

# 論文内容の要旨

## 論文題目 広範な生物種のゲノムに標的特異的に転移するバキュロウイルス介在型LINEベクターの開発

氏名 川島 朋子

### 序論

トランスジェネシスは、現代の医学・生物学に不可欠な技術である。現在、主にDNA型トランスポゾンやレトロウイルスなどがベクターとして用いられているが、これらは染色体にランダムに挿入するため、「遺伝子・機能領域の破壊」や「位置効果による発現のばらつき」をもたらす危険性があり、染色体の特定位置へ遺伝子を導入する技術が必要とされている。LINE (Long Interspersed Nuclear Element) は、ほぼ全ての真核生物のゲノムに存在するレトロトランスポゾンの一種である。LINEには、ゲノム上の特定位置に転移する因子が10種類以上も発見されている。当研究室では、これらの標的特異的LINEの転移機構を調べる目的で、昆虫の核多角体ウイルスのAcNPV (*Autographa californica nucleopolyhedrovirus*)を用いて、ヨトウガ由来の昆虫細胞Sf9細胞で配列特異的に転移させるシステムを開発した(図1)。私は、この系をトランスジェネシスに応用すれば、標的特異的な遺伝子導入を可能とする新たなベクターを作製できるのではないかと考えた。また、発現に用いるAcNPV

は系統的に離れたヒト細胞にも感染することが示唆されているため、幅広い動物に利用できる可能性が高いと考えた。そこで、AcNPVにLINEを組み込んだ「AcNPV介在型LINE」が幅広い種の細胞で標的特異的な転移活性をもつのかを明らかにするため、複数の標的特異的LINE (SART1、R1、R2)を用いて、多様な昆虫種や魚類メダカ細胞、哺乳類ヒト細胞を材料に、AcNPV介在型LINEの広範な感染性と転移活性を解析した。

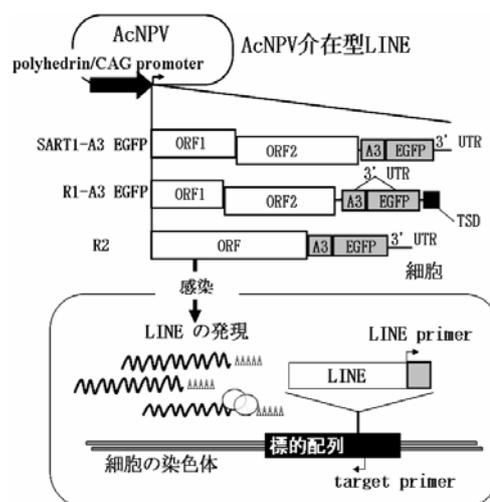


図1. AcNPV介在型標的特異的LINEの転移系

3' UTRの内部に外来配列 (A3プロモーターとEGFP) を組み込んだSART1、R1とR2を発現するAcNPVコンストラクトを作製し、細胞へ感染させる。この際、LINE発現用のプロモーターは昆虫ではpolyhedrin、脊椎動物ではCAGを用いた。標的特異的転移の有無は、LINE内部と標的配列の間を増幅するように設計したプライマーセットを用いてPCRで検出する。R1の末端には正確な挿入に必要な標的配列 (TSD) を付加した。

## 結果と考察

### 1 AcNPV介在型SART1/R1を用いた昆虫細胞・個体への外来遺伝子の導入

「AcNPV介在型LINE転移システム」が昆虫のトランスジェニックツールに適用できるかを調べた。ウイルス介在型の安定な転移システムが開発できれば、初期胚へのインジェクションなどが困難な非モデル昆虫での遺伝子導入が容易になると期待される。カイコのテロメア特異的LINE・SART1と28SrDNA特異的LINE・R1はSf9細胞へ転移することが確認されていたが、AcNPVにとって本来の宿主ではないカイコ幼虫においても、本転移系が応用できるのか調べる必要があった。またトランスジェニックツールとしてSART1とR1に外来配列を組み込んでも転移活性があるかを検証するため、3'非翻訳領域(3'UTR)にEGFPの発現カセットを含むAcNPV(SART1-A3 EGFP-AcNPV、R1-A3 EGFP-AcNPV)を作成し、カイコ5齢幼虫に注射した。SART1とR1は標的配列に転移するため、転移の有無はLINE内部の配列と標的配列の間のPCRで検出できる。感染72時間後に脂肪体のゲノムDNAを抽出しPCRを行った結果、特異的な転移を示すバンドが検出された。さらに転移した3'末端境界部分の配列を解析したところ、テロメア配列や28S rDNAの標的配列に正確に転移したことが確かめられた。次に組織ごとに解析を行った結果、精巣・卵巣を含む9つの組織でSART1とR1の転移を確認した(図2)。この結果は、生殖細胞を介して導入遺伝子が次世代に受け継がれる可能性を示唆する。一方、実験の過程で、高濃度のAcNPVはカイコの発生を阻害することが明らかになったため、遺伝子導入に最適なウイルスタイターや系統を検討した結果、F1トランスジェニック個体を得ることに成功した。しかし、導入した外来遺伝子の発現の有無は十分に検証できなかった。AcNPVの毒性や外来遺伝子の発現に関して今後解決すべき問題はあがあるが、本研究により初めて標的的特異的な遺伝子導入個体の作製が示された。また、非モデル昆虫アカモドクガの染色体にもSART1が転移したことから、カイコ以外の多様な昆虫においても、トランスジェニックツールとして利用できる可能性が示唆された。

### 2. メダカの28SrDNA特異的LINE (R2O1)の昆虫細胞での転移活性

近年、節足動物から脊索動物まで広範な生物に存在することが示された、28S rDNA特異的LINE・R2の利用を考えた。標的配列が生物間で高度に保存されているので、広く利用できる可能性がある。またカイコのR2 (R2Bm)や当研究室で単離したメダカ完全長R2 (R2O1)は、転移活性を持つことが明らかになっている(谷田部ら未発表データ)。

私は、R2が実際に系統的に離れた種でも転移するのかを検証するため、R2O1のORFと3'UTRを発現するAcNPVコンストラクトを作成し、昆虫由来のSf9細胞で転移実験を行った。その結果、コントロールとして用いたR2Bmは転移したが、R2O1の転移は確認できなかった。R2O1とR2Bmでは、図

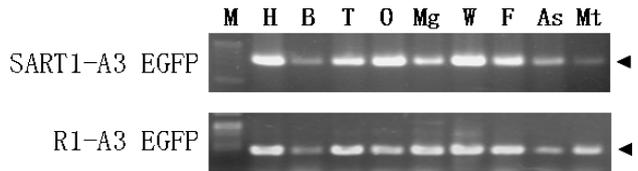


図2. カイコ幼虫の組織別転移解析

M, マーカー; H, 血球細胞; B, 脳; T, 精巣; O, 卵巣; Mg, 中腸; W, 翅元基; F, 脂肪体; As, 前部絹糸腺; Mt, マルピーギ管。感染個体において、解析を行った全ての組織でSART1-A3 EGFP、R1-A3 EGFPの標的的特異的転移が確認された。

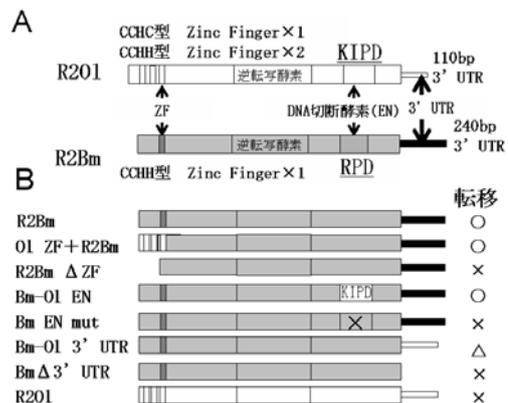
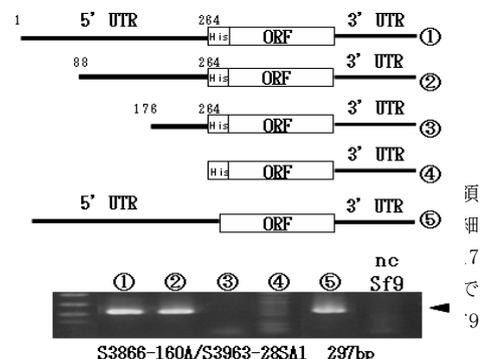


図3. メダカR2 (R2O1)とカイコR2 (R2Bm)のキメラコンストラクトを用いた転移実験

A, R2O1とR2Bmの構造的な相違点。B, 各キメラ型R2コンストラクトの標的的特異的転移を調べた結果。○, 転移; ×, 転移が確認できない; Δ, 転移するが、R2側の逆転写開始位置が不正確になる。



3に示すように、[N末のzinc-finger (ZF)], [ENの活性中心], [3' UTRの構造]など構造的な違いがある。この特徴的なドメインが転移活性の違いに関与しているのではないかと考え、一部分をR2BmからR2O1型に置き換えたキメラR2 (図3)を作製し、転移活性を調べた。その結果、ZFとENDドメインのキメラはSf9細胞でも転移したため、機能は保存されていることが示唆された。また、3'UTRのキメラコンストラクトでは、一部不正確な位置から逆転写が開始されたが転移自体は確認されたので、他の領域が原因であると考えられた。

新たに5'UTRを付加した全長R2O1の転移活性を調べた結果、Sf9細胞への転移が確認された(図4)。さらに5'UTRを短くしたコンストラクトを作製して解析を行った結果、5'UTRの88-176の領域がR2O1の転移に必須であることが判明した。この領域には、複数のR2因子の5'UTR全般で高度に保存されている配列が見つかったが、R2O1が5'UTRを転移に必要とする理由については今後の解明を待たねばならない。以上の結果から、R2O1はAcNPV介在型の導入系によって系統的に離れた昆虫の染色体にも標的的特異的に転移することが示された。

### 3. VSVG型AcNPVを利用したR2の脊椎動物細胞への標的的特異的転移

R2O1は昆虫細胞にも転移することから、脊椎動物全般にR2O1が利用できるのではないかと考えた。AcNPVの脊椎動物への感染と導入遺伝子の一過性の発現はいくつか報告されているが、転移システムと組み合わせた例はない。ヒト細胞で標的的特異的転移が成功すれば、安全な遺伝子治療ベクターなどへの応用が期待できる。そこで、ヒト細胞への強い感染力と高発現を可能とするウイルスベクターの作製を目指すため、AcNPV外殻の修飾とプロモーターを変えた数種のEGFP-AcNPVを作製して、感染細胞のEGFPシグナルを指標に導入効率の比較を行った。その結果、水疱性口内炎ウイルス(VSV)のエンベロップGタンパク質をもち、CAGプロモーターを発現に用いるAcNPVコンストラクトが最も適しており、ヒト細胞での高発現が確かめられた。そこで、5'UTRを含む全長R2O1を発現するR2O1-VSVG型AcNPVを作製し、感染実験を行った(図5)。感染細胞のゲノムDNAの解析結果から、感染4日後の293細胞においてR2O1の転移が確認できた。R2O1の挿入サイトの配列を詳細に調べた結果、28SrDNAの想定された標的配列に正確に転移したことが確かめられた(図5C)。以上の結果を総合すると、R2O1は昆虫、魚類、哺乳類動物の広範な細胞種で標的的特異的な転移活性を保持することが明らかとなった。

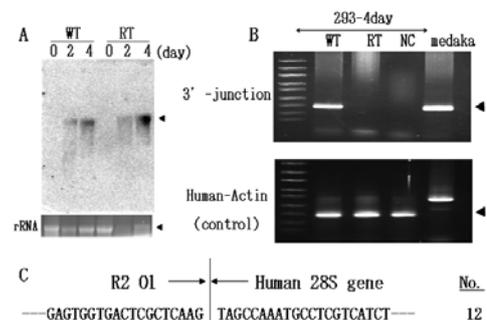


図5. R2O1のヒト細胞への転移

A, R2O1野生型(WT)と逆転写酵素変異体(RT)のVSVG-AcNPVを作製し、ヒト293細胞へ感染後、R2O1の転写をノザンハイブリダイゼーションで確認した。B, (上段) 標的的特異的転移検出のPCR。R2O1 WTでは転移が検出されたが、RT変異体では転移は検出されなかった。(下段) ヒトActinのPCR。NC (無処理293細胞)、medaka (メダカHdrR系統)。C, R2O1挿入部分の配列解析の結果。標的配列に正確に転移していた。

### 全体の考察と結論

本研究から「AcNPVが広範な生物種の細胞に感染・発現する」、「LINEのR2O1が系統的に離れた種に転移する」ことが示され、この二つの組み合わせにより、標的的特異的遺伝子導入を可能とする新しい遺伝的ツールを開発することができた。

DNA型トランスポゾンでは、ショウジョウバエのP因子のようにその種でしか転移しない種特異的な転移因子とpiggyBacのように広範な生物種で転移が可能な転移因子が知られている。一方、LINEを含むレトロトランスポゾンでは種特異性や宿主因子の転移への関与はほとんど調べられていない。LINEは自身のORFに逆転写酵素とDNA切断酵素をコードしており、転移に必要な宿主因子は主に転写・翻訳やDNA修復に関連したユニバーサルな因子が想定されている。しかし、その他の宿主因子との相互作用について

はほとんど未解明である。今回、魚類由来のR2O1が昆虫とヒト細胞でも転移したため、R2O1は種特異的な宿主因子には依存しないことが示唆された。R2が節足動物から爬虫類まで幅広い生物種に存在するのはこのためかもしれない。今後R2Bmを含む他種のR2において、幅広い生物種への転移活性を調べることにより、R2全体の特徴が明らかになると考えられる。一方、本研究では導入した外来遺伝子の発現の有無を十分に検証できなかった。これは、ウィルスベクターから由来した発現か染色体導入部位からの発現かを区別できないため、今後別の導入方法などを用いて検証しなければならない。また、遺伝子導入部位でのサイレンシング効果などを想定すると、インシュレーター配列の利用や転移標的部位の変更なども今後視野に入れておく必要があるが、技術的には容易に対応できる。以上のような改良が進めば、今回開発された標的特異的転移システムは安定で安全な汎用性の高い遺伝子導入法としておおいに期待できる。

### 発表論文

1) **Kawashima T**, Osanai M, Futahashi R, Kojima T, Fujiwara. H. A novel target specific gene delivery system combining baculovirus and sequence-specific LINEs *Virus Research* 2007 Jul;127(1):49-60.