特 集 1

バキュロウイルス・ベクター

前 田 進

鳥取大学農学部

(受付: 昭和62年 3 月15日)

1. はじめに

遺伝子工学の進歩により、大腸菌の宿主とプラスミドやファージのベクターにより自由に遺伝子をクローニングでき、また、ある場合には大腸菌に作らせることも可能となった。高等生物の細胞への遺伝子導入は細胞の構造と機能の性質上、ウイルス由来のベクターがいくつか開発されており、本特集の総説に詳しく紹介されている。本稿で紹介するバキュロウイルスのベクターは、脊椎動物のウイルスベクターにはない利点をいくつか備えており、ベクターの構築等に関しては他の総説¹⁾も参考にされたい。

昆虫ウイルスには、日本脳炎ウイルスやイネ萎縮病ウイルスのように他の動植物に対して強い病原性を持つ場合が多数知られており、多くの場合は昆虫体内でも増殖するものの、昆虫に対して全く病原性を示さない。一方、昆虫に病原を示すウイルス(昆虫病原ウイルス)も多数見つかっており、表1に示すように7科からなっている²⁾。バキュロウイルス科(*Baculoviridae*)は、無脊椎動物のみを宿主とするウイルスグループであり、このグループは(1)核多角体病ウイルス、(2)顆粒病ウイルス、(3)封入体非形成のウイルスの3つのサブグループにわけられる。そのうちの核多角体病ウイルス(Nuclear polyhedrosis virus; NPV)亜科は代表的な昆虫ウイルスであり、これに属する *Autographa californica* NPV(AcNPV)とカイコNPV(*Bombyx mori* NPV; BmNPV)は遺伝子発現のためのベクターとして現在広く利用されている。

昆虫ウイルスでは、封入体(包埋体)と呼ばれる結晶性のタンパク質を形成する性質を持ったウイルスが多数

見つかっている。Baculovirus, Entomopoxvirus, CPV (Reovirus)の3科のウイルスが封入体を形成し、今までに発見された全昆虫病原ウイルスの8割以上がこのような封入体を作る。一見、この不可思議な現象も、以下に述べるような昆虫の生活環を考えあわせると理にかなっていることが理解できる。

2. ウイルスの性状

2.1 自然界でのウイルスの伝播と封入体

昆虫は脊椎動物とは異なった性質をいくつか持っている。たとえば休眠という能力があり、あらかじめ生理的に不都合な環境を予測して遺伝子発現をコントロールすることにより、自ら不活性の状態にすることができる。その結果、エネルギーの補充なく、一年近くも生命を維持することができる。そこで、このような性質を持った昆虫を宿主とするウイルスは、宿主が活動していない間、ウイルスの感染能力を失うことなく自然界で生き延びなくてはならない。封入体は過酷な自然から内部に含まれるウイルスを保護する役割を果たしている。このため、ウイルス粒子の形成とは直接関係ない封入体タンパク質ではあるが、これを多量に合成し、なるべく強固な封入体を作ることにより生存効率を高めることができる。このようにして長い進化の過程で封入体タンパク質を多量に作るウイルスが自然界で淘汰されてきたものと考えられる。

昆虫ウイルスの感染は、ほとんどが経口感染である。封入体の場合も感染は幼虫に食下されることにより起こり、まず、消化液中のアルカリ性プロテアーゼにより封入体タンパク質が分解され、中から多数のウイルス粒子が放出される。ウイルスはすみやかに腸管細胞に吸着し、体腔内へと侵入して、脂肪体などのほとんどの組織で増殖する。感染末期には合成された子孫のウイルスは再び封入体へと包埋され、宿主昆虫は死に至る(図1)。

核多角体病ウイルスの封入体は多角体と呼ばれ、分子量約3万のサブユニットからなり、その遺伝子はウイル

Baculovirus Vector. Susumu Maeda, Faculty of Agriculture, Tottori University.

〒680 鳥取市湖山町南4-101

現住所 Zoecon Research Institute, 975 California Avenue, Palo Alto, CA 94304-1104, USA

表 1 昆虫に病原性を示すウイルス

科 名	核酸の性状	粒子の形態	包埋体の形成
Baculoviridae	dsDNA	棒 状	有
Poxviridae	dsDNA	れ ん が 状	有
Iridoviridae	dsDNA	正二十面体	無
Parvoviridae	ssDNA	球 状	無
Reoviridae	dsRNA	正二十面体	有
Rhabdoviridae	ssRNA	弾 丸 状	無
Picornaviridae	ssRNA	正二十面体	無

図 1 核多角体病ウイルスの感染，増殖様式

スゲノム上にある。多角体は非常に溶けにくい，消化液中のアルカリ性プロテアーゼにより，すみやかに消化される。このプロテアーゼは宿主のものが多角体タンパク質に特異的に結合することも明らかにされており³⁾，ウイルスの進化を考える上で興味深い現象である。

2. 2 ウィルス粒子と遺伝子の構造

核多角体病ウイルスのヌクレオキャプシドは，ウィルス DNA と塩基性のコア蛋白⁴⁾ が結合したものと考えられており，大きさは40-60 x 200-400nm である²⁾。ウ

ィルス粒子はこのキャプシドが膜に包まれたものであるが，細胞より出芽で出てくる粒子と多角体に包埋される粒子とでは蛋白質の性質や組織に対する感染性が異なる。多角体に包埋される場合には，一つのエンベロープに複数のヌクレオキャプシドが含まれる場合が多く，このヌクレオキャプシドの個数は形成される組織等によりばらつきはあるものの，ウィルス種により遺伝的に決っている。粒子中には，コア蛋白質以外に少なくとも20種前後の膜蛋白質が認められており，ウィルスにコード

されているものと考えられている²⁾。

ウイルスゲノムはスーパーコイル状の二本鎖の環状 DNA であり、全体で 90-160 kb の大きさを持つ²⁾。ベクターに使用されている AcNPV と BmNPV は、ともに約 130 kb の大きさである。AcNPV の制限酵素地図は図 2 に示してある^{5,6)}。ウイルスゲノムは環状であるため、Vlak と Smith の提案⁷⁾に従い、多角体遺伝子

子のプロモーター側にある EcoRI の制限酵素の認識部位を“0”とし、3'側を+として示すことにしている。ウイルス全体では 100 種前後の異なった蛋白質をコードしているものと考えられており、ほとんどがユニークな塩基配列で占められている。しかし、繰り返し配列を含む 1-2 kb 前後の領域もゲノム中に 4-5 か所認められている^{8,9,10)}。ちょうど、EcoRI の認識部位を含ん

図 2 AcNPV の制限酵素地図。矢印は多角体遺伝子

図 3 多角体の電子顕微鏡写真。結晶構造をした多角体の中にウイルス粒子がみられる

でいることから、いくつかの NPV ゲノム中に容易にその存在が確認されたが、役割は全くわかっていない。

cDNA クローニングや Northern ハイブリダイゼーションなどの結果からいくつかの遺伝子の存在が同定されているものの、現在のところ機能の明かとなった遺伝子は多角体遺伝子のみである。

2.3 ウイルス遺伝子の複製と増殖機構

エンベロープを持った核多角体病ウイルス粒子は膜の融合により細胞に吸着すると、ヌクレオキャプシドのみが細胞内に侵入し、最後には核膜を通過して uncoating する。裸になった DNA は、まず、初期蛋白質 (early) が転写、翻訳され、次に、初期蛋白質の助けにより delayed-early の遺伝子産物が転写、翻訳される。この場合、early の遺伝子産物の存在が必要と考えられている¹¹⁾。感染中期にはウイルスの膜蛋白質などが合成され、子孫のウイルス DNA も複製されてウイルス粒子が形成 (assembly) される。一方、感染末期には後期の (late) 遺伝子である多角体遺伝子が選択的に転写、翻訳され、宿主のものを含め他の遺伝子発現は、ほぼ完全に抑制されてしまう。このコントロールは後ほど述べる mRNA の転写のコントロールを通して行われるものと考えられている。いずれにせよ、この時期には細胞内の蛋白質のうち20-30%が多角体蛋白質で占められるようになる。ウイルス粒子のまわりには多角体蛋白質が集積、結晶化し、最終的には数百のウイルス粒子を包埋した数ミクロンの多角体が核内に形成される。他の細胞、組織への感染は、細胞膜を通して出芽により放出されたウイルス粒子により引き起こされる。(図3)

mRNA は、他の多くの場合と同様にキャッピングされ、ポリ A が付加される¹²⁾。しかし、ウイルスの転写にはウイルス特異的な RNA 合成ポリメラーゼが関与することが明らかになっており、ウイルスがコードしているものと考えられている¹³⁾。実際、ウイルスの転写のコントロールは他の遺伝子発現とは異なりバキュロウイルスに特異的であり、感染の初期から後期にかけてプロモーターおよびターミネーションの位置が変化することが示されている^{14, 15, 16)}。

すなわち、いくつかの遺伝子では感染が進展するにつれプロモーターが上流へ向かって数百から数千ベースと次第に移ってゆき、転写される mRNA もそれにつれてかなり長いものとなる^{14, 16)}。これらの mRNA の合成産物に関しては詳しく調べられていないが、感染が進行するのにともない、活性化されるプロモーターが上流に移り、抑制しなければならない初期、中期の蛋白質の翻訳開始位置を mRNA の下流に移すことにより、その合成を低下させるものと考えられている。

一方、ターミネーションの位置の変化は多角体遺伝子

図4 多角体遺伝子の転写

で認められており、末期にはターミネーションが2-4000 bp 下流へと移動する (図4)¹⁶⁾。この現象も、下流に位置する他の遺伝子の発現を抑制しているためとも考えられる。多角体遺伝子以外に末期に合成されるものに p10 遺伝子と呼ばれるものがある。AcNPV ではかなりの量が合成され、多角体遺伝子と同様、ターミネーションが約2000 bp 下流へと移動することが報告されている¹⁵⁾。

もう一つのバキュロウイルスの遺伝子発現の特徴に、スプライシングが全く認められないことがあげられる¹⁷⁾。上に述べたようなウイルス独自の転写調節機構を持っているので、宿主細胞で行われている複雑な調節機構は限られたウイルス遺伝子の中では全く不必要なものなのであろう。

ウイルスは2本鎖の DNA であるので宿主の DNA 合成機構により複製されるものと考えられている。Galleria mellonella NPV では、replication origin の塩基配列が推察されている¹⁸⁾。細胞内で合成されるワクシニアウイルスで見つかっているような DNA 合成に関与した酵素はコードされていないであろう。

2.4 宿主に与える影響

昆虫は開放血管系の生物であり、一般に昆虫の一生は短い。また、小型で内部構造は比較的単純であるので、いったんウイルスに感染するとたちまち体内に蔓延し、個体は死に至る。

バキュロウイルスには経卵伝播は認められず、また、ウイルスの誘発の原因として古くから考えられている溶原化のような宿主へのインテグレーションも現在までのところ認められていない。ウイルスの引き起こす癌化などの現象も報告されていない。しかし、AcNPV を TN-368細胞で長い期間にわたり継代すると細胞の染色体 DNA が copia 様の DNA とともに AcNPV のゲノムに取り込まれることが報告されている¹⁹⁾。

3. ベクターとしての性質

3.1 ベクターの特徴、利点

核多角体病ウイルスをベクターとして使用する場合には次のような特徴、利点がある。

a) ウイルスゲノムは二本鎖の DNA であり、制限

酵素処理などの組換え DNA 実験上、取扱が容易である。しかし、全体の長さは130 kb にも及ぶため、細胞内での homologous なリコンビネーションによらねば外来遺伝子を挿入できない。

b) 粒子は棒状であり、ある程度の長さ (7-8 kb) の DNA を挿入しても正常な粒子が形成される。

c) 多角体遺伝子という、感染末期に選択的に発現する遺伝子があり、この多角体タンパク質はウイルス粒子の形成とは直接関係がない。このため、この遺伝子を他のものに置き換えても感染性のあるウイルス粒子ができる。もちろん、ヘルパーのウイルスやウイルス遺伝子の一部を組み込んだ特殊な細胞などにも必要ない。

d) 多角体遺伝子は非常に強力なプロモーターを持っており、実際、感染末期には多角体タンパク質は全タンパク質の20-30%にも達する。

e) 多角体は光学顕微鏡で観察できるため、これを遺伝子導入のためのマーカーとして用いれば容易に組換え体 (リコンビナント) ウイルスをクローニングできる。

f) BmNPV をベクターに用いれば、個体を用いた大量生産システムに直ちに応用できる。

3.2 ベクターの構築に利用する多角体遺伝子の構造
ベクターとしては AcNPV および BmNPV が使用されているが、その他の核多角体病ウイルスもベクターとして現在、開発されている。いずれのシステムも培養細胞では、ほとんど同じようにして構築、利用できるが、BmNPV の場合は個体での大量の発現も簡単に行える。

以下、我々の開発したカイコ核多角体病ウイルス (BmNPV) のベクターを中心に説明する。

BmNPV の多角体の遺伝子およびその前後の遺伝子地図は図5のようになっている。多角体遺伝子は、この図の HpaI より580 bp 下流から翻訳開始のメチオニンから始まり、HindIII より488 bp 下流の ATT で終了する。遺伝子にはイントロンは存在しない。転写開始は翻訳開始の ATG より50 bp 上流にあるものと推察されている。ポリ A 付加のシグナルとして終始コドンの下流約 350 bp のところにある AATAAA が少なくともある程

度は働いているものと思われる。

多角体のプロモーターは感染末期には非常に強く働いているが、初期や中期の遺伝子産物の助けがないと全く働かず、このプロモーター部分だけを取り出してもベクターとしては効力を発揮しない。

3.3 ベクターとして利用する多角体遺伝子の転写とウイルスの複製

多角体のプロモーターは感染後期に活性化し、非常に強力であり、全タンパク質の20%以上をも合成する能力がある。異種のタンパク質を作らせた場合は、導入したタンパク質の性質により、かなり低下することも多く、その場合は転写活性も落ちているようである。

BmNPV と AcNPV との5'の塩基配列を比較してみると、翻訳開始の前71 bp が全く同一である²⁰⁾。多角体遺伝子内でもかなり塩基配列が変化しているところから、この保持配列は転写などと関連があるものと推察された。実際この保持配列を下流より欠損させていくと、それ以後に挿入した外来遺伝子の発現が急激に低下してくることが示された。この場合、転写活性が低下していることが認められた²¹⁾。このため、トランスファーベクターはこの保持配列をなるべく含むようにして構築する必要がある。

DNA の複製は感染中期より行われるが、多角体遺伝子は欠損していても全く関係ない。

3.4 トランスファーベクターの構築とその構造

核多角体病ウイルスは多角体遺伝子を含むという他のベクターには無い有利な性質を持っているが、DNA は130 kb と比較的長いので、リコンビネーションにより外来遺伝子を導入しなければならない。しかし、近年注目されているベクターにはワクシニアウイルスのように長いDNAを持ったものが多く、構築の手間がかかる点を除けば挿入できるDNAが長く、ヘルパーなどの助けを必要としないなど多くの利点を持っている。カイコ核多角体病ウイルスの場合は他のバキュロウイルスベクターと同様、多角体という非常に都合の良い遺伝子を持っているので、遺伝子の挿入は光学顕微鏡で容易に判断できる。これは、他のベクターには無い特徴である。

図5 カイコ NPV の多角体遺伝子付近の制限酵素地図

図6 遺伝子導入用ベクター pBE 274, pBK 273の制限酵素地図

細胞でのリコンビネーションを行うまでの操作，すなわち，トランスファーベクターの作製および外来遺伝子の挿入は，すべて大腸菌のベクターシステムを用いる．このためには，多角体遺伝子の前後 2-3 kb とポリリンカーを含むトランスファーベクターを準備し，これに外来遺伝子を導入する．もちろん，このベクターはアンピシリンの薬剤耐性遺伝子と大腸菌での DNA 複製開始点を含む．

最初，作製したトランスファーベクター p89B310²⁰⁾ は翻訳開始の上流を 18 bp，また，終始コドンの下流を 400 bp ほど欠いてしまったので，現在では図 6 のように，多角体遺伝子の 5'，3' の flanking region をできるだけ残した pBE 274，pBK 273 を主として利用している．構築の手順は基本的には，すでに報告したものの²⁰⁾ と同じであり，骨格は pUC 由来で，リンカーとして pBE 274 では EcoRI を，pBK 273 では KpnI，SacI，EcoRI の制限酵素部位を含んでいる²¹⁾．

3.5 挿入できる DNA の制限

i) 長さ

ゲノム DNA は長く，棒状のウイルス粒子のため，数 kb の長さの DNA が挿入できる．筆者らは，BmNPV に約 7 kb の DNA を挿入でき，また，継代しても DNA

に変化は認められないことを確認している²¹⁾．

ii) 塩基配列の制限

多角体遺伝子のプロモーターを用いるため，リンカーの後には 20-30 bp 以内に，翻訳開始の ATG がなければいけない．実際，OKAYAMA-BERG のベクターでクローンされた cDNA をそのまま用い，GC を比較的多く含む約 100 bp を翻訳開始前に挿入した場合は，これを除去した場合に比べ，合成量で 1000 分の 1 以下に落ちていた²¹⁾．これ以外には特に塩基配列の制限はないが，スプライシングは起こらず，イントロンを含むものは発現に利用できないので，cDNA を用いる．

4. ベクターの作製法

全体の流れを図 7 に示した．

4.1 プラスミドへの外来遺伝子の組み込み

まず，トランスファーベクターを適当な制限酵素で切断する．遺伝子挿入の効率を高めるため，通常はバクテリアアルカリフォスファターゼで処理しておく．外来遺伝子は，あらかじめベクターと同じ制限酵素部位を付加されたものを準備しておき，これらをライゲートし，大腸菌に形質転換する．リコンビナントプラスミドの構築はアンピシリンなどのマーカー遺伝子に挿入しないの

図7 組換え体ウイルスの作製と外来遺伝子発現の手順

で、外来遺伝子挿入の確認は直接制限酵素で処理してパターンを調べるか、もしくはハイブリダイゼーションによらなければならない。導入するDNA断片の制限酵素の切断部位が一致しない場合には、クレノー酵素などにより平滑末端にして挿入する。この場合の挿入効率は

低くなり、トランスファーベクターが10 kbと長い場合、数%以下に低下するが多い。挿入方向は、制限酵素処理後の泳動パターンにより順方向のものを選ぶ。

4.2 組換え体ウイルスの作製 (図8)

上記のように作製したリコンビナントプラスミドと野

図8 細胞における多角体遺伝子と外来遺伝子とのリコンビネーション

生株のウイルス DNA を培養細胞にトランスフェクションし、リコンビナントウイルスを作製する。これにはトランスフェクション可能な樹立細胞が必要であり、BmNPV では BmN 細胞、AcNPV は SF 21 AE 細胞が使用できる。

トランスフェクションはカルシウム沈澱により行い、他の動物細胞で行われている方法と同じである²⁰⁾。プラスミドとウイルス DNA のモル比は通常 50:1 程度である。まず、細胞を 60 mm シャーレ当たり、約 10^6 個の細胞を単層に培養し、これにカルシウム沈澱した DNA 溶液を 0.5 ml 加える。数時間から一昼夜放置した後、上清を取り除き、新しい培養液を加えて数日間培養する。トランスフェクションがうまく行われた場合は、4-5 日後にいくつかの細胞で多角体が観察される。6 日後に上清を採取し、ブラーク法²²⁾によりリコンビナントウイルスをクローニングする。アガロースに含まれる不純物は昆虫細胞に対する毒性があるため、ブラークの作製には純度の高いシーブラークアガロースを 0.75% の濃度で用いる。リコンビナントウイルスのクローニングには、多角体を形成せず、細胞病変像のみを示すブラークを採取する。この操作を 2 回繰返し、野生株の混入のないリコンビナントウイルスを純化する。リコンビネーションの効率は普通 0.5% 程度であり、多い場合は数%、少ない場合は 0.1% 位である²¹⁾。

リコンビナントウイルスの DNA を調べてみると、

ほとんどの場合は期待したように多角体遺伝子のかわりに外来遺伝子が挿入されていた。ごくまれに、多角体遺伝子より離れた位置で DNA の変化が制限酵素部位の欠失でみつかる場合もあった。しかし、この場合にも発現量に差は認められなかった²¹⁾。

リコンビナントウイルスは野生株と同様の方法で感染できる。カイコ幼虫への感染の場合は、経皮感染で行う。培養細胞、個体の場合も感染 4-5 日に外来遺伝子の発現は最大となり、細胞、個体とも多角体の形成以外は野生株の感染と同様の症状を示し、幼虫は 6 日目には死に至る。いずれの遺伝子を挿入した場合でも、細胞および幼虫における合成産物の経時的変化はヒトインターフェロン α の場合²⁰⁾ と同じような合成量のカーブ (図 9) を示す。

5. ベクターの使用例

BmNPV および AcNPV をベクターに用いて、数十種にも及ぶ外来遺伝子がすでに発現している。以下、タンパク質の修飾という点に注目しながら、使用例を説明する。

5.1 分泌シグナル

他の組織や細胞に働きかけるタンパク質は、合成された後に細胞外に分泌されなければならない。このようなタンパク質の N 末端は疎水性のアミノ酸が連なっているため、合成されたタンパク質は小胞体の膜に埋まり、疎

図9 カイコ NPV のベクターによる、ヒトインターフェロン α の合成の経時的変化

水性部分が除去された後、正しい形となって細胞外に放出される。単細胞生物である大腸菌や酵母では同じような機能はあるが、外来遺伝子の発現には利用しにくい。

ベクターとして要求されることは、正しい位置で分泌のためのシグナルペプチドが切り落とされ、細胞外に放出されねばならない。バキュロウイルスのベクターでは宿主が昆虫細胞であるため、ほんとうにヒトのタンパク質を正しく認識できるのかは興味のある問題であった。

BmNPV をベクターにしてヒトインターフェロン α を発現させた場合、合成産物は培養細胞ではほとんどが上清に認められた。さらに、カイコ幼虫に感染した場合も活性は体液（血リンパ）中に認められた。合成されたインターフェロンのN末端のアミノ酸配列を調べたところ、ヒト細胞で合成されたものと全く同じであった²⁰⁾。これは、昆虫細胞でも分泌の機構が類似しており、ヒトの分泌シグナルが正しく認識され、除去されたものと考えられた。

本システムにおける分泌シグナルの役割を検討するため、シグナルに対応した塩基配列を欠いたリコンビナントウイルスを作製し、感染して調べたところ、ほとんどの活性は細胞内に認められた。この場合、全体の活性はかなり低く、細胞内にとどまったタンパク質は分解されてしまうのであろう²³⁾。

カイコ個体を用いた場合でも正しい形をしたインターフェロンが得られたのは、幼虫のタンパク質合成の機構に負うところが大きい。幼虫期には成虫の形態形成のた

め、脂肪体組織などで大量にタンパク質を合成している。合成されたタンパク質は使用されるまで体液中で分解されることなく貯蔵され²⁴⁾、体液中に存在するプロテアーゼインヒビター²⁵⁾により保護されている。インターフェロンも同様に分解されることなく蓄積されたのであろう。

AcNPV をベクターに用い、インターロイキン2も同じようにして分泌のシグナルペプチドが除去されることが明らかにされている²⁶⁾。

5.2 糖鎖の付加

多くの膜タンパク質には糖鎖が付いているが、その生物学的機能に関しては未知の点が多い。ある場合には糖鎖は重要でないことがわかっているが、ベクターの合成産物として考えた場合は、より本来の形に近いものが望まれる。昆虫細胞では、ある種の糖鎖の合成酵素がヒトとは異なっており、この場合は全く同一のものが合成される可能性はない。

バキュロウイルスのベクターを用いた場合、ヒトインターフェロン β ²⁷⁾、インフルエンザのヘマグルチニン^{28, 29)}などで、糖鎖が付くことが示されている。しかし、構造に関する詳しい性状はわかっていない。また、分子量の異なるものが合成されることから、合成される分子の糖鎖の長さも違うものが付加されることが推察されている。

5.3 リン酸化

AcNPV のベクターにより c-myc を合成した場合、リン酸化されることが示されている³⁰⁾。

5.4 高次構造

我々が調べたもののうち、活性の調べられるインターフェロン α 等では、タンパク質量と活性が自然のものと一致していた。その他の場合も調べた限りでは同様の結果が得られており、いくつかのSS結合のあるタンパク質も活性ある形で合成され²¹⁾、正しい高次構造を持った外来遺伝子産物が合成されるものと思われる。

5.5 スプライシング

すでに述べたように、バキュロウイルスの遺伝子にはスプライシングをするものが見つかっておらず、また、転写、翻訳のコントロールシステムも宿主のものと異なっている。実際、スプライシングを起こすべき遺伝子を挿入しても除去されないようである。このため、イントロンのある遺伝子は cDNA を用いるかイントロンを人為的に除去しなければならない。

5.6 融合タンパク質

DNA は得られているが、機能が未知で、抗体などの無いタンパク質の場合は、融合タンパク質の形で合成し、多角体の抗体を用いて、検出、精製が可能である。また、一旦、この方法で融合タンパク質に関する抗体を

作製し、次に、この抗体を用いて、native なタンパク質を追うことが可能となる。

ウシバビローマウイルスおよびヒトバビローマウイルス E 2 タンパク質に関しては、このような方法により N 末端に約 50 個の多角体由来のペプチドを融合したタンパク質を合成し、これに対する抗体を作製し感染細胞における E 2 タンパク質の局在性について明らかにすることが可能となった³¹⁾。

5. 7 可溶化

大腸菌を宿主として用いた場合、合成された異種タンパク質が不溶化してしまう例が多数報告されている。複雑なタンパク質では塩酸グアニジンなどによっても活性を持った native なタンパク質を得ることができない場合が多い。我々の系でこのようなタンパク質の合成を試みた場合、大腸菌では活性を持った形として得られないタンパク質が可溶化した状態で合成された²¹⁾。

5. 8 生産量

ベクターで外来遺伝子産物を合成し、それを利用する場合、合成量は重要なファクターとなる。バキュロウイルスのベクターの場合はプロモーターが強力であることに特徴があり、多角体の場合は全タンパク質の 20% 以上にも及ぶ。外来遺伝子産物の場合はこれよりも一般に低下するが、合成するタンパク質の性質により合成量が決まるようである²¹⁾。分泌されるタンパク質、たとえばインターフェロン α では多角体タンパク質の場合に比べ 100 分の 1 程度であるが、今までの他の脊椎動物のベクター系に比べると 10 倍以上は効率が良い²⁰⁾。

実際に医薬品等として利用する場合には、容易に、安価で、かつ大量に生産できることが重要である。高等生物の培養細胞のシステムではコストが高いが、*in vivo*、すなわちカイコ幼虫が利用できれば容易に大量生産できる。

5. 9 ヘルパーなど

多角体遺伝子はウイルス粒子の形成に関係ないので、ヘルパーは必要ない。また、多角体遺伝子を欠損させてもウイルスの増殖には影響を与えなかった。経皮感染をした場合もウイルスの増殖に差はなく、野生株同様、感染後 6 日目には死に至った。しかし、野外での安定性は非常に低く、経口感染の効率も低い。これは多角体を欠損しているためであるが、このような性質は組換え DNA 実験上、安全性の点から都合の良い性質と思われる。

6. おわりに

バキュロウイルスのベクターは、すでに世界中で 200 以上の大学、研究所等で利用されており、多くのタンパク質の発現に用いられている。他のベクターシステムと同じように、タンパク質の違いにより得意、不得意はあ

るものの、全般的にみると合成量は高い。また、タンパク質の修飾の機構の点でもヒトなどの高等生物に近い。カイコ NPV の系は現在のところ唯一の個体レベルでの大量発現が行えるものであり、基礎および応用研究の両面から本システムが利用されることを期待する。

電子顕微鏡写真を提供くださった東京大学農学部、小林正彦氏、また、本稿の掲載の機会を与えてくださった国立遺伝学研究所、石浜明氏に感謝いたします。

文 献

- 1) 前田進, 細胞工学, **4**, 767 (1985)
- 2) Matthews, R. F. E. : Intervirology **17**, 1 (1982)
- 3) Maeda, S., Nagata, M., & Tanada, Y. : J. Invertebr. Pathol., **42**, 376 (1983)
- 4) Tweeten, K. A., Bulla, L. A., and Consigli, R. A. : J. Virol., **33**, 866 (1980)
- 5) Miller, L. K. & Dowes, K. P. : J. Virol., **29**, 1044 (1979)
- 6) Summers, M. D., Smith, G. E., Knell, J. D., & Burand, J. P. : J. Virol., **34**, 693 (1980)
- 7) Vlak, J. M. & Smith, G. E. : J. Virol., **41**, 1118 (1982)
- 8) Kuzio, J. & Faulkner, P. : Virology, **139**, 185 (1984)
- 9) Arif, B. M. & Doerfler, W. : ENBO J., **3**, 525 (1984)
- 10) Erlandson, M., Skepasts, P., Kuzio, J., & Carstens, E. B. : Virus Research, **1**, 565 (1984)
- 11) Guarino, L. A. & Summers, M. D. : J. Virol., **57**, 563 (1986)
- 12) Jun-Chuan, Q. & Weaver, R. F. : J. Virol., **43**, 234 (1982)
- 13) Fuchs, L. Y., Woods, M. S., & Weaver, R. F. : J. Virol., **48**, 641 (1983)
- 14) Lubbert, H. & Doerfler, W. : J. Virol., **52**, 255 (1984)
- 15) Pankin, C., Ladin, B. F., & Weaver, R. F. : J. Virol., **57**, 18 (1986)
- 16) Friesen, P. D. & Miller, L. K. : J. Virol., **54**, 392 (1985)
- 17) Lubbert, H. & Doerfler, W. : J. Virol., **50**, 497 (1984)
- 18) Blinov, V. M., Cutorov, V. V., Holodilov, N. G., Iljichev, A. A., Karginov, V. A., Mikrjukov, N. N., Mordivinov, V. A., Nikonov, I. V., Petrov, N. A., Urmanov, I. H. & Vasilenko, S. K. : FEBS letters, **167**, 1241 (1984)
- 19) Miller, D. W. & Miller, L. K. : Nature (London), **299**, 562 (1982)
- 20) Maeda, S., Kawai, T., Obinata, M., Fujiwara, H., Horiuchi, T., Saeki, Y., Sato, Y. & Furusawa, M. : Nature (London) **315**, 592 (1985)
- 21) Maeda, S. et al. : unpublished data
- 22) 前田進, 日本蚕糸雑誌, **53**, 547 (1984)

- 23) Maeda, S., Kawai, T., Chika, T., Horiuchi, T., Maekawa, K., Nakasuji, K., Saeki, Y., Sato, Y., Yamada, K. & Furusawa, M. : Proc. Japan Acad. Ser. B **60**, 423(1984)
- 24) Tojo, S., Betchaku, T., Ziccardi, V. J., & Wyatt, G. R. : J. Cell Biol. **78**, 823(1978)
- 25) Eguchi, M., Haneda, I., and Iwamoto, A. Comp. Biochem. Physiol. Ser. B **71B**, 569 (1982)
- 26) Smith, G. E., Ju, G., Ericson, B. L., Moschera, J., Lahm, H-W., Chizzonite, R. & Summers, M. D. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**, 8404 (1985)
- 27) Smith, G. E., Summers, M. D. & Fraser, M. J. : Mol. Cell. Biol., **3**, 2156(1983)
- 28) Kuroda, K., Hause, C., Rott, R., Klenk, H.-D. & Doerfler, W., : EMBO J., **5**, 1359(1986)
- 29) Posse, R. D. : Virus Research, **5**, 43(1986)
- 30) Miyamoto, C., Smith, G. E., Farrell-Towt, J., Chizzonte, R., Summers, M. D., & Ju, G. : Mol. Cell. Biol., **5**, 2860(1985)
- 31) Fuse, A. et al. : submitted for publication.