

3. BACシステム：大腸菌遺伝学とウイルス学が融合した 新しいヘルペスウイルスの遺伝子改変法

川口 寧^{1,2}, 田中 道子³

1 名古屋大学大学院医学系研究科ウイルス学分野

2 科学技術振興機構・さきがけ

3 国立感染症研究所感染病理部

巨大なウイルスゲノムを有するヘルペスウイルスの遺伝子改変法は、約四半世紀にも前に確立された。それにも関わらず、その過程は煩雑であり、改変には熟練と時間を要した。1997年、ドイツの Koszinowski のグループは、新しいヘルペスウイルスの改変法である'BACシステム'を報告した。彼らは、マウスサイトメガロウイルスのゲノムを BAC (bacterial artificial chromosome) にクローニングし、大腸菌に保持させた。そして、大腸菌の遺伝学を駆使してウイルスゲノムに変異を導入後、ウイルスゲノムを培養細胞に導入することによって変異ウイルスを再構築させることに成功した。この'BACシステム'の登場により、ヘルペスウイルスの遺伝子改変は著しく簡便化され、様々なヘルペスウイルスの増殖機構および病原性発現機構の解析が加速されている。また、'BACシステム'は、遺伝子治療用のヘルペスウイルスベクターの開発をも簡便化し、ヘルペスウイルスの医学的利用の普及に貢献している。本稿では、ヘルペスウイルス研究における'BACシステム'について概説する。

はじめに

ヘルペスウイルスは、エンベロープを有する大型のDNAウイルスであり、牡蠣といった無脊椎動物からヒトのような高等な脊椎動物に至るまで幅広く分布している¹⁾。現在までに130種類以上同定されているヘルペスウイルスは、ヒトおよび動物に、神経疾患、粘膜性疾患、皮膚疾患、腫瘍性疾患、呼吸器疾患等の様々な病態を引き起こすことより、医学および獣医学領域において重要なウイルス群である¹⁾。一方、ヘルペスウイルスのプロトタイプである単純ヘルペスウイルス (HSV: herpes simplex virus) は、強い神経指向性や高い殺腫瘍能力を有することより、遺伝子治療やウイルス療法分野で医学的利用が試みられている^{2,3)}。

ヘルペスウイルスの基礎研究や医学的利用には、ウイルスゲノム改変技術は極めて重要である。ウイルスの病原性発現機構や増殖機構の解析には、あるウイルス因子に改変を施した変異ウイルスの作製が、また、遺伝子治療ベクターの開発や改良には、病原性因子の不活化や外来遺伝子の搭載等が必須になってくる。ヘルペスウイルスの遺伝子改変法は、約四半世紀も前にシカゴ大学の Roizman のグループによって確立された⁴⁾。しかし、ヘルペスウイルスは巨大なウイルスゲノム (130~250 kbp) を有することより、その遺伝子操作の過程は煩雑であり、作製に長期間と熟練を要した。さらに、サイトメガロウイルスといった培養細胞において増殖が著しく遅いものや、Epstein-Barr ウイルスのように増殖が一定の条件下でしか行われなないヘルペスウイルスに関しては、ウイルスゲノムの改変はさらに困難であった。1997年、ドイツの Koszinowski のグループは、ヘルペスウイルスの遺伝子操作系に画期的なブレイクスルーをもたらした⁵⁾。'BACシステム'である⁶⁻⁹⁾。彼らはマウスサイトメガロウイルス (MCMV: murine cytomegalovirus) のゲノムを BAC (bacterial artificial chromosome) にクローニングし、大腸菌に保持させた。そ

連絡先

〒466-8550 名古屋市昭和区鶴舞町65
TEL: 052-744-2207
FAX: 052-744-2452
E-mail: ykawagu@med.nagoya-u.ac.jp

して、大腸菌の遺伝学を駆使してウイルスゲノムに変異を導入後、BAC クローンを大腸菌より抽出し、培養細胞に導入することによって変異ウイルスを再構築させることに成功した (図1)。この 'BACシステム' は、他のヘルペスウイルスにも応用され、現在では、ヘルペスウイルスの遺伝子操作系の主流になりつつある。本稿では、ヘルペスウイルス研究における 'BACシステム' について、筆者らの実際の実験データを含めて概説する。

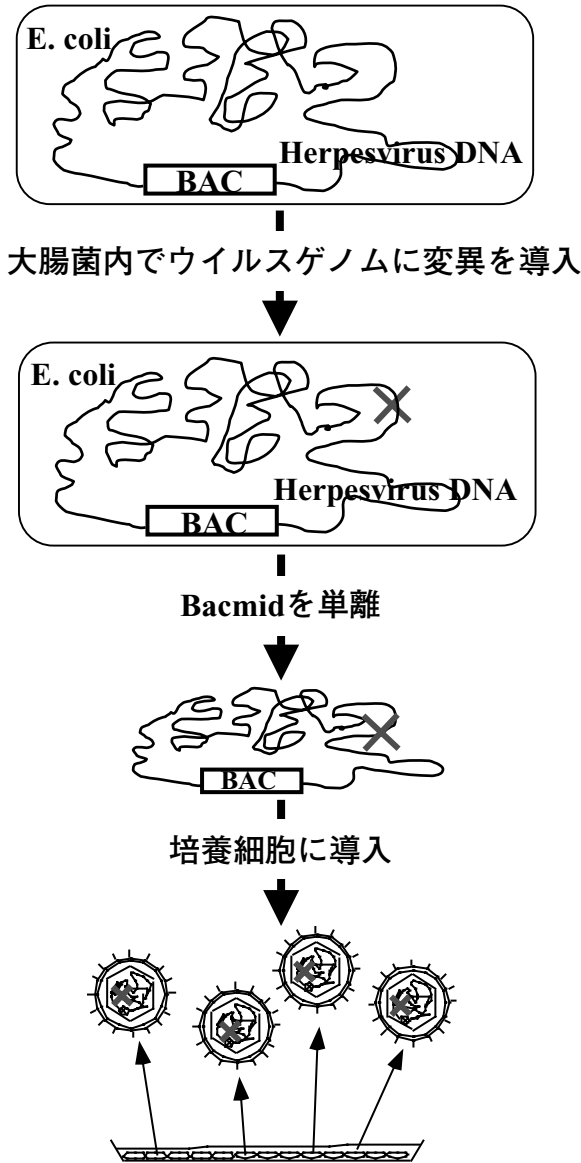


図1. BAC システム.
ヘルペスウイルスゲノムを BAC にクローニングし、それを保持する大腸菌を用いる。まず、大腸菌の遺伝学を利用してウイルスゲノムに変異を導入する。その後、大腸菌より BAC クローンを抽出し、培養細胞に導入すると変異ウイルスが産生される。

ヘルペスウイルス遺伝子改変法の変遷

1980年, Roizman のグループは、培養細胞内での相同組み換えを用いた HSV ゲノム改変系を報告した (図 2A)⁴⁾。この系は、HSV の thymidine kinase (TK) 遺伝子を選択マーカーとして利用した改変系で、欠損、挿入、点変異といった如何なる変異導入も可能なウイルス改変系である。しかし、目的の組み換えウイルスを得るまでに、(i) ウイルス粒子からのウイルスゲノムの精製、(ii) トランスフェクション、(iii) 薬剤存在下でのウイルスの選択、(iv) 3 ラウンドのプラーク純化をそれぞれ3回ずつ行わねばならない。これらの過程は、熟練のヘルペスウイルス研究者でも最低1ヶ月は必要であり、目的の組み換えウイルスを作製するのに半年~1年かかることも珍しくなかった。さらに、変異を導入するウイルス遺伝子が培養細胞での増殖に必須な場合は、その遺伝子を相補的に発現する細胞を作製する必要があった。

その後、Berns および Davison のグループが cosmid を用いた新たなヘルペスウイルス改変法を報告した (図2B)^{10, 11)}。彼らは、HSV および、HSV と近縁なブタのヘルペスウイルスである pseudorabies virus (PRV) を用い、相互にオーバーラップし、かつ、全ウイルスゲノムをカバーする5つのウイルスゲノム断片をクローニングした cosmid セットを作製した。これらの cosmid セットを培養細胞に導入すると感染性の PRV および HSV が再構築される。よって、cosmid にクローニングされたウイルスゲノム断片に目的の変異を導入し、それを他の cosmid セットと共に培養細胞に導入すると、目的の変異ウイルスを作製することができる。しかし、cosmid にクローニングされたウイルスゲノム断片に変異を導入することが困難であり、さらに、ウイルスゲノムの複製起点 (Ori) が欠損しやすいという欠点があった¹¹⁾。

BAC (bacterial artificial chromosome) システム

BAC は F 因子プラスミドのレプリコンに基づくクローニングベクターであり、300 kbp を超える DNA 断片のクローニングが可能である¹²⁾。ヒトをはじめとするゲノム研究に広く利用されている。F 因子のレプリコンは、大腸菌内で BAC クローンを単一コピーで保持させることを可能とする。よって、BAC クローンは大腸菌内で極めて安定に維持される。さらに、BAC クローンの改変には、大腸菌の遺伝学、つまり、大腸菌ゲノムの改変系がそのまま利用できる。後述するが、大腸菌のゲノム改変系は、recombinase を利用した 'allelic exchange' やトランスポゾンを用いたランダム変異導入など、簡便かつ効率的な遺伝子改変系が開発されている。

ヘルペスウイルスに先駆けて、1993年、Luckow のグループは、昆虫の大型 DNA ウイルスであるバキュロウイルス

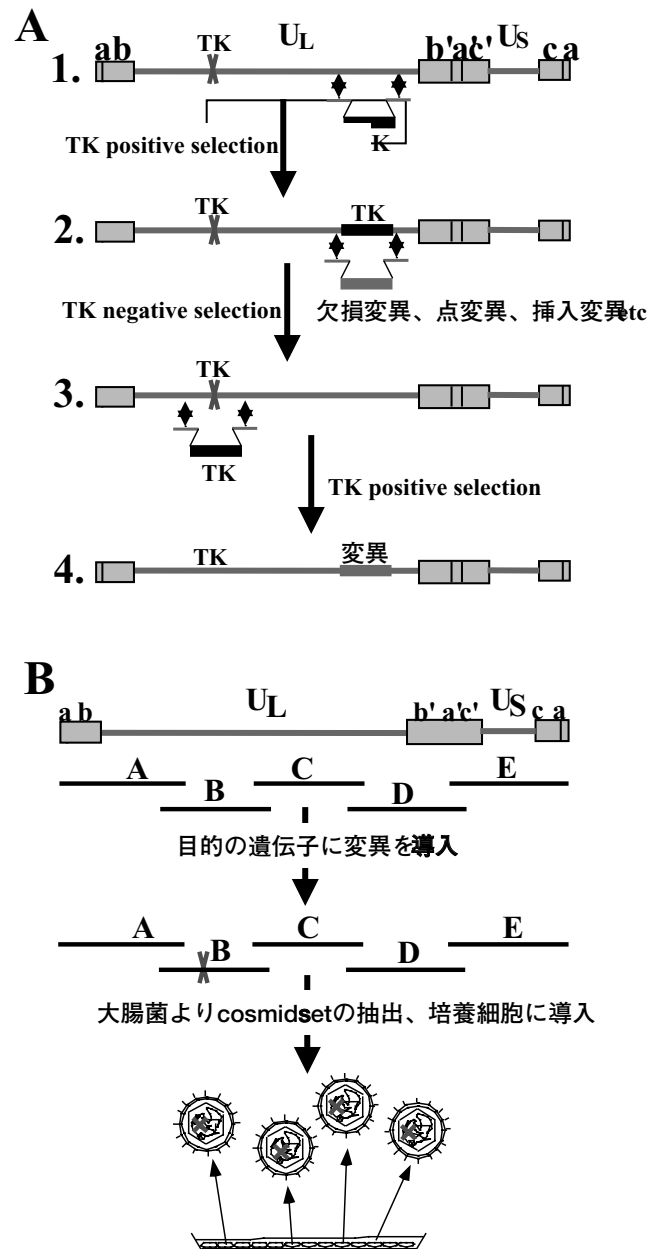


図2 従来のヘルペスウイルス遺伝子改変法.

(A) 培養細胞内での相同組み換えを利用する方法. 1. 変異を導入したい部位に TK 遺伝子の発現カセットが挿入された組み換え HSV を作製する. HSV の本来の TK 遺伝子を欠損した組み換えウイルス DNA および変異を導入したい部位に TK 遺伝子を挿入した HSV DNA 断片 (変異を導入したい両端の相同配列は 500bp 以上が必要) を有するプラスミドを培養細胞に導入する. TK 遺伝子が挿入された組み換えウイルスを HAT (hypoxanthine, aminopterin, thymidine) 培地で選択することにより単離する. HAT 培地では TK 活性を有するウイルスしか増殖できない. 2. 1 で得られた組み換えウイルスの DNA と, 希望の変異を導入した HSV DNA 断片を有するプラスミドを培養細胞に導入し, BUdR (bromodeoxyuridine) を含む培地で選択する. そして, TK 遺伝子が希望の変異を有する DNA 断片と置き換わった組み換えウイルスを単離する. BUdR を含む培地では, TK 活性を持たないウイルスのみが増殖可能である. 3. 本来の TK 遺伝子を修復するために, 2 で得られた組み換え HSV のウイルス DNA と TK 遺伝子を含む HSV DNA 断片を有するプラスミドを培養細胞に導入し, TK が修復された組み換えウイルスを HAT 培地で選択することにより単離する. (B) cosmid セットを用いる方法. 相互にオーバーラップし, かつ, ウイルス全ゲノムをカバーする 5 つのゲノム断片をクローニングした cosmid セットを作製する. cosmid にクローニングされたウイルスゲノム断片に目的の変異を導入し, それを他の cosmid セットと共に培養細胞に導入すると, 目的の変異ウイルスを作製することができる.

スに BAC システムを導入している¹³⁾。バキュロウイルスは発現系として多用されている。Luckow のグループが開発した系は、現在、Invitrogen 社から BAC-TO-BAC Baculovirus Expression system という名で市販され、バキュロウイルス発現系の簡便化に貢献している。それ以外にも、マウスゲノムをクローニングした BAC クローンを改変することによって遺伝子改変マウスの作製を簡便化したり^{14, 15)}、大型の DNA ウイルスであるワクシニアウイルスのゲノム¹⁶⁾ や大型の RNA ウイルスであるコロナウイルスの cDNA をクローニングする¹⁷⁾ ことによって各ウイルスの遺伝子改変系に利用されている。

ヘルペスウイルスゲノムのBACへのクローニング

Koszinowski のグループによってヘルペスウイルス研究に BAC システムが導入された後⁵⁾、様々なヘルペスウイルスゲノムが BAC にクローニングされ、現在までに16のヘルペスウイルスに BAC システムが導入されている^{5, 18-40)}。

ヘルペスウイルスゲノムを BAC にクローニングするためには、まず、従来の培養細胞における相同組み換え法を用いて、BAC がウイルスゲノムに挿入された組み換えウイルスを作製する必要がある。BAC は約 7 kbp と大きな DNA 断片であるので、その挿入部位によってはウイルスの性状（培養細胞での増殖や病原性）に影響を与える場合がある。つまり、BAC の挿入部位によっては、改変系の用途が限定されてしまう場合がある。例えば、感染性の

HSV ゲノムの BAC へのクローニングは、1999年 Horsburgh らのグループによって報告された²⁸⁾。しかし、この系では、BAC を TK 領域に挿入したことより TK の機能は破壊され、再構築された HSV はマウス動物モデルにおける病原性を失っている。また、TK 遺伝子産物は、抗ヘルペスウイルス剤アシクロビルの標的である。増殖型の HSV を遺伝子治療ベクターとして用いる際、アシクロビルは予期せぬ事態に対する safe guard として有用である。Horsburgh らの系で作製された HSV ベクターにはアシクロビルという safe guard が有効でない。

我々は、「全ての組み換えウイルスおよび遺伝子治療ベクターは野生株に由来する」という事実を鑑み、完全長のウイルスゲノムを有し、かつ、再構築されたウイルスが野生体の性状（培養細胞での増殖や、マウス動物モデルにおける病原性）を保持する感染性 HSV ゲノムのクローニングを試みた。野生体の性状を保持した完全長の感染クローンを得ることによって、あらゆる研究に応用できる HSV 遺伝子改変系の確立が可能になる。そのために、我々は BAC を HSV UL3 および UL4 遺伝子の遺伝子間領域に挿入した（図3A）。我々は過去に、この領域に外来遺伝子が安定に挿入され、かつ、挿入によってウイルスの培養細胞での性状が変わらないことを報告している⁴¹⁾。また、BAC を loxP 配列で挟み、Cre/loxP の部位特異的組み換え系で、BAC をウイルスゲノムより除去できるように工夫した（図3A）³¹⁾。HSV に外来遺伝子を搭載する際、その許容量はゲノムサイズの10~20%であると考えられている。比較的大きな DNA 断片である BAC の除去を可能にすることによって、外来遺伝子の搭載許容量が格段に増えることが期待される。

我々は、UL3, UL4 遺伝子間領域に、loxP 配列で挟まれた BAC を挿入した組み換え HSV (YK303) を、従来の培養細胞内での相同組み換え法を利用して構築した。HSV は感染細胞中で環状の DNA になることが知られているので、YK303 感染細胞より Hirt 法で環状ウイルスゲノムを抽出し、大腸菌 DH10B に保持させた (YEbac102)。大腸菌 YEbac102 より HSV-BAC (pYEbac102) を抽出し、制限酵素切断パターンを野生体と比較したところ、同じパターンを示した（図3B）³¹⁾。また、pYEbac102 を培養細胞に導入すると感染性ウイルス (YK304) が再構築された³¹⁾。さらに、Cre recombinase を発現する非増殖型アデノウイルス (AxCANCre) と YK304 を培養細胞に共感染させたところ、BAC が除去されたウイルス (YK311) を容易に得ることが可能であった（図3A）³¹⁾。再構築された YK304 および YK311 の性状を解析した結果、培養細胞での増殖やマウスモデルにおける病原性は、野生体と同等であった³¹⁾。以上、我々は、野生体の性状を保持する完全長の感染性 HSV ゲノムのクローニングに成功した。

BAC システムが様々なヘルペスウイルスに導入されているが、BAC をウイルスゲノムに挿入するために、特定

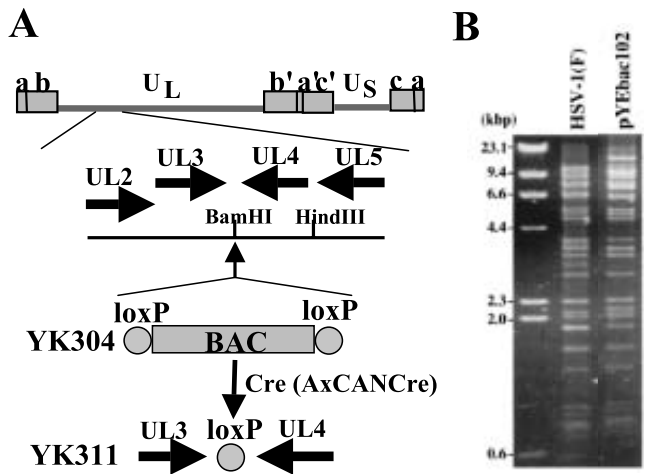


図3 ヘルペスウイルスゲノムの BAC へのクローニングの実際。(A) HSV-1 の UL3 および UL4 遺伝子間領域に loxP 配列で挟まれた BAC を挿入した。BAC は、Cre recombinase によって容易にウイルスゲノムから除去することが可能である。(B) 完全長の感染性 HSV-1 クローン (pYEbac102) と野生体ゲノムとの制限酵素 (BamHI) 切断パターンの比較。

のウイルス遺伝子を破壊してしまう場合が多い。また、遺伝子間領域に BAC を挿入したとしても、多くの場合、培養細胞での増殖や in vivo での病原性が低下する。これは、7 kbp と比較的大きな外来遺伝子である BAC の挿入によって、近隣のウイルス遺伝子の発現やウイルスゲノムの安定性、ウイルスゲノムのビリオンへのパッケージングに影響がでるためだと思われる。我々が開発した系のように、完全長のゲノムを有し、かつ、野生体の性状を保持するといった理想に近い系はほとんどなく、今後、各ヘルペスウイルスにおいて、改良が必要である。

大腸菌遺伝学を利用した ヘルペスウイルスゲノムへの変異導入。

(i) RecA 法

1989年、O'Conner のグループによって開発された方法である⁴²⁾。温度感受性の DNA 複製起点 (ts Ori), 正の選択マーカー, 負の選択マーカーを持つシャトルプラスミドを用いる。また、BAC は recombinase A (RecA) 陽性の⁴³⁾大腸菌に保持させる必要があるが、シャトルプラスミドに RecA の発現カセットを組み込めば、RecA 陰性の⁴⁴⁾大腸菌も使用できる。RecA 法の概要を 図 4 に示す。本法を利用すれば、欠失、挿入、点変異といったあらゆる変異導入が可能である。

我々は、RecA 法を用いて、HSV の ICP0 遺伝子に複数のアミノ酸置換を導入することを試みた。ICP0 は、様々な宿主細胞機構を制御する多機能因子である^{41, 43-46)}。また、ICP0 遺伝子は、HSV ゲノムのリピート配列に 2 コピー存在しているため、変異導入が困難とされている。RecA 法を用いた結果、比較的容易に両コピーの ICP0 遺伝子に目的の変異を導入することが可能であった³¹⁾。しかし、我々の経験では、標的遺伝子や変異の種類によっては、目的の変異導入が困難な場合もある。

(ii) RecE/RecT 法

大腸菌にクローニングされた BAC をより簡便に改変するために、1998年、Stewart のグループが報告した方法である⁴⁷⁾。本法の特徴は、RecA 法のように、シャトルプラスミドに目的の変異を含む DNA 断片をクローニングする必要がないことにある。つまり、PCR で増幅された直鎖状の DNA 断片で変異導入が可能である(図5)。一般的に、薬剤耐性遺伝子を目的部位に挿入後、Flp/FRT 法や Cre/loxP 法といった部位特異組み換え法によって薬剤耐性遺伝子を除去し、標的遺伝子に欠失変異を導入する。本法は、RecA 法に比して、著しく簡便かつ高率に変異導入が可能である。

前述のように RecA 法は標的遺伝子や変異の種類によ

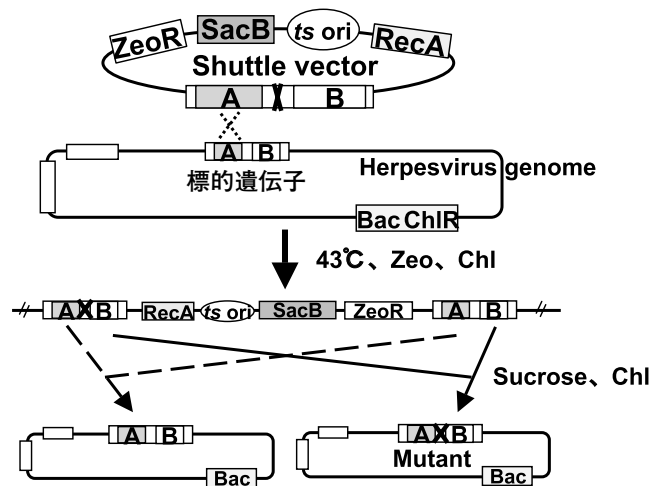


図 4 RecA 法。

我々の研究室では、シャトルベクターの正の選択マーカーとしてゼオシン耐性遺伝子、負の選択マーカーとして SacB 遺伝子を用いている(正の選択マーカーとは、選択剤存在下ではそのマーカー遺伝子がないと大腸菌が生存しえないもので、負の選択マーカーとは、選択剤存在下ではそのマーカー遺伝子が大腸菌に致死的に働くものである)。シャトルベクターには RecA の発現カセットも挿入されている。また、BAC はクロラムフェニコール耐性遺伝子を有している。目的の変異を導入した DNA 断片(変異両端の相同配列は 1 ~ 2 kbp が必要)をクローニングしたシャトルプラスミドを、BAC を保持する大腸菌に導入し、非許容温度(43°C)下でゼオシンおよびクロラムフェニコールを含む培地で選択する。すると、ts Ori を有するシャトルプラスミドは 43°C では複製ができないので、ゼオシン・クロラムフェニコール含有培地では BAC にシャトルベクターが組み込まれる。次に、その大腸菌を sucrose 添加培地で選択すると、SacB 遺伝子産物は致死的に働くので、SacB 遺伝子は除去される。こうして、理論上 50% の確率で目的の変異が導入された BAC を得ることができる。

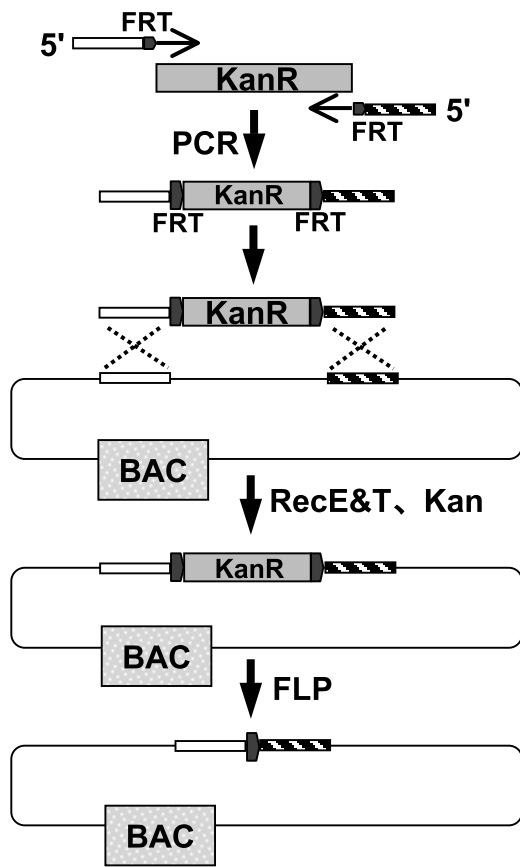


図5 RecE/RecT法。

我々の研究室では、薬剤耐性遺伝子としてカナマイシン耐性遺伝子を、また、部位特異組み換え法として Flp/FRT を用いている。まず、BAC を保持する任意の大腸菌に、RecE および RecT を誘導発現するプラスミドを導入する。目的の欠失変異の外側約 50b (相同配列)、FRT 配列、薬剤耐性遺伝子の両端約 20b からなるオリゴヌクレオチド対を用いて、相同配列および FRT 配列に挟まれた薬剤耐性遺伝子を PCR で増幅する。増幅された直鎖状の PCR 産物を、RecE/RecT 誘導下で BAC を保持する大腸菌に導入し、カナマイシンを含む培地で選択すると、目的の領域にカナマイシン耐性遺伝子が挿入される。その後、Flp recombinase を発現する温度感受性プラスミドを大腸菌に導入し、Flp/FRT の部位特異的な組み換えによりカナマイシン耐性遺伝子を除去する。カナマイシン耐性遺伝子除去後は、大腸菌を非許容温度で培養することによって Flp 発現プラスミドを大腸菌よりの除くこともできる。

では、変異導入が困難な場合がある。我々は RecE/RecT 法と RecA 法を組み合わせることによって、RecA 法による変異導入効率を高めることに成功している。標的としたウイルス遺伝子は UL13 遺伝子である。UL13 は全てのヘルペスウイルスで保存されているプロテインキナーゼであり、ある特定のウイルス遺伝子発現を制御していることが

知られている⁴⁸⁾。また、UL13 ホモログは宿主のプロテインキナーゼ cdc2 の標的部位をリン酸化することによって cdc2 を模倣する可能性が示唆されている⁴⁹⁻⁵²⁾。我々は、まず、RecE/RecT 法を用いて、UL13 欠損ウイルスを作製した。次に、RecA 法単独で UL13 領域に点変異および挿入変異を導入しようと試みたが、ICP0 の場合とは異なり、目的の変異を導入することができなかった。そこで、RecE/RecT 法によって、UL13 遺伝子領域にカナマイシン耐性遺伝子を挿入した BAC を基に、さらに RecA 法を施した。RecA 法によって目的の変異が導入されると、カナマイシン耐性遺伝子は除去され、大腸菌はカナマイシン感受性になる。この方法によって UL13 領域に点変異や挿入変異の導入が可能であった (田中ら、投稿準備中)。

RecE/RecT 法において、カナマイシン耐性遺伝子などの正の選択マーカーだけでなく、負の選択マーカー (SacB, rpsL, TetR 等) を同時に導入することによって、挿入や点変異の導入も理論上可能である。この系に関しては、Gene Bridges 社から 'Counter-selection BAC modification kit' が市販されている。また、ヒトサイトメガロウイルスにおいて、類似した系を利用したウイルスゲノムへの点変異導入が報告されている⁵³⁾。

(iii) トランスポゾンを用いた変異導入法

トランスポゾンは、可動性のエレメントであり、トランスポゼースの媒介により DNA にランダムに挿入される⁵⁴⁾。大腸菌やショウジョウバエをはじめとする様々なゲノムの改変に利用されている。トランスポゾンの DNA への挿入は、試験管内で行われる場合と大腸菌内で行われる場合がある (図6)。いずれの場合でも、トランスポゾンはランダムに挿入されるので、変異ウイルスライブラリーを作製することが可能である。古くから、ウイルスに化学的な処理を施すことによって変異ウイルスライブラリーを構築することは行われていた。しかしこの場合、変異がどの部位に導入されたかを同定するのは大変な手間がかかった。一方、トランスポゾンを用いた方法では、トランスポゾンエレメント内にプライマーを設定し、塩基配列の決定や PCR 法によってトランスポゾン挿入部位を容易に同定できる。この様なウイルスライブラリーは、各ウイルス遺伝子の培養細胞での必須性や、ある表現系の責任遺伝子の同定を行う際に強力なツールとなりうる^{55, 56)}。ウイルスライブラリーを作製する際、大腸菌より変異ウイルスゲノムライブラリーを抽出し、培養細胞にトランスフェクトする作業は手間がかかる。近年、BAC を保持した大腸菌に invasion と listeriolysin を発現させることによって培養細胞への侵襲性をもたせ、培養細胞に大腸菌を直接加えることによって、より簡便かつ効率的にウイルスゲノムライブラリーを培養細胞に導入し、ウイルスライブラリーを構築する手法も開

発されている⁵⁵⁾.

BAC クローンの応用

(i) アンプリコンへの応用

HSV ゲノムの Ori とウイルス DNA 切断・パッケージング配列 (pac 配列) および外来遺伝子の発現カセットを有するプラスミド (アンプリコンプラスミド) は, HSV 増殖に必要なウイルスタンパク質を trans に供給すると, ウイルス粒子にパッケージングされる. この非増殖型ウイルス粒子はアンプリコンと呼ばれ, 遺伝子治療ベクターとして多用されるようになってきている^{2,3)}. 従来, ウイルス増殖に必要なタンパク質を trans に供給するためには, ヘルパーウイルスが利用されてきた. しかし, この場合は, アンプリコンにヘルパーウイルスが混入する. 1998年, Strathdee らのグループおよび Fraefel のグループは, pac 配列を欠失した HSV の BAC クローンを利用することによってヘルパーウイルスフリーのアンプリコン作製系を確

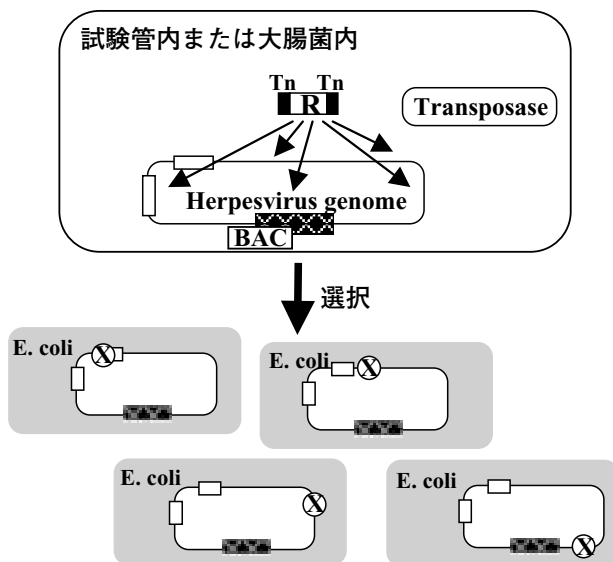


図6 トランスポゾンを用いた変異導入法.

トランスポゼース, トランスポゾン (薬剤耐性遺伝子が含まれている), ヘルペスウイルスの BAC クローンを試験管内で反応させた後, 大腸菌に導入する. すると, 変異ウイルスゲノムライブラリーが構築可能である. このトランスポゾン変異導入法はキット化されており, New England Bio Labs 等から市販されている. また, Koszinowski のグループは⁵⁶⁾, 薬剤耐性遺伝子を含むトランスポゾンエレメントとトランスポゼースの発現カセットを温度感受性のプラスミドに導入した. このドナープラスミドをヘルペスウイルスの BAC クローンを保持した大腸菌に許容温度下で導入し, さらに, 非許容温度・選択剤存在下で培養する. その結果, トランスポゾンが高率に BAC DNA に挿入され, ドナープラスミドも大腸菌から除去される.

立した^{29,30)}. Pac 配列を欠失した BAC クローンをアンプリコンプラスミドと共に培養細胞に導入すると, ヘルパーウイルスフリーのアンプリコンを得ることができる.

(ii) DNA ワクチンへの応用

ヘルペスウイルスの BAC クローンを, そのまま DNA ワクチンとして利用する試みも行われている. 増殖に必須なウイルス遺伝子に変異導入した非感染性 BAC クローンをを用いる場合と, 感染性だが弱毒化したヘルペスウイルスの BAC クローンをを用いる場合がある. いずれの場合も, BAC クローンの投与によってウイルスに対する防御免疫の誘導が報告されている^{32,35,57)}.

おわりに

ヘルペスウイルスの基礎研究やベクター開発に, BAC システムが導入された波及効果は大きい. 特に, 組み換え変異ウイルスの作製が困難であったヘルペスウイルス研究においては有効であり, 今後, これらのウイルス遺伝子の機能解析が急速に進むと考えられる. また, 従来は熟練のヘルペスウイルス研究者が中心であったヘルペスウイルスベクターの開発が, BAC システムの導入によって著しく簡便化された. これはヘルペスウイルスベクターの普及に大きく貢献すると考えられる.

最後に, BAC システムを基礎研究において利用する際の重要な注意点を述べる. BAC システムは, recombinase を過剰発現して遺伝子を改変することが多い. その際, recombinase の影響で, 目的の部位だけでなく, 予期せぬ部位に変異が導入されてしまうことは十分考えられる. 我々も予期せぬ部位への変異導入を複数経験している. あるウイルス遺伝子を改変し, 表現型が観察された際には, 必ず標的遺伝子の変異を修復した組み換えウイルス (リバートアントウイルス) を作製することが必須である. 表現型の責任遺伝子が, 変異を導入した遺伝子であると結論付ける前に, リバートアントウイルスが野生体の表現型を示すことの確認を忘れてはならない.

本総説における筆者らの研究は, 名古屋大学大学院医学系研究科ウイルス学分野 (西山幸廣教授), 国立感染症研究所感染病理部 (佐多徹太郎部長), 東京医科歯科大学難治疾患研究所細胞制御分野 (平井莞二教授, 山梨裕司教授) で行われました. プロメガ株式会社の香川裕之博士, 名古屋大学 (現, 感染症研究所) の野沢直樹博士には BAC システムの確立に協力していただきました.

文 献

- 1) Roizman B, Pellett PE. : The Family Herpesviridae : a brief introduction, p. 2381-2397. In D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B.

- Roizman, and S. E. Straus (ed.), *Fields Virology*, 4th ed. Lippincott-Williams & Wilkins, Philadelphia, P.A., 2001.
- 2) 川口 寧 : 単純ヘルペスウイルスを用いた 'human therapy' *Mebio* 21 : 24-33, 2004.
 - 3) 西山幸廣, 川口 寧 : ヘルペスウイルスの医学的利用—遺伝子治療と癌治療への応用 *ウイルス* 53 : 155-162, 2003.
 - 4) Post LE, Roizman B. : A generalized technique for deletion of specific genes in large genomes : alpha gene 22 of herpes simplex virus 1 is not essential for growth. *Cell* 25 : 227-32, 1981.
 - 5) Messerle M, Crnkovic I, Hammerschmidt W, Ziegler H, Koszinowski UH. : Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 : 14759-63, 1997.
 - 6) Brune W, Messerle M, Koszinowski UH. : Forward with BACs. New tools for herpesvirus genomics. *Trend. Genet.* 16 : 254-259, 2000.
 - 7) Britt WJ. : Infectious clones of herpesviruses : a new approach for understanding viral gene function. *Trend. Microbiol.* 8 : 262-265, 2000.
 - 8) Wagner M, Ruzsics Z, Koszinowski UH. : Herpesvirus genetics has come of age. *Trend. Microbiol.* 10 : 318-324, 2002.
 - 9) Adler H., Messerle M, Koszinowski UH. : Cloning of herpesviral genomes as bacterial artificial chromosomes. *Rev. Med. Virol.* 13 : 111-121, 2003.
 - 10) Van Zijl M, Quint W, Briaire J, De Rover T, Gielkens, A, Berns A. : Regeneration of herpesviruses from molecularly cloned subgenomic fragments. *J. Virol.* 62 : 2191-2195, 1988.
 - 11) Cunningham C, Davison AJ. : A cosmid-based system for constructing mutants of herpes simplex virus type 1. *Virology* 197 : 116-124, 1993.
 - 12) Shizuya H, Birren B, Kim UJ, Mancino V, Slepak T, Tachiiri Y, Simon M. : Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 : 8794-8797, 1992.
 - 13) Luckow VA, Lee SC, Barry GF, Olins PO. : Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J. Virol.* 67 : 4566-4579, 1993.
 - 14) Heintz N. : Bac to the future : the use of bac transgenic mice for neuroscience research. *Nature Rev. Neurosci.* 2 : 861-870, 2001.
 - 15) Copeland NG, Jenkins NA, Court DL. : Recombineering : a powerful new tool for mouse functional genomics. *Nat. Rev. Genet.* 2 : 769-779, 2001.
 - 16) Domi A., Moss B. : Cloning the vaccinia virus genome as a bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli* and recovery of infectious virus in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 : 12415-12420, 2002.
 - 17) Almazan F, Gonzalez JM, Penzes Z, Izeta A., Calvo E., Plana-Duran J, Enjuanes L. : Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 : 5516-5521, 2000.
 - 18) Borst EM, Hahn G, Koszinowski UH, Messerle M. : Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli* : a new approach for construction of HCMV mutants. *J Virol* 73 : 8320-8329, 1999.
 - 19) Yu D, Smith GA, Enquist LW, Shenk T. : Construction of a self-excisable bacterial artificial chromosome containing the human cytomegalovirus genome and mutagenesis of the diploid TRL/IRL13 gene. *J Virol* 76 : 2316-2328, 2002.
 - 20) Marchini A, Liu H, Zhu H. : Human cytomegalovirus with IE-2 (UL122) deleted fails to express early lytic genes. *J Virol* 75 : 1870-1878, 2001.
 - 21) Wagner M, Jonjic S, Koszinowski UH, Messerle M. : Systematic excision of vector sequences from the BAC-cloned herpesvirus genome during virus reconstitution. *J Virol* 73 : 7056-7060, 1999.
 - 22) McGregor A, Schleiss MR. : Molecular cloning of the guinea pig cytomegalovirus (GPCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome (BAC) in *Escherichia coli*. *Mol Genet Metab* 72 : 15-26, 2001.
 - 23) Delecluse HJ, Hilsendegen T, Pich D, Zeidler R, Hammerschmidt W. : Propagation and recovery of intact, infectious Epstein-Barr virus from prokaryotic to human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 : 8245-8250, 1998.
 - 24) Kanda T, Yajima M, Ahsan N, Tanaka M, Takada K. : Production of high-titer Epstein-Barr virus recombinants derived from Akata cells by using a bacterial artificial chromosome system. *J. Virol.* 78 : 7004-7015, 2004.
 - 25) Smith GA, Enquist LW. : Construction and transposon mutagenesis in *Escherichia coli* of a full-length infectious clone of pseudorabies virus, an alphaherpesvirus. *J Virol* 73 : 6405-6414, 1999.
 - 26) Smith, GA, Enquist LW. : A self-recombining bacterial artificial chromosome and its application for analysis of herpesvirus pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 : 4873-4878, 2000.
 - 27) Adler H, Messerle M, Wagner M, Koszinowski UH. : Cloning and mutagenesis of the murine gammaherpesvirus 68 genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *J Virol* 74 : 6964-74, 2000.
 - 28) Horsburgh BC, Hubinette MM, Qiang D, MacDonald ML, Tufaro F. : Allele replacement : an application that permits rapid manipulation of herpes simplex virus type 1 genomes. *Gene Ther* 6 : 922-930, 1999.
 - 29) Saeki Y, Ichikawa T, Saeki A, Chiocca EA, Tobler K, Ackermann M, Breakefield XO, and Fraefel C. : Herpes simplex virus type 1 DNA amplified as bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli* : rescue of replication-competent virus progeny and packaging of amplicon vectors. *Hum Gene Ther* 9 : 2787-94, 1998.
 - 30) Stavropoulos TA, Strathdee CA. : An enhanced pack-

- aging system for helper-dependent herpes simplex virus vectors. *J Virol* 72 : 7137-7143, 1998.
- 31) Tanaka M, Kagawa H, Yamanashi Y, Sata T, Kawaguchi Y. : Construction of an excisable bacterial artificial chromosome containing a full-length infectious clone of herpes simplex virus type 1 : viruses reconstituted from the clone exhibit wild-type properties in vitro and in vivo. *J Virol* 77 : 1382-1391, 2003.
 - 32) Meseda CA, Schmeisser F, Pedersen R, Woerner A, Weir JP. : DNA immunization with herpes simplex virus 2 bacterial artificial chromosome. *Virology* 318 : 420-428, 2004.
 - 33) White RE, Calderwood MA, Whitehouse A. : Generation and precise modification of a herpesvirus saimiri bacterial artificial chromosome demonstrates that the terminal repeats are required for both virus production and episomal persistence. *J. Gen. Virol.* 84 : 3393-3403, 2003.
 - 34) Schumacher D, Tischer BK, Fuchs W, Osterrieder N. : Reconstitution of Marek's disease virus serotype 1 (MDV-1) from DNA cloned as a bacterial artificial chromosome and characterization of a glycoprotein B-negative MDV-1 mutant. *J. Virol.* 74 : 11088-11098, 2000.
 - 35) Petherbridge L, Howes K, Baigent SJ, Sacco MA, Evans S, Osterrieder N, Nair V. : Replication-competent bacterial chromosomes of Marek's diseases virus : novel tools for generation of molecularly defined herpesvirus vaccines. *J. Virol.* 77 : 8712-8718, 2003.
 - 36) William Chang WL, Barry PA. : Cloning of the full-length rhesus cytomegalovirus genome as an infectious and self-excisable bacterial artificial chromosome for analysis of viral pathogenesis. *J. Virol.* 77 : 5073-5083, 2003.
 - 37) Mathony TJ, McCarthy FM, Gravel JL, West L, Young PL. : Construction and manipulation of an infectious clone of the bovine herpesvirus 1 genome maintained as a bacterial artificial chromosome. *J. Virol.* 76 : 6660-6668, 2002.
 - 38) Rudolph J, Osterrieder N. : Equine herpesvirus type 1 devoid of gM and gp2 is severely impaired in virus egress but not direct cell-to-cell spread. *Virology* 293 : 356-367, 2002.
 - 39) Zhou FC, Zhang YJ, Deng JH, Wang XP, Pan HY, Hettler E, Gao SJ. : Efficient Infection by a Recombinant Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Cloned in a Bacterial Artificial Chromosome : Application for Genetic Analysis. *J Virol* 76 : 6185-6196, 2002.
 - 40) Nagaike K, Mori Y, Gomi Y, Yoshii H, Takahashi M, Wagner M, Koszinowski U, Yamanishi K. : Cloning of the varicella-zoster virus genome as an infectious artificial chromosome in *Escherichia coli*. *Vaccine* 22 : 4069-4074, 2004.
 - 41) Kawaguchi Y, Tanaka M, Yokoyama A, Matsuda G, Kato K, Kagawa H, Hirai K, Roizman B. : Herpes simplex virus 1 alpha regulatory protein ICP0 functionally interacts with cellular transcription factor BMAL1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 : 1877-1882, 2001.
 - 42) O'Connor M, Peifer M, Bender W. : Construction of large DNA segments in *Escherichia coli*. *Science* 244 : 1307-1312, 1989.
 - 43) Hagglund R, Roizman B. : Role of ICP0 in the strategy of conquest of the host cell by herpes simplex virus 1. *J. Virol.* 78 : 2169-2178, 2004.
 - 44) Kawaguchi Y, Bruni R, Roizman B. : Interaction of herpes simplex virus 1 alpha regulatory protein ICP0 with elongation factor 1 delta : ICP0 affects translational machinery. *J Virol* 71 : 1019-1024, 1997.
 - 45) Kawaguchi Y, Van Sant C, Roizman B. : Herpes simplex virus 1 alpha regulatory protein ICP0 interacts with and stabilizes the cell cycle regulator cyclin D3. *J Virol* 71 : 7328-7336, 1997.
 - 46) Van Sant C, Kawaguchi Y, Roizman B. : A single amino acid substitution in the cyclin D binding domain of the infected cell protein No.0 abrogates the neuroinvasiveness of herpes simplex virus without affecting its ability to replicate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 : 8184-8189, 1999.
 - 47) Zhang Y, Buchholz F., Muyrers PP, Stewart F. : A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nat. Genet.* 20 : 123-128, 1998.
 - 48) Kawaguchi Y, Kato Y. : Protein kinases conserved in herpesviruses potentially share a function mimicking the cellular protein kinase cdc2. *Rev Med Virol* 13 : 331-340, 2003.
 - 49) Kawaguchi Y, Van Sant C, Roizman B. : Eukaryotic elongation factor 1delta is hyperphosphorylated by the protein kinase encoded by the U (L) 13 gene of herpes simplex virus 1. *J Virol* 72 : 1731-1736, 1998.
 - 50) Kawaguchi Y, Matsumura T, Roizman B, Hirai K. : Cellular elongation factor 1delta is modified in cells infected with representative alpha-, beta-, or gamma-herpesviruses. *J Virol* 73 : 4456-4460, 1999.
 - 51) Kawaguchi Y, Kato K, Tanaka M, Kanamori M, Nishiyama Y, Yamanashi Y. : Conserved Protein Kinases Encoded by Herpesviruses and a Cellular Protein Kinase Cdc2 Target the Same Phosphorylation Site In Eukaryotic Elongation Factor 1 δ . *J. Virol.* 77 : 2359-2368, 2003.
 - 52) Kato K, Yokoyama A, Tohya Y, Akashi H, Nishiyama Y, Kawaguchi Y. : Identification of protein kinases responsible for phosphorylation of Epstein-Barr virus nuclear antigen leader protein at serine 35 that regulates its coactivator function. *J. Gen. Virol.* 84 : 3381-3392, 2003.
 - 53) Britt WJ, Jarvis M, Seo JY, Drummond D, Nelson J. : Rapid genetic engineering of human cytomegalovirus by using a lambda phase linear recombination system : Demonstration that pp28 (UL99) is essential for production of infectious virus. *J. Virol.* 78 : 539-543, 2004.
 - 54) Berg CM. : Transposable elements and the genetic engineering of bacteria. In *Mobile DNA*. Berg DE, Howe M eds, pp879-925 ASM Press, 1989.
 - 55) Brune W, Menard C, Heesemann J, Koszinowski UH. : A ribonucleotide reductase homolog of cytomegalovirus and endothelial cell tropism. *Science*

- 291 : 303-305, 2001.
- 56) Burune W, Menard C, Odenbreit S, Messerle M, Koszinowski UH. : Rapid identification of essential and nonessential herpesvirus genes by direct transposon mutagenesis. *Nat. Biotech.* 17 : 360-364, 1999.
- 57) Suter M, Lew AM, Grob P, Adema GJ, Ackermann M, Shortman K, Fraefel C. BAC-VAC, a novel generation of (DNA) vaccines : a bacterial artificial chromosome (BAC) containing a replication-competent, packaging-defective virus genome induces protective immunity against herpes simplex virus 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 : 12697-12707, 1999.

BAC system: A novel method for manipulation of herpesvirus genomes based on the bacterial genetics.

Yasushi Kawaguchi^{1,2} and Michiko Tanaka³

¹Department of Virology, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya 466-8550,

²PRESTO, Japan Science and Technology Agency, 4-1-8 Honcho, Kawaguchi, Saitama 332-0012,

³Department of Pathology, National Institute Infectious Disease, 1-23-1 Toyama, Sinjyuku-ku Tokyo 162-8640.

E-mail: ykawagu@med.nagoya-u.ac.jp

Although methods for reverse genetics of herpesviruses have been established in early 1980s, the steps are laborious and time-consuming. In 1997, Dr. Koszinowski's group reported a novel approach for the construction of herpesvirus mutants, based on cloning the viral genome as a bacterial artificial chromosome (BAC) in *E. coli*. This technique allows the maintenance of viral genomes as plasmid in *E. coli* and the reconstitution of viral progeny by transfection of the BAC plasmid into eukaryotic cells. Any genetics modification of the viral genome in *E. coli* using bacterial genetics is possible, thereby facilitating the introduction of mutagenesis into herpesvirus genome. This 'BAC system' has opened new avenues for reverse and forward genetics of herpesviruses in basic research and in vector development for human therapy. Here we describe the principle of the 'BAC system' in herpesvirus researches.