HOKKAIDO UNIVERSITY

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	https://hdl.handle.net/2115/65660
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Hitomi_Takeda_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博　士（農学）　　氏名　武田 ひとみ

審査担当者　主　査　教　授　伴　戸　久　徳
副　査　教　授　増　田　　税
副　査　准教授　浅　野　眞一郎
副　査　講　師　中　原　健　二
副　査　助　教　佐　藤　昌　直

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

本論文は 1 章からなり、図 18、表 10、文献 87 を含む頁数 68 の和文論文であり、別に参考論文 2 編が添えられている。

バキュロウイルス科に属する核多角体病ウイルス（nucleopolyhedrovirus: NPV）は、宿主昆虫細胞に感染するとウイルス粒子を包埋した多角体を細胞核内に大量に形成する特徴を持つ。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は、既に多様な分野で利用されている。今後更に有用なウイルス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。しかし、バキュロウイルスの増殖機構、特に増殖過程における遺伝子間の相互作用については不明である。そこで、本研究では、バキュロウイルスベクターの中でも、特に発現効率が高いことで知られているカイコ核多角体病ウイルス（*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus: BmNPV）について、増殖過程におけるウイルス遺伝子間の相互作用について理解を深めることを目的とした。

これまでに、BmNPV の標準株である BmNPV T3 株を用いて、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、60%以上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非必須遺伝子であることを明らかにした。しかし、これらの中には、バキュロウイルスゲノムに広く保存されている遺伝子も含まれており、非必須遺伝子がウイルス増殖に不要であることは考えにくく、これら非必須遺伝子が相互作用を通してウイルス増殖に極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、本研究では非必須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。まず、非必須遺伝子クラスターの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の増殖は、コントロールのウイルスよりも著しく低くなることを見出し、これらの非必須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を示した。次に、*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て解析を進め、*bm11* と *bm12*、*bm12* と *bm13*、そして *bm13* と *bm14* の間にはそれぞれ相乗的、補償的、そして相加的な相互作用が存在し、これらの相互作用が BmNPV の増殖過程に大きな影響を与えることを明らかにした。しかし、これら4遺伝子の機能に関する既知の情報からは、それらの機能的関連性や相互作用機構を推定することはできなかった。

そこで、*bm12* と *bm13* の間に存在し、BmNPV の増殖過程に重大な影響を与える補償的相互作用についてその詳細を調査するために、*bm12* と *bm13* の一方あるいは両方をノックアウトしたウイルスの感染細胞における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。その結果、*bm12* 単独ノックアウトウイルスと *bm13* 単独ノックアウトウイルスは、いずれもコントロールウイルスと同等の増殖能を示すにもかかわらず、感染細胞における両ウイルスの遺伝子発現様態は大きく異なることが明らかとなった。また、両遺伝子をノックアウトした場合にのみ発現量が大きく低下する遺伝子を2つ（*bm67*、*lef-2*）同定し、それらは何れも必須遺伝子であったことから、これらが *bm12* と *bm13* をノックアウトしたときに増殖能が低下する原因遺伝子であると推定した。この点を明らかにするために、*bm12* と *bm13* の両方をノックアウトしたウイルスに *bm67* あるいは *lef2* を追加導入し、増殖能が野生型と同等レベルまで回復することを示した。

本研究から、BmNPV の非必須遺伝子は他のウイルス遺伝子の発現に多様な影響を与えること、非必須遺伝子間にはウイルスの増殖に重大な影響を及ぼす遺伝的相互作用が存在する場合があり、*bm12* と *bm13* の2遺伝子間には必須遺伝子 *bm67* と *lef-2* の発現を担保する補償的相互作用が存在していることが明らかとなった。これらの結果は、BmNPV の増殖におけるウイルス遺伝子発現様態の柔軟性と頑強性を理解する上で新たな視点を提供するものであり、BmNPV ベクターの改良を目的としたウイルスゲノム改変を進める上でも不可欠な知見である。よって、審査員一同は、武田ひとみが博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。