

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660038

研究課題名(和文) ゲノム分子進化を用いた弱毒ウイルス作出法の開発

研究課題名(英文) Development of methods for attenuated virus production by genome evolution

研究代表者

柿澤 茂行 (Kakizawa, Shigeyuki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号：10588669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナやそれ以外の植物種においてコドンの調査を行い、コドン頻度やレアコドンについての傾向を掴んだ。またいくつかの植物ウイルスにおいても同様の調査を行い、コドン頻度についての類似性が示唆された。レアコドンに対するtRNA遺伝子を植物において過剰発現させる系の検討を行い、通常の形質転換系で問題ないことが分かり、またウイルスを定期的にサンプリングしたのちその塩基配列を解析する系を検討した。

研究成果の概要(英文)：Rare codons and codon usage frequencies of *Arabidopsis thaliana* and other several plant species were investigated. Also, these from several plant viruses were investigated. Several strategies were examined to make a transgenic plant that express tRNA genes, and normal transgenic method would be appropriate. Experimental approaches for plant virus infection, genome extraction, and sequencing analysis were tried to be established.

研究分野：生物学

キーワード：ウイルス 植物

1. 研究開始当初の背景

近年考案されたレアコドンウイルスは、従来の弱毒ウイルス(生ワクチンウイルス)の問題点の多くを克服した次世代の弱毒ウイルスとして期待されているが(図1, 2)、ウイルスゲノムを人工合成して作製するため遺伝子組換えウイルスになってしまう点

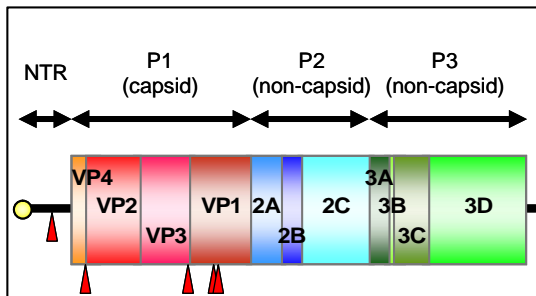


図1. ポリオウイルスの遺伝子構成

ポリオの弱毒ウイルスは、現在も世界中で広く利用されている生ワクチンであるが、赤い矢頭で示した5カ所の変異で強毒株に復帰することが知られている。復帰変異による強毒化と、それに伴うポリオの発症は大きな問題となっている。

図2. レアコドンウイルスの特徴

- 野生株とアミノ酸配列は完全に一致
- 抗原として利用可能
- 複製速度が低下すると期待される
- 生ワクチンとして有効
- ゲノム全体にわたり数百の変異が導入
- 復帰変異しにくい
- 方法論が確立している
- 多くのウイルスに対して適用可能
- 遺伝子組換えを利用して作られる
- 組換えウイルスの安全性審査を経なければならない

が問題である。特に我が国においては遺伝子組換えの安全性基準を満たさなくてはならない点と、遺伝子組み換え生物に対する社会

的な問題も多く、実用化に向けたハードルは極めて高く、非常に困難である。

本研究は、遺伝子組換えを用いることなくレアコドンウイルスを作出する新たな手法を植物ウイルスに対して応用することで、遺伝子組換えでないレアコドン弱毒ウイルスの作出を行うことを目的とする。

レアコドンは、細胞内におけるtRNAの存在量が少ないことに起因すると言われている。あるコドンに対するtRNA量が少ない場合、そのコドンを持つ遺伝子の翻訳速度が低下し、タンパク質の発現量が制限される現象が起こる。その影響は特にタンパク質のN末端側(遺伝子の5'末端側)において強い効果を持つと言われている。大腸菌において外来の遺伝子を発現させる際には、導入する遺伝子のコドンを大腸菌ゲノムのコドン頻度に従って最適化するような手法も広く利用されており、加えて、大腸菌のレアコドンに対するtRNA遺伝子を過剰発現させることで、レアコドンを含む遺伝子でも高発現が期待できるように改変された大腸菌株も多数市販されている。特に、開始コドン度から数十アミノ酸までにレアコドンを持つと、そのタンパク質の発現量が著しく低下する例が多く知られており、遺伝子クローニングの際にN末端付近のレアコドンを解消するようなプライマーを設計することも多々ある。従って、コドン頻度による発現量の制御は多くの生物に共通した性質である。

2. 研究の目的

本研究は、遺伝子組換えを用いることなくレアコドンウイルスを作出する手法を考案し、これを弱毒ウイルス(植物ウイルスの生ワクチン)として利用するための系を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

宿主としてはモデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を用いる。

具体的には以下のようなストラテジーを用いる。

(1) コドン頻度を計算しリストアップ

シロイヌナズナおよびその他の植物種のゲノムについて解析する。同時に、複数種の植物ウイルスゲノムについても解析する。

(2) 導入する tRNA を決定

レアコドンに対応する tRNA 遺伝子の候補をリストアップし、優先順位を決定する。

(3) 遺伝子導入系の検討

効果的に植物細胞内で発現させることが出来る系を検討する。遺伝子導入系・プロモーター系・発現系などが検討対象である。

(4) tRNA 遺伝子の導入

リストアップした tRNA 遺伝子の中から優先順位の高いものを選び、それを用いて植物の形質転換を行い、形質転換体を得ると共に発現量などを確認する。特に、過剰発現系のプロモーターを用いた場合には、遺伝子サイレンシング (RNAi) のメカニズムにより遺伝子の発現がまったく見られない場合があるため、個々の形質転換体について導入遺伝子の発現量を調べる必要がある。

(4) ウイルスを感染・経代

ウイルスを感染させ継代する系を確立する。ウイルス種によって接種 (感染) の方法が異なるため、いくつかの系を検討する必要がある。また感染植物から効果的にウイルス粒子を抽出する系も検討する。

(5) 同時に変異誘導試薬の投与

ウイルスゲノムへの変異導入率を高めるため、変異導入試薬であるリバピリンを同時

に投与する。これによりウイルスゲノムの進化速度を加速させる事ができると期待される。

リバピリンの同時使用はこの効果に加えて、ウイルス複製時の Fidelity (正確性) を高める効果も期待できる。ウイルスゲノムの変異率があまりにも高まってしまうとウイルス配列に変異が蓄積されすぎて絶滅してしまうため、リバピリンを投与して経代する実験系では、ウイルスの複製酵素に「複製エラーが少なくなるような」変異が蓄積することが知られており、すなわちウイルスが持つ複製酵素の Fidelity が高まることを期待され、ウイルス複製時のエラーを低減できるような、正確性の高い酵素へと変化していくことが期待される。

このような変異がウイルスの複製酵素に導入されたならば、ウイルスゲノム全体の変異率が低下すると期待され、これにより完成後のレアコドンウイルスにおける復帰変異の可能性がさらに低下すると予想される。本研究では様々な濃度のリバピリンを投与し、その効果を調べる。

(6) レアコドンウイルスの作出

4. 研究成果

まず、シロイヌナズナゲノムにおけるコドン頻度を調べ、レアコドンリストアップした。加えて、シロイヌナズナ以外の植物種についても同様にコドン頻度を調べた。その結果、多くの植物ではコドン頻度が比較的似ており、レアコドンも似ていることがわかった。加えて、いくつかの植物ウイルスにおけるコドン頻度を調べたところ、宿主である植物ゲノムのコドン頻度とある程度の類似関係にあることがわかり、またレアコドンも同様であることが分かった。

次に、レアコドンに対応する tRNA 遺伝子を用いて植物を形質転換する系を検討した。

その結果、通常の形質転換系で問題ないことが分かった。またウイルスを定期的にサンプリングしたのちその塩基配列を解析する系を検討し、レアコドンウイルスの作出を試みた。

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)

なし

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

柿澤 茂行 (KAKIZAWA SHIGEYUKI)
独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号：10588669

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし