

# 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)

中垣雅雄・武井隆三・木口憲爾・梶浦善太・矢島征雄  
信州大学 繊維学部 応用生物科学科

## 1. 緒言

フィブロイン遺伝子の改造を試みるためには、フィブロイン遺伝子の構造や合成機構を明らかにする必要がある。裸蛹 (*Nd*蚕) 突然変異はフィブロイン合成が著しく低下している突然変異種であり、ほとんど絹を吐くことなく蛹化する。*Nd*変異はフィブロインH鎖遺伝子の発現に密接に関係している可能性があり、フィブロインmRNAを正常体と裸蛹で比較すると明らかに裸蛹では少ないことから、*Nd*変異体ではフィブロインH鎖遺伝子の転写段階に抑制が働いていると想像されるので、これを調査した。

フィブロイン遺伝子の改造のためにバキュロウイルス(NPV)の多角体遺伝子の強いプロモータを利用する予定である。即ち外来遺伝子とその前後にカイコ染色体のフィブロイン遺伝子の塩基配列をもつ組換え体NPVを作成する。この組換え体NPVに外来遺伝子を生殖細胞の核に運ばせ、ウイルスDNA上のフィブロイン遺伝子配列と染色体上のフィブロイン遺伝子との相同性組換えを利用して、外来遺伝子をフィブロイン遺伝子の中に挿入する。このため、NPVの多角体遺伝子の強いプロモータについても、調査した。

## 2. 実験方法

供試蚕品種はC132号と*Nd*蚕である。5齢2日の幼虫後部絹糸腺からゲノミックDNAを抽出し、フィブロインH鎖遺伝子の5'末端をPCR法で増幅し、

ダイレクトシーケンスで配列を決定した。転写開始点の決定については5'RACE法を用いた。抽出したmRNAのRT反応を経て濃縮したものを5'RACEによって増幅し配列を決定した。転写の量、有無を確かめるためにrun-off法を用いた。*Nd*蚕、C132号蚕の5齢2日の後部絹糸腺より取り出した核抽出物のプロモーター領域を含むフィブロインDNA断片をPCR法により増幅したものを鋳型として、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ UTP存在下で転写反応を行った。得られた転写物をアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、オートラジオグラフィーにて検出した。

## 3. 結果と考察

塩基配列特定の結果、*Nd*蚕と正常蚕のC132号とのフィブロイン遺伝子5'末端周辺領域の塩基配列の差異は特に見られなかった。同様に、5'RACE法による転写開始点の決定と正常蚕との比較の結果、差異は特に見られなかった。

run-off法の結果、C132号の核抽出物にC132号のフィブロインDNA断片を反応させた場合、また、C132号の核抽出物に*Nd*蚕のフィブロインDNA断片を反応させた場合には転写反応が行われ、対応する大きさのRNAが合成された。一方、*Nd*蚕の核抽出物を使った場合、C132号と*Nd*蚕の両方のフィブロインDNA断片に対応する転写産物はほとんど検出されなかった。以上のことから、*Nd*蚕におけるフィブロインH鎖遺伝子の転写調節はフィブロインH鎖

遺伝子上の配列ではなく、5齢2日における後部絹糸腺細胞核内の転写因子に原因があると考えられた。

蚕フィブロイン合成の分子機構について研究すると同時に、蜘蛛と野蚕からもフィブロイン遺伝子をクローニングを試み、新しい昆虫フィブロインの作製に挑戦したい。

カイコのNPVが感染した中腸細胞では、多角体が形成されにくい。この原因を明らかにするために、中腸細胞と脂肪体細胞におけるBmNPVのウイルスDNA量、ポリヘドリンmRNA量とポリヘドリン量を調査した。ノーザン・プロット分析により中腸細胞におけるポリヘドリンmRNAの出現時期・蓄積状況を調査したところ、調査を開始した6時間目に微量ではあるがすでに検出され、12時間目以降にははっきりと検出された。感染72時間目の中腸細胞と脂肪体細胞のポリヘドリンmRNA量を定量的PCRにより調査したところ、どちらの細胞でもほぼ同程度量のポリヘドリンmRNAが蓄積していることが明らかになった。また、感染72時間目の両細胞のウイルスDNA量を定量的PCRにより測定したところ、どちらの細胞でもほぼ同程度量で、ほとんど差はなかった。中腸は多角体が形成されにくい、中腸でも脂肪体と同程度のウイルスDNA複製が起こることを示すものと考えられる。ウエスタン・プロット分析により感染末期の両細胞におけるポリヘドリン蓄積量を調査したところ、中腸細胞では、脂肪体細胞に比べ極めて少ないことが明らかになった。脂肪体細胞に比べ、中腸細胞で多角体が形成されにくいのは、ポリヘドリン遺伝子の翻訳量が少ないことに関係していることが明らかになった。

家蚕核多角体病ウイルス(BmNPV)の25K遺伝子の塩基配列と、その転写産物の末端を調べた。BmNPVでは、25K遺伝子の変異によるfew polyhedra (FP) 変異株は確認されていない。そこで本研究では、BmNPV 25K遺伝子の不活化がFP変異の表現型を誘導することを確認した。次に、これまで報告さ

れた多角体変異株のうちの2株、すなわちサイコロ型の多角体をつくり、その多角体に包埋されるウイルス粒子の数が少ないBmNPV-T株と、中腸細胞で多角体をつくりやすいBmNPV-La株の25K遺伝子に変異があるかどうかを調べるため、それらの25K遺伝子をクローニングして塩基配列を決定し、野生型多角体をつくるBmNPV-H株のものと比較した。BmNPV-T株の25K遺伝子から推定されるアミノ酸配列は、BmNPV-La株のものと同じであった。このことは、BmNPV-T株とBmNPV-La株の間にみられる多角体形成の相違は、25K遺伝子の変異によるものではないことを示している。BmNPV-H株の25Kタンパク質の推定アミノ酸配列には、BmNPV-T株やBmNPV-La株のものに比べて、アミノ酸の置換と欠失が一つずつあった。3つのNPV株の25K遺伝子の転写産物における違いの有無を調べた。BmNPV-T株とBmNPV-La株の25K遺伝子の完全長cDNAには、いずれも645 bpのタンパク質コード領域、126 bpの5'非翻訳領域とポリ(A)付加部位までの135 bpの3'非翻訳領域があり、転写産物サイズにおける違いは認められなかった。プライマー・エクステンション実験の結果、どのBmNPV株でも25K遺伝子の転写開始点は初期プロモーターCAGTに近接した部位であった。蚕以外の昆虫のNPVの25K遺伝子では、後期プロモーターATAAGから転写されることが報告されているので、初期プロモーターから転写されるBmNPV 25K遺伝子の転写は極めてユニークであることが明らかになった。