

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：12605
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2018～2019
課題番号：18K19204
研究課題名（和文）フェムトインジェクションを用いた組換えバキュロウイルス作製法の開発

研究課題名（英文）Construction of recombinant baculovirus using femtoinjection

研究代表者
仲井 まどか（Nakai, Madoka）

東京農工大学・（連合）農学研究科（研究院）・教授

研究者番号：60302907
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、これまで培養細胞で増殖できないとされてきたバキュロウイルスにおいても培養細胞を用いずに遺伝子組換えを行う手法を新たに開発することを目的とし、大腸菌で遺伝子組換えを行なったバキュロウイルスのゲノムDNAを昆虫卵に注射して感染させる方法の確立を試みた。近年、ゲノム編集技術の発展により卵にDNA等の核酸を打ち込む技術の応用範囲は広い。フェムトインジェクションを用いることにより卵殻の薄い卵への注射を可能にした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昆虫の卵は、種によって卵殻の薄くて柔らかいものや、卵そのものの厚みが薄いものがある。多様な卵の形態に対応して、注射接種する技術が確立できれば、モデル昆虫以外の種を用いたゲノム編集が可能になる。また、本研究の方法により培養細胞を用いない組換えバキュロウイルスが構築できれば、これまで解析できなかったバキュロウイルス 遺伝子の機能が解明できる。また、マーカー遺伝子を搭載した組換えバキュロウイルスの構築が可能になるので、バキュロウイルス の感染経路の解明が可能になる。

研究成果の概要（英文）：In this study, it was aimed to develop a new method for gene recombination without using cultured cells, injection of insect eggs with genomic DNA of baculoviruses genetically modified in *E. coli*. Recently, due to the development of genome editing technology, technology of injecting nucleic acid into eggs was extensively applicable. Femtoinjection technology allowed to inject DNA into insect eggs with thin eggshells.

研究分野：応用昆虫学

キーワード：バキュロウイルス フェムトインジェクション 注射 組換え 昆虫卵 チャノコカクモンハマキ

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

バキュロウイルスは、生物農薬やタンパク質発現などのベクターとして利用されている。バキュロウイルスが発現ベクターとしてよく利用される主な理由は、培養細胞を用いた組換えウイルスの作製が容易であるからである。しかし、約 600 種あるバキュロウイルスのうち、実は、感染可能な培養細胞を持つバキュロウイルスは数 10 種類に満たない。また、バキュロウイルスのゲノムには 100 個以上の遺伝子がコードされているが、機能がわかっている遺伝子はその半数にも満たない。一方、バキュロウイルスはチョウ目など重要な農業害虫の主要な天敵であるため、バキュロウイルスのゲノムにコードされている未解明の遺伝子の機能が分かれば、新しい害虫制御法の糸口が見つかる可能性がある。遺伝子組換えが可能になれば、これらの機能未知の遺伝子を欠損させることができるため、調べたい遺伝子を持つ野生株のウイルスと遺伝子組換えにより欠損させた欠損株の表現系を比較することにより、未知の遺伝子の機能が明らかになる。また、遺伝子組換えの手法が使えなかったバキュロウイルスにもマーカー遺伝子を搭載することが可能になるため、培養細胞で培養できなかったバキュロウイルスが宿主昆虫に感染するしくみ、すなわち感染機構の解明が可能になる。

2. 研究の目的

本研究は、上記の現状を踏まえて、従来の組換えウイルス作製法とは全く異なる、フェムトインジェクション（超微量注射）法を用いた新しい組換え法を開発する。感染可能な培養細胞のないバキュロウイルスの全ゲノムを元にした Bacmid（バキュロウイルスのシャトルベクター）の組換え DNA は、構築されている (Saito et al., 2015)。そこで、ES 細胞のようなデリケートな細胞に対しても、半定量的に遺伝子やタンパク質などを直接導入できるフェムトインジェクション法を用いて、バキュロウイルス DNA の昆虫卵に注射接種する方法を開発する。

3. 研究の方法

これまで培養細胞がなく遺伝子機能解析が行えなかったチャノコカクモンハマキの核多角体病ウイルス (*Adoxophyes honmai* NPV: *Adho*NPV) の遺伝子欠損株を作製することを目的とし、チャノコカクモンハマキ卵にウイルス DNA を注射接種する方法の検討を試みた。チャノコカクモンハマキは、扁平な卵を 50 個くらいの卵塊で産卵する。そのため、まず卵塊から個別の卵を分離してシャーレに固定する方法を検討した。卵の分離には化学的に卵殻を溶解させ、物理的に攪拌する方法を検討した。次に、卵塊にそのまま注射接種する方法とその孵化率を向上させる方法を検討した。

4. 研究成果

チャノコカクモンハマキの卵塊から分離した単体の卵を分離する方法は、無機塩水溶液を用いて卵を分離することに成功し、防腐剤を添加したゲルに固定することができたが、その後の孵化率が著しく低下した。卵が孵化しなかった原因として、操作中の物理的な衝撃、ゲルに固定する操作、防腐剤が関係すると考え一つ一つ検討を行った。その結果、物理的な衝撃と防腐剤の添加が、それぞれ卵の孵化率低下に関係することがわかったが、これらの要因を除いても孵化率の向上が見られなかった。その原因として、それぞれの操作の組み合わせにより卵の孵化率が低下してしまう可能性が考えられた。次に卵を単離せずに卵塊のまま注射接種する方法を試みた。超微量注射用のガラスキャピラリーを作製し、マイクロインジェクターの角度を調整することで卵塊へ注射接種することが可能になったが、産卵後 24 時間以内の卵を用いたところ孵化率が約

10%と低かった。そこで、卵塊を採集するための成虫の交尾産卵条件を検討した。すなわち、光周期を操作することにより、産卵直後の卵を回収する方法を検討した。その結果、産卵4時間以内の卵塊にウイルス DNA を注射することが可能になった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 仲井まどか	4. 巻 8
2. 論文標題 昆虫ウイルスと寄生蜂によるチョウ目昆虫の内分泌制御とその機構解明	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 昆虫と自然	6. 最初と最後の頁 25-28
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mikako Saito, Shoya Hiratoko, Ikuko Fukuba, Shin-ichi Tate and Hideaki Matsuoka	4. 巻 86
2. 論文標題 Use of a right triangle chip and its engraved shape as a transferrable x-y coordinate system from light microscopy to electron microscopy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Electrochemistry	6. 最初と最後の頁 6-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.5796/electrochemistry.17-00058	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Naruwa Tokunaga, Ryota Kishi, Tomoko Sasai and Mikako Saito	4. 巻 32
2. 論文標題 , "Enhancement of connexin30.3 expression in mouse embryonic stem cells line EB3 in response to cell-cell contacts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Human Cell	6. 最初と最後の頁 95-102
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13577-018-00235-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 斉藤美佳子	4. 巻 29
2. 論文標題 疾患予防の細胞科学	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 クリーンテクノロジー	6. 最初と最後の頁 68-72
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 斉藤美佳子, 深谷美優, 徳永成和, "
2. 発表標題 フェムトインジェクションによる標的単一細胞へのエクソソーム定量導入
3. 学会等名 2019年電気化学秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 深谷美優, 畠中智寛, 野口恵一, 斉藤美佳子
2. 発表標題 標的HeLa細胞へのエクソソーム導入条件の検討
3. 学会等名 電気化学会第87回大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Ann E. Hajek, Jo;rgen Eilenberg	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Cambridge University Press	5. 総ページ数 439
3. 書名 Natural Enemies 2nd edition	

1. 著者名 佐久間健治, 林 進, 斉藤美佳子	4. 発行年 2019年
2. 出版社 テクノシステム	5. 総ページ数 351-357
3. 書名 “実験動物飼育施設における防臭と臭活用の戦略”, 最新の抗菌・防臭・空気質制御技術 第4章 様々な空間の抗菌・防臭応用事例 第1節 製造環境の抗菌・防臭 第8項,	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

