様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　３年　５月１０日現在

機関番号：１７４０１
研究種目：若手研究
研究期間：2018～2020
課題番号：１８Ｋ１４６８６

研究課題名（和文）次世代型汎用バキュロウイルスベクターシステム基盤の創出

研究課題名（英文）Development of universal baculovirus vector system for synthetic biology

研究代表者
田附　常幸（TATSUKE, Tsuneyuki）

熊本大学・大学院先端科学研究部（工）・特任准教授

研究者番号：８０６３７８４３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究はバキュロウイルスを合成生物学で使用可能な汎用性の高いベクターとして再構築することを目的とした。バキュロウイルスの遺伝的最小化を目指して、Bacmidとして大腸菌で複製可能なバキュロウイルスゲノムDNAに試験管内で短いDNA断片を複数挿入し、昆虫培養細胞で増殖する多遺伝子破壊バキュロウイルスライブラリを作製した。これをウイルスの増殖が認められなくなるまで繰り返し、遺伝的におよそ最小化された多遺伝子欠損バキュロウイルスゲノムDNAライブラリを作出した。このライブラリは次世代型汎用バキュロウイルスベクターの原型となる候補を複数含んでいると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義
昆虫を宿主とするバキュロウイルスは高等真核生物での遺伝子発現ベクターとしてバイオ医薬品の生産などで利用されている。本研究はバキュロウイルスを汎用遺伝子発現ベクターとして最大限に利用するために様々な多遺伝子破壊バキュロウイルスをライブラリとして作製した。この多遺伝子破壊バキュロウイルスライブラリは様々な用途に使用できる原型となる多遺伝子破壊バキュロウイルスを含んでいると考えられ、バキュロウイルスの多用途化に貢献できると期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to reconstruct baculoviruses as versatile virus vectors for synthetic biology. I inserted several short DNA fragments in vitro into baculovirus genomic DNA to generate genetically minimum baculovirus genomic DNA. From them, I produced a polygene-deficient baculovirus library that can multiply in cultured insect cells. This process was repeated until viral replication was not observed, and a genetically minimized polygene-deficient baculovirus genomic DNA library was generated. This library is thought to contain several candidates for the prototype of next-generation general-purpose baculovirus vectors for synthetic biology.

研究分野：分子生物学

キーワード：バキュロウイルス　ゲノム科学　ウイルスベクター

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

環状二本鎖 DNA ゲノムを持ち、昆虫を宿主とするバキュロウイルスは高等真核細胞での遺伝子発現ベクターとしてバイオ医薬品の生産等で利用されている。バキュロウイルスは同一のゲノム DNA から包埋体由来ウイルス（ODV）と出芽ウイルス（BV）を生産するが、遺伝子発現ベクターとしては BV のみで機能する。ODV は昆虫個体間、BV は宿主昆虫体内での細胞間のウイルス伝播において機能している。しかし、遺伝子工学的な利用状況では ODV は非必須である。バキュロウイルスの個々の遺伝子はノックアウトによる機能解析が行われているが（Ono et al. Virus Res. 2012）、システム規模の解析や分類の報告はない。そのため、どのような遺伝子構成が最小システムとして機能するのか不明であった。

また、バキュロウイルスは構成要素が少なく、システムの起動と複製を宿主に依存しているため、低コストで高解像度な解析や試行錯誤が可能である。さらに、養蚕業との関係から基礎・応用研究の歴史的蓄積が豊富なだけでなく、バイオ医薬品生産で用いられているため産業利用が短期で実現可能である。このような点から、バキュロウイルスは合成生物学研究の対象として高い価値を持っているが、合成生物学の研究基盤が不足していた。

さらに、カイコバキュロウイルスである BmNPV は遺伝子を一つずつノックアウトした場合の表現型に基づいて、必須および非必須とされる遺伝子のグループ分けがなされていた（Ono et al. Virus Res. 2012）。しかし、このような個々の遺伝子を対象とした評価方法は遺伝子の相互関係が考慮されておらず、この方法で必須とされた遺伝子を集めるだけでは動作する最小システムの構築は難しい。2016 年に機能する人工デザインの原核生物最小ゲノムを報告した Hutchison らのグループも類似した問題に直面している（Hutchison et al. Science 2016）。本研究は Ono らとは異なるアプローチでバキュロウイルスシステムのリファクタリングを行い、遺伝子をシステム規模で必須・非必須に分類することで、大型の DNA ウイルスそのものの理解を深化させる性格を持っている。

これらのことから、本研究はバキュロウイルスの全遺伝子から BV の生産に必須の遺伝子群を同定し、ウイルスとして機能する最小システムの遺伝子構成を明らかにし、これを基盤とした合成生物学研究を可能にする次世代型汎用バキュロウイルスベクターの創出を目指した。

２．研究の目的

BV の生産に関わる遺伝子群をシステム規模で相互関係を考慮に入れて同定し、構成要素を整理・再編することで再構成に必要な基礎知見を収集し、バキュロウイルスベクターとして機能する最小の基本システムを再利用可能な Bacmid として構築することを目的とした。

また、本研究はバキュロウイルスのゲノム DNA のランダム欠失に基づくライブラリより近似的な最小システムを複数得て（情報工学における組合せ最適化問題のメタヒューリスティクスな手法に相当）、機能する最小システムを複数構築し、合成生物学で利用可能なシャーシ（元になるシステム）を作出することを目的とした。

３．研究の方法

本研究はバキュロウイルスを汎用遺伝子発現ベクターとして最大限に活用するために、最小の機能を持つ基本システムを同定・構築し、様々な人工遺伝子回路を拡張システムとして搭載可能な次世代型汎用バキュロウイルスベクターシステムの基盤を創出する。そのために、①分子生物学実験、②バイオインフォマティクス解析、③合成生物学的再構成実験を行い、BV の生産に関わる遺伝子群をシステム規模で相互関係を考慮に入れて同定し、構成要素を整理・再編することで再構成に必要な基礎知見を収集し、バキュロウイルスベクターとして機能する最小の基本システムを再利用可能な Bacmid として構築する予定であった。

本研究は最初の段階である①分子生物学実験でトラブルが発生したため、バキュロウイルスゲノム DNA 短縮システムの見直しを行い、遺伝的に最小なバキュロウイルスシステムの構築を行うことに方針転換を行った。

４．研究成果

本研究で最初に開発したバキュロウイルスゲノムの短縮を目的としたシステムは複数のトランスポゾンから構成される数 kb の巨大なコンストラクトであった。このため、このコンストラクトをバキュロウイルスゲノムに複数挿入させると、昆虫培養細胞内でバキュロウイルスが複製されないという問題が発生した。これは、バキュロウイルスのゲノム DNA が巨大化しすぎたため、バキュロウイルスの正常な複製が妨げられたと考えられる。

そこで、本研究は再度バキュロウイルスのゲノム DNA の短縮システムを開発した。このシステムは次世代シーケンサーのシーケンス用のライブラリの作製方法をもとにしたアイデアで、高活性 Tn5 トランスポゼースとその認識領域を両端に持つ数十 bp の dsDNA 断片を使用して試験管内でバキュロウイルスゲノム DNA を多遺伝子破壊（遺伝子への挿入による）させるものである。このシステムの動作は良好であり、バキュロウイルスの複製を妨げることなく遺伝子破壊を行うことができた。このシステムはバキュロウイルスに限らず、環状二本鎖 DNA をゲノムとして持つウイルスにも使用可能であると考えられる。このシステムが良好に動作した要因としては、短い DNA 断片をゲノム DNA に複数入れることで、ゲノム構造の変化を最小に抑えられたことや前システムのようなゲノム DNA の巨大化を抑えることができたからであると考えられ

る。
　再開発したこのシステムを用いて遺伝的に最小なバキュロウイルスゲノムDNAの作出を試みた。試験管内でのバキュロウイルスゲノムの多遺伝子破壊を行い、培養細胞内で複製されるバキュロウイルスのゲノム DNA を回収し（これを一世代とする）、再び試験管内でのバキュロウイルスゲノムの多遺伝子破壊を行うという操作をバキュロウイルスが複製しなくなるまで繰り返した。その結果、バキュロウイルスの複製が全く確認できない世代が確認された。この世代の一世代前を近似的な最小バキュロウイルスゲノム DNA ライブラリとした。
　この操作で作製した近似的な最小バキュロウイルスゲノム DNA ライブラリには単一の最小ゲノム DNA が含まれているのではなく、様々なタイプの遺伝的に最小なゲノム DNA が含まれていると期待される。このゲノムライブラリには次世代型汎用バキュロウイルスベクターの原型（シャーシ）となる候補を複数含んでいると考えられる。

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