

An Attempt to Construct a Silkworm Artificial  
Chromosome and Characterization of DNA  
Replication Related/Genes in the Silkworm,  
*Bombyx mori*

日野, 真人

<https://hdl.handle.net/2324/4060213>

---

出版情報：九州大学, 2019, 博士（農学）, 課程博士  
バージョン：  
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（2）

氏名	日野 真人			
論文名	An Attempt to Construct Silkworm Artificial Chromosome and Characterization of DNA Replication Related-Genes in the Silkworm, <i>Bombyx mori</i> (カイコ人工染色体作製の試みとカイコ DNA 複製関連遺伝子の機能解析)			
論文調査委員	主査	九州大学	教授	日下部 宜宏
	副査	九州大学	教授	飯田 弘
	副査	九州大学	教授	伴野 豊

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、モデル生物であるとともに有用な産業昆虫の一つであるカイコにおいて、基礎研究、応用利用の両面から期待されている人工染色体の構築に必要なカイコ複製の分子機構の解析を行い、それを利用した人工染色体デザインを試みたものである。近年、カイコは、有用組換えタンパク質の大量生産用宿主としても用いられているが、組換えタンパク質の高付加価値化、例えば、タンパク質糖鎖修飾のヒト型化など、カイコ遺伝子組換え技術による多数の遺伝子の編集が必須である研究課題がある。その場合、内在・外来遺伝子の削除・導入・発現制御を行う必要があり、多数の外来遺伝子の導入については、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。この問題点を解決する手段として、人工染色体が利用可能であると考えられるが、カイコにおいて人工染色体は実用化されていない。そこで、本研究では、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試みた。また、そのために必要となるカイコ DNA 複製に関連する遺伝子群の機能解析を行った。

細胞内で人工染色体が安定維持されるためには、導入した人工染色体が細胞周期ごとに複製され、細胞分裂中に娘細胞に適切に分配される必要がある。本研究では、まず、DNA に結合することで DNA 複製を誘導することができる DNA 複製因子の探索を行った。カイコ DNA 複製関連 43 遺伝子を選抜し、5 日間の遺伝子ノックダウンを行いカイコ DNA 複製において重要な役割を果たす遺伝子を見出した。その後、DNA 複製誘導能力を確認し、BmCdc6、BmOrc1、BmCdt1 の 3 因子が、DNA 複製誘導能力を持つことを明らかにした。そこで、これらの因子を利用したカイコ人工染色体を構築し、カイコ卵へ注入したが、成長したカイコ個体内での人工染色体の維持を確認することはできなかった。

次に、複製の開始反応に重要な Origin recognition complex (ORC) の構成因子である Orc1 が DNA 複製誘導能力を持つことが確認されたため、Orc の機能解析を行った。Insect two-hybrid analysis と Co-immunoprecipitation assay により、BmOrc2 と BmHP1a と BmHP1b が相互作用していること、特に、BmOrc2 の PXVXL モチーフがその相互作用に寄与していることを明らかにした。他生物では Orc1 の N 末端と HP1 が直接相互作用するが、BmOrc1 では当該領域は保存されていないため、カイコでは Orc1 の果たす役割を Orc2 が担っている可能性が示唆された。

最後に、カイコ DNA 複製機構を明らかにするため、DNA ポリメラーゼ、クランプ、クランプローダーの遺伝子ノックダウン実験を行い、これら遺伝子の機能阻害が細胞周期に与える影響を評価

した。その結果、DNA ポリメラーゼについては、ノックダウン後すぐに細胞周期に変化が現れ S 期で停滞・遅延するが、クランプやクランプローダーのノックダウンの影響は DNA ポリメラーゼの場合よりも遅れて現れることが明らかとなった。さらに、BmCtf18 が DNA 複製に非常に重要な役割を担っていることを明らかにした。

以上要するに、本論文は、カイコにおける複製関連遺伝子の機能解析を行い、また、テザリングにより複製誘導能力を有する因子を見出した。また、これらの遺伝子を利用した人工染色体の試作を行い、その実現にあたっての技術課題を明確に提示したもので、昆虫ゲノム科学、特に昆虫人工染色体の構築基盤となる分子機構の理解とその制御に寄与する優れた業績である。よって、本論文は博士（農学）の学位に値すると認める。