

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2021

課題番号：17K08162

研究課題名（和文）昆虫細胞によるバキュロウイルス非依存型高効率タンパク質発現系の構築

研究課題名（英文）Construction of baculovirus-independent highly efficient protein expression system in insect cells

研究代表者

永峰 俊弘（Nagamine, Toshihiro）

国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・専任研究員

研究者番号：90237553

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、ウイルスによる宿主細胞のシャットオフ機構を利用して、昆虫細胞によるバキュロウイルス非依存型高効率タンパク質発現系を構築することを目的として開始された。発現系の構築には至らなかったが、シャットオフ機構に関連していると考えられるliquid-liquid phase separation (LLPS) を誘導するタンパク質、IE1の感染ステージに伴った構造変化を見出し、IE1がLLPS形成の重要なコンフォメーションスイッチであることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バキュロウイルスの転写はvirogenic stroma (VS) と呼ばれるウイルスが誘導する核内構造体、すなわちLLPS内で進行する。従って、LLPS形成はウイルスによる宿主細胞のシャットオフ機構に大きく関連していると考えられるが、それだけに留まらず、LLPSは細胞の転写全体に関連している。従って、本研究によって、IE1依存的なLLPS形成機構の一端が解明されたことは、バキュロウイルスのシャットオフ機構研究が、細胞の転写機構全体を理解するための重要なモデルシステムと成り得ることを示している。

研究成果の概要（英文）：This study was initiated to construct a baculovirus-independent highly efficient protein expression system in insect cells using a virus-induced host cell shut-off mechanism. Although we could not construct the expression system, we found structural changes of IE1, a protein that induces liquid-liquid phase separation (LLPS), which is thought to be related to the shut-off mechanism, with the infection stage, and found that IE1 is an important conformational switch for LLPS formation.

研究分野：昆虫ウイルス学

キーワード：バキュロウイルス

1. 研究開始当初の背景

バキュロウイルス感染に伴う多角体タンパク質遺伝子の発現は、天然の遺伝子としては他に類を見ない高い発現量を示す。従来、この高い遺伝子発現量は強力なプロモーターによる高い転写効率によって説明されてきた。実際、通常の細胞遺伝子では多くの場合、遺伝子発現量は転写効率によって制御されている。細胞全体のタンパク質合成速度は転移 RNA やリボソームの数によって規定されており、多数の遺伝子が同時発現している通常の細胞では、多くの転写物によって翻訳装置の奪い合い、競合が起きている。また、転写自体も、多数の遺伝子を同時発現しようとするれば、それぞれの遺伝子間で転写装置の奪い合いが生じる。こうした状況下ではいわゆるプロモーター活性の強度で総称される、他の遺伝子より多くの転写物を産生する仕組みによって、最終産物の合成量も増加する。従って、通常の細胞でのプロモーター活性はあくまでも他の遺伝子との競合が前提となっており、仮に、こうした競合が存在しない状況では、同じプロモーターでも競合下とは比較にならない発現量が期待できる。

事実、バキュロウイルスの遺伝子発現は宿主細胞タンパク質の発現抑制(シャットオフ)によって効率化がはかられている。シャットオフ前に発現するウイルス初期タンパク質群は、細胞遺伝子との競合があるため、転写活性化因子が必要となる。しかし、シャットオフ発動後に発現する後期遺伝子群は、ウイルス自身がコードしている転写系を利用してはいるものの、特別な機構なしにある程度の高い発現量が確保されている。この時、多角体タンパク質遺伝子も発現を開始するが、他のウイルス遺伝子と同時に発現している時には、際立った発現効率は示さない。しかし、感染終盤、多くのウイルス遺伝子の発現も停止し、多角体タンパク質遺伝子と P10 と呼ばれるタンパク質の遺伝子のみが発現するようになると、他のウイルス遺伝子の発現低下に伴って、2 種の遺伝子発現量が劇的に増加する。これはウイルス遺伝子間での競合がなくなり、細胞が持つタンパク質生産能(翻訳能)を 2 種類の転写物に集中した結果である。実際、多角体タンパク質遺伝子の転写物が野生型の 10 分の 1 となる変異体においても、多角体タンパク質の生産量には違いが認められないことが知られており、これは翻訳効率が多角体タンパク質生産量を規定していることを示している。

2. 研究の目的

従って、どのようなプロモーターを持つ遺伝子であっても、シャットオフ機構によって単独発現させることができれば、極めて高い、おそらく多角体タンパク質遺伝子に匹敵する発現量を期待することができる。しかしながら現在、そのバキュロウイルスのシャットオフ機構が未解明のためにウイルスに依存しない単独発現系を構築することが不可能となっている。そこで本研究では、まずこのバキュロウイルスのシャットオフ機構に関するウイルス遺伝子を探索する。

バキュロウイルスに関しては、ウイルス遺伝子の網羅的な機能解析が不十分なために現時点でも機能未知遺伝子が多数存在する。機能解析の困難さの最大の原因は、RNA 干渉(RNAi)が利用できなかったことである。バキュロウイルス感染細胞では RNAi がほとんど機能しない。しかし最近、RNAi の阻害因子が抗アポトーシスタンパク質でもある P35 だということが明らかにされ、p35 欠損ウイルスでは RNAi が有効であることが示された(Mehrabadi et al., 2015; J. Virol., 89, 8182-8192)。従って、p35 欠損ウイルスを使えば、RNAi による網羅的な機能解析が可能となるはずだが、実際には、発現ベクターに利用されている代表的なバキュロウイルス、*Autographa californica* Multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) においては p35 欠損ウイルスは宿主細胞にアポトーシスを誘導するため、網羅的な機能解析には不向きである。

一方、これまで私達は一貫して、カイコ細胞に感染するバキュロウイルス、*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV: カイコ核多角体病ウイルス)を研究対象としてきた。BmNPV と AcMNPV は宿主範囲だけは異なっているものの、両者は 90% 以上のゲノム配列の相同性があり、増殖機構も極めて良く似たウイルスである。しかしながら、宿主範囲に加えて、もう一つの両者の違いは、p35 欠損 BmNPV が p35 欠損 AcMNPV とは異なって宿主細胞すなわちカイコ細胞にアポトーシスをほとんど起こさないことである (Kamita et al., 1993; J. Virol. 67, 455-463; Nagamine & Sako, 2016; PLoS ONE 11: e0156394)。従って、p35 欠損 BmNPV とカイコ細胞の組み合わせを用いれば RNAi によるバキュロウイルス遺伝子の網羅的な機能解析が可能となる。しかも、BmNPV は AcMNPV に良く似ているため、BmNPV で得られた知見はそのまま AcMNPV にも適用することが期待できる。従って、シャットオフ機構を利用する際にも、カイコ細胞に留まらず、AcMNPV の宿主細胞である Sf 細胞や High Five 細胞にも適用できる可能性が極めて高い。

網羅的な機能解析によってシャットオフ機構に関連する遺伝子が同定された後は、その遺伝子を利用してシャットオフ機構の詳細を解明する。そして最終的には得られた知見を基に培養細胞にシャットオフを誘導しながら、導入遺伝子の発現を可能とするプラスミドベクターの構築を目指す。

3. 研究の方法

宿主細胞のタンパク質発現抑制（シャットオフ）機構に関連するウイルス遺伝子を探索するため、p35 欠損 BmNPV の全 135 遺伝子に対して RNAi 法を使ってノックダウン実験を行う。ノックダウンによる細胞及びウイルスの mRNA 変化量を real-time RT-PCR 法で計測し、シャットオフに関連する可能性がある遺伝子を選抜する。選抜された候補遺伝子は非感染細胞に順次、単独あるいは複数個同時発現させることによって、シャットオフ活性の確認を行う。シャットオフ遺伝子が同定された後は、高効率タンパク質発現実現のため、シャットオフ遺伝子と目的遺伝子の同時発現系を構築する。シャットオフ遺伝子が目的遺伝子発現にも影響する場合には、バキュロウイルス転写系を含む外来転写系の導入を検討する。

4. 研究成果

平成 29 年度

29 年度は宿主細胞のタンパク質発現抑制（シャットオフ）機構に関連するウイルス遺伝子を探索するため、RNAi 法を使ってノックダウン実験を行った。当初の実験計画では各遺伝子から 500bp 程度の DNA 断片を PCR 増幅し、次にその増幅断片を用いて、2 本鎖 RNA を合成する 2 段階反応を行う予定であった。しかしより効率的に RNAi スクリーニングを行うため、in vitro Transcription T7 Kit（Takara）を用いて、1 段階で siRNA を合成して、得られた siRNA をトランスフェクション試薬を用いてカイコ細胞に導入する方法を検討した。具体的には、先ず siRNA のセンス鎖、アンチセンス鎖それぞれに対して一組ずつ、計 4 本について適切な向きに T7 プロモーター配列を付加したオリゴヌクレオチドを適切な組み合わせでアニーリングし、この鋳型 DNA を使って in vitro Transcription を行う。最後に RNaseT1 処理を行って siRNA を合成する。実際、この方法で作製した siRNA と GFP 遺伝子を同時にトランスフェクションして RNAi 実験を行った結果、抑制効果が確認できた。しかし、複数回同じ実験を繰り返した場合には時として効果にばらつきも認められた。ウイルス感染に対する siRNA の効果はトランスフェクション効率が低いために十分な抑制効果が得られなかったが、ウイルスのゲノム DNA と siRNA を同時にトランスフェクションすることによって抑制効果を検証できた。

平成 30 年度

30 年度も当初、BmN4-SID1 細胞を使つての RNAi 実験を開始していたが、その間に新たな知見として、細胞の転写機構に liquid-liquid phase separation (LLPS) が重要な役割を果たしていることが次々と報告された (Science [2018] 361: 378, Science [2018] 361: 379, Science [2018] 361: 412-415, Cell [2018] 175: 1842-1855)。また数年前より、核小体のような膜を持たない構造体の構造維持にも、この LLPS が大きく関与していることが報告され始めていた (Cell [2016] 165: 1686-1697, Cell [2016] 166: 651-663, Cell [2018] 175: 1467-1480, Cell [2018] 175: 1481-1491)。バキュロウイルスの転写は virogenic stroma (VS) と呼ばれるウイルスが誘導する核内構造体で進行し、この VS も LLPS によって構造維持されていると考えられる。従つて、ウイルス感染による VS 及びもう一つのウイルス誘導核内構造体 peristromal region (PR) の LLPS が、細胞内のその他の LLPS に大きく影響し、これがシャットオフ機構と関連している可能性が高くなつてきた。実際、感染細胞内の核小体は、VS と PR によって、光学顕微鏡では観測できないほど凝縮されていることが分かっている。そこで 30 年度は VS と PR の LLPS 誘導機構の解析を開始した。LLPS には天然変性領域 (IDR) 間の相互作用が重要であることが明らかになっている。そこで、まず、40 残基以上の IDR を持つバキュロウイルスタンパク質を調査した。その結果、18 種のタンパク質が見つかった。

令和元年度

細胞の転写に liquid-liquid phase separation (LLPS) が重要な役割を果たしていることが明らかとなり、本研究の中心課題であるウイルスによる宿主細胞のシャットオフ機構の解明にも LLPS との関連からのアプローチが必要となつてきた。LLPS には天然変性領域 (IDR) 間の相互作用が重要であることが明らかになっているので、30 年度は 40 残基以上の IDR を持つバキュロウイルスタンパク質 18 種のうち、VS あるいは PR 局在が既に分かっているタンパク質の IDR を中心に解析を進めた。その結果、IE1 による LLPS 形成には、IE1 の構造変化が関わっている可能性が推測されたので、令和元年度は IE1 の構造変化の詳細な解析を開始した。そのため、まず、IE1 の N 末端に GFP、C 末端に Halo タグを介して TMR を結合させて分子内 FRET の計測を行った。その結果、非感染細胞内と virogenic stroma (VS) 内では FRET 値に違いが認められ、LLPS 形成に伴つて、IE1 は構造変化することが明らかとなった。

令和 2 年度

令和 2 年度は、LLPS である virogenic stroma (VS) 形成に中心的な役割を果たしている IE1 の詳細な解析が宿主細胞のシャットオフ機構の解明に必須であると判断し、IE1 を 3 分割して、IE1 の構造と LLPS の関連について解析を開始した。hr 配列と呼ばれるウイルス DNA 領域に結合し、IE1 の点状構造 (LLPS) 形成に必要な BDI 領域は I ドメインの N 末端に存在する。その BDI を欠損させた変異 IE1 は、野生型同様、核に局在できることが明らかとなった。その一方、BDI

のすぐ近傍に存在する KRK 配列を欠損させると、その変異 IE1 は核に局在できなかつた。しかし、KRK 配列だけでは核局在シグナルとして機能できないことが明らかとなった。また、BDI 同様、核局在あるいは DNA 結合に重要であると考えられている BDII 領域は C ドメインに存在する。C ドメイン単独では核に局在できるが、I & C ドメインは核に局在できないことが判明し、構造依存的な局在機構の存在が明らかとなってきた。

令和 3 年度

3 年度は LLPS である virogenic stroma (VS) 形成に中心的な役割を果たしている IE1 の構造と LLPS の関連について解析した。hr 配列と呼ばれるウイルス DNA 領域に結合し、IE1 の点状構造 (LLPS) 形成に必要な BD1b 領域を欠損させた変異 IE1 は、野生型同様、核に局在できることが明らかとなった。その一方、BD1b のすぐ近傍に存在する BD1a(KRK) 配列を欠損させると、その変異 IE1 は核に局在できなかつた。しかし、KRK 配列だけでは核局在シグナルとして機能できず、IE1 の核局在には BD1a と BD1b の両方が必要であることが明らかとなった。また、BDI 同様、核局在あるいは DNA 結合に重要であると考えられている BDII 領域あるいは HLH 領域を欠損すると、DNA 結合能が失われて VS に局在できなくなることが分かった。更に、IE1 及びその断片の FRET プローブを作製することによって、感染ステージに伴った IE1 の構造変化が明らかとなり、IE1 が LLPS 形成の重要なコンフォメーションスイッチであることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nagamine Toshihiro	4. 巻 47
2. 論文標題 Apoptotic arms races in insect baculovirus coevolution	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physiological Entomology	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/phen.12371	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Lye Ping Ying, Noor Suriani Mohd, Shohaimi Syamsiah Aini, Junoh Niny Fariza, Tan Soo Choon, Iwamoto Shinichi, Kotani Eiji, Norazmi Mohd Nor, Nagamine Toshihiro, Mori Hajime, Liew Mervyn W.O.	4. 巻 90
2. 論文標題 Process development for quantitation and vaccine efficacy assessment of recombinant hemagglutinin-neuraminidase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Process Biochemistry	6. 最初と最後の頁 204~214
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.procbio.2019.11.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Lian Ai A, Tan Soo C, Nagamine Toshihiro, Liew Mervyn WO	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Salt induced phase separation of CHAPS and potential application for hydrophobic molecule extraction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Chemical Technology & Biotechnology	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jctb.6016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Nagamine Toshihiro, Inaba Takehiko, Sako Yasushi	4. 巻 532
2. 論文標題 A nuclear envelop-associated baculovirus protein promotes intranuclear lipid accumulation during infection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 108~117
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.virol.2019.04.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 永峰俊弘・佐甲靖志
2. 発表標題 バキュロウイルスのODV（包埋ウイルス）形成機構：PR脂質によるカプシド捕獲モデル
3. 学会等名 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 永峰俊弘・稲葉岳彦・佐甲靖志
2. 発表標題 バキュロウイルス核膜タンパク質Bm5 / Ac13（B10N）の機能解析
3. 学会等名 日本蚕糸学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永峰俊弘 稲葉岳彦 佐甲靖志
2. 発表標題 バキュロウイルス核膜タンパク質Bm5/Ac13の局在機構解析
3. 学会等名 日本蚕糸学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 永峰俊弘	4. 発行年 2022年
2. 出版社 ニューサイエンス社	5. 総ページ数 4
3. 書名 月刊「昆虫と自然」	

1. 著者名 永峰俊弘	4. 発行年 2019年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 5
3. 書名 アグリバイオ (2019, vol.3, No.12, 1149-1153)	

1. 著者名 永峰俊弘	4. 発行年 2019年
2. 出版社 ニューサイエンス社	5. 総ページ数 4
3. 書名 月刊「昆虫と自然」	

〔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
---------	---------