

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月17日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21380041

研究課題名（和文） 昆虫の遺伝子機能解析を飛躍的に進展させる効率的なプロモーター探索と効果の実証

研究課題名（英文） Development of effective promoters and efficient systems for gene function analysis in insects

研究代表者

瀬筒 秀樹（SEZUTSU HIDEKI）

独立行政法人農業生物資源研究所・遺伝子組換えカイコ研究開発ユニット・ユニット長

研究者番号：70342805

研究成果の概要（和文）：

効果的な昆虫の遺伝子機能解析に必要な、遺伝子の時空間的な制御を可能にするシステムの開発とプロモーターの探索を行った。カイコでは部位特異的組換えが機能し、クローン解析やプロモーター探索に有効であることを示した。さらに、人工ヌクレアーゼによるゲノム編集の可能性も見出した。また、バキュロウイルスの初期遺伝子プロモーターは、程度の差はあるものの昆虫目を超えて機能し、汎用できる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：

Systems to efficiently analyze gene function in insects were developed. Site-specific recombination works in silkworm and the system was found to be applicable for the clonal analysis and enhancer trapping. Gene editing utilizing artificial nucleases becomes possible. A promoter of baculovirus promoted expression of transgenes in some species belonging to different orders suggesting its utility across the insects.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2011年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2012年度	2,800,000	840,000	3,640,000
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

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：昆虫分子生物学・トランスジェニック昆虫

1. 研究開始当初の背景

昆虫における遺伝子組換え技術は、近年飛躍的に進展し、ハエ目、ハチ目、チョウ目、コウチュウ目の20種以上で成功例が報告されている。また最近のゲノム解析による遺伝子情報の蓄積とクローニング技術の向上から、目的遺伝子の単離が容易になり、モデル昆虫ではない種（非モデル昆虫）でも遺伝子機能の解析が進められるようになった。遺

伝子機能解析のためには、導入遺伝子の発現を時期、空間特異的に制御できることが求められる。ゲノム解析が進んでいるキイロショウジョウバエでは、時期・空間特異的な発現プロモーターと二元的な発現調節システム（Gal4/UAS系）を駆使して、導入遺伝子発現を制御するシステムが確立され（McGuire *et al.*, 2004）、発現様式の明確な Gal4（アクティベーター）系統が多数作出・維持され

ている。

一方、非モデル昆虫ではこのようなシステムは整っておらず、異種のプロモーターは機能しないことが多いため、遺伝子機能解析のためには、各昆虫種において発現様式の明らかなプロモーターの探索が急務となっている。本研究代表者と分担者の一部は、遺伝子組換えが可能なカイコ、カブラハバチ、ナミテントウで、二元的な発現調節システム（Gal4/UAS系、Tet-Off系）の効果実証を行ない、*piggyBac* トランスポゾンベクターの再転移と二元的な発現調節システムを利用したエンハンサートラップ法の開発を進めている（竹田, 2006）。しかしながら従来の方法は、世代時間が短く大量に飼育できるキイロショウジョウバエのような種以外では、効率的、現実的な方法とはいえない。

一方、遺伝子組換え昆虫で最も汎用されているプロモーターは 3xP3 で、これは種を越えて安定した発現が証明されている人工プロモーターである（Berghammer *et al.*, 1999）。昆虫ゲノム情報から、発現様式のわかった遺伝子およびその相同遺伝子の上流配列から候補プロモーター領域を推測することは難しいことではなくなっている。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝子組換え技術が確立されている昆虫目（ハエ目、チョウ目、ハチ目、コウチュウ目）を代表する非モデル昆虫を用いて、（1）部位特異的組換えの基盤構築、（2）部位特異的組換えと二元発現調節システムを組合わせた新しいエンハンサートラップ法の開発、（3）昆虫ゲノム情報を利用した *in silico* でプロモーターの探索と、その発現制御機能の検証を行い、これらのシステムが非モデル昆虫にとって効率的で汎用性の高いことを実証する。

3. 研究の方法

本研究では、遺伝子組換え技術が確立されている非モデル昆虫の代表として、カイコ（チョウ目）、カブラハバチ（ハチ目）、およびナミテントウ（コウチュウ目）を用いる。まず、部位特異的組換えの条件設定を行なう。つぎに、従来の二元的な発現調節システム（Gal4/UAS系、Tet-Off系）を利用し、部位特異的組換えを誘発するバクテリオファージ P1 由来の Cre-*LoxP* 系、および酵母 2 μ プラスミド由来の FLP-FRT 系を組合わせてエンハンサートラップ法を改良する。人工プロモーターの構築は、胚発生初期、性特異的、あるいは組織特異的に発現する遺伝子を選

び、昆虫ゲノムデータベースからこれらの相同遺伝子の上流配列を比較し、モチーフ検索等により候補プロモーター領域を抽出する。さらに、候補プロモーターを導入した遺伝子組換えシステムを作出し、その発現制御様式を検証する。

4. 研究成果

2009年度は、Gal4/UAS系とFLP-FRT系を組合わせた汎用的なクローン解析の系をカイコで構築した。細胞質アクチン *A3* 遺伝子のプロモーターの下流に FRT で挟まれた GFP 遺伝子、さらに下流に *Gal4* 遺伝子の結合したものを挿入した *piggyBac* ベクター（pBac[A3-GFP(FRT)Gal4]）を作製した。これにより、通常は全身で GFP を発現し、組換え酵素 FLP の作用により体細胞の一部で GAL4 を発現する実験系を構築することができる。

カブラハバチでは、効果的エンハンサートラップを行なうための、*piggyBac* 転移酵素遺伝子をゲノム中で安定に保持し、転移酵素を構成的に産出するシステムを確立した。これにより、部位特異的組換え用のターゲット遺伝子を、交配により任意のゲノム領域に転移させることができる。

ナミテントウでは、汎用性のある高い発現を示すプロモーターの候補として、バキュロウイルスの初期遺伝子 *immediate early 1 (iel)* プロモーターに着目した。その有効性を検証するため、ショウジョウバエおよびカイコにおける形質転換体を用いた BmNPViel プロモーターのレポーターアッセイを詳細に行った。その結果、胚、幼虫、蛹を通した全身での発現および幼虫における前胸腺、腸での発現が両昆虫間で保存されていることが明らかとなった。したがって、BmNPViel プロモーターが様々な昆虫において高い発現を誘導する汎用性プロモーターとして有効であることが示唆された。

2010年度は、部位特異的組換えの条件設定、改良エンハンサートラップ用のベクター構築、各種ベクターを導入した遺伝子組換えシステムの作出、プロモーター探索を進めた。カイコでは、Gal4/UAS系とFLP-FRT系を組合わせた汎用的な解析系を構築するために、pBac[A3-GFP(FRT)Gal4]ベクタープラスミドをカイコ卵に注入し、遺伝子組換えカイコシステムを4系統作製した。各系統において、1~4コピーのベクターの挿入が認められ、幼虫脂肪体での EGFP の発現が強く認められた。また、共同研究によってカイコでホーミングヌクレアーゼが機能することを初めて示した。さらに、FRT および attP 配列を組み込んだ改良エンハンサートラップ用のベクター構築を行った。その他、チョウ目昆虫ゲノムを比較し、論文を発表した。

カブラハバチでは、*piggyBac* 転移酵素を産生する系統とテトラサイクリントランスアクティベーターと EGFP のキメラタンパク質を産出する系統を交配してエンハンサートラップを試みた。

ナミテントウでは、汎用性のある熱ショック誘導性プロモーターの候補として、キイロショウジョウバエの *heat shock protein 70(hsp70)* プロモーターに着目した。その有効性を検証するため、形質転換ナミテントウを作出し、蛹期において発現解析を詳細に行った。その結果、*hsp70* プロモーター活性は、25°Cにおいて検出されるものの 40°C付近で最も高い活性を示すこと、熱ショック時間に応じて増加すること、熱ショック後速やかに減少すること、組織特異性を有しないことが明らかとなった。

2011 年度は、前年度に引き続き、部位特異的組換えの条件設定、改良エンハンサートラップ用のベクター構築、ベクターを導入した遺伝子組換え系統の作出、プロモーター探索等を行なった。カイコでは、部位特異的遺伝子導入系を組み込んだ改良エンハンサートラップベクターの構築と組換え体作出を開始した。また、pBac[A3-GFP (FRT) Ga14] を導入したカイコ系統について、様々な組織でのクローン解析に用いることができるように、*piggyBac* 転移酵素を発現する系統と交配して挿入配列を転移させ、脂肪体以外に皮膚や筋肉など、異なる組織で GFP の発現が観察される系統を樹立した。

カブラハバチでは、*piggyBac* 転移因子と tTA と EGFP のキメラタンパク質を産出する系統を交配してエンハンサートラップを継続し、さらに、リポフェクション法によって、汎用性のある高い発現を示すプロモーターの候補を見出した。

ナミテントウでは、ナミテントウの *cytoplasmic actin* 遺伝子のプロモーターの有効性を Tet-Off システムを利用して検証するためのベクターを作製した。

プロモーター探索では、幅広い昆虫種で利用可能と思われるプロモーターと新規マーカー遺伝子の候補を用いたベクターを構築した。このベクターをカイコに導入し、このシステムがワークすることがわかった。そこで次に、このベクターが昆虫各種でワークするかを検証するために、キイロショウジョウバエ、カブラハバチ、ナミテントウ各種において遺伝子組換え個体の作出を開始した。また、別のプロモーターの改良のために、これまで活性が低かったプロモーター候補配列を 3 回繰り返すことによって活性増強が可能かを検証するためのベクターを構築した。

2012 年度は、各昆虫種において、部位特異

的組換えの条件設定、改良エンハンサートラップ用のベクター構築および組換え系統の作出、プロモーター探索等を行なった。カイコでは、インテグラゼの標的配列を導入した改良エンハンサートラップ系統の開発を行い、エンハンサーを検出している系統が得られた。FLP-FRT 系を利用したクローン解析実験系では、組換え酵素 FLP の発現を誘導する熱ショックの条件と体細胞クローンのパターンとの関係を各種組織について明らかにして有効性を示し (図 1、2)、論文発表を行った。

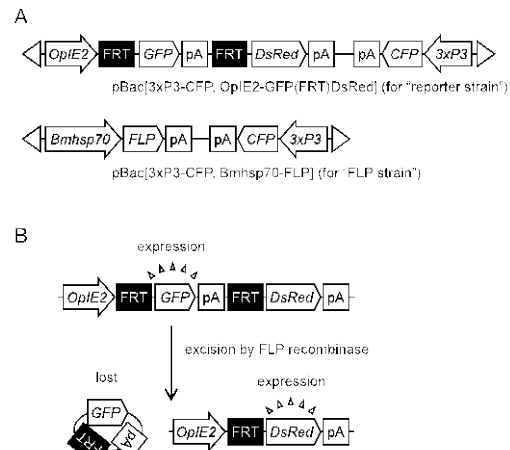


図 1. 汎用的なクローン解析系構築のための *piggyBac* ベクター

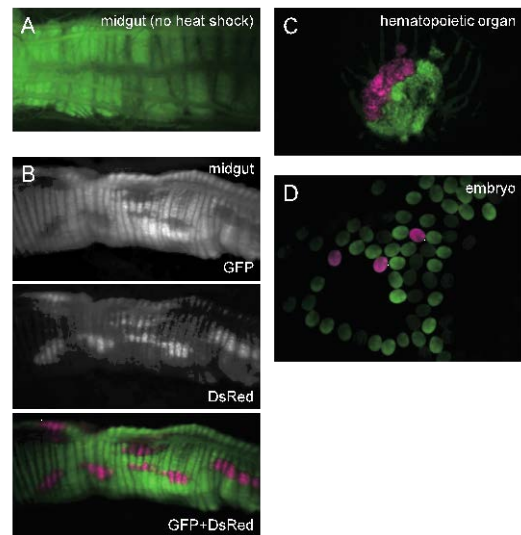


図 2. 組換え酵素 FLP によって FRT に挟まれた GFP がフリップアウトし、DsRed を発現するようになった細胞

カブラハバチでは、tTA と EGFP のキメラタンパク質を産出するような系統を用いたエンハンサートラップを実施し、再転移により致死となる場合は見られたが、明らかな表現

型としてエンハンサーを検出できるまでには至らなかった。

ナミテントウでは、*cytoplasmic actin* 遺伝子のプロモーターの有効性を検証したところ、ショウジョウバエにおいて有効であることが示唆された。

人工プロモーターの開発にむけては、*iel* プロモーター等およびカイコの体表黒色を薄くする *BmaaNAT* 遺伝子を用いて、カイコ、カブラハバチ、テントウムシ、キイロショウジョウバエで機能するかを検証したところ、カブラハバチ以外の昆虫種の黒色素を薄くできた。カブラハバチでは *iel* プロモーターによる発現誘導のみ確認できた。また、プロモーター領域の迅速な特定のために、バキュロウイルス系よりも扱いやすいと思われるエレクトロポレーションを利用した一過性の遺伝子導入発現系の開発に着手し、カイコではこの方法が有効であることを示唆した。

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 19 件)

1. Tatsuke T, Lee JM, Iiyama K, Sezutsu H, Uchino K, Kusakabe T (2013) Tightly controlled Tetracycline-inducible transcription system for explosive gene expression in cultured silkworm cells. *Archives of Insect Biochemistry & Physiology* 82(4):173-182, DOI:10.1002/arch.21083
2. Sajwan S, Takasu Y, Tamura T, Uchino K, Sezutsu H, Zurovec M (2013) Efficient disruption of endogenous Bombyx gene by TAL effector nucleases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 43(1):17-23, DOI:10.1016/j.ibmb.2012.10.011
3. Yoshiyama N, Tojo K, Hatakeyama M (2013) A survey of the effectiveness of non-cell autonomous RNAi throughout development in the sawfly, *Athalia rosae* (Hymenoptera) *Journal of Insect Physiology* 59(4):400-407, DOI:10.1016/j.jinsphys.2013.01.009
4. Daimon T., Sezutsu H. 他 14 名 (11 番目) (2012) Precocious metamorphosis in the juvenile hormone-deficient mutant of the silkworm, *Bombyx mori*, *PLoS Genetics*, 8 (3): e1002486, DOI:10.1371/journal.pgen.1002486
5. Osanai-Futahashi M, Ohde T, Hirata J, Uchino K, Futahashi R, Tamura T, Niimi T, Sezutsu H (2012) A visible dominant marker for insect transgenesis. *Nature communications* 3:1295, DOI:10.1038/ncomms2312.
6. Yonemura N, Tamura T, Uchino K, Kobayashi I, Tatematsu K, Iizuka T, Sezutsu H, Muthulakshmi M, Nagaraju J, Kusakabe T (2012) PhiC31 integrase-mediated cassette exchange in silkworm embryos. *Molecular Genetics and Genomics* 287(9):731-739, DOI:10.1007/s00438-012-0711-y
7. Osanai-Futahashi M, Tatematsu KI, Yamamoto K, Narukawa J, Uchino K, Kayukawa T, Shinoda T, Banno Y, Tamura T, Sezutsu H. (2012) Identification of the Bombyx red egg gene reveals the involvement of a novel transporter family gene in the late steps of the insect ommochrome biosynthesis pathway. *Journal of Biological Chemistry* 287(21): 17706-17714, DOI:10.1074/jbc.M111.321331
8. Komoto N, Tomita S. (2012) Development of a clonal analysis system in the silkworm, *Bombyx mori*, mediated by FLP and FRT. *Journal of Insect Biotechnology and Sericulture* 81:63-67, DOI: 10.11416/jibs.81.2_3_063
9. Masumoto, M., Ohde, T., Shiomi, K., Yaginuma, T. and Niimi, T. (2012) A baculovirus immediate-early gene, *iel*, promoter drives efficient expression of a transgene in both *Drosophila melanogaster* and *Bombyx mori*. *PLoS ONE*, 7: e49323, DOI:10.1371/journal.pone.0049323
10. Kobayashi I, Tsukioka H, Komoto N, Uchino K, Sezutsu H, Tamura T, Kusakabe T, Tomita S, (2012) SID-1 protein of *Caenorhabditis elegans* mediates uptake of dsRNA into *Bombyx* cells, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42: 148-154, DOI:10.1016/j.ibmb.2011.11.007
11. Kobayashi I., Sezutsu H. 他 10 名 (4 番目) (2011) An Efficient Binary System for Gene Expression in the Silkworm, *Bombyx mori*, Using GAL4 Variants, *Archives of Insect Biochemistry & Physiology*, 76:195-210, DOI:10.1002/arch.20402
12. Takasu, Y. 他 8 名 (5 番目) (2010) Targeted mutagenesis in the silkworm *Bombyx mori* using zinc finger nuclease mRNA injection, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40: 759-765, DOI:10.1016/j.ibmb.2010.07.012

13. d' Alençon, E., Sezutsu, H., et al. (2010) Extensive synteny conservation of holocentric chromosomes in Lepidoptera despite high rates of local genome rearrangement, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 7680-7685, DOI:10.1073/pnas.0910413107
 14. Fujii, T. 他 7 名 (6 番目) (2010) Transgenic analysis of the BmBLOS2 gene that governs the translucency of the larval integument of the silkworm, *Bombyx mori*, *Insect Molecular Biology*, 19: 659-667, DOI:10.1111/j.1365-2583.2010.01020.x
 15. Kobayashi, I. 他 6 名 (6 番目) (2010) Rescue of the Aojuku white-egg translucent (w-3ol) *Bombyx mori* mutant by transgenic expression of the wild-type Bmwh3 gene, *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, 79:111-116, DOI:10.11416/jibs.79.3_111
 16. Banno Y., Shimada T., Kajiura Z., Sezutsu H (2010) The Silkworm-An Attractive BioResource Supplied by Japan, *Experimental Animals*, 59: 139-146, DOI:10.1538/expanim.59.139
 17. Holtzman S., Miller D., Eisman, R. C., Kuwayama H., Niimi T., Kaufman T. C. (2010) Transgenic tools for members of the genus *Drosophila* with sequenced genomes, *Fly*, 4: 349-362, DOI:10.4161/fly.4.4.13304
 18. Shimomura M. 他 14 名 (10 番目) (2009) KAIKObase: An integrated silkworm genome database and data mining tool, *BMC Genomics*, 10: 486, DOI:10.1186/1471-2164-10-486
 19. Hatakeyama M., et al., The sawfly, *Athalia rosae ruficornis* (Hymenoptera) as a model insect for developmental and reproductive biology: what has been done and what should be done? *Proc. Arthropod. Embryol. Soc. Jpn*, 44, 2009, 1-12, URL: <http://aesj.co-site.jp/paesj.html>
- [学会発表] (計 21 件)
1. Sezutsu H, Tsubota T, Osanai-Futahashi M, Suzuki T, Tatematsu KI, Kobayashi I, Iizuka T, Uchino K, Yonemura N, Takasu Y, Tamura T (2012) Transgenic silkworms for analysis of gene function and production of recombinant proteins/silks. ICE2012 - XXIV International Congress of Entomology 2012, 2012. 8. 20, Korea
 2. Sezutsu H, Iizuka T, Uchino K, Kobayashi I, Tatematsu KI, Tsubota T, Yonemura N, Okada E, Nakajima K, Machii H, Tamura T (2012) Genetically modified silkworms and silks - recent updates and future prospects. The 7th International Conference on Wild Silkmoth and Silk, 22-24 Nov. 2012, Mahasarakham Univ., Thailand
 3. Osanai-Futahashi M, Tatematsu KI, Yamamoto K, Uchino K, Futahashi R, Tamura T, Sezutsu H (2012) Pigment synthesis pathway genes and their application to visible transgenic markers. ICE2012 - XXIV International Congress of Entomology 2012, 2012. 8. 20, Korea
 4. Hatakeyama M (2012) *Athalia rosae*: an emerging genetic model system for sawflies XXIV International Congress of Entomology: S1107TH07, 2012. 8. 23. Daegu, Korea
 5. Niimi, T., Transgenic ladybird: development of gene function analysis systems for non-model insects., The 1st International Conference on the Cricket / RNAi Symposium for Medicine-Agriculture-Engineering Collaboration Project (Joint Meeting), March 14, 2011, 要旨集
 6. Sezutsu, H. et al., Development of transgenic silkworm *Bombyx mori* for functional genomics, Sixth International Symposium on Molecular Insect Science, 2011.10.2-5, Amsterdam, The Netherlands
 7. Sezutsu, H. et al., Development of transgenic silkworms for functional genomics in *Bombyx mori* as a lepidopteran model insect 5th Annual Arthropod Genomics Symposium, 5th Annual Arthropod Genomics Symposium, 2011.7.9-12, Kansas, USA
 8. Tamura, T. et al., Transgenic silkworm as a tool for functional analysis of insect genes and for bioreactor, 2nd International Symposium on Silkworm Functional Genomics and Modern Silk Road, 2011.10.21-24, Chongqing, China
 9. Sezutsu, H. et al., Development of transposon mutagenesis systems and a database for transposon insertion lines in silkworm *Bombyx mori*, International Symposium: New Silk Road: Silkworm Genome to Sustainable Agriculture, 2010年11月10日, Tsukuba, Japan
 10. Sezutsu, H. et al., Extensive synteny conservation of holocentric

- chromosomes in lepidoptera despite high rates of local genome rearrangement, Workshop on Recent Advances in Sericulture Research, May 18, 2010, Bengalure, India
11. Tamura, T. et al., Development of transgenic silkworm as a tool for functional analysis and for bioreactor, International Symposium; New Silk Road: Silkworm Genome to Sustainable Agriculture, 2010年11月10日, Tsukuba, Japan
 12. Tamura, T. et al., Transgenic silkworm as a tool for the analysis of gene function and bioreactor, Workshop on Recent Advances in Sericulture Research, May 18, 2010, Bengalure, India
 13. 内野恵郎ら, 新規ミューテーターを用いたカイコ・エンハンサー・トップ系統の作出と解析, 平成22年度蚕糸・昆虫機能学術講演会-日本蚕糸学会第80回大会-, 2010年4月4日, 上田市, 信州大学
 14. 畠山正統, カブラハバチにおけるプロモーター探索の試み, 第31回菅平動物学セミナー, 2010年12月4日, 長野・筑波大菅平高原実験センター
 15. Sezutsu H., et al., Construction of enhancer trap system and Bombyx Trap DataBase for the analysis of gene function in silkworm Bombyx mori、Sezutsu H., et al., Construction of enhancer trap system and Bombyx Trap DataBase for the analysis of gene function in silkworm Bombyx mori
 16. 瀬筒秀樹, トランスジェニックカイコを用いた遺伝子機能解析、2009年度昆虫ポストゲノム研究会, 2009年9月10日, 北海道大学 農学部総合研究棟
 17. Sezutsu H., et al., Development of transgenic silkworm Bombyx mori for functional genomics, The 6th Asia-Pacific Congress of Entomology, 2009年10月20日, Beijing, China
 18. Sezutsu H., et al., Transgenic silkworm as a tool for the analysis of gene function. International Symposium on Bombyx mori. Functional Genomics and Modern Silk Road., 2009年10月23日, Chongqing, China
 19. Sezutsu H., et al., Construction of an enhancer trap system and Bombyx Trap DataBase for the analysis of gene function in silkworm Bombyx mori、第32回日本分子生物学会年会, 2009年12月11日, パシフィコ横浜
 20. 大出高弘・増本三香・柳沼利信・新美輝幸, トランスジェニックカイコおよびトランスジェニックフライにおけるBmNPViel プロモーターのレポーターアッセイ、2009年度 昆虫ポストゲノム研究会, 2009年9月10日, 北海道大学 農学部総合研究棟
 21. 大出高弘・増本三香・柳沼利信・新美輝幸, 形質転換昆虫における BmNPViel プロモーターの汎用性の検討、日本蚕糸学会中部支部第65回・東海支部大会第61回, 2009年12月3日, 名古屋大学 野依記念学術交流館・会議室
- 〔図書〕(計2件)
1. 畠山正統, 共立出版、分子昆虫学(第7章 4: 遺伝子組換え技術の害虫防除への利用), 2009, 394-396
 2. 瀬筒秀樹、富田正浩, 共立出版、分子昆虫学(第1章6: 遺伝子組換え技術), 2009, 37-39
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
瀬筒 秀樹 (SEZUTSU HIDEKI)
独立行政法人農業生物資源研究所・遺伝子組換えカイコ研究開発ユニット・ユニット長
研究者番号: 70342805
 - (2) 研究分担者
河本 夏雄 (KOMOTO NATUO)
独立行政法人農業生物資源研究所・遺伝子組換えカイコ研究開発ユニット・主任研究員
研究者番号: 30355747
 - (3) 研究分担者
富田 秀一郎 (TOMITA SYUICHIRO)
独立行政法人農業生物資源研究所・遺伝子組換えカイコ研究開発ユニット・主任研究員
研究者番号: 30360457
 - (4) 研究分担者
畠山 正統 (HATAKEYAMA MASATSUGU)
独立行政法人農業生物資源研究所・昆虫成長制御研究ユニット・主任研究員
研究者番号: 50281142
 - (5) 研究分担者
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