

蜘蛛の糸を蚕に吐かせる研究

(遺伝子ターゲティングによる家蚕フィブロイン遺伝子の改造)

信州大学繊維学部 中垣雅雄・塩見邦博・梶浦善太・八森 章

1. 緒言

カイコを宿主としないバキュロウイルス（害虫バキュロウイルス）の通常量をカイコに接種しても、極端な病状は示さず、正常に交尾産卵する。しかし、そのウイルスはカイコの細胞内に侵入し、ウイルス DNA は核まで到達し得る。この性質を利用して、Yamao ら(1999)は、害虫バキュロウイルスを用いたジーンターゲティング法を開発して、トランスジェニック・カイコの作成に成功した。ジーンターゲティング法には、新たな遺伝子の導入、在来遺伝子の改変や破壊など様々な応用が期待される。我々は、Yamao ら(1999)の方法を用いて、蜘蛛糸タンパク質の遺伝子をカイコ・フィブロイン遺伝子に導入することを試みているが、導入効率が Yamao ら(1999)の報告に比べ極端に低く、蜘蛛糸タンパク質遺伝子の導入されたカイコを選抜するに至っていない。ジーンターゲティングの導入効率を上げるためには、カイコの生殖細胞の核に到達する「蜘蛛糸遺伝子を運ぶ組換えウイルス」の DNA 量をより多くし、相同組換えのチャンスを増やすことが重要と考えられる。このためには、カイコに接種する組換えウイルスの量を増やす必要がある。そこで、通常量を越える組換えウイルスをカイコに接種した場合、カイコにどのような影響があるのかを調査した。また、カイコの生殖細胞内に到達する組換えウイルスの DNA 量がどの程度なのかを調査した。

2. 材料と方法

クローニング・ベクターとしては、害虫バキュロウイルス AcMNPV 用のトランスファー・ベクターである pFASTBAC を用いた。pFASTBAC に、BAC クローンから制限酵素で切り出したフィブロイン H 鎖遺伝子の相同配列と蜘蛛糸タンパク質の遺伝子を両者がインフレームになるように導入した。さらに、ジーンターゲティング・カイコを選抜指標として、カイコ・アクチン A3 プロモーターに制御された緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺

伝子をも導入した。これら遺伝子を導入したトランスファー・ベクターを用いて組換えウイルスを作成し、これをジーンターゲティング・ベクターとしてカイコに接種した。接種に用いたカイコ品種は、限性虎蚕、日 124 号、支 124 号×大草である。どのカイコも、室温 $26 \pm 2^\circ\text{C}$ で桑葉育し、ベクター接種後の生存率、蛹化率を調査した。また、これとは別に、ベクター接種後、カイコを解剖して生殖巣、脂肪組織、気管、脳・神経、絹糸腺、中腸、血球、マルピーギ管などを摘出した。摘出した各組織からそれぞれ total DNA を抽出した。各組織細胞に含まれるベクター DNA の有無を PCR 法により確認し、その量をプロットング法により比較した。

3. 結果と考察

フィブロイン H 鎖遺伝子の相同配列の間にインフレームに挿入した蜘蛛糸タンパク質の遺伝子と GFP 遺伝子カセットを導入した、約 12kbp の外来遺伝子を AcNPV に組み込んだジーンターゲティング・ベクターを作成した。

ジーンターゲティング・ベクターをカイコに接種したところ、このベクターが生殖巣細胞を始め、脂肪組織細胞、気管細胞、脳・神経系細胞、絹糸腺細胞、中腸細胞、血球細胞、マルピーギ管細胞などの調査したすべての細胞に到達していることが確認された。しかしながら、生殖巣細胞内へのベクター到達量は、脂肪組織細胞、気管細胞、脳・神経系細胞に比べるとかなり少なかった。現在、ベクター到達量を増やす方法を検討している。

高濃度のベクターをカイコに接種すると、カイコの発育成長が阻害されることがわかった。その阻害の程度は、カイコの品種によって大きく異なることがわかった。今回調査した品種の中では、限性虎蚕が最も阻害を受けにくかった。ジーンターゲティングの導入効率を上げる目的で、高濃度のベクターを接種するためには、阻害を受けにくい蚕品種を供試する必要があることが判明した。