

学位論文題名

ノックアウトウイルスを用いた
バキュロウイルスの遺伝子機能解析

学位論文内容の要旨

バキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (*Nucleopolyhedrovirus*; NPV) は、感染後期において多角体タンパク質 (Polh) を大量に産生し、この Polh を主成分とするウイルス包埋体 (多角体) を宿主細胞核内に多数形成する。現在、この Polh 高発現能を利用したバキュロウイルスベクターは効率の良い外来遺伝子発現系として広く利用されている。今後、バキュロウイルスにおける外来遺伝子高発現系の更なる改良と高次利用を進めるには、Polh の大量発現に関わる遺伝子とそれらの制御関係を理解することが不可欠である。そこで、ウイルス増殖過程におけるウイルス遺伝子発現制御ネットワークの解明を目指して以下の研究を行った。

(1) *Autographa californica* multiple NPV (AcMNPV) における immediate-early 遺伝子機能解析

NPV は環状二本鎖 DNA をゲノムとし、100 個を超える多数の遺伝子を保有している (Blissard and Rohrmann, 1993)。これらの遺伝子は発現時期により immediate-early (ie)、delayed-early、late、very-late に大別され (Friesen and Miller, 1986)、very-late 遺伝子に分類される Polh 遺伝子 (*polh*) の大量発現には、ウイルス増殖過程で発現される多数の遺伝子に関わっていると考えられている。特にウイルス感染直後に発現し、遺伝子発現ネットワークの最上流に位置する ie 遺伝子は転写制御因子をコードしており、ie 以降に発現する遺伝子のみならず ie 遺伝子自身の発現制御にも複雑に関わっていると考えられている。しかし、感染前初期における ie 遺伝子間の相互関係に関しても不明な点が多いのが現状である。そこで第一章では、ウイルス遺伝子の機能解析が最も進んでいる *Autographa californica* multiple NPV (AcMNPV) を用いて、ie 遺伝子 (*ie0*、*ie1*、*ie2*、*me53*、*pe38*) のウイルス増殖過程における役割と感染初期における相互関係について、各遺伝子のノックアウトウイルスを作製して解析を行った。

ie2 あるいは *pe38* を欠失させた場合に野生型とほぼ同様の増殖性を示したが、*ie1* を欠失させた場合、ウイルス DNA の複製も多角体形成も認められなかった。また、*me53* あるいは *ie0* を欠失させた場合には培養細胞系において 2 次感染の確認が困難なほど感染性ウイルス粒子の産生が強く抑制された。一方、これらのノックアウトウイルスについて感染初期における各遺伝子の発現を定量的 real-time PCR に

り調査した結果、少なくとも感染初期においては *ie1* と *me53* の発現は独立しており他の *ie* 遺伝子に影響されないこと、また、*ie* 遺伝子間には多様な転写制御の相互関係が存在していることが示唆された。

以上の結果から、これまでの一般的な考えとは異なり、*ie1* および *me53* の2種類の *ie* 遺伝子がバキュロウイルス遺伝子発現制御カスケードの最上流に位置することが推定された。また、*ie1* は既に報告されているように (Kool *et al.*, 1994; Lu and Miller, 1995) ウイルス DNA 複製段階において必須だが、*me53* はその後の過程に影響し、感染性ウイルス粒子の生産に重要な役割を果たしていると考えられる。

(2) *Bombyx mori* NPV (BmNPV)におけるウイルス遺伝子発現制御機構解析の基盤構築

上記の AcMNPV の *ie* 遺伝子の解析において、これまで不明であった *ie* 遺伝子間の制御関係について明らかにした。しかし、今後、ウイルス遺伝子の発現制御における相互関係の総体を理解するためには、個々の遺伝子を順番に解析するのではなくウイルス遺伝子の網羅的解析手段の導入が必要と考えた。また、制御機構をより深く理解し、得られた知見を応用展開するうえでウイルス遺伝子発現に関わる宿主因子の情報は重要である。最近、中国と日本の研究チームの国際的共同研究によりカイコ (*Bombyx mori*) の全ゲノム配列が解明され (International Silkworm Genome Consortium, 2008)、鱗翅目のモデル昆虫としてゲノムアノテーション計画が今まさに進行中であることから、カイコを宿主とする BmNPV において宿主ゲノム情報の利用が可能となってきた。一方、BmNPV においては効率の良いノックアウトウイルス作製・遺伝子改変システムが確立していない。そこで、遺伝子の網羅的解析を BmNPV において進めるための基盤構築を行った。

まず既に AcMNPV で導入されているバクミドシステムを、ゲノム配列が明らかになっている BmNPV T3 株 (Gomi *et al.*, 1999) を用いて構築し (Ono *et al.*, 2007)、従来の方法ではできなかった必須遺伝子のノックアウトを可能にした。次に λ red recombination システム (Datsenko and Wanner, 2000) を導入し、相同組換え酵素を強制発現させることで効率的に遺伝子を組換える系を確立した。

これらを組み合わせて、BmNPV の 135 遺伝子 (Gomi *et al.*, 1999) に加えて最近転写産物の存在が明らかになった 6 遺伝子 (Katsuma *et al.*, 2010) に関して、一連の BmNPV ノックアウトバクミド (KOVs) を作製して各 KOV DNA を BmN 細胞に導入し、それらの増殖特性を評価した。そして各遺伝子の欠失によるウイルス増殖や *polh* 発現量への影響を視覚化するために、*polh* プロモーターの制御下で GFP を発現させ、その蛍光量により評価した。さらに、それらのウイルス DNA 複製能や感染性ウイルス粒子産生能の有無に関しても調査を行った。

すると 10 個の KOV を導入した BmN 細胞中では GFP 発現が認められず、子孫ウイルスも産生されなかった。それらはウイルス DNA 複製因子やウイルス由来の RNA ポリメラーゼをコードする遺伝子を欠失させた変異体であるため、*polh* 発現にはウイルス DNA 複製と後期遺伝子発現というイベントが必須であることが示唆された。また残りの 131 個では GFP の発現が観察されたが、そのうち 36 個では子孫ウイルス産生が認められず、感染が拡大しなかった。それらの多くはウイルス粒子の構成因子をコードしているものが多く、感染性ウイルス粒子の形成に重要であるというこれまでの報告と矛盾しない。また、GFP が

発現し感染が拡大したものの中には、野生型と比べて GFP の発現量が減少しているものも観察されたため、それらが *polh* 発現に直接関与しているという可能性が示唆された。

以上、NPV の増殖過程に関わる遺伝子機能解析を網羅的に推進するための基盤構築が完了した。

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 准教授 浅 野 眞一郎

学 位 論 文 題 名

ノックアウトウイルスを用いた バキュロウイルスの遺伝子機能解析

本論文は106頁からなる和文論文であり、図17と表24を含む。別に参考論文1編が添えられている。

バキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (*Nucleopolyhedrovirus*; NPV) は、感染後期において多角体タンパク質 (Polh) を大量に産生することから、この Polh 高発現能を利用したバキュロウイルスベクターは効率の良い外来遺伝子発現系として広く利用されている。しかし、Polh の大量発現に関わる遺伝子とそれらの制御関係は不明な点が多い。本研究は、Polh の大量発現を可能にしているウイルス遺伝子発現制御ネットワークの解明を目指して研究を行ったものである。得られた結果は以下のように要約される。

(1) *Autographa californica* multiple NPV (AcMNPV) における immediate-early 遺伝子機能解析

ウイルス遺伝子の機能解析が最も進んでいる *Autographa californica* multiple NPV (AcMNPV) を用いて、感染後最初に発現する ie 遺伝子 (*ie0*、*ie1*、*ie2*、*me53*、*pe38*) のウイルス増殖過程における役割と感染初期における相互関係について、各遺伝子のノックアウトウイルスを作製して解析を行った。

その結果、*ie2*あるいは*pe38*を欠失させた場合に野生型とほぼ同様の増殖性を示すが、*ie1*を欠失させた場合、ウイルス DNA の複製も多角体形成も認められないこと、また、*me53*あるいは*ie0*を欠失させた場合には培養細胞系において2次感染の確認が困難なほど感染性ウイルス粒子の産生が強く抑制されることを示した。一方、これらのノックアウトウイルスについて感染初期における各遺伝子の発現を定量的 real-time PCR により調査した結果、少なくとも感

染初期においては *ie1* と *me53* の発現は独立しており他の *ie* 遺伝子に影響されないこと、また、*ie* 遺伝子間には多様な転写制御の相互関係が存在していることを明らかにした。さらに、*ie1* および *me53* の 2 種類の *ie* 遺伝子がバキュロウイルス遺伝子発現制御カスケードの最上流に位置すること、*me53* は感染性ウイルス粒子の生産に重要な役割を果たしていることを示した。

(2) *Bombyx mori* NPV (BmNPV) におけるウイルス遺伝子発現制御機構解析の基盤構築

これまでの結果を踏まえて申請者は、*Polh* の大量発現に関わる遺伝子間相互作用を理解するにはバキュロウイルスのなかで唯一、宿主のゲノム情報が利用可能な BmNPV において網羅的解析を展開するための実験系の確立が必要であると考えた。そこで、AcMNPV で導入されているバクミドシステムを BmNPV T3 株を用いて構築し、従来ではできなかった大腸菌の中でのウイルス遺伝子組換えと必須遺伝子のノックアウトを可能にした。さらに λ red recombination システムを導入し、相同組換え酵素を強制発現させることで効率的に遺伝子を組換える系を確立した。

この系を用いて、BmNPV の 141 遺伝子に対する一連の BmNPV ノックアウトバクミド (KOVs) を作製し、それら KOV の DNA 複製能、*polh* プロモーターの活性化、そして感染性ウイルス粒子産生能に関して調査を行った。まず、ウイルスの DNA 複製因子や RNA ポリメラーゼをコードすると報告されている 10 個の遺伝子について解析し、*polh* の効率的発現にはウイルス DNA 複製とウイルス RNA ポリメラーゼによる後期遺伝子発現という、2 つのイベントが重要であることを示した。またウイルス粒子の構成タンパク質遺伝子のいくつかは、ノックアウトすることで子孫ウイルス産生と感染拡大が認められなくなり、それらが感染性ウイルス粒子の形成に重要であることを示した。また、野生型と比べて同程度の感染拡大は認められるが *polh* プロモーターの活性化は低いものを見出し、それらが *polh* 発現に直接関与している可能性を示した。

本研究の成果は、産業的にも重要な NPV の遺伝子機能およびその制御機構の飛躍的理解にむけて貢献するところが大きく、学術及び応用の両面からその価値を高く評価することができる。

よって審査員一同は小野慎子が博士（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。