

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20581

研究課題名（和文）昆虫工場における組換えタンパク質生産性改善のための新規指向性進化法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel directed evolution method to improve recombinant protein productivity in insect factories

研究代表者

増田 亮津（Masuda, Akitsu）

九州大学・農学研究院・助教

研究者番号：10967079

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：組換えタンパク質を効率生産可能なカイコ-バキュロウイルス発現系では、難発現性タンパク質が存在することが分かっており、この問題を解決する変異体作製と優良変異体選抜が可能な昆虫独自の指向性進化ツールが必要である。本研究では、バキュロウイルスゲノム上の特定領域への変異導入ツール開発と優良変異体を選抜するために必要なウイルス増殖性に影響するバキュロウイルス遺伝子同定を試みた。変異導入用酵素はバキュロウイルスによって昆虫培養細胞で発現は確認できたが、ターゲットの塩基配列に変異は確認されなかった。ウイルス増殖性に影響する遺伝子の同定では、8遺伝子の候補を調べて増殖性を操作可能な遺伝子を複数特定できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高いタンパク質生産能力を持つカイコの発現系には、その工程の煩雑さからタンパク質の変異体の発現をスルーブット性高く検証するツールが存在しなかった。今回の知見を元に昆虫における独自の指向性進化ツールが実現できれば、他の発現系では作れないようなタンパク質でも機能改変や生産性改善が可能となり、バイオ医薬品やタンパク質材料の分野で大きく貢献できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In the silkworm-baculovirus expression system, which can efficiently produce recombinant proteins, it is known that there are some difficult-to-express proteins. Therefore, insect directed evolutionary tools that enable mutagenesis and selection of favourable mutants are needed to solve this problem. In this study, we attempted to develop a tool for introducing mutations into specific regions of the baculovirus genome and to identify baculovirus genes that affect viral proliferation, which is necessary for selecting desired mutants. The mutagenic enzyme was found to be expressed by the baculovirus in cultured insect cells, but no mutations in the target sequence were identified. In the identification of genes affecting viral proliferability, eight candidate genes were examined and several genes that could manipulate proliferability were identified.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：カイコ バキュロウイルス 変異導入 組換えタンパク質 指向性進化

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質の機能はアミノ酸配列やそれによって形成される構造に依存するため、1アミノ酸の変異でその機能が大きく変化することがある。そのため、ランダムな変異導入と選抜を繰り返すことで、求める機能を獲得するように進化させる指向性進化法は強力な新規機能分子の創出手法である。組換えタンパク質を効率的に生産可能なカイコ・バキュロウイルス発現系では、他生物で作れないタンパク質を作製可能な例がある一方で難発現性のタンパク質が存在することもわかっており、このような問題を解決するような変異体作製と優良変異体の選抜が可能な昆虫独自の指向性進化ツールが必要とされている。

### 2. 研究の目的

本研究は、カイコに感染するバキュロウイルスに、昆虫生体内において指向性進化のサイクルを実行させ、カイコ・バキュロウイルス発現系における組換えタンパク質の生産性改善を分子進化によって可能にすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 1) バキュロウイルスゲノム上の特定領域への変異導入法の確立

バキュロウイルスのゲノム上の特定領域の塩基配列に、変異導入が可能であるかを検証する。変異導入法としては、DNAを脱アミン化することで塩基置換を導入できる塩基デアミナーゼ (BD) を T7RNA ポリメラーゼ (T7RNAP) に融合した BD-T7RNAP を使用する [Cravens et al., 2021]。具体的には、BmNPV のゲノムに、BD-T7RNAP および T7 プロモーターとその直下に変異を導入したい目的遺伝子 (GOI) を組み込む。この組換え BmNPV ゲノムが昆虫細胞内で BD-T7RNAP を発現させると、GOI にランダムな塩基置換が引き起こされる。変異導入の確認は、ウイルスから回収した BmNPV ゲノムの GOI 周辺の領域を、次世代シーケンサーで配列決定することで行う。これにより、BD-T7RNAP によるバキュロウイルスのゲノム上の特定領域の変異導入効率が変わり、変異体ライブラリーの作製能力を示す事ができる。

#### 2) 指向性進化における目的変異体の自動選抜に利用可能な BmNPV 遺伝子の選抜

本研究では、変異によって目的タンパク質の発現量が増加したとき、ウイルスの効率的な増殖に必要な遺伝子の発現も同時に向上し、ウイルスが増殖しやすくなれば、自動的に目的とする変異体を選抜できると考えた。そのツールとして必要となる発現量に依存して増殖性が向上するようなウイルス遺伝子を選抜する。先行研究より、BmNPV の遺伝子 141 個をそれぞれ 1 つずつノックアウト (KO) したウイルスの増殖性の違いから、A~D の遺伝子群に分類されている [Ono et al., 2012]。その中でも Type B の遺伝子群は、ノックアウトすると、昆虫細胞で、ウイルスの増殖が遅くなる遺伝子群である。そこで、複数ある Type B 遺伝子をそれぞれノックアウトした BmNPV を使用し、そのノックアウトウイルスに対して同じ Type B 遺伝子を別の遺伝子座から発現させると、増殖性が回復するのかどうかを検証する (レスキュー実験)。これにより、指向性進化実験による目的変異体の選抜に利用できる遺伝子を特定する

#### 3) バキュロウイルス感染によるカイコ体内での指向性進化の実証

1) と 2) を統合し、BmNPV に感染したカイコ個体内で目的タンパク質の発現量が向上するような指向性進化が起こることを証明する。まず、2) で選抜した Type B 遺伝子をノックアウトした BmNPV ゲノムに、1) の変異導入ツールを組み込む。ここで、目的タンパク質の発現が増加した際に、Type B 遺伝子の発現が増加する仕組みとして、GAL4-UAS システムという、“転写因子 GAL4 によって UAS 配列直下の遺伝子を強制発現するシステム” を使用し [Fields et al., 1989]、目的タンパク質の発現が変異によって改善されると、Type B 遺伝子の転写・発現を活性化し、BmNPV の増殖が促進される遺伝子回路を構築する。

### 4. 研究成果

#### 1)

まずポリヘドリンプロモーターによって BD-T7RNAP を発現する遺伝子カセットと変異導入ターゲットの T7 プロモーターと EGFP の配列を導入した組換えバクミドを作製した。変異導入酵素 BD はシチジンデアミナーゼ (CD) とアデノシンデアミナーゼ (AD) の 2 種類をそれぞれ使用した (図 1)。構築した組換えバクミドをカイコ 5 齢幼虫にトランスフェクションし、数日間飼育した所、変異導入酵素の発現レポーターである tdTomato の発現が幼虫の全身で見られたため、ウイルスが増殖し、酵素が発現していることが確認できた。さらに、幼虫脂肪体を摘出し、タンパク質を抽出した後、T7RNAP 抗体を用いたウエスタンブロットティングを行った所、目的分子量にバンドが

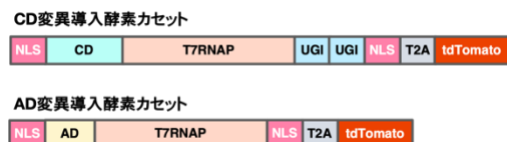


図 1

見られたことから、各 BD-T7RNAP が強く発現していることが確認できた (図2)。そこで、幼虫血清を採取し、バキュロウイルスのゲノムを抽出精製し、変異導入のターゲット領域を次世代シーケンスに供試し、変異導入の有無を解析した。その結果著しい変異の蓄積は確認できなかった。そのため、BD-T7RNAP の発現タイミングが変異導入に影響していることを考え、発現するためのプロモーターを感染初期に発現する IE1 プロモーター及び、感染後期に発現する GP41 プロモーターに変えて変異導入の実験を行った。今回はカイコ培養細胞 BmN で実験を行い、変異蓄積をより明確にするため、ウイルスを 5 回継代して実験を行った。いずれのプロモーターでも酵素発現のレポーターは確認されたので、発現していることは確認できたが、次世代シーケンサーでの変異解析ではどの区も顕著な変異は見られなかった。この原因として、BD-T7RNAP は確かに細胞内で発現しているが、ターゲット配列をもつウイルスゲノムが存在する領域に局在していないため変異導入が行われていない可能性がある。そのため、部位特異的な変異導入を達成するために今後は BD-T7RNAP の局在を確認し、ウイルスゲノムが存在する場所へと効率よく局在させるための仕組みを構築する。

1次抗体: rabbit anti T7RNAP (1:2000, 29943-1-AP)  
2次抗体: anti rabbit IgG-HRP (1:10000, ab97080)

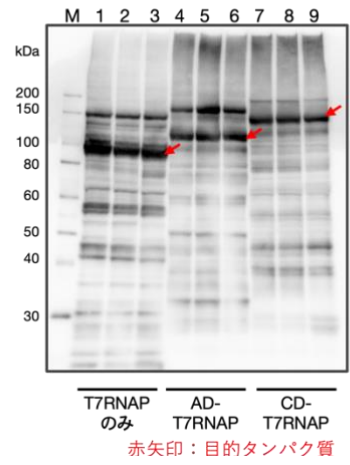


図 2

2)

すでに報告されているノックアウトすることでウイルス増殖が遅延するとされる BmNPV バキュロウイルス遺伝子群である type B 遺伝子を 8 種類それぞれ  $\lambda$ -Red 組換えによってノックアウトしたバクミドを作製した (図3)。感染のレポーターとして EGFP を発現するような遺伝子カセットを導入したノックアウトバクミドを作製し、さらにノックアウトした type B 遺伝子をポリヘドリンプロモーターの下流に配置したレスキューバクミドも作製した。レスキューバクミドにおける Type B 遺伝子の発現は tdTomato の赤色蛍光で観察できるようにした。これらのバクミドをカイコ培養細胞である BmN にトランスフェクションしたところ、レスキューバクミドで赤色蛍光が確認できたため、type B 遺伝子が発現していることが確認できた。そこで、トランスフェクションから 5 日後の増幅したウイルスを回収しプラークアッセイによってノックアウト・レスキューウイルスそれぞれの力価を測った。その結果、kip, ORF65, me53 ではノックアウトによって低かったウイルス増殖性がレスキューによって positive control として用いた type B 遺伝子をノックアウトしていないウイルスと同程度の増殖性に回復したが、odv-e18 では増殖性が回復していなかった (図4)。これにより、指向性進化実験による目的変異体の選抜に利用できるウイルス増殖性を操作可能な遺伝子を複数絞り込むことができた。

	type B 遺伝子	ORF
1	kip	15
2	ORF17	17
3	ORF65	65
4	gp41	66
5	me53	116
6	ie-0	117
7	odv-e18	119
8	bro-d	131

図 3

	type B 遺伝子	ノックアウトウイルス 力価 (pfu/mL)	レスキューウイルス 力価 (pfu/mL)
1	kip	<1000	$1.4 \times 10^5$
2	ORF17	<1000	$2.0 \times 10^3$
3	ORF65	<1000	$6.0 \times 10^5$
4	gp41	$4.4 \times 10^5$	$2.2 \times 10^5$
5	me53	<1000	$2.0 \times 10^5$
6	ie-0	$2.4 \times 10^5$	$3.6 \times 10^5$
7	odv-e18	<1000	<1000
8	bro-d	$2.4 \times 10^6$	$4.0 \times 10^5$
	positive control		$5.8 \times 10^5$

図 4

このように、本研究では変異導入を効率的に可能なシステムの確立に至らなかったが、優良変異体の選抜に利用できそうなウイルス増殖性を司る遺伝子候補を絞ることができた。今後は変異導入を狙った位置に起こすための問題となっているであろう局在の問題にフォーカスし、カイコで分子の指向性進化を可能とするようなシステムの構築を進めていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------