

カイコ人工染色体構築のための DNA 複製誘導因子の探索

昆虫ゲノム科学研究室 修士二年 日野 真人

カイコは、有用な産業昆虫の1つであり、有用組換えタンパク質の大量生産などに用いられている。その中で、ヒト型の糖鎖修飾を受けたタンパク質をカイコで生産することは、遺伝子組換えにより技術的には可能であると考えられている。しかし、そのためには内在・外来遺伝子の削除・導入・発現制御を行う必要があり、特に大量の外来遺伝子の導入は、既存の染色体挿入を基盤とした技術では限界があると考えられる。このような背景から、宿主染色体とは独立の発現制御を受け、大量の外来遺伝子の発現を自由自在に制御できる人工染色体の開発を思い立った。染色体が安定に細胞内に存在するためには、細胞周期毎に少なくとも1回複製され、娘細胞に均等に分配される必要がある。本研究においては複製に着目し、カイコ人工染色体を複製させる方法の確立を目指して研究を行うことにした。

DNA 複製は、複製起点と呼ばれる領域から始まり、多くのタンパク質が複合体を形成することにより厳密に制御されている。DNA 複製機構は複雑であり、特にカイコでは研究が進んでいないが、数種の生物において DNA に結合することで複製を開始させる因子が報告されている。このような DNA 複製誘導因子をカイコの DNA 複製関連遺伝子の中から見出し人工染色体に結合（テザリング）させれば、カイコ細胞内で人工染色体を複製させることができるのではないかと考えた。そこで、カイコ DNA 複製関連因子を研究対象として、初めに DNA 複製関連因子の中から複製必須遺伝子を選抜し、その後、その必須因子が DNA 複製を誘導するか否かを確認する（テザリング実験）という流れで研究を進めていくこととした。

学部生時、複製必須遺伝子を選抜するため複製関連全遺伝子のノックダウンを試み、フローサイトメーターによりノックダウンの細胞周期への影響を調査していた。この実験の結果をより正確に評価するために、本研究では RT-PCR によるノックダウン効率の評価を最初に行った。その結果、ノックダウンは成功しているが、5日間のノックダウンでは細胞周期へ影響を及ぼさない因子が31個存在していることが分かった。続いて、選抜された複製必須遺伝子のクローニングを行い、クローニングできた因子をプラスミドに結合させ、プラスミドがカイコ培養細胞内で複製されるか否かを確認するテザリング実験を行った。結果として、CDC6・CDT1・ORC1をテザリングすることでプラスミドが複製されるという結果を得た。カイコ人工染色体を複製させる方法として、これら因子を利用できることが示唆された。