

## 2 本鎖 RNA を用いたカイコ細胞のバキュロウイルス耐性強化

生物資源科学専攻 応用分子生物学講座 応用分子昆虫学 服部 和澄

### 1. はじめに

バキュロウイルス科に属する *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) は、カイコに核多角体病と呼ばれる致命的な疾病を起こし、養蚕業に深刻な経済的被害をもたらす病原ウイルスである。近年、トランスジェニック技術を用いてカイコに BmNPV 耐性を付与する試みが国内外で行われているが、まだ実用レベルでの耐性付与に成功していない。本研究室においては、BmNPV の必須遺伝子である *ie-1* を標的とした 2 本鎖 RNA (*ie-1*dsRNA) をカイコ U6 プロモーターと BmNPV のエンハンサーである *hr5* 配列の制御下で構成的に発現する組換えカイコ細胞 (BmN-B10) が作出され、この組換え細胞では BmNPV の増殖 (培養液中に放出されるウイルス量) が非組換え細胞 (BmN) の 1%以下にまで抑制されることが報告された (大塚, 2012)。しかし、感染 BmN-B10 では細胞増殖が認められず、フローサイトメトリー解析において細胞周期が G2/M 期で停止していることが判明した (武内, 2015)。これまでに、細胞周期阻害に関わる BmNPV の必須遺伝子として *odv-ec27* が報告されている。そこで、本研究では、感染 BmN-B10 における *odv-ec27* の発現について解析を行うとともに、本遺伝子を標的とした dsRNA (*odv-ec27*dsRNA) によるカイコ細胞の BmNPV 耐性強化について検討した。

### 2. 方法

まず、BmNPV を感染させた BmN と BmN-B10 における *ie-1* および *odv-ec27* 転写産物量を経時的にリアルタイム定量 PCR 法によって測定した。次に、*odv-ec27*dsRNA をカイコ U6 プロモーターの制御下で発現するプラスミド (pGEM-U6-IRec27) を作製し、リポフェクション法で BmN 細胞に導入した。この細胞に BmNPV を感染させ、培養上清中のウイルス DNA 量をリアルタイム定量 PCR 法で測定した。同様に、BmN-B10 細胞に pGEM-U6-IRec27 を導入し、この細胞に BmNPV を感染させ、培養上清中のウイルス DNA 量をリアルタイム定量 PCR 法で経時的に測定した。

### 3. 結果と考察

感染 BmN-B10 における *ie-1* 転写産物量は感染 BmN 細胞の 10-20%程度に抑制されていた。感染 BmN-B10 において *odv-ec27* の転写産物量も 20-40%程度に抑制されていたが、経時的に増加する傾向が認められた。これらのことから、感染 BmN-B10 における *ie1* 発現阻害が *odv-ec27* の発現阻害には不十分であり、発現した *odv-ec27* が細胞周期停止を引き起こしている可能性が示唆された。pGEM-U6-IRec27 導入 BmN 細胞に BmNPV を感染させた場合、培養上清中のウイルス DNA 量は、コントロールの 45%程度に抑制された。さらに、pGEM-U6-IRec27 を BmN-B10 細胞に導入した場合にもウイルス増殖抑制効果が認められた。以上から、*ie1*dsRNA を構成的に発現する BmN-B10 において *odv-ec27*dsRNA を同時に発現させることにより、BmNPV 耐性を強化できることが示唆された。