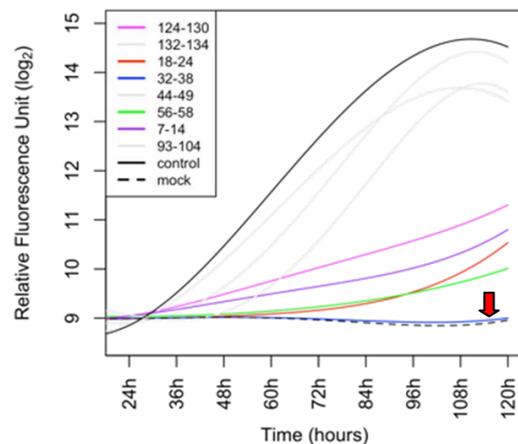


図 1

つまり、本クラスターを形成する僅か 7 個の非必須遺伝子 (またはその何個か) の欠失が、ウィルス増殖能を崩壊させることが判明した。このことは、(1)非必須遺伝子が増殖効率向上のために存在しているだけでなく、(2)ウィルス増殖に必須な機能発現に冗長的に関わり、ウィルスが頑健 (ロバスト) に感染サイクルを完結することに寄与していることを示唆している。このことから、特に非必須遺伝子単独破壊では解析できない遺伝子間相互作用の存在を明らかにし、そのウィルス増殖に対する貢献を解析することが必要と考えられる。これら非必須遺伝子群が集散的にどのように機能しているか、そしてその作用点はどこかを明らかにすることで、非必須遺伝子の必須性に関する分子機構を明らかにするとともに、非必須遺伝子を標的としたウィルスゲノム改変による、BmNPV ベクター機能改善のための基盤の構築が可能となる。

本研究では、上記の非必須遺伝子 (ORF32-38) クラスターについて以下の順序で解析を進めることとした。

- (1) ORF32-38 について BmNPV の感染サイクル冗長化の鍵となった遺伝子セットを逆遺伝学的に同定する。

- (2) それら鍵遺伝子のウイルス増殖(Polh 遺伝子座に EGFP 遺伝子を導入し、その発現を指標とした)への単独の影響と、それらの間の相互作用の影響を、種々の遺伝子型のノックアウト(KO)ウイルスを構築して、統計モデルを用いた遺伝学的解析によって定量的に明らかにする。
- (3) 2)で用いた各 KO ウイルスの DNA 複製、ウイルス粒子産生、ウイルス粒子の主要構成要素、ウイルス粒子の感染性等について定量解析を行い、ウイルス感染サイクルにおける各遺伝子の単独・組み合わせの作用点を明らかにする。
- (4) 各 KO ウイルスを感染させた細胞から網羅的な mRNA 発現プロファイルを取得し、それぞれの影響によって制御されるウイルスおよび宿主の遺伝子セットを同定するとともに、得られた結果を統合し、これらの非必須遺伝子による BmNPV のカイロ細胞への感染効率化戦略を明らかにし、増殖機構へのロバストネス付与過程について考察を行う。

4. 研究成果

ORF32-38 について BmNPV の感染サイクル冗長化の鍵となった遺伝子セットを逆遺伝学的に同定するために、まず非必須遺伝子組み合わせ KO ウイルスライブラリーの構築を行った。すなわち、ORF32-38 の領域にある 7 遺伝子について、それらの半数以上をカバーするように、4 遺伝子について 4 重変異体の組み合わせを作製し、野生型と 7 重変異体をコントロールとして欠損した遺伝子による増殖能を評価した。その結果、ORF32 と ORF36-38 の 3 遺伝子欠損がウイルス増殖能を顕著に低下させる事(多角体遺伝子座に EGFP 遺伝子を導入し、その発現を指標としたもの)が判明し、これらの非必須遺伝子の相互作用にウイルス増殖のロバストネスを支える仕組みが含まれる事が推定された。

そこで、まず、ゲノム上で連続して存在する ORF36-38 の 3 遺伝子を対象に、既に報告した Red 法を利用した BmNPV ゲノム改変技術(Ono et al. 2012)²⁾を用いて 2 遺伝子、3 遺伝子の全ての組み合わせで変異体を作製し、その増殖への影響を GFP 発現、プラーク形成、感染拡大速度等を指標に解析した。その結果、これら 3 遺伝子について以下の結果が得られた。

- (1) ORF36 の欠損は感染の拡大に極端な影響は与えないが、多核体タンパク質(Polh)発現が顕著に抑制される。
- (2) ORF36 欠損による増殖能へのネガティブ効果が ORF37 の同時欠損により改善される。
- (3) ORF36 と ORF38 が同時に欠損した場合に EGFP を指標とした増殖が確認できなくなる。

これらの結果から、幾つかの興味深い示唆が得られた。まず、(1)から、非必須遺伝子には、もっぱら Polh 発現制御に関わるものが存在し、包埋体生産・個体間感染効率に大きく貢献しているものが存在していると考えられ、自然界における本ウイルスの適応性向上に非必須遺伝子(機能)獲得の過程が大きく貢献した可能性が示唆される。また、(2)で ORF37 の欠損が ORF36 欠損による Polh 発現能の低下に明確な改善効果が認められたことから、両遺伝子間には suppressive interaction が存在する。そして、(3)から、ORF36 と ORF38 は非必須遺伝子クラスター ORF32-38 に認められる必須性に関わる遺伝子セットの一つである。

以上の結果を踏まえると、ここまで ORF32-38 の領域にある 7 遺伝子について、4 重変異体の組み合わせを作製し、ウイルス増殖の冗長化を担う遺伝子セット特定を進め、その過程で ORF32 と ORF36-38 の欠失が増殖能を大きく低下させることを見出したことから、ORF36-38 について解析を進めてきたが、本ウイルスの遺伝子間に suppressive interaction が確認されたことから、ORF32-38 に内在する冗長性を担う遺伝子セットを正確に洗い出すためには、7 遺伝子全ての組み合わせで多重遺伝子欠損ゲノムを構築し、その増殖に与える影響を評価する必要があることが強く示唆された。

そこで、これまでに構築した「BmNPV ゲノム人工合成(再構築)系」を用いて、多重遺伝子欠損ゲノムライブラリーの構築を進めることとした。欠損ライブラリーの構築に先立って本人工合成系における BmNPV ゲノムの安定性と正確性を検証したところ、酵母内でのゲノム断片連結過程において、ゲノムの断片の一部が欠失する現象を見出した。そこで、*in vitro*連結系(Gibson Assembly)³⁾とバキュロウイルスゲノム(パクミド)が安定して保持されることが知られる大腸菌のみを用いた BmNPV ゲノム人工合成系を改めて構築した。

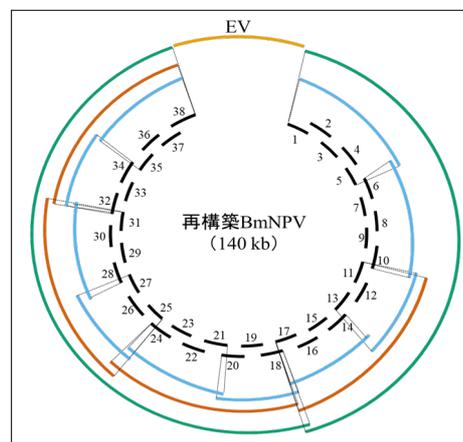


図 2

本人工合成系においては、図 2 に示すよう

に BmNPV ゲノム塩基配列を 38 断片に分割し、大腸菌での複製起点を含む断片 (EV) とこれらの断片を一定の順序で *in vitro* で連結する。こうして再構築した BmNPV ゲノムが大腸菌内で維持可能であり、大腸菌から回収した再構築 BmNPV ゲノムは、BmN 細胞へトランスフェクションすることで、感染性ウイルスの産生が可能である (図 3、上: トランスフェクション 72 時間、右上: トランスフェクション 96 時間)。この合成系においては酵母を利用した場合に見られたゲノムの一部が欠失する現象は確認できず、再構築 BmNPV ゲノム由来ウイルスはコントロールウイルスと同様に BmN 細胞に対して強い感染性を示した (図 3、左下: 感染 48 時間、下: 感染 96 時間)。

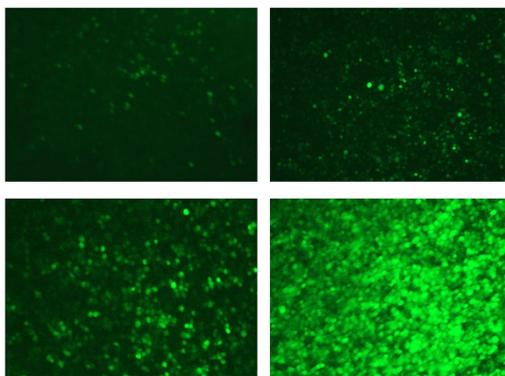


図 3

以上、本研究では非必須遺伝子群に潜む必須性を指標に抽出した非必須遺伝子セットを対象に、非必須遺伝子の相互作用と重要性について解析を進め、それらの集合体としての重要性を確認すると共に、遺伝子間相互作用に関する新たな知見を得た。さらにウイルス増殖機構の理解に不可欠な遺伝子間相互作用の詳細な解析を進めると共に、ここで得られた知見を基にした論理的デザインに基づく BmNPV ベクターの再構築を行うために、ギブソンアッセムブリ法を利用した BmNPV ゲノム人工合成 (再構築) システムを確立した。

<引用文献>

- 1) Miele S. A. B. et al. 2011. Baculovirus: Molecular insights on their diversity and conservation. 2011, Int. J. Evol. Biol.:379424.
- 2) Ono C. et al. 2012. Phenotypic grouping of 141 BmNPVs lacking viral gene sequences. Virus Res.:197-206.
- 3) Gibson D. G. et al. 2009. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. Nature Methods 6 (5): 343-345.

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)

〔学会発表〕(計 1 件)

原田直人、石橋大樹、浅野眞一郎、佐藤昌直、伴戸久徳、*in vitro* DNA 連結による BmNPV ゲノム構築プラットフォームの確立、名古屋大学 (愛知県・名古屋市)、日本蚕糸学会第 88 回大会、2018 年 3 月 19 日-20 日。

〔その他〕

ホームページ等

<https://lab.agr.hokudai.ac.jp/obunkon/ame/BmNPVpro.htm> (6 月公開予定)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伴戸 久徳 (BANDO, Hisanori)
北海道大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号: 20189731

(2) 研究分担者

佐藤 昌直 (SATO, Masanao)
北海道大学・大学院農学研究院・助教
研究者番号: 20517693

(3) 研究協力者

高 ひとみ (TAKA, Hitomi)
石橋 大樹 (ISHIBASHI, Taiki)
原田 直人 (HARADA, Naoto)
斎藤 諒 (SAITO, Ryo)