

BmNPV 新規分離株 (H4 株) の fusion protein の機能解析

応用分子生物学講座 応用分子昆虫学分野

酒井真美

(背景と目的)

カイコ核多角体病ウイルス (*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus: BmNPV) は真核細胞における最も効率が良い外来遺伝子発現ベクターの 1 つとして利用されている。近年、本研究室で得られた BmNPV 新規分離株である H4 は、その標準株である T3 と比べて培養細胞における増殖性は極めて低いが、カイコ個体では逆に T3 よりも増殖性が高いことが判明している (角谷, 2006)。本研究では H4 と T3 の増殖特性の違いに関わる因子を明らかにするとともに、T3 のような培養細胞での高い増殖性と H4 のような個体での高い増殖性を合わせ持つ優れたウイルスベクターを構築する事を目的とした。

(方法)

まず、両株の増殖特性に関わる可能性のある因子として、ウイルスの感染に重要な役割を担うと考えられる膜タンパク質 GP64 と fusion (F) protein に着目し、これらの遺伝子の塩基配列を T3 と比較した。次に、BmN 細胞内における相同組換えを利用して両株の F protein 遺伝子を組換えたウイルス (rec T3-H4F protein、rec H4-T3F protein) を作製した。増殖特性を調査する目的で、作製した組換えウイルスを培養細胞およびカイコ個体に感染させ、定量的 PCR により培養上清中のウイルス DNA 量を、また SDS-PAGE によりウイルスタンパク質発現量の比較を行った。さらに、精製したウイルス粒子を用いて、プラークアッセイと GP64 抗体を用いたウエスタンブロットを行い、ウイルスの感染力価とウイルス粒子中に含まれる GP64 量を調査した。

(結果および考察)

GP64 と F protein の遺伝子構造解析を行った結果、T3 と H4 で GP64 は 6 アミノ酸、F protein は 12 アミノ酸の違いが認められ、F protein では、4 個のアミノ酸変異が重要領域に存在することが推定された。そこで、本研究では F protein に着目し、その機能とウイルスの増殖特性への関与について解析を進めた。F protein 遺伝子を組換えたウイルス rec T3-H4F protein および rec H4-T3F protein の培養細胞およびカイコ個体で増殖特性を調査し、T3、H4 と比較した結果、rec H4-T3F protein は培養細胞において T3 よりも高い増殖性を示し、カイコ個体においては H4 と同等の増殖性が認められた。これらのことから、本ウイルスは T3 と H4 の増殖特性を合わせ持つことが明らかとなり、また、F protein は培養細胞における BmNPV の増殖効率に大きく関わる因子であることが判明した。さらに詳細な調査を進めたところ、F protein はウイルスの粒子中に含まれる GP64 の量的調節とウイルスの感染力の決定に関与していることが示唆された。