

学位論文審査の結果の要旨

氏名	光武宏
審査委員	<p>主査 小林 淳 (印)</p> <p>副査 竹松 葉子 (印)</p> <p>副査 東 政明 (印)</p> <p>副査 尾添 嘉久 (印)</p> <p>副査 内海 俊彦 (印)</p>
題目	Regulation of gene expression in cultured insect cells using <i>piggyBac</i> transposon (<i>piggyBac</i> トランスポゾンを用いた昆虫培養細胞における遺伝子発現制御)
審査結果の要旨 (2,000字以内)	
<p>昆虫培養細胞は、バキュロウイルス遺伝子発現系の宿主として用いられており、真核生物特有の翻訳後修飾などにより天然の遺伝子産物と同等な構造と機能を有する組換えタンパク質を大量生産できるので、大腸菌の発現系では生産困難なヒトなど高等真核生物由来の有用タンパク質生産に頻繁に利用されている。しかしながら、ウイルス感染による細胞の機能障害は、しばしばタンパク質の構造の不均一化や不溶化などの弊害をもたらし、また、昆虫と哺乳類におけるN型糖鎖の微細な構造の違いにより、昆虫細胞で生産した糖タンパク質が哺乳類の生体内でアレルゲンあるいは異物として認識され、機能を発揮できないことなどが報告されている。これらの問題点は、昆虫培養細胞のゲノムに外来遺伝子を導入し、高いタンパク質生産効率と哺乳類型の翻訳後修飾特性を有する形質転換細胞を作製すれば克服できると考えられる。形質転換のためのツールとしては、すでに、さまざまなトランスジェニック昆虫の作製に <i>piggyBac</i> トランスポゾンを変更したベクターが利用され、その有効性が証明されている。そこで本研究では、昆虫培養細胞における代謝特性の改変ならびに有用タンパク質生産に役立つ遺伝子操作技術の開発を目的として、(1) カイコ卵巣由来 BmN4 細胞を形質転換するための <i>piggyBac</i> トランスポゾンシステムの改良を行い、(2) 形質転換細胞のクローン間における導入遺伝子の発現レベルの違いとそのメカニズムの解析を行い、(3) 新たに明らかとなった piRNA による導入遺伝子発現抑制メカニズムを基盤とする内在性遺伝子の発現抑制技術を考案した。</p> <p>(1) 導入遺伝子を安定に持続発現する形質転換細胞を効率よく得るために、トランスジェニックカイコの作製に用いられた <i>piggyBac</i> ドナープラスミドに選抜用のピュー</p>	

ロマイシン耐性遺伝子を挿入し、また、転移酵素の供給源として使用されるヘルパープラスミドを mRNA に変更する改良を行った。その結果、転移酵素活性の残存期間が大幅に短縮し、導入遺伝子再転移の可能性がなくなったことにより、ピューロマイシン選抜後の形質転換細胞において導入した EGFP 遺伝子の発現を安定化させることができた。

- (2) 形質転換細胞をクローニングした結果、EGFP の発現レベルが異なるクローン（高発現～無発現）を分離できた。クローン間の発現レベルの差異は、主に導入遺伝子のコピー数と染色体挿入位置が原因と考えられたが、無発現クローンに関しては、何らかの遺伝子発現抑制メカニズムの関与が示唆された。そこで、無発現クローンの転写産物を分析した結果、導入遺伝子に対する piRNA が生成されており、*piggyBac* が第 11 染色体の内在性 piRNA クラスタ（*torimochi*）領域に挿入されたことにより、融合アンチセンス RNA が転写され、piRNA 経路による EGFP 遺伝子の抑制が生じていることを明らかにした。
- (3) 新たに明らかとなった piRNA による導入遺伝子発現抑制メカニズムに基づき、*piggyBac* を用いて内在性遺伝子の発現を抑制する新技術を考案した。実際に、カイコの幼若ホルモン受容体遺伝子の候補であるメソプレン耐性遺伝子ホモログ 1 および 2（*BmMet1* および *BmMet2*）のいずれかの完全長 cDNA を挿入した *piggyBac* ドナープラスミドを用いて得られた形質転換細胞クローンの中に、*BmMet1* および *BmMet2* 遺伝子のセンス RNA を合成せずにアンチセンス RNA を合成するものがそれぞれ見つかかり、piRNA による発現抑制が示唆された。今後、さらなる解析により発現抑制が確認できれば、*BmMet1* および *BmMet2* の機能検証に役立つ実験系が構築できるとともに、この新技術を応用した様々な内在性遺伝子の抑制も可能になると期待される。

以上のように、本論文は、*piggyBac* トランスポゾンシステムの改良により、導入遺伝子を安定に持続発現する形質転換 BmN4 細胞の作製法を確立し、導入遺伝子の発現レベルの異なる形質転換細胞のクローニングに成功するとともに、導入遺伝子を発現しないクローンでは piRNA を介した発現抑制が起こっていることを世界で初めて発見し、そのメカニズムの一端を解明した。さらに、その新知見を基盤として内在性遺伝子の発現抑制に *piggyBac* を利用する新技術を考案し、その有効性を示唆する結果を得た。これらの基礎ならびに応用昆虫学に関する学術的に重要な内容で構成される本学位論文は、博士学位として十分な価値を有すると判定した。