

ノックアウトウイルスを用いた BmNPV の増殖機構解析

生物資源科学専攻 応用分子生物学講座 応用分子昆虫学 高ひとみ

1. 背景と目的

バキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (*Nucleopolyhedrovirus*; NPV) は、感染後期における多角体タンパク質 (Polh) の高発現能を利用した効率の良い遺伝子発現ベクター (BEV) として広く利用されている。NPV の中でも *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* (BmNPV) は現在真核細胞を用いた最も効率の良いタンパク質発現系の一つである。BEV の更なる改良と高次利用を進めるには、ウイルス増殖と Polh 高発現に関わる遺伝子群の特定とその相互作用の解明が不可欠であるが、現在不明な点が多い。先行研究から、BmNPV 全 141 遺伝子のうち 86 遺伝子が培養細胞での増殖に非必須である (Ono *et al.*, 2012) ことが判明している。一方、これら非必須遺伝子を単独でノックアウトした場合に Polh 発現量や増殖性が様々に変化することから、非必須遺伝子が複雑にウイルス増殖に関わっていることが推定される。本研究では、複数の非必須遺伝子を組み合わせてノックアウトし、Polh 発現量の変化を解析することで、それら非必須遺伝子間の相互作用について検討した。

2. 方法

BmNPV の非必須遺伝子をゲノム上でマップすると非必須遺伝子が連続する領域 (非必須遺伝子クラスター) が 10 か所存在した。そこで非必須遺伝子間相互作用の解析を進める上での最初のステップとして、10 か所の非必須遺伝子クラスターを λ red recombination システム (Datsenko and Wanner, 2000) と BmNPV バクミドシステム (Ono *et al.*, 2007) を利用してノックアウトした。各ノックアウトウイルスはカイコ卵巣由来 BmN 細胞にトランスフェクションし、各クラスターの欠失がウイルス増殖に与える影響を、Polh 遺伝子プロモーターの制御下に組み込んだ GFP の発現により評価した。さらに非必須遺伝子クラスターに含まれる *bm11*, *bm12*, *bm13*, *bm14* の 4 遺伝子については連続する 2 遺伝子をノックアウトしたウイルスを作製し、同様の調査により 2 遺伝子間の相互作用を解析した。

3. 結果と考察

非必須遺伝子クラスターノックアウトウイルス 10 種は、全く GFP 蛍光が観察されないもの (1 種) と EGFP 蛍光が観察され 2 次感染も確認できたもの (9 種) に分類できた。全く GFP 蛍光が観察できなくなったものでは、ノックアウトした遺伝子間に、ウイルスの生存 (増殖) 自体を左右する重大な相互作用が存在すると推定されたため、現在更に詳細な解析を進めている。一方、残りの 9 種については、それらの遺伝子を欠失してもウイルスの生存 (増殖) は担保されるものの、ウイルスの増殖効率の維持や向上に重要な意味を持つ相互作用が存在する可能性がある。そこで、1 つの非必須遺伝子クラスターを構成する 4 遺伝子 *bm11*, *bm12*, *bm13*, *bm14* を対象に、連続する 2 遺伝子間 (*bm11-bm12*, *bm12-bm13*, *bm13-bm14*) の相互作用を解析した結果、それぞれ相乗的、補償的、相加的な相互作用の存在が推定された。