

平成21年3月31日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19580057

研究課題名(和文) センチクバエを利用した簡便なトランスジェニック個体作成法の開発

研究課題名(英文) Development research for the production of transgenic flesh fly

研究代表者 安西 偲二郎 (ANZAI KAIJIRO)

日本大学・薬学部・教授

30114359

研究成果の概要：

センチクバエに対する簡便な遺伝子導入法を検討し、エレクトロポレーション法により成虫の胸部背筋に一過的に遺伝子を導入することができた。センチクバエ個体において、外来遺伝子を強制発現させたのはこれが初めてである。次に、卵胎生であるセンチクバエの胚をメス体内から取り出してガラスキャピラリーを用いた微量注入法による遺伝子導入を試みた。当初、水のみを微量注入でも胚は発生しなかったが、条件検討を行い胚が正常に発生する条件を設定することができた。これまでに胚への遺伝子導入は実現していないが、今後更なる検討を行う予定である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：センチクバエ，トランスポゾン，遺伝子導入，トランスジェニック，昆虫利用

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は様々なものが産業界で広く利用されている。研究に用いるタンパク質は無論のこと、化合物合成のための合成酵素、食品加工用の酵素、医療用の酵素・抗体を始めとして、身近なものでも、洗濯用洗剤中の分解酵素、ジーンズの加工用のセルラーゼなど枚挙に暇がない。このようにタンパク質は様々な用途に、様々な種類のものが利用されている。大量、多品種のタンパク質の合成の

ためには、遺伝子組換えが容易で、かつ大量に生産できる系が必要である。これまでに大腸菌や培養細胞を用いたタンパク質生産系や、カイコ幼虫さらにはヤギなどの大型動物を用いたタンパク質生産系が開発されてきた。中でも、大量という点では、大型動物が適しているが、反面、作成は困難である。それに対し、培養細胞では遺伝子導入は容易であるものの、大量に産物を得るのは難しい。カイコは産み付けられた卵への微量注入で

遺伝子が導入できることから実用化されているが、一匹当たり1mg程度と決して多い量を産生するわけではなく、また比較的世代時間が短いものの、8週間程度は要し簡便とはいえない。

Fraserらは、1983年に cabbage looper moth, *Trichoplusia ni* に piggyBac と呼ばれるトランスポゾンが存在することを初めて明らかにした (Fraser MJ, Smith GE, Summers MD. Acquisition of Host Cell DNA Sequences by Baculoviruses: Relationship Between Host DNA Insertions and FP Mutants of *Autographa californica* and *Galleria mellonella* Nuclear Polyhedrosis Viruses. *J Virol.* 1983;47(2):287-300)。これを用いることにより昆虫の遺伝子組換え個体を作成することが出来るようになった (Handler, AM. Use of the piggyBac transposon for germ-line transformation of insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32 (2002) 1211-1220。の総説を参照)。2002年の時点で数十種の昆虫でこのトランスポゾンを用いて遺伝子組換え体が作成されている。国内においても、田村らがカイコで作成している。(Tamura T, Thibert C, Royer C, Kanda T, Abraham E, Kamba M, Komoto N, Thomas JL, Mauchamp B, Chavancy G, Shirk P, Fraser M, Prudhomme JC, Couble P. Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a piggyBac transposon-derived vector. *Nat Biotechnol.* 2000 Jan;18(1):81-4.)。

個体への遺伝子導入法については、一般に受精卵への直接注入がよく行われているが、昆虫の幼虫に対し、*in vivo* electroporation による遺伝子導入法が報告されている。カイコの幼虫にプラスミドを注射し、体外から電圧をかけることにより組織中にタンパク質の発現が見られている (Thomas JL. Electroporation, an alternative to biolistics for transfection of *Bombyx mori* embryos and larval tissues. *J Insect Sci.* 2003;3:17)。条件を決定すれば、ハエなど他の昆虫についても同様の手法が使えると思われる。

センチニクバエは適度な個体の大きさがあり、生化学的な解析には適している。飼育も容易であり、また一世代も約3週間と短い。名取らはセンチニクバエの成長過程における体液中のタンパク質の変化を調べ、貯蔵タンパク質が孵化後3日目くらいには体液中のタンパク質の7割を占めるほどまで増加することを明らかにしている (Tahara T, Maeda Y, Kuroiwa A, Ueno K, Obinata M, Natori S. Identification of storage-protein messenger RNA of the fleshfly *Sarcophaga peregrina*. *Biochem J.* 1982 Jun

1;203(3):571-5.)。このタンパク質遺伝子のプロモーターの塩基配列は明らかにされている (Matsumoto N, Nakanishi Y, Natori S. Homologies of nucleotide sequences in the 5'-end regions of two developmentally regulated genes of *Sarcophaga peregrina*. *Nucleic Acids Res.* 1986 Mar 25;14(6):2685-98.)。この遺伝子プロモーターを利用して遺伝子組換え個体を作成すると、体液中に7割近くもの純度のタンパク質を産生することが出来ると考えられる。

これらのことからセンチニクバエを用いてトランスジェニック個体を簡便に作製することができれば、市場のニーズに即する簡便な大量タンパク質生産系が出来ることが期待される。センチニクバエについてトランスジェニック個体を作製したという報告はないが、先に述べたように多くの昆虫でこのトランスポゾンを用いて遺伝子導入が行われているので作製可能と十分想定できる。

2. 研究の目的

本研究では、新たにセンチニクバエを利用して簡便かつ効率の良いタンパク質大量生産系を確立することを目指している。そのために、本課題の中でセンチニクバエのトランスジェニック個体の作製法を開発することを中心に、貯蔵タンパク質プロモーターのタンパク質生産系への応用の可能性について検討することを当初の目的とした。

研究を開始し、想定以上に遺伝子導入の困難さがあることが分かり、結果的に、遺伝子導入部位の決定や導入方法の確立など遺伝子導入にかかわる問題点を解決することが研究の中心となった。

3. 研究の方法

(1) センチニクバエの飼育

センチニクバエは P1A 飼育室で飼育した。飼育には、逃亡・臭気対策として、動物個別飼育装置を使用した。飼育装置内は 27℃とし 6am-10pm の 16 時間を照明し昼夜を作った。幼虫は餌としてレバーを与え、レバーの中で 4-5 日飼育した。最終齢である三齢幼虫をレバーから取り出し木屑の中で蛹化させた。一部の幼虫については実験に使用したり蛹化の時期を遅らせるために少し水の入ったタッパーウェアに入れ飼育した。9 日目に羽化するのでその前に蛹を成虫用の網カゴに移し、餌として砂糖、粉ミルク、水を与えた。9-11 日目にカゴにレバーを入れ幼虫を生ませた。

(2) 遺伝子導入検討用プラスミド

実験に使用する piggyBac トランスポゾンは、University of Notre Dame の Malcolm J. Fraser, Jr. 博士に分与していただいた。

遺伝子導入検討用プラスミドには、CMV プロモーター遺伝子を持ち、レポーターとし

て MGFP 遺伝子を持つ、プラスミド phMGFP (Promega) を主として利用した。

(3) センチクバエに対する遺伝子導入検討

① 成虫腹部への遺伝子導入

成虫メスを氷上麻酔したのち、腹部に 26G 注射針やピペットチップを利用して溶液をトランスフェクション試薬 Fugene6 (Roche 社) とともに注入した。2 日後に幼虫を取り出した。

② 一齢幼虫への遺伝子導入

Gene Pulser II (Bio-Rad 社) を用いて遺伝子導入を検討した。0.4cm キュベットを用い、溶液中に一齢幼虫を沈めエレクトロポレーションを行った。

③ 三齢幼虫への遺伝子導入

幼虫を氷上麻酔したのち、幼虫体内へ 26G 注射針で DNA 溶液を注入し、遺伝子導入装置 CUY21SC (NEPA GENE 社) を用いてピンセット型電極で幼虫を挟んでエレクトロポレーションを行った。2 日後に蛍光実体顕微鏡で外側から体全体を観察し、一部について解剖して体内組織について観察した。

④ 成虫胸部背筋への遺伝子導入

ガラスキャピラリーで成虫胸部背筋に対して DNA 溶液を注入し、注入した部位を挟む形で刺入型電極を刺し、遺伝子導入装置 CUY21SC (NEPA GENE 社) でエレクトロポレーションを行った。2~5 日目に解剖し蛍光実体顕微鏡で注射部位を観察した。

⑤ 胚への遺伝子導入

羽化後 5-6 日目のメスを氷上麻酔したのち、腹部を圧迫し子宮口から胚を取り出した。ガラスキャピラリーでプラスミド溶液あるいは TE 溶液を注入した。25°C で 2-3 日保温した。

4. 研究成果

遺伝子組換え個体作製にあたり、まず飼育室の整備を行った。飼育環境を一定にするため、日本医化器械製作所の動物個別飼育装置を購入し設置した。昆虫は飼育容器(虫かごやタッパウェア)の中で飼育することとし、この容器を二重扉の付いている動物個別飼育装置内に持ち込むことにした。個体の逃亡防止のため、装置の前面にナイロンメッシュで二重の蚊帳空間を作った。以上のようにして遺伝子組換え個体作製実験が出来る環境を整えることが出来た。

以上のような準備の後、センチクバエの飼育を開始した。センチクバエでは遺伝子の導入検討がほとんど行われていないことから導入の検討を中心に行った。

まず最初にどのような部位が遺伝子導入に適しているか、各時期の個体について検討した。成虫の子宮内にある胚に対しては、子宮の存在する部位に対しメス腹部に 26G 注

射針でトリパンプルーを含む溶液を注入した。注入したのち一部のメスを解剖し確かに子宮部に溶液が注入できたことは確認できた。しかし、このハエから幼虫が生まれてくることはなく、子宮に対する注射では胚に対しダメージが大きいことが考えられた。

一齢幼虫については体長 1mm 程度と小さいため、キュベット中に溶液と幼虫を入れ、エレクトロポレーションを行った。その結果、いずれの幼虫も死んだことから、ダメージの大きい方法であることが考えられた。

三齢幼虫については体長 1.5cm 程度と比較的大きく、26G 注射針での注入は容易である。幼虫体内には体液に囲まれて組織があるため、体液中に DNA を注入すれば低い割合でも組織に取り込まれることが期待された。そこで DNA 溶液を体液中に注射しエレクトロポレーションを行い、継時的に蛍光実体顕微鏡で観察した。体の外側から観察した結果、体表の一部に蛍光が見られたが、これは電極が接した部分の組織が損傷したために蛍光を発したもので、注入した DNA には依存しないものであった。DNA 注入後 2~3 日経過した幼虫を解剖し、組織の蛍光を観察した結果、マルピーギ管および腸管で蛍光が見られたが、無処理の個体でもマルピーギ管および腸管で蛍光が検出されたことから、自家蛍光であると判断した。無処理の個体と比べて強い蛍光を発する個体は得られず、遺伝子の導入はうまくいっていないと判断した。DNA 注入の方法や量、プラスミド濃度、電圧、電極タイプの検討などを様々に行ったが、自家蛍光を明確に上回る蛍光は観察されなかった。マルピーギ管および腸管の自家蛍光が強いこと、体液中に注入した DNA が体液によって希釈されることから、幼虫に対する遺伝子導入は当初考えていたより難しいのではないかと思われた。

そこで、注入した DNA 溶液の拡散が少ない部位として、成虫胸部の背筋に注目した。背筋に DNA 溶液を注入後、エレクトロポレーションを行い、水と餌のある環境で 2~5 日飼育し、解剖して蛍光実体顕微鏡で観察した。最初の頃はほとんどのハエが死んでしまい、その原因について検討し分かった点は羽化後の比較的若い成虫の方がエレクトロポレーションに耐えるということであった。羽化した当日の成虫を用いて実験を行った結果、背筋にわずかではあるが蛍光を観察することができ、遺伝子が導入されたと考えられた。センチクバエ個体において、外来遺伝子を強制発現させることができたのは我々の知る限りこれが初めてである。また、センチクバエ個体でウイルス由来の CMV プロモーターが機能することが初めて明らかになった。次に宿主のゲノム DNA 中に MGFP 遺伝子が挿入されるようにするため、

piggyBac transposon を含む CMV-MGFP コンストラクトを構築し、transposase の ORF をコードするプラスミドとともに導入した。今後、導入個体からゲノム DNA を抽出し、inverse PCR 法により MGFP 遺伝子の挿入の有無を検討する予定である。

この方法をさらに改良することにより、成虫胸部背筋での遺伝子発現が安定して見られるようになることが期待されるが、トランスジェニック体の作製には生殖系の細胞への遺伝子導入が必須である。センチニクバエは卵胎生でありメスは一齢幼虫を産む。そのため受精直後の卵を採取することが難しく、これまで幼虫への遺伝子導入を試みていた。しかし、羽化後 5-6 日のメスから取り出した胚は、昆虫用生理食塩水を含ませた脱脂綿上で発生を進行させることができるとの報告(Yamaguchi S., Homma K., and Natori S., A novel egg-derived tyrosine phosphatase, EDTP, that participates in the embryogenesis of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *Eur. J. Biochem.* 1999; 259: 946-953)があったことから、胚への微量注入による遺伝子導入を試みようと考えた。まず、Yamaguchi らの報告を追試する目的で、羽化後 6 日目のメスから胚を取り出し、シャーレ中で昆虫用生理食塩水を含ませた脱脂綿上にのせ、25℃で保温した。胚は成虫から取り出したため、完全には発生時期が一定しないが、一部の胚では極細胞が観察され、細胞性胞胚期であると考えられた。1-2 日後に体節および口器が観察されるようになり、さらに一齢幼虫となった。ただし、脱脂綿上では胚が固定できず微量注入ができないことから、センチニクバエ胚に微量注入する方法について条件検討した。ショウジョウバエの例を参考に、スライドグラス上に両面テープを貼り、その上に胚を並べた。次に微量注入時の内容物の浸出を防ぐため、シリカゲルを敷いたタッパウェア中に入れて少し乾燥させた。この後胚をフルオロシリコンオイルで覆い、ガラスキャピラリーを用いて水を微量注入した。胚はスライドグラスごと湿潤箱に入れ、25℃で保温した。ガラスキャピラリーの先端の細さ、胚の配置・固定法、乾燥時間、オイルの厚さ、微量注入する量などを検討し、水を微量注入したのち胚が正常に発生する条件を設定することができた。

現在、この条件で pHMGFP プラスミド溶液を微量注入しているが、まだ無処理の個体と比べて強い蛍光を発する個体は得られていない。今後、DNA の濃度や量を検討したり、より早いステージの胚を用いる、あるいは極細胞に微量注入するかなどの方法の改良を行い、生殖系の細胞への遺伝子導入を行う予定である。

このトランスジェニック個体の作製は、多

くのタンパク質が必要な研究開発には有用な方法である。そこで、このセンチニクバエ個体に対するトランスジェニック個体作製法の開発を見込み、新規遺伝子の探索についても並行して行っている。昆虫共生菌は宿主である昆虫の寿命や行動、生殖など広範囲にわたって重要な役割を果たしていることから、昆虫共生菌から宿主に対し有用な生理活性物質の受け渡しがあることは充分予想され、これらの中には医薬の資源として有用な物質が含まれていることが期待できる。しかし、昆虫共生菌は取り出して培養することが出来ないため、有用物質の探索はこれまで行われていない。我々はカメムシ共生菌のゲノム解読を開始し、ドラフト塩基配列をこれまでに得ることが出来ている。その中に既知のものとは相同性の低い、新規の glycosyltransferase 遺伝子を見出している。このような新規遺伝子の機能研究や産業利用を考えた場合、今回目指したトランスジェニック個体の簡便な作製法の開発により研究開発が大きく進展されると考えられる。他の昆虫で開発されていることから比較的容易と考えたものの、今回の限られた期間では、種による違いのためか容易にはトランスジェニック個体の作製には至らなかった。しかし、一過性の発現が実現したこと、胚に対する導入法の目処が立ち始めたことから、この技術について実現できるよう更なる検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会等発表](計 1 件)

小林秀昭 昆虫と微生物の共生関係に関する新規生理活性物質の単離とその利用 昆虫ゲノムプロジェクト研究 第 3 回運営委員会 (農林水産省農林水産技術会議事務局) 平成 21 年 2 月 17 日 農業生物資源研究所

[その他] (計 1 件)

サイエンスチャンネル (科学技術振興機構) 未来をひらく昆虫テクノロジー (5) ハエのチカラで環境問題や病気を克服 http://sc-smn.jst.go.jp/8/bangumi.asp?i_series_code=A070620&i_renban_code=005

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安西 偕二郎 (ANZAI KAIJIRO)
日本大学・薬学部・教授
30114359

(2) 研究分担者

小林 秀昭 (KOBAYASHI HIDEAKI)
日本大学・薬学部・講師
90344069