

Title	バキュロウイルスの遺伝子間相互作用に関する研究
Author(s)	武田, ひとみ
Citation	北海道大学. 博士(農学) 甲第12708号
Issue Date	2017-03-23
DOI	10.14943/doctoral.k12708
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/68581
Туре	theses (doctoral)
File Information	Hitomi_Takeda.pdf



バキュロウイルスの遺伝子間相互作用 に関する研究

北海道大学 大学院農学院

生物資源科学専攻 博士後期課程

武田 ひとみ

謝辞

本論に入るに先立ち、本研究を進めるにあたって多くのご指導ならびにご助言を賜り、さ らに本論文を御校閲いただいた北海道大学大学院農学研究院 応用分子昆虫学分野教授 伴戸久徳 博士に厚く御礼申し上げます。

また、本研究を進めるにあたり数々のご助言を頂いた本分野 准教授 浅野眞一郎 博士、 本分野 助教 佐藤昌直 博士、北海道大学大学院農学研究院 植物病原学分野教授 増田税 博士、北海道大学大学院農学研究院 植物病原学分野 中原健二 講師に心より御礼申し上げ ます。

加えて、私の研究生活において公私ともに支えて頂いた本講座の先輩、同輩、後輩方には厚くお礼申し上げます。

2017年1月

高(武田) ひとみ

目次

I. 序論	1
II. 材料と方法	
1. 供試細胞	5
2. 供試ウイルスおよび大腸菌株	5
3. BmNPV 遺伝子のノックアウト	5
4. 遺伝子組換えバクミドの作製	6
5. リポフェクション法による培養細胞の形質転換	8
6. 各ノックアウトバクミドを導入した BmN 細胞の経時的な EGFP 蛍光観察	8
7. 細胞内外におけるウイルス DNA 定量	8
8. トランスフェクション上清中に含まれるウイルスの力価測定	9
9. BmNPV 全遺伝子産物の定量	9
III. 結果	
1. BmNPV Type-A クラスターノックアウトウイルスの解析	
a) BmNPV Type-A クラスターノックアウトウイルスの作製	21
b) Type-A クラスターをノックアウトしたウイルスの性状調査	22
2. bm11~bm14 領域における遺伝子間相互作用の調査	
a) ノックアウトウイルスと遺伝子復帰ウイルスの作製	22
b)ノックアウトウイルスと遺伝子復帰ウイルスをトランスフェクションした	細胞
における EGFP 蛍光強度の継時的調査	23
c) bm12 と bm13 のアミノ酸相同領域の検索と各遺伝子にアラニン置換を導入	した
バクミドの解析	23
d) bm12 と bm13 の両方を欠損した場合にウイルス増殖に与える影響	24
e) BacΔ12 と BacΔ13 トランスフェクション時のウイルス遺伝子のトランスク	リプ
トーム解析	25
f) bm67 あるいは lef-2 による Bacム12-13 の性状回復	26
IV. 考察	45
V. 参考文献	57

I. 序論

バキュロウイルスは主に昆虫を宿主とする大型の DNA ウイルスであり、鱗翅目に感染するアルファバキュロウイルスとベータバキュロウイルス、膜翅目に感染するガンマ バキュロウイルス、双翅目に感染するデルタバキュロウイルスの4 属に分類される。こ のうちアルファ、ガンマ、デルタバキュロウイルスは多角体を産生する特徴から核多角 体病ウイルス (Nucleopolyhedrovirus; NPV)、ベータバキュロウイルスは顆粒を産生する 特徴から顆粒病ウイルス (Granulovirus; GV) と呼ばれている。アルファバキュロウイル スに属している NPV は、更に Group I と Group II に分類される。NPV は細胞間感染を 担う Budded virus (BV) と個体間感染を担う Occlusion derived virus (ODV) という二種 類の形態をとる (Blissard and Rohrmann, 1990) が、Group I と Group II バキュロウイル スでは BV の細胞間感染能の要である膜タンパク質が異なっている (Pearson *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2009)。

NPV は宿主に感染すると宿主細胞核内に多数の ODV を包埋した多角体を形成し、多 角体の主成分であるポリヘドリン (Polh) を細胞の全タンパク質の 30%~50%に至るほ ど高発現する。この多角体タンパク質の高発現能を利用したバキュロウイルス発現ベク ター (Smith et al., 1983; Maeda et al., 1985) が開発され、すでに多様な分野で用いられて いる。NPV の中でも、カイコを宿主とするカイコ核多角体病ウイルス (Bombyx mori nucleopolyhedrovirus; BmNPV) とカイコ個体を利用した外来遺伝子発現システムは、真 核細胞における最も効率のよい発現システムの一つであることが知られている。

NPV の環状二本鎖 DNA ゲノムには 100 を超える遺伝子が存在し(Ayres *et al.*, 1994)、 それらの発現は前初期(immediate-early)、後初期(delayed-early)、後期(late)、後後期 (very-late)とカスケード状に制御されている(Friesen and Miller, 1986)。前初期・後初 期遺伝子はウイルスの DNA 複製が起こるよりも前に宿主の RNA ポリメラーゼ II によ って転写される(Friesen and Miller, 1986)のに対し、後期・後後期遺伝子はウイルス DNA 複製開始後にウイルス由来の RNA ポリメラーゼによって転写される(Fuchs *et al.*, 1983)。 バキュロウイルス遺伝子は転写制御(Guarino and Summers, 1986; Yoo and Guarino, 1994) や、ウイルス由来 RNA ポリメラーゼの構造形成(Guarino *et al.*, 2002)、ヌクレオカプシ ドの形成(Thiem and Miller, 1989; Vanarsdall *et al.*, 2006)、宿主遺伝子の制御(Nobiron *et* al., 2003) など多様な過程に関与している。これらの報告は、バキュロウイルス感染時 におけるウイルス遺伝子間あるいは宿主遺伝子とウイルス遺伝子間の複雑な相互作用 の存在を示唆しており、本ウイルスの増殖機構を深く理解するためには、その過程にお ける遺伝子間相互作用の解明が必要である。バキュロウイルスの遺伝子間相互作用に関 しては、Autographa carifornica multiple nucleopolygedrovirus (AcMNPV) において fp25 と p35 (Kelly et al., 2006)、ac16 と ac17 (Nie and Theilmann, 2010)が、Choristoneura fumiferana multiple nucleopolyhedrovirus (CfMNPV) において lef-3 と p143 (Yu and Carstens, 2012) のダブルノックアウトウイルスを用いた解析が行われているのみである。また Polh 発 現制御に関わる遺伝子間相互作用についてもいまだ不明な点が多く、今後さらに有用な BmNPV ベクター系を開発するためには、ウイルスの増殖過程およびそこに組み込まれ た Polh の高発現に関わる遺伝子間相互作用の解明が不可欠である。

NPV の遺伝子間相互作用を解析するにあたって、先行研究での大きな壁はウイルス ゲノムを効率良く改変するシステムが確立されていないことであった。従来、ウイルス ゲノムの改変には細胞内相同組換えが用いられてきたが、必須遺伝子をノックアウトす ることができない、組換え効率が悪いなどの問題があった。そこで本研究室ではウイル スゲノムの塩基配列が明らかになっている BmNPV T3 株(Gomi et al., 1999a)を用いて バクミドシステムを確立した(Ono et al., 2007)。バクミドはウイルスゲノム上に大腸菌 の複製起点や lacZ 遺伝子、さらにトランスポゾンの挿入部位を導入したもので、大腸 菌内でウイルスゲノムの複製が可能なだけでなく、トランスポゾンを利用して組換えウ イルスの作製が容易である。さらにλ red recombination システム(Datsenko and Wanner, 2000)を導入することで、効率的に単一あるいは複数遺伝子をノックアウトすることを 可能にした。これらのシステムを用いて BmNPV 全 141 遺伝子について単一遺伝子ノッ クアウトウイルスライブラリーを作製し、カイコ卵巣由来 BmN 細胞において性状解析 を行ったところ、86 遺伝子は BmN 細胞での Polh 発現と子孫ウイルスの生産にとって 必須でないことが明らかになった(これら 86 遺伝子を Type-A 遺伝子とする)(Ono et *al.*, 2012)。しかし、Type-A 遺伝子を複数欠損させた場合(すなわち Type-A 遺伝子間の 相互作用)の影響は調査されておらず、これらの遺伝子群がウイルス増殖過程において どのような働きをしているのかについては明らかではない。遺伝子間相互作用は一般的 に、複数の遺伝子による表現型が個々の表現型からは予測できない遺伝子間の創発であ ると定義されている (Hartman et al., 2001; Dixon et al., 2009)。このような状況を踏まえ、

本研究では Type-A 遺伝子を多様な組み合わせでノックアウトしたウイルスを作製し、 これらウイルスの増殖に必須ではない遺伝子群の増殖への貢献について解析を進める ことにした。

Type-A 遺伝子のノックアウトをどのような指針ですすめるかは重要である。ここで は、できるだけ多くの Type-A 遺伝子を同時に欠損させ、ウイルス増殖への影響を調べ ることにした。本研究室で既に確立されているバクミドシステムと λ-red recombination システムを利用すれば、連続している複数遺伝子を容易にノックアウトできる。そこで、 BmNPV の増殖における Type-A 遺伝子の役割を解明するための最初のステップとして、 Type-A 遺伝子が連続して存在する領域(Type-A 遺伝子クラスター)をノックアウトし たウイルスを作製し、これらの遺伝子の欠損がカイコ培養細胞におけるウイルス増殖に 与える影響を、Polh 遺伝子プロモーターの下流に組み込んだ蛍光タンパク質(EGFP) の発現を指標に解析を進めた。

その結果、Type-A クラスターの1つを形成する4つの遺伝子 bml1~bml4 を全てノッ クアウトしたウイルスはコントロールのウイルスよりも著しく低い EGFP 発現量を示 したことから、この4遺伝子間に存在する直接的あるいは間接的な相互作用がウイルス 増殖過程で重要な役割を担っている可能性が示唆された。bm11 は BmNPV の近縁種で ある AcMNPV の ac19 のホモログであり、機能は不明である。bm12 は actin rearrenement inducing factor (arif-1) のホモログであり、この遺伝子は BmNPV や AcMNPV が属して いる Group I NPV とほとんどの Group II NPV で保存されている (Rohrman, 2013)。arif-1は AcMNPV では初期遺伝子として発現し、イラクサギンウワバ卵巣由来 Tn-368 細胞 ではアクチンの再編成を引き起こすことが報告されている(Roncarati and Knebel-Mörsdorf, 1997)。しかし、lacZ遺伝子の挿入によりAcMNPVの arif-1のC末端半分を 欠損させても、Tn-368 細胞とヨトウガ卵巣由来 Sf 細胞の両方で目立った感染性の減少 は認められない (Dreschers et al., 2001)。bm13 は per os infectivity factor (pif) の一つで あり、pif を失った AcMNPV は培養細胞では感染性を保持しているが、個体における経 ロ感染能力を失うことが報告されている(Ohkawa et al., 2005)。Bm14 は Group II NPV の f protein のホモログであると予測されている。f protein がコードする F protein は GroupII NPV では膜融合タンパク質であり、ウイルスが細胞に侵入する上で必須である が、 GroupI NPV では GP64 がその役割を果たすため F protein は膜融合タンパク質とし

ては機能していないと考えられている。AcMNPV では f protein を欠損させた場合、培養細胞におけるウイルスの増殖と感染性には影響はないが、ノックアウトウイルスは野生型のウイルスよりも宿主幼虫を死に至らしめるまでの時間が長かった(Lung et al., 2003)と報告されている。これらの AcMNPV を使った遺伝子解析から bm11~bm14 は少なくとも培養細胞においては非必須であることを示しており、これは BmNPV の1 遺伝子ノックアウトウイルスの表現型とも一致する(Ono et al., 2012)。しかし、これらの報告からは、これら4遺伝子間の相互作用を予測することはできなかった。そこで、本研究ではさらに bm11~bm14 遺伝子間に存在する相互作用の詳細について調査した。

II. 材料と方法

1. 供試細胞

培養細胞としてカイコ (*Bombyx mori*) 卵巣由来の BmN 細胞を供試した。細胞は 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (biosera) を含む TC-100 培地 (Applichem) (Table 1) を用い、 26℃で培養した。

2. 供試ウイルスおよび大腸菌株

ウイルスは、北海道大学大学院農学院応用分子昆虫学分野で継代保存している Bombyx mori nucleopolyhedrovirus (BmNPV)標準株 T3 を用いた。また、Escherichia coli (E coli.) BW25113 株 (λ red recombination システム (Datsenko and Wanner, 2000)の相 同組換え酵素を発現するプラスミド pKD46 を含む)と BW25141 株 (クロラムフェニコ ール耐性遺伝子 (cat')の両端に FRT 認識配列を持つテンプレートプラスミド pKD3 を 含む)は E. coli Genetic Stock Center (米国イェール大学)にて保存されているものを用 いた。

3. BmNPV 遺伝子のノックアウト

各種 BmNPV ノックアウトバクミドの作製には、EGFP 発現 BmNPV バクミド Bmbac^{+egfp} (BmGFP) (T3株、 Ono *et al.*, 2012) を用いてλ red recombination システム (Datsenko and Wanner, 2000) により行った。

a) エレクトロポレーション用コンピテントセルの調整

BmT3DH10B^{+egfp}-pKD46 株のコロニーを試験管に用意したL培地1mlに植菌し、30℃で 16 時間振盪培養した。次に100mlのL培地にその小培養液を加え、30℃で OD₆₀₀が 0.1 から 0.15 になった時点で(~1.5 h)、10%アラビノースを無菌的に1 ml(培養液の 1/100量)加え、さらに培養を続けた。OD₆₀₀が 0.3 から 0.5 になったら(~1.5 h)、10 分間氷冷して遠沈管に分けて遠心分離(2.5 krpm, 15 min., 4℃)し、上清を除いて菌体を懸濁したら氷冷した蒸留水を加えて遠心分離(2.5 krpm, 15 min., 4℃)し上清を除くことで 菌体の洗浄を行った。再度氷冷した蒸留水での洗浄を行い、10%グリセロールでの洗浄 後に1 mlの 10%グリセロール(培養液の 1/100量)に菌体を懸濁しあらかじめ-80℃で 冷却しておいたエッペンチューブに 50 µl ずつ分注し、-80℃で保存した。

b) BmNPV 遺伝子のノックアウト

E. coli BW25141 株 pKD3 をテンプレートとし、欠損させる標的 BmNPV 遺伝子の 5' 非遺伝子領域(50 nucleotides (nts))と3'非遺伝子領域(50 nts)を含むプライマー(Table 2) で cat 遺伝子を PCR (95°C, 15 sec., 45°C, 15 sec., 72°C, 1 min./3 cycles, 95°C, 15 sec., 55℃ 15 sec., 72℃ 1 min./25 cycles) により増幅した。PCR 産物(約1 kbp, >500 ng) は Dpn I で処理し、テンプレートプラスミドである pKD3 を消化して、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて精製し、55℃で温めた 25µl の蒸留水で溶出し た。その後エレクトロコンピテントセル化した BmT3DH10B^{+egfp}-pKD46 にエレクトロポ レーション法により精製 PCR 産物を全量導入し、SOC 培地 (Table 3) を 1ml 加えて 30℃ で1時間、その後 37℃で4時間以上培養した。遠心分離(5,000 rpm, 3 min., 4℃)し上 清を少量残して除去し、菌体を懸濁したものを LB-Cm/Kan (Table 4) プレートに塗布し た。37℃で16時間以上培養し、EGFP 発現 BmNPV ノックアウトバクミドを含むコロニ ーを得た。標的 ORF の欠損は内部領域を増幅するプライマーセット(Yamagishi et al., 2003) および上流域 (519 nts)、下流域 (404 nts) を増幅するプライマーセット (CmR-up:5'-GAATCAGCTCCAGCCTACAC-3'またはCmR-down:5'-CTAAGGAGGATATTCATATG-3' と、標的 ORF の隣接遺伝子の適当なプライマー、Table 5) を用いた PCR によって確認 した。その後 37℃で 6 時間培養しアンピシリン感受性コロニーを選抜することで、へ ルパープラスミド pKD46 が除去されたコロニーを得た。各種バクミド DNA は Qiagen midi-plasmid kit (Qiagen) を用いて精製し、NanoDrop2000 (Thermo scientific) で濃度を 測定して 0.1 µg/µl に合わせた。

- 4. 遺伝子組換えバクミドの作製
- a) ドナープラスミドの作製
- a-1)遺伝子(bm12、bm13)復帰ウイルス作製用ドナープラスミドの構築

BmNPV のバクミドをテンプレートとし、*bm12 と bm13* の 5′側上流領域と 3′側下流 領域に設計したプライマー (Table 6)を用いて各遺伝子を増幅し、それぞれ pCRII-TOPO vector (Life Technologies) にクローニングした。各増幅産物の塩基配列を確認し、各々 を TOPO-*bm12*、TOPO-*bm13 とした。*TOPO-*bm12* は *XhoI と NotI* で処理し (*bm12*-XN)、 TOPO-*bm13* は *SacI と NotI* で処理 (*bm13*-SN) した。一方、pEGFP-1 (Clontech) をテン プレートとして EGFP 遺伝子の 3'末端に *XhoI* 認識配列または *SacI* 認識配列を付加する プライマー (Table 6) を用いて PCR を行い、それぞれの PCR 産物を pCRII-TOPO vector にクローニングした後 BamHI と XhoI (EGFP-X) または BamHI と SacI (EGFP-S) で処 理した。さらに pFastBac-1 を BamHI と NotI で処理し、bm12-XN、EGFP-X とライゲー ションすることで pFastBac-EGFP-bm12 を、bm13-SN、EGFP-N とライゲーションするこ とで pFastBac-EGFP-bm13 を得た。

a-2) *bm12* あるいは *bm13* の中心付近のアミノ酸配列 RNI を全てアラニンに置換したド ナープラスミドの構築

pFastBac-EGFP-*bm12*をテンプレートとして、RNI を AAA に変化させたプライマー (pFB-GFP-arif1-RNI→AAA_F: 5'-GCAGCAGCATACATAAAAAGGCGCGCCGAAGCC-3'、pFB-GFP-arif1-RNI→AAA_R: 5'-ACGCATCTCTTTTAATTGCACGTACAAATTCCAG C-3)を用いて PCR を行った。PCR 産物は *DpnI* 処理を行った後、セルフライゲーショ ンすることで pFastBac-EGFP-*bm12* (RNI→AAA)を得た。同様の操作を pFastBac-EGFP -*bm13* (PCR テンプレート)とプライマー (pFB-GFP-pif2-RNI→AAA_F: 5'GCAGCAGC ACTGTTTGACCGATTACTAGGCCGAGAGGTG-3'、pFB-GFP-pif2-RNI→AAA_R: 5'-ATT ACTCTGTCCGGGCATAATGCGGTC-3)を用いて行い pFastBac-EGFP-*bm13* (RNI→AA A)を同様に作製した。

a-3) *bm12* と *bm13* 両方をノックアウトしたバクミドに *bm67* を追加するためのドナー プラスミド

pFastBac-EGFP-bm67 は本研究室に保存してあるものを使用した(川俣、2016)。

b)遺伝子復帰バクミドの作製

BacΔ12-13 バクミドと Tn7 トランスポゼースをコードするヘルパープラスミド pMON7124 を含む大腸菌をコンピテントセル化した。これを氷中で融解させ、pFastBac-EGFP-*bm12*、pFastBac-EGFP-*bm13*、pFastBac-EGFP-*bm12*(RNI→AAA)、pFastBac-EGFP*bm13*(RNI→AAA)を100 ng 加え 20 分間氷中に静置した。その後 42℃で 45 秒間熱処 理をし、2 分間氷中に保持した後 SOC 培地を 1 ml 加えて 37℃で 4 時間以上振盪培養す ることでトランスポゾンによる転移反応を誘導した。遠心分離(2,000 rpm, 3 min., 4℃) 後、上清を少量残して除去し、菌体を懸濁したものに 70 µl の X-gal 溶液および 30 µl の IPTG 溶液を加えて LB-Kan/Gen/Tet プレート (Table 4) に塗布した。37℃で約 36 時間培 養し、白いコロニーを選抜することで *bm12* または *bm13* を復帰した BacΔ12-13/12res、 BacΔ12-13/13res バクミドを得た。組換えが起こったことの確認にはプライマー (pUC/M13Forward: 5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3'、 pUC/M13Reverse: 5'-AGCGGATAACAATTTCACACAGG-3') を用いた PCR で行った。

5. リポフェクション法による培養細胞の形質転換

12-well-plate (Iwaki) に 70-80%の密度 (1 well あたり 4×10⁵ 個) になるまで培養した BmN 細胞を無血清 TC-100 培地で 2 度洗浄した後、400 µl の無血清 TC-100 培地を加え た。一方、XtremeGENE9 (Roche) 3.2 µl と無血清 TC-100 培地 96.8 µl を混合したもの 100 µl を、バクミド DNA 0.8 µg (100 ng/µl のバクミド 8 µl に無血清 TC-100 培地 92 µl を加えたもの) と混合して室温で 30 分間静置し、形質転換用培地とした。これを上記 の 12-well-plate の培養細胞に加え、26℃で 6 時間培養後、形質転換用培地を全て抜き取 り、10% FBS を含む TC-100 培地 1ml を加えて培養を続けた。

6. 各ノックアウトバクミドを導入した BmN 細胞の経時的な EGFP 蛍光観察

4×10⁵ 個の BmN 細胞に各種バクミド DNA を 0.8µg ずつトランスフェクションし、 10% FBS を含む TC100 培地に交換した後、0 時間、24 時間、48 時間、72 時間、96 時 間、120 時間において励起波長 489 nm、蛍光波長 520 nm の条件で infinite M200PRO (Tecan) で検出した。

7. 細胞内外におけるウイルス DNA 定量

a) 細胞内 total DNA の抽出とウイルス DNA 定量

4×10⁵ 個の BmN 細胞に各種バクミド DNA を $0.8\mu g$ ずつトランスフェクションし、12 時間、18 時間、24 時間、48 時間、72 時間後において細胞を回収した。回収した細胞を 1ml PBS により 1 度洗浄し、500 µl の proteinase K buffer (Table 7) に懸濁した。細胞懸 濁液に Proteinase K を 100 ng ずつ加え、55℃で一晩インキュベートした。翌朝 RNase (1 ng/1µl)を 1µl 加え、55℃で 1h インキュベートした。反応液に対してフェノール・クロ ロホルム処理を 3 回行った後、エタノール沈殿によって細胞内 DNA を回収した。定量 PCR (qPCR) は以下のように行った。抽出した DNA 100ng に *Dpn*I 10U を加えた total 20µl の反応液を調製し 37℃で一晩インキュベートした。反応液のうち 1µl (DNA 5 ng) を 3.6µl の滅菌水、0.2µl ずつのプライマー溶液 (10µM)、5µl の SYBR Premix Ex TaqTM (Perfect real time) (Takara) を混合したものに加えて LightCycler® Nano (Roche) を用 いて PCR (95°C, 30 sec./1 cycle, 95°C, 4 sec., 60°C, 25 sec./ 40 cycles) 産物量を、SYBR Green の蛍光量で計測した。。ウイルス DNA の定量には、ウイルスゲノム中で最も多い 4 つの *Dpn* I 認識部位を含む *gp41* 中の約 100 bp を増幅するプライマー(qPCR-BmNPVgp41-Fw: 5'-CAACACGTAGTGATAGTAATCGCCG-3'、 qPCR-BmNPV-gp41-Rv: 5'-GCGTCGCTTTCCGCACATC-3')を用いた。また内部コントロールとしてカイコの *fibroin* L 中の約 100bp を増幅するプライマー(qPCR-Bm-fibroinLchain-Fw: 5'-CCAGGGCGACTATGCAAG-3'、 qPCR-Bm-fibroinLchain-Fw: 5'-TGACGTTAGCGGCTGCAC-3') を使用した。

b) 培養上清中におけるウイルス DNA 量の定量

各タイムポイントで培養上清を回収した。ウイルス DNA の定量は a)と同様に gp41 中の 100 bp を増幅するプライマーを用いた定量的 real-time PCR (qPCR) によって以下 のように行った。まず、回収した培養上清のうち 10 µl を等量の 0.1% SDS 溶液と混合 し、95℃で 5 分間熱変性を行い、氷中に 2 分間静置した後、遠心分離 (15,000 rpm, 5 min., 4℃)を行った。この上清 1 µl を用いて前述と同様に反応を行い、SYBR Green の 蛍光量を計測した。スタンダードには、段階希釈した既知量の BmGFP バクミド DNA を用いた。

8. トランスフェクション上清中に含まれるウイルスの力価測定

トランスフェクション後 24 時間、48 時間で培養上清を回収した。SeaPlaque[™] アガ ロースを 0.3%になるよう miliQ で調整しあらかじめオートクレーブにより滅菌した。 1well あたり 1×10⁶ 個の BmN 細胞を播種した 6-well-plate に段階希釈したウイルス液を それぞれ接種し、1 時間後ウイルス液を全て抜き取り 0.3% SeaPlaque[™] アガロース 5ml と 15% FBS を含む TC-100 培地 10ml を混和したものを細胞に重層した。26℃で 4~5 日 間培養した後、蛍光顕微鏡下で観察することにより、EGFP 蛍光を発するプラーク数を カウントした。プラークの数から培養上清中に含まれていたウイルス力価を算出した。

9. BmNPV 全遺伝子産物の定量

トランスフェクション後3時間、6時間、12時間、24時間、96時間でそれぞれ4×10⁵ 個の細胞を回収し、遠心分離(2,000 rpm, 3 min., 4℃)した後、上清を除いた。PBS (Table 8) で細胞を洗浄し、TRIzol Reagent(Invitrogen)を用いて total RNA を抽出した。その 後抽出した RNA 全量を DNase I 処理、エタノール沈殿後、50µl の蒸留水に溶解した。 そのうち RNA 10µg を、PrimeScriptTM RT reagent Kit(Perfect real time)(Takara)を用 いて調製した逆転写反応液(Table 9)に添加し、逆転写反応(65℃, 5 min., 42℃, 15 min., 95℃, 2 min.)を行った。*Bm*NPV 遺伝子の定量は遺伝子内の約 100bp を増幅するプライ マー(Table 10)を用いた定量的 real-time PCR(qPCR)によって行った(7-a 参照)。こ のとき反応には LightCycler 480 SystemII®(Roche)を用い、内部コントロールとして カイコの *tubullin* を用いた。

Table 1	Composition of TC-100 bro	oth	
	TC-100	20.57 g	
	NaHCO ₃	0.35 g	
	Adjust pH to 6.2 with NaOH		
	Add dH ₂ O to make up to 1 L		
	Then filtrate with $0.2 \ \mu m$ nitro	cellulose membrane	

Table 2Oligonucleotide primers used for PCR to generate knockout bacmids.

7-14_up	5'-GAAGCAAAAAATGACTATTCTTTGCTGGCTTGCACTGCTGTCTACGCTTACgtgtaggctggagctgcttc-3'
7-14_down	5'-ATTTTAATTATACATGTTTTATTTTATTCTTTCAATAATCATAGGATACAcatatgaatatcctccttag-3'
18-24_up	5'-AATGAACGAGGACACTCCTCCGTTTTATTTATCAACACGCGCGACAACTgtgtaggctggagctgcttc-3'
18-24_down	5'-ATAAAATAATTATTTAAATAAAAATGTTTTTATTGTAAAATACACATTGAcatatgaatatcctccttag-3'
32-38_up	5'-ACACGTAGAATTCAACAGACGACTAGAGTACGTAGGCACAATCGCCACAA gtgtaggctggagctgcttc-3'
32-38_down	5'-ATATATATGTATGCAACAACTTTTTAATATTCACATTAAAAAGTGCCAGGcatatgaatatcctccttag-3'
44-49_up	5'-TTAAACAAGCATTCTTATTTCAATAATTGGAGACAGTTGTATCCACAATTgtgtaggctggagctgcttc-3'
44-49_down	5'-TTACGCACCATATACGCATCGGGTTGATATAATTAATATGGATCAATTTGcatatgaatatcctccttag-3'
56-58a_up	5'-ATTGCTGTTGTTGTCAATATGTGGGAATCTATACGATGGCAAATACTGAAgtgtaggctggagctgcttc-3'
56-58a_down	5'-CATTATGTACAATAATATGGGTTTTTATTTTACAACATTTATGTATATGAcatatgaatatcctccttag-3'
92a-104_up	5'-CGCGATGTATATGTCTTACTTCATTAGACTTTAGATTTTAATTTGTGAACgtgtaggctggagctgcttc-3'
92a-104_down	5'-TAATTACAAAATATCTTAGGCGATATGATTATGTTCCAAATAGCGAGAGAcatatgaatatcctccttag-3'
106-108_up	5'-GCATCTTATATACCCGACCGCTATTTGGCCACGTGACACAAGGCACGTTGgtgtaggctggagctgcttc-3'
106-108_down	5'-GCTTATTTTGTTGTCAACGTTCCCGTGAGTATATTTTTGATATCGTTAACcatatgaatatcctccttag-3'
110a-115_up	5'-TAAAATGATAAATCTTTAATTATATTCTTTTATTATACATTAATTTTATgtgtaggctggagctgcttc-3'
110a-115_down	5'-TCTAATAAATATTTCATTATTATCGTTGTTTAATTTAAGTCATATATAACcatatgaatatcctccttag-3'
124-130_up	5'-ATATTTTATATTATTTTTGTCTTTTATTATCGACGAGGGGCCGTTGTTGAgtgtaggctggagctgcttc-3'
124-130_down	5'-ATTAATAAATCTTGAACGTAATTTTGTCTTTCAATTTTGTGACCTCTGGCcatatgaatatcctccttag-3'
132-134_up	5'-TTACAACGACGCGTGACGATTCGACGAAAGCGCGAAACAAAC
132-134_down	5'-TCTTGCACCAGCGGTCCCGATTCGACTAACGGTCGATTGGATGGCTTAATcatatgaatatcctccttag-3'
11-14_up	5'-AATGAATAGCGGCGACGACGACGACGACGACGACTACACTATTCAAACGCGCgtgtaggctggagctgcttc-3'
11-14_down	5'-ATTTTAATTATACATGTTTTATTTTATTCTTTCAATAATCATAGGATACAcatatgaatatcctccttag-3'
11-12_down	5'-AGTATTCGATACATATTGCCATTACTTAGTTGTTGAATTAAATATTCAAAcatatgaatatcctccttag-3'
12-13_up	5'-ATTACATTAATACTTTATATAATCAAAAATAATACTTTATATAATA
12-13_down	5'-ACTAACTACTGACGTAACATTTAAACGACTTATTGTTTGT
13-14_up	5'-GTTTGTATTTCTTTATATAGTATACCAGCCCTTTTATCAGGCATACTTACgtgtaggctggagctgcttc-3'

Table 3	Composition of SOC-br	oth	
sol. A	Bactotryptone	2 g	
	Yeast extract	0.5 g	
	2M KCl	125 µl	
	5M NaCl	200 µl	
	Add dH ₂ O to make up to 9	93 ml	
sol. B	1 M MgCl ₂	1 ml	
	1 M MgSO ₄	1 ml	
	0.4 M Glucose	5 ml	
	After autoclaving, add sol.	B to sol. A	
	Then filtrate with 0.2 μ m l	Nitrocellulose membrane	

Table 4	Composition of	LB-plate			
L-broth	Bacto tryptone	2	10 g		
	Yeast extract		5 g		
	NaCl		5 g		
	Add dH ₂ O to make	e up to 1 L and autocla	ive		
LB-plate	L-broth				
	1.5% agar				
	After autoclave,	add supplements if	necessary:	ampicillin	150 µl/ml;
kanamycin 50	µg/ml; chloramphe	enicol 25 µg/ml			

Table 5	Oligonucleotide primers used for PCR to confirm the knocked out region.
16-5	5'-ATGAATTCTGTTCACAC-3'
24-5	5'-ATGTCTTGCATATTAAC-3'
26-5	5'-ATGGACGGCTCTGTTGT-3'
27-5	5'-ATGAACGAGGACACTCC-3'
34-5	5'-ATGACAACGGTTGCTGT-3'
42-5	5'-ATGGATAATTACAAATT-3'
50-5	5'-ATGACGGACGTAGTTCA-3'
54-5	5'-ATGTGTTCGACCAAGAA-3'
55-5	5'-ATGAAAAAGTAGCGCT-3'
60-5	5'-ATGTTACCTAAATATTA-3'
69-5	5´-ATGTTGCAACAAAATT-3´
73-5	5'-ATGAACACGTCCGTGGA-3'
128-5	5'-ATGCTACTAGTAAATCA-3'
130-5	5´-ATGAACTTTTGGGCCAC-3´
133-5	5'-ATGTTTGCGTCGTTGAC-3'
139-5	5´-ATGAACCGTTTTTTCG-3´
147-5	5´-ATGACGCAAATTAATTT-3´
BRO-a-e-5	5´-ATGGCTCAAGTTAAAAT-3´
Bm111-5	5'-ATGTTGCAAAGCGTCCG-3'
1-300	5´-AATAAATTCTTGAACGA-3´
5-300	5'-TTCTTGCACCAGCGGTC-3'
6-300	5'-GTTCAGCATGTCGACGA-3'
14-300	5'-CAAAAACGCCGTGGCGC-3'
23-300	5'-GTTACTCGATCTGTTTT-3'
32-300	5´-GCAATCATCGGATAAAG-3´
40-300	5'-CTGTAGCATTTTTAAAT-3'
46-300	5'-ATTGGGATTTACCACCT-3'
62-300	5'-CTTCAATTTTTTGAGGA-3'
67-300	5'-GATCTGAATCATTTGAC-3'
71-300	5'-TGCAAACTGACGCCGAG-3'
109-300	5'-GCCCGCACCGATTTCGG-3'
111-300	5´-GTACATAAACACTATGA-3´
127-300	5´-GCAAAAATTTTGAGTCT-3´
128-300	5´-ATCCAGCGAGCCTCCGT-3´
131-300	5'-GCGACGACGGTAAAAGT-3'
132-300	5'-ATTCACGAATGCAACAA-3'
137-300	5´-AAAAAAAACGATTTATT-3´
148-300	5'-CCGCAATTGGCGCAATG-3'
BRO-d-300	5´-CAATTGAATCACGCCCG-3´
BRO-e-300	5'-GGAGCGCATGAACAACT-3'

Table 6	Oligonucleotide primers used for PCR to construct donor plasmids for
	generating rescue bacmids.
bm12-5	5'- CACGTCCACTGATTGAGACTCATT-3'
bm12-3	5'- CTAATTATAAACGGATAGTTTTCTCTC-3'
bm13-5	5'- CGTAGTCAATTTCCAAATACACGATAG-3'
bm13-3	5'- TTAAGATAACTGCCCTCTGACGTCA-3'
egfp-Fw	5'- TACCGCGGGGCCCGGGATC-3'
egfp-Rv-Xho	I 5´- GAGAGCTCGAGCGCCTTAAGATAC-3´
egfp-Rv-SacI	5´- GAGAGGAGCTCCGCCTTAAGATAC -3´

Table 7	Composition	of proteinase	K reaction buffer
---------	-------------	---------------	-------------------

20 mM Tris-HCl(pH 7.5)	700 µl
1 M MgCl ₂	10 µ1	
10% SDS	50 µl	
Add dH ₂ O to make	up to 1 ml	

Table 8	Composition of 10×PBS		
NaC	1	40 g	
Na ₂ I	$HPO_4 \cdot 12H_2O$	14.5 g	
KCl		1 g	
KH_2	PO ₄	1 g	
Add	dH ₂ O to make up to 500 ml		

Table 9	Composition	of reverse	transcription	reaction	solution
---------	-------------	------------	---------------	----------	----------

5×PrimeScript TM buffer	2 µl	
PrimeScript [™] RT Enzyme Mix I	0.5 µl	
Oligo dT Primer (50 µM)	0.5 µl	
Random 6 mers (100 µM)	0.5 µl	
total RNA	500 ng	
Add dH ₂ O to make up to 10 μ l		

Gene name		Antisense primer		Sense primer	
Name	Direction	Primer name	Sequence	Primer name	Sequence
polyhedrin	+	L33180_000568_AW_020	GTTGGTGTACTCGCTGTGGA	L33180_000478_CW_020	TACGTGGGCATGAACAACGA
orf1629	-	L33180_000967_CW_020	TTTTGCAAACCGATGGCTGG	L33180_001031_AW_020	ATTTGGCAAGTCGTGTGGTG
3	+	L33180_002863_AW_020	ATACACGCGATCGAGTGCTT	L33180_002770_CW_020	GAAGCGCTCAACGATTTGCA
Orf_4	-	L33180_003579_CW_020	ATTTCGGCAATTACACGCGG	L33180_003700_AW_020	CCGAATTGGTGCCTCGTTTG
Orf_5	-	L33180_004835_CW_020	GTTTGATGCGGTCGTCGATG	L33180_004926_AW_020	AGCAAAAATGGCACGGTGAC
lef_1	-	L33180_005667_CW_020	CTGTACGGTGCGCGTATTTG	L33180_005807_AW_020	CATTGTGTGAGAGAGGCCGT
egt	+	L33180_007733_AW_020	AAGCGCATATAACTCGGCCA	L33180_007640_CW_020	ACCGTTTCCAGCGATCAACT
Orf_7a	+	L33180_008088_AW_020	GCGCGTGTGAACAGAATTCA	L33180_008010_CW_020	CTCACCAACCAGAGCAGTCA
bv_odv_e26	+	L33180_008604_AW_020	CGCTAGTGCCTGTCGATCTT	L33180_008505_CW_020	GTAAGGAGACGTTTGGCCGA
Orf_9	+	L33180_009083_AW_020	TCACTTTACGATCGGCGACA	L33180_009022_CW_020	ATGCCTTACGTCATCGGACC
Orf_10	-	L33180_009758_CW_020	CGTTCAAAACGCGTTGCAAC	L33180_009839_AW_020	CGGACCGCTGCATCAAAAAT
Orf_11	+	L33180_010637_AW_020	TCAAATTGCACGCGACCATT	L33180_010495_CW_020	TATTCAAACGCGCACGCAAA
arif_1	-	L33180_011382_CW_020	GGCTGTGAAGTCAAGTCCGA	L33180_011459_AW_020	CCTTCTACCACCACCACCAC
Orf_13	+	L33180_013475_AW_020	CTGCCCTCTGACGTCATTGT	L33180_013349_CW_020	GACGCAGCTTTTGCCTTTGA
Orf_14	+	L33180_015363_AW_020	ATAGGAACGTTGCAGCGACA	L33180_015233_CW_020	TCGGCGTCTCAGCATTCTTT
pkip	-	L33180_015938_CW_020	TTTTCACTTTTGGGCGCGTC	L33180_016021_AW_020	TTGTGCATAGCGGCCGATAT
dbp_Orf_16	-	L33180_016474_CW_020	CCGACGAATCAACATGTCGC	L33180_016534_AW_020	GTGTGCATTCATTTGCCGGA
Orf_17	+	L33180_017397_AW_020	CTGATAGAGCCCACGTCCAC	L33180_017337_CW_020	CGTTTTGAAGCGGTTGAGCA
iap1	+	L33180_018166_AW_020	TGCCAGGCGTCTTCGTTAAT	L33180_018023_CW_020	AATTTTTGGCCTGCCGCATT
lef_6	+	L33180_018750_AW_020	GGTCCGTTTGACTGTTGTGC	L33180_018630_CW_020	CGTGCCTACAGACAGGTGTT
Orf_21	-	L33180_019548_CW_020	AGTTCAACAGCCCCTCTTCG	L33180_019631_AW_020	CGCCACTCAACAAGAACACG
bro_a	-	L33180_021048_CW_020	AATACCACGTCGGACGAACC	L33180_021141_AW_020	TGCGTTAGGCGGAGAAAAGT

Table 10Oligonucleotide primers for qPCR.

Orf_22a	-	L33180_021910_CW_020	CGCTGAGGGACCCTTTCAAT	L33180_021990_AW_020	GTCACCCTACTCCCAACAGC
sod	+	L33180_022304_AW_020	AGCGAATTGTAGCCAACCGA	L33180_022158_CW_020	GTGCACGAATATGGCGACAC
fgf	+	L33180_023801_AW_020	TACCGTCGTTCTTCAGTGCC	L33180_023666_CW_020	GTGGCCAACTGTACGGATCA
Orf_25	-	L33180_024721_CW_020	GCTGAGATTGCGCGTTTGAT	L33180_024798_AW_020	GGCAACAAGGCAGACTGTTG
28	+	L33180_025189_AW_020	CTTCCAATTGTTTGCCCGCA	L33180_025058_CW_020	GACGGGCAAAACCATTACCG
39k	-	L33180_025691_CW_020	GTAAGCACCGCAGTCTGTCT	L33180_025756_AW_020	TCGTCGTCTTCAAGCGACAA
lef_11	-	L33180_026326_CW_020	CGCTCAAACGACACGATGTC	L33180_026435_AW_020	CCCGAAGCGAAATACAAGCG
Orf_29	-	L33180_026750_CW_020	GTGTACGTGTTGGGTTTGGC	L33180_026844_AW_020	GGAAAGACGACGGTGTCACT
p43	-	L33180_027547_CW_020	TCTCGGTTGGCAGCATTTCA	L33180_027668_AW_020	GCCGTAACGAATGCTTTGCA
p47	-	L33180_028388_CW_020	GAGCGGCGCGTTTTATTGAA	L33180_028520_AW_020	TGCTGTACACAATCGTGGCT
Orf_32	+	L33180_029912_AW_020	GTACATGTTAGCTGTGCGCG	L33180_029792_CW_020	GAAGAAAGTCTGGCGCAACG
gta	+	L33180_031409_AW_020	GCCGCCGCACTTAATTGAAA	L33180_031334_CW_020	TTGGCCGAGACGACATTCAA
Orf_34	+	L33180_031791_AW_020	TTGTTGGTAAAACGCAGCGG	L33180_031691_CW_020	CACCCGATACGCTACTTGCT
Orf_35	+	L33180_032213_AW_020	CGGTGCACAAACACGAATGT	L33180_032120_CW_020	CTGTCGACAGTGCATGCATG
Orf_36	+	L33180_032477_AW_020	ATAGGAGTCGTCGTCGTCGT	L33180_032413_CW_020	TGCAAAAGTCAACGAACGCA
odv_e66	+	L33180_034685_AW_020	AATCCGAATGACCCTCGACG	L33180_034567_CW_020	ACCGTTCGGAGTCCCAATTC
lef_8	-	L33180_035966_CW_020	TATTTGGGCGTGCGTACCAT	L33180_036053_AW_020	TGTGGCATTCACGGTCAGAA
Orf_40	+	L33180_039143_AW_021	CCATTTCTGTTTTGGCCACGT	L33180_039071_CW_020	ACGACGACGCTCGATTTACA
Orf_41	-	L33180_039604_CW_020	AGGCAAAATGCGTCGCAATT	L33180_039673_AW_020	GCAAGACGTCATGGACAACG
Orf_42	+	L33180_040007_AW_020	GATCTCGAGTGTGTTCGCGA	L33180_039858_CW_020	AACGTGCACAACAGAATGCC
lef_10	+	L33180_040402_AW_020	TATCCAGCATTGCATCGGCT	L33180_040332_CW_020	CCTCTGTGCCTCGGTGAAAT
vp1054	+	L33180_040402_AW_020	TATCCAGCATTGCATCGGCT	L33180_040332_CW_020	CCTCTGTGCCTCGGTGAAAT
vp1054	+	L33180_041389_AW_020	GTGTGCGTGCAGACCAAAAT	L33180_041269_CW_020	GCGAGTTTACGCGAAAACGT
Orf_44	+	L33180_041650_AW_020	AGTGTGCTGGCCCACTTTAT	L33180_041548_CW_020	TCGTCGTCATCGTCATCGTC
Orf_45	+	L33180_041885_AW_020	CCGATCGGCGAATTTTGTGT	L33180_041807_CW_020	TTTGTGACGTCGTCCGAAGT

Orf_46	+	L33180_042637_AW_020	GGCCGAGGTATCCAGTTACG	L33180_042544_CW_020	AATCGTGGCCAAGAAGCTGA
Orf_47	-	L33180_042875_CW_020	CGACTCGCCGTTTACGACTA	L33180_043024_AW_020	GGACGACATTGACGAAAGCG
fp	-	L33180_043799_CW_020	TCGCGTCTCACCATAACACC	L33180_043862_AW_020	CGCTCTGTTGCCGTTTTACA
lef_9	+	L33180_045564_AW_020	TGTCTACAAATTGGCCGCCT	L33180_045447_CW_020	TCGCCAGTTCAAACGCTAGT
Orf_51	+	L33180_046139_AW_020	AACTACGCTGTCTACGAGCG	L33180_046036_CW_020	AGCCGATGAAATTAGGCGGT
gp37	-	L33180_046752_CW_020	TGAATCGCCCGGATTTGGAA	L33180_046845_AW_020	TCAAACTGGGATCGTCGCAA
56	-	L33180_047829_CW_020	TGGATCGAACAAACGCAACG	L33180_047970_AW_020	GTGGCTCGGCATTGTAGAGA
Orf_54	+	L33180_052639_AW_020	TCGTCGCATTGTTGCTTCAA	L33180_052570_CW_020	ACGAGATCCGGCTTTCAACA
lef_3	-	L33180_053103_CW_020	TGCTCGAGTCGGAAGAGGTA	L33180_053253_AW_020	ACAAACGCGTTGCTTCGTAC
Orf_56	+	L33180_054187_AW_020	AAACGTGTTGTCAAGCGGTG	L33180_054122_CW_020	GTTCGTTAGCGTGGAGGGAA
Orf_57	+	L33180_055086_AW_020	AATTGGCAGGCCGAGAAGAA	L33180_054988_CW_020	CGCGTTCGAACACAAAACGA
iap2	+	L33180_055763_AW_020	TGGCATCCGGAACAACGTAA	L33180_055686_CW_020	GTGGTCGTTGACATGTTGGC
Orf_59	-	L33180_056479_CW_020	CACCATGGCGTTGCTTTCAA	L33180_056549_AW_020	GCCGGGCAAACAGTTTGATT
Orf_60	-	L33180_057095_CW_020	TTAAGCCGTCCACCGTGTAC	L33180_057171_AW_020	GCAACAAGCGGCGATGATAA
Orf_61	-	L33180_057780_CW_021	TCCGGATAGACTTGTTCGCAC	L33180_057844_AW_020	CCACTAAGGTGTCCGTGGTC
Orf_62	-	L33180_057958_CW_020	GCGCTTGCTCGATTTCCAAT	L33180_058072_AW_020	TCATTATCGTCGTCAGCCCG
vlf_1	-	L33180_058277_CW_020	TTCCTCTTCGCTGCTCGTTT	L33180_058398_AW_020	CAATAGCGGCGTGCCTTTAC
Orf_64	-	L33180_059591_CW_020	TTGAGCGCCAATTTCAACGG	L33180_059654_AW_020	GCCATACTATCGGTTGGGCA
Orf_65	-	L33180_059853_CW_020	GGCGCCTTGTTTGTTCGAAT	L33180_059982_AW_020	GCGACGACTCTGTACACCAA
gp41	-	L33180_060388_CW_020	CGTCAATCACGGCGTTGATC	L33180_060479_AW_020	ACTCTGCCGCCAAACATACA
Orf_67	-	L33180_061379_CW_020	TGATGCGCCGACACAAAATG	L33180_061523_AW_020	CTATACACACCGACGGCCTC
Orf_68	-	L33180_061928_CW_020	TTTACAGCAGCGTCCGTCTT	L33180_062067_AW_020	GCAATTTGGTGCAAAACGGC
p95	+	L33180_064673_AW_020	ACACGCCATGTATTGGTCGT	L33180_064525_CW_020	TTGTAGATCCGCGTACGACG
p15	+	L33180_066481_AW_020	ATCGCCTTTACGCCCTTGAA	L33180_066384_CW_020	GCTTGCAGCCTCAAAGCAAA
p30	-	L33180_067061_CW_020	TGTTGAGCTGCGTTTGTTCG	L33180_067142_AW_020	CTGACGACACCATGCTGTCT

vp39	-	L33180_067905_CW_020	TCCTCCGTGTCGATTTGCAA	L33180_068007_AW_020	AGGTGGTGTTGGCGATCAAT
lef_4	+	L33180_069874_AW_020	AGACCGTTCAATGGCCCATT	L33180_069730_CW_020	TTACATGACCGTGTCCGTGG
Orf_74	-	L33180_070283_CW_020	GTAGGTGTTGGTGGAGGTGG	L33180_070377_AW_020	ACGACACTCTGCGTCCAAAT
Orf_75	-	L33180_070524_CW_020	CATGCGTTCGTAATGAGCGG	L33180_070654_AW_020	TGCGGCTGTGTCGAACAATA
Orf_76	+	L33180_071617_AW_020	GGCCGTGATAAACTGTTCGC	L33180_071475_CW_020	GGTGCTTAAAAACGAGGGCG
odv_e25	+	L33180_072406_AW_020	AGGCGGTTTGGTCAGCATTA	L33180_072316_CW_020	ACTGCACTCTGGTGTACACG
82	-	L33180_072852_CW_020	GTCGTTGTTCAGCAGCGTTT	L33180_072937_AW_020	GCGTTTGTTTTTGTCGCACG
Orf_79	+	L33180_076647_AW_020	TTGTCCAAGTCCACGTAGCC	L33180_076546_CW_020	GATCACACGCTCGTTCTCGA
bro_b	+	L33180_077458_AW_020	CGCGCTTGATGTGTTCGAAA	L33180_077320_CW_020	ACGACCAGATGCAGTACGTG
bro_c	+	L33180_078483_AW_020	CGGTCATAGTGGAGCCGATC	L33180_078336_CW_020	ACTACGTGCCCAACTCCATG
38k	-	L33180_079055_CW_020	TCTCGCATCGAGTGTGCTAC	L33180_079130_AW_020	ATTGCACGAAATGGGTTGCG
lef_5	+	L33180_080339_AW_020	CACACATCCGACAGTAGCGA	L33180_080273_CW_020	CAGTCGAAAGCCAAACGAGG
88	-	L33180_080366_CW_020	TTCTGTAACTTCGGCGGCTT	L33180_080432_AW_020	CGGGTAGACCTCGCACATAC
Orf_85	-	L33180_080865_CW_020	AACGGAATTTCGGTACCGCT	L33180_080967_AW_020	CGACAAACGCACCACTCTTG
Orf_86	-	L33180_081728_CW_020	TGTCGTAAACGCTCCCCAAA	L33180_081847_AW_020	TACTCAATCTGTCGGAGCGC
Orf_87	-	L33180_082254_CW_020	GACAAACGTTGCGGAGTTCC	L33180_082352_AW_020	GTCCACCGTATTGATCGGCT
vp80	+	L33180_085264_AW_020	GTGTTGCGCGTCTTGTCTTT	L33180_085169_CW_020	CACAGCGTGTTGGTTATGCG
he65	-	L33180_085725_CW_020	TCGCCTACGTTGAACAGCAT	L33180_085839_AW_020	TGCCAAAGGATTGTTGCAGC
Orf_90	+	L33180_087136_AW_020	TGATGTTCGTCCGTGACTGG	L33180_087012_CW_020	TCGAGGTGGCCATTAAACGT
Orf_91	-	L33180_087660_CW_020	AGTTGATCGCCTTCAGTCGG	L33180_087724_AW_020	GCACCGGCAACAATATCGTC
Orf_92	-	L33180_087798_CW_020	TGTACTTGATGGGCGTCACC	L33180_087921_AW_020	CGTCCAACAACGCGTTTGAT
Orf_92a	-	L33180_089022_CW_020	CAATAGGGTATCGGGCACGT	L33180_089093_AW_020	TCGTAGTGAACAACGGACGT
Orf_93	-	L33180_089284_CW_020	TTGCACATCAGCTTGCGAAC	L33180_089363_AW_020	AGCCGACAACGTTACACGAT
Orf_94	-	L33180_090322_CW_020	ACGCTCTGTAATCGCCAACA	L33180_090466_AW_020	GCTTGGGCAACGTGATGTTT
Orf_95	-	L33180_091624_CW_020	ACACGACAAAATCTCCGCCT	L33180_091727_AW_020	GCCACCAACGCTTTGCTAAA

Orf_95a	-	L33180_092024_CW_020	GTGTGGTGTGACGCACAAAA	L33180_092153_AW_020	GCGCGTTAGGAACAAGCAAT
Orf_96	+	L33180_092239_AW_020	ATCGCCATTGCAACACATCG	L33180_092133_CW_020	ATTGCTTGTTCCTAACGCGC
Orf_97	+	L33180_093861_AW_020	GAAAAATCCACCGTGTCGCC	L33180_093786_CW_020	TGCTTCTTTCCAGGCGTAGG
Orf_98	+	L33180_094213_AW_020	ATCCAGACAAGTCTTGGCCC	L33180_094134_CW_020	AAACGTTGTAGAAGCGTGCG
Orf_99	-	L33180_094599_CW_020	TCTTGTGTTTCAGCCCCTCG	L33180_094685_AW_020	CACACTCGCTATGGGCAGAA
gcn2	-	L33180_094925_CW_020	TGGGATAAACTTGCCGGCAT	L33180_094999_AW_020	ACTGCTTTGGAACGCGAAAC
Orf_101	+	L33180_096324_AW_020	ATGTTAGAGAACGGTGGCGG	L33180_096179_CW_021	ACTCGTTTATGTGCGCTTTGT
lef_7	-	L33180_096670_CW_020	CCGATTCAACGTGACGATGC	L33180_096783_AW_020	CAAATCAGCCAATCACGCCA
110	-	L33180_097454_CW_020	CGCATCGACAGCGTAATGTG	L33180_097546_AW_020	GGTCAAACACGGATTTGGGC
111	+	L33180_099638_AW_020	ATCCGTGCCCCAAGTGTTTT	L33180_099493_CW_020	AGACGCTGCCGACATTGTTA
gp64/67	-	L33180_099960_CW_020	ATTCGCCTTCAGCCATGGAA	L33180_100076_AW_020	CGGTTGGTCGTTTATTGCCC
p24	+	L33180_102003_AW_020	GCCGCATGAACGTTCAAAGT	L33180_101937_CW_020	AACGCAACTGTGTGCGATTC
gp16	+	L33180_102485_AW_020	GCACGTTGTTAACTACCCCG	L33180_102376_CW_020	AACACGATTCGAACGTGGGA
pp34	+	L33180_103285_AW_020	TTGTTCAACTCGTTGCGCTG	L33180_103189_CW_020	GTTACCCGACTTGACGCTCA
Orf_109	+	L33180_103884_AW_020	TCGCTTGTGATTCTGGCACA	L33180_103809_CW_020	TCCGACATATCCCATGGCCT
alk_exo	+	L33180_105120_AW_020	ATTCCGCGATCGACCATAGC	L33180_105059_CW_020	TGCACAGCTGCAATCACAAC
Orf_110a	-	L33180_105589_CW_020	GTCCGCGTTGGTCAATTTGT	L33180_105673_AW_020	GTTTTGGACGCTGTGGAGTG
Orf_111	+	L33180_105777_AW_020	CGCGTGTAATTTTCGGGACC	L33180_105697_CW_020	GGAGCGGTCACGTTCTGTAA
p35	+	L33180_106534_AW_020	TCCACACTGTCCACGTAAGC	L33180_106460_CW_020	GTGCCGTTTGCTCACGAAAT
p26	+	L33180_108178_AW_020	GGCACCTTTATGTGTCCCGA	L33180_108053_CW_020	ATTTTTGCCGGCGAAAAGCT
p10	+	L33180_108690_AW_020	GAGCAGTGTCACCGGTCAAT	L33180_108584_CW_020	GGGCTGGAAGAATCGTTCCA
p74	-	L33180_109056_CW_020	TAGTGGCTAACGCTTTCCCC	L33180_109154_AW_021	AGAAGTTAATTCCGACGGCCA
me53	-	L33180_111310_CW_020	GCCATCATTTCGCTTGGCTC	L33180_111456_AW_020	ATCGATCTTAGCACCACCGG
ie_0	+	L33180_112997_AW_020	CCGTACGCGCCTTCAATTTC	L33180_112921_CW_020	GTGCGTGCTGTCACCATTTT
Orf_118	+	L33180_114657_AW_020	CAACAACATACACGTCGCCC	L33180_114550_CW_020	AAATCGTTTGTTTGGCGCCA

odv_e18	+	L33180_115072_AW_020	TAAAACCTGTCGCGCTTGGA	L33180_115006_CW_020	GTGCTGGCTCTGGTGGTAAT
odv_ec27	+	L33180_115664_AW_020	AAACGTCTTGGCTATCCGCA	L33180_115528_CW_020	TACAGAAAACGAGGGGGGTGC
Orf_121	+	L33180_116254_AW_020	GGCCGAGTCCAAGTCGAATT	L33180_116143_CW_020	GGGTATTTTGGCCTCAACGC
Orf_122	-	L33180_116360_CW_020	TCGATTTGCAGTTCGGGACA	L33180_116461_AW_020	GGCAACGTGTCAGTGCATTT
ie_1	+	L33180_118704_AW_020	CGCAAACGTTATAGCGTCGG	L33180_118602_CW_021	GTGAACCGAAGAGAGAGCACT
odv_e56	-	L33180_118969_CW_020	AAACAAGACCGCGCCTATCA	L33180_119039_AW_020	GTCCAACAGTAGTGACGGCA
Orf_125	-	L33180_120019_CW_020	CGTCGTCAATACAACACGGC	L33180_120116_AW_020	ACTGACACAACAAATGCGCC
ie_2	-	L33180_121020_CW_020	AAAAGCTCACGCCAATGCTG	L33180_121112_AW_020	CGCGTGTACAATAAGCACGG
pe38	+	L33180_123168_AW_020	TCACGGCCTATTTGCGGATT	L33180_123096_CW_020	AGAATTGCAGCGTCAGGTGA
ptp	+	L33180_124820_AW_020	ACCATGTAACCGGTGCGATT	L33180_124682_CW_020	AGTACCTGGCCAGACTTTGC
bro_d	-	L33180_125050_CW_020	CAGTGGCGTTGTTCCAATCG	L33180_125125_AW_020	GTAACATCGACGCTGCCAAC
Orf_133	-	L33180_126862_CW_020	AAATTCCCTCCGGCGTTGAT	L33180_126956_AW_020	TGGTTATCGACCACCCGTTG
Orf_134	+	L33180_127614_AW_020	AACGGTCGATTGGATGGCTT	L33180_127503_CW_020	CGATGACATGACCCCCGTAG
lef_2	+	L33180_127953_AW_020	TGTTCAGCATGTCGACGACA	L33180_127836_CW_020	CGGCTCCGCCCACTATTAAT

III. 結果

- 1. BmNPV Type-A クラスターノックアウトウイルスの解析
- a) BmNPV Type-A クラスターノックアウトウイルスの作製

BmNPV Type-A 遺伝子(単独でノックアウトしても培養細胞での増殖に大きく影響し なかった遺伝子(Ono et al., 2012))の増殖過程における重要性の解析を目的として、 Type-A 遺伝子クラスターをノックアウトしたウイルスを作製した。Type-A 遺伝子クラ スターは $bm7 \sim bm14$, $bm18 \sim bm24$, $bm32 \sim bm38$, $bm44 \sim bm49$, $bm56 \sim bm58a$, $bm92a \sim bm104$, bm106~bm108、bm110a~bm115、bm124~bm130、bm132~bm134 の 10 か所存在(Fig. 1) し、それぞれの領域をクロラムフェニコール耐性遺伝子で置き換えたノックアウトウイ μ $\gtrsim \delta$ Bac Δ 7-14, Bac Δ 18-24, Bac Δ 32-38, Bac Δ 44-49, Bac Δ 56-58a, Bac Δ 92a-104, Bac Δ 106-108、Bac∆110a-115、Bac∆124-130、Bac∆132-134 とした(Fig. 2)。また、これらの中で 最初のクラスターである bm7~bm14 領域については、別途 bm11~bm14 を欠損させた Bac **Δ11-14** を作製した。これらのノックアウトバクミドについて、正しい領域がノックア ウトされていることを各遺伝子の上流、下流域を増幅する PCR (Fig. 3A) により確認し た。上流域では、BacΔ7-14 で 414 bp、Bac Δ11-14 で 301 bp、BacΔ18-24 で 391 bp、 Вас∆32-38 т 359 bp、Вас∆44-49 т 1179 bp、Вас∆56-58а т 318 bp、Вас∆92а-104 т 323 bp, BacΔ106-108 で 426 bp, BacΔ110a-115 で 1304 bp, BacΔ124-130 で 1845 bp, BacΔ132-134 で 376 bp の産物が予測され、それぞれのサイズの産物が得られた(Fig. 3B)。下流 域では、、Bac∆7-14とBac∆11-14で541 bp、Bac∆18-24で1061 bp、Bac∆32-38で2885 bp、Bac∆44-49 で 303 bp、Bac∆56-58a で 334 bp、Bac∆92a-104 で 1711 bp、Bac∆106-108 で 304 bp、BacΔ110a-115 で 1586 bp、BacΔ124-130 で 1048 bp、BacΔ132-134 で 282 bp の 産物が予測され、それぞれのサイズの産物が得られた(Fig. 3C)。さらに、クロラムフ ェニコール耐性遺伝子で置換した領域の内部配列を増幅するプライマーを用いた PCR では、コントロールの BmGFP を鋳型に用いた場合にはそれぞれ BacΔ7-14 で 5820 bp、 Bac Δ 11-14 °C 1551 bp、Bac Δ18-24 °C 6101 bp、Bac Δ32-38 °C 3641 bp、Bac Δ44-49 °C 2023 bp、Bac∆56-58a で 1237 bp、Bac∆92a-104 で 9941 bp、Bac∆106-108 で 682 bp、Bac∆110a-115 で 3220 bp、BacΔ124-130 で 5066 bp、BacΔ132-134 で 1158 bp の産物が予測されそれ ぞれのサイズの産物が得られた(Fig. 3D)が、各ノックアウトバクミドを鋳型に用いた 場合には PCR 産物が得られなかった(Fig. 3E)。

b) Type-A クラスターノックアウトウイルスの性状調査

type-A 遺伝子クラスターのノックアウトが polh プロモーター制御下のウイルス増殖 に与える影響を調査するために、BmN 細胞に各ノックアウトバクミドをトランスフェ クションし、24 時間ごとの経時的な EGFP 蛍光量を測定した。作製したノックアウト バクミドは全て polh プロモーターの制御下に EGFP が発現するように設計されており、 EGFP の蛍光量により polh プロモーターの活性を測定できるだけでなく、EGFP 発現細 胞の増加を経時的に調査することで BV の感染性の有無を調査することができる。11種 のノックアウトウイルスをそれぞれ BmN 細胞にトランスフェクションしたところ(Fig. 4)、Bac∆32-38 では 96 hpt においても全く蛍光が認められなかった(Fig. 4B)。それ以 外のノックアウトウイルス(10種)では全て 48 hpt から EGFP 蛍光が観察され、周辺 の細胞に二次感染する様子が認められた。しかし、これら 10 種のノックアウトバクミ ドをトランスフェクションした細胞の 120 hpt における EGFP 蛍光強度はいずれもコン トロールである BmGFP より低い値を示し、Bac∆7-14 でコントロールの 0.067 倍(Fig. 4A)、Bac ∆ 11-14 で 0.045 倍(Fig. 4B)、Bac∆18-24 で 0.79 倍(Fig. 4C)、Bac∆44-49 で 0.47 倍 (Fig. 4E)、Bac∆56-58a で 0.049 倍 (Fig. 4F)、Bac∆92a-104 で 0.62 倍 (Fig. 4G)、 BacΔ106-108 で 0.52 倍 (Fig. 4H)、BacΔ110a-115 で 0.64 倍 (Fig. 4I)、BacΔ124-130 で 0.61 倍 (Fig. 4J)、Bac∆132-134 で 0.72 倍 (Fig. 4K) であった。

2. bm11~bm14 領域における遺伝子間相互作用の調査

a) ノックアウトウイルスと遺伝子復帰ウイルスの作製

BacΔ11-14 はコントロールの BmGFP のような 48 hpt~72 hpt にかけての EGFP 蛍光の 増加は見られず、120 hpt になっても BmGFP よりも EGFP 蛍光強度は著しく低かった。 このことから、*bm11~bm14* の 4 遺伝子が協調的に *polh* プロモーター制御下の EGFP 発 現に貢献していることが示唆された。そこで、この領域に含まれる 4 遺伝子について詳 細な相互作用の解析を試みることにした。まず *bm11-bm14* に含まれる 4 遺伝子をにつ いて連続する 2 遺伝子のノックアウトバクミド (BacΔ11-12、BacΔ12-13、BacΔ13-14) を作製した (Fig. 5)。それぞれのノックアウトウイルスはクロラムフェニコール耐性遺 伝子が正しい位置に挿入されたかどうかを PCR で確認した (Fig. 6)。その結果、上流域 では BacΔ11-12 では 301 bp、BacΔ12-13 では 504 bp、BacΔ13-14 では 404 bp の産物が予 測され、それぞれのサイズの産物が得られた (Fig. 6A)。下流域では BacΔ11-12 で 336 bp、BacΔ13-14 で 541 bp、BacΔ12-13 で 404 bp の産物が予測され、それぞれのサイズの 産物が得られた(Fig. 6A)。さらにクロラムフェニコール耐性遺伝子で置換した領域の 内部配列を増幅するプライマーを用いるとコントロールのBmGFPをテンプレートに用 いた場合は約 300 bp の産物が得られたが、それぞれのノックアウトウイルスをテンプ レートに用いた場合は産物が得られなかった(Fig. 6B)。ノックアウトウイルスに加え て BacΔ12-13 に *bm12* あるいは *bm13* を復帰させた遺伝子復帰ウイルスも作製した。復 帰した遺伝子の内部 300 bp を増幅するプライマーを用いて PCR を行うと、BacΔ12-13-12res、BacΔ12-13-13res の両方で、コントロールと同様に 300 bp の産物が増幅され、そ れぞれに *bm12* あるいは *bm13* が挿入(復帰)されたことが確認された(Fig. 6C)

b) ノックアウトウイルスと遺伝子復帰ウイルス DNA をトランスフェクションした細 胞における EGFP 蛍光強度の継時的調査

それぞれの遺伝子ノックアウトや遺伝子復帰がウイルス増殖に与える影響を調査する ため、ノックアウトウイルス DNA(バクミド DNA)を BmN 細胞にトランスフェクシ ョンし 24 時間ごとの経時的な EGFP 蛍光量を測定した(Fig. 7)。

1 遺伝子ノックアウトウイルスの BacA11、BacA12、BacA13、BacA14 のうち、BacA12 と BacA13 はコントロールの BmGFP と同様の EGFP 蛍光強度を示した。また、BacA11 と BacA14 はそれぞれコントロールに対して 120hpt における EGFP 蛍光強度が約 50% 程度に低下した。。次に隣接する 2 遺伝子間の相互作用を解析するため、2 遺伝子ノッ クアウトウイルスの解析を行った。BacA13-14 はコントロールの約 50%程度の EGFP 蛍 光強度を示し、これは BacA14 とほぼ一致した(Fig. 7B)。一方、BacA11-12 と BacA12-13 はコントロールと比べて 15%以下と非常に低い値を示した(Fig. 7A,7C)。これらの 結果は蛍光顕微鏡による蛍光観察でも確認した(データ省略)。このように、*bm12 と bm13* は単独で欠損させた場合には、EGFP 発現に影響は認められないにも関わらず、両 者を欠損させた場合には、EGFP 発現に影響は認められないにも関わらず、両 者を欠損させた場合には、EGFP 発現が極端に抑制されることが判明した。BacA12-13 に *bm12 と bm13 をそれぞ*れ復帰させたウイルスを作製し、培養細胞にトランスフェク ションを行ったところ、どちらの復帰ウイルスもコントロールの BmGFP と同様な EGFP 蛍光強度を示した(Fig. 7D)。

c) *bm12* と *bm13* のアミノ酸相同領域の検索と各遺伝子にアラニン置換を導入したウイルスの解析

bm12と bm13 に何らかの共通機能を仮定した場合、2 遺伝子には共通するモチーフが

存在する可能性がある。そこで、*bm12 と bm13* のアミノ酸配列の類似性を Clustal W に より調査した(Fig. 8)。2遺伝子のアミノ酸配列間には3アミノ酸が一致する部位が2 か所存在(RNI: アミノ酸 198-200、TSV: アミノ酸 262-264) するのみで、明確な類似性 は認められなかった。bm12 と bm13 のアミノ酸配列を NCBI-CCD のライブラリを用い てモチーフ検索を行うと、bm12では108個のモチーフがヒットした。一方 bm13では3 個のモチーフがヒットし、アミノ酸配列 187-221 が Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACCD)のモチーフにヒットし、そのうち7アミノ酸一致した。また、アミ ノ酸配列 176-294 がメディエーター複合体サブユニット 16 にヒットし、そのうち 12 ア ミノ酸が一致するという結果が得られた。 Fig. 8 で示した *bm12 と bm13* でアミノ酸が一 致する 2 か所のうち RNI 配列は *bm13* において ACCD モチーフとメディエーター複合 体のモチーフ両方とオーバーラップしていた。そのため、何らかの機能を持つ可能性が あると考え 3 アミノ酸(RNI)を全てアラニンに置換した *bm12* あるいは *bm13* をもつ 組換えバクミドを新たに作製した(Fig. 9)。導入した RNI→AAA の変異については配 列を確認した(Fig. 10A)。さらに *bm12 と bm13* の内部 300 bp を増幅するプライマーを 用いて PCR を行うと (Fig. 10B)、それぞれ Bac∆12-13/12(RNI→AAA)res、Bac∆12-13/13(RNI→AAA)res では、コントロールと同様に 300 bp の産物が増幅されたが、Bac∆12、 BacΔ13 をテンプレートにした場合には産物が得られなかった。作製した BacΔ12-13_12(RNI-AAA)res と Bac∆12-13_13(RNI-AAA)res を BmN 細胞にトランスフェクショ ンし、24 時間ごとの EGFP 蛍光強度を測定すると、どちらのバクミドをトランスフェ クションした細胞においても、コントロールである BmGFP と同等の蛍光強度を示した (Fig. 11)_°

d) bm12 と bm13 の同時欠損がウイルス増殖に与える影響

BacΔ12-13をトランスフェクションした細胞において EGFP 蛍光が減少する原因がウ イルス DNA 複製段階での障害によるものか、あるいはウイルス粒子の産生能に問題が 生じているのかを調べるため、細胞内に含まれるウイルス DNA 量、培養上清中に含ま れるウイルス DNA 量および、培養上清中のウイルス力価を測定した。

細胞内のウイルス DNA 量はトランスフェクション後 12 時間、18 時間、24 時間、48 時間、72 時間について調査し、各サンプル中に含まれたウイルス DNA 量は BmGFP の 12 時間のサンプルの値を 1 とした相対値で示した (Fig. 12)。12 時間においては BmGFP と比較して BacA12、BacA12-13、BacA12-13/12(RNI-AAA)res、BacA12-13/13(RNI-AAA)res では有意に DNA 量が上昇し、それぞれ 2.11 倍、3.28 倍、4.10 倍、6.20 倍、9.40 倍であ った。18 時間においては、BmGFP と有意差が認められたのは BacΔ12-13/12(RNI-AAA)res のみであり、BmGFP に比べ 1.97 倍のウイルス DNA が存在した。24 時間では BmGFP と BacΔ12-13 あるいは BacΔ12-13/12(RNI→AAA)res で有意差が存在し、それぞれウイル ス DNA 量は 0.62 倍、1.55 倍であった。48 時間と 72 時間ではどちらも BmGFP と有意 差が存在するのは BacΔ12-13 のみであり、それぞれ BmGFP に比べ 0.11 倍、0.17 倍であ った。

次に培養上清中に放出されたウイルス DNA 量を 12 時間、18 時間、24 時間、48 時 間、72 時間において測定した(Fig. 13)。トランスフェクション後 12 時間と 18 時間の 培養上清中に含まれるウイルス DNA 量は、コントロールとすべてのノックアウトウイ ルス間に有意差はなかった。24 時間においては BacA12-13 のみ有意にウイルス DNA 量 が減少し、コントロールの 0.22 倍であった。48 時間ではコントロールと有意差が存在 したのは BacA13 と BacA12-13 であり、それぞれコントロールの 1.4 倍、0.0093 倍であ った。72 時間では 24 時間と同様 BacA12-13 のみ有意にウイルス DNA 量が減少し、0.023 倍であった。

トランスフェクション後 24 時間と 48 時間における培養上清中のウイルス力価を測 定すると(Fig. 14)、24 時間において BacΔ12-13 のウイルス力価はコントロールや他の 組換えバクミドに比べ、約 1000 分の1 の値を示した。48 時間においては BacΔ12-13 と それ以外のウイルス力価は更に差が広まり、コントロールと比較すると 100000 分の 1 以下の力価であった。

e) BacΔ12 と BacΔ13 トランスフェクション時のウイルス遺伝子のトランスクリプトー ム解析

bm12 と bm13 の間に存在する相互作用が果たすメカニズムを同定するために、bm12 と bm13 それぞれあるいは両方の欠損が BmNPV 遺伝子の転写に与える影響を BmNPV が持つ遺伝子の 95%である 136 遺伝子を対象に調査した。測定を行わなかった 5 遺伝 子については、それら遺伝子間の配列相同性によって特異的なプライマーが設計できな い遺伝子、もしくは qPCR の典型的な温度サイクルで増幅が期待されない遺伝子があっ たため、それらを測定対象から除外した。BmGFP、BacΔ12、BacΔ13、BacΔ12-13 のバ クミドを BmN 細胞にトランスフェクションし、9 hpt において細胞から total RNA を抽 出し cDNA を作製した。Table 10 で示したプライマーを用いて、qPCR により BmNPV

遺伝子の mRNA 発現量を測定した。qPCR データの前処理として、3 反復のうち 2 反復 以上で増幅が認められなかった遺伝子を除外して、統計解析を行った。線形モデルをデ ータにあてはめ、各遺伝子型による影響を推定した結果を Fig. 15 に示す(ヒートマッ プで表示している数値は BmGFP との差について底2の対数変換を行った数値)。 BmGFP と比較して、発現量が上昇した遺伝子は暖色、減少した遺伝子を寒色で示し、 BmGFP との発現量の差が大きくなるほど色が濃くなるように示している。BacΔ12 にお いては、ノックアウトした arif-1 のみしかコントロールである BmGFP との間に発現量 の有意な差(p=0.000197)が存在しなかった。一方、BacΔ13 では 43 遺伝子が BmGFP よりも 1.9 倍から 4.4 倍、発現量が増加し (p<0.05)、bm13 をノックアウトすることに よりウイルス遺伝子発現量が増加する傾向が観察された。BacΔ12-13 では BacΔ13 で発 現していた遺伝子発現の増加はほぼ抑制され、3 遺伝子のみで BmGFP と比べて発現量 の増加が維持されていた。次に BacΔ12、BacΔ13、BacΔ12-13 のウイルス増殖表現型と 相関のある発現量を示すウイルス遺伝子を探索したところ、BmGFP、BacΔ12、BacΔ13 と比較し、BacΔ12-13 でのみ発現が低下した遺伝子として bm67 を同定した。発現変動 の量は Bm67 よりも小さいが、lef-2 についても bm67 と同様な発現変動パターンが確認 できた (uncentered Pearson correlation = 0.80)。

f) bm67 あるいは lef-2 による Bac A12-13 の性状回復

BmGFP、BacΔ12、BacΔ13、BacΔ12-13 を BmN 細胞にトランスフェクションし、BmNPV 全遺伝子の転写量を調査した結果より、bm67 もしくは lef-2 の転写量減少が BacΔ12-13 の GFP 蛍光の減少をもたらしている可能性が推測された。そこで、BacΔ12-13 に bm67 を追加したバクミド(BacΔ12-13/bm67+) と BacΔ12-13 に lef-2 を追加したバクミド (BacΔ12-13/lef-2+) を作製した(Fig. 16)。バクミドの組換えが起こったことを M13 primer による PCR で確認すると、BmGFP では約 3.3 kbp、BacΔ12-13/bm67+では約 4.8 kbp、BacΔ12-13/lef-2+では約 4.4 kbp の産物が予測され、それぞれで予想されるサイズ の PCR 産物が得られた(Fig. 17)。BacΔ12-13/bm67+ と BacΔ12-13/lef-2+を細胞にトラ ンスフェクションした際の GFP 蛍光強度を測定したところ、BacΔ12-13 で見られた EGFP の減少は bm67 あるいは lef-2 を 1 コピー追加することによって完全に回復しコン トロールである BmGFP と同等の EGFP 蛍光強度を示した(Fig. 18)。

hm No	Gene name	Position and ORF	hm No	Gono namo	Position and ORF
DITINO.	Gene name	orientation		Gene name	orientation
1	polyhedrin	1 → 736	hr3		64802-65350
2	bm1629	770 ← 2396	70	vp15	$66329 \rightarrow 66707$
3	Pk1	2395 → 3220	71	cg30	66716 ← 67517
4		3250 ← 4270	72	vp39	67522 ← 68572
5		4607 ← 5600	73	lef-4	68591 → 69986
6	lef-1	5482 ← 6292	74		69987 ← 70449
7	egt	6407 → 7925	75	p33	70487 ← 71264
7a		7940 → 8101	76		71263 → 71746
8	bv/odv-e26	8067 → 8754	77	odv-e25	71757 → 72441
9		8725 → 9355	78	dnahel	72479 ← 76145
10		9389 ← 10457	79	pif-4	$76132 \rightarrow 76678$
11		10459 → 10789	80	bro-b	76776 → 77493
12	arif-1	10978 ← 12298	81	bro-c	77570 → 78524
13	pif-2	12335 → 13481	82	38k	78663 ← 79623
14	f-protein	$13586 \to 15605$	83	lef-5	79558 → 80353
15	pkip	15639 ← 16146	84	dnabinding p6.9.	80354 ← 80549
16	dbp	16188 ← 17139	85	P40	80593 ← 81679
1/		$1/215 \rightarrow 1/602$	86	P12	81701 ← 82070
18	iap1	17606 → 18482	87	P45	82053 ← 83214
19	let-6	18489 → 19008	88	vp80	83240 → 85316
20		19131 ← 19344	89	he65	85345 ← 86212
21		19401 ← 20817	nr4L		86431-86648
22	bro-a	20854 ← 21805	90		$86/02 \rightarrow 8/449$
23	sod	22029 → 22482	91	1 10	87454 ← 87769
0		22497-23100	92	odv-ec43	87786 ← 88959
24	fgf	$23407 \rightarrow 23953$	92a		88983 ← 89162
nr2R		24012-24278	93		89213 ← 89414
25		24369 ← 25014	nr4R		89552-90142
26	ubiquitin	$25035 \rightarrow 25266$	94		90091 ← 91363
27	39K	25323 ← 26154	95	ріт-з	$91387 \leftarrow 91999$
28	Iet-11	26150 ← 26486	95a		$92007 \leftarrow 92177$
29	nuaix	$26451 \leftarrow 27102$	90	wif d	92113 → 92398
30	p43	27172 ← 28258	97	ріт-1	$92532 \rightarrow 94113$
31	p47	28268 ← 29465	98		$94123 \rightarrow 94369$
32	IeI-12	$29525 \rightarrow 30074$	988		$94474 \rightarrow 94647$
33	gia	$30152 \rightarrow 31670$	99	DLO	$94542 \leftarrow 94725$
34		$31080 \rightarrow 31920$	100	PKZ	$94761 \leftarrow 95436$
30		$31903 \rightarrow 32290$	101	lof 7	$95020 \rightarrow 90352$
27	ody off	$32300 \rightarrow 32079$	102	IEI-7	$90370 \leftarrow 97039$
37	oto - TDAX like	$32000 \rightarrow 34972$	103	critinase	$97051 \leftarrow 98707$
30	els · TRAX-like	$35075 \leftarrow 35342$	104	v-Call1	$90750 \rightarrow 99725$
40	dna Ldomain	$33350 \leftarrow 30227$	105	904/07	101563×102148
40		$30204 \rightarrow 39211$	100	p24 an16	$102178 \rightarrow 102140$
42		$39790 \rightarrow 40207$	108	pr0 pr34	$102560 \rightarrow 102430$
42a	lef-10	$40206 \rightarrow 40440$	109	ppo+	$103510 \rightarrow 104170$
43	vn1054	$40300 \rightarrow 41395$	110	alk-exo an	$104200 \rightarrow 105460$
44	vp roo r	$41479 \rightarrow 41710$	110a		$105505 \leftarrow 105678$
45		$41714 \rightarrow 41966$	111		$105577 \rightarrow 105787$
46		$42221 \rightarrow 42704$	112	p35	$105923 \rightarrow 106820$
47	chaB-like	42725 ← 43238	hr5	poo	106947 - 107561
48	chaB-like	43252 ← 43501	113	p26	$107702 \rightarrow 108422$
49	fp	43656 ← 44298	114	p10	108497 → 108707
50	lef-9	$44402 \rightarrow 45872$	115	p74	108798 ← 110733
51		45935 → 46400	116	me53	110966 ← 112319
52	qp37	46481 ← 47363	117	ie-0	112596 → 113379
53	dnapol	47495 ← 50453	118	p49	113396 → 114824
54	•	$50462 \rightarrow 52877$	119	odv-e18	114834 → 115137
55	lef-3	52884 ← 54039	120	odv-ec27	115154 → 116024
56		54058 → 54460	121		116041 → 116326
57	mtase	54440 → 55226	122		116325 ← 116928
58	iap2	55377 → 56124	123	ie-1	116994 → 118746
58a	•	56185 → 56367	124	odv-e56	118839 ← 119964
59		56379 ← 56676	125		119995 ← 120313
60		56675 ← 57479	126		$120282 \rightarrow 120627$
61		57499 ← 57898	127	ie-2	120664 ← 121930
62		57919 ← 58174	128	pe38	$122416 \rightarrow 123343$
63	vlf-1	58192 ← 59329	129		$123446 \rightarrow 123677$
64		59337 ← 59667	hr1		123706 - 124297
65		59672 ← 59984	130	ptp	$124431 \rightarrow 124935$
66	gp41	59989 ← 61198	131	bro-d	124936 ← 125983
67		61190 ← 61892	132	bro-e	126060 ← 126783
68	tlp	61740 ← 62283	133		126860 ← 127313
69	p95	$62249 \rightarrow 64766$	134		$127342 \rightarrow 127669$
			405	106.0	407050 400000

Fig. 1 Type-A clusters in the BmNPV T3 gene repertoire. Type-A clusters are shaded.



Fig. 2 Structures of Type-A cluster KO bacmids. The target gene was replaced by chloramphenicol acetyltransferase (*cat*) gene cassette via homologous recombination in *E. coli* to generate each KO BmNPV T3 bacmid. EGFP gene was inserted into the *polyhedrin* locus of all bacmids. *polh*: *polyhedrin* promoter.



Fig. 3 Verification of successful gene replacement to generate Type-A cluster KO BmNPV bacmids A schematic representation of PCR to verify gene-knocking out (A). PCR was carried out using primer pairs to amplify the internal sequence (INT) of the target knockout gene(s) (D, E), the 5' junction sequence of *cat* (5Jcat) or the 3' junction sequence of *cat* (3Jcat) (B,C) with bacmid DNA as template. The PCR products were electrophoresed on a 0.8% agarose gel. The template bacmid and information about the target region and the primer pair (target region, primer No., primer No.) for each lane are indicated above and below the photographs, respectively. Refer to the previous report (Yamagishi *et al.*, 2003) for the sequences of these viral gene specific primers (gsp).





Fig. 5 Structures of KO and complementation bacmids to characterize genetic interactions between gene pairs in the *bm11-bm14* Type-A cluster. The target gene was replaced by the chloramphenicol resistance gene cassette (*cat*) via homologous recombination in *E. coli* to generate KO BmNPV T3 bacmid. To construct *bm12-bm13* double knockout BmNPVs complemented with *bm12* or *bm13* (Bac Δ 12-13/12res and Bac Δ 12-13/13res), the gene sequences were inserted immediately downstream of the EGFP gene in the *polyhedrin* locus of Bac Δ 12-13. *polh*p: *polyhedrin* promoter.



Fig. 6 Verification of successful gene replacement to generate KO and complementation bacmids to characterize genetic interactions between gene pairs in the *bm11-bm14* Type-A cluster. PCR was carried out using primer pairs to amplify the internal sequence (INT) of the target knockout gene(s) (B, C), the 5' junction sequence of *cat* (5Jcat) or the 3' junction sequence of *cat* (3Jcat) (A) with bacmid DNA as template. The PCR products were electrophoresed on a 0.8% agarose gel. The template bacmid and information about the target region and the primer pair (target region, primer No., primer No.) for each lane are indicated above and below the photographs, respectively. In the panel B and C, the numbers, 2, 3, 1-2, 1234, 2-3, and 3-4 are abbreviation for the target sequences, INT of *bm12*, *bm13*, *bm11-12*, *bm11-14*, *bm12-13*, and *bm13-14*, respectively. Refer to the previous report (Yamagishi *et al.*, 2003) for the sequences of viral gene specific primers (gsp).



Fig. 7 EGFP expression profiles for KO and complementation bacmids to characterize genetic interactions between gene pairs in the *bm11-bm14* Type-A cluster. BmN cells were transfected with 0.8 μ g Bac Δ 11, Bac Δ 12, Bac Δ 13, Bac Δ 14, Bac Δ 11-14, Bac Δ 11-12, Bac Δ 12-13, Bac Δ 13-14, Bac Δ 12-13/12res, or Bac Δ 12-13/13res or BmGFP. EGFP fluorescence intensity was measured at 0, 24, 48, 72, 96 and 120 hpt. Each experiment was triplicated and error bars represent standard error of the mean.

clustalw.aln

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

arif-1	MLNKTTAVLQFGLNASLLLAYLIVFVLSIMGVADN-RYAFLLEIEGKRSVINLSIPIMLS
pif-2	MYRILIVVFLFVFLYIVYQPFYQAYLHIKRAQQKYNDTLDDRMD
	: ::**:::: * *.*: :. * :: :.
arif-1	FGMWILFYTFYFVWKIVVWTKNRIGSSNTNVNFNAEKNFYVAITCIMVNVITGLCWMLFA
pif-2	YIESVMRRRHYVPIEALPTIRFDTNLGTLAGDTIKCMSVPLFVSEIDLPMFD-CSQVCDN
	*
arif-1	AFQIYVFKNGHLPTLDVLYRHYDLESVCWNSIVYLEIDYENAEILSQNCVYENLYKKCIM
pif-2	PSAAYFFVNNTDVFVVNGHKLTVGGYCSTNSLPRNCNRETSVILMSL
	. *.* * * *
arif-1	CRAIVRDHEPTVFNQNYSVIIMGVLTILAVQCWNLYVQLKEMFRNIYIKRRAEAEKASYD
pif-2	NQWTCIAEDPRYYAGTDNMTQIAGROHFDRIMPGOSNRNTLFDRLLGREVNVAT
-	: .:* : .:* :* : : : . <mark>***</mark> :.* *
	Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACCD)
arif-1	HYCDIDYCLEEERESNSKLLEVVSEGRNSSSVAAVTHPPFTPSTTTTTSVSETLSSFIAL
pif-2	NTFRRSWDELLEDGTRRFEMRCNSRDNNNNLMFVNPLNPLECLPNVCTSVRNVHTSVRPV
-	: .: * :. :. **. : *: <mark>***</mark> :. :*:
arif-1	SDLTSQPSPSPHPSSPFGNHNEFYFGNTYSVPKPVYNVPKKVLCTTPDACTMCQPPLP
pif-2	FETGECDCGDEAVTRVTHIVPGDRTSMCASIVDGL
	Mediator complex subunit 16
arif-1	DEEIISRRTPTFSPKLLRKSKELSPVKPVKPPTPPVPTAPVKPPTPPVPTAHVPTPPVPT
pif-2	DKNTASYRYRVECVNLYTSILNYSSNK-LLCPSNNFDSNTDAAFAFEVPGSYPLSGNGLN
-	*:: * * :* . : *. *: *: . : . : ** :: : .
arif-1	PPPMCFSEELQRKFKERKLSVYN-
pif-2	EPTYRFYLDTRSRVRYNDVRGQLS
	*. * : : : . : . :

Fig. 8 Alignment of bm12 (arif-1) and bm13 (pif-2) amino acid sequences. The red boxes indicate identical sequences between the two peptides. The region with similarity to Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase or Mediator complex subunit 16 is indicated by blue or yellow line, respectively.



Fig. 9 Structures of RNI motif-mutagenized bacmids $Bac\Delta 12-13/12(RNI \rightarrow AAA)$ res and $Bac\Delta 12-13/13(RNI \rightarrow AAA)$ res. The gene sequences of $bm12(RNI \rightarrow AAA)$ or $bm13(RNI \rightarrow AAA)$ were inserted immediately downstream downstream of the EGFP gene in the *polyhedrin* locus of $Bac\Delta 12-13$. *polh*p: *polyhedrin* promoter.



Fig. 10 Verification of RNI motif-mutagenized sites of bm12 or bm13. (A) The sequences of alanine substituted site of bm12 or bm13. The red box indicates the site where substitution of amino acids was carried out. (B) Structural verification for RNI motif-mutagenized BmNPV bacmids Bac $\Delta 12$ -13/12(RNI \rightarrow AAA)res and Bac $\Delta 12$ -13/13 (RNI \rightarrow AAA) res. PCR was carried out targeting the internal sequence (INT) of bm12 or bm13. The PCR products were electrophoresed on a 0.8% agarose gel. The template bacmid and information about the target region and the primer pair (target region, primer No., primer No.) for each lane are indicated above and below the photographs, respectively. Refer to the previous report (Yamagishi *et al.*, 2003) for the sequences of viral gene specific primers (gsp).



Fig. 11 EGFP expression profiles for RNI motif-mutagenized BmNPV bacmids. BmN cells were transfected with 0.8 μ g Bac Δ 12-13/12(RNI \rightarrow AAA)res, Bac Δ 12-13/13 (RNI \rightarrow AAA) res, or BmGFP. EGFP fluorescence intensity was measured at 0, 24, 48, 72, 96 and 120 hpt. Each experiment was triplicated and error bars represent standard error of the mean.

	12hpt	18hpt	24hpt	48hpt	72hpt
	BmGFP BacΔ12 BacΔ13 BacΔ12-13/12(RNI→AAA)res BacΔ12-13/13(RNI→AAA)res	BmGFP BacΔ12 BacΔ13 BacΔ12-13/12(RNI→AAA)res BacΔ12-13/13(RNI→AAA)res	BmGFP BacΔ12 BacΔ13 BacΔ12-13/12(RNI→AAA)res BacΔ12-13/13(RNI→AAA)res	BmGFP BacΔ12 BacΔ13 BacΔ12-13/12(RNI→AAA)res BacΔ12-13/13(RNI→AAA)res	BmGFP BacΔ12 BacΔ13 BacΔ12-13/12(RNI→AAA)res BacΔ12-13/13(RNI→AAA)res
1.00E+00	I I I				
1.00E+01	*				
1.00E+02		* <u>*</u>	* * * * T T		
1.00E+03			*	*	*
1.00E+04				1 T T T T	I T = = I

1.00E+05

Fig. 12 Profiles for viral DNA replication levels of KO and RNI motifmutagenized BmNPV bacmids. BmN cells were transfected with 0.8 µg of Bac $\Delta 12$, Bac $\Delta 13$, Bac $\Delta 12$ -13, Bac $\Delta 12$ -13/12(RNI \rightarrow AAA)res, Bac $\Delta 12$ -13/13(RNI \rightarrow AAA)res or BmGFP and were harvested at 12, 18, 24, 48 and 72 hpt. Total cellular DNA was isolated, digested with *Dpn*I restriction enzyme, and analyzed by real-time PCR. The experiment was triplicated for each time point. The bar heights indicate the averages and the error bars represent the standard error.

	12hpt	18hpt	24hpt	48hpt	72hpt
1.002+00	BmGFP BacΔ12 BacΔ13 BacΔ12-13 BacΔ12-13/12(RNI→AAA)res BacΔ12-13/13(RNI→AAA)res	BmGFP Bac∆12 Bac∆13 Bac∆12-13 Bac∆12-13/12(RNI→AAA)res Bac∆12-13/13(RNI→AAA)res	BmGFP BacΔ12 BacΔ13 BacΔ12-13 BacΔ12-13/12(RNI→AAA)res BacΔ12-13/13(RNI→AAA)res	BmGFP BacΔ12 BacΔ13 BacΔ12-13 BacΔ12-13/12(RNI→AAA)res BacΔ12-13/13(RNI→AAA)res	BmGFP Bac∆12 Bac∆13 Bac∆12-13 Bac∆12-13/12(RNI→AAA)res Bac∆12-13/13(RNI→AAA)res
1.00E+01					
1.00E+02					111111
1.00E+03					
1.00E+04					
1.00E+05	- IIII			I	
1.00E+06				*	1
1.00E+07				T T	*
1.00E+08				*	III II
1.00E+09					

Fig. 13 Profiles for amounts of budded viral DNA produced in BmN cells transfected with KO and RNI motif-mutagenized BmNPV bacmids. BmN cells were transfected with 0.8μ g of bacmids indicated below the bars. Culture media were collected at 12, 18, 24, 48 and 72 hpt. Viral DNA in the media was quantified by qPCR. Error bars represent standard error of the mean (*n*=3).



Fig. 14 Production of infective budded viruses from BmN cells transfected with KO and RNI motif-mutagenized BmNPV bacmids. BmN cells were transfected with 0.8 μ g of bacmids in top left of the plot. Culture media were collected at 24 hpt and 48 hpt and the titer determined by a plaque assay. Each experiment was triplicated and error bars represent standard error of the mean.

-5 0 5 log₂(fold change to control [竏・・Cp])

Fig. 15 Differential gene expression of *bm12-bm13* KO BmNPV bacmids. BmN cells were transfected with Bac $\Delta 13$, Bac $\Delta 12$, Bac∆12-13 or BmGFP and were collected at 9 hpt. All transcripts were quantitated by qRT-PCR using viral gene-specific primers to amplify about 100 nucleotides (Table 10). Each experiment was triplicated. Arrows indicate lef-2 and bm67.



41



Fig. 16 Structures of Bac Δ 12-13-derived bacmids carrying additional copy of the viral gene differentially expressed only in Bac Δ 12-13. The gene sequences of *bm*67 or *lef-2* were inserted immediately downstream downstream of the EGFP gene in the *polyhedrin* locus of Bac Δ 12-13. *polh*p: *polyhedrin* promoter.



Fig. 17 Structural verification for Bac Δ 12-13-derived BmNPV bacmids Bac Δ 12-13/bm67+ and Bac Δ 12-13/lef2+. PCR was carried out using M13 primer sets. The PCR products were electrophoresed on a 0.8% agarose gel. The template bacmid for each lane is presented above the photograph.



Fig. 18 Effects of inserting *bm67* or *lef-2* in Bm Δ 12-13 on EGFP expression profiles. BmN cells were transfected with 0.8 µg of Bac Δ 12-13/bm67+, Bac Δ 12-13/lef2+ or BmGFP. EGFP fluorescence intensity was measured at 0, 24, 48, 72, 96 and 120 hpt. Each experiment was triplicated and error bars represent standard error of the mean.

IV. 考察

単一遺伝子のノックアウトではウイルスの増殖に極端な影響を与えない Type-A 遺伝 子を複数ノックアウトした場合、増殖にどのような影響があるのかを調べた。まず、10 か所存在する非必須遺伝子クラスター領域 bm7~bm14、bm11~bm14、bm18~bm24、 bm32~bm38、bm44~bm49、bm56~bm58a、bm92a~bm104、bm106~bm108、bm110a~bm115、 bm124~bm130、bm32~bm134 (Fig. 1)を、それぞれノックアウトしたバクミド BacA7-14、 Bac Δ11-14、Bac Δ18-24、Bac Δ32-38、Bac Δ44-49、Bac Δ56-58a、Bac Δ92a-104、Bac Δ106-108、Bac Δ110a-115、Bac Δ124-130、Bac Δ132-134を作製した。それぞれのノックアウト バクミドを BmN 細胞にトランスフェクションし、Polh プロモーター制御下に置いた EGFP の発現を調査したところ、その増殖性は全く EGFP 蛍光が確認できないか、極端 に低下したもの (TAC-I: Bac Δ7-14、Bac Δ11-14、Bac Δ18-24、Bac Δ32-38、Bac Δ56-58a、 Bac Δ124-130)と EGFP 蛍光が極端に低下しなかったもの (TAC-II: Bac Δ44-49、Bac Δ92a-104、Bac Δ106-108、Bac Δ110a-115、Bac Δ132-134)の2 グループに大別することができ た。以下に本研究で欠損させた Type-A 遺伝子について、これまで報告されている機能 について概説した後、bm11~bm14 領域について詳しく解析した結果をもとに、これらの 非必須遺伝子の重要性について議論したい。

TAC-I に含まれる各ノックアウトバクミドで欠損させた遺伝子に関する情報を以下に示す。

• Bac Δ 7-14

BacΔ7-14 でノックアウトされた領域に含まれる遺伝子のうち、bm9 については AcMNPVの bm9 ホモログである ac17をノックアウトすると Sf9 細胞(ヨトウガ卵巣由 来)感染時に DNA 複製の遅延が起こり、さらに BV 産生が野生型の約 10 分の1 に減少 するという報告があり (Nie and Theilmann., 2010)、今回の結果 (bm9 もノックアウトし た BacΔ7-14 では EGFP 蛍光強度がコントロールバクミド BmGFP の約 1/10 に低下; Fig. 6A) と一致する。bm8 (bv/odv-e26)の産物については IE-1 と共局在することや、FP25 と相互作用し細胞のアクチンと複合体を形成すること (Beniya et al., 1998) などが報告 されているが、欠損した場合の増殖への影響についての詳細は不明である。bm10 につ いては AcMNPV の bm10 ホモログ ac18 をノックアウトしてもイラクサギンウワバ幼虫 に対する感染性が変わらないこと (Wang et al., 2007)、また bm11 の挿入変異体も生存 (増殖)可能である(Rohrmann., 2013) ことが報告されている。*bm12、bm13、bm14* は それぞれ AcMNPV の *arif-1、pif-2、f protein* のホモログである。この 3 つの遺伝子の機 能については後述する。

• Bac Δ 18-24

BacA18-24 に含まれる 7 遺伝子のうち、5 遺伝子は機能が報告されている。このうち bm19(lef-6)については、AcMNPV の lef-6 を欠損させた場合に培養細胞への感染は可 能だが、後期遺伝子の転写に遅延がおこることが報告されている(Lin and Blissard., 2002)。bm20 は機能に関する報告はなく、BmNPV において相同組換えによる変異体作 製失敗により必須遺伝子と考えられていた(Rohrmann., 2013)。同様に bm23(sod)も BmN 細胞では必須であると報告されていたが、我々の研究室での結果や本研究の結果 では bm20 と bm23 は必須ではなく、たとえ両方の遺伝子が無くとも BmNPV は増殖可 能であることを示している。その他の遺伝子の機能としては、AcMNPV の bm18(inhibitor of apoptosis-1; iap-1) ホモログ (ac27) を欠損しても培養細胞とイラクサギンウワバおよ びヨトウガ幼虫で 野生型と同等に増殖する(McLachlin et al., 2001)こと、AcMNPV に おける bm21 オルソログ (ac30) を遺伝子挿入により欠損させると、感染幼虫の生存期 間が延びる(Huang et al., 2008)こと、AcMNPV の bm24 (fibroblast growth factor; fgf) ホ モログ (ac32) はウイルスの全身感染を加速する役割を持つ可能性がある(Means and Passarelli., 2010)ことなどが報告されている。

• Bac Δ 32-38

EGFP が全く確認できなくなった Bac Δ 32-38 においてノックアウトした 7 個の遺伝子 の機能については不明な点が多い。まず BmNPV の近縁種である Autographa californica multiple NPV(AcMNPV)において、*ac41*(*bm32*のホモログ)を欠損すると、BV 産生 量が野生型の 20%~40%になる(Guarino *et al.*, 2002)。*bm33*(*global transactivator*; *gta*) がコードしている BM33 は転写の調節や DNA の組換えおよび修復などに関与する SNF2 ファミリーの N 末端ドメインを持つが、NPV における機能は不明であり BmNPV では *bm33* を欠損しても増殖に影響しない(Rohrmann., 2013)。*bm34*の欠損は(*very late factor-1*; *vlf-1*)の発現抑制により ODV 産生を減少させ(Katsuma and Shimada, 2009)、 *bm36* は AcMNPV の *ac45*(*bm36*のホモログ)が一過性の転写アッセイで LEF-12 の発 現に必要である(Li *et al.*, 1999)。また、*bm38*(*E26 transformation-specific*; *ets*)の産物は ショウジョウバエにおいて DNA damege や RNA の輸送、翻訳の制御に関わっている TRAX タンパク質のアミノ酸配列と 27%の相同性を示すが、実際の機能は不明である (Claussen *et al.*, 2006)。

• Bac Δ 56-58a

BacΔ56-58a に含まれる遺伝子のうち、bm56 は機能不明のコア遺伝子(全てのバキュ ロウイルスで保存されている遺伝子)である。bm56 は欠損しても BV 産生には影響し ないがビリオンを欠いた ODV が見られた(Xu et al., 2008)という報告があり、多角体 の形態形成に関与している可能性がある。bm57 は methyl transferase (mtase)であり、 AcMNPV の bm57 ホモログ(ac69)の欠損変異体を用いた実験では、欠損しても培養細 胞におけるウイルス複製に影響を与えない(Wu and Guarino, 2003)と報告されている。 bm58 は AcMNPV の inhibitor of apoptosis (iap2)ホモログであり BmN 細胞においては ウイルス増殖に必須である(Katsuma et al., 2008)が、欠損しても増殖は可能であった。

• Bac Δ 124-130

BacΔ124-130 の領域には前初期遺伝子である *ie-2* (*bm127*) と *pe38* (*bm128*) 遺伝子が 含まれている。前初期遺伝子 5 個は感染直後から発現し、その後のウイルス遺伝子発現 に重要な機能を持つと考えられているが、2 遺伝子を失っても BmN 細胞における増殖 は可能であった。AcMNPV では *pe38* を欠損したウイルスは BV 産生量が 99%減少した (Milks *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2006) と報告があり、ノックアウトした領域に *pe38* を含 む BacΔ124-130 の EGFP 蛍光強度がコントロールバクミド BmGFP よりも著しく低下し た (約 6%) ことと類似している。他にも、AcMNPV の *bm124* ホモログ (*ac148*; *odv-e56*) を欠損したウイルスは個体間の感染性を失うが培養細胞では増殖可能である (Harrison *et al.*,2010; Sparks *et al.*, 2011) こと、*bm125* の欠損ウイルスは感染性を持つ (Rohrmann., 2013) こと、*bm126* の欠損ウイルスを宿主幼虫に感染させると致死時間が 延長されるが、BV 産生量には有意な差がない (Hao *et al.*, 2009) こと、*bm130* (*protein tyrosine phosphatase*; *ptp*) を欠損したウイルスを感染させたカイコでは徘徊行動が起こ らなくなる (Kamita *et al.*, 2005) ことが報告されている。

このように上記の bm20、bm23、そしてこの bm58 について、これまで必須と言われていた遺伝子が我々の実験系では非必須である。この違いについてはノックアウトを作

製する手法の違い("相同組換え:ノックアウトに用いるマーカー遺伝子以外に余分な 配列は挿入されない。"と"バクミド+λ red recombination システム:ノックアウト部位に マーカー遺伝子以外の配列が挿入される。"の違い)による可能性もあるが、培養環境 や細胞の違いに起因する可能性も否定できず、今後の解析を待つ必要がある。

TAC-II に含まれる各ノックアウトバクミドで欠損させた遺伝子に関する情報を以下に示す。

• Bac Δ 44-49

BacΔ44-49 でノックアウトした遺伝子のうち、bm44、bm45、bm46 の機能は全く不明 である。bm47 については欠損したウイルスでは感染幼虫の運動性が低下するという報 告(Gomi et al., 1999b)のほか、AcMNPVの bm47 ホモログである ac58/59 は ODV と BVの構造タンパク質であると報告がある(Braunagel et al., 2003; Wang et al., 2010)。bm48 は DNA 結合タンパク質であるとの報告(Li et al., 2006)があり、培養細胞を用いた相 同組換えによる変異体作製が失敗したことから必須遺伝子と言われていた。bm49(few polyhedra; fp)を欠損したウイルスでは感染後期に起こる幼虫の液状化のレベルが低下 する(Katsuma et al., 1999)ことや、AcMNPVのbm49ホモログ(ac61)を欠損するとビ リオンおよびヌクレオカプシドに欠陥を生じる代わりに、野生型に比べ2倍~5倍のBV を産生する(Fraser et al., 1985; Harrison et al., 1996)ことが報告されている。今回 bm44~bm49をまとめてノックアウトしてもコントロールの約 50%の EGFP 蛍光強度を 示したことから、この領域に含まれる遺伝子は全て欠損しても BmN 細胞における BmNPVの増殖には重大な影響がないことが判明した。

• Bac∆92a-104

*bm92a~bm104*のノックアウトバクミド(Bac∆92a-104)は全141遺伝子の約10%にあたる15遺伝子を欠損していることになるが、コントロールの6割程度のEGFP蛍光を示した。この領域に含まれる遺伝子のうち、*bm92a、bm93、bm95a、bm98、bm98a、bm99、bm101*の7遺伝子については機能に関する報告が無いが、そのうち*bm93とbm101*の2遺伝子はBmNPVにおいて相同組換えによる変異体作製失敗により必須遺伝子と考えられていた(Rohrmann., 2013)。AcMNPVの*bm94*ホモログ*ac114*はBVとODV両方の構造タンパク質であると報告があるほか、BM95(PIF-3)はBM97(PIF-1)とBM13(PIF-2)とともに複合体を形成し経口感染に関与する(Peng*et al.*, 2010)と言われている。ま

た、bm96 を欠損したウイルスをカイコ個体に感染させると幼虫の移動性に影響する (Gomi et al., 1999b) こと、bm100 (protein kinase 2; pk2) は AcMNPV、BmNPV、PlxyNPV、 RoMNPV の4種だけが持つ遺伝子で BmN 細胞ではウイルス増殖に必要である(Katsuma et al., 2008) ことが報告されているが、今回の結果は bm100 は必須ではないという我々 が以前報告した結果を確認する結果であった (Ono et al., 2012)。bm102 (lef-7) を欠損 したウイルスは DNA 合成量が減少する (Gomi et al., 1997) こと、bm103 (chitinase) は カイコの chitinase と 63%の相同性を示し、AcMNPV における bm103 ホモログの ac126 は BV の形成に関与するだけでなく、ac127 (bm104 (viral cathepsin; v-cath) ホモログ) とともに感染後期の幼虫の液状化に関与している (Hawtin et al., 1992; Slack et al., 1995) ことが報告されている。

• Bac∆106-108

BacΔ106-108 については、bm106 をノックアウトすると感染幼虫が死ぬまでの時間が 延びる(Gomi et al., 1999b)、bm107 はヌクレオカプシドのエンベロープに関与している (Gross et al., 1993)と言われている一方でノックアウトしても感染性には影響しない (Rohrmann., 2013)と報告されている。AcMNPV では bm108 ホモログ (ac131)を欠損 すると空洞のある多角体ができるため包埋体の安定性に関与する可能性があると報告 されているが、詳しい機能は不明なままである。これらの3遺伝子はそれぞれ欠損が致 命的であるという報告がないため、今回の結果はそれらと矛盾しないが、EGFP 蛍光強 度はコントロールと比べて有意に減少しているため、これら3遺伝子が BmNPV の BmN 細胞での増殖に何らかの関与をしていると考えられる。

• Bac110a-115

Bac Δ 110a-115 において欠損した遺伝子については、AcMNPV における *bm111* ホモログ (*p94*)の欠損は *Spodoptera. frugiperda* 幼虫への感染には影響を与えないことが報告さ れている(Clem *et al.*, 1994)。また、*bm112* ホモログ (*p35*)はアポトーシスのインヒビ ターであり、*S. frugiperda* 細胞において AcMNPV 感染時に細胞のアポトーシスを抑制す ること(Clem *et al.*, 1991)や、*p35*の欠損は Sf 細胞において BV 産生を著しく減少させ る(Herschberger *et al.*, 1992)ことが報告されている。*bm113* ホモログ (*p26*)は AcMNPV において欠損しても、培養細胞と幼虫の両方で影響がないとされている(Simón *et al.*, 2008)が、*p26 を p10(bm114* ホモログ)、*p74(bm115* ホモログ)とともに欠損させる と、ビリオンを欠いた多角体が産生される(Wang et al., 2009)との報告がある。bm114 のホモログである p10 は感染後最も遅いタイミングで発現する後後期の遺伝子として 知られ、そのプロモーターは polh と同様に発現ベクターに利用される。p10 は宿主の tubullin と関与し、複合体を形成する(Patmanidi et al., 2003; Carpentieret al., 2008)ほか、 Ac131 との関与も示唆されている(Escasa et al., 2006; Lange et al., 2003)。p10 を欠損す ると、脆弱なビリオンが外れたと思われる空洞を示す粗い表面をもつ多角体を形成する (Gross et al., 1994; Vlak et al., 1988; Williams et al., 1989)。bm115 ホモログ(p74)は経口 感染因子(per os infectivity factor: pif)の一つである。p74 は ODV の宿主の中腸細胞へ

の結合を誘導することが明らかになっており、AcMNPVにおいて p74 を欠損させると、 経口感染が起こらなくなることが報告されている(Ohkawa et al., 2005)。

• Bac∆132-134

BacΔ132-134 における欠損遺伝子については、*bm132* に相当する遺伝子が AcMNPV には存在せず機能についても報告がないが、*bm133* は欠損しても増殖可能である (Rohrmann., 2013)、*bm134* は ODV の構造タンパク質をコードし *bm133* と同様に欠損 しても増殖可能である (Rohrmann., 2013)。これら 3 遺伝子を欠損しても EGFP 蛍光強 度はコントロールの 70%程度と、今回作製したノックアウトウイルスの中では最も高い EGFP 蛍光強度を示した。この結果から、これらの遺伝子は BmN 細胞における増殖に 関しては重要な役割を担っていないのかもしれない。

本研究の結果から明らかなように、単独で欠損してもウイルスの増殖に大きな影響が 認められない遺伝子群が複数欠損した場合にウイルス増殖が大きく阻害される場合 (TAC-I)のあることが判明した。このことは複数の非必須遺伝子(アクセサリー遺伝 子)がウイルス増殖に大きな影響を与える機能の発現に関して遺伝子間相互作用を持つ 場合のあることを意味している。この場合、それらの遺伝子は特定の機能発現制御にお いて機能的に密接に関連(遺伝的相互作用)していると考えられる、しかし、既に概説 した本研究で欠損させた遺伝子に関するこれまでの報告からは、それらの遺伝子間の機 能的関連性を示唆するものは見当たらない。そこで次にそれらの欠損によりウイルスの 増殖が大きく阻害された bm11、bm12、bm13、bm14 の4 遺伝子を対象に、それらの遺 伝的相互作用について解析した。bm11 は AcMNPV の ac19 のホモログであるが、機能 の遺伝子は BmNPV や AcMNPV が属している Group I NPV とほとんどの Group II NPV で保存されている (Rohrman, 2013)。*arif-1* は AcMNPV では初期遺伝子として発現し、 イラクサギンウワバ卵巣由来 Tn-368 細胞ではアクチンの再編成を引き起こすことが報 告されている (Roncarati and Knebel-Morsdorf, 1997)。*lacZ* 遺伝子の挿入により AcMNPV の *arif-1* の C 末端半分を欠損させた場合は、Tn-368 細胞とヨトウガ卵巣由来 Sf 細胞の 両方で目立った感染性の減少は認められなかった (Dreschers *et al.*, 2001)。*bm13* は *per os infectivity factor* (*pif*) の一つであり、PIF 遺伝子を失った AcMNPV は培養細胞では感 染性を保持しているが、個体における経口感染能力を失うことが報告されている (Ohkawa *et al.*, 2005)。*bm14* は GroupII NPV の *f protein* のホモログであると予測されて

いる。F protein は Group II NPV では膜融合タンパク質であるが、 Group I NPV では GP64 がその役割を果たすため F protein は膜融合タンパク質としては機能していないと 考えられている。AcMNPV では *f protein* を欠損させても培養細胞におけるウイルスの 増殖と感染性には影響はないが、ノックアウトウイルスは野生型のウイルスよりも宿主 幼虫を死に至らしめるまでの時間が長かった(Lung *et al.*, 2003)。これらの AcMNPV を 使った遺伝子解析から *bm11~bm14* は少なくとも培養細胞においては非必須であること を示しており、これは既に報告した BmNPV のノックアウトウイルスの表現型とも一致 する(Ono *et al.*, 2012)。

これらの遺伝子はそれぞれの機能解析はなされてはいるが、やはり既知の機能からは これらがウイルス増殖において重要な、どのような機能発現に関して密接に関連してい るのかを推定することはできなかった。そこで、これらの遺伝子間にどのような相互作 用があるのかを2遺伝子ノックアウトウイルスを用いてさらに解析したところ、2遺伝 子の組み合わせによってそれらには相乗的、相加的、補償的な相互作用が観察された。 まず bm11 のノックアウトでは EGFP 蛍光強度がコントロールの BmGFP の約 60%程度 に減少し、bm12 単独のノックアウト (BacA12) では BmGFP と同等の蛍光強度が観察 された。ところが両者をノックアウト (BacA11-12) すると著しく EGFP 蛍光強度が減 少したことから、bm11 と bm12 の間には相乗的な相互作用の存在が示唆された。bm12 と bm13 は両者とも単独ノックアウトでは、コントロール (BmGFP) と同等の蛍光強度 を示したにもかかわらず、2遺伝子を同時にノックアウトした場合には蛍光強度がコン トロールの 15%以下に減少したことから、両者間には補償的な相互作用が存在している と考えられた。ところで、bm12-13 遺伝子座および bm13-14 遺伝子座にまたがる転写産 物が存在していることが知られている(Katsuma et al., 2011)。本研究においては、遺伝 子復帰実験の結果から bm12 と bm13 のノックアウトウイルスの表現型にその転写産物 が関与している可能性は除外できると考えられるが、近隣遺伝子に干渉するような転写 産物の挙動が遺伝子の相互作用の誤った解釈につながる可能性があるため注意が必要 である。BmNPV におけるトランスクリプトーム情報の更なる蓄積と、そのような転写 産物の機能を研究するための手法の発展が、今後バキュロウイルスの遺伝子間相互作用 の解析を進めるうえで重要となるであろう。bm13 と bm14 の場合は、BacA13 は BmGFP と同等、BacA14 は BmGFP の 50%の EGFP 蛍光強度を示すが、両者をノックアウトし た BacA13-14 の EGFP 蛍光強度が BacA14 の EGFP 蛍光強度とほぼ一致した。このこと から両者間には相加的な相互作用が存在することが推定される。今回作製した複数遺伝 子のノックアウトウイルスの中で、BacA13-14 の結果だけが単一遺伝子ノックアウトの 結果から予測できるものであり、ここで得られた結果は非必須遺伝子間の複雑な相互作 用を示唆するものと言える。

bm12 と bm13 間に存在した補償的な遺伝子間相互作用の詳細を解析するため、それ ぞれのアミノ酸配列についてモチーフ検索と相同性検索を行ったが、2 つのアミノ酸配 列間に類似したモチーフは存在せず、相同性も認められなかった。2 つのアミノ酸配列 を比較した中で3アミノ酸が一致する箇所(RNI)を全てアラニンに置換した変異バク ミドを作製しそれらの性状を BmN 細胞において解析したところ、EGFP 蛍光強度、培 養上清中に含まれるウイルスの力価やウイルス DNA 量、細胞内に含まれるウイルス DNA 量の全ての項目においてコントロールに近い性状であった。したがってこの RNI という3アミノ酸は bm12 と bm13 それぞれの機能にとって重要ではなく、今回観察さ れた相互作用には影響を与えないものであると考えられた。BacΔ12、BacΔ13、BacΔ12-13 についても細胞内に含まれるウイルス DNA 量、培養上清中に含まれるウイルス DNA 量とウイルスの力価を調査した(Fig. 12、Fig. 13)。AcMNPV においては感染後6時間 からウイルス DNA は 1.7 時間ごとに 2 倍に増加し、 感染 20 時間前後になるとウイルス DNA 複製が停止してプラトーに達し、BV の出芽が始まると報告されている(Rosinski *et al.*, 2002)。さらに Fig. 13 のコントロールウイルスについて 18 時間、24 時間のデータ を比較すると違いがないことから、今回サンプルを回収したタイミングのうち、12 hpt、 18 hpt まではウイルス DNA の複製が主に起こり、24 時間以降は二次感染が進んでいく ことが推測される。細胞内 DNA 量について BacΔ12-13 は 18 hpt までコントロールの

BmGFP より多い(12 hpt)かあるいは同等(18 hpt)である。したがって二次感染が起こる前段階でのウイルス DNA 複製は *bm12 と bm13*の両方をノックアウトしても障害を受けていないと考えられる。一方、24 hpt の上清中に含まれるウイルスの力価がBacΔ12-13 で BmGFP の 1000 分の1 となっていること、24 hpt で上清中に含まれるウイルス DNA 量についても BmGFP に比べ 20%程度になっていることから、BacΔ12-13 では二次感染に必要な BV の産生あるいは放出に問題が生じていると推測される。

これらの観察から、bm12 と bm13 がウイルスの二次感染に必要な機能発現に関して 密接に関連している可能性が示唆されたが、その詳細に関しては推定することができな かった。そこで BmGFP、BacΔ12、BacΔ13、BacΔ12-13 をトランスフェクションした細 胞において 9 hpt で total RNA を抽出し、BmNPV のすべての遺伝子について転写産物量 を比較した。BacΔ12 と BacΔ13 のトランスクリプトームを比較したところ、bm12 と bm13 がウイルス遺伝子に与える影響は大幅に異なっていた。このことから、ウイルス の増殖が許容される遺伝子発現の様態は極めて多様であると考えられる。また、これら 4 種類のウイルスについて得られたトランスクリプトームを比較した中で、特徴的な変 化のパターンを示したのが bm67 と lef-2 であった。bm67 と lef-2 は共に $Bac\Delta 12$ と BacΔ13 では BmGFP に比べ転写量が上昇したかあるいは変化しなかったが、BacΔ12-13 では転写量が減少し、これは GFP 蛍光強度において BacΔ12 と BacΔ13 をトランスフェ クションした細胞においては EGFP 蛍光強度がコントロールと同等の値を示すのに対 し、BacΔ12-13 では EGFP 蛍光強度が著しく減少するという変化のパターンと類似して いる。bm67 と lef-2 は全てのバキュロウイルスで保存されている 37 のコア遺伝子に含 まれており(Yuan et al., 2011; Garavaglia et al., 2012)、これら2遺伝子をそれぞれ単独で ノックアウトすると、BmNPVでは二次感染能を失うと報告されている(Ono et al., 2012)。 これらの結果から、bm12 と bm13 は bm67 および lef-2 の発現に密接に関連しており、 両者の欠損により bm67 と lef-2 の発現が抑制された結果、ウイルス増殖の大幅な低下と なって観察された可能性が示唆された。そこで、bm67と lef-2 のどちらの発現低下がウ イルス増殖の極端な低下につながったのかについて、さらに検討した。

*bm*67 は感染後期に生産される 27 kDa のタンパク質であり、ウイルス粒子の非構造 タンパク質として細胞質に局在し、宿主の A3 アクチンと相互作用する (Chen *et al.*, 2007) ことが報告されている。さらに *bm*67 はヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus type1: HIV-1)の転写活性化因子 Tat の一部とアミノ酸配列が類似する領域を持っ ている (Rohrmann, 2013)。HIV の TAT はウイルス RNA の 5'領域に形成される TAR と呼ばれる高次構造に結合し、RNAの転写を活性化する働きをもつ(Wei et al., 1998) ことが知られている。本研究室における bm67 に関する解析では、bm67 における tat 類 似性領域の8アミノ酸を欠損あるいはアラニンに置換した場合、bm67をノックアウト した場合と同様に polh プロモーター制御下で発現する EGFP 蛍光強度が著しく低下す ることが判明している(川俣、2016)。また、bm67と bm12 は共に宿主のアクチンとの 関連が示唆されている。細胞骨格であるアクチンを利用して宿主細胞への侵入、増殖、 非感染細胞への移行を行うウイルスの報告は多い(Marsh and Helenius, 2006)。バキュ ロウイルスも例外ではなく、ヌクレオカプシドの形態形成にアクチンフィラメントを利 用していると報告されている(Charlton and Volkman, 1991)。さらに AcMNPV では宿 主細胞に侵入したヌクレオカプシドが核に移行する際に、ヌクレオカプシドが actin comet tail と呼ばれる構造により推進力を得ていることや (Ohkawa et al., 2010)、AC141、 VP39、FP25、BV/ODV-C42 といったヌクレオカプシドの構造タンパク質が宿主のキネ シン-1 と結合し、ヌクレオカプシドの核から細胞質への移行と BV の構築に関与する という報告がある(Biswas et al., 2016)。 bm12 と bm13 の両方をノックアウトした場合 に bm67 の発現が抑制されたことで宿主アクチンに通常の感染時とは異なる何らかの影 響を与え、その結果二次感染に必要な BV の産生、放出の大幅な減少を引き起こした可 能性はあるが、確認には今後さらに詳細な解析が必要である。

lef-2はDNA プライマーゼのアクセサリー因子であり、DNA プライマーゼである LEF-1 と相互作用することが報告されている(Evans et al., 1997)。LEF-2 は一過性のウイル ス DNA 複製の実験系においては必須であるが(Kool et al., 1994; Lu et al., 1995)、lef-2 を欠損した AcMNPV ウイルス DNA を Sf21 細胞にトランスフェクションした場合は、 ウイルス DNA 複製の開始に必須でないと報告されている(Wu et al., 2010)。LEF-2 は DNA と LEF-1 の両方に結合する(Wu et al., 2010)ことが調べられているほか、LEF-2 に変異が入った AcMNPV では後後期遺伝子の転写に影響を与えるため、DNA 複製と転 写の両方に役割を持つと示唆されている(Mikhailov and Rohrmann, 2002)。また、BmNPV の LEF-2 は後期遺伝子の転写を活性化することが報告されている(Sriram and Gopinathan, 1998)。 以上の内容を総合すると、*bm12 と bm13* は BmNPV の遺伝子発現制御カスケードの 中で *bm67 と lef-2* よりも上流に位置し、*bm67* あるいは *lef-2* の発現を補完的に支えてい ると考えられる。*bm67 と lef-2* に関しては両方とも必須遺伝子であるという共通性はあ るものの、従来の報告からは機能的な共通性を見出すことはできなかった。現時点では、 *bm67 と lef-2* の更に下流に重要な遺伝子が存在し、その遺伝子の発現を *bm67 と lef-2* が 補完的に支えているのではないかと考えられるが、*bm67 と lef-2* が直接的に相互作用し ている可能性もあり、詳細は不明である。

本研究では、BmNPV 非必須遺伝子間に複雑な遺伝的相互作用が存在し、遺伝子の組 み合わせによってはそれらを同時にノックアウトするとウイルスの増殖に大きな影響 を与えることを明らかにした。そのような遺伝的相互作用が認められる 2 つの遺伝子 bm12 と bm13 については詳細な解析を行い、これらの非必須遺伝子がどちらかが存在 すれば良い機構で補完的に必須遺伝子 bm67 と lef-2 の発現を制御し、それらの必要十分 な発現を担保していることが明らかになった。これはバキュロウイルスの増殖における ロバストネスに関してその構造を明らかにした初めての例である。既に述べたように、 bm12 と bm13 間の遺伝的相互作用の実体は、これまでの一度に一つの遺伝子、そして 特定の機能について焦点を絞って解析する還元主義的なアプローチで得られた既報の 結果からは予測できないものであった。本研究では単遺伝子・多重遺伝子ノックアウト による複数遺伝子の組み合わせに対する阻害と網羅的なウイルス遺伝子発現解析を行 い、*bm12*と *bm13* 間の遺伝的相互作用が *bm67、lef-2*の発現制御に関わることを明らか にした。このような補償的な相互作用を持つ遺伝子の場合、単遺伝子への阻害実験の結 果から、その遺伝子の機能、役割を明らかにすることはできない。Type-A 遺伝子が 86 遺伝子存在し、TAC-II のように多重遺伝子ノックアウトがウイルス増殖に大きく影響 しない観察を考慮すると、本研究の対象となった bm12、bm13 以外にも補償的な相互作 用を持つ遺伝子群が存在する可能性は高い。したがって、ウイルス遺伝子を個別に解析 するだけでは、対象となるウイルス遺伝子の機能・役割についての本質的な情報を取得 できない可能性があることを強く示唆している。ゆえに、BmNPV の増殖機構の理解、 ひいては BmNPV 発現ベクターシステム改良のためには、各遺伝子の機能に関する理解 を深めるだけではなく、複数の遺伝子間の遺伝的相互作用を効率的に分析する手法を探 求し、構築する必要がある。本研究はその先駆けであり、今後の研究の礎となることが 期待される。本研究で得られた結果は、BmNPV 発現ベクターシステムの改良(オンデ マンド設計)におけるウイルスゲノム改変の重要な標的遺伝子でもある非必須遺伝子の 機能に関して新たな視点を提供すると共に、各遺伝子の機能を遺伝子間の遺伝的相互作 用の中で理解することの重要性をあらためて強調するものである。

V. 参考文献

Ayres, M. D., Howard, S. C., Kuzio, J., Lopez-Ferber, M. and Possee, R. D. (1994) The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* **202**, 586-605

Beniya, H., Braunagel, S. C. and Summers, M. D. (1998) *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, subcellular localization and protein trafficking of BV/ODV-E26 to intranuclear membranes and viral envelopes. *Virology* **240**, 64-75

Biswas, S., Blissard, G. W. and Theilmann, D. A. (2016) Trichoplusia ni kinesin-1 associates with AcMNPV nucleocapsid proteins and is required for the production of budded virus. *J Virol* **90**, 3480-3095

Braunagel, S. C., Russell, W. K., Rosas-Acosta, G., Russell, D. H. and Summers, M. D. (2003) Determination of the protein composition of the occlusion-derived virus of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9797-9802

Blissard, G. W. and Rohrmann, G. F. (1990) Baculovirus diversity and molecular biology. *Annu Rev Entomol* **35**, 127-155

Carpentier, D. C., Griffiths, C. M. and King, L. A. (2008) The baculovirus P10 protein of Autographa californica nucleopolyhedrovirus forms two distinct cytoskeletal-like structures and associates with polyhedral occlusion bodies during infection. *Virology* **371**, 278-291

Charlton, C. A. and Volkman, L. E. (1991) Sequential rearrangement and nuclear polymerization of actin in baculovirus-infected Spodoptera frugiperda cells. *J Virol* **65**, 1219-1227

Chen, H. Q., Chen, K. P., Yao, Q., Guo, Z. J. and Wang, L. L. (2007) Characterization of a late gene, ORF67 from Bombyx mori nucleopolyhedrovirus *FEBS Lett* **581**, 5836-5842

Claussen, M., Koch, R., Jin, Z. Y. and Suter, B. (2006) Functional characterization of Drosophila Translin and Trax. *Genetics* **174**, 1337-1347 Clem, R. J., Fechheimer, M. and Miller, L. K. (1991) Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science* **254**,1388-1390

Clem, R. J., Robson, M. and Miller, L. K. (1994) Influence of infection route on the infectivity of baculovirus mutants lacking the apoptosis-inhibiting gene p35 and the adjacent gene p94. *J. Virol* **68**, 6759-6762

Datsenko, K. A. and Wanner, B. L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6640-6645

Dixon, S. J., Costanzo, M., Baryshnikova, A., Andrews, B. and Boone, C. (2009) Systematic mapping of genetic interaction networks. *Annual review of genetics* **43**, 601-625

Dreschers, S., Roncarati, R. and Knebel-Morsdorf, D. (2001) Actin rearrangement-inducing factor of baculoviruses is tyrosine phosphorylated and colocalizes to F-actin at the plasma membrane. *J Virol* **75**, 3771-3778

Escasa, S. R., Lauzon, H. A., Mathur, A. C., Krell, P. J. and Arif, B. M. (2006) Sequence analysis of the Choristoneura occidentalis granulovirus genome. *J Gen Virol* **87**, 1917-1933

Evans, J. T., Leisy, D. J. and Rohrmann, G. F. (1997) Characterization of the interaction between the baculovirus replication factors, LEF-1 and LEF-2. *J. Virol.* **71**, 3114-3119

Fraser, M. J., Brusca, J. S., Smith, G. E. and Summers, M. D. (1985) Transposon mediated mutagenesis of a baculovirus. *Virology* **145**, 356-361

Friesen, P. D. and Miller, L. K. (1986) The regulation of baculovirus gene expression. *Curr Top Microbiol Immunol* **131**, 31-49

Fuchs, L. Y., Woods, M. S. and Weaver, R. F. (1983) Viral Transcription During *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus Infection, a Novel RNA Polymerase Induced in Infected *Spodoptera frugiperda* Cells. *J Virol* **48**, 641-646

Garavaglia, M. J., Miele, S. A., Iserte, J. A., Belaich, M. N. and Ghiringhelli, P. D. (2012) Ac53,

ac78, ac101 and ac103 are newly discovered core genes in the family Baculoviridae. *J Virol* **86**, 12069-12079

Gomi, S., Zhou, C. E., Yih, W., Majima, K. and Maeda, S. (1997) Deletion analysis of four of eighteen late gene expression factor gene homologues of the baculovirus, BmNPV. *Virology* **230**, 35-47

Gomi, S., Majima, K. and Maeda, S. (1999a) Sequence analysis of the genome of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *J Gen Virol* **80**, 1323-1337

Gomi, S., Kamita, S.G. and Maeda, S. (1999b) Deletion analysis of all genes of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV). *RIKEN Review* **22**, 39-41

Gross, C.H., Wolgamot, G.M., Russell, R.L., Pearson, M.N. and Rohrmann, G.F. (1993) A baculovirus encoded 16 kDa glycoprotein localizes near the nuclear membrane of infected cells. *Virology* **192**, 386-390

Gross C.H., Russell R.L.Q. and Rohrmann G.F. (1994) The Orgyia pseudotsugata baculovirus p10 and polyhedron envelope protein genes, analysis of their relative expression levels and role in polyhedron structure. *J. Gen. Virol* **75**, 1115-1123

Guarino, L. A. and Summers, M. D. (1986) Functional mapping of a trans-activating gene required for expression of a baculovirus delayed-early gene. *J. Virol* **57**, 563-571

Guarino, L. A., Mistretta, T. A. and Dong, W. (2002) Baculovirus *lef-12* is not required for viral replication. *J Virol* **76**, 12032-12043

Hao, B., Huang, J., Sun, X., Deng, F., Zhang, Y., Wang, H., Chen, H. and Hu, Z. (2009) Variants of open reading frame *bm126* in wild-type *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus isolates exhibit functional differences. *J Gen Virol* **90**, 153-161

Harrison, R. L., Jarvis, D. L. and Summers, M. D. (1996) The role of the AcMNPV 25K gene, "FP25," in baculovirus polh and p10 expression. *Virology* **226**, 34-46 Harrison, R. L., Sparks, W. O. and Bonning, B. C. (2010) *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ODV-E56 envelope protein is required for oral infectivity and can be substituted functionally by *Rachiplusia ou* multiple nucleopolyhedrovirus ODV-E56. *J Gen Virol*. **91**, 1173-1182

Hartman, J.L., Garvik, B and Hartwell, L. (2001) Principles for the buffering of genetic variation. *Science* **291**, 1001-1004

Hawtin, R.E., Arnold, K., Ayres, M.D., Zanotto, P.M., Howard, S.C., Gooday, G.W., Chappell, L.H., Kitts, P.A., King, L.A. and Possee, R.D. (1992) Identification and preliminary characterization of a chitinase gene in the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. *Virology* **212**, 673-685

Herschberger P.A., Dickson J.A. and Friesen P.D. (1992) Site-specific mutagenesis of the 35kilodalton protein gene encoded by Autographa californica nuclear polyhedrosis virus, cell linespecific effects on virus replication. *J. Virol* 66, 5525-5533

Huang, J., Hao, B., Deng, F., Sun, X., Wang, H. and Hu, Z. (2008) Open reading frame *Bm21* of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus is not essential for virus replication in vitro, but its deletion extends the median survival time of infected larvae. *J Gen Virol* **89**, 922-930

Jiang, S.S., Chang, I.S., Huang, L.W., Chen, P.C., Wen, C.C., Liu, S.C., Chien, L.C., Lin, C.Y., Hsiung, C.A. and Juang, J.L. (2006) Temporal transcription program of recombinant *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrosis virus. *J Virol* **80**, 8989-8999

Jiang, Y., Deng, F., Rayner, S., Wang, H. and Hu, Z. (2009) Evidence of a major role of GP64 in group I alphabaculovirus evolution. *Virus Res* **142**, 85-91

Kamita, S. G., Nagasaka, K., Chua, J. W., Shimada, T., Mita, K., Kobayashi, M., Maeda, S. and Hammock, B. D. (2005) A baculovirus-encoded protein tyrosine phosphatase gene induces enhanced locomotory activity in a lepidopteran host. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2584-2589

Katsuma, S., Noguchi, Y., Zhou, C.L., Kobayashi, M. and Maeda, S. (1999) Characterization of the 25K FP gene of the baculovirus *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus, implications for post-

mortem host degradation. J Gen Virol 60, 783-791

Katsuma, S., Kawaoka, S., Mita, K. and Shimada, T. (2008) Genome-wide survey for baculoviral host homologs using the Bombyx genome sequence. *Insect Biochem Mol Biol* **38**,1080-1086

Katsuma, S. and Shimada, T. (2009) *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus ORF34 is required for efficient transcription of late and very late genes. *Virology* **392**, 230-237

Katsuma, S., Kang, W., Shin-i, T., Ohishi, K., Kadota, K., Kohara, Y. and Shimada, T. (2011) Mass identification of transcriptional units expressed from the *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus genome. *J Gen Virol* **92**, 200-203

川俣智美(2016)カイコ核多角体病ウイルス (BmNPV) コア遺伝子 bm67 の機能解析 北海道大学大学院農学院 修士論文

Kelly, B. J., King, L. A., Possee, R. D. and Chapple, S. D. (2006) Dual mutations in the Autographa californica nucleopolyhedrovirus FP-25 and p35 genes result in plasma-membrane blebbing in Trichoplusia ni cells. *J Gen Virol* **87**, 531-536

Kool, M., Ahrens, C.H., Goldbach, R.W., Rohrmann, G.F. and Vlak, J.M. (1994) Identification of genes involved in DNA replication of the Autographa californica baculovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11212-11216

Lange, M. and Jehle, J. A. (2003) The genome of the Cryptophlebia leucotreta granulovirus. *Virology* **317**, 220-236

Li, L., Harwood, S. H. and Rohrmann, G.F. (1999) Identification of additional genes that influence baculovirus late gene expression. *Virology* **255**, 9-19

Li, Z., Li, L., Yu, H., Li, S. and Pang, Y. (2006) Characterization of two homologues of ChaB in *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *Gene* **372**, 33-43

Lin, G. and Blissard, G. W. (2002) Analysis of an *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus lef-6-null virus, LEF-6 is not essential for viral replication but appears to

accelerate late gene transcription. J Virol 76, 5503-5514

Lu, A. and Miller, L.K. (1995) The roles of eighteen baculovirus late expression factor genes in transcription and DNA replication. *J. Virol* **69**, 975-982

Lung, O.Y., Cruz-Alvarez, M. and Blissard, G.W. (2003) Ac23, an envelope fusion protein homolog in the baculovirus *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus, is a viral pathogenicity factor. *J Virol* **77**, 328-339

Marsh, M. and Helenius, A. (2006) Virus entry, open sesame. Cell 124, 729-740

Maeda, S., Kawai, T., Obinata, M., Fujiwara, H., Horiuchi, T., Saeki, Y., Sato, Y. and Furusawa,
M. (1985) Production of human alpha-interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nature*.
315, 592-594

McLachlin, J.R., Escobar, J.C., Harrelson, J.A., Clem, R.J. and Miller, L.K. (2001) Deletions in the Ac-iap1 gene of the baculovirus AcMNPV occur spontaneously during serial passage and confer a cell line-specific replication advantage. *Virus Res* **81**, 77-91

Means J. C. and Passarelli A. L. (2010) Viral fibroblast growth factor, matrix met alloproteases, and caspases are associated with enhancing systemic infection by baculoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 9825-9830

Mikhailov V. S., Rohrmann G. F. (2002) The Baculovirus Replication Factor LEF-1 is a DNA Primase. *J. Virol* **76**, 2287-2297

Milks, M. L., Washburn, J. O., Willis, L. G., Volkman, L. E. and Theilmann, D. A. (2003) Deletion of *pe38* attenuates AcMNPV genome replication, budded virus production, and virulence in Heliothis virescens. *Virology* **310**, 224-234

Nie, Y. and Theilmann, D. A. (2010) Deletion of AcMNPV AC16 and AC17 results in delayed viral gene expression in budded virus infected cells but not transfected cells. *Virology* **404**, 168-179

Ohkawa, T., Washburn, J.O., Sitapara, R., Sid, E. and Volkman, L.E. (2005) Specific binding of *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus occlusion-derived virus to midgut cells of Heliothis virescens larvae is mediated by products of *pif* genes *Ac119* and *Ac022* but not by *Ac115*. *J Virol* **79**, 15258-15264

Ohkawa, T., Volkman, L. E. and Welch, M.D. (2010) Actin-based motility drives baculovirus transit to the nucleus and cell surface. *J Cell Biol* **190**, 187-195

Ono, C., Nakatsukasa, T., Nishijima, Y., Asano, S., Sahara, K. and Bando, H. (2007) Construction of the BmNPV T3 Bacmid System and Its Application to the Functional Analysis of BmNPV he65. *J. insect Biotechnol. Sericol* **76**, 161-167

Ono C., Kamagata, T., Taka, H., Sahara, K. Asano, S. and Bando, H. (2012) Phenotypic grouping of 141 BmNPVs lacking viral gene sequences. *Virus Res* **165**, 197-206

Patmanidi A.L., Possee R.D. and King L.A. (2003) Formation of P10 tubular structures during AcMNPV infection depends on the integrity of host-cell microtubules. *Virology* **317**, 308-320

Pearson, M. N., Russell, R. L. and Rohrmann, G. F. (2001) Characterization of a baculovirusencoded protein that is associated with infected–cell membranes and budded virions. *Virology* **291**, 22-31

Peng, K., van Oers, M.M., Hu, Z., van Lent, J.W. and Vlak, J.M. (2010) Baculovirus per os infectivity factors form a complex on the surface of occlusion-derived virus. *J Virol* **84**, 9497-9504

Rohrmann, G. (2013) The AcMNPV genome, Gene content, conservation, and function. In Baculovirus Molecular Biology (3nd ed.), National Center for Biotechnology Information. Chapter12., pp 247-330. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK49500/

Roncarati, R. and Knebel-Mörsdorf, D. (1997) Identification of the early actin-rearrangementinducing factor gene, *arif-1*, from *Autographa californica* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. *J Virol* **71**, 7933-7941 Rosinski, M., Reid, S. and Nielsen, L.K. (2002) Kinetics of baculovirus replication and release using real-time quantitative polymerase chain reaction. *Biotechnol Bioeng* **77**, 476-480

Simón, O., Williams, T., Caballero, P. and Possee, R.D. (2008) Effects of Acp26 on in vitro and in vivo productivity, pathogenesis and virulence of Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus. *Virus Res* **136**, 202-205

Slack, J.M., Kuzio, J. and Faulkner, P. (1995) Characterization of v-cath, a cathepsin L-like proteinase expressed by the baculovirus *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus. *J. Gen. Virol* **76**, 1091-1098

Smith, G. E., Summers, M. D. and Fraser, M. J. (1983) Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected with a Baculovirus Expression Vector. *Biotechnology* **24**, 434-443

Sparks, W.O., Harrison, R.L. and Bonning B.C. (2011) *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ODV-E56 is a per os infectivity factor, but is not essential for binding and fusion of occlusion-derived virus to the host midgut. *Virology* **409**, 69-76

Sriram, S. and Gopinathan, K.P. (1998) The potential role of a late gene expression factor, lef2, from Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus in very late gene transcription and DNA replication. *Virology* **251**, 108-122

Thiem, S. M. and Miller, L. K. (1989) Identification, sequence, and transcriptional mapping of the major capsid protein gene of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol* **63**, 2008-2018

Vanarsdall, A. L., Okano, K. and Rohrmann G. F. (2006) Characterization of the role of VLF-1 in baculovirus capsid structure and DNA processing. *J. Virol* **80**, 1724-1733

Vlak, J. M., Klinkenberg, F. A., Zaal, K. J., Usmany, M., Klinge-Roode, E. C., Geervliet, J. B., Roosien, J. and van Lent, J. W. (1988) Functional studies on the p10 gene of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus using a recombinant expressing a p10-β-galactosidase fusion gene. *J. Gen. Virol* **69**, 765-776 Wang, L., Salem, T. Z., Campbell, D. J., Turney, C. M., Kumar, C. M. and Cheng, X. W. (2009) Characterization of a virion occlusion-defective Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus mutant lacking the p26, p10 and p74 genes. *J Gen Virol* **90**, 1641-1648

Wang, R., Deng, F., Hou, D., Zhao, Y., Guo, L., Wang, H. and Hu, Z. (2010) Proteomics of the *Autographa californica* Nucleopolyhedrovirus Budded Virions. *J Virol* **84**, 7233-7242

Wang, Y., Wu, W., Li, Z., Yuan, M., Feng, G., Yu, Q., Yang, K. and Pang, Y. (2007) *ac18* is not essential for the propagation of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus. *Virology* **367**, 71-81

Wei, P., Garber, M. E., Fang, S. M., Fischer, W. H. and Jones, K. A. (1998) A novel CDK9associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loopspecific binding to TAR RNA. *Cell* **92**, 451-462

Williams, G. V., Rohel, D. Z., Kuzio, J. and Faulkner, P. (1989) A cytopathological investigation of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus p10 gene function using insertion/deletion mutants. *J. Gen. Virol* **70**, 187-202

Wu, X. and Guarino, L.A. (2003) *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus *orf69* encodes an RNA cap (nucleoside-2'-O)-methyltransferase. *J Virol* **77**, 3430-3440

Wu, C. P., Huang, Y. J., Wang, J. Y., Wu, Y. L., Lo, H. R., Wang, J. C. and Chao, Y. C. (2010) Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus LEF-2 is a capsid protein required for amplification but not initiation of viral DNA replication. *J Virol* **84**, 5015-5124

Xu, H.J., Yang, Z.N., Zhao, J.F., Tian, C.H., Ge, J.Q., Tang, X.D., Bao, Y.Y. and Zhang, C.X. (2008) *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus ORF56 encodes an occlusion-derived virus protein and is not essential for budded virus production. *J. Gen. Virol* **89**, 1212-1219

Yamagishi, J., Isobe, R., Takebuchi, T. and Bando, H. (2003) DNA microarrays of baculovirus genomes, differential expression of viral genes in two susceptible insect cell lines. *Arch Virol* **148**, 587-597

Yoo, S. and Guarino, L. A. (1994) Functional dissection of the *ie2* gene product of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* **202**, 164-172

Yu, M. and Carstens, E.B. (2012) *Choristoneura fumiferana* multiple nucleopolyhedrovirus LEF-3-P143 complex can complement DNA replication and budded virus in an AcMNPV LEF-3-P143 double knockout bacmid. *J Gen Virol* **93**, 383-388

Yuan, M., Huang, Z., Wei, D., Hu, Z., Yang, K. and Pang, Y. (2011) Identification of Autographa californica nucleopolyhedrovirus ac93 as a core gene and its requirement for intranuclear microvesicle formation and nuclear egress of nucleocapsids. *J Virol* **85**, 11664-11674