

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580064

研究課題名（和文）

培養細胞を用いない組換えバキュロウイルス構築法の開発とその利用

研究課題名（英文）

Construction of recombinant baculoviruses without using cell cultures

研究代表者

仲井 まどか（NAKAI MADOKA）

東京農工大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：60302907

研究成果の概要（和文）：

バキュロウイルスは、昆虫のみに感染する DNA ウイルスであり害虫防除資材として世界中で使用されている。また、タンパク質の発現ベクターとしても利用されている。これまで、約 600 種のバキュロウイルスが報告されているが、詳細な感染過程や遺伝子の機能が明らかにされているのは、タイプ種を含む一部のウイルス種に限られている。その主な理由は、特に顆粒病ウイルスなどバキュロウイルスの多くの種で感染可能な培養細胞がないため、組換えウイルスが作製できないからである。リバーズジェネティクスによる遺伝子機能解析には、特定の遺伝子を破壊した組換えウイルスを用いるが、組換えウイルスの作製には感染可能な培養細胞が必要であり、これまで感染可能な培養細胞のないウイルス種の遺伝子の機能解析はできなかった。そこで本課題は、培養細胞を用いずに組換えバキュロウイルスの構築法を開発することを目的とした。主な成果は、バキュロウイルスのゲノムに大腸菌の複製起点を導入することにより大腸菌内で遺伝子組換えを可能にするバックミド DNA の作製法を確立したことである。

研究成果の概要（英文）：

Construction of recombinant viruses is important for elucidating viral gene function and infection processes, as well as for recombinant protein production. However, with the exception of a few model systems, most of the ~600 known baculoviruses lack permissive cell lines in which recombinant genotypes can be produced and, consequently, the molecular pathology of those viruses is poorly understood. The purpose of this study was to establish a generally applicable methodology to construct recombinant baculoviruses without having to use cell culture. In this study, the bacmid system was constructed using baculoviruses genome introduced with bacterial replication origin and generated recombinant virus DNA was established.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
H21 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
H22 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
H23 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用昆虫学

キーワード：(1) 組換えウイルス (2) 顆粒病ウイルス (3) 核多角体病ウイルス
(4) トランスファーベクター (5) チャノコカクモンハマキ (6) バックミド

1. 研究開始当初の背景

バキュロウイルスの遺伝子機能がわかっているのは、特定の遺伝子を欠損させる遺伝子組

換えが可能な分離株に限られており、また遺伝子組換えウイルスの作製には培養細胞が必要なので、感染可能な培養細胞が見つからないウイルス種についてはその遺伝子の機能解析が行えなかった。本研究では、培養細胞を用いずに主にバキュロウイルスのゲノムに大腸菌の複製起点を導入することにより大腸菌内で遺伝子組換えを可能にするバックミド (bacmid) DNA の作製手法を用いて、これまで遺伝子組換えが行えなかった顆粒病ウイルス (GV) と核多角体病ウイルス (NPV) について組換え bacmid-DNA の構築を行った。

2. 研究の目的

まず、(1) NPV を用いた組換えウイルス作製法の検討を行った。すなわち、培養細胞における相同組換えの手法が確立している *Autographa californica* MNPV (AcMNPV) を用いて虫体内にウイルス DNA とトランスファーベクターを注射接種し、相同組換えによる遺伝子組換えを行った。次に、(2) 包埋体形態異常変異 GV の全ゲノム配列の決定を行った。GV の包埋体の形態を決定する遺伝子はまだ解明されていない。従来の GV が長径約 0.2 μm で楕円体であるのに対し、この変異株は、包埋体の形態が一辺約 1 μm の正六面体である。そのため、この遺伝子の全塩基配列を決定することにより GV の包埋体の形態を決定する遺伝子の特定ができる。そこで、GV の包埋体形態に関する遺伝子を特定する手法を確立するために、(3) GV-bacmid の構築を行った。また、チャノコカクモンハマキ NPV (AdhoNPV) を用いて(4) NPV-bacmid の構築を行った。チャノコカクモンハマキ幼虫は、AdhoNPV と近縁種のリンゴコカクモンハマキ NPV (AdorNPV) にも感染するが、AdhoNPV と AdorNPV のチャノコカクモンハマキ幼虫に対する殺虫スピードは著しく異なっている。AdhoNPV と AdorNPV の遺伝子を比較することにより、NPV の殺虫スピードを決定する遺伝子を特定できる事が期待されるが、両ウイルスとも感染可能な培養細胞が存在しない。そのため、AdhoNPV の bacmid が構築できれば、致死スピード関連遺伝子が特定できる。

3. 研究の方法

(1) NPV を用いた組換えウイルス作製法の検討

① AcMNPV の包埋体からウイルス DNA を精製した。このゲノム DNA と x-gal マーカーを挿入したトランスファーベクターを核酸導入剤と混合してシロイチモジヨトウ 4 齢 0 日幼虫に注射接種した。リポフェクチン 1 μg 、トランスファーベクター 1 μg 、AcMNPV ゲノム DNA 1.5 μg を混合し、シロイチモジヨトウ幼虫 165 頭に注射接種した。また、ポジティブコントロールとして既に x-gal マーカーを挿入した AcMNPV を、ネガティブコントロールとしてトランスファーベクターのみを注射した。

② x-gal の酵素活性と lacZ 遺伝子を PCR で検出する手法を組み合わせることで遺伝子組換えの有無を検出した。

(2) 包埋体形態異常変異 GV の全ゲノム配列決定

宮崎県で分離された包埋体形態異常変異 GV について、次世代シーケンサーにより塩基配列

の決定を行った。

(3) 顆粒病ウイルス bacmid の構築

① リンゴコカクモンハマキ GV (AdorGV) 包埋体よりウイルス DNA を抽出した。既に報告されている AdorGV 塩基配列をもとに、ウイルスゲノムを一カ所だけ切断する制限酵素切断箇所を検索した。

② Bac-to-Bac (invitrogen) システム由来の bacmid カセット (大腸菌の複製起点と外来遺伝子を導入するための Mini-att Tn7 標的部、カナマイシン耐性遺伝子を含む配列) を PCR により増幅した。AdorGV のゲノム DNA を一カ所だけ切断する制限酵素で切断し、そこに上記の bacmid カセットを挿入した。

③ エレクトロポレーションにより形質転換を行い大腸菌 (HST08, TAKARA) に AdorGV-Bacmid の DNA を導入した。さらに、ここにヘルパープラスミドを形質転換し AdorGV-Bacmid 系を構築した。

(4) 核多角体病ウイルス bacmid の構築

① チャノコカクモンハマキ NPV (AdhoNPV) 包埋体よりウイルス DNA を抽出した。既に報告されている AdhoNPV 塩基配列をもとに、ウイルスゲノムを一カ所だけ切断する制限酵素切断箇所を検索した。次に、AdhoNPV の DNA を制限酵素で切断し、bacmid カセットの挿入を行った。次に、エレクトロポレーションにより形質転換を行い大腸菌 (HST08, TAKARA) に AdorNPV-bacmid の DNA を導入した。さらに、ここにヘルパープラスミドを形質転換し AdorNPV-bacmid 系を構築した。AdhoNPV の場合は、非コード領域を切断する酵素はなく、ウイルスゲノムを一カ所だけ切断するがコード領域を切断する酵素が見つかった。そこで、この酵素を用いて bacmid DNA の構築を行った。詳細は後述する。

③ AdorNPV-bacmid 系の構築が成功していることを確認するために、pFastBacI に EGFP 遺伝子を導入し、AdorNPV-Bacmid 系に対して EGFP 遺伝子が導入できるかどうか確認した。

4. 研究成果

(1) NPV を用いた組換えウイルス作製法の検討

リポフェクチン、トランスファーベクター、AcMNPV ゲノム DNA の混合液を注射接種したシロイチモジヨトウ幼虫の x-gal 酵素活性を図 1 (B) に示す。また、*in vitro* で培養細胞 (Sf-9) にトランスフェクションした結果を図 1 (A) に示す。*In vitro* 接種区 (B) では、ネガティブコントロールの DW 接種 (①) とトランスファーベクター接種 (②) に比べてポジティブコントロールである AcMNPV-lacZ 組換えウイルス接種 (③) が有意に高く、混合液接種サンプル (④) も有意に高い酵素活性を示した。*in vivo* 接種区 (A) でも、DW 接種 (①) とトランスファーベクター接種 (②) に比べてポジティブコントロールである AcMNPV-lacZ 組換えウイルス接種 (③) が有意に高かった。一方、混合液接種サンプル (④) の酵素活性は、全体としてはトランスファーベクター接種と AcMNPV-lacZ 組換えウイルス接種と有意差がなかった。

そこで、さらに混合液接種について PCR による lacZ 遺伝子挿入の確認を行った (図 2)。その結果、*in vitro* での酵素活性と PCR による組換えの有無は必ずしも一致しなかった。一方、*in vivo* では、PCR によるマーカー遺

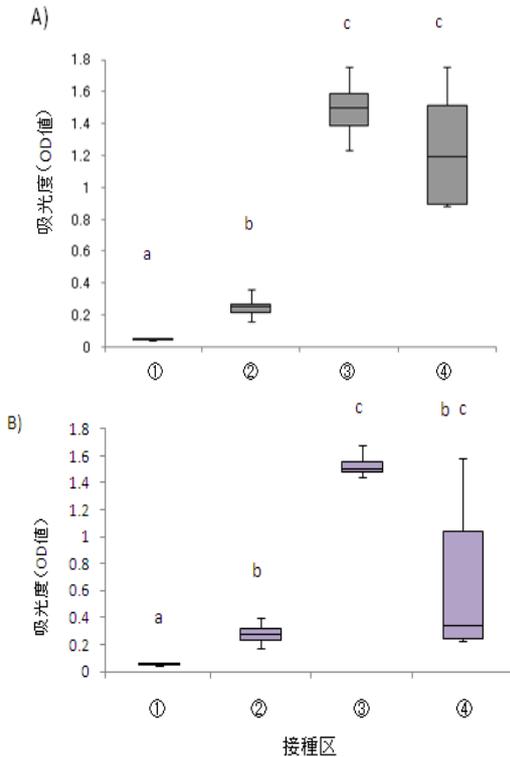


図1 β ガラクトシダーゼ法による lacZ 遺伝子発現の検出.

A) *in vitro* 組換え処理区でのβ-ガラクトシダーゼアッセイによる検出結果. B) *in vivo* 組換え処理区でのβ-ガラクトシダーゼアッセイによる検出結果.
 ① control: ネガティブコントロールとして DW 接種. n=12 ② ベクターのみ: トランスファーベクターのみ接種. n=24 ③ Positive control: ポジティブコントロールとして AcMNPV/lacZ-hsp70 ウイルス DNA 接種. n=24 ④ 組換え処理: 組換え処理区として野生型 AcMNPV ウイルス DNA およびトランスファーベクター接種. n=165 ※異なる文字は $p < 0.01$ で有意差があることを示す.

伝子の挿入が確認されないサンプルに比べて確認されたサンプルが、有意に酵素活性が高かった。細胞 (*in vitro*) での組換え効率が 25%であったのに対して、幼虫内 (*in vivo*) での組換え効率は、2%であった。このことから、lacZ マーカーを使用する場合には、x-gal 酵素活性を測定し、活性の高いサンプルについてのみ PCR 検出をすることにより、大量のサンプルからのスクリーニングを安価で容易に可能にすると考えられる。

(2) 包埋体形態異常変異顆粒病ウイルスの全ゲノム配列を決定

次世代シーケンサーを用いて包埋体形態異常変異顆粒病ウイルスの全ゲノム塩基配列を決定した。その結果、従来の形態の包埋体をもつリンゴコカクモンハマキ GV との一致度が 90%以下の遺伝子を 3 個特定した。

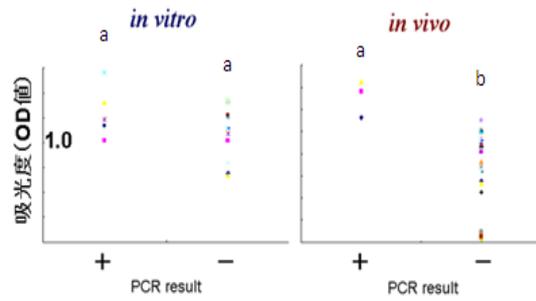


図 2 β ガラクトシダーゼアッセイで求められた発色強度と lacZ 遺伝子挿入断片の有無の関係.

PCR で確認した結果、PCR+は lacZ 遺伝子挿入断片あり、PCR-は lacZ 遺伝子挿入断片なしを示す。図中の点は個別のサンプルを示す。

※ 異なる文字は $p < 0.01$ で有意差があることを示す。

(3) 顆粒病ウイルス bacmid の構築

① AdorGV ゲノムの解析の結果、*BlnI* により非コード領域を一カ所だけ切断する事がわかった。そこで、*BlnI* により AdorNPV のゲノム DNA を消化し (図 3-1. AdhoGV のゲノムと Bacmid cassette の *BlnI* 消化の確認) この切断箇所に bacmid カセットを挿入した。挿入断片に含まれているカナマイシン (Km) の配列とウイルスゲノム DNA に含まれる *egt* 遺伝子を PCR により検出した。その結果、22 個のコロニーのうち 1 コロニーについて両方の遺伝子を確認した (図 3-2. Bacmid DNA の形質転換コロニーからのダイレクト PCR)。さらに、このコロニーより DNA を抽出し、制限酵素断片長解析を行った。すなわち、制限酵素 (*EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*) で消化し、挿入断片の確認を行った (図 3-3. Bacmid DNA と AdorGV ゲノム DNA の制限酵素切断片プロファイル)。その結果、bacmid 断片挿入サンプル (AdorGV Bacmid) にはウイルスゲノムのみ (AdorGV genome) と比較して付加的な断片が認められ、bacmid カセットの挿入に成功していることが確認できた。

②この DNA をヘルパープラスミドと共に大腸菌内に形質転換することにより、Bacmid 系を構築し、PCR による増幅とその断片のシーケンスにより断片の挿入が成功していることを確認した (図 4-1. 抽出したヘルパープラスミドの *BamHI* 消化による確認、4-2. AdorGV)。

(4) 核多角体病ウイルス bacmid の構築

① AdorNPV ゲノムの解析の結果、非コード領域を一カ所だけ切断する制限酵素はなく、*FseI* がコード領域である ORF31 を切断することがわかった。そこで、*FseI* で切断される ORF31 の上端をあらかじめ bacmid カセットに接続し、この断片を AdorNPV のゲノム DNA に挿入する手法「Gene Repair Bac-カセット法」を開発した。

②構築した AdhoNPV-bacmid DNA をヘルパープラスミドと共に大腸菌内に形質転換することにより、bacmid 系を構築し、制限酵素断

片長解析およびPCRによる増幅とその断片のシーケンスにより断片の挿入が成功していることを確認した(図5)。

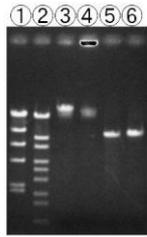


図3-1
①ONE STEP Marker1
②ONE STEP Marker6
③AdorGV-Bln I
④AdorGV genome
⑤Bacmid cassette-Bln I
⑥Bacmid cassette

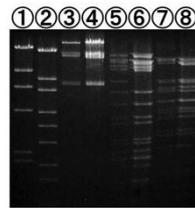


図3-3
①ONE STEP Marker1
②ONE STEP Marker6
③AdorGV Bacmid-BamH I
④AdorGV genome-BamH I
⑤AdorGV Bacmid-EcoR I
⑥AdorGV genome-EcoR I
⑦AdorGV Bacmid-Hind III
⑧AdorGV genome-Hind III

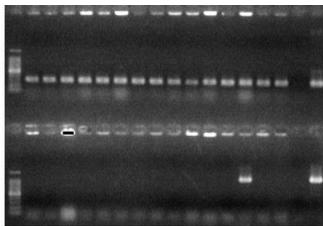


図3-2 CD-PCR
上段はKm耐性遺伝子検出
下段はegt遺伝子検出
左から100bp DNA ladder marker, colony1~22
ポジティブコントロール、ネガティブコントロール

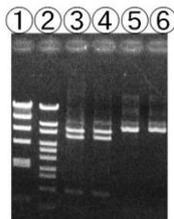


図4-1
①ONE STEP Marker1
②ONE STEP Marker6
③helper plasmid-BamH I
④helper plasmid-BamH I
⑤helper plasmid
⑥helper plasmid

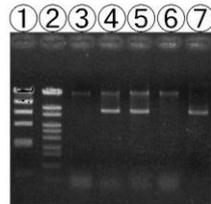


図4-2
①ONE STEP Marker1
②ONE STEP Marker6
③AdorGV Bacmid DNA
④AdorGV Bacmid DNA + helper plasmid
⑤AdorGV Bacmid DNA + helper plasmid
⑥AdorGV Bacmid DNA
⑦helper plasmid

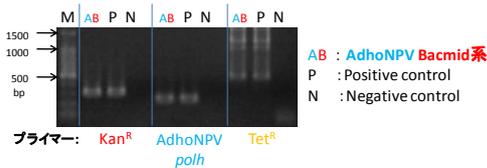


図5 PCRによるAdhoNPVバックミド系構築成否の確認。

③bacmid系を用いて外来遺伝子の挿入が可能であるかどうかの確認を、緑色蛍光タンパク質であるeGFP遺伝子を挿入することにより行った。

今後は、構築したバックミドDNAを宿主昆虫に接種し感染させる手法を確立する。また、構築したバックミドDNAを用いて、遺伝子欠損ウイルスを構築し、実際に宿主幼虫に接種し、野生株の表現型と比較することにより、AdhoGVの包埋体の変異に関する遺伝子やAdhoNPVの殺虫スピード関連遺伝子の特定を行う予定である。

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)

[学会発表](計7件)

1) 齋藤康将・阿部健人・国見裕久・平尾綾子・仲井まどか, チャノコカクモンハマキ核多角体病ウイルスのBacmid系の構築とそれを利用した組換えウイルスの作製, 第56回日本応用動物昆虫学会, 平成24年3月28日, 近畿大学, 奈良.

2) 齋藤康将・阿部健人・国見裕久・平尾綾子・仲井まどか, チャノコカクモンハマキ核多角体病ウイルスBacmidの作製, 第73回昆虫病理研究会, 平成23年12月3日, 東京大学, 東京.

3) 阿部健人・齋藤康将・国見裕久・平尾綾子・仲井まどか, Bacmidを用いた組換えリンゴコカクモンハマキ顆粒病ウイルスの作製, 第73回昆虫病理研究会, 平成23年12月3日, 東京大学, 東京.

4) Teduka, K., Hirao, A., Y. Kunimi, M. Nakai, Construction of recombinant baculoviruses without using cell cultures, 43rd annual meeting of Society for Invertebrate Pathology, 平成22年7月14日, Karadeniz Technical University, Turkey.

5) Hikiyama, S., Hirao, A., Kunimi, Y., M. Nakai, Genome sequence of a granulovirus occlusion body shape/size mutant, 43rd annual meeting of Society for Invertebrate Pathology, 平成22年7月13日, Karadeniz Technical University, Turkey.

6) 手塚 薫・国見裕久・平尾綾子・仲井まどか, 培養細胞を使わない組み換え核多角体病ウイルス作製法の検討, 第54回日本応用動物昆虫学会大会, 平成22年3月26日,

千葉大学.

7) 引原翔平・国見裕久・宇久田理恵・平尾綾子・仲井まどか, チャノコカクモンハマキ病死体から分離された顆粒病ウイルス包埋体形態異常変異株の全ゲノム解析, 第54回日本応用動物昆虫学会大会, 平成22年3月27日, 千葉大学.

[図書] (計1件)

Nakai, M. (2012) Viral control of tea pests in Japan and the effects of infection on domestic endoparasitoids. In: Opende Koul, G. S. Dhaliwal, Sucheta Khokhar and Ram Singh (eds.), Biopesticides in Sustainable Agriculture: Progress and Potential. Scientific Publishers (India), Jodhpur (In Press).

[その他]

ホームページ

<http://www.tuat.ac.jp/~insect/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仲井 まどか (NAKAI MADOKA)
東京農工大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号：60302907

(3) 連携研究者

姜 媛瓊 (KANG WONKYON)
理化学研究所・本分子昆虫学研究室・専任研究員

研究者番号：30291917