

バキュロウイルス・ベクター システムの利用

宮 嶋 成 壽 ・ 小 林 淳
(三重大学 工学部)

本特集36～41頁

「昆虫ウイルスの生物工学への利用」を参照



昆虫培養細胞の核内に形成されたカイコ核多角体病ウイルス (BmNVP) の多角体

多角体の直径は 2.0～4.5 μm 。培養細胞はカイコ^{はい}胚子由来 NISES-BoMo-15AIIc 細胞。

ホタルのルシフェラーゼを発現するバキュロウイルスに感染して光るカイコ

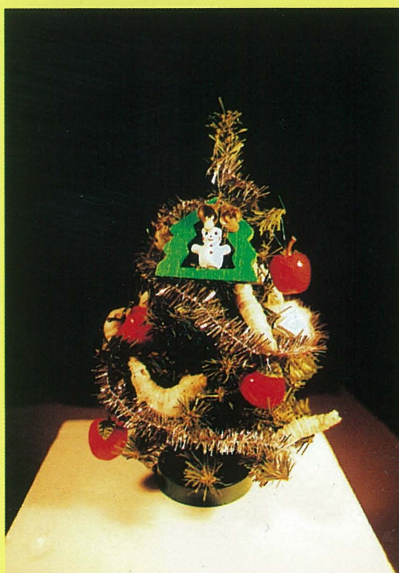
(写真提供：片倉工業株式会社 生物科学研究所，金谷利道氏)

ホタルの発光は、ホタルのもつルシフェラーゼという酵素とルシフェリンという基質の反応によって起こる。

まずカイコのバキュロウイルス・ベクターにルシフェラーゼ遺伝子をつないだものを感染させ、カイコ体内で酵素ルシフェラーゼを発現させる。つぎにルシフェリンをカイコに注射するとルシフェラーゼと反応して発光が起こる。

上：組換えウイルスに感染したカイコ 5 齢幼虫にルシフェリンを注射し、バイアル瓶を並べ照明を点灯 (左) または消灯 (右)。

下：同じく、組換えウイルスに感染したカイコ 5 齢幼虫にルシフェリンを注射し、クリスマスツリーに乗せ、照明を点灯 (左) または消灯 (右)。



昆虫ウイルスの生物工学への利用

— バキュロウイルス・ベクターシステム利用の現状 —

宮 蔭 成 壽 ・ 小 林 淳

バキュロウイルスは、節足動物、とりわけ昆虫に特異的に感染するウイルスである。そのため、従来、バキュロウイルスの存在は、昆虫ウイルス病の研究者にのみ知られていたにすぎなかった。十年ほど前に、バキュロウイルスの一種である核多角体病ウイルス (NPV) のゲノム DNA が遺伝子工学的手法を用いて組み換えられ、NPV の有する強力なプロモーターにより、生物学的活性を有する外来遺伝子産物がきわめて効率よく発現されることが証明された。それ以来、基礎生物学のみならず、医学、農学ならびに生物工学などの応用生物学も含めた幅広い分野で、バキュロウイルス・ベクターシステムの有効性が認識され、世界中で利活用されるに至った。バキュロウイルス・ベクターシステムを利用した遺伝子発現件数は、現在、着実に増加しており、ベクターシステムの改良も盛んに行なわれていることから、今後、ますますその応用範囲が広がるものと期待される。

はじめに

科学技術が高度に発展した 20 世紀も末になった現在、われわれの周辺にはそれらの技術により生産された精巧な工業製品があふれている。しかし、長い進化の過程を経て洗練された多様な生物の機能から学ぶべき点はまだ多い。昆虫は古くからわれわれ人間にとって身近な存在であったが、近年、その昆虫に感染するウイルスが、実は優れた遺伝子発現ベ

クターとして利用できることが明らかになり、現在では、分子生物学および遺伝子工学において欠くことのできないものになっている。それが、バキュロウイルス・ベクターシステムである。

1. バキュロウイルスとは何か

地球上に生息するほとんどの生物種に対し、多かれ少なかれ特異的に感染するウイルスが存在する。昆虫もその例外ではなく、数多くの昆虫病原ウイルスが知られており、その一つがバキュロウイルスである^{1,2)}。最近の分類³⁾によると、バキュロウイルス科 (Baculoviridae) は、感染細胞核内に封入体を形成するのが特徴的な Eubaculovirinae と封入体を形成しない Nudibaculovirinae の 2 亜科に分けられ、さらに、Eubaculovirinae は、nuclear polyhedrosis virus (核多角体病ウイルス、NPV) と granulosi virus (顆粒病ウイルス、GV) の二つの属に分けられている。一方、Nudibaculovirinae には、non-occluded baculovirus (NOB) のみが属している。これらのうち、遺伝子発現ベクターに用いられているのは NPV である。NPV のウイルス粒子は、40~50×200~400 nm の桿状ヌクレオキャプシド (核酸を包むタンパク質の外殻) がエンベロープ (外殻の外側にさらに包む膜) に包まれた構造をしており、二本鎖の環状 DNA ゲノム (80~200 kbp; キロ塩基対) を格納している³⁾。

NPV の宿主昆虫は、鱗翅目 (チョウ・ガの仲間)、直翅目 (コオロギの仲間)、鞘翅目 (甲虫

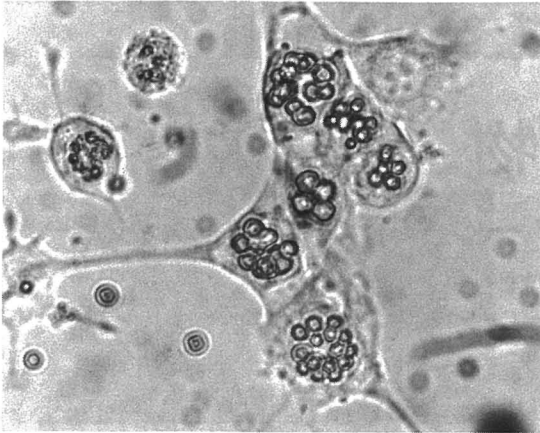


図1 昆虫培養細胞核内に形成されたカイコ BmNPV の多角体。

類), 脈翅目 (カゲロウの仲間), 膜翅目 (ハチの仲間) など約 400 種に及んでいる。宿主昆虫に感染した NPV は, おもに脂肪体や血球の核内で増殖し, 感染後期の核内には, 直径 $0.5\sim 15\ \mu\text{m}$ の多角形をしたタンパク性結晶 (多角体) が形成される (図 1)。核多角体病 (nuclear polyhedrosis) という病名は, この病徴に由来する。多角体の主要構成タンパク質であるポリヘドリンは, 分子量約 30 kDa (; キロダルトン) であり, 感染後期の細胞のタンパク質成分の 20~30 % を占める。多角体にはウイルス粒子が多数包埋されているため, 宿主昆虫が感染末期に死亡して, 皮膚が破れて多角体が体外に放出されると, 別の宿主昆虫への感染源となる。

多角体の役割は, 昆虫体外でのウイルス粒子の保護であり, ウイルスの増殖には必須ではない。したがって, 多角体の主成分として大量に発現されるポリヘドリンの遺伝子をインターフェロンなどの外来遺伝子に置換すれば, ウイルスは細胞内で正常に増殖し, しかも, 目的の外来遺伝子が大量に発現されるものと期待される。このような発想から誕生したのが, バキュロウイルス・ベクターシステムである。

2. バキュロウイルス・ベクターシステムの開発

1) 誕生の背景

さまざまな生物から単離した遺伝子産物の生物学的活性, あるいは活性と構造の関係を解析し, また, その活性を医療あるいは工業生産などに応用するためには, 当然, その遺伝子産物が大量に必要となる。しかし, 多くの場合, 天然に存在する遺伝子産物の体内含有量は, そのような目的を容易に達成できるほど多くはない。この問題を解決するために, 目的の遺伝子産物を効率よく合成する方法が開発されてきた。その結果, 低分子量のものであれば化学的に合成することが可能になり, また, 高分子のタンパク質の合成のために, 生物の優れた遺伝子発現機能を応用した遺伝子発現ベクターが開発された。

大腸菌とプラスミド (環状の核外遺伝子) を用いた遺伝子発現ベクター (受容体となる細胞へ外来遺伝子を導入し, 発現させるもの) システムは, 手軽さと発現量の多さから, これまでもっとも頻繁に用いられてきたシステムである。しかし原核生物である大腸菌を使用するため, 真核生物由来の遺伝子を発現させるとうまく発現しない, あるいは発現しても本来の生物学的活性や高次構造を再現できないなどの問題が起り, 必ずしも万能ではなかった。

一方, 真核生物でも, 培養細胞とウイルスを利用したいくつかの遺伝子発現ベクターシステムが開発された。これらのベクターシステムを用いて発現させた真核生物由来の遺伝子産物の多くは, 大腸菌での発現量には劣るものの, 本来の遺伝子産物と同等な活性を有していた。このような事実から, 遺伝子発現効率の高い真核生物ベクターシステムの開発に対する要望は, 次第に高まっていった。

2) 発現系における二つの流れ

このような背景のもと, NPV の優れたタンパク質 (ポリヘドリン) 生産能力に眼をつけたアメリカの Summers らのグループは, 1983 年にキンウワ

バ(ヤガ科の蛾)の一種 *Autographa californica* の NPV (AcNPV) を利用して、ポリヘドリンの代わりにヒトの β -インターフェロンを、真核生物の発現系としては異例なほど大量に発現させることに成功し⁴⁾、これが、バキュロウイルス・ベクターシステムの始まりとなった。

その後日本でも、Maeda ら (1984, 1985) が、カイコ (*Bombyx mori*) の NPV (BmNVP) を利用して、ヒト α -インターフェロンの発現に成功した^{5,6)}。先の AcNPV を用いたシステム同様、BmNPV のシステムでも昆虫培養細胞においてインターフェロンが効率よく発現したが、それに加えて BmNPV のシステムでは、カイコ幼虫に組換えウイルスを注射することにより、培養系よりもきわめて効率よくインターフェロンを発現できた。カイ

コによるインターフェロン発現の手順を図 2 に示す。最近では、NPV の DNA ゲノムに外来遺伝子を直接挿入する方法の開発も行なわれているが、図 2 のような、プラスミド DNA とウイルス DNA との昆虫培養細胞内での相同組換え(相同な DNA 配列間での組換え)を利用した遺伝子導入法が現在でももっともよく用いられている。

このように、バキュロウイルス・ベクターシステムによる遺伝子発現には、昆虫培養細胞系とカイコなどの昆虫体を用いる二つの流れがあり、それぞれに以下のような長所と短所がある。

培養細胞系は、培養液とクローン化された細胞から構成されているため、比較的均一な遺伝子産物が得られるうえ、培養液および細胞由来のタンパク質の形成も比較的単純なので、遺伝子産物の精製も容易である。しかしながら、遺伝子産物を大量に得るために培養系をスケールアップする場合、培養液や培養装置にかかるコストが非常に大きくなってしま

う。これに対して、昆虫体、とくにカイコを用いる場合、一般的に培養細胞よりも遺伝子発現効率が高い(たとえばインターフェロンでは、カイコ血液 1 ml 中に 40 μ g 以上産生され、他の系に比べて 100 倍ほど高い)。このような傾向は、分泌タンパク質において顕著である。なぜならカイコの血液が中性付近の pH をもち、プロテアーゼ活性がないために、分泌された遺伝子産物が血液中に安定に蓄積されるためである。しかも、カイコは昆虫の中でもっとも家畜化の進んだ昆虫であり、大量飼育技術が長い養蚕業の歴史の中で確立されているため、培養系よりも低いコストで遺伝子の大量発現を行なうことができる。また、生体内に存在するさまざまな分化した細胞により、組織特異的な翻訳後修飾が行なわれる可能性もある。その反面、同じ理由で、遺伝子産物が不均一になる可能性も高い。それに、培養系とは異なり、発現された遺伝子産物を昆虫由来のさまざ

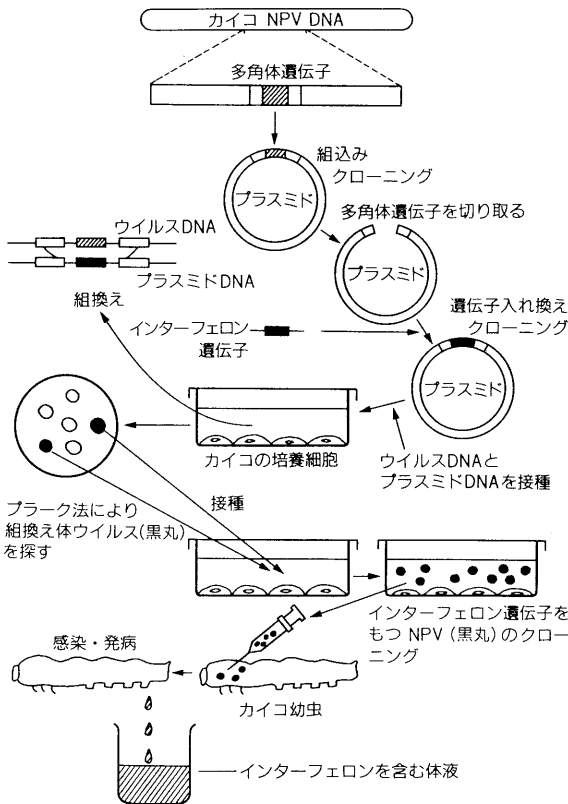


図 2 組換え体ウイルスの作製とインターフェロン産生の手順 (文献¹⁵⁾より転載)。

まなタンパク質成分などから分離精製するのは、必ずしも容易ではない。以上のように、どちらの場合も長所と短所があるため、外来遺伝子の発現に培養細胞を用いるか、昆虫体を用いるかは、遺伝子産物の特性や利用目的に応じて決定される。

3. 利用の現状

バキュロウイルス・ベクターシステムの利用は、上述のように、 β -インターフェロン⁴⁾および α -インターフェロン^{5,6)}から始まった。このベクターシステムは、優れた外来遺伝子発現能力と共に、大腸菌では不可能であった真核生物に特有な翻訳後修飾を可能にするなどベクターとして有利な特徴を有していたため、その後発現された外来遺伝子産物の数は着実に増え、論文で報告されたものは1988年までに36遺伝子⁷⁾、さらに1992年までにはその十倍近くの約340遺伝子⁸⁾に達しており、間もなく（あるいはすでに？）1000遺伝子を越えるものと思われる。それらすべてを紹介することは誌面の都合上不可能なので、そのほんの一部を表1に示す。

発現された遺伝子数の増加に伴って、発現産物の利用法も多様化してきた。生体内には微量にしか存在しない遺伝子産物をバキュロウイルスで大量に発現させ、その構造と生物学的活性との関係を解析す

る基礎研究への利用にとどまらず、医療用生理活性物質の合成に必須な酵素活性を有する遺伝子産物（たとえばアミド化酵素⁹⁾など）の生産、あるいはウイルスや寄生虫の表面抗原遺伝子産物のワクチンとしての生産¹⁰⁾などさまざまな応用例が報告されている。

最近、筆者らは、マラリアの表面抗原遺伝子の一つをバキュロウイルスに組み込み、カイコ幼虫で効率よく発現することに成功した¹¹⁾。この表面抗原は

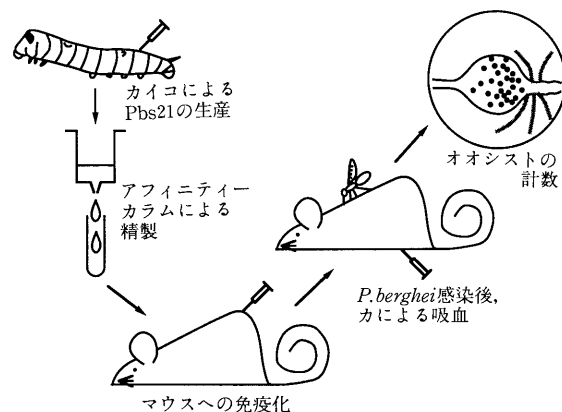


図3 カイコ幼虫を用いて生産したネズミマラリア *Plasmodium berghei* のオオキネート表面抗原 Pbs 21 によるマラリア伝播阻止効果判定の手順。アフィニティーカラムで精製された Pbs 21 を用いてネズミを免疫し、その後、*P. berghei* を感染させてからカに吸血させる。そして、カを解剖して消化管にマラリアが形成するオオシストを数える。

表1 昆虫バキュロウイルス・ベクターシステムにおける外来遺伝子発現例（文献⁸⁾より一部抜粋改変）。

発現した外来タンパク質	由来
DNA ポリメラーゼ	ヒトアデノウイルス-2
ヌクレオキャプシドタンパク質（ワクチン）	ラッサ熱ウイルス
Gene I タンパク質	カリフラワーモザイクウイルス
キャプシドタンパク質 C（ワクチン）	日本脳炎ウイルス
コア抗原（ワクチン）	B 型肝炎ウイルス
核タンパク質（ワクチン）	インフルエンザウイルス B
エンベロープタンパク質 gp 120（ワクチン）	ヒト免疫不全ウイルス
HD-73 デルタ毒素	バチルスチューリンゲンシス・クルスターキー株
ルシフェラーゼ	ホタル
α -インターフェロン	ヒト
インスリン受容体	ヒト
ビタミン D 受容体	ヒト

Pbs 21 というタンパク質で、ネズミマラリア *Plasmodium berghei* がカの体内に侵入するオオキネート（マラリア原虫の配偶子が有性生殖により合体して生じた接合子で、カの胃壁に侵入してオオシストを形成する）のステージ（発育段階）において発現される。図3に示したように、カイコで発現させ、アフィニティーカラム（目的物質をカラムにつめた担体への親和性を利用して分離する）で精製した Pbs 21 を、あらかじめネズミに注射して免疫しておく、その後マラリア原虫を感染させてからカに吸血させても、免疫したマウスからカへのマラリア原虫の伝播はほとんど起こらなかった。一方、大腸菌で発現させた Pbs 21 は、高次構造が異なるため、伝播阻止効果はあまり高くなかった。このようにネズミマラリアを用いたモデル実験の結果が非常に良好だったことから、ヒトマラリア *P. falciparum* の表面抗原のうち Pbs 21 に対応する Pfs 25 をカイコを用いて大量に生産すれば、効果的なマラリア伝播阻止ワクチンとして実用化できるものと期待されている。

カイコを用いた発現系は、前項で述べたように、遺伝子産物の大量発現を培養細胞系よりも低コストで達成できるため、このようなワクチン生産にきわめて有利であり、今後ますます利用されてゆくものと予想される。しかしながら、大量発現におけるカイコを用いることの優位性も、近年、培養液の低コスト化など昆虫培養細胞系の改良が目覚ましいスピードで進展しているため、いつまでも不動であるとは言いがたい。1993年11月、名古屋において開催された Japanese Association for Animal Cell Technology 学会の昆虫培養細胞とバキュロウイルス発現系に関するシンポジウムで、欧米から招待されたスピーカーたちは、そのような印象をさらに強める最新成果の報告を行なった¹¹⁾。

すなわち、Gong と Montgomery (JRH Bioscience) は、*Spodoptera frugiperda* (ヨトウムシ

の一種) 由来の Sf 9 細胞よりも優れた AcNPV 発現系として、無血清 EX-CELL 405 培地で浮遊培養した *Trichoplusia ni* (イラクサキンウワバ) 由来の High Five™ (または Tn 5) 細胞について報告した。Overton ら (Glaxo) も、同じ細胞系を 36 l のバイオリクターにまで容易にスケールアップできることを報告した。また、Francis ら (Tulane 大学) は NASA と共同で、スペースシャトルを利用した宇宙空間でのタンパク質生産のために、流体力学的な力を減少するようにシミュレートされた微小重力状態での Sf 9 細胞培養用バイオリクターの開発とそれを用いた組換えタンパク質の発現について報告した。Bernard ら (Glaxo) は、細胞分取装置を使用した細胞のリサイクルと培養液のパーフュージョン（フィルターを使用した培養液の循環^{ろ過}）を組み合わせることにより、細胞密度を 1 ml あたり 10⁷ 細胞以上にまで高めることに成功し、その結果、細胞あたりの組換えタンパク質生産量が向上したことを報告した。

このような先駆的な研究（頂点）が強力に推進されている一方で、バキュロウイルスを用いた発現に必要なすべてを含んだキットの発売により、バキュロウイルス・ベクターシステムを使用する研究者の数（裾野）も大幅に増えている。現在発売されているキットの代表として、まず AcNPV を用いたものに、MaxBac™ と Xpress System™ (いずれも Invitrogen) がある。前者は、世界で最初に発売されたキットで、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子の発現により、組換えウイルスを青色のプラーク（単一のウイルスに由来する感染細胞集団）として検出できるように工夫されている。また後者は、前者を改良して、遺伝子産物のアミノ末端にヒスチジンを 6 残基付加することにより、金属を固定化したアフィニティーカラムと結合できるようにしたものであり、そのため遺伝子産物の精製がワンステップで行なえる。アミノ末端のヒスチジン残基は、その後エンテ

ロキナーゼにより切除できる。一方、BmNPV を用いたものには、Bom-Ex (日本農産工業) があり、培養細胞のみならず、カイコ幼虫での大量発現にも対応している。このほかにも、受託方式による発現を含め、数社がバキュロウイルスによる発現をサポートしており、今後もまだ増加する傾向にある。

おわりに

バキュロウイルス・ベクターシステムは、世界中のかなりの数の大学、研究所および企業で利用され、発現系としては大腸菌のつぎで、すでに酵母よりも多く利用されているといわれている。したがって、今後さらに使いやすく、しかも遺伝子産物の特性や利用目的にきめ細かく対応できるような多様性のあるベクターシステムへと改良されていくであろう。また、利用件数の増大に伴って、バキュロウイルスでうまく発現しない例もいくつか報告され始めている。これらを克服するための工夫も、今後大きな課題になってくるものと思われる。なお、本稿では誌面の都合上ふれなかったが、昆虫に対する毒素遺伝子あるいは昆虫ホルモン関連遺伝子を組み込んだ NPV を、組換えウイルス農薬として害虫防除に活用する研究¹²⁾も欧米で盛んに行なわれており、バキュロウイルス・ベクターシステムの新たな利用法として将来の実用化に期待が集まっている。

本稿を読んでバキュロウイルス・ベクターシステムに興味をもたれた方は、これに関する書籍^{8,10,13-16)}や総説^{7,17-22)}が数多く出版されているので、そちらを参考にさせていただきたい。最後に、本稿の執筆において、有益な情報を提供して下さったカリフォルニア大学デービス校の前田 進博士に心から感謝いたします。

文 献

- 1) 川瀬茂実：遺伝，38(11)，169-181 (1984)。
- 2) Kurstak, E. ed. : Viruses of Invertebrates. Marcel Dekker, New York (1991)。
- 3) Francki, R. I. B. *et al.* eds. : Classification and Nomenclature of Viruses. Springer-Verlag, Wien (1991)。
- 4) Smith, G. E. *et al.* : Mol. Cell. Biol., 3, 2156-2165 (1983)。
- 5) Maeda, S. : Proc. Japan Acad., 60, 423-426 (1984)。
- 6) Maeda, S. : Nature, 315, 592-594 (1985)。
- 7) Luckow, V. A. and M. D. Summers : Bio/Technology, 6, 47-55 (1988)。
- 8) O' Reilly, D. R. *et al.* : Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual. W. H. Freeman and Company, New York (1992)。
- 9) Kobayashi, J. *et al.* : Cytotechnology, 8, 103-108 (1992)。
- 10) Goosen, M. F. A. *et al.* eds. : Insect Cell Culture Engineering. Marcel Dekker, New York (1993)。
- 11) Japanese Association for Animal Cell Technology : Abstracts of the Sixth Annual Meeting of JAACT '93 Nagoya (1993)。
- 12) 前田 進：蛋白質 核酸 酵素，37，842-847(1992)。
- 13) 前田 進：昆虫ウイルスとバイオテクノロジー。サイエンスハウス，東京 (1993)。
- 14) Summers, M. D. and G. E. Smith : A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures (Texas Agric. Expt. Sta. Bull. No. 1555). (1987)。
- 15) 渡部 仁：微生物で害虫を防ぐ。裳華房，東京 (1988)。
- 16) 松浦善治：蛋白質 核酸 酵素，37，211-222(1992)。
- 17) 前田 進：細胞工学，4，767-780 (1985)。
- 18) 前田 進：ウイルス，37，1-11 (1987)。
- 19) 前田 進：実験医学，7，1566-1570 (1989)。
- 20) 丸本恭正：遺伝，別冊1，86-93 (1988)。
- 21) Bishop, D. H. L. : Seminars in Virology, 3, 253-264 (1992)。
- 22) 松影昭夫ら：中部バイオフォーラム，7，28-35 (1993)。

(みやじま しげとし・こばやし じゅん，

三重大学 工学部 分子生物学講座)