

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 藤 本 浩 文

転移因子 (transposable elements) を生物ゲノムへ人為的に挿入する実験系を構築し、転移因子の宿主ゲノムへの挿入機構を明らかにすることは、あらゆる生物ゲノム中に存在し現在もなお一部で転移を繰り返している多種多様な転移因子の生物ゲノムへの侵入機構を解明する上で、大きな意義があり、形質転換生物作成のための強力な道具を提供することにもなる。真核生物における転移因子の挿入機構に関する研究は、主に酵母を宿主とした実験系で進められているが、解析に適した宿主と導入ベクターが存在しない等の理由から、他の生物種においてはほとんど行われていない。本研究は、カイコを用いて、転移因子の宿主ゲノムへの挿入機構を解明するための実験系の構築を試みたものであり、論文は3章からなる。

第1章 実験系の構築

転写因子は、宿主ゲノムに部位特異的に挿入し、転写によってmRNAが生成されなければ転移活性を持たないRNA介在型である、カイコ由来のnon-LTR型レトロトランスポゾンR2Bmを用いた。R2因子は、多くの昆虫種ゲノムのrRNA遺伝子28S領域に部位特異的な挿入が確認され、配列内部に存在する単一のORFがコードするタンパク質がTPRT (Target Primed Reverse Transcription) 活性を有していることがin vitroの実験系において判明している。宿主には、ゲノム中にR2Bmを持たない培養細胞C65を用いた。導入ベクターとしては、既に昆虫細胞における遺伝子発現系として実用化されているバキュロウイルスAcNPV (Autographa californica Nuclear Polyhedrovirus) を用いた。

R2Bmは、カイコN4系統ゲノムよりクローニングし、全塩基配列を決定した。その配列を、酵母のR2Bmの塩基配列と比較し、5'UTR, ORF, 3'UTRの各構成配列がほぼ完全に保存されていることを確認した。次に、C65細胞におけるrRNA遺伝子28S領域のR2Bm挿入部位近傍の配列がカイコN4系統ゲノム中のR2Bm挿入部位前後の配列と完全に一致することを確認し、R2Bmが部位特異的挿入を行う際に必要な認識配列が保存されていると判断した。C65培養細胞にAcNPV野生株を感染させ、細胞増殖率は低下するが、ポリヘドリンプロモーターを用いた遺伝子発現系が転移因子挿入機構の解析に利用できることを確認した。

以上から、組換えAcNPVをベクターとして、R2BmをC65培養細胞核内に導入し、R2BmのmRNAおよびタンパク質を発現させる実験系が構築できると判断し、R2Bmの配列を含む種々の組換えAcNPVを作成し、これらの組換えAcNPVをC65培養細胞に感染させ、細胞ゲノムへの挿入をPCRによって確認することにした。

第2章 R2Bm配列3'側の挿入様式

PCRの結果、R2Bmが挿入していないrRNA遺伝子配列の増幅が優先され、挿入の確認が困難であったので、R2Bmの挿入をR2Bmの3'端と5'端とにわけて観察した。その結果、R2Bmの3'側の挿入にはR2Bmタンパク質の翻訳が可能なORFと3'UTR全長が必須であると判断された。また、R2Bm単独では3'側の挿入のみがおこり5'側をゲノムに挿入する能力がないことが判明し、5'側の挿入には宿主細胞側の機能が必要であることが示唆された。そこで、R2Bm配列の5'上流にrRNA遺伝子28S領域のR2Bm挿入部位上流の配列を付加した配列をC65細胞に導入した結果、すべての場合で3'側の挿入活性とは無関係に5'側の挿入が観察された。

次に、R2Bm全長の挿入を確認するために、PCRの増幅産物に対して、R2Bmの配列をプローブにサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、R2Bm全長に28S側の配列を付加した場合にのみ、R2Bmの全長の挿入を示すシグナルが検出された。従って、R2BmをC65細胞ゲノムに挿入するには、R2Bmタンパク質、3'UTR配列全長、5'上流領域、および、rRNA遺伝子28S領域中のR2Bm挿入部位上流、の配列が必要であることが示唆された。このとき、R2Bmの5'側は宿主細胞側のDNA修復機能を利用した宿主ゲノムとの相同的組換えによって、3'側はR2BmタンパクによるTPRT反応によって挿入したものと考えられた。

第3章 実験系の応用

以上の推論の検証のため、R2BmORFのみの配列を導入した組換えAcNPVと、5'端上流にrRNA遺伝子R2Bm挿入部位上流の600bpsの配列を付加し、3'UTR全長のORF内に1塩基欠損をもつ配列を導入した組換えAcNPVの2つのベクターを、C65培養細胞に共感染させて、R2Bm配列全長が培養細胞ゲノムへ挿入されるか否かを検証した。その結果、両ウイルスを混合して細胞に感染させた場合には3'端の挿入が明瞭に観察され、サザンハイブリダイゼーションの結果から、混合ウイルス感染細胞では、R2Bm全長の挿入が確認された。

以上要するに、本論文は、RNA介在型であるカイコ由来のnon-LTR型レトロトランスポゾンR2BmをC65細胞にAcNPVをベクターとして導入する実験系を確立し、転移因子をin vivoで宿主ゲノムに導入することが可能であることを示したものであり、転移因子の転移機構の解明に、また形質転換生物を作成するための道具の開発に幅広い応用が期待される。よって、審査委員一同は、本論文が、博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。