

## 茗原眞路子研究奨励助成金報告書

報告日 2022 年 12 月 28 日

採択年度 2021 年度

所属 自然科学研究機構 基礎生物学研究所 進化ゲノミクス研究室

(英文 National Institutes of Natural Sciences, National Institute for Basic Biology, Laboratory of Evolutionary Genomics)

氏名 依田 真一 (英文 Shinichi Yoda )

研究課題名 アブラムシの細胞内共生を可視化するライブイメージング技術の開発  
(英文 Development of live imaging methods to visualize intracellular symbiosis in pea aphids)

### 1. 研究報告

アブラムシの細胞内共生を可視化するライブイメージング技術の開発を目指し、遺伝子導入の直接的証拠として全身で蛍光を発するアブラムシの作出を試みた。アブラムシ胚で高活性をもつ 2 種類のプロモーターを *in vivo* ルシフェラーゼアッセイから特定し、各プロモーターを *piggyBac* の donor プラスミドにある蛍光タンパク質上流に組み込んだ。一方、アブラムシの後胚発生でプロモーター活性を評価するには 3 ヶ月の胚休眠を待つ必要があるため、アブラムシに先立ってより簡便な系としてカイコ幼虫で検討した。donor とトランスポゼース (PBase) をコードする helper プラスミドを *in vivo* electroporation 法により幼虫皮膚に共導入すると、プロモーターの一方は微弱な GFP 蛍光を示し、もう一方は heterologous な系にも関わらず、真皮・脂肪・筋・神経などさまざまな組織で明瞭な GFP 蛍光を示し、後胚発生でも強いプロモーター活性をもつ可能性が強く示唆された。アブラムシ胚へのプラスミド導入には以下の 4 つの条件を検討した: (a) helper として PBase または改変型の hyperactive PBase を使用、(b) helper をプラスミド DNA または mRNA として注入、(c) 予想されるゲノムへの挿入領域が最大 8 kb から最小 4 kb までの数種類の donor プラスミドを注入、(d) donor と helper を最大 1000 ng/ $\mu$ L から最小 250 ng/ $\mu$ L までの数種類の濃度で注入。合計 2,000 を越えるアブラムシ卵にプラスミドをインジェクションしたが、これまでのところ GFP 蛍光を示す G0 個体や次世代は得られていない。今後は helper をタンパク質として注入するほか、*piggyBac* による donor の切断ステップ・挿入ステップのどこかに問題がある可能性についても検証する。さらに、*piggyBac* の代替として CRISPR-Cas9 によるノックインについて検討する。

## 2. 実績報告

(学会発表、論文発表、図書についてお書きください)

[論文発表] Komata S, Yoda S, KonDo Y, Shinozaki S, Tamai K, Fujiwara H. (2022) Functional unit of supergene in female-limited Batesian mimicry of *Papilio polytes*. *Genetics*, iyac177, <https://doi.org/10.1093/genetics/iyac177>.

[学会発表] 依田真一 アブラムシの細胞内共生を可視化するライブイメージング技術の開発 日本動物学会 2021 年大会 (招待講演)

## 3. 収支報告

助成額： (単位 円)

支出内訳

設備備品	消耗品	旅費	人件費	その他	合計
	387,274			112,726	500,000