

氏 名	山 尾 眞 史
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 甲 第 184 号
学位授与の日付	平成 11 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科・専 攻	工芸科学研究科 機能科学専攻
学位論文題目	バキュロウイルスを用いたカイコの形質転換系に関する研究
審 査 委 員	(主査) 教 授 小 田 耕 平 教 授 古 澤 壽 治 教 授 原 三 郎 助教授 森 肇

論 文 内 容 の 要 旨

近年、動植物に外部から遺伝子を導入し、より生産性を高めたり、新たな機能を付加する形質転換に関する研究はめざましい進歩を遂げつつある。しかし、これまでの研究においても、カイコの形質転換については成功には至っていなかった。カイコの形質転換が実現できると、より機能性に富んだ絹タンパク質(フィブロイン)を作り出したり、ワクチンなどの有用タンパク質をカイコ体内で大量に生産できる新たなカイコを作出できるようになる。

本研究では、カイコ以外の鱗翅目昆虫に感染するバキュロウイルス *Autographa californica nucleopolyhedrovirus* (AcNPV) がカイコにおいて増殖するが、致死させないという特徴を生かして、このウイルスをベクターに用いたカイコの形質転換系の作出を行った。本研究の特徴は、カイコが持つ遺伝子を標的として、そこに外来遺伝子を導入し、発現させるといった遺伝子ターゲティングに成功した点にある。

本論文は、4つの章から構成されている。

第1章では、カイコを含むこれまでの昆虫における形質転換の現状について述べた。

第2章では、AcNPVをベクターに用いたカイコへの外来遺伝子の導入を行った。AcNPVをカイコ5齢幼虫に接種したところ、①ウイルスの増殖は極めて遅く、接種後20日目以降でウイルスの増殖が確認され、②AcNPV接種幼虫は蛹化するが、蛹での発育は停止し、エクジステロイドの投与によって発育を再開できることを明らかとした。ショウジョウバエのヒートショックプロテイン・プロモーターの制御下で発現するルシフェラーゼ遺伝子をAcNPVに組み込んだリコンビナントウイルスを作製した。このウイルスを5齢幼虫に接種し、ルシフェラーゼ遺伝子がカイコゲノムに組み込まれることを明らかとした。しかし、ルシフェラーゼ遺伝子の発現はカイコの交配を繰り返すと減少した。これらのことから、AcNPVをベクターに用いることによってカイコの形質転換が可能であることが示されたが、外来遺伝子をより安定に発現させる必要があることが明らかとされた。

第3章では、フィブロイン遺伝子への緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein, GFP) 遺伝子のターゲティングを行った。フィブロイン遺伝子にGFP遺伝子を挿入したキメラ遺伝子を作製し、このキメラ遺伝子をAcNPVに組み込んだリコンビナントウイルスを作製した。このウイルスを5齢幼虫に接種し、染色体上のフィブロイン遺伝子とキメラ遺伝子が相同組み換えを起こすことによって、GFP遺伝子がフィブロイン遺伝子にターゲティングされた個体を選抜した。このGFP遺伝子がターゲティングされたカイコでのGFP遺伝子の発現を検討したところ、GFPはフィブロインとの融合タンパク質として後部絹糸腺で合成され、さらに絹糸として吐糸されていることを明らかとした。以上のことから、AcNPVをターゲティングベクターとして用いることにより、標的とする遺伝子座位に外来遺伝子を相同組み換えに

よってターゲティングできることを明らかとした。これはカイコの遺伝子改変が可能であることを意味し、今後各種プロモーターを利用した有用タンパク質の持続的、かつ大量生産が可能になることを示している。

第4章の総合考察においては、遺伝子ターゲティングによるカイコ個体を用いた有用物質生産系、ノックアウトカイコの作製といった、カイコの遺伝子ターゲティングがもたらす今後の展望について述べた。

論文審査の結果の要旨

本論文は、バキュロウイルスの一つである AcNPV をベクターに用いたカイコでの遺伝子ターゲティングに関する研究であり、このような成果は他の昆虫においては類をみない、重要な結果を含んだ学術的価値の高い論文である。本研究成果により、AcNPV をベクターに用いたカイコでの遺伝子ターゲティングによって、カイコのプロモーターを利用した有用タンパク質の持続的、かつ大量生産が可能であることを示した。また、遺伝子ターゲティングによって特定の遺伝子を欠失させたノックアウトカイコを作製することにより様々な遺伝子の機能解析、特に胚発生、神経系のネットワークの構築、生体防御機構の解析といった様々な生命現象の解明にも貢献するものと考えられる。

本論文の内容の一部は、以下に示す2つの国際的学術雑誌に公表されている。

1. H. Mori, M. Yamao, H. Nakazawa, Y. Sugahara, N. Shirai, F. Matsubara, M. Sumida, T. Imamura. Transovarian transmission of a foreign gene in the silkworm, *Bombyx mori*, by *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Bio/Technology* 13: 1005-1007 (1995)
2. M. Yamao, N. Katayama, H. Nakazawa, M. Yamakawa, Y. Hayashi, S. Hara, K. Kamei, H. Mori. Gene targeting in the silkworm by use of a baculovirus. *Genes & Development* 13: 511-516 (1999)