バキュロウイルスベクター，昆虫系による物質生産†

前 田 進

(カリフォルニア大学デービス)

近年の遺伝子工学の進歩により，大腸菌の宿主とファージ，プラスミドのベクターを用いて多くの遺伝子が分離，同定され，また，その発現もできることが示された．しかし多細胞の高等生物に由来する複雑な蛋白質は，たとえ合成されても，糖鎖などの修飾，可溶化，生物活性などの点でしばしば問題が認められることが多かった．このため，これに代わる多くの真核生物由来のベクターシステムが考案された．なかでもバキュロウイルス(科)の核多角体病ウイルスのベクターは，発現量や合成蛋白質の生物学的性状などの点から，現在では頻繁に用いられている発現ベクターとなっている⁽¹⁻⁷⁾．

1. バキュロウイルスの性状とベクターへの応用

バキュロウイルス(核多角体病ウイルス：NPV)は節足動物(主として昆虫)に特異的であり，約 130 kb の環状の 2 本鎖 DNA をゲノムとする，膜構造を持った棒状のウイルスである．ゲノムの 5 ヶ所(それぞれ約 1 kb)にわたり，約 100 bp の繰返し配列が認められる以外は，ほとんどがユニークな塩基配列におおわれ，ウイルス全体で約 100 前後の遺伝子を含んでいるものと推察されている⁽⁸⁾．感染末期には，ウイルス粒子を包埋する多角体と呼ばれる結晶蛋白質を核内に多量に形成するという特徴があり，多角体の主要蛋白質はウイルスにコードされた分子量 3 万のサブユニットからなる．

多角体は包埋したウイルス粒子を野外にて安定に長期間保護する役割を果たすが，粒子の形成と直接関係ないことから，多角体遺伝子の翻訳領域を外来遺伝子に置き換えることにより，多角体の強力なプロモーターのもとで導入した遺伝子を多量に発現させることができる．鱗翅目昆虫のヤガ科の *Autographa californica* NPV とカイコ(*Bombyx mori*) NPV (BmNPV) がベクターとし

て頻繁に用いられている⁽²⁻⁴⁾．

2. 組換えウイルスの作成とベクターの選択^(2,5,7)

核多角体病ウイルスのゲノムは非常に大きく，直接外来遺伝子を挿入できないので，プラスミドにクローニングした多角体遺伝子を含む DNA 断片を用いた発現(トランスファー)ベクターを作成し，これを用いて，外来遺伝子をウイルスゲノムに導入しなければならない(図 1)．このための典型的なベクターは多角体遺伝子の翻訳領域のみを除去し，多角体遺伝子の強力なプロモーターの直後に遺伝子挿入のためのリンカーを導入したものである．また，組換えが正しく起こるように，この領域を含む多角体遺伝子の前後，約 3 kb を順方向になるようにプラスミドに挿入してある(図 2)．

実際にバキュロウイルスに導入する外来遺伝子は，感染末期にはスプライシングが阻止されるため，イントロンを含まない cDNA などを用いる．また，5' 末端の非翻訳領域は 30 bp 以下(とくに GC の多い場合)にする．導入する遺伝子の大きさに実質上の制限はないが(10 kb まで)，外来遺伝子は，このベクターのリンカーの位置に順方向になるように挿入し，これを野生株ウイルスの DNA とカルシウム沈殿法により培養細胞にトランスフェクションする．数日後に上清を採取して単層に培養した細胞に感染させ，アガロスを重層する．数日後，多角体を形成しない組換えウイルスのブランクを顕微鏡下で検索して採取し，さらにブランク純化を繰返して，均一なウイルスを得る．

現在では，目的に応じた種々のトランスファーベクターが利用できる^(6,7)．多角体遺伝子の発現には 5' 末端の非翻訳領域の全域と転写開始の ATAAG 配列付近の約 60 bp が重要であることが明らかにされており，現在利用されている多くの発現ベクターはこの領域をほとんど含んでおり，発現量が高い．また，種々の制限酵素の認識部位を持ったベクターが数種類以上，使用可能である．

† Expression of Foreign Genes in Insects Using Baculovirus Vectors.

Susumu MAEDA (Department of Entomology, University of California, Davis, CA 95616, USA)

図 1 コトランスフェクションした細胞における多角体遺伝子と外来遺伝子との組換え

バキュロウイルスの使用における重要なポイントに組換えウイルスのプラーク法による分離がある。この段階を容易に行うため、 β -ガラクトシダーゼの遺伝子をマーカーとして含んでいるベクターや、2つの遺伝子を同時に発現するために2つのプロモーターを持ったベクターや、多角体遺伝子以外のウイルス遺伝子由来のプロモーターやキメラのプロモーターを持っており、感染初期に発現できるものなどがある⁽⁷⁾。また、多角体の領域にゲノム上で一カ所にしかない制限酵素の認識部位を導入して組換えウイルスの効率をあげたウイルスゲノムも利用できる⁽⁹⁾。外来遺伝子を多角体遺伝子とともに導入する

図 2 カイコ核多角体病ウイルスの発現ベクターの制限酵素地図と種々のベクターのリンカー付近の塩基配列

ベクターもあり、この場合は多角体遺伝子を欠損したウイルスゲノムに遺伝子を導入する。

3. 外来遺伝子の発現と生成産物の精製^(2,5,7)

外来遺伝子発現のためには、単層に培養した細胞に細胞当たり 5~10 感染粒子になるように感染させ、46~72 時間後に培養液もしくは感染細胞を採取する。細胞によっては浮遊培養も可能であり、この場合、攪拌棒をいれた化学用の平底のフラスコに 100~200 cc になるように培養液を加え、1 分間に 100 回転位のスピードで培養する。培養液は市販の粉末や液体のものが入手でき、通常ウシ胎児血清を 10% 必要とするが、無血清の培地も細胞によっては利用できる。

カイコの幼虫を用いる場合は以下のように行う⁽²⁾。数時間のあいだ絶食した 5 齢幼虫を氷水の中に数分間つけて麻酔を行い、感染培養の上清を 10 倍に希釈して、6 mg/ml になるようにカナマイシンを加えた溶液をペニシリン注射器にて 10~20 μ l (約 5×10^5 感染粒子) ずつ腸管をきずつけないようにして体腔内に注射する。サンプルは感染 4 日目に採取する。分泌される蛋白質の場合は、腹脚を注射針でつついて溶出してくる体液を試験管などに受け、ただちにフェニルチオウレアや DTT などの酸化防止剤を加えて、メラニン化を防ぐ。いったん、分子ふるいのカラムに一度でも通過させると、それ以後はメラニン化は起こらない。

バキュロウイルスで発現した蛋白質は、いったん、サンプリングしてしまうと、それ以後は一般的な生化学的手法で精製でき、他の生物材料由来のサンプルと基本的な差はないと考えてよい。硫安沈殿、分子ふるいのカラム、イオン交換カラム、アフィニティークラムなどにより、効果的に精製できる。また、HPLC も目的産物が溶媒に安定ならば、非常に有効である⁽¹⁰⁾。

4. 発現した蛋白質の性状

バキュロウイルスの系で外来遺伝子を発現させた場合には、高等生物の細胞で行われるような蛋白質の修飾が本来のものと同じように起こることが比較的多い。

分泌のシグナルは正しく認識されて本来の位置で正しく切断され、ER に取り込まれ、ゴルジ体を通して分泌される。しかし、分泌の効率が悪く、ゴルジ体でトラップされてしまう場合もまれにある⁽¹¹⁾。

糖鎖の付加は本来の位置に起こる。特異な糖が付加することはないが、高マンノース型がほとんどで、複合糖鎖はほとんど認められない。このため、糖鎖の長さは平

均して脊椎動物の場合に比べると約半分である。昆虫細胞では、糖鎖の付加に関する酵素で脊椎動物にあるものがいくつか欠損しているのが原因であると考えられているが、最近になり、バキュロウイルスの発現に用いている昆虫細胞でも、糖鎖の末端にシアル酸を付加する酵素などが存在しており、微量ではあるが、複合糖鎖の存在していることが明らかにされた⁽¹²⁾。

生成した外来遺伝子産物は、ほとんどの場合可溶化しており、本来と同じような生物活性を持つ。酵素などの活性に関しても差は認められていない。また、高次構造も本来のものと区別がなく、本来のものと同じように抗原性も高い。

リン酸化や他の修飾も本来と同じように行われる場合の多いことが報告されている⁽⁴⁻⁶⁾。

また、バキュロウイルスでウイルスの構造蛋白質を発現させた場合には、しばしば、ウイルス粒子様の形成が認められる。感染細胞のホモジェネートを密度勾配遠心するとウイルス粒子のピークが得られたり、また、電子顕微鏡により本来のウイルス粒子と全く区別がつかないような形態をした粒子が観察され⁽¹³⁾、ワクチンへの応用が期待されている。

カイコのような幼虫個体を外来遺伝子の宿主として用いた場合には培養細胞にはない多くの利点が認められる。たとえば、昆虫細胞を含め樹立細胞系では C 末端のアミド化が一般に起こりにくいが、幼虫で発現させた場合には関連した酵素があるため、アミド化が正しく起こる。また、外来遺伝子は幼虫では培養細胞系に比べて数 100 倍も多量に合成される場合が多く、体液中に存在するプロテアーゼ阻害剤により、分泌された蛋白質は分解されることなく体液中に貯蔵される。発現した蛋白質は HPLC などの生化学的手法により比較的容易に精製できる。最近では、昆虫に毒性を示す蛋白質の遺伝子をバキュロウイルスの遺伝子に挿入することにより、即効性のある有効なウイルス農薬の開発もすすんでいる^(14,15)。

BmNPV はカイコという扱いやすい昆虫を宿主として発現に用いることができることから、とくにその有用性が注目されている。カイコは実用面では絹生産のための養蚕業として、基礎研究では生理学、生化学、分子生物学の材料として古くから利用されている。このため、病原として、また、組換え体としてのウイルスの適切な取扱いが必要となる。NPV の感染は多角体に包埋されたウイルスが食下されることにより起こるので、いっ

たん, 多角体を欠損させた組換えウイルスを扱う場合はカイコへの感染という点に関しては問題ない。野生型ウイルスを研究室内で扱う場合はとくに注意が必要になるが, ウイルスを培養細胞でのみ扱う場合は組換えウイルスを扱う場合と同じように扱えば問題はない。とくに, 感染細胞を乾燥させたまま放置しないように注意する。幼虫個体への野生株ウイルスにはとくに注意を払い, 感染個体は隔離した状態で飼育し, 容器などは使用后すべて滅菌する。

- (1) 前田 進: 細胞工学, 4, 767—780 (1985).
- (2) 前田 進: 実験医学, 7, 1566—1570 (1989).
- (3) L. K. Miller: *Ann. Rev. Microbiol.*, 42, 177—199 (1988).
- (4) S. Maeda: *Ann. Rev. Entomol.*, 34, 351—372 (1989).
- (5) S. Maeda: in "Invertebrate Cell System Applications," vol. I, ed. by J. Mitsuhashi, CRC Press, Boca Raton, FL, 1989, p. 167.
- (6) V. A. Luckow: in "Recombinant DNA Technology and Application," ed. by A. Prokop, P. K. Bajpai, and C. S. Ho, McGraw-Hill Inc., New York, 1991, p. 97.
- (7) D. R. O'Reilly, L. K. Miller, and V. A. Luc-

kow: "Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual," W. H. Freeman and Company, New York, 1992.

- (8) G. F. Rohrmann: *J. Gen. Virol.*, 73, 749—761 (1992).
- (9) P. A. Kitts, M. D. Ayres, and R. D. Possee: *Nucleic Acids Res.*, 18, 5667—5672 (1990).
- (10) A. Miyajima, J. Shreurs, K. Otsu, A. Kondo, K. Arai, and S. Maeda: *Gene*, 58, 273—281 (1987).
- (11) D. L. Jarvis and M. D. Summers: *Mol. Cell. Biol.*, 9, 214—223 (1989).
- (12) D. J. Davidson, J. M. Fraser, and F. J. Castellino: *Biochemistry*, 29, 5584—5590 (1990).
- (13) N. Higashihashi, Y. Arai, T. Enjo, T. Horiuchi, Y. Saeki, K. Sakano, Y. Sata, K. Takeda, S. Takashima, and T. Takahashi: *J. Virol. Methods*, 35, 159—167 (1991).
- (14) S. Maeda, S. L. Volrath, T. N. Hanzlik, S. A. Harper, K. Majima, D. W. Maddox, B. D. Hammock, and E. Fowler: *Virology*, 184, 777—780 (1991).
- (15) 前田 進: 蛋白質 核酸 酵素, 37, 842—847 (1992).