

カイコ核多角体病ウイルス (BmNPV) コア遺伝子 *bm67* の機能解析

生物資源科学専攻 応用分子生物学講座 応用分子昆虫学 川俣智美

1. はじめに

カイコ核多角体病ウイルス (*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus: BmNPV) は培養細胞やカイコ個体を用いた外来タンパク質発現ベクターとして注目されており、有用性を高めるためには約 140 個ある遺伝子の機能を明らかにする必要がある。特にバキュロウイルス科に属するウイルスが共通して保持する 37 個のコア遺伝子の機能を理解することは重要である。BmNPVorf67 (*bm67*) もコア遺伝子の 1 つだが、詳細な機能は分かっていない。*bm67* のノックアウトにより培養細胞において 2 次感染能が失われること (Ge *et al.*, 2008; Ono *et al.*, 2012) や、Bm67 タンパク質 (Bm67) がウイルス粒子の非構造タンパク質であり、感染細胞の宿主アクチンと相互作用すること (Chen *et al.*, 2007) が報告されている。本研究では先行研究の結果を確認するとともに、Bm67 アミノ酸配列中のヒト免疫不全ウイルス (HIV) 転写活性化因子 Tat とアミノ酸配列が類似する領域 (Rohrmann, 2013) に注目し、Bm67 の機能発現におけるこの領域の重要性について調査を行った。

2. 方法

大腸菌内で *bm67* ノックアウト BmNPV バクミドの *polh* 遺伝子座に *egfp* を挿入し、その後に本来の *bm67* や Tat と類似する領域を欠失あるいはアラニン置換した *bm67* (*bm67^{ΔTat}*, *bm67^{ΔTatA}*) をレスキューしたバクミドを作製した。各バクミドを BmN 細胞にトランスフェクションし、あるいはそれらの細胞から得られたウイルスをインフェクションして、EGFP の蛍光強度の測定および細胞培養上清に放出された出芽ウイルス (BV) 量の qPCR による定量を行った。コントロールとしては、野生型 BmNPV バクミドの *polh* 遺伝子座に *egfp* を導入した BmGFP バクミドを用いた。また、BmGFP, *bm67* ノックアウトウイルス、あるいは野生型の BmNPV をカイコ個体に接種し、これらのウイルスの増殖を qPCR により調査した。さらに FLAG タグ付加 Bm67, FLAG タグ付加 Bm67^{ΔTat}, あるいは FLAG タグ付加 Bm67^{TatA} を発現するバクミドを作製し、Cy5 でラベルした抗体を用いた免疫染色法により、ウイルス感染細胞内での Bm67 および各変異 Bm67 の局在を調査、比較した。

3. 結果と考察

bm67 のレスキューにより BmNPV の増殖能が完全に回復したことから、Bm67 が BmNPV の感染増殖で重要な機能を担っていることが示唆された。*bm67^{ΔTat}*, *bm67^{ΔTatA}* レスキューウイルスでは増殖能の回復がほとんど認められなかったことから、Tat 類似領域が Bm67 の機能発現に極めて重要であると考えられた。しかし Bm67 と Bm67^{ΔTat} および Bm67^{TatA} の間でウイルス感染細胞内の局在に明らかな違いは認められず、この調査からは Tat 類似領域が担う機能について新たな知見は得られなかった。一方、BV の定量および EGFP 蛍光観察の結果から、*bm67* ノックアウトウイルスが感染性 BV 生産能を持つことが初めて明らかになった。以上、本研究においてコア遺伝子 *bm67* は必須遺伝子ではなく、効率的な感染増殖のための重要なアクセサリ遺伝子であり、その機能発現に Tat 類似領域が重要であることが示唆された。