

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14891

研究課題名(和文)バキュロウイルス個体適応性の機能ゲノミクス

研究課題名(英文)Functional genomics on in vivo fitness of BmNPV

研究代表者

伴戸 久徳 (Hisanori, Bando)

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：カイコバキュロウイルス(BmNPV)分離株(H4)と標準株(T3)のゲノム塩基配列の類似性は98%と非常に高いが、H4はカイコ個体での増殖に高度に適応した系統である。T3とH4のキメラウイルスを作製し、ウイルス増殖と外来遺伝子発現に与える影響を調査した。その結果、gp64の構造の違いが、T3とH4の個体での増殖特性の違いに大きく関わっていること、H4のGP64に認められる6カ所のアミノ酸変異のうち、少なくとも2カ所の変異がウイルスの個体増殖能と外来遺伝子の発現効率に大きく影響を及ぼすことが明らかとなった。以上の結果は、GP64の構造を標的としたBmNPVベクター改良の可能性を示すものであった。

研究成果の概要(英文)：Bombyx mori nucleopolyhedrovirus (BmNPV) H4 that had genome sharing high sequence similarity (approx. 97%) with that of the type strain of BmNPV T3 showed marked growth advantage in silkworm larvae. Studies using chimeric recombinant BmNPV between H4 and T3 demonstrated that a viral membrane protein gene gp64 as a determinant in the in vivo fitness of BmNPV H4. Further analyses identified amino acid positions involved in the BmNPV H4 phenotype of efficient growth in silkworm larvae. These results suggested the possibility to control growth ability of BmNPV in silkworm larvae by gp64-targeted genome manipulation.

研究分野：農学

キーワード：昆虫機能利用 有用物質生産 バキュロウイルス

### 1. 研究開始当初の背景

ウイルス研究においては、自然界でのウイルス集団から培養細胞系で効率よく増殖し、扱いやすいウイルスが選択的に分離され、研究材料として確立される傾向がある。バキュロウイルスにおいても、増殖機構の詳細な解析が進んでいるのは培養細胞で良く増殖する一部の分離株に限られている。一方で、申請者が北海道で分離したカイコバキュロウイルス(BmNPV)分離株(H4)は標準株(T3)と比べると、培養細胞BmNでの増殖量は1/10以下であるが、カイコ個体では約3倍高い増殖能を示すという興味深い発見をした。これまでバキュロウイルスにおいて個体内での増殖能が大きく向上した変異株の報告はなく、T3と新型株H4は「バキュロウイルスの個体適応変異(宿主個体での増殖能が向上するウイルスゲノム変異)」を理解する上で他に類を見ない興味深い研究対象である。しかし、既存のゲノム改変技術では改変の自由度に対する制約が多く、逆遺伝学的手法で効率よくH4ゲノム中の「高い個体内増殖能に関わる領域」を特定することは現実的には不可能であった。しかし、近年、我々の研究室でBmNPVバクミド/red相同組換えシステムを確立し(Ono et al., 2012)、さらにウイルスゲノムの完全人工合成が可能となったことから、H4の高い個体増殖能に関わるゲノム領域の特定が現実に達成可能な研究となった。

### 2. 研究の目的

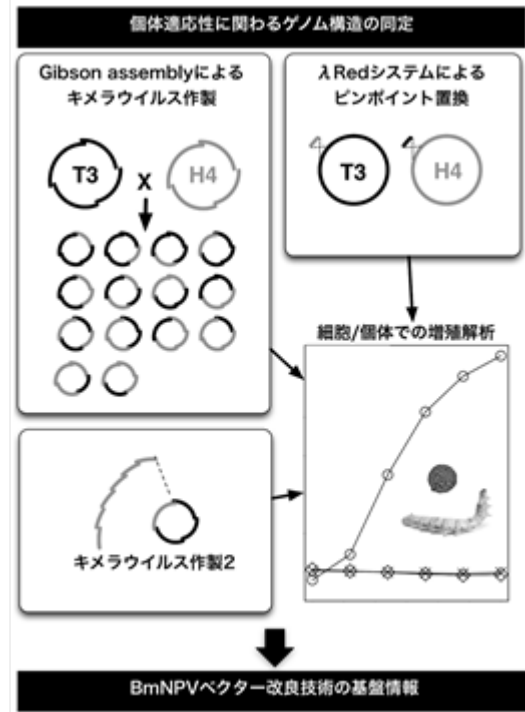
カイコバキュロウイルス(BmNPV)をベクターとしたカイコ個体での外来遺伝子発現システムは、真核細胞を用いた最も効率の良い発現システムの1つとして知られている。本研究の目的はBmNPV系統間のキメラウイルス再構築により、個体適応性(増殖能の向上)に関わるウイルス遺伝子構造を明らかにし、BmNPVベクター系改良技術の創出に繋げることにあった。

### 3. 研究の方法

T3ゲノムの特定領域をH4の相同領域に置換したキメラウイルスを作製し、それらキメラウイルスの個体での増殖能の変化を解析することで、H4のカイコ個体での高増殖能を担うゲノム領域を特定する。具体的には、酵母内でのウイルスゲノム完全人工合成技術とred相同組換えシステムを用いて、T3とH4のゲノム構造を遺伝子単位で入れ替え、作出されたキメラウイルスの個体での増殖能を評価することとした。

前者は複数の伝子領域の同時改変に威力を発揮する方法であり、開発が進んでいるDNA断片からのゲノム人工合成技術(Gibson et al., 2009)に着目して開発した「バキュロウイルスゲノムを完全人工合成するためのシステム」である。一方、後者は、通常、ゲノム上の1領域を改変するための簡便な方法で

あり、我々はBmNPVバクミド/red相同組換えシステムを用いて作製したBmNPVの全ての遺伝子に関する1遺伝子ノックアウトウイルスライブラリーを有している。(Ono et al., 2007)。本研究では、これらの2つの異なる方法を用いてT3とH4の増殖特性の違いに関わる遺伝子領域について解析を進めた。



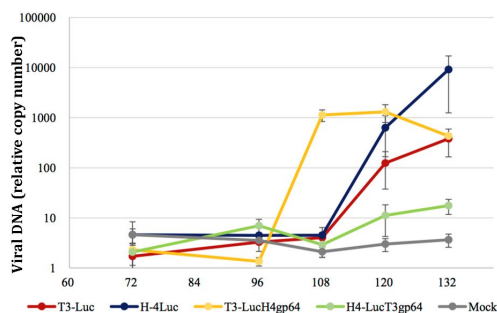
### 4. 研究成果

まず、ウイルスゲノムの完全人工合成法を用いたT3とH4の増殖特性の違いに関する責任領域の特定を進めた。具体的には、バキュロウイルスゲノム断片(~30kbp)を酵母内で正確に連結させ、感染性ウイルスゲノムを回収するシステムを用いた。このシステムを利用することで、T3ゲノムの任意の領域の配列をH4の配列と置き換えることが可能である。しかし、一連の実験において酵母内でのゲノム断片の連結作業を繰り返す過程で、一部のゲノム領域が欠失する場合のあることを見出し、これは、BmNPVゲノムの一部領域が酵母細胞にとって不都合な機能を有することが原因であろうと推察された。そこで、BmNPVゲノムの再構築を酵母ではなく、大腸菌内で行うことで、より安定したバキュロウイルスゲノム完全人工合成系の確立を進め、その安定性を調査した。その結果、大腸菌内でのBmNPVゲノム配列の連結過程においては、一部のウイルスゲノム領域が欠失するなどの現象は観察されず、より安定したウイルスゲノムの再構築が可能であると考えられた。一方、T3とH4の増殖特性の解析結果を基に増殖特性の違いに関わると考えられる責任遺伝子をいくつか予想し、これらの遺伝子を対象にred相同組換えシステムおよび単一遺伝子ノックアウトウイルスライブラリー

を用いて解析を進めた。標準株(T3)と北海道分離株(H4)を比較するとゲノム塩基配列の類似性は97%と非常に高いが、H4はカイコ個体での増殖に高度に適応した系統である。H4はT3に比べて非常に小さなプラークを培養細胞上で形成することから、両系統の増殖性の違いを生み出す要因が出芽ウイルス(BV)の感染効率にある可能性が考えられた。そこで、細胞間感染で重要な役割を果たすウイルス膜タンパク質遺伝子gp64に注目した。T3とH4で入れ替えたキメラウイルスを作製し、T3とH4間でのgp64の入替が、ウイルス増殖および外来遺伝子発現に与える影響を調査するために、まず以下の組換えウイルスを作製した。

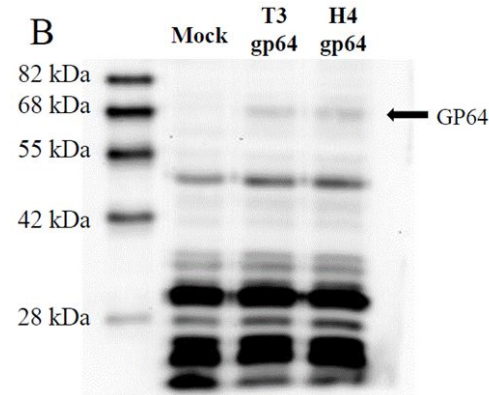
- \* ルシフェラーゼ遺伝子を導入したウイルスT3およびH4 (T3-Luc、H4-Luc)
- \* T3-Luc、H4-Lucのgp64をノックアウトしたウイルス(T3-Luc gp64、H4-Luc gp64)
- \* T3-Luc gp64、H4-Luc gp64に本来のgp64を復帰させたウイルス(T3-LucT3gp64、H4-LucH4gp64)
- \* T3-LucT3gp64、H4-LucH4gp64でgp64を入れ替えたウイルス(H4のgp64を持つT3: T3-LucH4gp64、T3のgp64をもつH4: H4-LucT3gp64)

まず、gp64ノックアウトウイルスT3-Luc gp64、H4-Luc gp64と、それぞれに本来のgp64を復帰させたウイルスT3-LucT3gp64、H4-LucH4gp64では、増殖能に明確な違いは認められなかった。一方、gp64を入れ替えた場合には増殖能に明らかな違いが認められた。カイコ個体を用いた感染実験において、H4-LucT3GP64はH4-Lucよりも増殖能の低下が観察され、T3-LucH4GP64はT3-Lucよりも増殖能が向上した。これらのことから、gp64の構造の違いが、T3とH4の個体での増殖特性の違いに大きく関わっていることが示唆された。



H4のgp64産物(膜タンパク質GP64)には6カ所の変異が認められ、これらの変異がT3とH4の増殖特性に影響を与えていることが考えられた。これらの変異はいずれも膜融合ドメイン、膜貫通ドメイン、そしてオリゴマー化ドメインなどのGP64の既知の重要な機能領域とは異なる領域に存在していたが、2つのアミノ酸変異は膜融合効率に関わると推定される領域に存在していた。そこで、T3GP64発現プラスミドおよびH4GP64発現プ

ラスミドを構築し、カイコ培養細胞BmNにトランスフェクションして両者の細胞膜融合活性を比較した。



その結果、各GP64が同程度発現する細胞において膜融合活性に違いが認められ、少なくとも、両者に機能的な違いのあることが判明した。つぎに、H4のこの2カ所のアミノ酸についてT3タイプのアミノ酸に変異させ、増殖特性の変化を調査したところ、これらのアミノ酸を1カ所でも変異させた場合には、増殖能の著しい低下が確認された。これらのことから、これら2カ所のアミノ酸がH4の増殖機構におけるGP64の機能発現にとって極めて重要な意味を持つことが判明した。また、T3とH4の増殖特性の変化はGP64における複数のアミノ酸変異による可能性が示唆された。さらに、gp64の入替により個体におけるルシフェラーゼの発現量も著変に变化したが、その変化は必ずしも増殖能の変化とパラレルな関係ではなかった。

以上、本研究での成果は、BmNPVの必須膜タンパク質GP64の構造変化がBmNPVの個体での増殖能に大きな影響を与えること、また、GP64の構造は外来遺伝子の発現効率にも大きく影響を及ぼし得ることが明らかとなった。これらの結果は、GP64の構造を標的としたBmNPVゲノム改変により、BmNPVのカイコ個体内での増殖特性と外来遺伝子の発現効率を操作可能であることを強く示唆するものである。

#### 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 件)

〔学会発表〕(計 1件)

石川小百合(伴戸久徳)、BmNPV膜タンパク質GP64の増殖特性への関与について、日本蚕糸学会第85回大会、2015年9月26日、北海道札幌市

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 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 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

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

浅野真一郎 (ASANO SHINICHIRO)  
北海道大学・大学院農学研究院・准教授  
研究者番号：10882826