

バキュロウイルスゲノム人工合成系の構築

生物資源科学専攻 応用分子生物学講座 応用分子昆虫学 石橋 大樹

1. はじめに

バキュロウイルス科に属するカイコ核多角体病ウイルス (BmNPV) をベクターとしたカイコ個体での外来タンパク質発現系は現在, 真核細胞における発現系の中で最も効率の良い系であると言われている (Miyajima *et al.*, 1987)。この系を更に発展させ, 高度利用を図る為には, 感染増殖機構の詳細な理解が必要であり, バキュロウイルスゲノムに多様な変異を導入可能な自由度の高いゲノム改変技術の確立が必要である。そこで本研究では, 近年開発の進んでいる DNA 断片のアセンブリ技術を用いた BmNPV ゲノムの人工合成系について検討した。

2. 方法

酵母, 大腸菌内で複製可能な EGFP 発現 BmNPV (BmGFP/Yori) を λ red recombination system (Datsenko and Wanner, 2000) を用いて作製し, この DNA を培養細胞にトランスフェクションしてウイルス産生能を調査した。次に, BmGFP/Yori を 39 の DNA 断片に細分化し, これらのアセンブリを 3 段階に分けて行った。第 1, 第 2 ステップでは酵母に DNA 断片を導入しアセンブリを行うことで 39 の DNA 断片を 6 種の DNA 断片に統合した。第 3 ステップではこれらの DNA 断片のアセンブリを酵母および *in vitro* の Gibson Assembly (Gibson *et al.*, 2009) を用いて行った。得られた人工合成 BmNPV ゲノム DNA を培養細胞にトランスフェクションして経時的に GFP 蛍光を観察し, 感染性ウイルス粒子の回収を試みた。

3. 結果と考察

まず, 作製した BmGFP/Yori についてウイルス産生能を有すること, および酵母内で複製可能であることが明らかとなった。酵母を用いた第 1, 第 2 ステップのアセンブリでは, 全てのコンストラクトにおいて各 DNA 断片が正確に連結されていることが PCR により確認された。第 3 ステップについてはまず酵母を用いて行ったが, 得られたコンストラクトの培養細胞へのトランスフェクション実験で GFP 蛍光が認められず, このコンストラクトは感染性ウイルス粒子の産生能を持たないと考えられた。この原因を調査したところ, 酵母に導入していない BmGFP/Yori バクミドを *Bgl* II 処理した際に見られた複数のバンドのうち, 2 本が酵母に導入した BmGFP/Yori において消失していることが判明した。このことから, BmGFP/Yori には酵母に対し毒性を持つ遺伝子が存在するため, この領域が欠失または変異したコンストラクトが選抜されたことで感染性ウイルス粒子の産生能を失った可能性が考えられた。そこで, 第 3 ステップのアセンブリを酵母ではなく *in vitro* の Gibson Assembly を用いて行ったところ, この問題が解消するという結果を得た。

4. まとめ

本研究でカイコバキュロウイルス (BmNPV) ゲノム人工合成系の基盤が構築された。今後はこの系を用いた逆遺伝学的解析により BmNPV の感染増殖機構に関する理解が飛躍的に深まることが期待される。