

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：82112

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658056

研究課題名(和文)カイコにおける遺伝暗号拡張のための基盤研究

研究課題名(英文)Study on the basis for genetic code expansion in silkworm

研究代表者

寺本 英敏(Teramoto, Hidetoshi)

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・主任研究員

研究者番号：60391562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円、(間接経費) 780,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、21番目のアミノ酸をコードできるカイコ系統を作出するための基盤研究を実施した。具体的には、終止コドンを利用して遺伝暗号を拡張する際に妨害要因となりうるNMD(nonsense-mediated mRNA decay)関連遺伝子をノックアウトし、本来NMDの標的となるmRNAを安定化できるか試みた。カイコNMD関連遺伝子を標的とするTALEヌクレアーゼをカイコ培養細胞に投与し、標的遺伝子配列の変化を解析するとともに、NMDに感受性の蛍光タンパク質の発現量変化を追跡した。その結果、標的遺伝子配列の変化は認められたものの、蛍光タンパク質発現量の明らかな変化は確認できなかった。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to construct the basis for genetic code expansion in silkworm, *Bombyx mori*. NMD, nonsense-mediated mRNA decay, could be an obstacle for genetic code expansion using stop codon reassignment methodology. In this study, it was investigated that mRNAs intrinsically degraded by NMD could be stabilized by knocking NMD-related genes out in silkworm cultured cells. We transfected TALE nucleases which target NMD-related genes to the cultured cells. Changes in the targeted gene sequences and in the expression of a fluorescent protein whose mRNA is sensitive to NMD were investigated after the transfection. We detected some changes in the targeted gene sequences but no apparent changes in the expression of the fluorescent protein were observed.

研究分野：バイオテクノロジー

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：昆虫 生体機能利用 バイオテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

21 番目のアミノ酸をコードするよう生物の遺伝暗号を拡張することで、自然界にはない機能をもつタンパク質の作出が可能になっている。微生物を用いた系では、医薬品としての臨床応用を見据えた研究も進んでいる。遺伝暗号拡張は、これまで単細胞生物および培養細胞での応用に留まっていたが、ごく最近になって、多細胞生物である線虫 (*C. elegans*) への応用が報告された。今後、他の多細胞生物においても同様の試みが進むと予測される。

カイコ (*B. mori*) は組換えタンパク質の生産ホストとして他の系にはない特徴 (低コスト・翻訳後修飾など) を有しており、診断薬等の実用生産に向けた研究が進展している。また、カイコが繭として産生するシルクタンパク質は強度や生体適合性に優れ、医工学材料としての利用研究が国内外で進められている。我が国はカイコの研究で長い歴史をもち、現在もゲノム解析やポストゲノム・遺伝子組換え研究などで世界をリードしている。

上述の背景から、カイコの遺伝暗号を拡張することは、産業動物としてのカイコの有用性を飛躍的に向上させ、我が国独自の技術として医薬品や材料開発に大きなインパクトを与える可能性を有している。

2. 研究の目的

本研究では、カイコ (*B. mori*) の遺伝暗号を拡張して 21 番目のアミノ酸をコードできるシステムを作出するための基盤研究を実施する。

具体的には、終止コドンを利用して遺伝暗号を拡張する際に妨害要因となりうる NMD (nonsense-mediated mRNA decay: タンパクコード領域に終止コドンを持つ mRNA を急速に分解する機構) 関連遺伝子を遺伝子ターゲティング法によりノックアウトし、本来 NMD の標的となるはずの mRNA が安定化されるかを明らかにする。これにより、カイコ NMD の分子機構の一端を明らかにするとともに、遺伝暗号拡張に適した NMD 欠損カイコシステムを作出するための基礎的知見を集積する。

3. 研究の方法

本研究では、遺伝子ターゲティング法として TALE ヌクレアーゼ (TALEN) を用いる方法を第一に検討する。1 年目では、カイコ NMD 関連遺伝子を標的とする TALEN 遺伝子を構築するとともに、NMD ノックアウトアッセイに用いるカイコ培養細胞を作出する。2 年目では、作出した培養細胞を用い、NMD 関連遺伝子を標的とする TALEN の発現による NMD 活性の変化を解析し、NMD 活性を失活あるいは低減させるための標的遺伝子を明らかにする。

4. 研究成果

(1) NMD 関連遺伝子の DB 検索とターゲティング標的配列の確認

キイロショウジョウバエ (*D. melanogaster*) で知られている 4 種の NMD 関連遺伝子 (*Upf1*, *Upf2*, *Upf3*, *Smg1*) の配列を用いてカイコゲノム DB を検索したところ、*Upf1*~3 に相同な配列をもつ候補遺伝子 (*BmUpf1*, *BmUpf2*, *BmUpf3*) がヒットした。一方、*Smg1* に相同な配列をもつ有力な候補遺伝子はヒットしなかった。DB 検索で得られた候補遺伝子配列を元に、カイコ培養細胞 (BmN) のゲノム DNA をテンプレートとして *BmUpf1*~3 の部分配列を増幅し、シークエンスによりその配列を決定した。

(2) *BmUpf1*~3 を標的とする TALEN の設計と遺伝子構築

上記 1 で決定した配列を元に、*BmUpf1*~3 に含まれる特定の制限酵素サイトが切断を受けるよう、それらの前後に TALEN の認識 DNA 配列を設定した (図 1)。

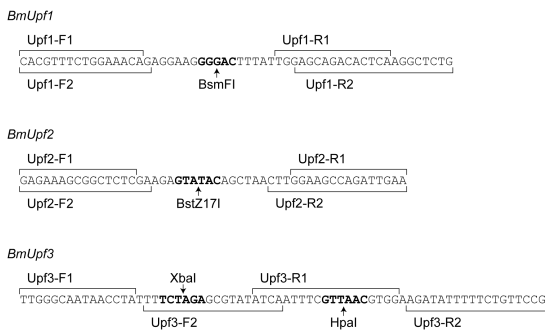


図 1. *BmUpf1*~3 に含まれる制限酵素サイト前後に設定した TALEN 認識 DNA 配列 Forward および Reverse 認識配列をそれぞれ F および R として示す。

上記の標的配列を認識するよう設計した TALEN をコードする遺伝子 (計 12 種類) を組み込んだベクターを構築した。

(3) 3'非翻訳領域によるタンパク質発現への影響解析

キイロショウジョウバエでは、3'非翻訳領域 (UTR) に SV40 3'UTR をもつ mRNA が NMD 機構による分解を受けることが報告されている。カイコでも同様の現象が認められれば、NMD 活性のアッセイに用いることができる。そこで、GFP 遺伝子の下流に Hsp70 3'UTR および SV40 3'UTR を繋いだ発現ベクターを BmN 細胞へトランスフェクションし、GFP の発現量を比較した (図 2)。

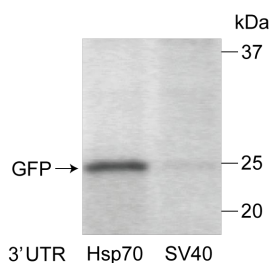


図2 . 異なる 3'UTR (Hsp70, SV40) をもつ GFP 遺伝子の BmN 細胞での発現 Strep-tag でアフィニティ精製した GFP の SDS-PAGE 像を示す。

図2の結果から、SV40 3'UTR を繋いだ場合には、Hsp70 3'UTR を繋いだ場合と比較して GFP の発現量が大幅に減少することが分かった。このことから、カイコでもキロシヨウジョウバエと同様に、SV40 3'UTR をもつ mRNA が NMD 機構の標的となることが示唆された。そこで、この現象を利用して NMD 活性をアッセイするための仕組みを構築することにした。

(4) NMD アッセイ用組換え BmN 細胞の作出

GFP に SV40 3'UTR を繋げた発現カセットと、内部標準として DsRed に Hsp70 3'UTR を繋げた発現カセットをタンデムに配置した piggyBac ベクターを構築した(図3)。発現プロモーターは双方に共通とした。

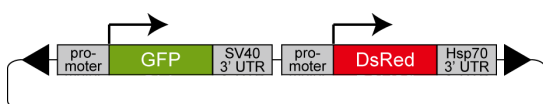


図3 . アッセイ用組換え BmN 細胞の作出に用いた piggyBac ベクターの模式図 異なる 3'UTR を繋いだ DsRed および GFP 遺伝子をタンデムに連結した。

構築したベクターをヘルパープラスミドとともに BmN 細胞にトランスフェクションし、その後約 3 ヶ月間継代培養した。細胞の懸濁液を希釈して別の培養プレートに播種し、約 1.5 ヶ月間培養して増殖させた。GFP および DsRed を発現するコロニーから細胞を掻き取って別のフラスコに移し、継代培養した。得られた細胞集団では GFP および DsRed が恒常的に発現しており、これらの遺伝子がゲノム中に挿入されていると判断した。そこで、これら細胞集団を以下のアッセイに用いた。

TALEN による標的遺伝子のノックアウトによって NMD 活性が低減すると、SV40 3'UTR をもつ GFP の発現量が増加し、一方で Hsp70 3'UTR をもつ DsRed の発現量は変化しないと想定される。したがって、GFP と DsRed の発現量比を追跡することで、NMD 活性の

変化を知ることができると考えた。

(5) BmN 細胞への TALEN 投与によるゲノム切断および蛍光タンパク質発現量の解析

上記2で作製したベクターをテンプレートに、*in vitro* 転写によって TALEN mRNA を合成した。

まず、*BmUpf1* を標的とする TALEN mRNA (Upf1-F2 および Upf1-R1, 各 10 µg) を、4 で作出した組換え BmN 細胞 ($2\sim 3\times 10^6$ 個) にトランスフェクションした。2 日間培養後、細胞からゲノム DNA を抽出し、図1に示す BsmFI サイトを含む領域近傍の DNA 断片を PCR 増幅した。TALEN で切断を受けることによって DNA 配列に変異・欠失・挿入が起こると、制限酵素によって切断されなくなると予想される。しかし、増幅した断片を BsmFI でカットしたところ、コントロールに比べて明確な変化は観察されなかった。

キロシヨウジョウバエでは、相同する *Upf1* 遺伝子は生命維持に必須とされている。上記の結果から、切断自体が起こらなかった可能性に加え、*BmUpf1* 遺伝子がノックアウトされた細胞が死滅したことにより、切断パターンの変化が観察されなかった可能性も考えられる。

次に、*BmUpf3* を標的に同様の実験を行った。TALEN mRNA (Upf3-F1 および Upf3-R1, 各 5 µg) をトランスフェクションした組換え BmN 細胞 ($2\sim 3\times 10^6$ 個) を 6 日間培養し、ゲノム DNA を抽出した。図1に示す XbaI サイトを含む領域近傍の DNA 断片を PCR 増幅し、XbaI による切断パターンを比較した(図4)。その結果、TALEN mRNA 投与区においてわずかながら未切断の断片が観察された。このことから、細胞の一部においてゲノム中の標的配列が TALEN によって切断を受けたと推察した。一方、細胞での GFP および DsRed の発現量は、明確な変化が観察されなかった(図5)。

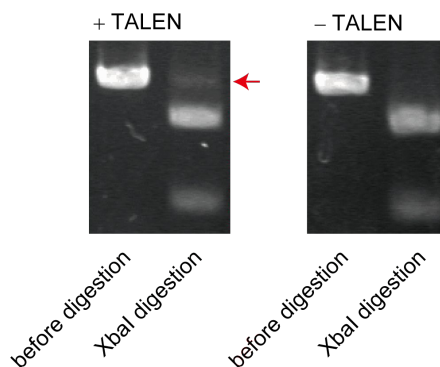


図4 . TALEN mRNA (Upf3-F1+Upf3-R1) トランスフェクション 6 日後の BmN 細胞ゲノム DNA 断片の XbaI 切断パターン TALEN mRNA 投与区においてわずかに切れ残りが見られる (パネル A 赤矢印)。

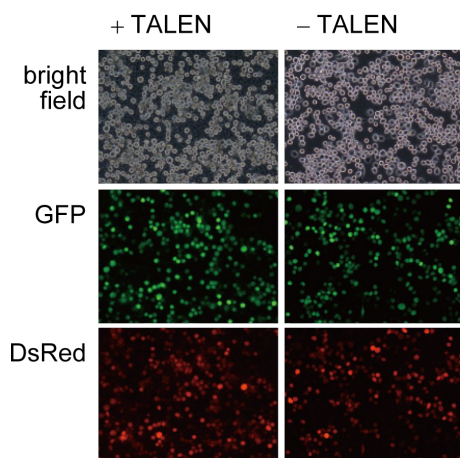


図 5 . TALEN mRNA (Upf3-F1+Upf3-R1) トランスフェクション 6 日後の BmN 細胞における蛍光タンパク質の発現状態

さらに、同じく *BmUpf3* を標的に、異なる TALEN のペア (Upf3-F2 および Upf3-R2, 5 μ g) を用いて同様の実験を行った。8 日間培養後ゲノム DNA を抽出して上記と同じ DNA 断片を PCR 増幅し、HpaI による切断パターンを比較した。その結果、上記と同様に TALEN mRNA 投与区においてわずかながら未切断の断片が観察された (図 6)。一方、細胞での GFP および DsRed の発現量は、上記と同様に明確な変化が観察されなかった (図 7)。

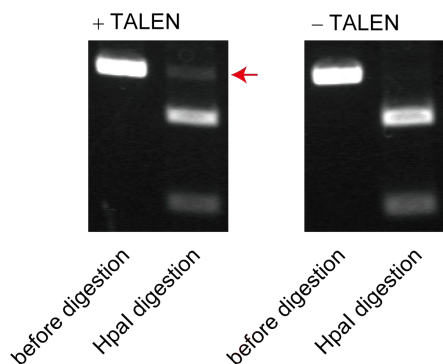


図 6 . TALEN mRNA (Upf3-F2+Upf3-R2) トランスフェクション 8 日後の BmN 細胞ゲノム DNA 断片の HpaI 切断パターン TALEN mRNA 投与区においてわずかに切れ残りが見られる (パネル A 赤矢印)。

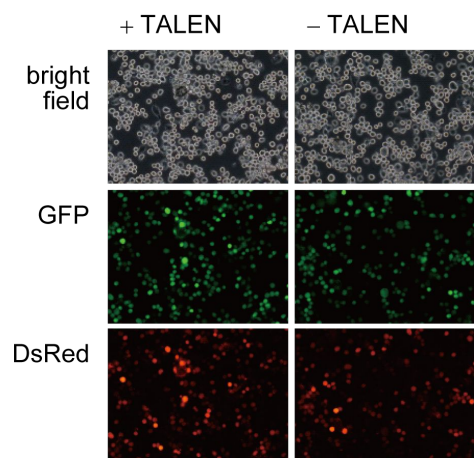


図 7 . TALEN mRNA (Upf3-F2+Upf3-R2) トランスフェクション 8 日後の BmN 細胞における蛍光タンパク質の発現状態

以上の結果から、設計した TALEN は *BmUpf3* のノックアウトに有効であることが分かった。キロシヨウジョウバエでは相同する *Upf3* は生命維持に必須ではないとされており、NMD 活性を低減させる標的遺伝子として適していると考えられる。DNA 断片の切断実験から推測すると、ゲノム中の *BmUpf3* が変異した細胞数はごく少数であると推察される。今後、細胞における蛍光タンパク質の発現量をより正確に定量評価することで、*BmUpf3* 遺伝子ノックアウトの影響を明らかにできると考えている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

寺本 英敏 (TERAMOTO HIDETOSHI)
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 : 6 0 3 9 1 5 6 2

(2) 研究分担者

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 : 0 0 4 1 4 9 1 2