



Title	トランスジェニックカイコの家蚕核多角体病ウイルスに対する抵抗性
Author(s)	小島, 桂; Kojima, Katsura; 斎藤, 寛 他
Citation	北海道大学農場研究報告, 33, 9-13
Issue Date	2003-03-31
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/13462">https://hdl.handle.net/2115/13462</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	33_p9-13.pdf



## トランスジェニックカイコの家蚕核多角体病ウイルスに対する抵抗性

小島 桂<sup>1)・3)</sup>・斎藤 寛<sup>2)</sup>・山田 恭裕<sup>2)</sup>・田村 俊樹<sup>3)</sup>・磯部 良子<sup>2)</sup>・浅野 眞一郎<sup>1)</sup>・  
佐原 健<sup>1)</sup>・伴戸 久徳<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup>北海道大学大学院農学研究科応用生命科学専攻)

(<sup>2)</sup>北海道大学北方生物圏フィールド科学センター)

(<sup>3)</sup>独立行政法人農業生物資源研究所)

(2003年1月9日受理)

### 緒 言

家蚕核多角体病ウイルス(BmNPV)は養蚕現場において甚大な被害をもたらすウイルスであり<sup>1)</sup>、繭生産用のカイコ(実用系統)においてはウイルス耐病性の向上が重要な育種目標である。しかしながら、現在までに実用レベルにおいてBmNPV耐性のカイコはいかなる系統においても得られておらず、従来の育種・選抜法では核多角体病の克服は困難であると考えられる。

近年、カイコにおいてトランスジェニック技術が開発され<sup>2)</sup>、カイコをタンパク質の生産工場として利用する研究が脚光を浴びている。この技術は、遺伝子導入や遺伝子抑制によるカイコの遺伝的解析に利用が可能であると共に、カイコ本来の生産物である絹タンパク質の品質向上や強健性、耐病性に優れるトランスジェニックカイコの作出に有効であると考えられる。

特定の遺伝子発現を抑制する方法としては、アンチセンスRNA(asRNA)、二本鎖RNA(dsRNA)、リボザイムおよびDNAザイムの利用が挙げられる<sup>3)</sup>。特に、同じ塩基配列を持つmRNAを分解し、転写後遺伝子サイレンシング(PTGS)を引き起こすことが知られているdsRNAの効果はRANインターフェアランス(RNAi)と呼ばれ、動物、植物、線虫、原核生物など広範な生物に有効である<sup>4)</sup>。

本研究では、家蚕核多角体病ウイルス必須遺伝子に対するdsRNAならびに欠失遺伝子を導入し、これらトランスジェニックカイコの本ウイル

スに対する耐病性試験を実施した。

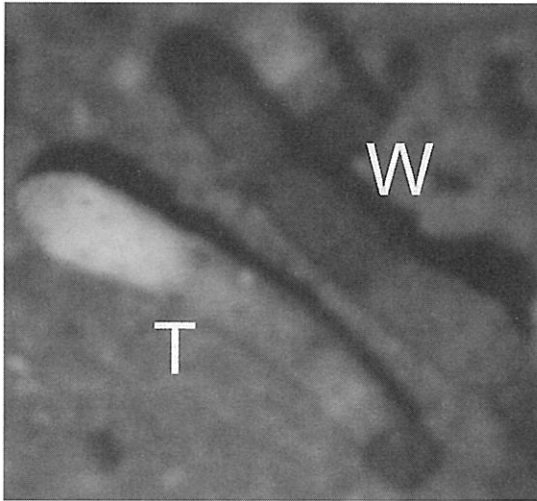
### 材料および方法

#### トランスジェニックカイコの作出

家蚕核多角体病ウイルス遺伝子のうち、*helicase*と*lef 1*の配列数百bpとそれよりも数十bp長い逆位繰り返し配列を持つ発現プラスミドをIsobe *et al*<sup>5)</sup>の方法に従って作成し、短いループを持つdsRNAが転写されるよう設計した。また、*ie1*遺伝子のアンタゴニストであるIE1TN<sup>6)</sup>と上記dsRNAをTamura *et al*<sup>2)</sup>の方法によりカイコに導入して、それぞれIE1TN、ds-Lef1およびds-helと名付けたトランスジェニック個体を得た。導入個体間の交配により次代蚕(G1)を獲得し、導入遺伝子がゲノムDNAに組み込まれたかどうかをGFPマーカーによりスクリーニングした<sup>2)</sup>。トランスジェニックカイコはw-1系統と交配し(G2)、これらを耐病性試験に用いた。故に、試験区のカイコはGFPマーカーを持つ組換え体と非組換え体が混在する(第1図)。

#### 耐病性試験

耐病性試験には1蛾育区から組換え、非組換え個体をランダムに30個体、また、対照区としてw-1系統から30個体抽出し、2齢1日目に総量で $3 \times 10^6$ 個のウイルス多核体(1個体あたり $10^5$ 個)を添食した。添食用の飼料は半日以内に食下される量を与え、以後は通常通り26℃にて人工飼料を与えて、4齢期までは死亡個体を放置したままの飼育ケースを使用した劣悪環境で飼育し(第2図

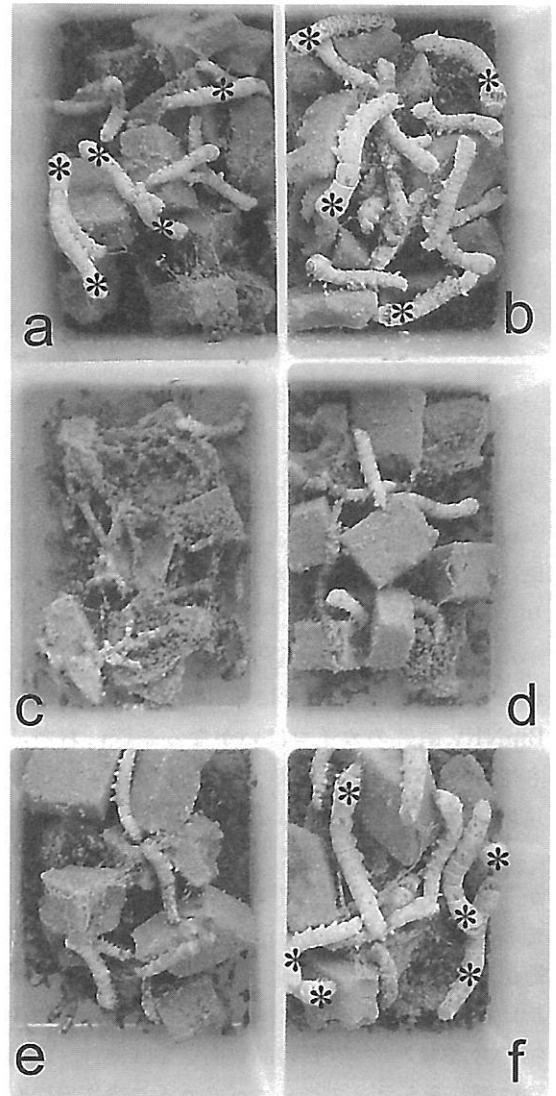


第1図 組換え体カイコ(T)と非組換え体カイコ(W)。組換え体カイコは蛍光顕微鏡下でGFPにより緑色蛍光を放つ。

参照), 5 齢期にて生存個体をウイルスフリーの飼育ケースに移して飼育を継続した。3 齢, 4 齢および 5 齢起蚕時に生存数と生存するカイコの GFP マーカーによる組換え, 非組換えの判定を行った。それらの判定には GFP 検出用フィルター (GFP2) を備えた蛍光顕微鏡 (MZFLIII, Leica) を用いた。

### 結果と考察

第1表に孵化時における GFP 発色個体 (トランスジェニック: 第1図参照) 率, 各齢におけるウイルス添食後のトランスジェニック, 非トランスジェニック個体別の生存数を示した。核多角体病ウイルスの耐病性試験に用いた G2 には必ず GFP マーカーを持つ個体が存在し, ほとんどの区において GFP ポジティブは約 50% を占めたことから, 導入遺された遺伝子数が 1 個であると考えられる。また, GFP 個体が 75% であった 3 区には G1 に座位の異なる 2 遺伝子導入があった可能性が高い。Helicase の dsRNA を転写するトランスジェニック 3 区中, 2 区では GFP 個体が約 25% となった。また, 孵化率が非常に低く耐病性実験に使用できない区も 2 区存在した。これはカイコにおいても相同遺伝子が必須な遺伝子群に属す



第2図 ウイルス添食後 8 日目における耐病性試験区の状況。a: IE1TN-6; b: ds-Lef1-7; c: IE1TN-2; d: ds-Lef1-2; e: IE1TN-1; f: ds-hel-1; \*: 死亡個体が多数存在したまま, 4 齢に到達したカイコ。

るため, この dsRNA が孵化に悪影響を与えた結果であると推察される。

家蚕核多角体病ウイルスに対する耐性試験において, 対照区の w-1 区 (非トランスジェニックカイコ) はすべての個体が 3 齢になることなく死亡した (Table 1 生存個体の列)。これに対し 3 種類のトランスジェニックカイコ区では 3 齢まで到達する個体を有する区が存在した (Fig. 2)。これら

第1表 トランスジェニック区における組換え体の割合ならびに耐病性試験成績

実験区名	個体数	組換え体 <sup>1</sup> (%)	生存個体					
			3 齢起蚕 <sup>2</sup>		4 齢起蚕 <sup>4</sup>	5 齢起蚕 <sup>4</sup>	蛹 <sup>4</sup>	成虫 <sup>4</sup>
			T <sup>2</sup>	- <sup>3</sup>				
ds-hel-1	30	25	6	0	5	1	0	0
ds-hel-2	30	25	0	0	0	0	0	0
ds-hel-3	30	50	0	0	0	0	0	0
ds-Lef1-1	30	75	1	1	0	0	0	0
ds-Lef1-2	30	50	0	0	0	0	0	0
ds-Lef1-3	30	50	4	1	1	0	0	0
ds-Lef1-4	30	25	0	0	0	0	0	0
ds-Lef1-5	30	50	6	3	0	0	0	0
ds-Lef1-6	30	50	19	0	7	4	2	2
ds-Lef1-7	30	50	8	0	4	1	0	0
ds-Lef1-8	30	50	3	0	0	0	0	0
ds-Lef1-9	30	50	2	2	0	0	0	0
IE1TN-1	30	50	0	0	0	0	0	0
IE1TN-2	30	50	0	0	0	0	0	0
IE1TN-3	30	75	0	0	0	0	0	0
IE1TN-4	30	50	1	0	1	1	0	0
IE1TN-5	30	50	5	1	0	0	0	0
IE1TN-6	30	50	5	2	5	0	0	0
IE1TN-7	30	75	5	1	5	0	0	0
IE1TN-8	30	50	4	6	4	0	0	0
対照区(w-1)	30	0	0	0	0	0	0	0

<sup>1</sup> 孵化時における GFP 発色個体のおよその割合。

<sup>2</sup> T：トランスジェニックカイコ。

<sup>3</sup> -：非トランスジェニックカイコ。

<sup>4</sup> 4 齢起蚕以降の生存個体は全てトランスジェニックカイコ (T) である

は全てもしくはその大部分が GFP マーカーを有するトランスジェニック個体であったが、非トランスジェニック個体 (非 GFP 個体) も含まれた。しかしながら、4 齢以降まで生存できたのはトランスジェニック個体に限られた。*Helicase* 遺伝子をターゲットとしたトランスジェニック (ds-hel) 区では 3 区中で 1 区において 6 個体の 3 齢到達個体の出現が認められ、何れもトランスジェニック個体であった。このうち、5 個体が 4 齢に、1 個体が 5 齢に達したものの化蛹した個体は存在しなかった。*Lef1* をターゲットとしたトランスジェニック (ds-Lef1) 区では 9 区中 7 区において 3 齢到達個体の出現が認められ、少数の非トランスジェニック個体が混在した。4 齢到達区は 1/3 の区に

認められ、何れもトランスジェニック個体であるという ds-hel 区と同様の結果であった。このうち 2 区に 5 齢到達個体が出現し、1 区 2 個体が成虫に達した。IE1TN を用いたトランスジェニックにおける耐病性試験結果は、3 齢到達個体については、ds-lef1 区に類似しており、その後の結果は成虫に達した個体が存在しない点を含めて ds-hel 区に類似していた。

これらの結果は双方の dsRNA と IE1TN トランスジェニック区において対照区に比べ明らかなウイルス耐性効果を示している。つまり、RNAi および機能部位欠失アンタゴニストの何れの戦略を用いてもウイルス必須遺伝子を抑制するトランスジェニックカイコが家蚕核多角対病ウイルスへの

耐病性増強に効果を発揮すると考えられる。一方、トランスジェニック区であるにも関わらず全く効果が認められなかった区が存在することも事実である。本研究のトランスジェニック作出にはゲノム中に広範に存在する TA 配列をターゲットとして挿入するレトロトランスポゾン (*piggyBac*) を用いており<sup>2</sup>、遺伝子は必ずしも同一部位に挿入されるとは限らない。遺伝子の発現効率プロモータの種類のみならず、どの染色体のどこに座上するかにより大きく左右されるという位置効果が知られている<sup>7</sup>。G1 トランスジェニック個体で挿入部位が異なるならば、位置効果により本実験の結果のように耐病性に大きな差が生ずることが考えられる。

ds-Lef1 ならびに IE1TN における 3 齢到達個体に非トランスジェニック個体が混在する区があったのは、耐性を獲得したトランスジェニックカイコの存在が、その区でのウイルス増殖をある程度低く押さえた結果である可能性が考えられる。また、非常に低いながらも、添食時を含めた 2 齢期間中にウイルス摂食の機会がなかったという可能性があげられる。4 齢到達個体に非トランスジェニック個体は全く存在しなかったことから、後者の可能性が事実であったとしても、対照区に比べトランスジェニックカイコは本ウイルスに対する耐病性効果が高いことは否めない。

本研究の結果は、家蚕核多角体病ウイルス耐性カイコの作製へ向けたトランスジェニックカイコの利用が可能であることと、その戦略が正しいことを裏付けるものである。耐病性試験から 2 個体の成虫が獲られたことは、これら個体を素材とした本ウイルス耐病性カイコの育種に道を拓いたと考えることも可能であろう。しかしながら、本研究の耐病性試験でわずか 2 個体しか成虫が得られなかった事実は、本研究の目標とする実用レベルでの BmNPV 耐性カイコの作成には、さらなる検討が必要であると考えられる。

## 摘 要

家蚕核多核体病ウイルス(BmNPV)必須遺伝をターゲットとする 3 種類のトランスジェニックカイコを作製し、ウイルス耐病性試験を行った。2 種類の dsRNA ならびに機能領域欠失アンタゴニスト何れのトランスジェニックカイコでもウイルス抵抗性は向上した。しかしながら、成虫に達した個体は非常に少なく実用に供するためには改良の余地があると考えられる。

## 引用文献

1. Kawase, S. In: Virus and Insects, J. Japan. Chem. Monograph Series, 12. Nankodo press, Tokyo, pp. 1-11.
2. Tamura, T., Thibert, C., Royer, C., Kanda, T., Abraham, E., Kamba, M., Komoto, N., Thomas, J. L., Mauchamp, B., Chavancy, G., Shirk, P., Fraster, M., Prudhomme, J. C. and Couble, P.: Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori*. *Nature Biotech.* 18: 81-84. 2000.
3. Jen, K. Y. and Gewirtz, A. M.: Suppression of gene expression by targeted disruption of messenger RNA: available options and current strategies. *Stem. Cells*, 18: 307-319. 2000.
4. Hammond, S. M., Berstein, E., Beach, D. and Hannon G. J.: An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 404: 293-296. 2000.
5. Isobe, R., Kojima, K., Sahara, K., Asano, S. and Bando, H.: Antisense and double-strand RNA interference in a silkworm ovarian cell line. *J. Insect Biotech. Seric.* 71: 43-47. 2002.
6. Yamada, Y., Matsuyama, T., Quan, G. -X., Kanda, T., Tamura, T., Sahara, K., Asano, S. and Bando, H.: Use of an N-terminal half truncated IE 1 as an antagonist of IE 1, an essential regulatory protein in baculovirus. *Virus Res.* 90: 253-261. 2002
7. Kelley, K.A., Friedrich, V.L. Jr., Sonshine, A., Hu, Y., Lax, J., Li, J., Drinkwater, D., Dressler, H. and Herrup, K.: Expression of Thy-1/lacZ fusion genes in the CNS of transgenic mice. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* 24: 261-274 1994.

## Resistance of transgenic silkworm against *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV)

Katsura KOJIMA<sup>1)·3)</sup>, Hiroshi SAITOH<sup>2)</sup>, Yasuhiro YAMADA<sup>2)</sup>,  
Toshiki TAMURA<sup>3)</sup>, Ryoko ISOBE<sup>1)</sup>, Shin-ichiro ASANO<sup>1)</sup>,  
Ken SAHARA<sup>1)</sup> and Hisanori BANDO<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Division of Applied Bioscience, Graduate School of Agriculture,  
Hokkaido University, Sapporo 060-8589, Japan)

<sup>2)</sup>Experimental farm, Field Science Center of Northern Biosphere,  
Hokkaido University, Sapporo 060-0811, Japan)

<sup>3)</sup>Insect Gene Engineering Laboratory, National Institute of Agrobiological Sciences,  
Tsukuba, 305-8634, Japan)

(Received January 9, 2003)

### Summary

Transgenic silkworms possessing artificial anti-viral genes were constructed using a transposon, *piggyBac*, system and subjected to test for their resistance to *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV). Silkworms inoculated with BmNPV at the 1st day of the 2nd instar larvae survived till 4th instar larvae, and all of them were found to be transgenic silkworms. Though apparent BmNPV-resistance increased in the transgenic silkworms, further improvement of the resistance was required for practical use.

