

BmNPV 耐性細胞の作出に関する研究

応用分子生物学講座 応用分子昆虫学
大塚 大輔

カイコは 4000 年以上前から絹を産出する有用昆虫として飼育されてきた。また、近年においてはタンパク質の翻訳後修飾が哺乳類と類似していることや大量飼育法が確立していることなどから有用タンパク質の大量発現系としても注目を集めている。しかし、大量飼育において問題となるのはウイルス病や細菌病などの発生である。なかでも古来最も深刻な被害を与えるものの一つにカイコ核多角体病ウイルス (BmNPV) が挙げられる。BmNPV 耐性カイコの作出を目的として BmNPV の必須遺伝子に対する二本鎖 RNA (dsRNA) を発現するようなトランスジェニックカイコが作製された。これらのトランスジェニックカイコは BmNPV の増殖抑制は確認できたものの、実用的な耐性カイコの作出には至らなかった。その原因として組織による dsRNA 発現量の違い、ウイルスによる宿主遺伝子発現抑制 (shut off) が考えられた。そこで、これらの問題点を解消するための研究を行なった。

まず、組織による dsRNA 発現量の違いという問題点を克服するため RNA polymerase III 系 (pol III) のプロモーターである U6 プロモーターのクローニングを行なった。Pol III 系のプロモーターは一般的に組織特異性が低いことが知られている。そのプロモーターを用いて dsRNA 発現系を作製し、遺伝子発現抑制効果を調査した。その結果、今回作製したカイコ U6 プロモーターを利用した dsRNA 発現系は効率的に標的遺伝子を抑制することが可能であった。

次に、ウイルスによる宿主遺伝子発現抑制を回避するため、BmNPV 由来のエンハンサーである *hr5* の利用を試みた。ここではウイルス感染時に宿主遺伝子は shut off されるにも関わらずウイルスの遺伝子発現は活発に起こっている、即ち「ウイルス自身の遺伝子が shut-off を免れる」原因が *hr* のエンハンサー機能に依存するのではないかという作業仮説をたて、*hr5* の機能解析を行なった。その結果、*hr5* を付加した発現ユニットはウイルスによる shut off を回避できることが判明した。

最後に、U6 プロモーターを利用した dsRNA 発現システムと *hr5* を組み合わせた anti shut off dsRNA 発現システムをゲノムに導入した組換え細胞を作製した。これらの組換え細胞はコントロールの非組換え細胞と比較して、ウイルスの増殖を効果的に抑制することが可能であった。

今後、これらの発現システムを組み込んだトランスジェニックカイコを作製して実用レベルの BmNPV 耐性能を有するのかを調査する予定である。