

論文の内容の要旨

論文題目 カイコへの遺伝子導入に関する研究

氏名 富田 秀一郎

今日の分子生物学的研究は、主にモデル生物を使って得た知見を一般化できるかどうかを検証する形で進んでおり、モデル生物には外来遺伝子の導入系が求められている。言いかえれば外来遺伝子導入系の整備された種がモデル生物として頻用されている。カイコは養蚕業との関わりで長年にわたって人間の手が加えられ他に類を見ないほど家畜化された昆虫であるが、同時に多くの生理学および遺伝学的知見が集積した結果、モデル生物として利用されるようになった。遺伝子導入系には一過的な transient 系と永続的な stable 系がある。カイコに外来遺伝子を導入する方法としては、transient 系としてはバキュロウイルス発現系が開発されているが、ゲノムに安定的に外来遺伝子を導入する stable 系は確立されておらず、このことが分子生物学的方法論を用いた研究を困難にしてきた。本研究ではカイコに遺伝子を導入して発現させる系の技術開発を行うことを目的として、一過的および永続的な導入法の開発や改善のために、バキュロウイルス発現系の改良による応用範囲の拡大、導入ベクターとして利用するためのトランスポゾンの単離、および配列特異的組換え酵素の利用の検討という三つのアプローチを行った。

1 カイコ核多角体病ウイルス p10 遺伝子の単離と利用

カイコ核多角体病ウイルス(BmNPV)は *Autographa carifornica* NPV(AcNPV)と並んで外来遺伝子の大量発現に利用されているバキュロウイルスである。核多角体病ウイルスには感染後期になって旺盛に合成される2つのタンパク質がある。その一つは多角体の構成タンパク質であるポリヘドリンであり、もうひとつは p10 タンパク質である。外来遺伝子発現に利用されてきたのは主にポリヘドリンプロモータであったが、近年 AcNPV では p10 プロモータを用いた外来遺伝子発現が報告されている。p10 欠損ウイルスは正常に増殖し多角

体を形成する。これを利用した組換ウイルスはウイルス粒子が多角体に包埋され経口接種が可能となる。BmNPVはその宿主であるカイコの大量飼育体系が整っていることから、経口接種可能な組換ウイルスの作製法の確立はカイコ-BmNPV系の利便性を飛躍的に高められると思われる。そこでBmNPVのp10座位に外来遺伝子を導入するベクターを構築し、実際に組換ウイルスを作製してその性状を明らかにした。

1-1 BmNPV p10 遺伝子のクローニングとトランスファーベクターの構築

クローン化したBmNPVのp10遺伝子の配列はAcNPVのものとの90%以上の相同性を示した。BmNPVのp10遺伝子はORFの途中にフレームシフトがあり、AcNPVのp10タンパク質と比較するとカルボキシル末端を欠いた、70アミノ残基よりなる約7.7 kDaのタンパク質をコードしていた。これは完全なp10遺伝子が形成する繊維状構造(fibrillar structure)が、BmNPV感染細胞においては観察されないことと符合する。プロモータ領域においては、推定されるTATA boxおよびバキュロウイルスのvery late プロモータに共通するATAAGモチーフは保存されていた。トランスファーベクターの構築においては、p10遺伝子の5'上流域と3'下流域をそれぞれ別個にクローニングし、それらを組み合わせてNru Iをユニークなクローニングサイトとして持つpBNT1を構築した。pBNT1はBmNPVのp10座位にp10プロモータにより制御される外来遺伝子を導入することが可能である。

1-2 p10 ベクターを用いた組換ウイルス作製とその性状解析

pBNT1を用いてBmNPVのp10座位にp10遺伝子の代わりにルシフェラーゼ遺伝子を導入した組換ウイルスBmp10-Lucおよび対照としてポリヘドリン座位にルシフェラーゼ遺伝子を導入した組換ウイルスBmPH-Lucを作製した。Bmp10-Lucはポリヘドリン遺伝子が無傷のまま保持しているため多角体を形成し、ウイルス粒子がその中に包埋されていた。カイコ由来培養細胞株NISES-BoMo15AIIcにこれらの組換ウイルスを感染させて行った経時的なルシフェラーゼ・アッセイの結果、BmNPVのp10およびポリヘドリンプロモータは感染後約60時間でピークを迎えるよく似た発現パターンを示すこと、発現量の最大値は前者は後者の約1/2であることが示された。これらの結果はp10およびポリヘドリンがともにvery late geneと呼ばれる遺伝子のグループに属していることやAcNPVにおいてもp10プロモータの活性がポリヘドリンの1/2であることと整合性がとれている。

Bmp10-Lucがp10遺伝子を欠損していることの病原性への影響を検討するため、野生型ウイルスを対照としてカイコに対して多角体の添食試験を行った。その結果、多角体の感染力価は野生型のほうが若干高いこと、多角体の長期保存後の感染力価の低下については両者に明確な差異が認められないことが明らかとなった。以上のことよりBmNPVのp10組換ウイルスは経口接種による物質生産に利用可能であることが示された。また、Bmp10-Luc感染虫の血リンパ中の多角体密度は野生型感染虫に比べ顕著に低かったが、これはp10欠損ウイルスが感染した培養細胞において多角体の培地への放出が抑制されるという報告と合致する。

2 カイコの *mariner* 様因子のクローニングと性状解析

形質転換の最初のステップは外来の DNA を細胞内に導入することであるが、カイコにおいては卵へのマイクロインジェクションにより一過的に外来遺伝子を導入することがすでに可能となっている。そこで、次のステップである外来遺伝子のゲノムへの挿入を起こさせるベクターとして、利用可能なトランスポゾンを探した。本研究では、幅広い生物種にその存在が確認されている *mariner* 様因子に着目してカイコよりクローニングを行い、その性状を解析した。

2-1 カイコの *mariner* 様因子のクローニングと構造解析

縮重プライマーによる PCR で部分配列をクローン化した後、それをプローブとしてゲノムライブラリをスクリーニングしてゲノムクローンを取得した。このクローンのトランスポザナーゼの ORF には挿入配列、終止コドン、そしてフレームシフトがあり不完全であったため、さらにいくつかのプライマーを設計して PCR を行った。そして PCR 産物の配列から、完全型のカイコ *mariner* 様因子(BmMLE)の塩基配列およびそのコードするタンパク質のアミノ酸配列を予想した。この仮想のタンパク質はモーリシャスショウジョウバエ *Drosophila mauritiana* の活性型 *mariner* である *Mos1* 因子とアミノ酸配列で 34%の相同性を示し、分子系統学的にはセクロピア蚕 *H. cecropia* の MLE (HcMLE)と非常に近縁であった。

2-2 カイコゲノム中での BmMLE の存在様式の解析

大造および C108 系統を用いたサザンプロット解析の結果、BmMLE は半数体ゲノム当たり約 80 から 100 コピー存在すること、ゲノム中でかなりのバリエーションがありその多くは欠失型と予想されること、そしてゲノム上の多数の座位に分散して存在していることが明らかとなった。次に BmMLE がゲノム中でどのような修飾を受けてきたかを解析するため、入手できる限りの地理的品種を用いて末端の逆位反復配列をプライマーとして LA PCR を行った。これはまた同時に BmMLE を持っていない系統を探するという意味もあった。その結果、BmMLE はそのサイズにおいて約 20 種類以上の多型を持ち子孫に安定的に受け継がれることが示唆された。バンドの出現パターンに着目すると地理的品種のグループでは中国種がもっとも多様に富んでおり、他のグループではグループ内の多型は顕著ではなかった。このことより BmMLE がカイコのゲノム中で動き、修飾を受けていることが示唆された。また全てのカイコの系統の起源が中国種であるというこれまでの研究結果ともよく一致していた。供試した限りでは BmMLE を保持していない系統は見つけることが出来なかった。従って BmMLE の転移酵素が細胞内に存在すると、数多く存在する内在性コピーが一斉に転移してゲノム構造を大きく変化させてしまうおそれがあるため、現時点では BmMLE をカイコの遺伝子組み換えに利用することは困難であると結論した。しかし、ランダムに遺伝子を破壊する実験には利用できる可能性がある。

3 FLP リコンビナーゼによるカイコ培養細胞および卵での配列特異的 DNA 切り出し

カイコの形質転換についてはいくつかの成功例の報告はあるものの効率が極めて低

く、実用化にはその効率を向上させることが強く求められている。また同時に遺伝子操作の自由度を高くすることも望まれている。そこで配列特異的 DNA 組換え酵素である FLP リコンビナーゼに着目し、これのカイコにおける利用可能性を探るため、FLP リコンビナーゼの活性を染色体外での DNA 切り出しによって検定する系を構築し、カイコ培養細胞および卵において FLP リコンビナーゼが機能しうるか否かを検討した。

まず FLP リコンビナーゼを発現するヘルパー、FLP の認識配列(FRT)を両端にもつ遺伝子カセットの挿入により破壊された β -ガラクトシダーゼ遺伝子を有する切り出しインディケーター、およびインディケーターが組み換えを受けた後に取ると予想される構造をもつポジティブコントロールの 3 種類のプラスミドを構築した。カイコ由来の培養細胞にこれらのプラスミドを一過的に導入したところ、インディケーター単独では内在性レベルであった β -ガラクトシダーゼの活性がヘルパーとコトランスフェクトすることにより顕著に増大した。ポジティブコントロールとの比較から切り出し効率は 10~20%と予想された。 β -ガラクトシダーゼ活性による細胞化学的染色による検出も同様の結果を与えた。

次にこれらのプラスミド DNA を卵にマイクロインジェクションし、組織化学的染色により β -ガラクトシダーゼ活性を検出した。その結果、インディケーターのみでは染色される細胞は全く現れず、ヘルパーとのコインジェクションによって染色される細胞が出現した。さらにインディケータープラスミドが実際に組み換えを受けていることを検証するため、DNA を注射した卵からプラスミドを回収してサザンブロット解析を行った。その結果ヘルパーとのコインジェクションによるインディケーターの構造変化が検出され、2つの FRT 間で正確に組み換えが起こったことが示唆された。デンシトメトリー定量により求めた切出効率は約 20%であった。

以上の結果より FLP リコンビナーゼはカイコの培養細胞および卵において FRT 間の DNA 組み換えを触媒することが示された。また切出効率においても哺乳動物細胞において得られた値と大きな違いは認められず、FLP リコンビナーゼがカイコの遺伝子操作ツールとして利用可能であることが示唆された。

以上本研究においてはカイコに遺伝子を導入する系の技術開発を行うことを目的として、BmNPV の p10 座位に外来遺伝子を導入するトランスファーベクターを構築し、p10 組換えウイルスの経口接種における有用性を示した。また、形質転換を行うためのツールとしてトランスポゾンの 1 種である *mariner* 様因子をカイコより単離し、これを BmMLE と名付けた。BmMLE は内在性のコピー数が多く遺伝子導入ベクターとしての応用は困難であると思われた。一方カイコの形質転換における遺伝子導入効率を改善し、遺伝子操作の自由度を向上させるためのツールとして、FLP リコンビナーゼに着目し、これがカイコ培養細胞および初期胚において機能することを明らかにし、利用可能であることを示した。また本研究により明らかとなった知見を組み合わせることにより、さらに様々なカイコの遺伝子操作法への応用が考えられる。例えば FLP-FRT 系を利用することにより高効率に組換え NPV を得ることが可能となるであろう。また、活性型の BmMLE を組み込んだ AcNPV の経口接種により遺伝子破壊を誘発して、多数の突然変異を得ることができると期待される。