

バキュロウイルス発現系を支えるシス配列とトランス因子の同定 —昆虫培養細胞における非ウイルス性有用物質生産系の開発を目指して

勝間 進

東京大学大学院 農学生命科学研究科

研究の目的

バキュロウイルスはチョウ目昆虫に感染する大型の DNA ウイルスである。バキュロウイルスの最大の特徴は、感染の最後期に「多角体」と呼ばれる数百の子孫ウイルスを含むタンパク性の結晶体を大量に産生することである。多角体の主成分はウイルスが合成するポリヘドリン (POLH) であり、ウイルス感染細胞全タンパク質の 50% を占めることもある。このように単一のタンパク質が細胞全タンパク質の数十% を占めるシステムは、多細胞真核細胞ではこのバキュロウイルス-昆虫細胞系のみであり、このポリヘドリン遺伝子 (*polh*) の高発現を利用した「バキュロウイルスベクターシステム (BEVS)」が開発されることにつながった。現在では、Virus-like particle (VLP) ワクチンの製造から獣医薬、試薬生産まで幅広く利用されている。そのような背景にも関わらず、バキュロウイルスが最終的に大量の多角体を産生するメカニズムは、開発から約 40 年経った今でもその大部分が未解明である。本研究では、POLH の高発現を支えるシス配列とトランス因子を同定することによって、バキュロウイルス発現系のコアメカニズムを解明することを目的とし、それを模倣した産業利用可能なウイルスフリー外来遺伝子発現系の開発を目指す。

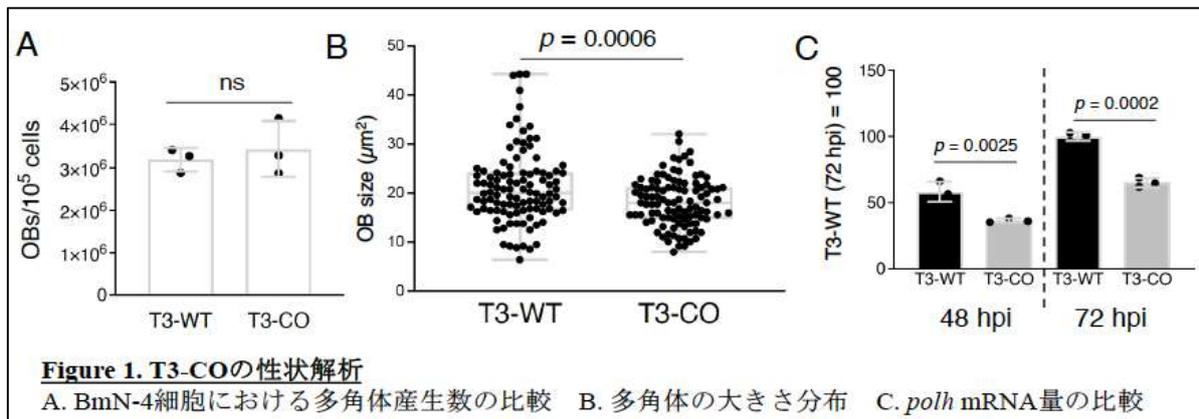
方法

バキュロウイルス感染細胞においては、感染最後期に *polh* が選択的に転写されることが知られている。BEVS の開発、改良に伴い *polh* プロモーターの同定、およびエンハンサーを含む転写調節領域の同定が行われてきた。その結果、バキュロウイルス RNA ポリメラーゼの後期プロモーターの共通配列である TAAG を含む TAAGTATT という 8 塩基が *polh* の転写に必須であること¹、それ以降のメチオニンコドンまでの 50 塩基ほどの配列 (burst 配列と呼ばれる) が重要であることが判明している。メチオニン以降のポリヘドリン配列 (20 アミノ酸程度) と融合して発現させると発現産物量が増加することも知られている。しかし、実際、*polh* が多くの後期遺伝子と同じウイルス RNA ポリメラーゼ認識配列を持つにもかかわらず、*polh* だけが著しく高い転写量を示す統一の見解は得られていない。また、これらの情報は主に 1990 年代までの研究のものであり、当時の分子生物学的手法の限界のため、正確なシス配列の同定は行われていない。本課題では、カイコに感染するカイコ核多角体病ウイルス (Bombyx mori nucleopolyhedrovirus, BmNPV) を用いて、*polh* の転写や翻訳、安定性に寄与する BmNPV ゲノム上のシス配列を正確に同定する。その際、

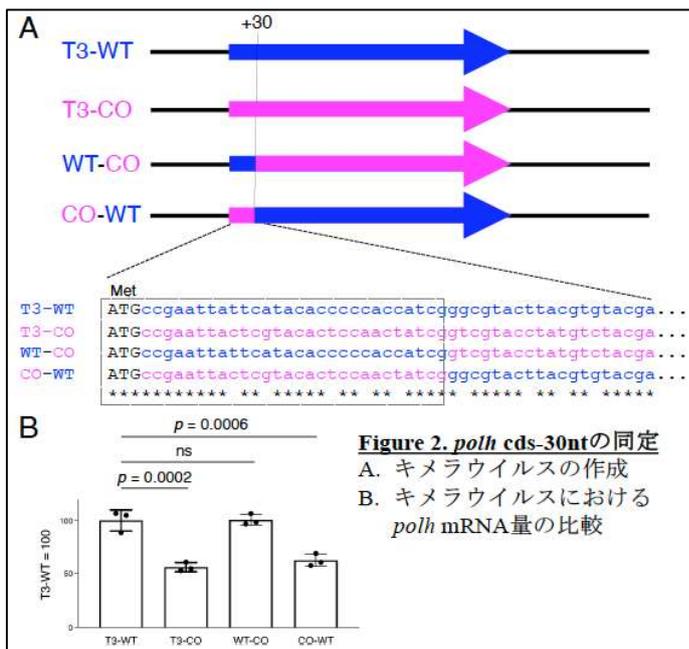
内在性の *polh* を用いて多角体の形成数等を指標にする方法とレポーターとしてルシフェラーゼを用いる方法を用いる。

結果

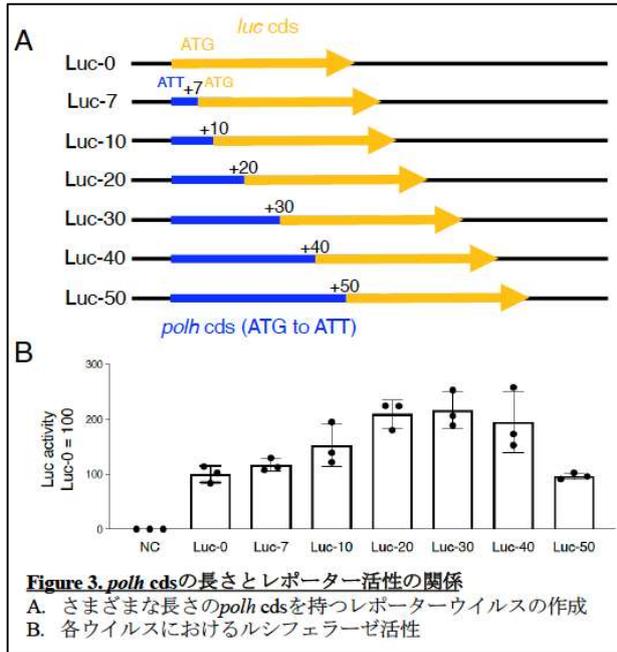
polh のコーディング配列内に潜むシス配列を同定するために、宿主であるカイコにコドン最適化した *polh* (*co-polh*) を人工合成し、それを野生型 *polh* (*wt-polh*) と入れ替えた BmNPV (T3-CO) を作成した。*co-polh* は塩基配列レベルで *wt-polh* と 81% 同一であり (アミノ酸は 100% 一致)、塩基置換は遺伝子全体にわたって存在していた。



wt-polh を発現するウイルス (T3-WT) と T3-CO の性状を比較したところ、多角体数は変化しないものの多角体が小さくなっていることがわかった (Fig. 1A, 1B)。SDS-PAGE、および定量 RT-PCR の結果、これは *polh* の翻訳ではなく mRNA レベルの低下によるものであることがわかった (Fig. 1C)。*wt-polh* と *co-polh* のキメラ遺伝子を導入した BmNPV を作成し (Fig. 2A)、*polh* mRNA 量を調査したところ、*polh* の前半 30 塩基 (cds-30nt) が *polh* mRNA 量に寄与することが判明した。つまり、*wt-polh* 由来の cds-30nt が存在すれば *polh* mRNA



mRNA が高レベルで維持されるということである (Fig. 2B)。ルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイを行ったところ、*polh* cds の付加により活性は上昇するが、cds-30nt の付加で最大となり、それより長くしても活性は低下することが判明した (Fig. 3A, 3B)。*wt-polh* と *co-polh* には cds-30nt 内に 5 塩基の置換が存在する。また、同じく BEVS で用いられる AcMNPV と比較するとこのうち 4 塩基が保存されていることがわかった²。



一方、コントロールウイルスを作成する過程で、*wt-polh* をもつにもかかわらず非常に小さな多角体を形成するウイルスを得た。そのウイルスは、burst 配列との開始メチオニンの間にベクター由来の配列が 19 塩基含まれていた。その配列を短くしていくと徐々に多角体の大きさが改善され、完全に取り除くと野生株と同程度の大きさの多角体を形成した。レポーターウイルスを使った場合も同じ現象が観察されたが、これらは *polh* プロモーター依存的 mRNA レベルの違いによって生じていることが明らかになった³。

結論

polh cds-30nt 内に *polh* mRNA 量を決定する重要なシス配列があることを明らかにした。今後は、この配列とトランス因子との関係や *polh* mRNA の安定性との関係を調査する必要がある。また、BEVS を利用する場合はできるだけ burst 配列と開始メチオニンの間を短くすることが重要であることを見出した。

文献

- Rankin, C., Ooi, B.G., and Miller, L.K. (1988) Eight base pairs encompassing the transcriptional start point are the major determinant for baculovirus *polyhedrin* gene expression. *Gene* **70**:39-49.
- Katsuma, S., and Matsuda-Imai, N. (2024) Codon optimization-based whole-gene scanning identifies hidden nucleotides essential for *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus *polyhedrin* hyperexpression. *J. Mol. Biol.* **436**:168595.
- Katsuma, S., and Matsuda-Imai, N. (2023) A seamless connection from the burst sequence to the start codon is essential for *polyhedrin* hyperexpression in alphabaculoviruses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **679**:1-5.