

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-89481

(43) 公開日 平成11年(1999) 4月6日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	F I
A 0 1 K 67/033	5 0 1	A 0 1 K 67/033 5 0 1
C 1 2 N 5/10		C 1 2 N 5/00 B
15/01		15/00 E
// (C 1 2 N 5/10		
C 1 2 R 1:91)		

審査請求 有 請求項の数 3 O L (全 5 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平9-258394	(71) 出願人	391030284 農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所長 茨城県つくば市大わし1-2
(22) 出願日	平成9年(1997)9月24日	(72) 発明者	田村 俊樹 茨城県つくば市松代4丁目25番地401棟204
特許法第30条第1項適用申請有り 平成9年4月3日 日本蚕糸学会発行の「日本蚕糸学会第67回学術講演会 1997 講演要旨集」に発表		(72) 発明者	行弘 研司 茨城県つくば市並木2丁目10番地1号207 棟306
		(72) 発明者	長谷川 毅 茨城県つくば市春日1丁目住宅11-4- 205-510
		(74) 代理人	弁理士 平木 祐輔 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 蚕のキサンチン脱水素酵素欠失突然変異 og、og<sup>t</sup> 及び oq の妊性と表現型の回復法及びその後代の利用法

(57) 【要約】

【解決手段】 蚕のキサンチン脱水素酵素欠失突然変異 og、og<sup>t</sup> 及び oq にキサンチン酸化酵素を投与することにより前記突然変異 og、og<sup>t</sup> 及び oq の妊性と表現型を回復することを特徴とする蚕のキサンチン脱水素酵素欠失突然変異 og、og<sup>t</sup> 及び oq の妊性と表現型の回復方法。

【効果】 本発明により、蚕のキサンチン脱水素酵素欠失突然変異 og、og<sup>t</sup> 及び oq の皮膚の透明性と不妊性を回復させることができた。その結果、この処理された蚕の突然変異体は形質転換分野において宿主として用いることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 蚕のキサンチン脱水素酵素欠失突然変異 og、og<sup>t</sup> 及び oq にキサンチン酸化酵素を投与することにより前記突然変異 og、og<sup>t</sup> 及び oq の妊性と表現型を回復することを特徴とする蚕のキサンチン脱水素酵素欠失突然変異 og、og<sup>t</sup> 及び oq の妊性と表現型の回復方法。

【請求項 2】 請求項 1 記載の方法によりその妊性と表現型が回復された蚕のキサンチン脱水素酵素欠失突然変異 og、og<sup>t</sup> 又は oq。

【請求項 3】 請求項 2 記載の蚕のキサンチン脱水素酵素欠失突然変異 og、og<sup>t</sup> 又は oq からなる外来遺伝子導入用の宿主生物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、遺伝子工学の分野で用いられる宿主生物、特に蚕の突然変異体に関する。

【0002】

【従来の技術】形質転換技術の分野で宿主のマーカー遺伝子としてキサンチン脱水素酵素遺伝子を使用することはショウジョウバエの分野において知られている。そして、このキサンチン脱水素酵素活性が欠如しているショウジョウバエの突然変異体は形質転換の宿主として用いられている。そこで、蚕においてもキサンチン脱水素酵素欠失突然変異体を宿主として用いることが考えられるが、蚕のキサンチン脱水素酵素欠失突然変異 og、og<sup>t</sup> 又は oq は不妊性であるため次世代が得られず形質転換の宿主として用いることができない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、蚕のキサンチン脱水素酵素欠失突然変異 og、og<sup>t</sup> 又は oq の妊性を回復する方法及びかかる方法で得られた突然変異体を宿主として提供することである。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、蚕のキサンチン脱水素酵素欠失突然変異 og、og<sup>t</sup> 又は oq にキサンチン酸化酵素を投与することにより該突然変異体の不妊性を回復することができることを見出し本発明を完成するに至った。

【0005】すなわち、本発明は蚕のキサンチン脱水素酵素欠失突然変異 og、og<sup>t</sup> 及び oq にキサンチン酸化酵素を投与することにより前記突然変異 og、og<sup>t</sup> 及び oq の妊性と表現型を回復することを特徴とする蚕のキサンチン脱水素酵素欠失突然変異 og、og<sup>t</sup> 及び oq の妊性と表現型の回復方法である。さらに、本発明は上記方法によりその妊性と表現型が回復された蚕のキサンチン脱水素酵素欠失突然変異 og、og<sup>t</sup> 又は oq である。さらに、本発明は上記の蚕のキサンチン脱水素酵素欠失突然変異 og、og<sup>t</sup> 又は oq からなる外来遺伝子導入用の宿

主生物である。

【0006】

【発明の実施の形態】蚕において、形質転換体を作成する方法を開発することは重要な課題である。形質転換技術を確立するためには、外来遺伝子が蚕のゲノム中に挿入された個体、即ち形質転換個体を効率よくスクリーニングし、維持する必要がある。この場合、形質転換個体の表現形質を変えることのできる遺伝子を外来遺伝子として用いる方法は、上記の目的に適しており、蚕においてもこの遺伝子とその宿主を開発する必要がある。既に、形質転換技術が確立されているショウジョウバエでは野性型のキサンチン脱水素酵素遺伝子がマーカー遺伝子として用いられ、この酵素活性が欠如している突然変異体が宿主として用いられている。

【0007】

蚕においてもキサンチン脱水素酵素が欠如しているため、皮膚が透明となる突然変異体（正常の蚕の皮膚は白色不透明）og、og<sup>t</sup> 及び oq が存在している。そして、この突然変異 og、og<sup>t</sup> 及び oq はキサンチン脱水素酵素遺伝子をマーカー遺伝子として用いることにより、形質転換のための宿主として利用できると考えられる。しかし、これらの突然変異体は不妊性であり、ホモ型の皮膚の透明な蚕は次世代を採ることができないため、形質転換のための宿主として利用できなかった。

【0008】本発明では、これらの突然変異の幼虫又は蛹に市販のキサンチン酸化酵素を昆虫細胞用の培地に溶かしたものを注射することによって、皮膚の透明性と不妊性を回復させる方法を開発した。そのため、回復処理した突然変異個体の卵、生殖巣や精子を DNA 微量注射法やパーテクルガン、ウイルスベクター等の遺伝子導入で処理し、次世代を得ることが可能となった。その結果、クローニングしたキサンチン脱水素酵素遺伝子をマーカー遺伝子として使用できるようになるとともに、形態変化によって形質転換個体の維持ができるようになった。

【0009】

本発明で用いる蚕のキサンチン脱水素酵素欠失突然変異 og は劣性の遺伝子で、雌が不妊性であるため遺伝的にヘテロである正常の雌 (+/og) と突然変異体の雄 (og/og) との交配により、系統として維持されている。また、突然変異 og<sup>t</sup> 又は oq は雌雄とも不妊性であるため遺伝的にヘテロで正常な表現型を示す個体間の交配により調製される。

【0010】

本発明で用いるキサンチン酸化酵素は市販の粉末酵素（オリエンタル酵母社製のキサンチン酸化酵素等）を用いることができ、その蚕に対する投与量は蚕 1 頭に対して 2.5mg である。この酵素の蚕に対する投与方法は、昆虫培養液に溶かしたものを蚕の幼虫に注射することによって行う。

【0011】

【実施例】以下、本発明を実施例により具体的に説明する。ただし、本発明はこれらの実施例にその技術的範囲を限定するものではない。

(1) 蚕のキサンチン脱水素酵素欠失突然変異 og、og<sup>t</sup>又はoqは以下のようにして調製した。

突然変異 og、og<sup>t</sup>及びoqは劣性の遺伝子によって支配されている。そのため、遺伝的にヘテロである突然変異系統の正常蚕を利用することによって突然変異体を得ることができる。ogの場合雌が不妊であるため、正常ヘテロの雌(+/og)と突然変異の雄(og/og)とを交配することにより、変異体を得るとともに突然系統として維持することができる。また、突然変異og<sup>t</sup>又はoqでは雌雄とも不妊であるため、正常蚕同士の交配を行い、突然変異遺伝子をヘテロに持つ正常蚕同士を交配した場合のみ突然変異体が次世代に出現することから、突然変異体が出現した場合の親の交配型は+/og<sup>t</sup>X+/og<sup>t</sup>または+/oq<sup>t</sup>X/oqであることが分かる。このことを利用して、この交配区からの正常蚕同士を交配することによって、突然変異を系統として維持している。実験に用いた突然変異体は上記の方法で調製することができる。飼育は桑の生葉又は人工飼料(日本農産工業(株)製原種用人工飼料)を用いて行った。

【0012】(2) 蚕のキサンチン脱水素酵素欠失突然変異 og、og<sup>t</sup>又はoqの妊性の回復処理。

上記の方法で調製された突然変異 og、og<sup>t</sup>又はoqの5齢起蚕(5齢起蚕とは蚕の場合、幼虫期に4回の脱皮を行い蛹になるが、4回目の脱皮を行った直後の時期の蚕のこと)の幼虫を氷で冷やすことにより麻酔させる。この幼虫の腹部に昆虫細胞培養液(Grace 昆虫細胞培養液、和光(株))に溶解したキサンチン酸化酵素溶液50 $\mu$ lを注射する。以後は25 $^{\circ}$ Cで飼育し、成虫を得る。このような処理をして得られる突然変異 og、og<sup>t</sup>又はoqの成虫は雌雄ともに妊性を有しており、突然変異同士の交配を行うことができる。

【0013】(3) 具体的実験例

突然変異体へのキサンチン酸化酵素の注射による表現形質の回復について調べた結果を図1に示した。図1において、左上の蚕はこの系統の正常蚕で、右上は突然変異体の同じ発育段階の幼虫である。正常蚕の皮膚は白色不透明なのに対し、突然変異蚕は透明である。突然変異 oqの5齢起蚕に25mg/ml(左下)又は50mg/ml(右下)の濃度のキサンチン酸化酵素溶液50 $\mu$ lを注射し、人工飼料で5日間飼育した場合の突然変異体の形態は正常に近くなる。このように、キサンチン酸化酵素の注射の効果を幼虫期に判断することができた。このような処理を行って、得られた突然変異の成虫の妊性は以下のものであった。突然変異 oqの場合、無処理の突然変異体では、30頭の5齢幼虫から得られる成虫は2頭で、しかもこれらの成虫は不妊であった。これに対し、処理を行った27頭の突然変異体から得られた成虫は17頭であり、このうち12頭は妊性を有しており、次世代を得ることができた。他のキサンチン脱水素酵素欠失突然変異 og 又はog<sup>t</sup>でも、同じ様な結果がえられた。突然変異ogの雌では

無処理の5齢幼虫25頭のうち成虫となったものは1頭で、しかもこの成虫は不妊であった。処理した突然変異体では20頭のうち5頭が成虫になり、このうち4頭は妊性を回復していた。突然変異og<sup>t</sup>の場合無処理では62頭のうち、成虫になったものは15頭、うち5頭が妊性であった。これに対し、処理したものでは26頭のうち、成虫になったものが25頭で、この全てが妊性を有していた。このようにキサンチン酸化酵素処理は、キサンチン脱水素酵素欠失突然変異 og、og<sup>t</sup>又はoqの妊性回復効果を持つことが明らかである。

【0014】このような処理をして、妊性を回復した突然変異体を利用することによって、全ての個体が突然変異型の表現形質を示す集団を作ることが可能である。この集団を用いることによって、図2のような方法が可能である。突然変異体の幼虫の生殖巣にクローニングしたキサンチン脱水素酵素遺伝子を注射する場合や精子にこの遺伝子をウイルスやパーテクルガンを利用して導入する実験を行う場合、キサンチン酸化酵素の注射によって妊性の回復処理をあらかじめ突然変異体に行っておくことができる。したがって、このような処理をした個体は次世代を得ることができ、次世代の一部の個体に遺伝子が導入され、形質転換体となった場合は表現型が正常になる。また、卵に遺伝子を注射する実験を行った場合でも同様である。このように、この妊性回復処理を行うことによって、形質転換体を作成する場合に最も困難な次世代のスクリーニングにおいて、蚕を生きた状態で簡単に形質転換体を判別する方法が可能になった。

【0015】(4) 不妊性を回復したoq突然変異体の後代における挙動

表1は上記の(2)及び(3)のような処理によって妊性を回復した突然変異oqの成虫同士を交配した場合の次世代における突然変異体の出現状態である。キサンチン酸化酵素を注射することによって妊性を回復した突然変異同士を交配した場合の次世代は全て突然変異体となった。さらに、この次世代に同様の処理を行って、さらに次の世代を得た場合でも同じように突然変異体のみが出現した。このようなキサンチン酸化酵素の注射は一時的に表現形質を回復させるが、遺伝的な影響は全く無いと判断される。

【0016】

【表1】

産区番号	孵化個体数	正常個体数	突然変異個体数
1	20	0	20
2	14	0	14
3	104	0	104
4	10	0	10

【0017】

【発明の効果】本発明により、蚕のキサンチン脱水素酵素欠失突然変異 og、og<sup>t</sup>及びoqの皮膚の透明性と不妊性を回復させることができた。その結果、この処理さ

れた蚕の突然変異体は形質転換分野において宿主として用いることができる。

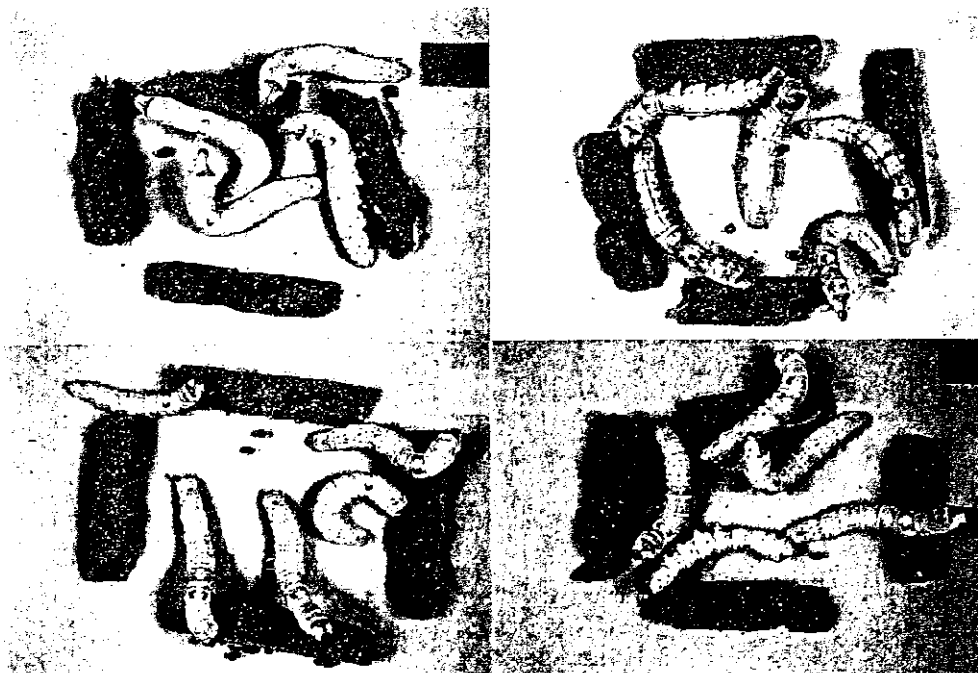
【図面の簡単な説明】

【図 1】キサンチン酸化酵素の注射による突然変異 $oq$ の正常化を示す図。(左上：正常蚕、右上：突然変異体、

左下：酵素1.2mg を注射、右下：2.5mg を注射)

【図 2】妊性を回復させたキサンチン脱水素酵素欠失突然変異  $og$ 、 $og^t$ 又は $oq$ を用いることによって可能になった形質転換実験例を示す図。

【図 1】



キサンチン酸化酵素の注射による $oq$ 突然変異の正常化(左上、正常蚕、右上、突然変異体、左下、酵素2.5mgを注射、右下、5mg注射)

【図 2】

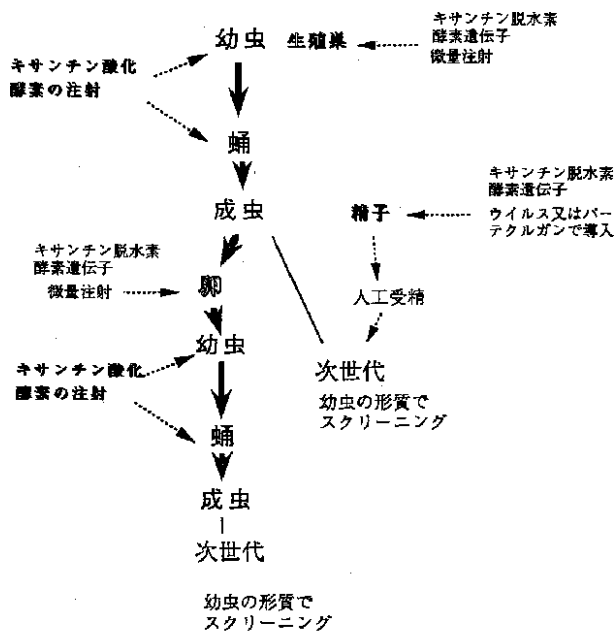


図2. キサンチン酸化酵素処理によって妊性を回復させたキサンチン脱水素酵素欠失突然変異 $og$ ,  $ogr$  及  $bioq$ を用いることによって可能になった蚕の形質転換実験例

フロントページの続き

(51)Int.Cl.6	識別記号	F I
(C 1 2 N 15/01		
C 1 2 R 1:91)		

(72)発明者 河本 夏雄  
茨城県つくば市並木 2 丁目10番地 1 号207  
棟203

(72)発明者 神田 俊男  
茨城県稲敷郡阿見町荒川沖1711 - 3  
(72)発明者 藤井 博  
福岡県福岡市西区生松台 2 丁目35番地 - 13