



|                     |                                                                                                                           |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | バキュロウイルスの遺伝子間相互作用に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]                                                                                     |
| Author(s)           | 武田, ひとみ                                                                                                                   |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                                                     |
| Degree Name         | 博士(農学)                                                                                                                    |
| Dissertation Number | 甲第12708号                                                                                                                  |
| Issue Date          | 2017-03-23                                                                                                                |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/65660">https://hdl.handle.net/2115/65660</a>                                         |
| Rights(URL)         | <a href="https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/">https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/</a> |
| Type                | doctoral thesis                                                                                                           |
| File Information    | Hitomi_Takeda_abstract.pdf, 論文内容の要旨                                                                                       |



## 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称：博 士（農学）

氏名： 武田 ひとみ

### 学 位 論 文 題 名

#### バキュロウイルスの遺伝子間相互作用に関する研究

##### 【背景と目的】

バキュロウイルス科核多角体病ウイルス属に属するウイルス (Nucleopolyhedrovirus; NPV) は感染すると宿主細胞核内にウイルス粒子を包埋した多角体を形成するという特徴を持つ。この多角体タンパク質 (Polh) 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利用されている。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。しかし、バキュロウイルスが Polh の 高発現を達成するメカニズムには不明な点が多い。NPV は 100 以上の遺伝子を持っており、Polh 発現につながる増殖過程においてウイルス遺伝子間に複雑な相互作用・制御機構が存在することが考えられている。今後更に有用な NPV ベクター系を開発するためには、ウイルスの増殖機構とそこに組み込まれた Polh 高発現に関わるウイルス遺伝子の相互作用についての理解が不可欠である。

BmNPV の遺伝子間相互作用を解析するためにはウイルスのゲノムを効率良く改変するシステムが必要である。近年、本研究室で BmNPV の標準株である BmNPV T3 株 (Gomi *et al.*, 1999) を用いてバクミドシステムが確立された (Ono *et al.*, 2007)。まず、これに  $\lambda$  red recombination システム (Datsenko and Wanner, 2000) を導入することで、効率的にウイルス遺伝子をノックアウトすることを可能にし、こ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の増殖能を解析した結果、86 個の遺伝子については単独で欠損してもカイコ培養細胞 (BmN) での Polh 発現と子孫ウイルスの生産に大きな影響を与えない (Type-A) 非必須遺伝子であることが明らかになった (Ono *et al.*, 2012)。しかし、これらの中には、NPV において広く保存されている遺伝子も含まれており、Type-A 遺伝子がウイルス増殖に不要であることは考えにくい。また、遺伝的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おり (Hartman *et al.*, 2001; Dixon *et al.*, 2009)、これらの非必須遺伝子の相互作用がウイルス増殖にきわめて重要な役割を担っている可能性は否定できない。そこで、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、これら単

独ではウイルスの増殖に重要ではない遺伝子群がそれらの相互作用を通して増殖に貢献している可能性について解析を進めた。

#### 【結果】

まず、Type-A 遺伝子が隣接して存在するゲノム領域 (Type-A 遺伝子クラスター) をバクミドシステムと  $\lambda$  red-recombination システムを用いて抗生物質耐性遺伝子と置換した複数遺伝子ノックアウトウイルスを作製した。これらウイルスゲノムの 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) の発現をウイルス増殖の指標にし、遺伝子ノックアウトがウイルス増殖に与える影響について解析を進めた。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 *bm11~bm14* 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。しかし、これら 4 遺伝子間に関する既知の機能からは、それらの機能的関連性を推定することはできなかった。そこで、*bm11~bm14* の 4 遺伝子について隣接する 2 遺伝子をノックアウトしたウイルスを作製し解析を進めると、*bm12* と *bm13* はそれぞれを単独でノックアウトしても EGFP 発現量に影響を及ぼさないが、両方をノックアウトしたウイルスは EGFP 発現量が野生型の約 10 分の 1 に低下するという結果が得られた。したがって、この 2 遺伝子間には BmNPV の Polh 発現を支える増殖過程に重要な影響を与える相互作用が存在すると考えられた。次にこの相互作用の詳細を調査するため、*bm12* と *bm13* を単独あるいは両方ノックアウトしたウイルスの遺伝子発現についてトランスクリプトーム解析を行った。すると、両方をノックアウトした時のみ発現量が大きく低下する遺伝子が二つ (*bm67*、*lef2*) 存在しており、これらはいずれも必須遺伝子であった。そして、ウイルスに *bm67* または *lef2* を追加導入することで、EGFP 発現量が野生型と同等まで回復することが判明した。

#### 【まとめ】

本研究では NPV の非必須遺伝子間にウイルスの増殖能に重大な影響を及ぼす遺伝的相互作用が存在すること、そして *bm12* と *bm13* 間には必須遺伝子である *bm67* と *lef2* の十分な発現を維持する補償的な相互作用が存在することを初めて明らかにした。ここでの結果は、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。