

BmNPV の me53 遺伝子レスキュー実験と量的制御システム導入の試み

生物資源科学専攻 応用分子生物学講座 応用分子昆虫学 工藤 滉己

1. はじめに

バキュロウイルスの一種であるカイコ核多角体病ウイルス (BmNPV) はゲノムにコードする約140遺伝子を感染サイクルの中で段階的に発現する。その中でも、感染最初期に生産される ie 遺伝子の一つ me53 は他の遺伝子の転写を制御するだけでなく、感染性ウイルス粒子形成にもかかわる重要な遺伝子である。従来の研究では、遺伝子をノックアウトすることで機能を解析していたが、発現量に着目して解析を行なっている例はない。本研究では、まず me53 ORF 上流 500 bpを転写制御配列としたレポーター遺伝子を用い、異なる遺伝子座でも内在性のプロモーターと同様な転写活性を示すかを評価した。ついで、その結果をもとにme53 ノックアウトバクミド (Δ me53) のレスキューバクミド(me53Res)を作製し、ウイルスの増殖性が回復することを確認した。最後に、デグロン様配列を利用したSMASh (Chung et al., 2015) の系を構築して、me53タンパク質量の制御を試みた。

2. 方法

BmNPV バクミドの polh 遺伝子座に me53 ORF 上流500 bp とレポーター遺伝子 MetLuc を結合したバクミド (me53Luc) をカイコ卵巣由来細胞 BmN 細胞へとトランスフェクションし、me53 と metluc をそれぞれ特異的なプライマーで qRT-PCR を行った。次に、me53 ノックアウト BmNPV バクミドの polh 遺伝子座に egfp とORF 上流500 bp を含む me53 をレスキューしたバクミド(me53Res)を作製した。これと、me53 ノックアウトバクミド (Δ me53) ,野生型バクミド (BmGFP) をそれぞれトランスフェクションし、細胞内 EGFP 蛍光を蛍光顕微鏡で観察することで後発期遺伝子発現とウイルス増殖の有無を評価した。次に、デグロン様配列とme53 を融合させたバクミド (me53SMASh) をBmN 細胞にトランスフェクションして、タンパク質生産を抑制する薬剤である Asunaprevir が添加された培地で、EGFP 蛍光が Δ me53 と比べて増大するかを検証した。

3. 結果と考察

me53Luc の qRT-PCR の結果、トランスフェクション後3時間、6時間、9時間において、me53 と metluc の転写量に有意差はなく、me53ORF上流500bpが感染初期に必要な転写制御領域であると考えられた。ついで、この配列を用いてme53を発現するme53Res、me53を発現しない Δ me53 が発現するEGFPの蛍光を測定したところ、 Δ me53よりもme53Res の蛍光が強かった。また、顕微鏡での観察では me53Resでは一時感染細胞から周辺細胞への感染の拡大が確認できる一方で、 Δ me53では EGFP発現細胞が点状に偏在していた。これらの結果から、ORF上流500bpの発現制御領域、me53 ORF、ORF下流500bpを含む領域がme53 の機能領域として単離できたと同時に、me53 は二次感染に必要なことが示唆された。最後に、タンパク質レベルでの発現制御手法としてSMAShによるme53タンパク質制御を試みたが、Asunaprevir の添加の有無にかかわらず、me53SMASh は Δ me53の表現型をレスキューせず、構築したコンストラクトではme53の機能を果たしていなかった。ここでは、SMASh が機能しなかった理由についても議論する。