

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22248003

研究課題名(和文) システムバキュロウイルス学の幕開け - タンパク質超発現システムの解明と再構築 -

研究課題名(英文) A systems biology approach for improving baculovector system

研究代表者

伴戸 久徳 (Bando, Hisanori)

北海道大学・(連合)農学研究科(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) 36,300,000円、(間接経費) 10,890,000円

研究成果の概要(和文)：バキュロウイルスのタンパク質高発現に関わる遺伝子間相互作用解析にシステムバイオロジーを導入し、遺伝子欠失ウイルスを用いてウイルス遺伝子(40遺伝子)間ネットワークのモデル構築を行うとともに、複雑な遺伝子間相互作用の存在を明らかにした。また、複数遺伝子欠失ウイルスを用いて、最初期遺伝子間のネットワークを解明し、ウイルス遺伝子ネットワークの最上流を操作するための基盤を確立した。さらに、ウイルスベクターからのタンパク質発現に関わる新規宿主因子を同定した。

研究成果の概要(英文)：By taking a systems biology approach, a baculovirus gene network models was built and host factors involved in recombinant protein expression from a baculovector system were identified.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：バキュロウイルス 遺伝子相互作用 昆虫利用・機能開発

1. 研究開始当初の背景

バキュロウイルス(核多角体病ウイルス属(NPV))は感染昆虫細胞内でウイルスタンパクの1つである多角体タンパクを細胞内タンパク質の2~3割を占めるほど発現する。このウイルス感染時の多角体遺伝子プロモーターからの遺伝子高発現を利用し、有用タンパク質 mRNA を多角体遺伝子プロモーターから発現させる「バキュロウイルス発現ベクター(BEV)システム」は真核細胞タンパク発現系の中で最も効率が良い系として知られる。これまでに3000種類を超えるタンパク質(日本脳炎ワクチン用ウイルス構造蛋白や豚成長ホルモンなど)がBEVシステムを利用して発現されており、医療分野ではインフルエンザワクチンなどが実用試験段階に入っている。BEVシステムの利点はその高い生産性だけではなく、哺乳動物細胞で増殖しないという安全性や大腸菌や酵母、そして植物で脊椎動物の生理活性蛋白を生産させたときに往々にして起こる翻訳後修飾の問題が昆虫細胞では少なく、天然型に近いものが生産できることが挙げられる。これらのことから世界的にも医薬・検査薬生産分野においてNPVの利用が一段と注目されているのが現状である。ところがBEVシステム応用のさらなる拡大とより効率的な有用タンパク質の発現を考えると既存のBEVシステム研究には以下の課題がある:

(1) ウイルス感染による細胞障害性

BEVシステムはウイルス感染による細胞破壊(細胞障害性)を伴う。これにより細胞の構造が保たれず、膜タンパク質等の発現が難しいだけでなく、タンパク質発現用の細胞、ウイルスの準備が毎回必要である。ウイルス感染の細胞障害性に関する詳細な解析はなされておらず、根本的な解決法は示されていない。

(2) 有用タンパク質大量発現にはウイルス増殖というシステムレベルの理解が必要

ウイルス感染による細胞障害性や発現タンパクへの悪影響を避けるアプローチとして多角体遺伝子プロモーターからの転写に関与するウイルス遺伝子のみ利用が過去に試みられたが、その一時的発現系を用いてもBEV本来の多角体遺伝子発現には到底及ばない程度の発現しか得られなかった。つまり、有用タンパク質大量発現にはウイルス増殖サイクルを経なくてはならず、全ウイルス遺伝子がお互いをどのように制御し合い、多角体発現を含めたウイルス増殖サイクルをどのように実行するかシステムレベルの情報が必要である。

(3) 未同定宿主因子の存在・関与

BEVシステムの高い生産性はウイルス遺伝子発現により達成されるが、ウイルス生活環をサポートする宿主因子も必要であることが推測されるが、現時点では多角体発現、細胞障害性に関与する宿主因子が未同定で

ある。よって、これらの同定が必要であるが、宿主因子の完全な網羅的同定は困難であり、不確定要素である宿主因子をいかに扱うが大きな課題である。

2. 研究の目的

上記の課題を解決するためにはウイルスの個々の遺伝子の解析ではなく、「ウイルス・宿主遺伝子の相互作用の総体としてのウイルス感染」を明らかにする新たな研究手法が必要である。このような状況で我々は(1)網羅的なウイルス・宿主遺伝子の制御関係の解析と(2)未同定宿主因子の存在があってもウイルス遺伝子発現システムの全体像をモデル化する数理解析の融合が有効と考えている。「少数遺伝子を順番に1つ1つ研究する」ボトムアップ型解析だけでは未同定因子、特に実験的解析が困難な遺伝子がある場合、システムの全体像を捉える作業が難航する。そこで本研究では宿主遺伝子の網羅的スクリーニングと共に未同定因子の存在を補完できる数理モデルを取り入れ、「ウイルス遺伝子間の制御関係を抽出するトップダウン型解析」の導入を行う。

3. 研究の方法

これまで、ウイルス・宿主遺伝子解析の基盤として

(1) カイコバキュロウイルス BmNPV ゲノムのプラスミド(bacmid)化(Ono et al., 2007, JIBS)

(2) BmNPV の各遺伝子を欠失したノックアウト(KO)ウイルスライブラリー

(3) BmNPV ゲノムの簡便かつ柔軟な改変手法

(4) カイコ遺伝子に対する RNAi 誘導技術(Tsukada et al., 2006, Nucleic Acids Res.)

(5) ウイルス遺伝子発現を網羅的に解析するためのマイクロアレイ(Yamagishi et al., 2003)

(6) 遺伝子発現解析、ネットワークモデリング(Sato et al. 2007, Plant J.; van Poecke et al., 2008, Plant Cell.)

を準備してきた。本研究ではこれらの準備段階を進展させ、簡便なウイルスゲノム改変技術を更に至適化すると共に、さらに多様なゲノム改変ウイルスを作製する。ゲノム改変ウイルスの遺伝子発現解析には、次世代シーケンサー(RNAseq)による網羅的データ収集と数理解析を導入することで、ウイルス遺伝子ネットワークをモデル化し、多角体発現・細胞障害性がウイルス増殖システムの中でどのように制御されているのかをそのモデルから仮説を立てる。さらに、ネットワークモデルをもとにウイルス・宿主遺伝子を改変して多角体発現・細胞障害性の制御を試みる。

4. 研究成果

まず、相同組換え酵素 red recombinase を発現させた大腸菌内において、効率的に遺伝

子改変が可能なシステム(Datsenko and Wanner, 2000)を BmNPV に導入し、BmNPV の遺伝子改変を容易に行えるシステムを構築した。このシステムを用いて、BmNPV の全遺伝子(約 140)の遺伝子 KO ウイルスライブラリーを完成させ、各遺伝子がウイルスの増殖に与える影響を明らかにした(Ono et al., 2012)。これにより、ウイルス及び細胞のトランスクリプトーム解析及びタンパク質発現特性解析のためのプラットフォームが確立した。

次に、野生型ウイルス感染細胞の解析結果から選抜した遺伝子欠損ウイルス(40 種類)を用いて、感染細胞における RNAseq によるトランスクリプトーム解析と数理解析を組み合わせることで、40 遺伝子により構成されるウイルス遺伝子ネットワークを推定した。その結果、このウイルス遺伝子ネットワークモデルは複製、転写などの既知の機能に関わる遺伝子がネットワーク上で離れており、モジュールとして各機能は比較的独立している可能性が高いことが明らかとなった。この結果から各モジュールに属するウイルス遺伝子の操作によって、ウイルス感染に関わる各機能を独立に制御できる可能性が示唆された。

一遺伝子 KO ウイルスを用いて推定した 40 種類の遺伝子で構成されるウイルス遺伝子ネットワークを検証する目的、そしてウイルス遺伝子改変に対するウイルスの頑強性を調べる目的で、ウイルス遺伝子過剰発現コンストラクトや複数遺伝子ノックアウトウイルスを作製した。ウイルス遺伝子過剰発現によるウイルス遺伝子ネットワーク操作の標的として、ウイルス後期遺伝子発現に関わることが既知で且つ細胞障害性への関与が示唆されているウイルスゲノム複製に影響を及ぼさないことがネットワークモデルから推定される遺伝子を選抜した。それら遺伝子の過剰発現の多角体発現への影響を現在解析している。複数遺伝子ノックアウトウイルスの解析から「単一遺伝子欠損ウイルスの表現型解析では推定できない遺伝子間の複雑な相互作用の存在」とともに、「ウイルス増殖性を保持しつつ広範囲のウイルス遺伝子改変が可能である事」が判明した。さらに、ウイルスの初期遺伝子に関して一過性発現系や逆遺伝学的手法を組み合わせて解析を行った結果、ウイルス遺伝子発現ネットワークの頂点に存在する 5 種類の最初期遺伝子間の相互作用が新たに明らかとなり、ウイルス遺伝子ネットワークの最上流を操作するための基盤が確立した。

一方、組換えタンパク質発現向上に関わる宿主因子も組換えタンパク質発現能の異なる細胞株における野生型ウイルス感染細胞 mRNA 発現プロファイリングから同定され、ウイルスベクターの改良方策をデザインするためのもう一つの要素であるウイルス-宿主遺伝子ネットワークモデルを構築するための基盤の構築が進んだ。カイコ BmNPV 感

受性(高発現性)低感受性(低発現性)細胞におけるウイルス感染後の遺伝子発現を RNA-seq により比較した結果、感受性細胞で発現が低下している遺伝子として、スプライシング因子に相同性を示す新規遺伝子(Gene27)を見出した。Gene27 遺伝子のノックダウン細胞では BmNPV によるタンパク質生産が向上したが、他のカイコスプライシング因子 5 種のノックダウンはタンパク質生産に影響しないか、生産の低下を引き起こした。このことから、スプライシング阻害がタンパク質生産の向上を引き起こすのではなく、特定の因子のスプライシング異常が生産向上を引き起こすことが示唆された。

次いで、Gene27 ノックダウン細胞に BmNPV を感染後、RNA-seq 解析を行った。得られた RNA-seq リードデータをカイコリファレンスゲノムおよび遺伝子モデルに対してマッピングし、遺伝子発現量の検定をコントロール細胞、ノックダウン細胞の間で行った。スプライシングへの影響を検討するために TopHat, Cufflinks, Cuffdiff を用いた。その結果、宿主遺伝子については Gene27 ノックダウン細胞ではコントロール細胞に比べて、ウイルス非感染時には 205 遺伝子、ウイルス感染時には 240 遺伝子の発現が変動していた。このうち、137 遺伝子がウイルス感染時において Gene27 ノックダウン細胞特異的に変動していた遺伝子であり、RNAi やエネルギー代謝に関わる遺伝子群が変動することが明らかとなった。また、スプライシングの変化は計 68 遺伝子について観察された。

一方、ウイルスのトランスクリプトームについても Gene27 ノックダウン細胞では変化が観察された。コントロール細胞では 67 種のウイルスゲノム由来の転写単位を検出したが、そのうち 14 種は Gene27 ノックダウン細胞で発現が増加し、残りの遺伝子については発現量が低下した。このことから、Gene27 の発現を操作することで、宿主遺伝子およびウイルス遺伝子の発現が制御可能であることが示された。

また、Bro-b 遺伝子を欠失した BmNPV では、タンパク質生産が向上していることを以前報告しているが、Bro-b 遺伝子欠失と Gene27 ノックダウンはタンパク質生産性において相乗的に作用することを見出しており、これらは異なるサブネットワークにおいて機能すると推定される。

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 2 件)

Hitomi Taka, Chikako Ono, Masanao Sato, Shin-ichiro Asano1 and Hisanori Bando, Construction and phenotypic analysis of BmNPVs lacking viral gene sequences., Journal of Insect

Biotechnology and Sericology, 82, 2013. 査読有り
Chikako Ono, Takanori Kamagata, Hitomi Taka, Ken Sahara, Shin-ichiro Asano, Hisanori Bando, Phenotypic grouping of 141 BmNPVs lacking viral gene sequences., Virus Research, 165, 197-206, 2012. 査読有り

〔学会発表〕(計 16 件)

高ひとみ、小野慎子、佐藤昌直、浅野眞一郎、伴戸久徳、非必須遺伝子の複数ノックアウトがBmNPV増殖に与える影響について、日本蚕糸学会第83回蚕糸・昆虫機能利用学術講演会、2014年3月10日~3月11日、藤沢市。

佐藤昌直、ウイルス遺伝子ネットワークモデリング(招待講演): ウイルス学者は-omicから何を読み取るか、日本ウイルス学会北海道支部会第47回夏季シンポジウム、2013年7月20日~7月21日、奈井江町(北海道)。

Hitomi Taka, Chikako Ono, Masanao Sato, Shin-ichiro Asano, Hisanori Bando, Complex genetic interactions among non-essential genes of BmNPV revealed by multiple gene knockout analysis, International Conference on Agricultural Biodiversity and Sustainability. 2013, Jun. 17-24, Daegu, Korea.

小野慎子、高ひとみ、佐藤昌直、浅野眞一郎、伴戸久徳、AcMNPVIE1遺伝子発現の口バストネスを支えるIE遺伝子ネットワークと保証的相互作用、日本蚕糸学会第84回大会 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会、2013年3月18日~3月19日、藤沢市。

高ひとみ、小野慎子、佐藤昌直、浅野眞一郎、伴戸久徳、複数遺伝子ノックアウトウイルスを用いたウイルス遺伝子相互作用解析、日本蚕糸学会第83回大会 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会、2013年3月18日~3月19日、つくば市。

Masanao Sato, Modeling the gene regulatory network of Bombyx mori nucleopolyhedrovirus T3 strain in early stage of the infection. Foundation of Systems Biology in Engineering 2012. 2012, Oct. 21-25, Morioka, Japan.

高ひとみ、小野慎子、浅野眞一郎、伴戸久徳、ノックアウトバキュロウイルスの作製と解析、第10回昆虫病理研究会シンポジウム、2012年9月21日~9月23日、帯広市。

Hitomi Taka, Chikako Ono, Takanori Kamagata, Shin-ichiro Asano, Hisanori Bando, Construction and phenotypic analysis of BmNPVs lacking viral gene sequences, International Conference on

Agricultural Biodiversity and Sustainability. 2012, Jul. 28-29, Sapporo, Japan.

高ひとみ、伴戸久徳、バキュロウイルス遺伝子発現制御機構の解明と利用に向けた基盤構築。日本ウイルス学会北海道支部会第46回夏季シンポジウム、2012年7月21日~7月22日、伊達市。

永田祐大、副嶋泰彦、門宏明、李在萬、日下部宜宏、カイコ BES を用いたヒト抗菌タンパク質の生産と活性評価、第34回日本分子生物学会、2011年12月13日~12月16日、横浜市。

永田祐大、副嶋泰彦、門宏明、李在萬、日下部宜宏、カイコ -N-acetyl glucosaminidase (BmFDL) のノックダウンが N-グリカン形成に与える影響、第34回日本分子生物学会、2011年12月13日~12月16日、横浜市。

工藤遼亮、門宏明、李在萬、日下部宜宏、バキュロウイルス発現系における小胞体シャペロンの関与、第34回日本分子生物学会、2011年12月13日~12月16日、横浜市。

酒井真美、佐原健、浅野眞一郎、伴戸久徳、The replication properties of BmNPV controlled by a membrane fusion protein. 第34回日本分子生物学会、2011年12月13日~12月16日、横浜市。

Yukimi Akatsuka, Takumi Abe, Yasuyuki Nishijima, Chikako Ono, Ken Sahara, Shin-ichiro Asano, Hisanori Bando, Analysis of a novel transactivator BmNPV p15, XLIV Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, 2011, Aug 7-11, Halifax, Canada.

Daisuke Ohtsuka, Shin-ichiro Asano, Ken Sahara, Hisanori Bando, hr5 as a cis-acting element escaping baculovirus-induced host shut-off, XLIII Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, 2010, Jul. 11-15, Trabzon, Turkey.

Chikako Ono, Ken Sahara, Shin-ichiro Asano, Hisanori Bando, Essential genes of BmNPV, XLIII Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, 2010, Jul. 11-15, Trabzon, Turkey.

〔その他〕

ホームページ

<http://jsss.agr.hokudai.ac.jp/BmNPVpro.htm>

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

日下部 宜宏 (KUSAKABE, Takahiro)
九州大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号：30253595

(3) 研究分担者

佐藤 昌直 (SATOU, Masanao)
基礎生物学研究所・発生遺伝学研究部門・
助教
研究者番号：20517693