

# BmNPV 必須遺伝子ノックアウトウイルスの相補試験とリファクタリング

## への展開

生物資源科学専攻 応用分子生物学講座 応用分子昆虫学 石川 聡子

### 1. はじめに

カイコ核多角体病ウイルス (BmNPV) は約 140 個の遺伝子を有する大型 DNA ウイルスであり, 感染後後期においてポリヘドリンを高発現することから, タンパク質発現ベクターとして利用されている。ベクターの改良を進めるためにはウイルスの増殖機構を深く理解する必要があるが, 多くのウイルス遺伝子の機能に関して不明な点が多い。先行研究 (Ono et. al. 2012) ではこのウイルスのすべての遺伝子について単一遺伝子ノックアウトバクミドライブラリーの作製がされている。本研究では, BmNPV の増殖機構の詳細を解明するために合成生物学的手法を導入するために必要なウイルス遺伝子のリファクタリングをウイルス必須遺伝子について試みた。

### 2. 方法

先行研究の単一遺伝子ノックアウトバクミドライブラリーの中で感染後後期にポリヘドリン発現が確認されず, ウイルス増殖に必須な 8 個の遺伝子 (*p47*, *lef-8*, *lef-10*, *lef-9*, *lef-4*, *p143*, *lef-5*, *ie-1*) を対象とした。必須遺伝子の ORF 上流 500 bp から下流 500 bp までの領域を遺伝子機能単位と仮定し, ノックアウトバクミドのポリヘドリン遺伝子座位にレスキューしたバクミドを作製した。作製したバクミドをカイコ卵巣由来培養細胞である BmN 細胞に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ウイルス増殖能の回復を評価した。

### 3. 結果と考察

ノックアウトバクミドをトランスフェクションした BmN 細胞では先行研究の報告通り感染後後期に発現する EGFP 蛍光は確認されず, ウイルスの増殖能は確認できなかった。上記のように仮定した各遺伝子配列をレスキューしたバクミドをトランスフェクションした BmN 細胞ではすべてにおいて EGFP 蛍光が確認された。また, 増殖能の回復が著しく低かった *lef-4* レスキューバクミドを除いて, その蛍光を発する細胞は経時的に増加し, ウイルスの感染の拡大が観察された。このことから, 本実験で用いた遺伝子配列により各遺伝子が担う増殖に必須な機能を補い得ることが明らかになった。

### 4. まとめ

本研究によって, BmNPV 必須遺伝子について増殖に必須である遺伝子機能単位が抽出可能であることが示唆された。今後, リファクタリングが進み, BmNPV ゲノムの標的遺伝子と周辺遺伝子の機能単位を整理することができれば, 標的遺伝子と周辺遺伝子を独立に扱うことが可能になる。