

BmNPV ゲノム再構築系の確立とウイルス相同反復配列 (hr) の必須性解析

生物資源科学専攻 応用分子生物学講座 応用分子昆虫学 原田 直人

1. はじめに

カイコを宿主とするバキュロウイルスであるカイコ核多角体病ウイルス (*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus: BmNPV) は 128 kb のゲノムをもつ (Gomi *et al.*, 1999) 環状 2 本鎖 DNA ウイルスである。本ウイルスは、感染後期にポリヘドリンタンパク質を高発現するため、組換えタンパク質発現ベクターとして活用されている。より高機能なベクターの開発には BmNPV の感染増殖機構の詳細な理解と、自由度の高いウイルスゲノム改変技術の確立が必要である。そこで、本研究では BmNPV ゲノム再構築系の確立を行うとともに、この技術を用いて本ウイルスの複製起点と考えられている相同反復配列 (hr) の必須性を解析した。

2. 方法

BmNPV ゲノムを分割した 38 DNA 断片 (石橋, 2016) と、大腸菌での複製起点および多角体プロモーターの制御下に置いた EGFP 配列を含む配列 (EV) から Gibson assembly (Gibson *et al.*, 2009) により再構築 BmNPV ゲノム (rcBmGFP) を構築した。ただし、rcBmGFP は BmGFP (Ono *et al.*, 2007) と構造上区別できるように、EV は BmGFP の逆方向になるように連結した。また、rcBmGFP をゲノムとするウイルスの増殖をカイコ培養細胞 BmN を用いて解析した。次に、再構築に用いた 38 個のウイルスゲノム断片中の 5 断片に含まれる 7 個の hr を全て *lac Z* 部分配列に置換した rcBm Δ hr1-5 および 6 個の hr を置換した rcBm Δ hr1-4 を構築し、それらのウイルス増殖能を調査した。

3. 結果と考察

BmN 細胞へ rcBmGFP をトランスフェクション後 72 時間において細胞内に EGFP 蛍光が観察され、96 時間ではその周辺細胞への蛍光拡大が認められたことから、rcBmGFP の感染性ウイルス産生能が確認された。しかし、rcBmGFP の増殖は BmGFP と比べて遅延することが判明し、EV の方向性が増殖効率に影響する可能性が考えられた。次に、rcBm Δ hr1-4 および rcBm Δ hr1-5 を BmN 細胞へトランスフェクションした結果、BmGFP と比較して弱いながらも EGFP 蛍光が観察された。また、一つの蛍光細胞の周りに 4 ~ 10 個の弱い蛍光細胞が存在しており、感染性ウイルスの産生が示唆された。これらの結果は、hr が感染力増強には寄与するが、複製や感染性ウイルス粒子産生に必須ではないことを示しており、BmNPV ゲノム上の hr 以外の配列が複製起点として機能することが示唆された。

4. まとめ

Gibson assembly を利用した BmNPV ゲノム再構築系を確立し、この手法を用いて本ウイルスの増殖における hr の必須性を検討した。今後、本研究で確立した BmNPV ゲノム再構築系は、BmNPV の増殖機構解析や機能改変に大きく貢献することが期待できる。