

学 位 論 文 題 名

哺乳動物細胞におけるバキュロウイルスの遺伝子発現

－転写制御における問題点－

学位論文内容の要旨

バキュロウイルス科に属する核多角体病ウイルス (*Nucleopolyhedrovirus* : NPV) は節足動物（主に昆虫）を宿主とするウイルスである。NPV は微生物農薬や昆虫細胞における効率の良い外来遺伝子発現ベクターとして利用されており、我々の身近のものとなっている。さらに、本ウイルスは哺乳動物由来の培養細胞にも侵入可能であるが増殖はしないため、ヒトなど哺乳動物細胞を対象とした遺伝子導入ベクターとしての開発も活発に進められている。ところで、自然界には節足動物と脊椎動物の両方で増殖できるウイルスが存在し、それらはすべて RNA ウイルスである。それでは何故、DNA ウイルスは節足動物と哺乳動物の両方で増殖することができないのであろうか。DNA ウイルスと RNA ウイルスの増殖機構を比較すると、DNA ウイルスの増殖には RNA ウイルスの増殖には含まれない DNA から RNA への転写段階と DNA の複製段階が含まれている。このことから、昆虫細胞と哺乳動物細胞において、これらの段階に関わる細胞因子や機構に違いのある可能性が示唆される。また、ウイルス DNA の複製は一般にウイルス遺伝子産物により制御されていることを考えると、まず転写が適切に進行する必要があるといえる。これまでのところ哺乳動物細胞の核まで侵入し、組換え遺伝子の発現まで行うことのできる NPV が哺乳動物細胞で増殖できない分子機構の詳細は明らかにされていない。しかし、本ウイルスの利用を適切に進める上で、この分子機構について明らかにすることは極めて重要である。そこで本実験では、哺乳動物細胞における NPV の遺伝子発現および必須制御遺伝子 *immediate-early 1* (*ie1*) の機能発現について調査すると共に、昆虫細胞と哺乳動物細胞におけるプロモーター配列の特異性について比較解析を行った。

NPV は感染後、まず宿主の RNA ポリメラーゼ II 転写系を利用して *immediate-early* および *delayed-early* 遺伝子群を発現する。*early* 遺伝子産物の多くは転写制御因子として機能することが知られており、これら *early* 遺伝子産物により発現誘導されたウイルス RNA ポリメラーゼを用いて *late* および *very-late* 遺伝子群が転写される。一過性発現実験において、NPV *early* 遺伝子プロモーターの哺乳動物細胞 (BHK) における活性を調べたところ、弱いながら活性を保持していることが明らかとなった。DNA マイクロアレイ解析においても、哺乳動物細胞 (BHK) に侵入した AcNPV は少なくとも一部の *early* 遺伝子や *late* 遺伝子を発現していることが判明し、一過性発現系での実験結果を裏付ける結果であった。さらに、nested RT-PCR によって DNA マイクロアレイでは発現が確認できなかった必須制御遺伝子 *ie1* の発現も確認された。*ie1* 産物

(IE1) はウイルスの増殖において鍵を握る必須制御タンパク質であることから、哺乳動物細胞においても昆虫細胞と同様に IE1 が機能するかどうかを調査した。昆虫細胞においては、IE1 はウイルスゲノム上の標的配列である homologous regions (*hrs*) に結合してプロモーターを活性化する (*hrs* 依存型転写活性化) 機構と、*hrs* 非依存型 (DNA 非結合型) の転写活性化機構を有していることが知られている。最近、哺乳動物細胞 (BHK) においても IE1 による *hrs* 依存型転写活性化が起こることが報告された。しかし、本研究において、昆虫細胞で認められる IE1 の *hrs* 依存型転写活性化が、必ずしも BHK 細胞において確認できるとは限らないことが判明した。一方、*hrs* の存在しない様々なプロモーターを用いて IE1 による活性化を調査したところ、昆虫細胞ではすべてのプロモーターが活性化されたが、哺乳動物細胞では *BmNPV ie1* (Bie1) プロモーターにおいてのみ IE1 による活性化が観察された。Bie1 プロモーターにおけるこの活性化に必要な領域を検索したところ、TATA-box および CAGT モチーフを含むコアプロモーター領域のみが必要であることが判明した。そこで、他のプロモーターのコア領域についても同様に調査したところ、哺乳動物細胞 (BHK、Vero) においても IE1 による活性化が観察され、これらのプロモーターでは哺乳動物細胞においてはコアプロモーターの上流配列が IE1 による活性化を阻害していると考えられた。

このように昆虫細胞と哺乳動物細胞では、IE1 に対するプロモーターの応答性に違いがあること、またコアプロモーターについては多くの場合、両者において同様に IE1 応答性が認められることが判明した。このことは、コアプロモーターによる基本転写に関わる因子が両者において良く保存されていることを示唆している。昆虫細胞と哺乳動物細胞におけるコアプロモーターの機能についてさらに詳しく調査する目的で、コアプロモーター活性に影響する DNA 配列 (コアプロモーター配列) について解析を行った。その結果、昆虫細胞 (BmN、Schneider2、Sf9) では TATA-box を有する昆虫関連遺伝子由来のコアプロモーターの活性が他のコアプロモーターに比べて顕著に高かったが、哺乳動物細胞 (BHK、Vero、HeLa、L) では、コアプロモーターの活性に顕著な違いは認められなかった。これらのことから、昆虫細胞と哺乳動物細胞ではコアプロモーター配列の認識に何らかの違いがあることが推測された。また、TATA-box を持つコアプロモーターにおいて、AT 含有量およびピリミジン含有量の増減や、イニシエーターのコンセンサス配列 (CCA(+1)GTCC) の有無が活性に与える影響を調べたが、明らかな影響は認められなかった。一方、TATA-box からイニシエーターまでの塩基数を変化させたところ、昆虫細胞 (BmN、Schneider2) では塩基数が 22~24 の場合に活性が高くなることが判明した。しかし、哺乳動物細胞 (BHK、Vero) では、このような傾向は認められなかった。これらのことから、昆虫細胞ではコアプロモーター活性の決定において、TATA-box からイニシエーターまでの距離の制約が、哺乳動物細胞に比べて厳しいことが示唆された。

以上のように、哺乳動物細胞に侵入した NPV は必須制御遺伝子 *ie1* を含むいくつかの遺伝子を発現しており、必須制御タンパク質 IE1 は哺乳動物細胞においても潜在的に転写活性化能を保持していることが明らかになった。しかし、昆虫細胞と哺乳動物細胞とではプロモーター配列における構造的制約の違いが存在し、これが哺乳動物細胞における NPV 遺伝子発現制御に大きな影響を及ぼすことが推定された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 伴 戸 久 徳

副 査 教 授 上 田 一 郎

副 査 教 授 三 上 哲 夫

学 位 論 文 題 名

哺乳動物細胞におけるバキュロウイルスの遺伝子発現

－転写制御における問題点－

バキュロウイルス科に属する核多角体病ウイルス (*Nucleopolyhedrovirus*: NPV) は微生物農薬や哺乳動物細胞への遺伝子導入ベクターとしての利用が進められており、我々の身近なものとなっている。NPVは昆虫のみならず哺乳動物細胞に侵入し組換え遺伝子の発現が可能であるが、増殖はしない。NPVの利用を適切に進める上で、本ウイルスが哺乳動物細胞で増殖できない分子機構について明らかにすることは極めて重要である。そこで、本実験では昆虫細胞と哺乳動物細胞におけるプロモーター配列の特異性について比較解析すると共に、哺乳動物細胞における NPV の遺伝子発現およびウイルス必須制御遺伝子の機能発現について調査した。

まず、一過性発現実験において、NPV early 遺伝子プロモーターは哺乳動物細胞においても弱いながら活性を保持していることが明らかとなった。さらに、哺乳動物細胞に侵入した AcNPV は少なくとも必須制御遺伝子 *ie1* を含む複数の遺伝子を発現していることが DNA マイクロアレイ解析および nested RT-PCR 解析において明らかとなった。*ie1* 産物 (IE1) はウイルスの増殖において鍵を握る必須制御タンパク質である。そこでまず、哺乳動物細胞においても昆虫細胞と同様に IE1 が機能するかどうかを調査した。昆虫細胞においては、IE1 はウイルスゲノム上の標的配列である homologous regions (*hrs*) に結合してプロモーターを活性化する (*hrs* 依存型転写活性化) 機構と、*hrs* 非依存型 (DNA 非結合型) の転写活性化機構を有していることが知られている。最近、哺乳動物細胞 (BHK) においても IE1 による *hrs* 依存型転写活性化が起こることが報告されたが、本研究の結果から、哺乳動物細胞においては必ずしも *hrs* の存在が IE1 による転写活性化に結びつかないことが示された。また、*hrs* の存在しない様々なプロモーターを用いて IE1 による活性化を調査したところ、哺乳動物細胞においても各種コアプロモーターについては IE1 による活性化が観察されるものの、多くの場合、哺乳動物細胞においてはコアプロモーターの上流配列が IE1 による活性化を阻害していることが明らかとなった。

昆虫細胞と哺乳動物細胞におけるコアプロモーターの機能についてさらに詳しく調査す

る目的で、コアプロモーター活性に影響する DNA 配列（コアプロモーター配列）について解析を行った。その結果、昆虫細胞では TATA-box を有する昆虫関連遺伝子由来のコアプロモーターの活性が他のコアプロモーターに比べて顕著に高かったが、哺乳動物細胞では、コアプロモーターの活性に顕著な違いは認められなかった。これらのことから、昆虫細胞と哺乳動物細胞ではコアプロモーター配列の認識に何らかの違いがあることが推測された。また、TATA-box を持つコアプロモーターにおいて、AT 含有量およびピリミジン含有量の増減や、イニシエーターのコンセンサス配列（CCA(+1)GTCC）の有無が活性に与える影響を調べたが、明らかな影響は認められなかった。一方、TATA-box からイニシエーターまでの塩基数を変化させたところ、昆虫細胞では塩基数が 22~24 の場合に活性が高くなることが判明した。しかし、哺乳動物細胞では、このような傾向は認められなかった。これらのことから、昆虫細胞ではコアプロモーター活性の決定において、TATA-box からイニシエーターまでの距離の制約が、哺乳動物細胞に比べて厳格であることが示唆された。

以上、本研究により哺乳動物細胞に侵入した NPV は必須制御遺伝子 *ie1* を含むいくつかの遺伝子を発現しており、必須制御タンパク質 IE1 は哺乳動物細胞においても潜在的に転写活性化能を保持していることが明らかになった。しかし、昆虫細胞と哺乳動物細胞とではプロモーター配列における構造的制約の違いが存在し、これが哺乳動物細胞における NPV 遺伝子発現制御に大きな影響を及ぼすことが推定された。本研究は NPV の哺乳動物細胞における遺伝子発現を解析した最初の例であり、これらの成果は本ウイルスの安全性を分子レベルで理解する上で極めて重要な知見を与えるものである。

よって審査員一同は、松山高央が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。