

令和元年6月11日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18826

研究課題名(和文) TALEを利用したカイコにおける遺伝子抑制技術の開発

研究課題名(英文) Development of gene repression system using TALE in the silkworm

研究代表者

坪田 拓也 (TSUBOTA, Takuya)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・主任研究員

研究者番号：00612772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：カイコの絹タンパク質遺伝子h-fibroin(h-fib)およびその発現を制御する転写制御遺伝子Arrowhead(Awh)を標的とするTALEと、転写抑制因子のリプレッサードメインとの融合タンパク質であるTALERを発現するコンストラクトを作製し、カイコに導入して遺伝子組換えカイコを作出した。h-fibを標的としたTALERについては組換えカイコを獲得することに成功したが、h-fibの発現抑制は見られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カイコではRNAiによる遺伝子ノックダウンを行うことが著しく困難であり、その代替技術としてTALENの制限酵素部位FokIと転写抑制因子のリプレッサードメインとを差し替えたTALERタンパク質の利用を試みた。本研究では標的遺伝子の発現抑制を確認することはできなかったが、今後改良を加えていく上での足がかりとなる知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Constructs encoding TALERs (Fusion protein of TALE and transcriptional repressor domain) targeting silkworm h-fibroin (h-fib) and its repressor Arrowhead (Awh) were generated, and they were microinjected into the silkworm embryo to establish transgenic strains. For TALER of h-fib we could establish the transgenic strain, and this strain was crossed with GAL4 strain for the overexpression of TALER in the silk gland. However, the transcriptional repression of h-fib gene was not observed.

研究分野：昆虫分子生物学

キーワード：ゲノム編集 TALEN カイコ 遺伝子組換え 遺伝子発現制御

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

カイコを含むチョウ目昆虫は、RNAi による遺伝子ノックダウンの効率が初期胚や蛹初期以外の時期ではきわめて悪い。このような理由から、特に幼虫期において遺伝子の機能解析を行うことが難しい状況にある。近年では、新たな遺伝子導入法であるエレクトロポレーション法を利用することで局所的に RNAi を起こすことは可能になりつつあるが、例えば絹糸腺のようなサイズの大きな組織全体で遺伝子発現を抑制することは依然困難である。申請者はこれまで、カイコの絹糸腺において転写因子 Antennapedia (Antp) や Arrowhead (Awh) の機能解析を進めてきたが、遺伝子抑制ができないことが技術的な障壁となり、これらの遺伝子の機能をいまだ十分には明らかにできていない。

ゲノム編集技術は、遺伝子を自在に書き換えることのできる技術であり、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 の効率が非常に高く、このツールを用いて様々な遺伝子のノックアウトに成功している。申請者は昨年、TALEN の効率の高さを活かし、カイコにおいて簡便かつ効率的な遺伝子ノックイン技術の開発に成功した。一方で、単純に TALEN により変異を導入した場合、個体が致死あるいは発育不全になって解析や系統維持が困難なケースも多く、時期あるいは組織特異的に遺伝子の機能を抑制する技術の開発が急務である。TALEN は植物病原菌由来の DNA 結合ドメインである TALE と、エンドヌクレアーゼ FokI との融合タンパク質であるが、近年では FokI を別のタンパク質と置き換えて、遺伝子ノックアウト以外の目的に利用する研究が盛んに行われている。例えば、FokI を GFP と置き換えて染色体を可視化したり、あるいは FLAG と置き換えて ChIP 解析に利用したりする技術が開発されている。

### 2. 研究の目的

本研究では、カイコで RNAi に代わる新たな遺伝子抑制技術を開発することを目的とし、TALE と Hairy タンパク質由来の転写抑制ドメインとを融合させた「TALER」が遺伝子抑制ツールとして利用可能かどうかを検証する。カイコでは酵母由来の転写因子である GAL4 とその結合配列である UAS とを組み合わせた「GAL4/UAS システム」が確立しており、この技術を用いることで組織あるいは時期特異的に遺伝子を容易に誘導できる。本研究では、GAL4 ドライバー系統がすでに確立している絹糸腺を対象とし、絹糸腺で TALER を発現させることで遺伝子抑制が起こるのかどうかを解析する。

### 3. 研究の方法

1) 標的遺伝子のプロモーター部位をターゲットとする TALEN の構築と活性評価  
カイコ絹糸腺タンパク質遺伝子 sericin-1 (ser1)、fibroin heavy chain (h-fib)、およびそれらの発現を制御することが示唆される転写因子 Antp、Awh を本研究では対象とする。これらの遺伝子のプロモーター領域を標的とする TALEN を作製し、切断活性を検証して設計した TALE が適切にプロモーターを認識できるのかどうかを明らかにする。

#### 2) UAS-TALER 系統の作出

1) で設計した TALE をショウジョウバエ由来の Hairy タンパク質のリプレッサードメインにつなぎ、UAS ベクターに挿入する。この Hairy タンパク質のリプレッサードメインについては、最近ショウジョウバエにおいて、TALE と融合させて標的遺伝子の転写を抑制できることが示された。作製したコンストラクトをカイコに注射し、遺伝子組換えカイコ (UAS-TALER 系統) を作出する。

#### 3) 標的遺伝子の発現抑制の検証

作出した UAS 系統を絹糸腺で GAL4 を発現する系統と交配し、次世代の個体の絹糸腺で上記遺伝子および下流の遺伝子の発現を解析する。発現量の低下が起こっているのかどうかを明らかにし、TALER が遺伝子抑制ツールとして利用可能かどうか検討する。

### 4. 研究成果

H28 年度は標的遺伝子の選定を行い、後部絹糸腺で発現する絹タンパク質遺伝子 h-fibroin (h-fib) およびその発現を制御する転写制御遺伝子 Arrowhead (Awh) の 2 つを標的とすることとした。カイコで樹立されている GAL4 系統 AyFib-431a は、後部絹糸腺で幼虫の初期の段階から GAL4 を発現しており、この系統を用いることで後部絹糸腺で効率よく遺伝子抑制を行うことができるものと見込まれる。h-fib および Awh 遺伝子のプロモーター部位のゲノムシークエンスを、組換えカイコ系統を樹立する白 C 系統より決定し、それらを標的とする TALEN を構築した。続いて、ショウジョウバエで遺伝子発現抑制に用いられている転写抑制遺伝子 hairy のカイコホモログを検索し、BG1BMGA005390 がそれに該当することを見出した。BG1BMGA005390 の転写抑制ドメインを単離し、上記で作出した TALEN の FokI と差し替えて TALER を構築した。この TALER を UAS ベクターに挿入し、カイコに導入するためのコンストラクトとした。

H29 年度は上記コンストラクトをカイコ初期胚に注射し、強制発現系統の作出を進めた。

h-fib 遺伝子のプロモーターを標的とする TALER の UAS 系統について 1 系統得ることができ、後部絹糸腺で GAL4 を発現する AyFib-431a 系統と交配し強制発現を行った。導入したコンストラクトの発現確認を行うために、後部絹糸腺から RNA を抽出して hairy に対するプライマーで RT-PCR を行い、確かにコンストラクトが発現していることが確認された。

H30 年度は H29 年度に作出した系統について h-fib 遺伝子の発現を RT-PCR により解析した。その結果、h-fib 遺伝子の発現抑制は起こっていないことが明らかになった。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

坪田拓也・内野恵郎・瀬筒秀樹 カイコにおける PITCh 法の効率化に向けた取り組み 日本ゲノム編集学会第 3 回大会 2018

坪田拓也・内野恵郎・瀬筒秀樹 PITCh 法によるカイコフィブロイン遺伝子座へのノックインの試み 日本ゲノム編集学会第 2 回大会 2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名 : 該当なし

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 :

部局名 :

職名 :

研究者番号 (8 桁) :

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名 : 該当なし

ローマ字氏名 :

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。