

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660260

研究課題名(和文)バキュロウイルスゲノム人工合成系の確立と新規遺伝子解析用ウイルスベクターの開発

研究課題名(英文)Assembly of baculovirus genome DNA fragments in yeast for improving baculovectors

研究代表者

伴戸 久徳 (Bando, Hisanori)

北海道大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：20189731

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)：本研究の第一の目的は、DNA断片からバキュロウイルスゲノムを人工合成する技術を確立することであり、これは多様な分野で利用されているバキュロウイルスの遺伝子構造を改変して、その有用性を高め、更なる高次利用を展開するためには不可欠な技術である。本研究ではまず、カイコバキュロウイルスゲノムDNA(BmNPV/bacmid)に酵母での複製起点(Yori)を導入し、大腸菌および酵母で複製可能であるBmNPVゲノムを作出した。次に、Yoriを含むBmNPVゲノム全域をカバーする21DNA断片を大腸菌にクローニングし、これらの断片を酵母細胞内に導入して、連結させることに成功した。

研究成果の概要(英文)：The technologies that enable flexible manipulation of virus genome are very important technical base for improving viral vectors. The aim of this study is to establish a method for assembling baculovirus genome DNA from both synthetic and natural DNA fragments to improve baculovectors. First, we constructed a baculovirus of the silkworm (BmNPV/bacmid) carrying an yeast replication origin (Yori). Second, we cloned 21 overlapping DNA fragments covering whole sequence of the BmNPV/bacmid genome DNA with Yori in bacterial cells using a plasmid vector. Lastly, we assembled the 21 fragments in yeast to form the complete BmNPV genome DNA.

研究分野：応用分子昆虫学

キーワード：昆虫機能利用 有用物質生産

1. 研究開始当初の背景

申請代表者は大腸菌内での相同組換えを利用し、これまでにウイルス遺伝子ノックアウトウイルスクローン(バクミド)作製技術、遺伝子ノックアウトウイルスライブラリーを構築し、BmNPV が持つ 141 遺伝子全てについてそれぞれの遺伝子ノックアウトがウイルス感染における影響を網羅的に解析中である。これらの解析は一定の成果を納め、ウイルスの個々の遺伝子破壊の影響を網羅的に解析し、感染性を保持できる非必須ウイルス遺伝子を同定している (Ono et al. 2012)。さらにこの単遺伝子ノックアウトウイルスの表現型に関する情報をもとに、ゲノム上で隣り合う非必須遺伝子については隣接領域を一度に除いた多重遺伝子ノックアウトバクミドを構築、解析中である。しかしながら、これまでの解析ではウイルスゲノムに散在する様々な領域で複数遺伝子を欠失可能であることがわかっており、今後、さらにウイルス機能ゲノミクスを推進するためには、ゲノムの様々な領域をスループットよく改変できる新たなゲノム改変方法の確立が必要である。このようなバキュロウイルスに関する網羅的な遺伝子機能解析やゲノミクスの研究領域においてさきがけとなる研究を展開するためには革新的なゲノム改変方法の開発が必要であると考えられた。近年、DNA 断片からのゲノムを人工合成する技術(Gibson et al. 2009)が報告された。酵母細胞内で、複数の小さな DNA 断片を連結させて巨大な DNA を合成するこの技術は、130kbp 以上あるバキュロウイルスのゲノムを人工合成する目的にも利用可能であろうと考えられた。さらに、本技術と申請者が持つ red 組換えシステムを組み合わせることで、バキュロウイルスゲノム改変を自在に行えるゲノム人工合成方法を確立することができ、バキュロウイルスベクターの改良をこれまでに無い速度で行うことが可能になると期待された。

2. 研究の目的

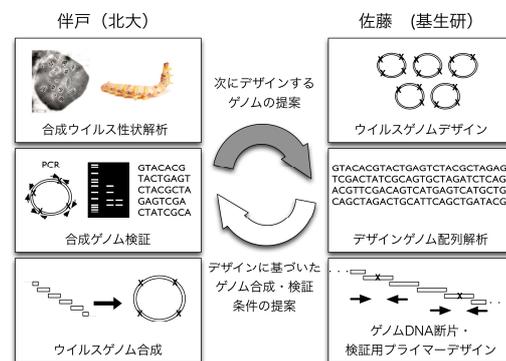
昆虫科学におけるウイルスベクターの利用は主に組換えタンパク質の高発現に限られており、他の利用目的での開発は極めて限られた例しかない。一方、ウイルスが有する昆虫個体全身への感染および遺伝子発現能力は異所的な遺伝子発現及び機能解析を飛躍的にスピードアップするための研究ツールとして極めて有望である。しかし、既知の昆虫ウイルスは宿主に対する病原性が強いなどの不適な形質により、この目的には適さない。

そこで、本研究では、まず、ウイルス遺伝子が多数除去され、病原性が低下したウイルスを作製し、カイコ個体での遺伝子機能解析を飛躍的に簡便化できる新規ウイルスベクター構築等を実現するための基盤技術の確

立を目指した。即ち、カイコに感染するバキュロウイルス (*Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*: BmNPV) を実験材料とし、BmNPV ゲノム DNA 断片を酵母細胞内で連結し、ウイルスゲノムを再構築する技術の確立を目指した。

3. 研究の方法

本研究では全長が約 140kb のウイルスゲノムクローンを対象に制限酵素部位の探索や相同配列を利用した DNA 断片配列のデザインを行うため、バキュロウイルスの取り扱いに習熟した研究者だけではなく、配列デザインの探索とゲノム人工合成効率化をバイオインフォマティクスによって可能とする研究者との連携が研究推進に必須である。そこで、以下の研究体制で研究を実施した。



また、BmNPV ゲノム DNA の酵母細胞内での人工合成系の確立を目指し、以下の方法で研究を進めた。

(1) BmNPV ゲノム DNA 人工合成 (再構築) 用のゲノム断片 DNA ライブラリーの作製。 BmNPV ゲノム断片 DNA ライブラリーデザイン

1 回の Gibson assembly に用いる DNA 断片の末端は反応液中の全 DNA 断片のうち、連結される断片同士のみが一致した配列を持つようにデザインされなくてはならない。

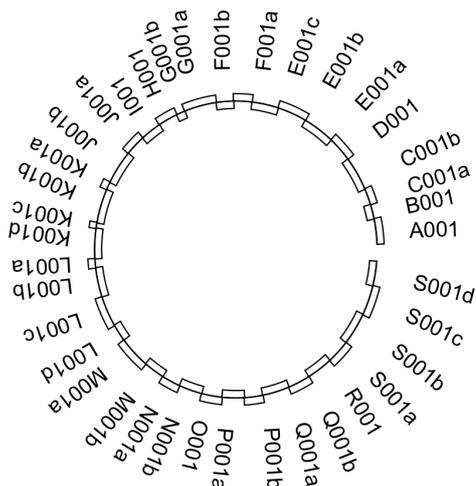
BmNPV ゲノム配列の中で

- 既知 ORF 以外の領域の配列
- 両末端 40 塩基がゲノム内に 1 つしか存在せず、且つ末端 40 塩基の Tm 値が 55-60 以内の配列
- 1 つの断片が 3-5kb 程度という基準を同時に満たす 40 塩基を探索したが、すべてを満たす断片でゲノム全体をカバーすることは出来なかったため、c のゲノム断片長を最長 5kb とし、
 - 上記 a を満たしつつ、両端の 40 塩基がゲノム内に 1 つしか存在しない断片内で唯一の配列
 - 断片長は問わないという条件でゲノム全域をカバーする断片をカスタム Perl スクリプトを作成して探索し、

A001: 1 断片、B001: 1 断片、C001: 2 断片、
D001: 1 断片、E001: 3 断片、F001: 2 断片、
G001: 2 断片、H001: 1 断片、I001: 1 断片、
J001: 2 断片、K001: 4 断片、L001: 4 断片、
M001: 2 断片、N001: 2 断片、O001: 1 断片、
P001: 2 断片、Q001: 2 断片、R001: 1 断片、
S001: 4 断片

(断片名: サブ断片数)

という断片をデザインすることができた。



BmNPV ゲノム断片 DNA ライブラリー作製

1-1 で設計したデザインに基づいて BmNPV ゲノム配列と 40 塩基の相同性を持ち、NotI 認識配列を有するプライマーを設計し、PrimeSTAR Max DNA ポリメラーゼを用いて増幅し、A-tailing の後、pCR8 ベクターにクローニングした。クローニングした BmNPV ゲノム断片をシークエンスし、塩基配列を確認した。

(2) 大腸菌でも酵母で複製可能な BmNPV ゲノム DNA の作製。

BmNPV ゲノムを酵母内で人工合成(再構築)するためには、酵母内で複製可能な BmNPV ゲノムを構築するためには、まず、酵母細胞内で複製可能な BmNPV ゲノムを作製する必要がある。また、酵母細胞内で人工合成された BmNPV ゲノムは、構造解析やトランスフェクションに用いるために一旦大腸菌内で増幅させる必要がある。そこで、まずは大腸菌でも酵母でも複製可能な BmNPV ゲノムの作製が可能かを調べる必要がある。そのために、既に作製済みである BmNPV バクミド DNA (Ono et al., 2007) の多角体構造遺伝子領域を GFP コード配列に置き換えた BmGFP (Ono et al., 2012) を基本骨格として利用した。一方、プラスミド pYES1L (Invitrogen) から酵母での複製起点 (ARS4/CENS) を含む配列領域を PCR で増幅し、red 相同組換えシステム (Ono et al., 2012) を用いて BmGFP に挿入した (BmGFP/Yori)。

BmGFP/Yori バクミド DNA を大腸菌で増幅した後、酵母細胞内に導入し酵母細胞内でも複製可能であることを調査した。BmGFP/Yori にはマーカー遺伝子としてアンピシリン耐性遺伝子 (ampR)、ストレプトマイシン耐性遺伝子 (strepR) トリプトファン要求性遺伝子 (trp1) を持たせてある。そこで、ストレプトマイシンを含む選択固形培地を用いて BmGFP/Yori 導入酵母を培養したところ、ストレプトマイシン耐性酵母コロニーを得ることに成功した。そこで、得られた酵母からエピゾーマル DNA を回収してアガロースゲル電気泳動で解析したところ、BmGFP/Yori と同じ大きさの環状 2 本鎖 DNA を得ることが出来た。また、BmGFP/Yori 特異的プライマーを用いた PCR を用いた構造解析からも得られた DNA が BmGFP/Yori であることが確認された。

次に、酵母から回収した BmGFP/Yori DNA を大腸菌にトランスフェクションし、アンピシリンを含む固形培地で培養したところ、アンピシリン耐性の大腸菌コロニーを得た。これらの大腸菌からエピゾーマル DNA を抽出し、アガロースゲル電気泳動等で解析したところ、回収されたものは BmGFP/Yori であることが確認された。

(3) 酵母から回収したバクミド DNA からの感染性ウイルスの回収

このように、BmGFP/Yori は大腸菌でも酵母でも複製可能であることが判明したことから、つぎに酵母複製起点を有する BmGFP/Yori がカイコ細胞 BmN で複製可能であり、また感染性ウイルスの産生が認められるかを調査した。

上記の、酵母で複製後、再び大腸菌にトランスフェクションして増幅した BmGFP/Yori DNA を精製し、BmN 細胞に導入後 25 度 C で培養を継続した。この細胞を経時的に蛍光顕微鏡下で観察したところ、導入後 2 日目には細胞に GFP 蛍光が認められ、その後、GFP 蛍光を発する細胞は増加し、細胞には CPE が認められた。更に、この培養液を用いて感染実験を行ったところ、培養細胞中には感染性ウイルスが産生されていることが確認された。

(4) 複数の DNA 断片の酵母細胞内連結による BmNPV ゲノム DNA 再構築

まず、BmGFP/Yori の酵母複製起点を含むウイルスゲノム断片を、(1) で作製した BmNPV ゲノム断片と連結出来るようにデザインし、プラスミドベクターを用いてサブクローニングした (YoriF)。次に、BmNPV ゲノム全体をカバーする約 40 個のゲノム断片 (YoriF を含む) を BmNPV ゲノム断片 DNA ライブラリーのクローンから NotI で切り出し、これらを酵母細胞に導入した。ゲノム断片を導入した酵母をストレプトマイシン含有固形培地で培養したところ、極めて少数のコロニーを得た。得られたコロニーからエピゾーマル DNA

を回収し、アガロースゲル電気泳動で解析したところ、BmGFP/Yori よりも低分子の DNA のみが確認された。この結果から、酵母細胞内で連結できる断片数に制約のある可能性が考えられたので、改めて 21 断片で BmNPV ゲノム全体をカバーするライブラリーを構築した。このライブラリーから調整した 20 断片 (YoriF を含む) を酵母に導入し、上記と同様に選択培地で培養したところ、多くの酵母コロニーを得た。これらの酵母からエピソード DNA を回収し、大腸菌に再び導入して増幅した後、アガロースゲル電気泳動で解析した結果、大きさは BmGFP/Yori と一致した。また、連結部位を検出するためにデザインしたプライマーセットを用いた PCR で解析したところ、導入断片が正確に連結されていることが確認された。

4. 研究成果

本研究において、カイコバキュロウイルス BmNPV に大腸菌の複製起点、および酵母での複製起点を導入し、大腸菌および酵母で複製可能であり、BmN 細胞においてウイルスとして増殖可能な BmGFP/Yori を構築することに成功した。また、BmNPV ゲノム全体をカバーする 21 個の DNA 断片 (YoriF を含む) を酵母細胞で正確に連結できることを確認し、バキュロウイルスゲノム改変に酵母での人工合成系が利用可能であることを明らかにした。

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)

[学会発表](計 1 件)

石橋大輝・佐藤昌直・高ひとみ・竹内潤一・浅野眞一郎・伴戸久徳「バキュロウイルスゲノム人工合成系の確立に向けて」第 11 回昆虫病理研究会シンポジウム 2014 年 9 月 18 日～9 月 20 日 人材開発センター富士研究所(富士吉田市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伴戸 久徳 (BANDO, Hisanori)

北海道大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：20189731

(2) 研究分担者

佐藤 昌直 (SATO, Masanao)

基礎生物学研究所・発生生物学領域・助教

研究者番号：20517693