HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Elucidation of the upstream gene regulatory network to activate the Polyhedrin promoter in Bombyx mori nucleopolyhedrovirus [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	中西, 登志紀
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第15767号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92649
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	NAKANISHI_Toshiki_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　中西　登志紀

審査担当者　主　査　准教授　佐 藤 昌 直
副　査　教　授　浅 野 眞一郎
副　査　教　授　尾之内　均

学位論文題名

Elucidation of the upstream gene regulatory network to activate the Polyhedrin promoter in Bombyx mori nucleopolyhedrovirus
（カイコ核多角体ウイルスのポリヘドリンプロモーター活性化上流遺伝子の制御ネットワークの解明）

本論文は英文 104 頁、図 16、表 12 を含む 2 章から構成されており、参考論文 1 編が付されている。

カイコ核多角体病ウイルスは近年では新型コロナウイルスに対するサブユニットワクチンとして国内企業が開発に利用するなど、組換えタンパク質発現系として利用されるウイルスである。応用利用が進んでいる一方で基礎的な理解は十分ではなく、ウイルスベクターの分子生物学的改良につながる研究はなされていない。本研究は組換えタンパク質発現に利用されるポリヘドリン遺伝子プロモーターの活性化機構の基礎的理解に取り組んだものである。カイコ核多角体病ウイルス感染最終期に発現する構造タンパク質ポリヘドリンの遺伝子発現制御ネットワークの解明を研究の目的とし、感染細胞中のウイルス遺伝子制御を可視化して分析可能な実験・解析系を構築している。本研究の成果として、DNA ウイルスであるカイコ核多角体病ウイルスがどのような転写制御ネットワークを持っているかを明らかにしている。

第 1 章では、上記研究目的に向けての技術開発に取り組んだ成果を報告している。ウイルス遺伝子発現可視化に用いる分子生物学的ツールの開発を行い、薬剤依存的な遺伝子発現（タンパク質分解）制御システムである Small molecule assisted shut-off (SMASh)システムのカイコ細胞への利用を検討した。SMASh はこれまでに哺乳類、酵母での使用実績があったが、昆虫での使用や適合性を検証した初めての研究である。その結果、SMASh はカイコ細胞でも薬剤依存的にタンパク質分解が可能であること、加えてタンパク質分解促進シグナルとして汎用されているＰＥＳＴ配列がカイコ細胞でも利用可能であることを明らかにしたことを報告している。

第２章では、ポリヘドリン遺伝子プロモーターとポリヘドリンプロモーター活性制御の必須遺伝子プロモーターの２つのプロモーターを同時に観察できるデュアルレポーターウイルスを構築し、タイムラプス観察と組み合わせ、1 細胞レベルで 2 色の蛍光プロファイルを取得できるようにした。それらのプロファイルを統計解析し、10 種類の必須遺伝子の中からポリヘドリンプロモーター活性との相関が高いマーカー遺伝子を同定したと述べている。また、ウイルス遺伝子ノックダウン系と当該レポーター観察系を組み合わせ、各必須遺伝子プロモーター活性化プロファイルの変化を解析することで、必須遺伝子間の制御ネットワークをモデリングし、ポリヘドリンプロモーター活性制御ネットワークには 2 種類の制御システムが推定されること、ウイルスの DNA ヘリカーゼ p143 が２つの制御システムに共通する鍵となる遺伝子である可能性について議論している。本章ではさらに p143 の発現を制御する上流遺伝子探索のために、カイコ核多角体病ウイルス全 143 遺伝子をそれぞれノックダウンし、p143 プロモーター活性化プロファイルの変化から 54 遺伝子が p143 の上流遺伝子として同定している。それぞれの制御パターンをクラスタリングによって分類することで、ウイルスのゲノム複製に関連するシステムの関与を記載している。

総合討論では各章で開発された二つの解析システムを組み合わせることで期待される成果について議論している。
中西氏は、レポーターウイルスの使用、タイムラプス観察、各種の統計解析を組み合わせ、感染進行に伴うウイルス遺伝子発現制御関係の動態を制御ネットワークの動態として同定することに世界でも初めて成功している。さらに中西氏による本研究の発展性についての議論から、本研究における発見はポリヘドリンプロモーター制御の理解に遺伝子ネットワークとしての理解を加えたと新規性を認め、本研究の発展性、独創性のある研究と判定した。

よって、審査員一同は、中西登志紀が博士（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。