

論文審査の結果の要旨

氏名 川島 朋子

本論文は、3章から構成され、第1章はテロメア特異的 LINE・SART1 および 28S rDNA 特異的 R1 の組換え AcNPV を用いた昆虫細胞・個体への外来遺伝子の導入、第2章はメダカ由来の 28S rDNA 特異的 LINE R2OI (R2OI)とカイコ由来の R2Bm (R2Bm)の組換え AcNPV を用いた昆虫細胞での転移活性、第3章は VSVG 組換え AcNPV を利用した R2OI と R2Bm のヒト細胞での転移活性について述べられている。

第1章において、論文提出者は一般にトランスジェネシスが困難であることが知られる昆虫に着目し、新たな遺伝子導入ツールの候補として、マーカー遺伝子を導入したバキュロウイルス介在型 SART1 および R1 を作製し、ウイルス感染個体の染色体における転移の境界部分の塩基配列の解析から、生体の細胞においても SART1 および R1 の転移の標的特異性が維持されることを示した。さらに SART1 については、非自律的な二つのウイルスの共感染によって転移のコントロールが可能で、ウイルスの構築も簡便となる、より実用的な導入系の開発に成功した。さらに、AcNPV が宿主外のカイコにも毒性を示すことを明らかにし、4系統・計 3300 匹以上のカイコに注射を行い、ウイルス濃度と、転移・生存の効率の関連を詳細に調べ、実際にバキュロウイルス介在型 LINE を用いてトランスジェニック昆虫の作出が可能であることを示した。また、AcNPV の感染性については、鱗翅目昆虫、膜翅目昆虫や直翅目昆虫にも感染することを明らかにし、バキュロウイルス介在型 LINE の転移システムが初期胚へのインジェクションなどが困難な昆虫での遺伝子導入に応用に可能となることを初めて示した。このように全く新しい遺伝子導入系を構築し、実際にその応用性を実験的に示したことは高く評価できる。

第2章では、種をこえた LINE の転移活性を調べるために、近年、新たに節足動物から爬虫類まで広範な生物に存在することが示された 28S rDNA 特異的 LINE・R2 に着目し、鱗翅目昆虫由来の Sf9 細胞への転移を解析した。メダカ由来の R2OI とカイコ由来の R2Bm それぞれの重要なドメインの変異体や、

キメラコンストラクトを計 15 種作製し、R2 の構造と転移活性の関連を考察した。その結果、系統的に離れたメダカとカイコの R2 の各ドメインが標的特異的に転移する際に共通の機構を維持しており、交換可能であることを初めて示した。また、R2OI は R2Bm と異なり、ORF の上流に位置する 5'UTR の配列を含む全長の発現が、昆虫細胞への標的特異的転移に必須であることを明らかにした。R2OI が系統的に大きく離れた昆虫細胞へも転移した結果は、R2OI は種特有の宿主因子に依存せず、生物間で共通の因子および共通の機構によってホストの染色体に転移することを示す興味深いものである。この知見は、R2 のベクターとしての汎用性と利用性の高さを示唆する。さらに論文提出者はこれまで知られていなかった、R2 の 5'UTR の転移促進的な機能を見出し、LINE の 5'UTR の機能が個々で大きく異なることを明らかにした。

第 3 章では、哺乳類ヒト細胞に着目して転移実験を行った。ヒト細胞での R2OI の発現に用いる AcNPV について、その改変の必要性を詳細に検証し、水疱性口内炎ウイルスのエンベロープ (VSVG) の組換え AcNPV を新たに構築し、実際にヒト細胞内での R2OI を高発現するベクターの構築に成功した。構築した R2OI の転移システムを利用して、R2OI がヒト細胞内においても 28S rDNA 内の標的配列に正確に転移することをホストの染色体の詳細な解析により証明している。これらの結果から、AcNPV が広範な生物種の細胞に感染・発現すること、R2OI が系統的に離れた種においても標的特異的に転移することが示され、この二つの組み合わせにより、標的特異的遺伝子導入を可能とする新しい遺伝的ツールの基礎を構築した点が高く評価される。このシステムは、ヒトの遺伝子治療や一般の動物の遺伝子導入法の従来の問題点を解決する、安定で安全な汎用性の高い遺伝子導入法に応用が可能であり、今後の実用化がおおいに期待される。

なお、本論文第 1 章は藤原晴彦博士、小嶋徹也博士、二橋亮博士、長内美瑞子氏、第 2・3 章は藤原晴彦博士との共同研究であるが、論文提出者が主体となって解析および検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。