

公益財団法人富山第一銀行奨学財団

理事長 金岡 純二 殿

助成研究成果概要報告書

教育機関名 : 富山大学	助成金額 :	780 千円
研究代表者 : 土田 努	所属 : 大学院理工学研究部 (理学)	職位 : 准教授
研究題目 : 昆虫内部共生系を対象とした、未開の遺伝子資源および害虫防除標的探索のための遺伝子機能解析法の確立		

研究概要

創薬のシード化合物として、熱帯地域などに生息する微生物や植物が生産する生理活性物質が利用されてきた。しかし名古屋議定発効以降、海外の生物資源へのアクセスが困難になるという課題が突きつけられている。申請者はこれまでに、未開の遺伝子資源として身近に存在する“昆虫とその体内の微生物共生系”の利用を提案し、その基盤研究を推進してきた。これらの共生系に存在する特殊な代謝系をもつ微生物には、栄養価に乏しい餌上での害虫の大繁殖を可能にしたり、抗腫瘍活性等を示す生理活性物質の産生を行なうものが存在する。これらの分子機構を明らかにすることによって、共生系を標的とした害虫防除のための新規殺虫資材開発や、共生系で産生される有用物質の商業利用が可能となることが期待される。しかし昆虫-微生物共生系では、重要機能を司る遺伝子を探索・確認するための有効な手法が存在せず、その開発は喫緊の課題となっている。本課題では、内部共生のモデル生物であるアブラムシを主な対象として、その体内共生系で効率的に機能する発現ベクターの構築、および *in vivo* エレクトロポレーションを併用した体細胞トランスジェネシスの手法を開発することを目指す。具体的には、以下の2項目に全力を挙げて取り組む: 1) アブラムシで恒常的に発現する遺伝子のプロモーター領域の取得、および発現ベクターの開発、2) アブラムシに感染するウイルスを利用した発現ベクター開発。

成果要約

1) アブラムシで恒常的に発現する遺伝子のプロモーター領域の取得

これまでの解析から、Actin A3 遺伝子が内部共生器官をはじめ恒常的に高発現していることを明らかになった。しかし本遺伝子では明確なプロモーター構造が検出されなかった。そこで、Actin A3 遺伝子の転写開始点付近を中心とした領域で、数百 base ずつの配列を候補プロモーターとして8箇所を選定し、エンドウヒゲナガアブラムシに *in vivo* エレクトロポレーションを行った。各候補プロモーターによる転写活性を、蛍光実体顕微鏡により、蛍光タンパク質発現の有無、および定量リアルタイム PCR 装置を用いて評価したが、いずれのプロモーター領域にも転写活性が認められなかった。

2) アブラムシに感染するウイルスを利用した発現ベクター開発

モモアカアブラムシに感染するウイルス MpDENV を対象に、感染初期に高発現する遺伝子上流にある TATA box をもつ推定プロモーター領域を単離し、配列長の異なる5つのコンストラクトを作製した。エンドウヒゲナガアブラムシおよびモモアカアブラムシに *in vivo* エレクトロポレーションを行ない、蛍光実体顕微鏡を用いて評価を行なったところ、いずれのコンストラクトにも発現活性は認められなかった。

このように、いずれのアプローチにおいても活性を認めることができなかった。そこで、アブラムシ体内に発現コンストラクトが導入されているのかを Cy3 で標識した発現コンストラクトを用いて確認を行なった。その結果、*in vivo* エレクトロポレーション2時間後の時点では、細胞内に発現コンストラクトの存在が

確認されたが、21 時間にはコンストラクトの存在を表す蛍光がほとんど観察されなくなった。In vivo エレクトロポレーション法が確立されているアズキノメイガでは、21 時間後でも発現コンストラクトが十分に存在していることから、アブラムシでは外来性 DNA を急速に分解あるいは排除する何らかの機構が存在している可能性が示唆された。今後、コンストラクトの打ち込み量を大幅に増やす等、導入コンストラクトが残りやすいような導入方法の検討が必要である。本成果については、以下のように学会の全国大会、および国際学会で発表を行い、好評を得た。

<p>研究成果 発表状況</p>	<p>【雑誌論文、学会発表、図書、新聞掲載、作成 Web ページ、特許権等の出願・取得状況】</p> <p><u>学会発表</u> 和佐野 直也¹・杉本 貴史²・重信 秀治³・土田 努¹ (1 富山大・院・理工、2 農研機構・3 基生研) “アブラムシにおける <i>in vivo</i> electroporation 法を用いた遺伝子機能解析系構築の試み” 第 63 回 日本応用動物昆虫学会大会 (筑波大学)</p> <p><u>国際学会 (招待講演)</u> Tsutomu Tsuchida "Molecular basis and ecological relevance of symbiont-mediated body colour change in aphids" <i>UK-FRANCE Joint Meeting on Aphids</i>, Rothamsted Research, Harpenden, UK</p>		
<p>経費の 執行状況</p>	<p style="text-align: center;">区 分</p> <p>【物品費】</p> <p>【旅費】</p> <p>【謝金】</p> <p>【その他】</p> <p style="text-align: center;">合計</p>	<p style="text-align: center;">執行額 (円)</p> <p style="text-align: right;">374,660</p> <p style="text-align: right;">69,740</p> <p style="text-align: right;">330,600</p> <p style="text-align: right;">5,000</p> <p style="text-align: right;">780,000 円</p>	<p style="text-align: center;">備 考</p> <p>第 63 回 日本応用動物昆虫学会大会 参加費</p>