

# 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 富田 秀一郎

本研究は、カイコ個体へ遺伝子を導入し一過的および永続的に発現されるシステムの開発を目的とし、以下に示す三つの方法でその可能性を検討したものである。

## 1. バキュロウイルス発現系の改良

カイコ核多角体病ウイルスは、すでに外来遺伝子導入発現用のベクターとして利用されている。しかし、従来のベクターはポリヘドリン遺伝子を外来遺伝子で置換するため、核多角体が形成されず、経口感染ができない、という欠点があった。本研究では、ポリヘドリン遺伝子の代わりにp10 という後期遺伝子のプロモーターの下流に外来遺伝子を組み換えることのできるトランスファーベクターを構築し、試みにルシフェラーゼ遺伝子を組み換えたウイルスを作出した。組換えウイルスは、ポリヘドリン遺伝子を組み換えた場合に比して遜色のないタンパク質合成能を示し、またウイルスの感染性や安定性も野生型ウイルスに匹敵するものであった。このシステムはウイルスの経口接種による遺伝子発現に利用できると考えられる。

## 2. カイコゲノムからの新規トランスポゾンの単離

マリナー (mariner) は、昆虫を中心に多くの動物で発見されているトランスポゾンである。縮重プライマーによるPCRを利用してカイコのゲノムDNA からマリナーに似た配列 BmMLEを増幅することができた。サザン解析の結果、BmMLE は、カイコのゲノムに約90コピー存在すると推定され、そのほとんどは挿入/欠失変異や点変異によって転移酵素のORF が崩れていた。しかし、複数の配列を継ぎ合わせることで完全な転移酵素のORF を推定することができた。BmMLE は、特定の遺伝子をカイコ

へ導入するベクターとしては不向きだが、この転移酵素を別のベクターでカイコへ導入することにより、突然変異を高頻度で誘発することができるものと考えられ、トランスポゾンタギング法など新規な遺伝子工学技術へ応用できる可能性がある。

### 3. 配列特異的組換え酵素の利用

FLP リコンビナーゼは出芽酵母の組換え酵素であり、FRT と呼ばれる塩基配列を特異的に認識してDNA の切断と再結合を行う。FLP-FRT のシステムはショウジョウバエなどで人為的な組換えを誘導する目的に利用されている。カイコの培養細胞および卵においてFLP-FRT のシステムが動いて組換えが起こるか否かを、組換え酵素をコードするヘルパープラスミドと $\beta$ ガラクトシダーゼをコードするインジケータープラスミドのコトランスフェクションによって検定した。その結果、培養細胞・卵ともに10～20%と高い切り出し効率が観測され、哺乳動物細胞で得られる値と遜色がなかった。したがって、FLP リコンビナーゼは、カイコにおいてもDNA の組換えを触媒するものと推定され、たとえばBmNPV の組換え効率を上昇させることなど、カイコへの遺伝子導入のいろいろな場面に利用できると考えられる。

以上要するに、本研究は、カイコ個体への遺伝子導入に関し、後期遺伝子p10 のプロモーターを利用してバキュロウイルスによる一過的な発現システムの改良を図り、同時に永続的発現システムの開発のために新規のトランスポゾン及び配列特異的組換え酵素の利用を検討したもので、学術上、応用上価値ある知見を得ている。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。