

研究成果報告書

【申請者氏名】

米村 真之

【所属機関】

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門
絹糸昆虫高度利用研究領域 カイコ基盤技術開発グループ 主席研究員

【研究題目】

休眠性実用品種に最適な遺伝子組換え技術の開発

【研究目的】

遺伝子組換えカイコの産業的利用を促進するため、農家飼育向け休眠性実用品種に対する遺伝子組換え技術の開発を研究目的とする。

遺伝子組換えカイコの作出は胚発生が停止しない非休眠性実験品種を用い、胚発生初期にある非休眠卵に遺伝子組換えのためのDNA溶液等を注射する手法によって行われる。非休眠性実験品種に一旦形成された遺伝子組換え形質は、休眠性実用品種との交配操作を通して遺伝子組換え実用系統へと育成される。そのため、系統育成にかかる手間や時間を必要としない手法、すなわち休眠性実用品種に遺伝子組換えを直接行う手法については、その開発がかねてから望まれてきた。

休眠性実用品種では胚発生が産卵後48時間ほどで停止し卵休眠するため、遺伝子組換え操作を行うには何らかの非休眠化処理により卵休眠を解除する必要がある。しかし、代表的な非休眠化処理である浸酸処理は、産卵24時間以降の休眠性初期胚について有効であるため、産卵後8時間までの初期胚へ実施する遺伝子組換え処理には適合しない。そこでこれまで、親世代への非休眠化処理により休眠性品種から非休眠卵を採種する対応を図り、親世代卵期における低温暗催青、親世代幼虫期・蛹期における休眠ホルモン抗体注射などの処理方法が試みられた。しかし、これらはいずれも、利用できる品種が限られる、処理の結果が安定しないなどの制約から、一般的な手法として定着しているとは言い難い。

本研究では、卵休眠を解除する薬剤その他の非休眠化処理を胚発生初期に行うことにより、休眠性であるがためこれまでは不可能であった休眠性実用品種に対する遺伝子組換えを安定的に実施するための技術開発を行う。

【研究内容及び成果】

1. ジメチルスルホキシド(DMSO)を利用した実用品種への遺伝子導入法の開発

卵休眠の解除は、一般に産卵後24時間以降の卵を塩酸で処理(浸酸処理)することによって行うことができる。しかし、遺伝子導入を目的として卵へDNAを注射する時期は産卵後8時間以内である必要があるため、どうしても浸酸処理により卵休眠の解除を行うのであれば、その時期は産卵直後からの数時間となってしまう。この場合、卵の塩酸に対する感受性の高さ、注射による物理的影響などのため、効率良い遺伝子導入は困難であった。

最近、卵巣や精子の凍結保存に使われるDMSOの卵休眠解除作用がカイコでも有効であることが報告された。DMSOは塩酸より毒性が低いことから、休眠卵への遺伝子導入に利用できるのではないかと考えられた。そこでまず、産卵直後の卵に対するDMSOの効果を調べた。

実験には人工飼料によって飼育した交雑種「ありあけ」の休眠卵を用いた。羽化した成虫を交配し、室温25℃に3~5時間置いた後、5℃の冷蔵庫に入れ、1~2日後に室温に戻し、割愛した雌をバラ種産卵台紙に乗せ、2時間放置することによって産卵させた。卵回収(採種)直後に、卵が産み付けられた台紙を数分間水道水に漬けることにより、台紙から剥がしシャーレに移した卵を、シャーレに残る水をパストゥールピペットで除いた後、100%DMSO液に浸漬し、25℃でインキュベートした。処理後は卵を水道水で良く洗い、水分を除き、乾いたシャーレに入れ、保湿したタッパウェア内に入れ、2週間25℃に放置し孵化させた。

表1 DMSO処理による「ありあけ」の孵化状況

処理時間 分	0	7.5	15	30	45	60	90	120
不受精卵数	7	8	8	8	9	13	6	17
着色卵数	281	67	18	8	5	3	143	163
催青死卵数	0	10	9	6	18	8	24	14
孵化卵数	0	71	133	94	101	115	26	48
処理卵数	288	156	168	116	133	139	199	242
孵化率 %	0.0	45.5	79.2	81.0	75.9	82.7	13.1	19.8

DMSOが卵休眠を解除する効果は処理時間が7.5分から現れ、15~60分で最も高くなり、孵化率は約80%に達した。以後は徐々に低下した(表1)。

DMSOが卵休眠を解除する作用は日本種や中国種の原種に対しても有効かどうかを調べるため、「ありあけ」と同じ手順で採種した卵に対し、その効果を調べた。「日137号」の場合、15分処理で75.7%、30分で84.5%の卵が孵化した(表2)。また、「支146号」の場合、15分で54.8%、30分で47.0%の孵化率となった(表3)。以上の結果より、産卵直後の卵をDMSOで処理することにより、多くの休眠性実用品種の休眠卵において大部分が孵化すると予想された。

表2 DMSO処理による「日137号」の孵化状況

処理時間 分	0	7.5	15	30	45	60	90	120
不受精卵数	29	17	16	7	30	18	28	22
着色卵数	78	13	0	1	1	0	5	0
催青死卵数	0	4	1	1	1	0	4	4
孵化卵数	0	55	53	49	41	48	25	13
処理卵数	107	89	70	58	73	66	62	39
孵化率 %	0.0	61.8	75.7	84.5	56.2	72.7	40.3	33.3

表3 DMSO処理による「支146号」の孵化状況

処理時間 分	0	7.5	15	30	45	60	90	120
不受精卵数	74	4	49	52	72	93	145	245
着色卵数	218	29	19	28	27	28	35	46
催青死卵数	0	17	7	18	7	11	8	7
孵化卵数	0	72	91	87	66	61	29	22
処理卵数	292	122	166	185	172	193	217	320
孵化率 %	0.0	59.0	54.8	47.0	38.4	31.6	13.4	6.9

次に、DMSOで処理した卵への注射実験を行った。接着剤でスライドグラスに固定したDMSO処理済みの「ありあけ」卵に、赤色蛍光(3xP3DsRed)又は緑色蛍光(3xP3EGFP)タンパク質遺伝子をマーカーとするベクタープラスミドの顕微注射を行ったところ、それぞれ24.3%(表4)及び30.2%(表5)の卵が孵化した。

表 4 3xP3DsRed 注射による孵化状況

供試卵	「ありあけ」DMSO処理済						
スライド番号	1	2	3	4	5	6	合計
不受精卵数	3	6	12	2	2	4	29
着色死卵数	20	20	14	39	43	43	179
催青死卵数	2	3	2	3	0	0	10
孵化卵数	23	19	20	4	3	1	70
注射卵数	48	48	48	48	48	48	288
孵化率 %	47.9	39.6	41.7	8.3	6.3	2.1	24.3

表 5 3xP3EGFP 注射による孵化状況

供試卵	「ありあけ」DMSO処理済						
スライド番号	1	2	3	4	5	6	合計
不受精卵数	5	10	9	4	9	6	43
着色死卵数	31	22	13	13	15	12	106
催青死卵数	4	7	10	6	8	17	52
孵化卵数	8	9	16	25	16	13	87
注射卵数	48	48	48	48	48	48	288
孵化率 %	16.7	18.8	33.3	52.1	33.3	27.1	30.2

また、DMSOで処理した「日137号」の卵への3xP3DsRedの注射では62.7%が孵化するという、非常に良い結果が得られた(表6)。DMSOで処理した「支146号」の卵への注射でも14.5%の孵化率が得られた(表7)。いずれも遺伝子導入実験に利用できるレベルだと判断された。

表 6 3xP3DsRed 注射による孵化状況

供試卵	「日137号」DMSO処理済						
スライド番号	1	2	3	4	5	6	合計
不受精卵数	0	3	7	2	5	4	21
着色卵数	13	17	7	7	9	9	62
催青死卵数	3	3	5	6	4	2	23
孵化卵数	30	24	28	33	30	33	178
注射卵数	46	47	47	48	48	48	284
孵化率 %	65.2	51.1	59.6	68.8	62.5	68.8	62.7

表 7 3xP3DsRed 注射による孵化状況

供試卵	「支146号」DMSO処理済						
スライド番号	1	2	3	4	5	6	合計
不受精卵数	26	23	23	26	25	22	145
着色卵数	9	14	15	14	9	10	71
催青死卵数	4	5	3	3	4	6	25
孵化卵数	8	6	7	4	9	7	41
注射卵数	47	48	48	47	47	45	282
孵化率 %	17.0	12.5	14.6	8.5	19.1	15.6	14.5

これらの実験によって孵化した幼虫を飼育し、得られた成虫を交配し、次世代の卵を採種した。得られた次世卵を浸酸し、孵化直前に蛍光顕微鏡で調べることによって、胚の単眼で蛍光を発する個体を検出し、DMSOで処理した休眠卵へのベクタープラスミドの注射による遺伝子組換え体の作出効率を調べた。

表 8 DMSO処理卵への注射による遺伝子組換えカイコの作出効率

品種名	導入遺伝子	採種 蛾区数	遺伝子組換え体 出現蛾区数(%)
ありあけ	3xP3DsRed	17	7 (41.2)
ありあけ	3xP3EGFP	12	2 (16.7)
日137号	3xP3DsRed	50	17 (34.0)
支146号	3xP3DsRed	7	3 (42.9)

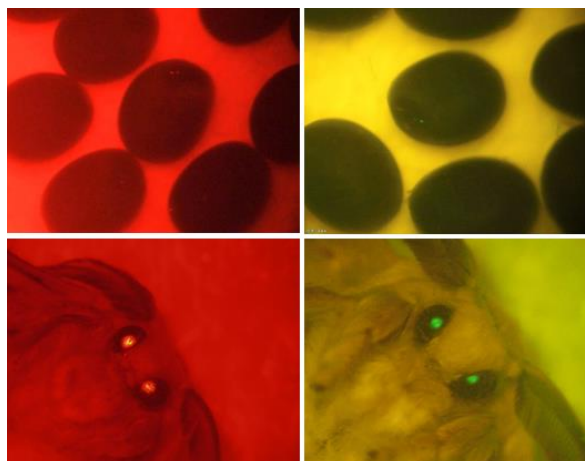


図 1 遺伝子組換えカイコの卵及び成虫における蛍光タンパク質遺伝子の発現

「ありあけ」に3xP3DsRedを注射した場合、孵化した70頭の幼虫を飼育し、得られた成虫を交配することによって17蛾区から採種され、このうち7蛾区で遺伝子組換え体が出現した。「ありあけ」の卵に3xP3EGFPを注射した場合は、87頭の幼虫が孵化し、12蛾区から採種され、このうち2蛾区で遺伝子組換え体が出現した。「日137号」の場合は50蛾区から採種され、17蛾区で遺伝子組換え体が出現した。また、「支146号」でも7蛾区から採種され、このうち3蛾区で遺伝子組換え体が出現した(表8)。得られた遺伝子組換え体の一部を飼育し系統化

して、その胚の単眼及び成虫の複眼における蛍光タンパク質遺伝子の発現状態を観察した。卵における発現は着色した漿液膜を通して観察しているため、蛍光の強度は低かった。しかし、成虫では蛍光の強度は高く、容易に判別することができた(図1)。

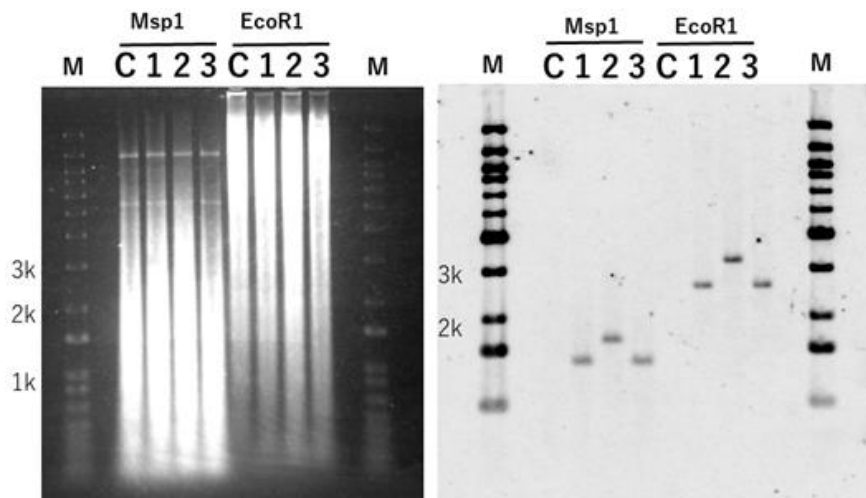


図2 3xP3DsRedを導入した遺伝子組換えカイコのサザンブロット解析
左は制限酵素Msp1又はEcoR1で切断したゲノムDNAの電気泳動図
右はサザンブロッティングの結果
Mはサイズマーカー、Cは対照、1～3は遺伝子組換え体

これらの遺伝子組換え体から抽出し制限酵素で切断したゲノムDNAを、アガロースゲル電気泳動によって分離してナイロン膜に転写し、遺伝子導入に用いたトランスポゾンpiggyBacのアームの部分配列をプローブとしてサザンブロット解析を行った。その結果、どの遺伝子組換え体から

もベクターのシグナルが検出され、注射した遺伝子はカイコゲノムに挿入されていることが証明された(図2)。

2. コロナ放電を利用した実用品種への遺伝子導入法の開発

コロナ放電による休眠卵の人工孵化については古くはイタリアで研究され、日本では明治の初期に研究報告がある。コロナ放電が卵休眠を解除する効果は高く、しかも産卵直後の卵から産卵後5日目の卵まで有効であることが分かっている。そのため、休眠卵を人工孵化させる方法としての実用化が期待されたが、浸酸法が普及したことにより、研究は途絶えた。

コロナ放電の特性を利用することにより休眠性実用品種への遺伝子導入法の開発が可能であると考えられた。そこで、コロナ放電を行うための装置を自作し(図3)、休眠性実用品種への遺伝子導入を試みた。

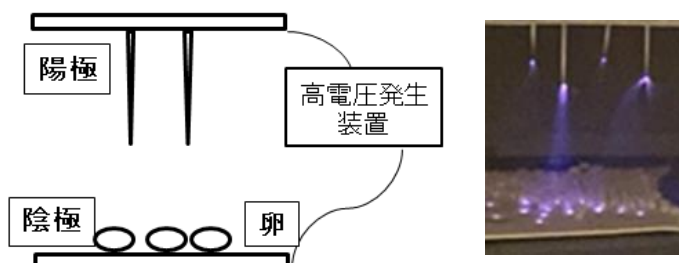


図3 コロナ放電装置の概略図(左)と放電状態(右)

表9 コロナ放電による「ありあけ」の孵化状況

処理方法	無処理	卵齢2hで放電処理
不受精卵数	0	1
着色卵数	467	0
催青死卵数	0	52
孵化卵数	0	206
処理卵数	467	259
孵化率 %	0.0	79.5

まず、交雑種「ありあけ」の休眠卵に10～15kVの電圧で5～10分のコロナ放電処理を行い、孵化率を調べたところ、無処理の卵はすべて休眠卵であり孵化する個体は見られなかったが、産卵後2時間の卵を処理した場合には79.5%の卵が孵化した。このように、自作コロナ放

電装置を使用した場合でも、コロナ放電が卵休眠を解除する効果は非常に高いことが確認された。

次に、コロナ放電を行った「ありあけ」の卵に3xP3DsRedを注射し、孵化率を調べた。その結果、注射したどのスライドからも卵は孵化し、平均20.2%の注射卵が孵化し、287個の注射卵から58頭の孵化幼虫が得られた(表10)。

表10 放電処理卵に注射した場合の孵化状況

スライド番号	1	2	3	4	5	6	合計
不受精卵数	2	4	5	6	3	2	22
着色卵数	36	35	35	30	35	35	206
催青死卵数	0	0	0	0	0	1	1
孵化卵数	10	9	7	12	10	10	58
注射卵数	48	48	47	48	48	48	287
孵化率 %	20.8	18.8	14.9	25.0	20.8	20.8	20.2

得られた孵化幼虫を人工飼料で飼育し成虫を交配して、次世代であるG1の産卵蛾区を採種した。G1卵は休眠するため、浸酸処理を行ってから催青し、卵の後期において蛍光顕微鏡によって赤色蛍光を持つ個体のスクリーニングを行った。

表11 コロナ放電による遺伝子組換えカイコの作出効率

処理方法	採種蛾区数	遺伝子組換え体出現蛾区数(%)
卵齢2hでコロナ放電処理	15	4 (26.7)

その結果、58頭の幼虫が孵化し、15蛾区から採種され、そのうち4蛾区に蛍光を発する卵が出現した(表11)。

蛍光を発する卵が出現した各蛾区におけるその頻度を表12に示した。蛍光を発する卵の数は蛾区によって異なり、1蛾区当たりで2~11頭の遺伝子組換えカイコが出現した。得られた遺伝子組換えカイコの一部は飼育し、導入した遺伝子が次世代に伝わることについて、卵・成虫の蛍光観察及びゲノムのサザンブロット解析により確認した。

表12 コロナ放電による遺伝子組換え体の出現頻度

蛾区番号	調査卵数	蛍光を発する卵数(%)
TMY25-1	211	11 (5.2)
TMY25-2	212	9 (4.2)
TMY25-3	298	7 (2.3)
TMY25-4	156	2 (1.1)

【今後の課題】

DMSOやコロナ放電を利用することにより、従来技術では回避困難であった非休眠性実験系統の産する非休眠卵への遺伝子組換えを介在させることなく、農家飼育向け実用品種に対して遺伝子組換え操作を直接行うことが可能になった。この技術開発の成功によって、絹糸の新規形質を付加された遺伝子組換え実用系統の作出を加速させる技術的下地が整った。

しかし、一般的な手法として今後普及させ、遺伝子組換えカイコを用いたバイオテクノロジー産業や蚕糸業に応用するためには多くの成功例を積み重ねていくことが大切である。特に、コロナ放電処理については安全でさらに使いやすい装置を設計し、再現性を高め、

交雑種「ありあけ」だけではなく、二化性の日本種や中国種、一化性の欧州種、突然変異系統などにも利用できることを証明する必要がある。

また、遺伝子組換えタンパク質の生産技術をさらに高度化する観点からは、例えばヒト医薬品原薬生産のように高い品質及び信頼性が求められる遺伝子組換えタンパク質の生産技術の開発が課題となるが、本研究で開発された方法はそのような研究を進めるためにも有効である。

【発表論文等】

特願2022-022288（出願日2022年2月16日）

発明の名称「休眠卵を用いた遺伝子組換えカイコの作製方法」

発明者「米村真之、田村俊樹、飯塚哲也、山田信人、酒井弘貴、小林功、内野恵郎、瀬筒秀樹」

特願2022-072682（出願日2022年4月26日）

発明の名称「休眠卵を用いた遺伝子組換えカイコの作製方法」

発明者「米村真之、田村俊樹、飯塚哲也、小島桂、山田信人、酒井弘貴、小林功、内野恵郎、瀬筒秀樹」