

## 論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻  
平成 27 年度博士課程進学  
氏名 工藤愛弓  
指導教員名 松尾隆嗣

論文題目 テナガショウジョウバエにおける遺伝子導入システムの確立

昆虫は多様な形質を有しているため、生物の形質がどのように進化し維持されてきたのかを研究するのに適した生物であり、中には産業的に利用価値が高い種もいる。一方、農作物を加害したり病原菌を媒介したり、あるいは侵略的外来種として在来種と競合する“害虫”としての側面を有する種もいる。このような害虫としての側面を制御し、昆虫を有益に利用するには、各形質の遺伝学的なメカニズムの理解を欠かすことはできない。そして、そのためには遺伝子进行操作する技術が必要である。

これまで非モデル昆虫では、RNA 干渉による遺伝子の発現抑制 (Knock Down) が主に行われてきた。RNA 干渉は、迅速に効果を得られるという利点がある一方、再現性が不十分であること、系統を確立できないこと、オフターゲット効果を制御できないことといった欠点がある。その上、元からある遺伝子 (の機能) に操作を加えるだけでなく、オプトジェネティクスなどの高度な遺伝学的ツールを利用するには、機能欠損型の遺伝子操作ではなく、遺伝子を導入する技術が必要になる。さらに、次世代シーケンサーの登場によって、標的とする遺伝子の配列情報を低コストで迅速に得られるようになったことで、非モデル昆虫でも今後遺伝子導入技術の重要性はさらに高まると考えられる。

遺伝子導入技術の内、非モデル種でも比較的多くの種で利用されてきたのがトランスポゾンであり、細胞分裂前の初期胚にマイクロインジェクションを行えば、系統を確立することも可能である。しかしながら、トランスポゼースはゲノム上の短い (2~4bp 程度の) 塩基配列ヘランダムに外来遺伝子を組み込むため、ポジション効果 (ゲノム上の位置によっ

て、異なる発現制御を受けること)を制御できないという欠点があり、遺伝子の精密な機能解析には適さない。これに対して、ゲノム編集技術を用いるとターゲットとして予め選定したゲノム上の部位に遺伝子を組み込むことができるため、ポジション効果を制御することができる。ゲノム編集技術の中でも CRISPR/Cas9 システムはターゲット配列を指定するためのガイドの設計が簡単なので幅広い生物で利用されており、もちろん非モデル種でも利用できる。ただし、CRISPR/Cas9 システムにも欠点があり、今日発生学や行動生物学で用いられるような大きなサイズの外来遺伝子を効率よく導入することは難しい。

ポジション効果を制御し、かつ大きなサイズの外来遺伝子を効率よく導入するために利用できる技術が *phiC31/attP* システムである。このシステムでは、*phiC31* インテグレースが宿主ゲノム上の *attP* 配列とプラスミドベクター上の *attB* 配列を組み替えることによって外来遺伝子を導入する。*phiC31* インテグレースが組み込み時にターゲットとする *attP* 配列は 39bp もあり特異性が高いことに加え、組み込むことのできる遺伝子サイズに上限がなく、組み込み効率が非常に高い。遺伝子導入効率が非常に高いということは、扱う研究者が少ない非モデル種において扱いやすさにもつながるだろう。キイロショウジョウバエにおいては、*attP* 配列のゲノムへの導入と各 *attP* 系統の特性（ポジション効果や挿入位置など）の同定によって、精度の高い遺伝子導入や GAL4/UAS バイナリシステムを用いた部位・時期特異的な遺伝子の発現制御が可能になった。

*phiC31/attP* システムを用いた遺伝子導入は、2段階のプロセスによって構成されている。第1段階では、*piggyBac* トランスポゾンを用いた形質転換によって *attP* 配列をマーカー遺伝子とともにゲノム内に組み込み、第2段階の *phiC31* インテグレースを用いた外来遺伝子の導入に利用する。*phiC31/attP* システムは2段階の工程を経るため、初めにこのシステムを導入する時の手間はかかるものの、①適当な *attP* 挿入システムを用いれば遺伝子の導入効率が高い、②組み込める遺伝子サイズに上限がない、③同じ *attP* 挿入システムを用いれば組み込み位置を揃えられてポジション効果を一定にできる、④一度確立した *attP* 挿入システムは繰り返し利用できるという利点がある。

私が研究対象としているテナガショウジョウバエは、オスのみが太く長く発達した前脚を有するという形態的な特徴だけでなく、行動形質にも近縁種にはない興味深い特徴があ

る。これまでにテナガショウジョウバエの特徴的な行動形質の遺伝学的基盤を明らかにするために2つの研究が行われてきた。1つは、オスのみが近縁種と比べて高い闘争性をもつことに着目した研究で、近縁種との間で脳内トランスクリプトームを比較することで、テナガショウジョウバエのオスだけで発現量が増加する遺伝子を見つけた。もう1つは、メスの交尾受容性が系統間で大きく異なることに着目し、交尾受容性が高い系統と低い系統との掛け合わせによるイントログレッション系統の確立とイントログレッション領域の特定を行うことで、交尾受容性の制御に関わる可能性のある476の遺伝子が同定された。以上に加えて、行動に特徴のある3系統は、HiSeqを用いた解析によって全ゲノム配列がほぼ解読されている。以上のように、順遺伝学的な解析によって行動を制御する遺伝子の候補が見つかってきており、これらの遺伝子の機能を確かめるための逆遺伝学的手法の導入が火急の課題となっていた。そこで本研究で、*phiC31/attP* システムを用いた遺伝子導入システムをテナガショウジョウバエに導入することで、今後逆遺伝学的な解析を精確かつ迅速に行うことができるシステムの確立を目指した。

#### 1. *piggyBac* トランスポゼースを用いた遺伝子導入

遺伝子導入に用いられるトランスポゾンはいくつもの種類が知られている。トランスポゾンの中でも特に宿主範囲が広いのが *piggyBac* であり、酵母から哺乳類細胞まで幅広い分類群で利用されている。トランスポゾンを用いた形質転換では一度挿入した部位から再転移する *hit & run* 現象が起こりうるが、*piggyBac* は再転移する際に組み込んだ遺伝子を痕跡なく抜き取るという特性を持っているため変異源となる心配がないという利点を有する。そこで、まずは *piggyBac* を用いた遺伝子導入をテナガショウジョウバエでも利用できるか確かめるとともに、*phiC31* インテグラーゼが認識する *attP* 配列を組み込むことを目的とした。

*piggyBac* トランスポゼース mRNA とベクターDNA を *vermillion* 系統の初期胚にマイクロインジェクションした。ベクター濃度を変えて2つの実験を行ったが、どちらの濃度でも孵化率と羽化率はおよそ50%であり、成虫の3分の2から次世代を得ることができた。次世代が得られたG0世代の成虫を母数にした場合、ベクター濃度が高い方の形質転換効率は

低い方の 2 倍以上であった。各形質転換体は掛け合わせによってホモ接合化を行い、結果として 37 の *attP* 挿入系統を得ることができた。

## 2. *phiC31/attP* システムを用いた遺伝子導入

*piggyBac* を用いた遺伝子導入とその後の掛け合わせによって確立した *attP* 挿入系統に対して、*phiC31* インテグレースを用いて遺伝子導入を行った。今後行う実験の手間を省くためにキイロショウジョウバエ用に作製されたプラスミドベクターを利用したいのでキイロショウジョウバエの *vermilion*<sup>+</sup> 遺伝子によって、*vermilion* 変異体の眼の色が野生型に復帰するか確かめたい。また、遺伝子導入には少なからず手間がかかるため今後有用になる遺伝子を導入したいと考え、生殖細胞特異的に Cas9 タンパク質を発現する *nosP-Cas9* を含むコンストラクトである *pBFv-nosP-Cas9* (Kondo & Ueda, 2013) を選んだ。各 *attP* 挿入系統について 200 個程度の初期胚にベクターDNA と *phiC31* インテグレース mRNA をマイクロインジェクションした。結果として、次世代が得られた G0 世代の成虫を母数にした場合に遺伝子導入効率が 3% を超える系統が 1 つ、2% を超える系統を 8 つ得ることができた。これらの系統は、今後効率よく遺伝子導入を行う上で非常に有用になるといえる。

本研究では、テナガショウジョウバエにおいて高い精度で高効率に遺伝子操作を行うために *phiC31/attP* システムの導入することができた。これにより、オプトジェネティクス、カルシウムイメージングなどを用いて、テナガショウジョウバエの特徴的な形態や闘争・求愛行動を解析することが可能になった。また、非モデル種での遺伝子操作では、採卵を効率よく行うことやマイクロインジェクションそのものによる死亡率をいかに下げることができるかが非常に重要である。本研究ではマイクロインジェクションに関わる諸技術を工夫することによって、効率よくマイクロインジェクションを行うことができるようになった。