

氏 名	やまもと まさふみ <b>山 本 真 史</b>
学位(専攻分野)	博 士 ( 学 術 )
学 位 記 番 号	博 甲 第 3 6 8 号
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規程第 3 条第 3 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	<b>バキュロウイルスとトランスポゾンを用いたカイコの形質転換に関する研究</b> (主査)
審 査 委 員	教授 杉村順夫 教授 山口政光 教授 古澤壽治 助教授 森 肇

## 論文内容の要旨

本研究ではカイコの形質転換方法として従来行われていた AcNPV を用いる方法と、*piggyBac* を用いる方法のそれぞれの長所を取り入れ、より簡便で効率的な形質転換方法の開発を行った。さらにこの形質転換方法を利用して哺乳動物由来の糖転移酵素遺伝子のカイコへのノックイン、並びにカイコ抗菌タンパク質遺伝子転写因子の RNAi によるノックダウンを行った。

本論文は以下の 5 つの章から構成されている。

第 1 章では、トランスジェニック昆虫に関する研究の現状とトランスジェニックカイコ作製についての問題点と課題、期待される技術について述べた。

第 2 章では AcNPV と *piggyBac* を併用した形質転換方法について報告した。AcNPV のウイルスゲノム内に *piggyBac* の末端反復配列を挿入し、その内側にプロモーター、EGFP 遺伝子, SV40 polyA 付加シグナルを組み込んだ組換え AcNPV を作製した。次に、ショウジョウバエの HSP70 プロモーター、*piggyBac* のトランスポゼース遺伝子を組み込んだ組換えウイルスを作製した。これら 2 種類の組換えウイルスを混合後、カイコの卵にインジェクションして感染を起こさせた。トランスポゼースの働きによって、*piggyBac* の末端反復配列によって挟まれたマーカー遺伝子のカセットがカイコ染色体に組み込まれるようになった。この結果、ウイルスやトランスポゾンそれぞれ単独に用いてカイコの形質転換を行うよりも効率良く簡便にトランスジェニックカイコを得ることができる形質転換方法が開発された。

第 3 章では、カイコの合成する糖タンパク質の糖鎖を改変する目的でウシの  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase 遺伝子のカイコ個体へのノックインを行った。第 2 章で開発した形質転換法を用いて同遺伝子を導入し、得られたトランスジェニックカイコの糖タンパク質の糖鎖構造をレクチンブロットにより解析した所、哺乳動物の場合と同様にガラクトースが付加された糖タンパク質がこのトランスジェニックカイコで合成されていることがわかった。このことから、今後複合型糖鎖を持つ糖タンパク質がこのようなトランスジェニックカイコで合成することが可

能になるものと判断された。

第4章では、この形質転換法を用いて RNAi によるカイコの抗菌タンパク質遺伝子の転写因子のノックダウンを行った。カイコの抗菌タンパク質の特性については、まだあまり明らかにされておらず、ショウジョウバエにおいて Rel/NF- $\kappa$ B ファミリーに属する Dif と高い相同性を持つ Rel タンパク質がカイコで単離された(BmRel)。そこでこの BmRel を RNAi によってノックダウンすることで、カイコでの抗菌タンパク質遺伝子の発現カスケードを明らかにすることができる考えた。方法は *piggyBac* 内に BmRel 遺伝子の一部のループ構造を持ち、二重鎖 RNA を発現するようなカセットを作製し、このカセットをカイコに導入し、BmRel ノックダウンカイコを作製した。さらに、このカイコで種々の抗菌タンパク質遺伝子発現を解析したところ、グラム陽性菌である *Micrococcus luteus* の刺激に対して抗菌タンパク質遺伝子の発現が抑制されていることが判明し、これによって BmRel はグラム陽性菌に対して免疫反応を行う Toll 経路に係わる抗菌タンパク質遺伝子の転写調節因子であると考えられた。

第5章の総合考察においては、本研究で開発した形質転換方法によるカイコのノックイン、ノックダウン技術の利用により期待される成果と今後の展望について述べた。

## 論文審査の結果の要旨

トランスジェニック生物の作製に関する研究は多くの動植物で行われている。カイコも例外ではなく、その優れたタンパク質生産能力を利用して有用タンパク質をカイコ体内で発現させたり、絹タンパク質を改変することで昆虫工場としてカイコを利用することが期待されている。しかし、遺伝子の導入技術の問題からトランスジェニックカイコの作製に関してはなかなか成果が挙げられていないのが現状であった。カイコに外来遺伝子を導入する方法にはバキュロウイルスの一種である *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcNPV)を用いる方法と、トランスポゾン *piggyBac* を用いる方法がある。AcNPV を用いる方法は、AcNPV のウイルスゲノム内に、宿主の遺伝子を導入したい領域のエキソン間に目的遺伝子を持つリコンビナント AcNPV を作製し、このウイルスの感染によりカイコ体内で複製されたウイルスゲノムがカイコのゲノムの一部と相同組換えを起こすことにより、目的遺伝子がカイコゲノムに導入される方法である。しかし、この方法では遺伝子の導入効率が非常に低いという問題があった。一方トランスポゾンを用いる方法は *piggyBac* をベクターとして、カイコの産卵直後の卵にトランスポゾンの DNA をマイクロインジェクションするという方法である。この方法では遺伝子導入をトランスポゾンの転移に依存するため比較的高い割合で遺伝子導入を行えるが、卵へ DNA をマイクロインジェクションするには、極めて高度な技術を必要としていた。

本論文では、このバキュロウイルス AcNPV とトランスポゾン *piggyBac* を併用することにより、新たなカイコの形質転換方法を開発した点に最初のオリジナリティーがある。ウイルスとトランスポゾンを併用することで、実験操作を簡便化し遺伝子導入効率を高めるという方法は、他では類をみない興味深い結果である。さらにこの方法を用いて、カイコに有用遺伝子をノックインす

ることにより、よりタンパク質生産に適するようにカイコを改変することに成功した。さらには、この方法を用いることで、カイコ個体での RNAi の研究を行った。

本論文の内容は、以下の学術雑誌に発表されている（印刷中を含む）。

1. Yamamoto M., Yamao M., Nishiyama H., Sugihara S., Nagaoka S., Tomita M., Yoshizato K., Tamura T., Mori H. New and highly efficient method for silkworm transgenesis using *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus and *piggyBac* transposable elements. *Biotechnol Bioeng.* 88: 849-53 (2004)
2. Tanaka H., Yamamoto M., Moriyama Y., Yamao M., Furukawa S., Sagisaka A., Nakazawa H., Mori H., Yamakawa M. A novel Rel protein and its shortened isoform that differentially regulate antibacterial peptide genes in the silkworm *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.* (in press)