

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580083

研究課題名(和文)ジンクフィンガーヌクレアーゼを用いたカイコセリシン遺伝子のノックアウト

研究課題名(英文) Knockout of Bombyx sericin genes using zinc finger nucleases

研究代表者

高須 陽子 (TAKASU, YOKO)

独立行政法人農業生物資源研究所・新機能素材研究開発ユニット・研究員

研究者番号：00414912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：カイコの繭に含まれるセリシンタンパク質をコードする2種類の遺伝子Ser1およびSer3遺伝子をそれぞれ部位特異的な人工ヌクレアーゼを用いてノックアウトした。得られたノックアウト系統のカイコは、それぞれのセリシンタンパク質を完全に欠損する繭を作った。今後、これらの遺伝子の特定の部位を欠失させるなどの方法で、さまざまな物性を示すセリシンを作出することが期待できる。たとえば、セリシンの除去が障害になっている絹糸腺を利用した物質生産や新たな機能を付加した絹製品の製造に適したセリシン変異系統として利用できる。

研究成果の概要(英文)：Sericin proteins are a group of glue proteins which constitute silkworm cocoons. Two sericin encoding genes, Ser1 and Ser3, were mutated by sequence-specific engineered nucleases separately, and Ser1- and Ser3-deficient strains were obtained, respectively. The homozygous mutant strains were confirmed to lack of the corresponding proteins in the cocoon. A similar method is applicable to remove a specific region of these genes in order to generate a novel sericin with different property. The silkworm strain with mutant sericin protein(s) will be useful for material production by silk glands as well as production of new silk fibers with additional functions, in which removal of sericin is regarded as a technical barrier.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学 応用昆虫学

キーワード：カイコ TALEN ノックアウト セリシン

1. 研究開始当初の背景

ゲノム中の特異的な配列に結合するジンクフィンガータンパク質と DNA 切断酵素を融合したジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) により、ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュ、センチュウ、カイコ、ラットなどで遺伝子ターゲティングが成功した。しかし、標的とする配列に特異的な ZFN を設計する手法は確立されておらず、さまざまな手法を用いて ZFN を設計しても、成功率は 20-50%にとどまっていた。また、成功した場合でも、生殖細胞に変異が導入される効率は一般に 1%未満であり、変異個体の検出に困難が伴うことが予想された。変異個体を容易に検出する方法としては、ZFN による切断部位へ相同組換えにより蛍光タンパク質遺伝子を導入する方法がショウジョウバエで成功し、他の生物でも同様の試みが行われていた。

カイコでは、油蚕原因遺伝子である *BmBLOS2* のノックアウトに成功したものの、その後有効な ZFN は見つかっておらず、相同組換えによる遺伝子導入も成功していなかった。

2. 研究の目的

カイコにおける遺伝子ターゲティングを実用的な技術とするため、非マーカー遺伝子であり、絹糸腺を用いた物質生産にも利用されているセリシン遺伝子のノックアウトを試みる。

3. 研究の方法

これまでに報告された ZFN の情報を元に、セリシン遺伝子のエクソン上の特異的な配列を認識する ZFN を設計する。また、蛍光タンパク質遺伝子の 3' 上流に標的配列を挿入したレポーター遺伝子をあらかじめカイコに導入し、その遺伝子の発現を指標として、ZFN の効率評価と変異個体の絞り込みを行う。

4. 研究成果

1)カイコへの *rosy* ターゲットの導入と ZFN の効率評価

カイコ染色体への変異導入をレポーター遺伝子により検出する方法の動作確認をおこなうため、緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子の 3' 上流にショウジョウバエで効果が確認されている ZFN の標的配列 *ry* を組み込んだ遺伝子組換えカイコを作製した (図 1)。異なる 3 系統の組換えカイコの受精卵に対し、

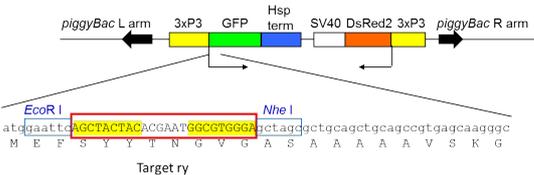


図 1. *ry* 標的配列を組み込んだレポーター遺伝子導入のための *piggyBac* ベクター。

ry 配列を特異的に切断する ZFN の mRNA を注射し、*GFP* 遺伝子のノックアウト効率を調べた。その結果、得られた受精域のうち約 3 分の 1 で変異体が観察された。このことから、*ry* に対する ZFN のノックアウト効率がカイコでも非常に高いこと、そして *GFP* の発現による変異個体スクリーニングが有効であることを確認した。

表 1. カイコにおける *GFP* 遺伝子のノックアウト

Strain	Eggs injected	% Hatched	Fertile broods	Yielders	Efficiency (%)
ry1	288	42.0	51	17	5.9
ry2	288	62.1	80	29	4.9
ry3	288	23.3	18	6	4.5

2)カイコ *Ser1* 遺伝子を標的とする ZFN の設計とクローニング

セリシンタンパク質をコードする主要な遺伝子である *Ser1* 遺伝子のエクソンに ZFN の標的配列を検索し、3 組の候補配列を決定した。これらに対して特異性を持つと期待される ZFN を設計し、酵母を用いた *MEL-1* アッセイにより、比較的切断効率の高い ZFN とターゲット S1-2 を絞りこんだ。さらに、縮重プライマーを用いた方法により、S1-2 に対して有効な変異型 ZFN を選び出した (図 2)。

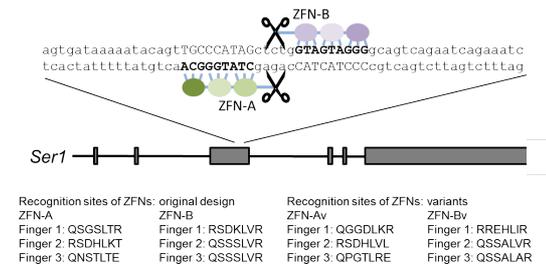


図 2. *Ser1* 遺伝子の第 3 エクソン上の特異的な配列と ZFN の認識部位のアミノ酸配列。

3) *Ser1* ターゲットを持つレポーター系統の作出と ZFN によるノックアウト実験

S1-2 ターゲット配列を上流に組み込んだ *GFP* 遺伝子を導入したカイコを用いて、2) で設計・クローニングした ZFN による *GFP* のノックアウト効率を評価した。2 組の ZFN をそれぞれ 384 粒の受精卵に注射し、得られた 78 蛾区の受精卵についてスクリーニングをおこなったが、その中に *GFP* がノックアウトされた卵は得られなかった。以上のように、ターゲット S1-2 を特異的に認識する ZFN が設計できなかったことから、活性のある ZFN の設計は非常に困難であると結論した。

4) TALEN による *Ser1* および *Ser3* 遺伝子のノックアウト

ZFN と同様に特異的な遺伝子配列を認識し、変異を導入する人工ヌクレアーゼとして近年開発された TALEN (Transcription activator-like effector nuclease) を用いることにより、カイコに対しても遺伝子変異の導入が可能であることが確かめられたため (Sajwan et al., 2013) *Ser1* および *Ser3* 遺伝子のノックアウトを目的として、これらのエクソン配列を特異的に認識する TALEN (図 3) をクローニングし、それらの mRNA をカイコ受精卵に注射した。それぞれ 336 粒

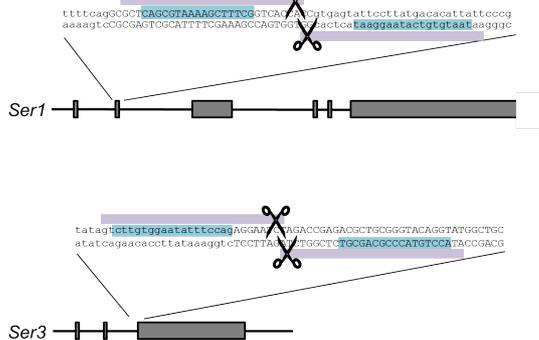


図 3. *Ser1* 遺伝子の第 2 エクソン (上) および *Ser3* 遺伝子の第 3 エクソン (下) の TALEN による認識配列。長方形はエクソン、実線はイントロン。大文字はエクソン配列、小文字はイントロン配列を示す。水色の背景部分が TALEN により認識される配列。

の受精卵に注射し、上簇した注射個体同士を交配して得られた受精卵のうち、4 蛾区ずつを選んで掃き立てて飼育し、各区 15 頭を上簇させた。*Ser1* ノックアウト試験区では、60 頭のうち 13 頭が正常な繭を作り、11 頭が薄皮繭を作った。残りは繭を作ることなく裸蛹あるいは不完全な蛹となり、これらについては羽化しなかった。*Ser3* ノックアウト試験区では、23 頭が正常繭、3 頭が薄皮繭を作り、26 頭が裸蛹あるいは不完全な蛹となった。それぞれの繭からセリシンタンパク質を抽出して SDS-PAGE をおこなったところ、目的のタンパク質を欠失した繭が確認された (図 4)。これら G_1 カイコを野生型と交配した後、

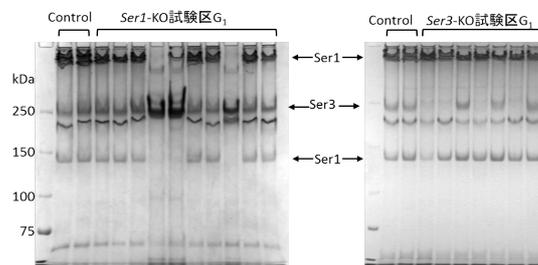


図 4. *Ser1* ノックアウト試験区 (左) および *Ser3* ノックアウト試験区 (右) の G_1 カイコの繭層セリシンの SDS-PAGE。

蛾区内交配を繰り返し、それぞれ 2 種類の変異系統を作出した (図 5)。これら 4 種類の変異系統はいずれも、変異遺伝子についてホモ

接合の個体では、完全に目的タンパク質を欠失していることが確認された (図 6)。*Ser1* あるいは *Ser3* タンパク質を完全に欠失する個体は全齢人工飼料育をおこなった場合、吐糸に失敗し、羽化する個体はまれであったが、5 齢のみ桑葉育することで改善された。



図 5. *Ser1* ノックアウト試験 (上) および *Ser3* ノックアウト試験 (下) より得られたセリシンノックアウト系統の遺伝子配列。

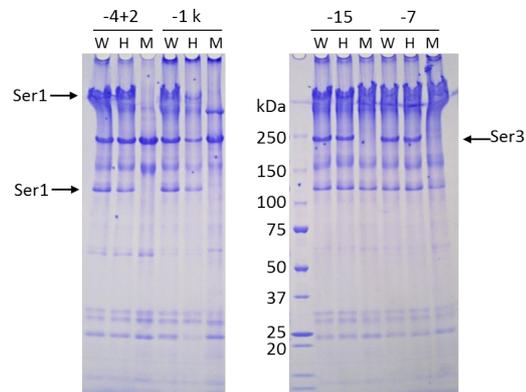


図 6. *Ser1* ノックアウト系統 (左) および *Ser3* ノックアウト系統 (右) の繭層セリシンの SDS-PAGE。野生型と変異型のホモ接合同士の交配により得られた個体から繭層セリシンを抽出。図 5 の 4 系統の変異型 (-4+2 bp, -1 kbp, -15 bp, -7 bp) について、それぞれ野生型ホモ (W), ヘテロ (H), 変異型ホモ (M) の分析結果。

5) TALEN を用いたカイコ遺伝子ノックアウト実験の標準プロトコールの確立

Ser1 および *Ser3* 遺伝子のノックアウト実験を通して、カイコ遺伝子のノックアウト実験の標準的な手法を確立し、その内容を論文にまとめた (Takasu et al., 2014 in press)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- 1) Takasu Y, Tamura T, Sajwan S, Kobayashi I, Zurovec M (2014) The use of TALENs for nonhomologous end joining mutagenesis in silkworm and fruitfly. **Methods** in press.

2) Takasu Y, Sajwan S, Daimon T, Osanai-Futahashi M, Uchino K, Sezutsu H, Tamura T, Zurovec M (2013) Efficient TALEN construction for *Bombyx mori* gene targeting. **PLoS One** 8: e73458.

3) Sajwan S*, Takasu Y*, Tamura T, Uchino K, Sezutsu H, Zurovec M (2013) Efficient disruption of endogenous *Bombyx* gene by TAL effector nucleases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 43: 17-23.
*Equal contribution.

〔学会発表〕(計 5件)

- 1) 高須陽子・田村俊樹・内野恵郎・瀬筒秀樹 (2013)セリシンノックアウトカイコの作出と繭層セリシンの分析. **第60回日本シルク学会研究発表要旨集** 15
- 2) 高須陽子・田村俊樹・小林功・内野恵郎・瀬筒秀樹・Michal Zurovec (2012)カイコに挿入した *ry* 標的配列に対する変異導入効率. **日本蚕糸学会関東支部第63回大会講演要旨** 11
- 3) 高須陽子・田村俊樹・小林功・内野恵郎・瀬筒秀樹・Suresh Sajwan・Michal Zurovec (2012) TALEヌクレアーゼを用いたカイコ遺伝子ノックアウトの試み. **日本蚕糸学会第82回大会講演要旨** 61
- 4) 高須陽子 (2011) ジンクフィンガーヌクレアーゼを用いたカイコ遺伝子のノックアウト. **新学術領域「複合適応形質進化の遺伝子基盤解明」若手ワークショップ COMPLEX ADAPTIVE TRAITS Newsletter** p.11
- 5) 高須陽子・小林功・瀬筒秀樹・飯塚哲也・内野恵郎・田村俊樹・Suresh Sajwan・Michal Zurovec (2011) ジンクフィンガーヌクレアーゼによるカイコ遺伝子のターゲティングの現状と問題点. **日本蚕糸学会支部合同大会講演要旨** 20

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1件)

名称: カイコのセリシン1変異系統
発明者: 高須陽子・田村俊樹・飯塚哲也・亀田恒徳・桑名芳彦

権利者: 独立行政法人農業生物資源研究所
種類: 特許
番号: 特願 2013-244477
出願年月日: 平成 25 年 11 月 27 日
国内外の別: 国内

○取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者
高須陽子 (TAKASU YOKO)
独立行政法人農業生物資源研究所 遺伝子組換え研究センター 新機能素材研究開発ユニット 主任研究員
研究者番号: 00414912

(2)研究分担者
()

研究者番号:

(3)連携研究者
瀬筒秀樹 (SEZUTSU HIDEKI)
独立行政法人農業生物資源研究所 遺伝子組換え研究センター 遺伝子組換えカイコ研究ユニット ユニット長
研究者番号: 70342805