

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 遺伝子発現抑制

学位論文内容の要旨

バキュロウイルス科に属する *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) は昆虫病原ウイルスであり、害虫を標的とした微生物農薬、さらには哺乳動物細胞を標的とした遺伝子治療ベクターとしての利用・開発が進められている。このような AcMNPV 利用拡大において、本ウイルスの環境とりわけ哺乳動物細胞への影響を評価することは安全性の確立において極めて重要である。本研究では AcMNPV の転写活性を指標に哺乳動物細胞内における本ウイルスの挙動を解析し、宿主昆虫細胞内における挙動と比較することでその活性および細胞への影響を調査した。

ウイルスの宿主域の決定は細胞への侵入の可否、細胞内のウイルス増殖に必要な環境の存否、子孫ウイルスの次の宿主への伝搬の可否により決定されている。多くのウイルスにとっては初めの細胞への侵入段階が宿主選択において大きな障壁となっているが、AcMNPV は増殖可能な昆虫細胞以外の細胞に対しても侵入する事が出来る。即ち、AcMNPV の宿主域決定には細胞侵入後の段階、恐らく転写過程が重要であると考えられる。そこで、本研究ではまず AcMNPV の哺乳動物細胞内における転写能を DNA マイクロアレイ解析および 5'RACE 法により調査した。

DNA マイクロアレイ解析の結果、AcMNPV は哺乳動物細胞内においてもいくつかのウイルス遺伝子を発現することが明らかとなった。しかし、いずれの遺伝子においてもその発現量は著しく低く、また一部の遺伝子についてはタンパク質翻訳領域(ORF)から転写されるなど、プロモーターの認識において異常が認められた。

次に、どのような機構により哺乳動物細胞内における AcMNPV 遺伝子発現が抑制されているかを調査した。哺乳動物細胞における組換え AcMNPV からの外来遺伝子発現は、histone deacetylase (HDAC) 阻害剤により向上するという報告がある。HDAC 阻害剤はヌクレオソーム構造を変化させることにより遺伝子発現量を調整すること、および外来遺伝子とウイルス遺伝子は同一ヌクレオソーム上に存在することから、HDAC 阻害剤による遺伝子発現促進は AcMNPV 遺伝子にも及んでいることが推測された。そこで、HDAC 阻害剤のウイルス遺伝子発現に与える影響を DNA マイクロアレイ法および定量 PCR 法により調査した。その結果、AcMNPV の哺乳動物細胞における遺伝子発現はヒストン脱アセチル化を介する系により抑制されていることが示唆された。

一般的にはヒストン脱アセチル化による転写抑制にはヒストン H3K9 のジメチル化と heterochromatin protein (HP1) の結合が見られると言われている。そこで、Chromatin immunoprecipitation (ChIP) 解析により、AcMNPV 遺伝子プロモーター上でのヒストン修飾および HP1 結合量を解析した。ChIP 解析の結果、AcMNPV の哺乳動物細胞における遺伝子発現抑制にはヒストン H3K9 のジメチル化および HP1 結合は関与しないことが示唆された。

また、転写のエピジェネティックな抑制を誘導する分子として知られる DNA メチル化についても bisulfite sequence 解析を行ったが、ウイルス粒子中のゲノム DNA 内には高度なメチ

ル化は認められず、AcMNPV の哺乳動物細胞における遺伝子発現抑制に DNA メチル化は重要ではないと推測された。

ヒストン脱アセチル化を介するウイルス遺伝子発現抑制は、哺乳動物細胞を宿主とする DNA ウイルスの増殖過程においても広く観察され、ウイルスがコードする抗ヒストン脱アセチル化能を破壊するとウイルス増殖能が失われることから、哺乳動物細胞におけるヒストン脱アセチル化を介するエピジェネティック遺伝子発現抑制系は DNA ウイルスに対する防御システムとして機能していることが推測される。

AcMNPV の哺乳動物細胞内におけるウイルス増殖能という観点から以上の結果をまとめる。本ウイルスは哺乳動物細胞において、ヒストン脱アセチル化を介する遺伝子発現抑制機構のためにウイルス遺伝子を十分に発現することができず、また少なくとも一部の遺伝子においてはプロモーター誤認識により完全な ORF を含む mRNA を合成できないため、増殖に必要な遺伝子発現を完遂できないことが、哺乳動物細胞内で本ウイルスが増殖出来ない理由の一つであると結論付けられる。また、本ウイルスの微生物農薬としての利用、および遺伝子治療ベクターとしての利用における安全性を考えた場合、通常は哺乳動物細胞に対して大きな影響は無いと考えられるが、本ウイルスゲノムにコードされる遺伝子の哺乳動物細胞における機能はほとんど未知であるため、HDAC 阻害剤などウイルス遺伝子発現が促進される状況においてはその影響について十分に留意する必要がある。

今後、AcMNPV の適切な利用推進のためには、本ウイルスの遺伝子発現におけるエピジェネティック制御の全容を解明し、その人為制御技術を確立する事が望まれる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 伴 戸 久 徳

副 査 教 授 増 田 税

副 査 教 授 内 藤 哲（北海道大学大学院生命
科学院）

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 遺伝子発現抑制

本論文は、図 6、表 10、を含み、8 章からなる総頁数 52 の論文であり、別に参考論文 1 編が添えられている。

バキュロウイルス科に属する *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) は昆虫病原ウイルスであり、害虫を標的とした微生物農薬、さらには哺乳動物細胞を標的とした遺伝子治療ベクターとしての利用・開発が進められている。このような AcMNPV 利用拡大において、本ウイルスの環境とりわけ哺乳動物細胞への影響を評価することは安全性の確立において極めて重要である。本研究は、AcMNPV の転写活性を指標に哺乳動物細胞内における本ウイルスの挙動を解析し、宿主昆虫細胞内における挙動と比較することでその活性および細胞への影響を調査する目的で行ったものである。

ウイルスの宿主域の決定は細胞への侵入の可否、細胞内のウイルス増殖に必要な環境の存否、子孫ウイルスの次の宿主への伝搬の可否により決定されている。AcMNPV は増殖可能な昆虫細胞以外の細胞に対しても侵入する事が可能であることから、本研究ではまず AcMNPV の哺乳動物細胞内における転写能を DNA マイクロアレイ解析および 5'RACE 法により調査している。その結果、AcMNPV は哺乳動物細胞内においてもいくつかのウイルス遺伝子を発現することが明らかとなった。しかし、いずれの遺伝子においてもその発現量は著しく低く、また一部の遺伝子についてはタンパク質翻訳領域(ORF)から転写されるなど、プロモーターの認識において異常が認められた。

次に、どのような機構により哺乳動物細胞内における AcMNPV 遺伝子発現が抑制されているかを調査している。本研究では、HDAC 阻害剤はヌクレオソーム構造を変

化させることにより遺伝子発現量を調整すること、および外来遺伝子とウイルス遺伝子は同一ヌクレオソーム上に存在することから、HDAC 阻害剤による遺伝子発現促進は AcMNPV 遺伝子にも及んでいることが推測された。そこで、HDAC 阻害剤のウイルス遺伝子発現に与える影響を DNA マイクロアレイ法および定量 PCR 法により調査したところ、AcMNPV の哺乳動物細胞における遺伝子発現はヒストン脱アセチル化を介する系により抑制されていることが示唆された。

一般的にはヒストン脱アセチル化による転写抑制にはヒストン H3K9 のジメチル化と heterochromatin protein (HP1) の結合が見られると言われている。そこで、次に Chromatin immunoprecipitation (ChIP) 解析により、AcMNPV 遺伝子プロモーター上でのヒストン修飾および HP1 結合量を解析している。ChIP 解析の結果、AcMNPV の哺乳動物細胞における遺伝子発現抑制にはヒストン H3K9 のジメチル化および HP1 結合は関与しないことが示唆された。また、転写のエピジェネティックな抑制を誘導する分子として知られる DNA メチル化についても bisulfite sequence 解析を行ったところ、ウイルス粒子中のゲノム DNA 内には高度なメチル化は認められず、AcMNPV の哺乳動物細胞における遺伝子発現抑制に DNA メチル化は重要ではないと推測された。これらのことから、ヒストン脱アセチル化を介するウイルス遺伝子発現抑制は、哺乳動物細胞を宿主とする DNA ウイルスの増殖過程においても広く観察され、ウイルスがコードする抗ヒストン脱アセチル化能を破壊するとウイルス増殖能が失われることから、哺乳動物細胞におけるヒストン脱アセチル化を介するエピジェネティック遺伝子発現抑制系は DNA ウイルスに対する防御システムとして機能していることが推測された。

以上、本ウイルスは哺乳動物細胞において、ヒストン脱アセチル化を介する遺伝子発現抑制機構のためにウイルス遺伝子を十分に発現することができず、また少なくとも一部の遺伝子においてはプロモーター誤認識により完全な ORF を含む mRNA を合成できないため、増殖に必要な遺伝子発現を完遂できないことが、哺乳動物細胞内で本ウイルスが増殖出来ない理由の一つであると結論付けられている。また、本研究は、本ウイルスの微生物農薬としての利用、および遺伝子治療ベクターとしての利用における安全性を考えた場合、通常は哺乳動物細胞に対して大きな影響は無いと考えられるが、本ウイルスゲノムにコードされる遺伝子の哺乳動物細胞における機能はほとんど未知であるため、HDAC 阻害剤などウイルス遺伝子発現が促進される状況においてはその影響について十分に留意する必要があることを示すものであり、学術上、応用上高く評価できる。よって、審査員一同は、藤田龍介が博士（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。