

## 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：2010～2012  
 課題番号：22380039  
 研究課題名（和文） リポフェクションによる昆虫個体への簡便な遺伝子導入・遺伝子機能解析技術の開発  
 研究課題名（英文） Development of a simple gene delivery system into insects by lipofection  
  
 研究代表者  
 神村 学 (MANABU KAMIMURA)  
 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：60370649

研究成果の概要（和文）： リポフェクション法により 6 目 70 種以上の昆虫でルシフェラーゼ遺伝子を発現させることに成功した。カイコに脱皮ホルモン不活性化酵素遺伝子 *E22O* を発現させたところ、血液虫の脱皮ホルモン濃度が低がり、脱皮・変態が阻害された。また、本法とレポーター遺伝子アッセイを組み合わせることにより、カイコの麻痺ペプチドがポリシストロニック mRNA から翻訳されることも明らかにした。このように、リポフェクション法は様々な昆虫に遺伝子を発現させてその機能を解析したり、遺伝子の発現制御機構を解析する手段として利用できそうである。

研究成果の概要（英文）： The firefly luciferase gene was successfully expressed by *in vivo* lipofection in more than 70 species of insects belonging to six orders. Expression of the *E22O* gene encoding an ecdysteroid inactivating enzyme by lipofection effectively decreased the 20-hydroxyecdysone titer and blocked molting in *B. mori*. Combining this gene delivery system with the luciferase assay revealed that the silkworm paralytic peptide is encoded by a polycistronic mRNA. These results indicate that *in vivo* lipofection can be used to analyze functions or expression control mechanisms of genes in varieties of insects.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2011 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2012 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

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

## 1. 研究開始当初の背景

分子生物学研究の進展とゲノム解析の広がりに伴い、現在、多くの昆虫種で様々な遺伝子がクローニングされ、それらの機能を解析する技術が強く求められている。トランスジェニック昆虫（昆虫の遺伝子組換え個体）は遺伝子の機能を解析するための最も優れたシステムである。しかし、現行では、特定の時期の卵に目的遺伝子を組み込んだトランスポゾン注射して次世代で遺伝子組換え個体を得るという方法をとっているため、ステージのそろった卵を多量に集めることのできる種にしか使えない。また、特別な注射装置を必要とし、作業に熟練する必要もある。このように制約が大きく、双翅目を中心とした 20 種ほどのモデル昆虫でしか作出に成功していない。一方、遺伝子銃やエレクトロポレーションなどにより外来遺伝子を一過的に昆虫個体に発現させる技術が開発されている。これらの方法は種を問わず利用できるという利点があるが、高価な遺伝子導入装置を必要とすることが多く、さらに、一般に導入効率が非常に低いためレポーター遺伝子の発現を検出できるのみで遺伝子の機能解析に利用できた例はほとんどない。このように、一部の種を除き、昆虫個体への遺伝子導入とそれによる遺伝子機能解析はいまだに非常に困難である。

## 2. 研究の目的

応募者はこれまでに、昆虫ホルモン関連の遺伝子の機能を解析してきたが、その過程で、発現プラスミドとリポフェクション用の遺伝子導入試薬を混ぜて血体腔中に注射するという極めて簡単な方法により、カイコ幼虫に脱皮ホルモンの分解酵素を発現させてその機能を解析できることを見いだした。この手法を使えば、カイコを含む様々な昆虫種で様々な遺伝子の機能を簡便に解析することができるようになることを期待できる。そこで、リポフェクションにより様々な昆虫に様々な遺伝子が発現させてその機能を解析する技術を開発することを目的として、本研究を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) ルシフェラーゼ遺伝子の各種昆虫への発現の試み

ドクガ核多核体病ウイルスの *IE2* 遺伝子プロモーターによりホタル・ルシフェラーゼを発現するプラスミド (pIZT-fluc) を市販のリポフェクション試薬と混ぜ、様々な昆虫の幼虫もしくは蛹に注射し、数日飼育してから体壁部分をサンプリングしてルシフェラー

ゼ・アッセイに供試し、ルシフェラーゼの強度から発現効率を評価した

### (2) *E220* 遺伝子のカイコ幼虫への発現

*IE2* 遺伝子プロモーターにより緑きょう病菌の脱皮ホルモン不活性化酵素遺伝子 *E220* を発現するプラスミド (pIZT-E220) をカイコの 3~5 齢幼虫にリポフェクションし、その後の発育を観察するとともに、血液をサンプリングし、HPLC-RIA により血液中のエクジステロイド濃度を測定した。

### (3) カイコ麻痺ペプチド mRNA がポリシトロニック mRNA であることの証明

uENF1、uENF2、麻痺ペプチド (paralytic peptide: PP) 前駆体の 3 種類の ORF のうちのいずれか一つの ORF をホタル・ルシフェラーゼ ORF に置換した mRNA を発現するプラスミドを構築し、培養細胞に導入するほか、カイコ幼虫にリポフェクション法により導入してこれらの mRNA を発現させ、ルシフェラーゼ・アッセイを行うことで、各 ORF の発現量を比較した。

## 4. 研究成果

### (1) ルシフェラーゼ遺伝子の各種昆虫への発現の試み

12 上科、21 科に属す 77 種のチョウ目昆虫にリポフェクションによる遺伝子発現を試みたところ、47 種 (61%) で明らかなルシフェラーゼの発現が見られ、20 種 (26%) では特に高い発現が見られた (図 1)。原始的なグループから高等なグループまでを見渡してみても、特に発現量が多いグループは無く、多くの科の中に発現効率が高い種と低い種が混在していた。以上の結果より、チョウ目昆虫にリポフェクションを試した場合、系統上の位置によらず 50%以上の確率で遺伝子導入でき、さらにその半分の種では効率的に遺伝子導入できるものと推測された。

チョウ目昆虫以外では、無変態昆虫 1 種、不完全変態類 4 目 22 種、完全変態類 4 目 35 種にリポフェクションによるルシフェラーゼ遺伝子の発現を試みた (図 2)。無変態類のマダラシミではルシフェラーゼは発現できなかった。不完全変態類 (バッタ目、ハサミムシ目、カマキリ目、カメムシ目) でもルシフェラーゼの発現効率は悪く、4 種でのみ弱いルシフェラーゼの発現を確認できた。完全変態類では、ハエ目 3 種では全く発現を確認できず、アミメカゲロウ目のコウスバカゲロウでもバックグラウンドレベルの発現を観察できたのみであった。一方、ハチ目では調べた 8 種中 4 種ではっきりしたルシフェラ

一ゼの発現を確認でき、コウチュウ目では調べた 23 種中 17 種で発現が確認できた。これらの結果から、チョウ目に加えて、ハチ目、コウチュウ目でもリポフェクションにより外来遺伝子を発現できることがわかった。このように、完全変態類では比較的リポフェクションによる遺伝子の発現効率が高かったが、不完全変態類では効率が低かった。

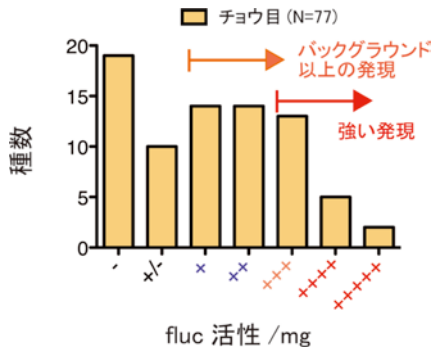


図1 チョウ目昆虫へのリポフェクションによるルシフェラーゼ遺伝子の発現

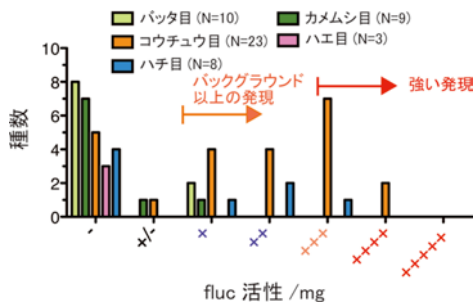


図2 チョウ目以外の昆虫へのリポフェクションによるルシフェラーゼ遺伝子の発現

(2) *E220* 遺伝子のカイコ幼虫への発現

リポフェクション法により *E220* 遺伝子をカイコの 3 齢幼虫に発現させたところ、3 齢期間が大幅に延長しそのまま体がぱんぱんになるまで食べ続けて死亡するか、いったん 4 齢幼虫に脱皮した後、早熟変態した (図 3)。

4 齢幼虫に *E220* 遺伝子を発現させた場合も処理した幼虫の齢期間がのび、多くの個体は 5 齢幼虫に脱皮することなく死亡した。

繭を作り始めたばかりの 5 齢幼虫に *E220* 遺伝子を発現させた場合には、蛹化には影響がなかったが羽化が強く阻害された (図 4)。*E220* 遺伝子を発現させた虫の蛹期中の血中エクジステロイド濃度を測定したところ、活性型脱皮ホルモンである 20-ヒドロキシエクジソンの濃度が下がり、かわりにエクジソンや 20-ヒドロキシエクジソンが *E220* により酸化されることにより生じる 22-デヒドロエクジソンや 22-デヒドロ-20-ヒドロキシエクジソンが多量に蓄積していることが確かめられた (図 5)

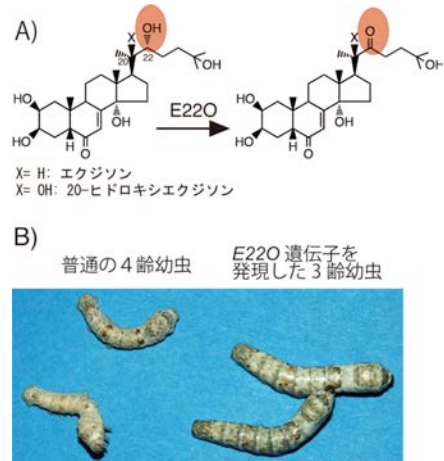


図3 カイコ 3 齢幼虫への *E220* 遺伝子の発現  
A) *E220* による脱皮ホルモンの不活化反応  
B) *E220* 遺伝子を発現させた後 5 日たった幼虫

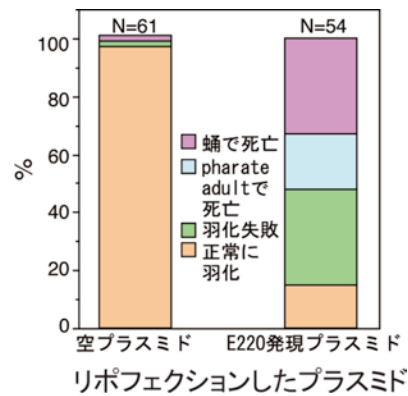


図4 カイコ 5 齢幼虫へ *E220* 遺伝子を発現させた後の蛹期の発育

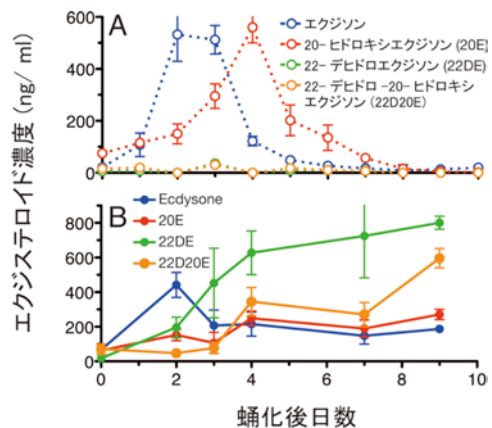


図5 カイコ 5 齢幼虫へ *E220* 遺伝子を発現した後の蛹期のエクジステロイド濃度の推移  
A) 無処理虫 B) *E220* 発現虫

(3) カイコ麻痺ペプチド mRNA がポリシストロニック mRNA であることの証明

カイコには 0.6 kb と 1.5kb の 2 種類の長さの PP mRNA が存在する。1.5 kb PP mRNA

の cDNA をクローニングして配列を調べたところ、PP ORF の上流に uENF1 と uENF2 と名付けたともに約 100 アミノ酸からなるタンパク質をコードする ORF を持つポリシストロニック（トリシストロニック）mRNA である可能性が示唆された（図 6 A）。この 1.5 kb mRNA がポリシストロニック mRNA であることを証明するために、3 種の ORF のうちいずれか一つをホタル・ルシフェラーゼ ORF に置換した mRNA を発現するプラスミドを構築し、Sf9 細胞やカイコ aff3 細胞に導入してルシフェラーゼ・アッセイを行ったところ、両細胞でともに uENF1、uENF2、PP ORF が 100 : 20 : 5 の割合で発現することがわかった（図 6 B）。同じプラスミドをカイコ幼虫にリポフェクションにより導入し、血球と体壁を採取してルシフェラーゼ・アッセイを行ったところ、両方の組織で、培養細胞とほぼ同じ割合で 3 種の ORF から翻訳が起こることが確かめられた（図 6 C）。以上の結果から、この mRNA がポリシストロニック mRNA であり、uENF1、uENF2、PP の 3 種のタンパク質が独立して翻訳されることが示された。

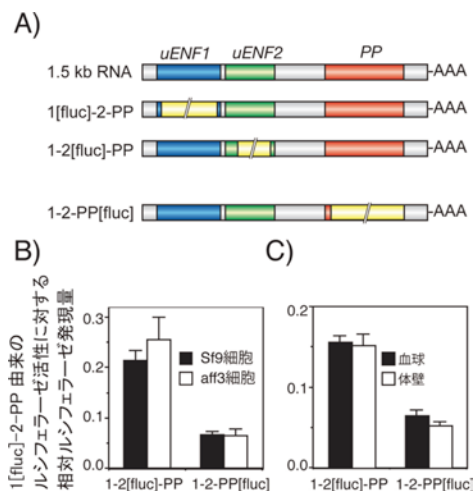


図 6 1.5 kb PP mRNA からの翻訳制御機構解析  
A) 発現させる mRNA の模式図 B) 培養細胞における 3 種の ORF からの翻訳量の比較 C) カイコ幼虫組織における 3 種の ORF からの翻訳量の比較

以上の解析より、*in vivo* リポフェクションをカイコでの遺伝子の機能解析や発現制御機構解析に利用できることが確かめられた。また、カイコだけでなく広範囲の昆虫への遺伝子導入に利用できることもわかった。このように、本法は昆虫への汎用的かつ簡便な遺伝子導入法として、様々な解析に利用できるものと期待できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 8 件）

1. Kamimura M, Saito H, Niwa R, Niimi T, Toyoda K, Ueno C, Kanamori Y, Shimura S, Kiuchi M. (2012) Fungal ecdysteroid-22-oxidase: a new tool for manipulating ecdysteroid signaling and insect development. *J Biol Chem.* 287: 16488-16498.
2. Kanamori Y, Hayakawa Y, Matsumoto H, Yasukochi Y, Shimura S, Nakahara Y, Kiuchi M, Kamimura M (2010) A eukaryotic (insect) tricistronic mRNA encodes three proteins selected by context-dependent scanning. *J Biol Chem* 285: 36933-36944.
3. Nakahara Y, Kanamori Y, Kiuchi M, Kamimura M (2010) Two hemocyte lineages exist in silkworm larval hematopoietic organ. *PLoS One* 5, e11816.

〔学会発表〕（計 16 件）

1. 神村学 (2013) *in vivo* リポフェクション: 昆虫への簡便で汎用的な遺伝子導入法としての可能性. 日本応用動物昆虫学会、2013 年 3 月 29 日、日本大学藤沢キャンパス
2. 神村学 (2013) 緑きょう病菌の脱皮ホルモン不活性化酵素: 新たな生理学、発生学研究ツールとしての展開. 日本応用動物昆虫学会、2013 年 3 月 29 日、日本大学藤沢キャンパス
3. 神村学 (2013) *in vivo* トランスフェクション (*in vivo* リポフェクション) は昆虫への汎用的な遺伝子導入法になりうるか? 日本蚕糸学会、2013 年 3 月 19 日、農林水産技術会議筑波事務所
4. 神村学 (2013) *in vivo* リポフェクションによるカイコほかのチョウ目昆虫への簡単な遺伝子発現技術の開発. 日本蚕糸学会、2013 年 3 月 19 日、農林水産技術会議筑波事務所
5. 神村学, 丹羽隆介, 新美輝幸, 豊田衣子, 上野千尋, 志村幸子, 木内信 (2012) カビ由来の脱皮ホルモン分解酵素を用いた簡便な脱皮ホルモン濃度低下法の開発. 日本応用動物昆虫学会、2012 年 3 月 28 日、近畿大学奈良キャンパス

〔図書〕（計 1 件）

1. Kamimura M (2011) ENF peptides in insects. Hemolymph proteins and

functional peptides: Recent advances  
in insects and other arthropods  
(Bentham Science Publishers), pp.  
172-182.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

神村学 (KAMIMURA MANABU)  
(独) 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: 60370649

### (2) 研究分担者

宮本 和久 (MIYAMOTO KAZUHISA)  
(独) 農業生物資源研究所・  
昆虫微生物機能研究ユニット・上席研究員  
研究者番号: 10370686

門野 敬子 (KADONO KEIKO)  
(独) 農業生物資源研究所・  
昆虫ゲノム研究ユニット・上席研究員  
研究者番号: 40355722

和田 早苗 (WADA SANAE)  
(独) 農業生物資源研究所・  
昆虫微生物機能研究ユニット・主任研究員  
研究者番号: 50414959

### (3) 連携研究者

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開発ユニット・  
ユニット長  
研究者番号: 70342805