

# 「改変遺伝子導入昆虫を利用した環境調和型害虫防除法に関する基礎研究」

(H11年～H13年、第I期)  
H13年度予算額：0.92 (億円)

研究代表者：山元大輔 (早稲田大学)

研究体制：早稲田大学他8機関

## 研究の概要・目標

1 何を目標している  
・昆虫集団の個体数制御を行うため、従来の薬剤に依存する手法とは発想の異なる遺伝子工学的手法の開発を目指す。

(第I期の目標)  
形質転換昆虫作出用の新規ベクターの原型の完成  
(第II期の目標)  
閉鎖系における形質転換昆虫による昆虫集団の個体数変動の評価

2 何を研究している  
・昆虫を遺伝子操作するための、ベクター開発および遺伝子の単離を行う。改変遺伝子導入昆虫による集団のサイズの制御手法を開発する。

3 何が新しいのか  
・遺伝子組換え技術を個体数制御に応用した例はなく、本邦独自の、薬剤に依存しない個体数制御技術の開発に結びつく。

ベクター：目的とする遺伝子を細胞に運び増殖・発現するために用いられる運び屋DNA分子のこと

## 諸外国の現状等

現状と我が国の水準

・改変遺伝子導入昆虫を利用した環境調和型害虫防除法に関するプロジェクトは、世界的先例がなく、初めての試みと思われる。本課題の川上にあたるショウジョウバエの性行動制御遺伝子研究は世界の先端を走っている。

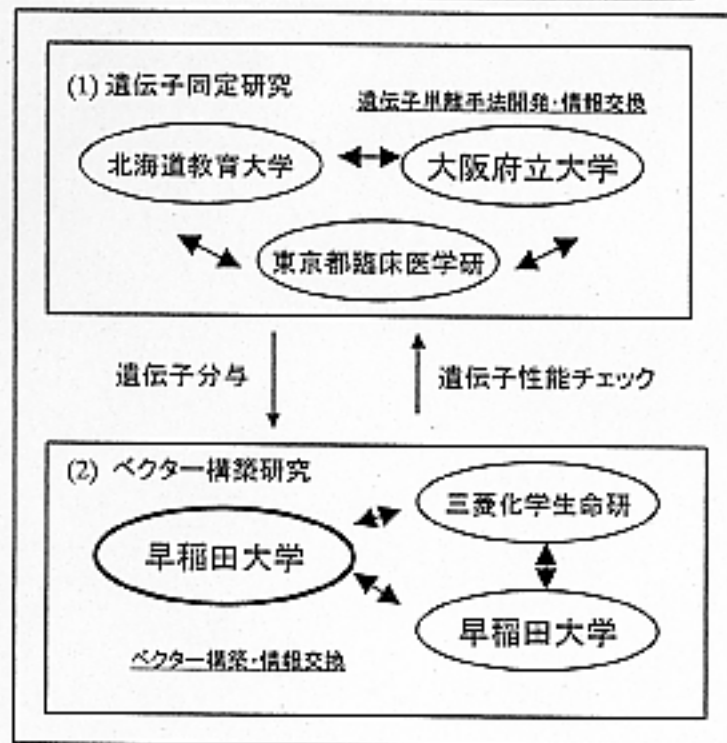
## 研究進展・成果がもたらす利点

1 世界との水準の関係  
・遺伝子工学手法を個体数制御に応用した例は世界的にもない。本成果は世界にない、本邦初の新しい環境調和型害虫防除法の開発に結びつく。

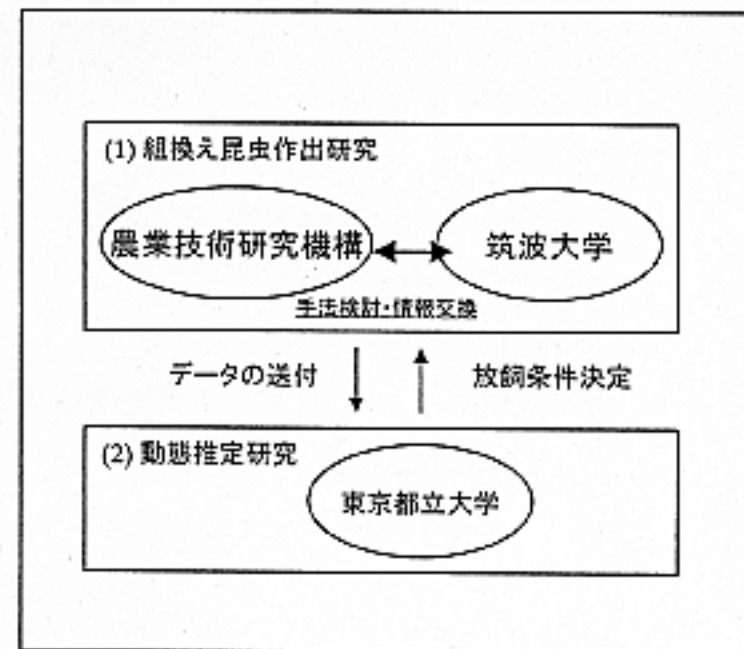
2 波及効果  
・薬剤に依存しない新しい衛生昆虫防除法が開発される。

# 「改変遺伝子導入昆虫を利用した環境調和型害虫防除法に関する基礎研究」の研究体制

## 1 個体数制御用ベクターに関する研究



## 2 形質転換昆虫作出とその動態に関する研究



### 研究の目標

I 期終了時: 形質転換昆虫作成用の新規ベクターの原型完成

II 期終了時: 閉鎖系における形質転換昆虫による昆虫集団の個体数変動の評価

科学技術振興調整費 総合研究  
 「改変遺伝子導入昆虫を利用した環境調和型害虫防除法に関する基礎研究」  
 第Ⅰ期（平成11年～13年）における実施体制および所要経費 （単位：千円）

研 究 項 目	担 当 機 関 名	所 要 経 費
1. 個体数制御用ベクターに関する研究		
(1) 個体数制御用遺伝子の同定		
① 脳の雌雄を決める遺伝子の同定	北海道教育大学教育学部	5,718
② 性行動・神経機能を支配する遺伝子の同定	大阪府立大学総合科学部	6,873
③ 温度適応行動に関わる遺伝子の同定	(財)東京都臨床医学総合研究所	11,639
(2) 個体数制御用遺伝子の人為的な改造と個体数制御用ベクターの構築と改良		
① 新規ベクターの構築と改良	早稲田大学理工学総合研究センター	216,687
② ベクター導入法の開発と改良	(株)三菱化学生命科学研究所	5,528
③ 導入遺伝子の発現特性の分析と改良	早稲田大学理工学部総合研究センター	5,611
2. 形質転換昆虫作出とその動態に関する研究		
(1) 形質転換体作出と遺伝子・個体数動態の実験研究		
① ミツバチの形質転換体作出と形質転換個体の動態推定	農業技術研究機構	52,028
② イエバエの形質転換体作出と形質転換個体の動態推定	筑波大学農林学系	10,750
(2) 集団内導入遺伝子頻度及び個体数の動態推定	東京都立大学	25,711
3. 研究推進	文部科学省研究振興局	426
		340,971

## 【研究成果の概要】

課題名（研究代表者）：改変遺伝子導入昆虫を利用した環境調和型害虫防除法の開発に関する基礎研究（山元大輔）

### 第一班成果概要

#### （1） 個体数制御用遺伝子の分離・同定

個体数を減少させるには、導入遺伝子保有個体の生存価を損なうことなくその妊性を失わせる、あるいは低下させることが必要である。例えば個体の性転換を起こさせたり、行動異常を招来する遺伝子の導入は、有望な方法と考えられる。また、生存不適域に移動させるという戦術もある。性転換や行動異常をひきおこす遺伝子の特定は容易でないが、そうした局面に異常を持つ突然変異体が分離できれば、その原因遺伝子として該当遺伝子を同定できる。そこで突然変異の誘発・分離が比較的容易なキイロショウジョウバエを用いて、性転換、行動異常及びその土台となる脳神経機能異常を示す突然変異体スクリーニングを分担して進め、原因遺伝子クローニングやその強制発現実験を行った。その結果、利用できる可能性のある以下の遺伝子を単離できた。

*fruitless*：強制発現により雌の神経系を雄化させること（性転換）が可能（山元、木村賢一）

*atsugari*：低温を好む変異体によって同定。温度受容細胞の機能に関わる遺伝子（梅田）

*calreticulin*：麻酔感受性変化を指標にして同定された。記憶障害をもたらす可能性のある遺伝子（蒲生）

*fickle(BTK)*：交尾異常により不妊となる変異に基づき同定。優性形質を生じる変異型の作成に成功（井上）

こうした突然変異体分離、原因遺伝子同定に並行して、より確実、効率的な変異誘発—遺伝子クローニング法の開発を進め、キイロショウジョウバエで初めてのジーントラップ法、dual-tagging gene-trapを確立した（山元）。また二本鎖RNA産生型cDNAによる遺伝子機能阻害法を確立した（上田）。

#### （2） ベクターの構築

ショウジョウバエで汎用されているトランスポゾン P 因子は、宿主が *Drosophila* 属に限定されているため、各種の害虫の形質転換には使用不能である。そこで極力広い宿主域を持つトランスポゾンを選び、ベクターを作成するという方針に沿い、*Mariner* 因子ベクターの構築を行なった。*Mariner* のうち *Mos1* と呼ばれる因子にまずマルチクローニングサイトを導入し、ここにウミクラゲ発火タンパク質改良型の sGFP コード配列をマーカーとして挿入したベクター、及びショウジョウバエ複眼着色遺伝子 *white* をマーカーとして挿入したベ



クターを作成した。これらを用いて形質転換が可能であることをまずショウジョウバエを用いて確認した。続いてイエバエの形質転換に使用可能とするため、*white* に代わり *to* 遺伝子をマーカーとした *Mariner* ベクターを構築した。このベクターにはイエバエの *to*<sup>+</sup> 突然変異系統（複眼が朱色に変化）に導入した場合、成虫の眼色変化を指標に形質転換体を分離できるという特徴がある。*to* マーカーを持つベクターとしては、そのプロモータに *white* プロモータを用いたもの、バキュロウィルスプロモータを用いたもの、そしてアクチンプロモータを用いたものの三種を作成した。さらに他の研究グループによって開発された *Hermes* 因子ベクター、*PiggyBac* 因子ベクターを用いたイエバエ用ベクターも作成した（以上、山元）。

### （3）利己的遺伝子ベクター

以上に述べたベクターは、あくまで各種昆虫の形質転換の為のものであり、非組換え集団の中に少数持ち込まれたとしても、その遺伝子頻度上昇は望めない。むしろ直ちに消滅する可能性が高い。そこで、導入遺伝子を持つ子世代が、それを持たないものを駆逐して拡張する「利己的遺伝子ベクター」を考案して試作した。予備的実験はショウジョウバエにおいてこれが機能することを示しており、実用上最も困難と思われた点に解決策を見出すことが出来た（山元）。

## 第二班成果概要

### （1）ミツバチ及びイエバエの形質転換体作出

*Mariner* 型トランスポゾン *Mos1* をイエバエ受精卵にマイクロインジェクションしたところ、その子世代のゲノム DNA から *Mos1* 配列を PCR により検出した。すなわち、*Mos1* による生殖細胞系列形質転換に世界で初めて成功した。またイエバエ *to*<sup>+</sup> 変異体の体細胞に *to*<sup>+</sup> 遺伝子を組み込んだプラスミドを注入し一過性に発現させ、複眼の色を変化させることができた。この結果を第一班にフィードバックし、*to*<sup>+</sup> をマーカーとする *Mariner* ベクターの構築の基盤を提供した。ミツバチについては形質転換に未だ成功していない（木村澄、本田）。一方形質転換法の簡便化を計るため、キイロショウジョウバエを用いてマイクロインジェクション効率の詳細な検討を加えた（上田）。

### （2）個体群サイズ縮小をもたらす導入遺伝子の特性についての理論的検討

どのような遺伝子を持った形質転換法を用いれば、非組換え体集団中に導入遺伝子を広め、かつ個体数を減少させることができるのか、コンピュータシミュレーションを行なった。最も簡便で有効な手段は、雌の雄化であり、導入遺伝子（雄化遺伝子）保有個体に生

存価の低下が全くないと仮定すると、対象となる自然集団にわずか1%の組換え体を導入するだけで、20世代後にはその集団は消滅すると予測された。この結果を第一班による性転換研究にフィードバックした。また利己的遺伝子ベクターについても同様にその作動特性をシュミレーションし、性転換（雄化）遺伝子ほどには劇的ではないが、期待通り集団中に導入遺伝子を拡散できることがわかった（松尾）。

*Mos1*因子は自律的に増殖するトランスポゾンであるため、利己的遺伝子ベクターを用いずとも集団中に広がる可能性もある。そこで *Mos1* 保有個体を、*Mos1* を持たない集団に導入した後、閉鎖環境で数世代飼育し、*Mos1* の集団内頻度を各世代調査した。その結果、*Mos1* は導入後しばらくは増加傾向を示したのち再び減少する複雑な頻度変化を示した。従ってやはり利己的遺伝子ベクターを用いて安定増加を計る必要性があると考えられる（木村澄）。

研究成果公表等の状況<課題全体>

課題名（研究代表者）：改変遺伝子導入昆虫を利用した環境調和型害虫防除法に関する基礎研究（山元大輔）

【研究成果発表等】

	原著論文による発表	左記以外の誌上発表	口頭発表	合計
国内	10 件	5 件	69 件	84 件
国外	23 (2) 件	4 (3) 件	23 件	50 (5) 件
合計	33 (2) 件	9 (3) 件	92 件	134 (5) 件

（注：既発表論文について記載し、投稿中の論文については括弧書きで記載のこと）

【特許出願等】 2 件 （国内 1件、国外1 件手続中）

【主要雑誌への研究成果発表】

Journal	Impact Factor	サイテ-マ 1	サイテ-マ 2	合計
Nature Cell Biology	?	1		1
Journal of Cell Biology	12.88	1		1
Molecular and Cellular Biology	9.866	2		2
Proceedings of the National Academy of Sciences of USA	10.26	1		1
Journal of Biological Chemistry	7.666	2		2
Molecular Biology and Evolution	4.983		1	1
Genetics	4.221	1		1
Genes to Cells	4.869	1		1
European Journal of Biochemistry	3.307	1		1
Chemistry and Physics of Lipids	1.266	1		1
Cell and Tissue Research	2.488		1	1
Archives of Insect Biochemistry and Physiology	1.28	2		2
Development Genes and Evolution	2.269	1		1
Colloids and Surfaces B: Biointerfaces	0.944	1		1
Journal of Neurogenetics	1.692	(2)		(2)
Genetica	1.699		1	1
Zoological Science	0.864	1		1
Applied Entomology and Zoology	0.495		4	4
Genes and Genetic Systems	1.206	1		1
Biochemical and Biophysical Research Communications	2.671	(1)		(1)
主要雑誌小計		17 (3)	7	24 (3)
発表論文合計		34 (4)	8 (1)	42 (5)