

# 遺伝子組換えカイコ作出技術の高度化とその利用に関する研究

坪田 拓也（農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門）

[tsubota@affrc.go.jp](mailto:tsubota@affrc.go.jp)

## はじめに

カイコは大量の絹タンパク質を生産する能力を持つ昆虫であり、遺伝子組換え技術を利用した検査薬・医薬品・化粧品等の生産の事業化が一部の企業で始まっている。組換えカイコの実用化のさらなる拡大を図るためには、ゲノム編集技術の改良を含め、遺伝子組換えカイコの作出技術をより簡便かつ効率的なものにする必要がある。また、カイコでは多くの遺伝子の機能が未解明であり、これらの機能を明らかにすることが組換えカイコの利用をさらに進める上で肝要であると考えられる。本稿では、筆者らがこれまで取り組んできた組換えカイコの作出技術の高度化、およびその技術を利用した遺伝子機能解析の成果について紹介する。

## 新規プロモーターの開発

カイコでは2000年にトランスポゾン *piggyBac* を用いた遺伝子組換え技術が開発され<sup>1)</sup>、この技術を用いて様々な遺伝子の機能解析や有用タンパク質を生産するための研究が進められている。遺伝子組換え技術により導入した遺伝子を働かせるためには、プロモーターの機能が不可欠である。カイコではこれまで絹糸腺、神経系等の組織で働くプロモーターが単離されてきたが、遺伝子組換え研究を行う上でこれらのプロモーターだけでは十分であるとは言い難い。そこで筆者らはカイコの新規プロモーターの特定を試みた。昆虫の血球細胞は異物の認識や攻撃など自然免疫において中枢の役割を担う器官である。筆者らはカイコ血球細胞で働くプロモーターの特定を目指し、血球細胞で高発現する *hemocytin* 遺伝子、*HPI* 遺伝子、*lp44* 遺伝子の上流配列のプロモーター活性について調べた。その結果、*lp44* 遺伝子の上流1.3kbの配列について、血球細胞の一つであるエノシトイドで特異的に遺伝子発現を誘導する活性があることを見出した<sup>2)</sup>。このプロモーターは、カイコ血球細胞の分化やエノシトイドでの遺伝子機能解析、あるいは白血球モデルカイコといった病態モデル研究等への活用が可能であると考えられる。

筆者らはさらにカイコで有用なプロモーターを同定するため、エンハンサートラップ系統（トランスポゾンゲノム中にランダムに転移させた系統）のスクリーニングを行った。その結果、蛍光タンパク質遺伝子 *DsRed* を全身で強力で発現する系統を見出した。この系統でのトランスポゾンゲノム上の挿入位置の解析を行った結果、様々な生物において全身で強く発現する *hsp90* 遺伝子内に挿入していることが明らかになった。この遺伝子の上流2.9kbのゲノム領域(*hsp90P2.9k*)を単離してそのプロモーター活性を解析したところ、カイコの培養細胞およびカイコ生体内の様々なステージや組織で、遺伝子発現を強く誘導できることが分かった(図1)。*hsp90P2.9k* はカイコだけでなくヨトウガ由来の培養細胞である *Sf9* でも強く遺

伝子発現を誘導できたことから、この配列はカイコ以外のチョウ目昆虫においても遺伝子発現のために利用可能であることが示唆された。さらに、*hsp90P2.9k* の部分配列について活性解析を行い、2.0kb の配列について全長と同様の活性を持つことが明らかになった<sup>3)</sup>。今回特定した配列は、カイコやそれ以外の昆虫における遺伝子機能解析や、あるいは組換え体を簡便に判別するための有用なツールとして利用できると考えられ、例えば全身での有用物質生産や卵での簡便な組換え体の判別等が可能になると期待される。この成果は米遺伝学会の facebook サイトや昆虫研究者のコミュニティである Insect genetic technologies research coordination network で取り上げられ、また日経産業新聞や日経バイオテク ONLINE などに記事が掲載された。

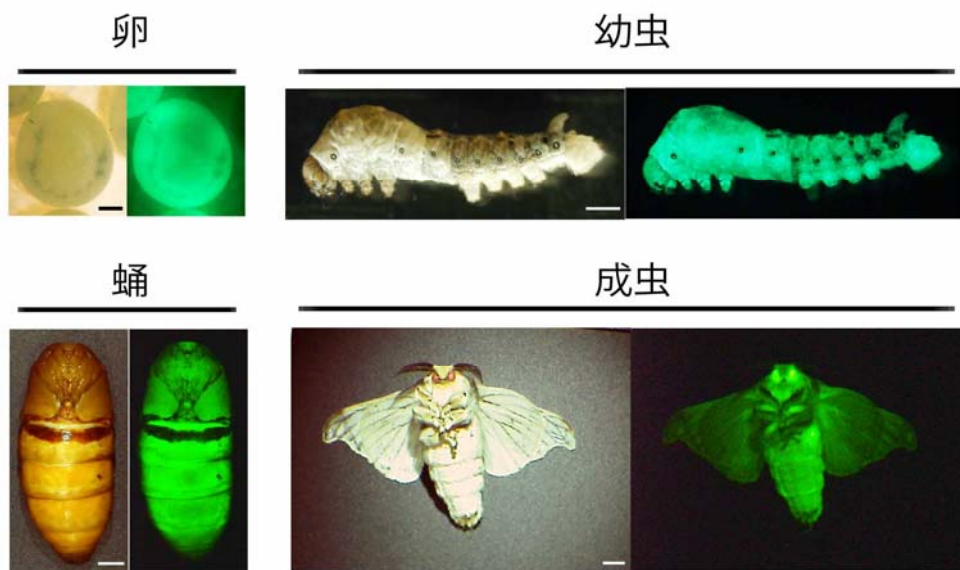


図1 カイコの卵、幼虫、蛹、成虫での*hsp90*プロモーターによる*GFP*遺伝子の発現。それぞれの1対の写真で左が白色光下、右が*GFP*蛍光を撮影したもの。右側の写真で緑色に光っている部分で*GFP*遺伝子が発現している。*hsp90*プロモーターは各段階の全身で活性をもっていることが分かる。スケールバーは卵が0.3mm、幼虫が1mm、蛹と成虫が3mmを示す。

### 簡便かつ効率的なノックインシステムの開発

ゲノム編集技術は、自在に遺伝子の改変を行うことができる画期的なツールであり、近年大きな注目を浴びている。カイコでは、ゲノム編集ツールの一つである TALEN を用いて高い効率で標的遺伝子の破壊を行うことが可能である<sup>4)</sup>。しかしながら、ゲノムの狙った位置に遺伝子を挿入するノックイン

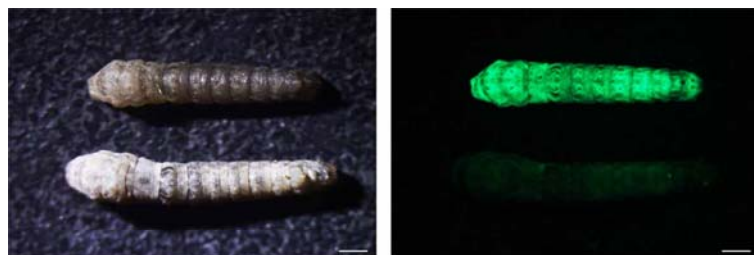


図2 PITCh法によるカイコ*BLOS2*遺伝子へのノックイン。左の写真が白色光下で、右の写真が蛍光下で撮影したもの。それぞれ上の個体がノックインに成功したカイコ、下の個体が正常なカイコを示す。ノックインに成功した個体では*BLOS2*遺伝子の破壊により皮膚が透明になり、さらに*GFP*遺伝子の挿入により全身での緑色の蛍光が観察される。スケールバーは1mm。

については、例えば相同組換えといった従来の方法では非常に効率が悪く<sup>5)</sup>、組換えカイコ

の実用利用等を進める上で問題となっていた。筆者らは、国内のゲノム編集研究の第一人者である広島大学の山本教授のグループと共同で、マイクロホモロジー媒介末端結合を利用した新規ノックイン技術「PITCh(ピッチ)法」を用い、カイコで効率よくノックインが起こせるのかどうかを解析した。皮膚の尿酸顆粒の蓄積に関わる *BLOS2* 遺伝子に、上記 *hsp90* プロモーターおよび GFP をもつドナーベクターのノックインを PITCh 法を用いて試みたところ、多くの個体で全身での GFP 発現および *BLOS2* の変異による皮膚の透明化が観察された(図 2)。これらの個体について PCR およびシーケンス確認を行った結果、ドナーベクターが正確に *BLOS2* 遺伝子座に挿入されていることが確認された<sup>6)</sup>。さらにこの方法を用いることで、DNA 修復に関わる *ku80* 遺伝子へのノックインも効率よく行えることが明らかになった<sup>7)</sup>。以上から、PITCh 法を用いることでカイコで簡便かつ効率的にノックインを行うことが可能であることが示された。この方法を用いれば、例えば有用タンパク質の生産量を 1 桁上昇させたり、あるいは遺伝子機能解析を大幅に省力化したりすることが可能になるものと期待される。*BLOS2* のノックインの成果については Nature Publishing Group の注目の論文に選定されるとともに、日本経済新聞や日経バイオテク ONLINE などに記事が掲載された。さらに *hsp90* プロモーターの成果と合わせて農業生物資源研究所(現農業・食品産業技術総合研究機構)の H26 年度の主な研究成果に採択された。

#### 絹糸腺での遺伝子発現制御機構の解析

カイコの絹糸腺は大量の絹タンパク質を生産する能力があり、遺伝子組換え技術により当該組織において効率よく有用タンパク質を生産することが可能である。絹糸腺での遺伝子発現制御機構を明らかにすることは、このような有用タンパク質生産をより効率よく行うためには必須の課題である。また、この課題は基礎生物学研究所の鈴木義昭名誉教授のグループを中心に分子生物学の勃興期から長年取り組まれたもので、学術的にも大きな意義があるものである。筆者らは、遺伝子組換え技術を利用してカイコ絹糸腺での絹糸タンパク質遺伝子の発現制御機構の解明に取り組んだ。その結果、絹糸腺の中部区画(中部絹糸腺)においてはホメオティック遺伝子 *Antennapedia* が *sericin-1*、*sericin-3*、*fhx4*、*fhx5* といった複数の主要な絹タンパク質遺伝子の発現を制御しているのに対し、後部区画(後部絹糸腺)ではホメオボックス遺伝子 *Arrowhead* が *h-fibroin*、*l-fibroin*、*fibrohexamerin* という様々な絹タンパク質遺伝子の発現の制御に機能していることが分かった<sup>8-12)</sup>(図 3)。これらの成果は財経新聞等に紹介されるとともに、H27 年度の農業生物資源研究所の主な研究成果に採択された。

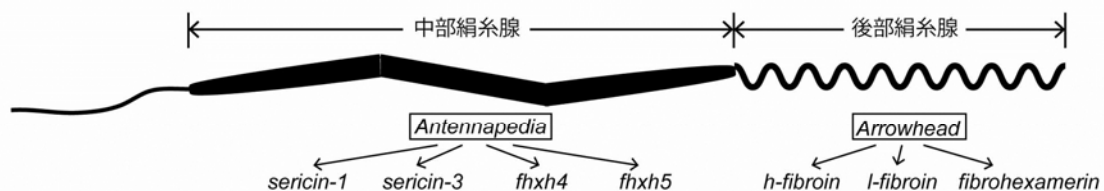


図3 カイコ絹糸腺での遺伝子発現制御

#### 終わりに

今回このような由緒正しい賞を頂くことができ大変光栄を感じる一方、筆者らが取り組

んでいる研究はまだ道半ばであると考えている。PITCh 法によるノックインは効率の面などで改良の余地が残っており、さらに使い勝手の良いツールにしていく必要がある。絹糸タンパク質遺伝子へのノックインは、組換えカイコによる新たな産業の創出には不可欠であるが、現時点ではまだ実現できていない。筆者らは引き続きこれらの課題に取り組んで農学のさらなる発展に貢献したいと考えており、今後ともご支援を頂ければ大変幸いである。

## 謝辞

本研究は農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門 カイコ機能改変技術開発ユニットで行われたものであります。本研究を行うにあたり多大なご指導およびご支援を頂きました瀬筒秀樹ユニット長はじめユニットのメンバー、つくば技術支援センターの皆様、および同部門の研究員の方々に厚く御礼申し上げます。またノックインの成果は広島大学・山本卓教授のグループとの共同研究、絹糸腺での遺伝子発現制御機構の成果は北海道大学・滝谷重治准教授のグループとの共同研究によるものです。この場をお借りしまして深く感謝申し上げます。

## 引用文献

- 1) Tamura T., Thibert C., Royer C., Kanda T., Abraham E., Kamba M., Kômoto N., Thomas J.-L., Mauchamp B., Chavancy G., Shirk P., Fraser M., Prudhomme J.-C., Couble P. *Nat Biotechnol* 18:81-84 (2000)
- 2) Tsubota T., Uchino K., Kamimura M., Ishikawa M., Hamamoto H., Sekimizu K., Sezutsu H. *Insect Mol Biol* 23:165-174 (2014)
- 3) Tsubota T.\*, Uchino K.\*, Suzuki K.T., Tanaka H., Kayukawa T., Shinoda T., Sezutsu H. (\*these authors contributed equally) *G3: Genes, Genomes, Genetics* 4: 1347-1357 (2014)
- 4) Takasu Y., Sajwan S., Daimon T., Osanai-Futahashi M., Uchino K., Sezutsu H., Tamura T., Zurovec M. *PLoS One* 8:e73458 (2013)
- 5) Daimon T., Kiuchi T., Takasu Y. *Dev Growth Differ* 56: 14-25 (2014)
- 6) Nakade S\*., Tsubota T\*., Sakane Y\*., Kume S., Sakamoto N., Obara M., Daimon T., Sezutsu H., Yamamoto T., Sakuma T., Suzuki K.T. (\*these authors contributed equally) *Nat Commun* 5:5560 (2014)
- 7) Tsubota T., Takasu Y., Uchino K., Kobayashi I., Sezutsu H. *J Insect Biotechnol Sericol* in press
- 8) Ohno K., Sawada J., Takiya S., Kimoto M., Matsumoto A., Tsubota T., Uchino K., Hui C., Sezutsu H., Handa H., Suzuki Y. *J Biol Chem* 288: 31581-31591 (2013)
- 9) Kimoto M., Tsubota T., Uchino K., Sezutsu H., Takiya S. *Dev Biol* 386: 64-71 (2014)
- 10) Kimoto M., Tsubota T., Uchino K., Sezutsu H., Takiya S. *Insect Biochem Mol Biol* 56: 29-35 (2015)
- 11) Tsubota T., Tomita S., Uchino K., Kimoto M., Takiya S., Kajiwara H., Yamazaki T., Sezutsu H. *J Biol Chem* 291: 7087-7096 (2016)
- 12) Takiya S., Tsubota T., Kimoto M. *J Dev Biol* 4: 19 (2016)