

平成21年 6月23日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2005～2008  
 課題番号：17380039  
 研究課題名（和文）トランスジェニック技術を利用した非モデル昆虫の遺伝子機能解析システムの開発  
 研究課題名（英文）Development of transgenesis-based systems of gene functional analysis for non-model insect species  
 研究代表者  
 畠山 正統（HATAKEYAMA MASATSUGU）  
 独立行政法人 農業生物資源研究所・制御剤標的遺伝子研究ユニット・主任研究員  
 研究者番号：50281142

## 研究成果の概要：

転移因子（トランスポゾン）ベクターを利用したトランスジェニック（遺伝子組換え）技術が確立されている、ハチ目、チョウ目、コウチュウ目およびハエ目の昆虫を用い、キイロショウジョウバエのようなモデル生物でない一般の昆虫種（非モデル昆虫）に応用できる遺伝子解析システムの開発を行なった。テトラサイクリン耐性オペロンを利用した遺伝子発現制御システム（Tet-Off 系）とトランスポゾン挿入を利用したエンハンサートラップ法について、種を越えて適用できる可能性を見出した。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	5,300,000	0	5,300,000
2006年度	4,000,000	0	4,000,000
2007年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2008年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
総計	15,600,000	1,890,000	17,490,000

## 研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：遺伝子組換え昆虫、遺伝子工学、遺伝子発現制御、トランスジェニック

## 1. 研究開始当初の背景

研究開始時点で、トランスジェニック技術が確立されていた昆虫は、双翅目を除けば、ハチ目1種、チョウ目2種、コウチュウ目2種であった。国内では、本研究課題に参画する研究者のグループによって、ハチ目、チョウ目、およびコウチュウ目の昆虫で、トランスジェニック技術が確立されていた。

トランスジェニック技術を利用した遺伝子機能解析のアイデア自体はすでに提唱されていたものであるが、システムティック

に遺伝子機能解析ができる昆虫は、モデル昆虫のキイロショウジョウバエに限られているような状況であった。

昆虫における遺伝子機能解析では、目的遺伝子の導入および、導入遺伝子の発現制御が必要不可欠である。また、非モデル昆虫では、発現様式の明らかな遺伝子プロモーターや機能遺伝子の網羅的探索のために、エンハンサートラップ法や突然変異誘発法の開発も求められていた。

## 2. 研究の目的

トランスポゾンベクターを利用したトランスジェニック技術が確立されている昆虫を用い、導入した遺伝子の発現制御が容易にでき、昆虫目を越えて非モデル昆虫にも応用可能な、以下のような遺伝子解析システムを開発することが目的である。

- (1)テトラサイクリン耐性オペロンを利用した遺伝子発現制御システム
- (2)トランスポゾン挿入を利用したエンハンサートラップ
- (3)トランスポゾン転移を利用した突然変異誘発

## 3. 研究の方法

以下のようなトランスジェニックシステムをカブラハバチ(ハチ目)、カイコ(チョウ目)、およびナミテントウ(コウチュウ目)のそれぞれの種で作出して解析した。系統作出に用いたベクターについては、キイロショウジョウバエで動作確認を行なった。

### (1)遺伝子発現制御 (Tet-Off) システム

動作既知のプロモーターの調節下で *tTA* 遺伝子を発現するアクチベーター系統と、**TRE** によって標的遺伝子の発現が調節されるエフェクター系統を作出した。標的遺伝子には緑色蛍光蛋白質 (*EGFP*) 遺伝子を用いた。これらを交配して、標的遺伝子の発現誘導を表現型と PCR 法によって調べた。さらに、テトラサイクリン投与による負の制御の可否、投与至適条件を設定した。

### (2)エンハンサートラップ

構成的に *piggyBac* 転移酵素を産出するジャンプスターター系統と、基礎プロモーターで制御されたレポーター蛍光蛋白質遺伝子をもち、エンハンサー近傍に挿入されるとレポーター蛍光蛋白質遺伝子の発現が検出できるミューテーター系統を作出した。これらを交配し、レポーター蛍光蛋白質の発現時期や発現場所について表現型をもとに調べた。

### (3)突然変異誘発

エンハンサートラップのために作出したジャンプスターター系統と、すでに *piggyBac* 由来ベクターを使って作出された系統をミューテーター系統として使い、これらを交配して子孫の表現型を調べ、突然変異誘発の可否を検証した。

## 4. 研究成果

### (1)遺伝子発現制御 (Tet-Off) システム

まず、キイロショウジョウバエで正常に作動することを確認した、熱ショック蛋白質遺伝子 (*hsp70*) プロモーターで *tTA* 遺伝子の発現を制御できるベクターと、**TRE** 制御下で標的 *EGFP* 遺伝子を発現するベクターを用いて、カブラハバチ、カイコ、ナミテントウのそれぞれの種で、アクチベーター系統とエフェク

ター系統を確立した。

カブラハバチでは、これらの系統の交配により *tTA*、**TRE-EGFP** の両方の遺伝子を持つ胚でのみ *EGFP* 遺伝子が発現し、その蛍光が検出された (図1)。また、交配前に一方の系統の♀親に、テトラサイクリンを 100  $\mu$ g/ml の濃度で経口投与することにより、その子孫の胚で *EGFP* 遺伝子の発現を完全に抑制できた。

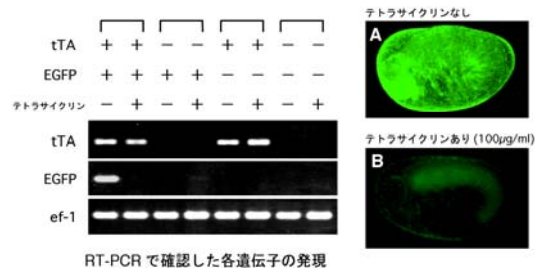


図1 カブラハバチにおける Tet-Off

カイコでは、*tTA*、**TRE-EGFP** の両方を持つ個体では、胚、幼虫では熱ショックによる *tTA* 遺伝子の発現誘導により *EGFP* の蛍光が検出された (図2)。また、テトラサイクリンあるいはドキシサイクリンを、10  $\mu$ g/g の濃度で人工飼料へ混合して投与すると、幼虫での *EGFP* 遺伝子発現が抑制された。これらの効果は濃度依存的で、投与による生存・生殖に影響はない。

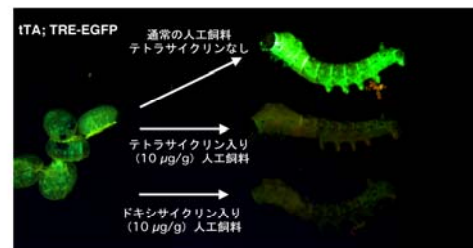


図2 カイコにおける Tet-Off

カブラハバチ、カイコのいずれにおいても、用いたキイロショウジョウバエの *hsp70* プロモーターは、構成的に *tTA* の発現を誘導し、このプロモーターは異種では熱ショックによる厳密な発現制御ができないことがわかった。

ナミテントウでは、アクチベーター系統とエフェクター系統を確立し、交配によって *tTA*、**TRE-EGFP** の両方を持つ個体を作ってきたが、残念ながら、*tTA* による *EGFP* 遺伝子の発現誘導はみられなかった。エフェクター系統の **TRE-EGFP** 遺伝子の挿入位置による位置効果の可能性等が考えられるが、いまのところ原因は不明である。

### (2)エンハンサートラップ

カイコでは、*piggyBac* と異なる *Minos* トラ

ンスポゾンベクターを利用し、転移能はもたず、構成的に *piggyBac* 転移酵素を産出するジャンプスターター系統と、*actin3* 遺伝子のプロモーターで制御された *Gal4* 遺伝子 (*A3-Gal4*) をもつミューター系統を作出した。これらを交配すると 10-40%の子孫で *A3-Gal4* が再転移したエンハンサートラップラインが得られた。この系統を、UAS 下流に *EGFP* 遺伝子をもつレポーター系統と交配すると様々な *EGFP* の発現様式を示す系統が得られ (図 3)、トランスポゾン挿入を利用したエンハンサートラップが機能することがわかった。

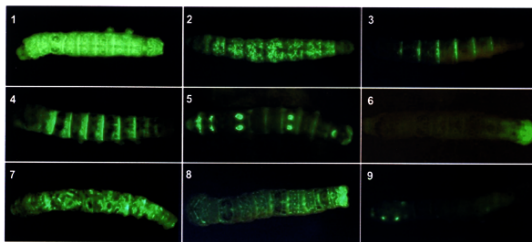


図3 カイコでのエンハンサートラップ

カブラハバチでは、*piggyBac* 転移酵素遺伝子をゲノム内に不動化したジャンプスターター系統と、*piggyBac* の逆位末端反復配列 (ITR) の間に基礎プロモーターの下流に *EGFP* 遺伝子をもつ、再転移可能なレポーター系統を作出した。これらの系統を交配してその子孫を調べたが、残念ながらこれまでに、発現様式を特定できる系統の作出には至っていない。

今回試みたエンハンサートラップでは、多数の系統を作出して飼育する必要が生じる。カイコのシステムでは、*Gal4/UAS* 系を利用しているため、トラップの成否の判断にはエンハンサートラップラインをレポーター系統と交配しなければならない。また、カブラハバチのシステムでは、エンハンサーの近傍にレポーター遺伝子が挿入されるだけなので、以後の実験には直接使用できない。そこでこれらの解決策として、レポーター系統としても、トラップされたエンハンサー制御によるアクチベーター系統としても利用できる融合蛋白質を開発した。*tTA* 遺伝子の中央部に *EGFP* 遺伝子を結合して発現させると、融合蛋白質 (*tTA::EGFP*) は、*EGFP* の蛍光を発生、*TRE* 下流に結合したレポーター遺伝子の発現を誘導できた。さらに、*tTA* の活性は、テトラサイクリン ( $1 \mu\text{g/ml}$ )、あるいはドキシサンクリン ( $0.1 \mu\text{g/ml}$ ) の投与により阻害されることが判明した。キイロショウジョウバエでの動作確認を行なったところであり、カブラハバチおよびカイコへの導入には至っていない。

ナミテントウでは、ジャンプスターター系

統とレポーター系統を確立したが、エンハンサートラップの可否についてはいまのところ確認できていない。一方、昆虫種間で汎用性の高い強力な発現誘導プロモーターの候補として、ナミテントウ *cytoplasmic actin* 遺伝子のプロモーター上流域をクローニングし、その有効性はキイロショウジョウバエを用いて確認した。

### (3)突然変異誘発

カブラハバチ、カイコ、ナミテントウのいずれの種でも、エンハンサートラップに用いたジャンプスターター系統と、ミューター/レポーター系統を交配することにより、突然変異を誘発可能である。しかしながら現在のところ、表現型として現れる突然変異の単離、固定には至っていない。大規模な交配実験が必要だと考えられる。

## 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)

[雑誌論文] (計 14 件)

- ① Hara K, Kuwayama H, Inukai Y, Yaginuma T, Niimi T (2009) A novel fusion protein that functions as an enhanced green fluorescent protein reporter and a tetracycline-controlled transcriptional activator. *Dev Genes Evol*, 219: 103-110.
- ② Hatakeyama M, Sumitani M, Yamamoto DS, Lee JM, Oka K (2008) The sawfly, *Ahtalia rosae ruficornis* (Hymenoptera) as a model for developmental and reproductive biology: what has been done and what should be done? *Proc Arthropod Embryol Soc Jpn*, 43: in press.
- ③ Hara K, Kuwayama H, Yaginuma T, Niimi T (2008) Establishment of a tetracycline-Off system using a *piggyBac*-based vector as a gene functional analysis tool for the temporal targeting of gene expression. *J Insect Biochem Sericol*, 77: 159-166.
- ④ Uchino K, Sezutsu H, Imamura M, Kobayashi I, Tatematsu KI, Iizuka T, Yonemura N, Mita K, Tamura T (2008) Construction of a *piggyBac*-based enhancer trap system for the analysis of gene function in silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol*, 38: 1165-1173.
- ⑤ Kobayashi I, Uchino K, Sezutsu H, Iizuka T, Tamura T (2007) Development of a new *piggyBac* vector for generating transgenic silkworms using the kynurenine 3-mono oxygenase gene. *J Insect Biochem Sericol*, 76: 145-148.
- ⑥ Kuwayama H, Yaginuma T, Yamashita O,

- Niimi T (2006) Germ-line transformation and RNAi of the ladybird beetle, *Harmonia axyridis*. *Insect Mol Biol*, 15: 507-512.
- ⑦ Uchino K, Imamura M, Sezutsu H, Kobayashi I, Kojima K, Kanda T, Tamura T (2006) Evaluating promoter sequences for trapping an enhancer activity in the silkworm *Bombyx mori*. *J Insect Biochem Sericol*, 75: 89-97.
- ⑧ 田村俊樹、瀬筒秀樹、小林功、内野恵郎 (2006) 遺伝子組換えカイコの研究の現状と将来. 蚕糸・昆虫バイオテック 75: 155-159.
- ⑨ 島山正統、炭谷めぐみ、山本大介、李載日文 (2006) カブラハバチの遺伝子組換えの現状と今後の展望. 蚕糸・昆虫バイオテック 75: 167-173.
- ⑩ 新美輝幸、桑山久史、原喜実子、柳沼利信 (2006) ナミテントウの遺伝子機能解析システムの現状と将来. 蚕糸・昆虫バイオテック 75: 175-182.
- ⑪ 新美輝幸、柳沼利信 (2006) ナミテントウの larval RNAi 法. 日本比較内分泌学会ニュース 121: 32-37.
- ⑫ Sumitani M, Yamamoto DS, Lee JM, Hatakeyama M (2005) Isolation of *white* gene orthologue of the sawfly, *Ahtalia rosae* (Hymenoptera) and its functional analysis using RNA interference. *Insect Biochem Mol Biol*, 35: 231-240.
- ⑬ Hatakeyama M, Sumitani M (2005) Preservation of a transgenic strain of the sawfly, *Ahtalia rosae* (Hymenoptera) by artificial fertilization using cryopreserved sperm. *Insect Mol Biol*, 14: 105-109.
- ⑭ 新美輝幸 (2005) 遺伝子で探るテントウムシの斑紋形成. *昆虫と自然* 40: 9-12.
- [学会発表] (計 13 件)
- ① 大門高明、瀬筒秀樹ら、トランスポゾンを利用したカイコの遺伝学的ツールの開発. 第 53 回 日本応用動物昆虫学会大会・小集会 WII、2009 年 3 月 30 日、札幌
- ② 瀬筒秀樹、カイコ・エンハンサートラップ 系統とデータベース (*Bombyx Trap DataBase*) の開発. 日本蚕糸学会第 79 回大会 (蚕糸・昆虫機能学術講演会)、2009 年 3 月 22 日、東京農工大
- ③ Niimi T, Ladybird watching. *Molecular Mechanisms in Development and Evolution*, 2009, March 20, Basel, Switzerland
- ④ Niimi T, Development of gene function analysis systems for non-model insects. The 3<sup>rd</sup> Insect Genomes Research Meeting, 2009, March 11, RIKEN, Kobe
- ⑤ Hara K, Niimi T et al. Development of tetracycline-OFF system using *piggyBac* vector in *Drosophila*. *Asia-Pacific Congress*

- of Sericulture and Insect Biotechnology 2008, March 22, Nagoya
- ⑥ 瀬筒秀樹、遺伝子組換えカイコが拓く新たな生物学、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会、2008 年 12 月、神戸
- ⑦ Sezutsu H, Niimi T, Hatakeyama M et al., Development of enhancer trap mutagenesis and Tet-OFF system in silkworm. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006, June 18-23, Kyoto.
- ⑧ Sezutsu H, Niimi T, Hatakeyama M et al., Development of enhancer trap mutagenesis in *Bombyx mori*. The seventh International Workshop on Molecular Biology and Genetics of the Lepidoptera, 2006, August 20-26, Crete, Greece
- ⑨ 島山正統、新美輝幸、瀬筒秀樹ら、トランスジェニックカブラハバチにおける遺伝子発現制御システム. 第 42 回日本節足動物発生学会 2006 年 6 月・福島
- ⑩ 島山正統、新美輝幸、瀬筒秀樹ら、カブラハバチにおける Tet-Off 系を利用した遺伝子発現制御. 日本動物学会第 77 回大会 2006 年 9 月・島根
- ⑪ 島山正統、カブラハバチにおけるトランスジェニック技術を利用した遺伝子機能解析と生殖制御への利用. 日本応用動物昆虫学会第 70 回大会 2006 年 3 月・つくば
- ⑫ 瀬筒秀樹、新美輝幸、島山正統ら、カイコエンハンサートラップ系の開発: テトラサイクリンによる遺伝子発現調節 (Tet-OFF 系) の開発. 日本蚕糸学会第 76 回大会 2006 年 3 月・京都
- ⑬ Hatakeyama M, Regulation of meiotic cell cycle arrest in insect: Approaches using parthenogenetic species and transgenic technology. NIAS/COE International Symposium, Genetic resources and functional genomics in insects, 2005, March 8-9, Tsukuba.

[図書] (計 2 件)

- ① 新美輝幸、昆虫の斑紋を作る遺伝子を探る、衣笠会繊維研究所、昆虫が語る生物学の未来、2009、印刷中。
- ② 島山正統、4 章-6 遺伝子組換えによる不妊化技術の開発と利用、シーエムシー出版、昆虫テクノロジー研究とその産業利用 (監修: 川崎健次郎、野田博明、木内信)、2005、238-245.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況（計 0件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

畠山 正統 (HATAKEYAMA MASATSUGU)

(独) 農業生物資源研究所・制御剤標的  
遺伝子研究ユニット・主任研究員

研究者番号：50281142

(2) 研究分担者

瀬筒 秀樹 (SEZUTSU HIDEKI)

(独) 農業生物資源研究所・遺伝子組換え  
カイコ研究センター・研究員

研究者番号：70342805

新美 輝幸 (NIIMI TERUYUKI)

名古屋大学大学院・生命農学研究科・助教

研究者番号：00293712

(3) 連携研究者