

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05617

研究課題名(和文)分散型動原体をもつカイコ染色体を利用した人工染色体の基盤構築

研究課題名(英文) Construction of artificial chromosomes using silkworm chromosomes with holocentric kinetochores

研究代表者

門 宏明 (Mon, Hiroaki)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：30616412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,700,000円

研究成果の概要(和文)：人工染色体は宿主染色体を損なうことなく長鎖DNAを細胞内に導入可能であり、安定的に遺伝情報を継承できる。カイコは、分散型動原体をもつ生物であり、その特性を生かした人工染色体の応用が期待される。本研究では、カイコ培養細胞で安定的に維持される人工染色体作製のための基盤構築を目的とする。Golden gate法を用いて、カイコゲノムを含む長鎖環状DNAの構築し、Cenp-TとCenp-Nを用いた動原体タンパク質の局在化技術を開発した。また、カイコのテロメア末端維持機構の解析を進め、関連遺伝子を同定した。これにより、カイコ人工染色体構築の基盤が形成され、今後の遺伝子改変技術の発展に寄与する成果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動原体による染色体分配、および、テロメアの維持は、生物が生命を維持するために不可欠なシステムである。本研究は、カイコにおけるこれらの分子装置の理解と、それに基づく人工染色体の基盤構築を目的とした。本研究により、長鎖環状DNAの構築、および、遺伝子発現技術を確立することができ、今後のカイコ染色体研究の足がかりになると考えている。また、カイコにおける人工染色体技術は、昆虫工場として利用されるタンパク質発現系の高付加価値化(糖鎖修飾など)、および、高栄養価タンパク質源として利用される昆虫の遺伝子経路改変への応用も期待される。

研究成果の概要(英文)：Artificial chromosomes enable the insertion of long DNA into cells without harming the host chromosomes, ensuring stable inheritance of genetic material. The silkworm, with its dispersed centromere type chromosomes, presents a promising opportunity for artificial chromosome applications. This study aims to establish a foundation for creating artificial chromosomes that can be stably maintained in silkworm cultured cells. Using the Golden gate method, we have developed a technical platform for manipulating long circular DNA, including the silkworm genome and developed ectopic localization techniques of centromere proteins Cenp-T and Cenp-N on these long DNAs. Additionally, we analyzed the telomere maintenance mechanism in silkworms and identified related genes. These advancements lay the groundwork for constructing artificial chromosomes in silkworms, contributing to future developments in genetic modification technologies.

研究分野：昆虫分子細胞生物学

キーワード：カイコ 分散型動原体 テロメア

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

遺伝子組換え技術では、外来 DNA を染色体に挿入することで、表現型の変化や新しい機能を付加するが、複数の遺伝子を導入し、それらの発現量、タイミング、組織特異性を制御するためには、長い制御配列を含む DNA を染色体に挿入する必要がある。一方、人工染色体は染色体のように機能し、宿主の染色体を損なうことなく長鎖 DNA を細胞内に導入でき、細胞分裂後もその遺伝情報を継承することが可能である。カイコを含む昆虫では、遺伝子導入やゲノム編集により多くのゲノム改変が行われているが、人工染色体を利用した遺伝子改変昆虫や昆虫細胞は未だ報告されていない。本研究で使用するカイコでは、以下のように、他生物とは異なる特徴を有しており、外来 DNA を維持・分配を研究する上でカイコはとても魅力的な生物である。

- 1) 多くの生物では、1本の染色体上に1箇所だけ動原体が存在する局在型動原体であるのに対し、カイコでは、1本の染色体上に多数の動原体を有する分散型動原体を持っており、染色体の全体に微小管結合部位をもっている。
- 2) テロメアは、ヒトでは数塩基対の反復配列、ショウジョウバエでは non-LTR 型レトロトランスポゾンが染色体末端を維持している。カイコでは、テロメア反復配列とレトロトランスポゾンとの混合型メカニズムにより染色体末端が保護されている。

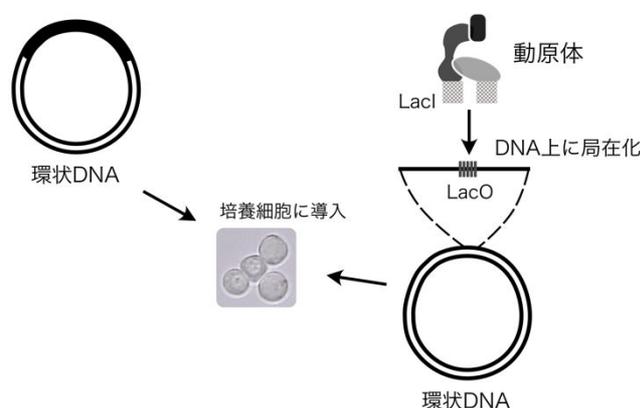
カイコと同様の分散型動原体をもつ線虫では、生殖細胞に DNA を注入すると、細胞内で複製され、細胞分裂の際に染色体とは独立に分配されることが知られている。しかしながら、カイコ細胞では、単純に環状 DNA をカイコ培養細胞内に導入するだけでは、複製・分配する人工染色体の構築は困難であることが分かっている。

### 2. 研究の目的

本研究では、カイコに特徴的な染色体構造に着目し、カイコ培養細胞において、長期間にわたり安定的に維持される人工染色体の作製するための基盤構築を試みる。カイコ DNA 複製、分散型動原体を構成するタンパク質の同定とその機能解析をベースに、カイコで機能する人工染色体の基盤構築が行えるのではないかと考えた。

### 3. 研究の方法

100 kb 程度の大きな環状 DNA を土台とし、その DNA をカイコ培養細胞に導入し、人工染色体としての機能を付与できるかを解析した。(1)カイコゲノムを含む大きな環状 DNA を操作できる技術基盤の確立として、まず、複数のエレメントを組み込んだ長鎖 DNA の構築を行った。方法としては、Type IIS に区分される制限酵素とリガーゼを使



用し、切断と連結を繰り返す Golden gate 法は、複数の DNA 断片を特定の順序で連結することができるため、この方法を用いて長鎖 DNA 構築を行った。また、カイコ細胞の中で遺伝子を発現させる際、複数のプロモーターやタンパク質を標識するタグや蛍光タンパク質、発現量をコントロ

ールするためのタグを付加するためのベクター構築システムを作製した。方法としては、プロモーターとしては、カイコ細胞の中で活性の高い *Orygia pseudotsugata* nucleopolyhedrovirus 由来の IE2 プロモーター、カイコ由来の Actin A3、HSC70-4、および、HSP90 プロモーターを選択した。標識タグとしては、EGFP、StayGold、mScarlet-1 をはじめとする複数の蛍光タンパク質、さらに、標識タグとしては、HA や Flag といった従来からよく使用されているタグだけでなく、ALFA-tag といった nanobody ベースの高い特異性と親和性をもつ抗体で標識できるタグを使用した。これらのパーツをベクターにそれぞれクローニングし、ベクターライブラリーを作製した。これらを組み合わせて、Golden gate 法でパーツをアセンブルし、それぞれ目的に応じた遺伝子発現ベクターを作製した。(2) 動原体タンパク質などの外来タンパク質を長鎖 DNA 上に局在化させる技術の確立を目指した。動原体タンパク質である Cenp-T と Cenp-N をクローニングし、これらのタンパク質を長鎖 DNA 上に異所局在化させるために、LacO/LacI システム、dCas9 システム、および SunTag システムを用いた。それぞれのシステムは、特定の DNA 配列に対するタンパク質の結合を誘導するものであり、これにより動原体タンパク質を長鎖 DNA 上の特定の位置に局在化させることができるかを検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) カイコゲノムを含む大きな環状 DNA を操作できる技術基盤の確立

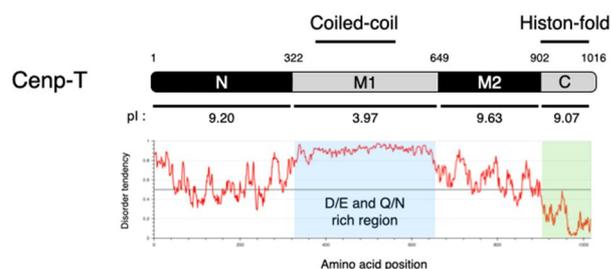
一般的に長鎖 DNA に新たな配列を挿入するときは、大腸菌内での組換えにより行うことが多いが、本研究では、操作をより簡便にし、カイコ細胞内で DNA を長期間維持させるのに必要なエレメントをもつ長鎖環状 DNA を、*in vitro* で効率よく構築するために、Golden gate 法を用いることにした。この方法では、~10 kbp 程度のエレメントをそれぞれ個別のプラスミドとして作製しておき、様々な組み合わせで酵素反応させることにより、簡便に効率よく様々な種類の長鎖環状 DNA を作製可能になる。そのためのベクター系のシステムを作成し、~100 kbp 程度の長鎖 DNA が構築可能になった。この長鎖 DNA にカイコゲノム配列を挿入し、人工染色体の土台とすることにした。

##### (2) 動原体タンパク質など外来タンパク質の異所局在化技術の確立

長鎖環状 DNA を安定して細胞内で維持するには、動原体タンパク質が最も重要であると考えられるため、染色体のクロマチン近傍で機能するとされる Cenp-T と Cenp-N を動原体タンパク質として使用した。カイコの Cenp-T は、ヒトをはじめとする多くの生物のホモログと比較してサイズが大きいため、DNA 上に局在化させるために必要な最小領域と、他の動原体タンパク質と相互作用する領域を詳細に解析した

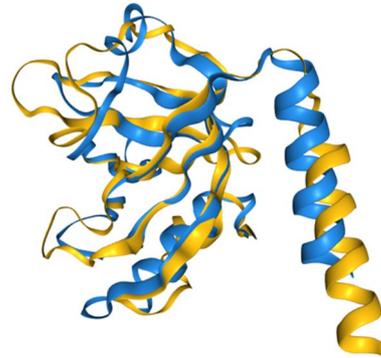
(右図)。また、動原体タンパク質を長期間、細胞内で発現させると発現量が低下するため、ヒト FKBP12 および大腸菌 dihydrofolate reductase (ecDHFR) タグを用いて、可逆的に細胞内のタンパク質量を制御可能なシ

ステムも構築した。構築した長鎖環状 DNA にリピート配列を複数導入し、dCas9 と gRNA を発現させることで、細胞に導入したプラスミドの可視化を試みた。また、様々なリピート配列を解析するため、dCas9-gRNA 発現ベクターを簡便に構築できるよう改良を行った。しかしながら、既存の EGFP では明確なシグナルが得られなかったため、現在、リピート数の増幅と退色が少なく、



より明るい蛍光タンパク質を使用した解析を進めている。

次に、染色体を安定的に維持するためには染色体末端が安定的に保護される必要があるが、カイコのテロメア末端維持に関する知見が少ないため、その機構に関わる遺伝子の解析を行った。カイコゲノムには、ヒトや酵母などのモデル生物においてテロメア末端で機能する遺伝子のホモログが見つかっていない。そこで、AlphaFold2 による構造類似度を指標に検索したところ、テロメア末端で機能するシェルテリン複合体に含まれる遺伝子と非常によく似た遺伝子を同定した（右図）。今後は、この遺伝子と相互作用する遺伝子を単離し、カイコ動原体遺伝子とテロメア局在遺伝子を利用して染色体の安定維持機構の解明を行い、人工染色体への応用を試みる。



上記の通り、長鎖環状 DNA を構築し、動原体タンパク質を DNA 上に局在化させる技術を構築できたが、カイコ培養細胞は、プラスミドのような小さな環状 DNA から長鎖 DNA まで、長期間保持しており、de novo 動原体形成が有効に機能しているかを判断することが難しかった。テロメアリピートとトランスポゾン配列を両末端にもった線状 DNA を土台にすることが必要であると考えられる。これらを達成する上でも、本研究結果は、今後のカイコ人工染色体構築の足がかりになると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mon Hiroaki, Sato Masanao, Lee Jae Man, Kusakabe Takahiro	4. 巻 151
2. 論文標題 Construction of gene co-expression networks in cultured silkworm cells and identification of previously uncharacterized lepidopteran-specific genes required for chromosome dynamics	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Insect Biochemistry and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 103875 ~ 103875
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ibmb.2022.103875	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 米澤 徳隆・門 宏明・佐藤 昌直・藤田 龍介・李 在萬・日下部 宜宏
2. 発表標題 カイコ培養細胞の有糸分裂に関わる機能未知遺伝子の解析
3. 学会等名 日本蚕糸学会第92回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柿野 耕平, 門 宏明, 佐藤 昌直, 藤井 告, 日野 真人, 李 在萬, 藤田 龍介, 日下部 宜宏
2. 発表標題 カイコ精巣をモデルとした配偶子形成に関与するカオナン遺伝子の解析
3. 学会等名 日本蚕糸学会第92回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 足立 朋範, 日野 真人, 門 宏明, 日下部 宜宏
2. 発表標題 カイコ人工染色体作製に向けた染色体単離手法の検討
3. 学会等名 日本蚕糸学会第93回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 米澤 徳隆, 門 宏明, 佐藤 昌直, 藤井 告, 日野 真人, 藤田 龍介, 李 在萬, 日下部 宜宏
2. 発表標題 鱗翅目昆虫の細胞分裂に関わる機能未知遺伝子の解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 門 宏明
2. 発表標題 分散型動原体をもつカイコ染色体
3. 学会等名 染色体学会 第74回年会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 米澤 徳隆, 門 宏明, 柿野 耕平, 佐藤 昌直, 藤田 龍介, 李 在萬, 日下部 宜宏
2. 発表標題 鱗翅目昆虫の細胞分裂に関わる機能未知遺伝子の解析
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 足立 朋範, 日野 真人, 門 宏明, 日下部 宜宏
2. 発表標題 カイコ人工染色体作製に向けた染色体単離手法の検討およびカイコBACの改良
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 米澤徳隆・柿野耕平・門 宏明・李 在萬・日下部宜宏
2. 発表標題 カイコにおける機能未知遺伝子KMMTBOM008400の機能解析
3. 学会等名 日本蚕糸学会第94回大会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------