

令和元年度 日本大学文理学部個人研究費 研究実績報告書

所属・資格 生命科学科・助手

申請者氏名 小山 里実

研究課題		遺伝子ノックアウト技術を用いたカイコガ変異形質の原因遺伝子の同定
報告の概要	研究目的 および 研究概要	<p>近年、特定遺伝子を破壊した後に形質を解析することでその原因遺伝子を同定する逆遺伝学的手法が確立され、様々な生物において応用も含めた有効性が認められている。ゲノム編集の手法は、TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease) を用いることでより確実に遺伝子を破壊することが可能となり、カイコガにおいてもその検証が急速に行われている。一方、カイコガには様々な変異系統が維持されており、それらの特徴的な形質を制御する遺伝的要因の解明が望まれている。しかしながら、ポジショナルクローニング法など従来の順遺伝学的手法だけでは、多大な労力と時間を要するばかりではなく、その原因遺伝子を確定するには不十分である場合が多い。とりわけ複数の遺伝子によって制御されていることから複雑に分離する遺伝形質においては、順遺伝学および逆遺伝学的な両面からのアプローチが有効であると考えられる。</p> <p>そこで本研究では、カイコガの多因子支配形質である繭色の色調の遺伝形質を対象として、逆遺伝学的手法を用いてそれらの原因遺伝子を同定すると共に、この方法の多因子支配形質の解明における有効性について検証することを目的とする。</p>
	研究の結果	<p>カイコガの第 27 番染色体上にある笹繭発現関連遺伝子 <i>Ga</i> のいくつかの候補遺伝子について、RT-PCR によってその発現様式を調べたところ、有意な差異はみられなかった。しかし、それぞれクローニングした後に塩基配列解析を行った結果、欠損など大きな構造変異はみられなかったが、糖輸送体および糖転移酵素に加え、モノサッカライドセンシングプロテイン (MSSP) 遺伝子において <i>Ga</i> 形質に対応するアミノ酸の置換を見出すことができた。次にこれら候補遺伝子の遺伝子破壊実験の第一歩として、緑繭抑圧遺伝子 <i>Ign-1</i> をノックアウトするため、笹繭の緑繭化への関与が明らかにされているピロリン 5 カルボン酸還元酵素遺伝子 (<i>P5CRI</i>) の TALEN の構築を Golden Gate 反応により試みたところ、目的とする TALEN の中間プラスミドを比較的効率よく得ることができた。</p>
	研究の考察・反省	<p>笹繭の緑繭化への関与が明らかにされている <i>P5CRI</i> は、緑繭抑圧遺伝子 <i>Ign-1</i> の責任遺伝子である可能性が極めて高い。そこでこの <i>P5CRI</i> の破壊によって <i>Ign-1</i> のノックアウトを行い、笹繭の緑繭化への関与が明らかにされている <i>P5CRI</i> と <i>Ign-1</i> との関係を検証するとともに、ゲノム編集技術 (TALEN) を用いた遺伝子破壊実験を確立する。一方、笹繭発現関連遺伝子 <i>Ga</i> の形質に対応するアミノ酸置換がみられた糖輸送体、糖転移酵素および MSSP において、さらに類似する表現形質を示す系統を用いた塩基配列解析を進めることで候補遺伝子を絞り込んでいく必要もあるが、同時にこれら <i>Ga</i> 候補遺伝子についても TALEN を用いた遺伝子破壊実験に着手し、逆遺伝学的なより直接的な検証を進めていく予定である。</p>
研究発表 学会名 発表テーマ 年月日/場所 研究成果物 テーマ 誌名 巻・号 発行年月日 発行所・者	<p>※この欄は、本報告書提出時点で判明している事項についてご記入ください。</p> <p>第 5 回蚕糸・昆虫機能利用関東地区学術講演会 カイコ緑繭抑圧遺伝子 <i>Ign-1</i> とピロリン 5 カルボン酸還元酵素遺伝子 <i>P5CRI</i> との関係解明 2019. 11. 16/東京農工大学府中キャンパス</p>	