

博 士 論 文

テナガシヨウジヨウバエにおける
遺伝子導入システムの確立

工藤愛弓

目次

	ページ
第1章 序論	
1-1. 昆虫科学における遺伝子導入システムの必要性	1
1-2. 昆虫における遺伝子導入技術	3
1-3. インテグレーションを用いた部位特異的な遺伝子導入	5
1-4. <i>phiC31/attP</i> システム	6
1-5. テナガショウジョウバエ	10
1-6. 本論文の構成	12
第2章 テナガショウジョウバエにおける <i>piggyBac</i> トランスポゼースを用いた遺伝子導入	
2-1. 緒言	19
2-2. 材料および方法	21
2-3. 結果	25
2-4. 考察	26
第3章 テナガショウジョウバエにおける <i>phiC31/attP</i> システムを用いた部位特異的な遺伝子導入	
3-1. 緒言	39
3-2. 材料および方法	41
3-3. 結果	43
3-4. 考察	44
第4章 総合考察	
4-1. テナガショウジョウバエにおけるマイクロインジェクション方法の確立	51
4-2. <i>phiC31/attP</i> システムの利用	53
4-3. 今後の展望	55
付章 プロトコル	
A. <i>piggyBac</i> トランスポゼースを用いた遺伝子導入	59
B. <i>phiC31/attP</i> システムを用いた部位特異的な遺伝子導入	83
謝辞	94
引用文献	95

第 1 章 序論

1-1. 昆虫科学における遺伝子導入システムの必要性

昆虫（Insecta：六脚綱）は地球上でもっとも種数の多い分類群である．現在までにおよそ 100 万種が記載され，未記載種を含めると 250 万から 3000 万種も存在すると見積もられている（Starr, 2017）．昆虫がこれほどまでに多くの種に分化できたのは，海から高山に至るまで様々な環境に適応する過程で多様な形質を獲得してきたためであろう．多様な形質を有する昆虫を用いた解析は，生物の形質がどのように進化し，維持されてきたのかについての我々の理解を深めるのに役立つ．また，昆虫の中にはカイコ（絹，製薬），ハナバチ（蜂蜜，蜜蝋，花粉媒介），一部のカイガラムシ（天然色素，蝋）など産業に利用される種やイナゴやカワゲラなど食用とされる種，クサカゲロウやテントウムシなど農業天敵として利用される種など有益なものがある．一方で，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したりする昆虫も存在する．害虫としての側面を制御し，有益に昆虫を利用するにはそれぞれの形質を行動生態学的に理解するだけでは不十分であり，遺伝学的なメカニズムの理解を欠かすことはできない．

形質と遺伝子とを結びつけるために取られる手法は，大きく分けて 2 つある．1 つは，ある表現型（突然変異や種内・種間変異）に着目し，その原因となる遺伝子を明らかにすることを目的とした順遺伝学的解析（Forward genetics）である．もう 1 つは，ある遺伝子に着目し，その遺伝子に人為的な操作を加えることで表現型にどのような影響があるかを調べる逆遺伝学的解析（Reverse genetics）である．これらの解析手法は，形質と遺伝子との関係性を明らかにするという点で目的を一にするものの，研究の始発点と終着点が正反対のアプローチである．これまで，“モデル種”であるキイロショウジョウバエでは両方の手法が用いられてきた．例えば，キイロショウジョウバエの全ゲノムは 2000 年に解読されてから年々アップデートされ，現在では 17737 個の遺伝子をコー

ドしていることが明らかになっている (Adams et al., 2000; Gramates et al., 2017). また、遺伝子機能を調べるための遺伝子 Knock Down/Out/In 技術に加えて、精密な遺伝子操作技術も様々なものが開発されている (Bassett & Liu, 2014; Venken & Bellen, 2014). その一方で、モデル種以外のほとんどの昆虫では遺伝学的な解析を行うのは困難なままである.

非モデル昆虫の中にはモデル種には見られない、風変わりな形態や驚くべき行動を有しているものがある. そのように興味深い特徴を有する非モデル昆虫は行動生態学の分野で活用されてきたものの、ゲノムが解読されていないために遺伝学的な操作を行うにあたっては、標的とした遺伝子の配列情報を容易に獲得できないという問題点があった. 今日、次世代シーケンサーの普及に伴い、大規模な塩基解析にかかるコストや労力が減少したことで、非モデル昆虫においても網羅的な遺伝子解析を行うことが可能になった (Ekblom & Galindo, 2011). つまり、順遺伝学的な解析手法の躍進によって、非モデル昆虫においても特定の形質を制御する遺伝子を解明するための環境が整いつつある. しかしながら、それらの候補の中から偽陽性の遺伝子を排除したり、どの程度形質に寄与しているかを調べたりするための逆遺伝学的な解析手法の導入は、現在に至っても達成されていない種がほとんどである.

非モデル昆虫において遺伝子の機能を解析するために用いられている主要な技術は、RNA 干渉 (RNA interference : RNAi) である (Kola et al., 2015). RNA 干渉は、1998 年に Fire と Mello のグループによって発見された現象で、siRNA (short/small interfering RNA) もしくは比較的長い二本鎖 RNA によって配列特異的に mRNA の発現を抑制する (Fire et al., 1998). 開発当初の研究において、初期胚へのマイクロインジェクションでは幼虫期以降まで効果が持続しないことが問題であったが、幼虫へのマイクロインジェクションや給餌・浸漬による二本鎖 RNA の導入が可能になったことで各発育段階で RNA 干渉を行えるようになり、次第に多くの昆虫で利用されるようになった (Tomoyasu & Denell, 2004; Baum et al., 2007; Mao et al., 2007). RNA 干渉の特徴は、遺伝子 Knock Out

とは異なり、遺伝子の機能を完全には喪失させない点である。このことは、生存に重篤な影響を与えるような遺伝子であっても解析できるという利点になる反面、その不完全性によって、効果が小さかったり再現性を十分に得られなかったりという欠点にもつながる。また、RNA 干渉による遺伝子の発現抑制効果は、ほとんどの生物で次世代へと受け継がれないため、系統を確立して維持することはできない。以上に加えて、RNA 干渉を用いた遺伝子機能解析の最も重要な欠点は、オフターゲット効果を制御できないことである。RNA 干渉におけるオフターゲット効果とは、ターゲット配列との類似性によって無関係な mRNA を認識し、機能を抑制してしまうことである。オフターゲット効果を受けたかどうかは視認できない上、オフターゲットとなりうる配列がゲノム上に存在しているかどうかは全ゲノムが解読されている種でなければ確認することが難しい。

1-2. 昆虫における遺伝子導入技術

RNA 干渉のように mRNA を介した間接的な遺伝子の制御ではなく、遺伝子そのものを改変する方法のうち、非モデル昆虫でも比較的簡単に利用できるのがトランスポゾンを用いた形質転換法である。トランスポゾンとは、ゲノム上を自律的に移動する能力を持つ因子であり、1950 年頃に McClintock によって発見された (McClintock, 1950)。トランスポゾンを用いた形質転換では末端反復配列 (Terminal Inverted Repeats : TIRs) を認識して、切り出しと組み込みを行うトランスポゼースを利用することで遺伝子をゲノム内に組み込むことができる。トランスポゾンの中には、キイロショウジョウバエでよく利用される *P-element* のように限られた種でしか移動活性のない種類がある一方、種を問わず利用できる *piggyBac* や *Minos* などもあるため、非モデル昆虫でも形質転換を行うことができる (表 1-1 ; Handler et al., 1993 ; Pavlopoulos et al., 2007 ; Nakamura et al., 2010 ; Warren et al., 2010 ; Fraser, 2012 ; Handler & O'Brochta, 2012 ; Liu et al., 2012 ; Schetelig & Handler, 2013 ; Beaudette et al., 2014 ; Yusa, 2015)。加え

て、細胞分裂前の初期胚にマイクロインジェクションを行うことで次世代にも形質転換の効果を受け継がせることができ、系統を確立することも可能である。それにもかかわらず、トランスポゾンを用いた形質転換法は遺伝子の機能を精確に調べたい場合には、最適な方法であるとは言えない。なぜなら、外来遺伝子は周囲のゲノム環境によって異なる発現制御を受けるため(ポジション効果)、トランスポゾンによってランダムな部位に組み込まれてしまう場合にはこの効果を制御できないからである(図 1-1B)。また、遺伝子の内部に転移し、無関係な遺伝子を破壊してしまう可能性さえある(図 1-1C; Li et al., 2013)。

ZFNs や TALEN, CRISPR/Cas9 といったゲノム編集技術を用いると、ターゲットとしてあらかじめ選定したゲノム上の部位に対して任意の配列を組み込んだり破壊したりすることが可能になり、トランスポゾンを用いた形質転換では制御できなかったポジション効果の問題を解決できる (Salsman & Delloire, 2017)。中でも、2012 年に登場した 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 (sgRNA) の設計が非常に簡単であったため、幅広い生物種で利用される汎用的な技術となった (Jinek et al., 2012; Wang et al., 2013; Momose & Concordet, 2016; Krappmann, 2017; Tanning et al., 2017)。ゲノム編集技術はポジション効果を制御できないトランスポゾンに比べて、遺伝子の機能を精確に解析する上で優れた技術だといえるが、それでもなお、発生学や行動生物学の分野で遺伝的な解析に用いるには不十分な点が残されている

(表 1-2)。まず、組み込むことができる遺伝子サイズに上限があるという難点がある。初期の研究で用いられていた単純なマーカー遺伝子と比較して、今日、発生学や行動生物学で用いられるコンストラクトのサイズは増加傾向にあり、時には様々な機能因子を含んで 15kb になることもある (e.g., Bosch et al., 2015)。現在のところ CRISPR/Cas9 システムでは、それほど大きなコンストラクトを導入することはできない (Salsman & Delloire, 2017)。そして、遺伝子導入効率の低さも問題になる。実際には 1 つの実験の中で、ポジティブコントロールとネガティブコントロールを含めたいくつかの遺伝子について、複数の系統を用い

て結果を比較する必要がある。従って、全ての実験を実施する上での労力を減らすためにも、遺伝子導入系統の確立は簡便かつ効率が高いことが望まれる。しかしながら、現在までに報告されている CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子の導入効率は、これまで用いられていた他の技術に比べると格段に低い (Gratz et al., 2013, 2014 ; Yu et al., 2014 ; Gilles et al., 2015)。

1-3. インテグレースを用いた部位特異的な遺伝子導入

ポジション効果を制御するための技術の一つとして、特定の部位に遺伝子を組み込むことが可能な、バクテリオファージ由来のインテグレースがキイロシヨウジヨウバエを中心に利用されてきた。バクテリオファージは細菌に感染した後の増殖様式の違いによって、ビルレントバクテリオファージとテンプレートバクテリオファージの 2 タイプに分けられる (Smith et al., 2010)。感染した細菌の細胞膜を破壊する“溶菌”のみを行うビルレントバクテリオファージに対して、テンプレートバクテリオファージは“溶菌”だけでなく“溶原化”を行う。溶原化とは、細菌内に安定的な状態で保持されたファージのゲノム DNA (プロファージ) が細菌の増殖に伴って子孫に伝達されていく現象である。細菌内のプロファージはプラスミドとして独立に存在することもあれば、宿主染色体に組み込まれることもある。プロファージは溶原サイクルから溶菌サイクルに移行する際に、細菌の染色体から切り出されて放出される (Fogg et al., 2014)。この宿主染色体へのプロファージの組み込みと切り出しに用いられる酵素がインテグレースであり、ファージが有する attachment P (*attP*) 配列と宿主染色体上の *attB* 配列それぞれに対して、二量体を形成して結合する (図 1-2A)。その後、*attP* 配列と *attB* 配列が対合し (図 1-2B)、DNA 二本鎖の開裂、相補鎖の交換、ライゲーシオンを経て、宿主染色体にプロファージが組み込まれる (図 1-2C ; Olorunniji et al., 2012 ; Rutherford et al., 2013)。組み込み後には、*attP* 配列と *attB* 配列を半分ずつ有する *attL* 配列と *attR* 配列が生成される (図 1-2D)。ファージ由来の付属タンパク質である RDF (Recombination directionality factor) や Xis

(Excisionase)が存在する場合、インテグレースは *attL* 配列と *attR* 配列を基質に切り出し反応を行うが、これらのタンパク質が存在しない条件下では *attP* 配列と *attB* 配列を基質に組み込み反応だけを行う (Khaleel et al., 2011; Fogg et al., 2014). このような基質特異性は、インテグレースによる遺伝子導入効率の高さに寄与している.

インテグレースは触媒残基の違いによってチロシン型とセリン型に分けられる. チロシンインテグレースの中で最も有名なものが、 λ ファージ由来の Int (Integrase) であり、ベクターへの遺伝子のクローン化をハイスループットに行える Gateway システムに利用されている (Hartley et al., 2000). 一般的なクローンベクターの作製では、制限酵素配列の付加やリガーゼ処理を行った上で、組み込んだ遺伝子の挿入方向を確認する必要があるが、手間と時間が掛かってしまう. しかも、制限酵素配列を付加するために PCR (Polymerase Chain Reaction) を行えば、変異が導入される可能性を否定できない. Gateway システムを用いれば Int を用いた遺伝子のクローニングによって、制限酵素配列の付加やリガーゼ処理を行うことなく、ベクターに遺伝子を一方向に組み込むことが可能である. さらに、少しずつ配列の異なる *attP*, *attB*, *attL*, *attR* 配列を利用することで、複数の遺伝子を一度にクローニングすることも可能になった (Ashwini et al., 2016).

1-4. phiC31/*attP* システム

セリンインテグレースの中で最もよく利用されているのは *Streptomyces* 属に感染するバクテリオファージ phiC31 に由来するインテグレースである (Groth et al., 2000; Khaleel et al., 2011). 2000 年に Calos らのグループは、ヒト細胞を用いて phiC31 インテグレースが宿主以外でも効率よく機能することを示した (Groth et al., 2000). その後 2004 年に同グループは、昆虫では初めてキイロシヨウジヨウバエで、phiC31 インテグレースを用いた遺伝子導入に成功した (Groth et al., 2004). これらの研究によって、phiC31 インテグレースを用いる

と部位特異的な遺伝子導入を高効率に行えることが示されたものの、キイロシヨウジョウバエを扱う多くの研究者の間で普及し、様々な遺伝学的解析に用いられるようになるには続く研究を待たねばならなかった。

それまでキイロシヨウジョウバエでは、*P-element* を用いた形質転換が主流であり、多くの研究者が利用する方法であったために数多くのベクターが作出されていた。そのため *P-element* から *phiC31* インテグレースを用いた遺伝子導入へと切り替える場合には、既存のベクターを作り直す必要が出てくるばかりか、*phiC31* インテグレースの認識配列 (*attP*) をゲノム内に事前に組み込んでおく必要も出てくるため、非常に手間がかかってしまう。つまり、初期投資の大きさが *phiC31/attP* システムを利用する上で障壁となっていたといえよう。

ところがその後数年の間に、*BAC* システムの併用による 130kb を超える遺伝子の導入 (Bateman et al., 2006)、*Minos* トランスポゾンの併用による遺伝子・エンハンサートラップの新技术の開発 (Venken et al., 2006)、*nos* および *vasa* プロモーターを用いた生殖細胞特異的な *phiC31* インテグレースの発現誘導による遺伝子導入の高効率化 (Bischof et al., 2007)、*attP* 挿入系統ごとの各組織 (神経、脂肪、筋肉) における遺伝子発現量の比較 (Markstein et al., 2008) など、*phiC31/attP* システムを用いた遺伝子導入において非常に重要な基盤となる研究が立て続けに報告された。さらに、それぞれのグループで 100 を超える *attP* 挿入系統が作成され、それぞれの系統におけるマーカー遺伝子の発現を定量的に調べることで、遺伝子導入効率が高く、各組織で導入した遺伝子の発現レベルが高い系統が見出された (Groth et al., 2004; Bateman et al., 2006; Venken et al., 2006; Bischof et al., 2007)。これらの研究により、既に確立された *attP* 挿入系統を用いることで手間が大きく削減でき、なおかつ様々な遺伝子操作を行えることが示された。以上のように、*phiC31/attP* システムは高度な遺伝学的解析を行うための基盤として発展した (Groth & Calos, 2004; Groth et al., 2004; Bateman et al., 2006; Bischof et al., 2007; Ni et al., 2009; Boy et al., 2010)。

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（図 1-3）。第 1 段階（第 2 章）では、*piggyBac* トランスポゾンを用いた形質転換によってひとまとまりの人工配列をゲノム内に組み込む（Kim & Pyykko, 2011）。なお、この配列の中には第 2 段階（第 3 章）で用いる、*phiC31* インテグレースを用いた配列特異的な組換えのターゲットとなる attachment P (*attP*) 配列が含まれている（Thorpe & Smith, 1998；Groth et al., 2004）。この方法は 2 段階の遺伝子導入を必要とするためにかかる労力は大きいですが、トランスポゾンやゲノム編集技術を用いた遺伝子導入と比べて明確な強みがいくつかある。1 つ目に、適当な *attP* 挿入システムを用いた場合、第 2 段階の遺伝子導入を比較的高い効率で行える点である。どのシステムを用いるかによって遺伝子導入効率は変動しうるものの、最も成功したケースでは、次世代を残すことができた成虫のうち、60% が形質転換体であったという報告がある（Groth et al., 2004；Bischof et al., 2007）。2 つ目に、*phiC31/attP* システムを用いると大きなサイズの遺伝子でもゲノムに組み込むことが可能になる点である。例えば、キイロシヨウジョウバエでは、最大 133kb の BAC コンストラクトをゲノムに導入できたという報告がある（Venken et al., 2006）。3 つ目は、同じ *attP* 挿入システムを用いれば、異なるコンストラクトを用いたとしても染色体上の遺伝子導入部位を一律にすることが可能になる点である。これにより、異なるコンストラクト間の表現型を精確に比較することが可能になる。4 つ目は、1 段階目の遺伝子導入によって、一度、高効率に遺伝子導入できる *attP* 挿入システムを確立してしまえば、余分な労力がかからなくなるという点である。異なるコンストラクトを用いた別の実験であっても、同じ *attP* 挿入システムを利用することでポジション効果を一定にすることができる。

phiC31 インテグレースはさらに精密な遺伝子操作技術にも利用されている。例えば λ フェージの *Int* と同じように、*phiC31* インテグレースについても少しずつ配列の異なる認識配列が作出されたことで、RMCE（Recombinase-mediated cassettes exchange）という遺伝子導入法に用いることができるようになった

（Bateman et al., 2006）。RMCE では、ドナー配列とターゲット配列の両端に 1

組ずつ、計 2 組の認識配列が配置されている。1 組の *attP* 配列と *attB* 配列を用いた場合、プラスミドに含まれていた抗生物質耐性遺伝子など全ての配列が組み込まれてしまうが、RMCE による遺伝子導入では認識配列に挟まれた領域だけを組み込むことが可能になる。また、*phiC31* インテグレースによる組換えによってゲノムから除去されるターゲット配列上にマーカー遺伝子が載っていれば、ドナー配列上にマーカー遺伝子がなくとも、導入に成功したかを判断することが可能である。これにより、部位特異的に導入する遺伝子の大きさを減少させることができ、遺伝子の発現に影響を与えるような因子をできる限り排除することができる。従来、RMCE には *Cre/loxP* システムや *Flp/FRT* システムが用いられていたが、*phiC31/attP* システムを用いることによって、組換え以外の用途に *Cre/loxP* システムや *Flp/FRT* システムを利用できるという利点になる。さらに、*phiC31/attP* システムを使った RMCE の応用として、MiMICs

(Minos-Mediated Integration Cassettes) という遺伝子やタンパク質のトラップ法が開発されている (Venken et al., 2011)。MiMICs コンストラクトには、2 つの *attP* 配列に挟まれた可視マーカー (MiMICs カセット) の両端に *Minos* トランスポゾンの TIRs が含まれており、*Minos* トランスポゼースによってゲノム上のランダムな部位に挿入される。トランスポゾンのみを用いた遺伝子・タンパク質トラップ法とは異なり、ゲノム内に挿入された MiMICs のカセットは、TIRs 以外を RMCE によって交換することが可能であるため、一度トラップした遺伝子やタンパク質に対して異なる遺伝学的操作を加えることができる。以上はキイロショウジョウバエで利用されている技術であるが、*phiC31/attP* システムは、昆虫以外の生物でも利用されている (表 1-2)。例えば哺乳類のゲノムには、*phiC31* インテグレースの認識配列に似た配列 (*pseudo-attP* 配列) が存在しており、遺伝子導入に利用することが可能である (Thyagarajan et al., 2001; Olivares et al., 2002)。この *pseudo-attP* 配列と Gateway システムとを併用することによって、ハイスループットに哺乳類細胞へ遺伝子を導入するシステムが開発されている (Jump-InTM Fast Gateway[®] System)。なお、キイロショウジョウバエなど

の昆虫のゲノムにも *attP* 配列と似た配列が存在しており、その相同性は 23～41%と哺乳類における相同性とほとんど変わらないものの (Groth et al., 2004 ; Nimmo et al., 2006), *pseudo-attP* 配列に対する遺伝子の組み込みは観察されていない。

1-5. テナガシヨウジョウバエ

テナガシヨウジョウバエ *Drosophila prolongata* は, *melanogaster* 種群, *rhopaloea* 種亜群に属し, 中国南西部, インド北東部, ミャンマーおよびベトナムに分布している (Singh & Gupta, 1977 ; Toda, 1991 ; Setoguchi et al., 2014). 近縁のシヨウジョウバエに比べて, テナガシヨウジョウバエの体サイズは雌雄共に大きい。また, 多くのシヨウジョウバエとは異なり, オスはメスよりも大きく, オスの前脚のみ肥大化して黒と白に着色している (図 1-4 ; Blanckenhorn et al., 2007 ; Setoguchi et al., 2014). この誇張化した前脚は, オス間の闘争やレッグバイブレーションという前脚を用いてメスの腹部を激しく振動させる求愛行動に用いられる。さらに, 着色度合いに差はあるものの, 雌雄共に翅に模様がある。これらの特徴は, 近縁種である *Drosophila rhopaloea*, *Drosophila kurseongensis* および未記載種の KB866 では見られないことから, テナガシヨウジョウバエで急速に進化したことが示唆されている (Setoguchi et al., 2014 ; Kudo et al., 2017). このような形態と行動の進化に関わる遺伝子を明らかにするための糸口として, 野外個体群に由来する 15 の単一メス由来自殖系統間で形態と行動を比較したところ, 体サイズに対する脚のプロポーション, 闘争性, 求愛行動のパターンおよび再交尾の有無などに顕著な系統間差が認められた (Kudo et al., 2015).

テナガシヨウジョウバエが有する特徴的な形質の遺伝学的基盤を明らかにするため, これまでに 2 つの研究が行われてきた。一つは, テナガシヨウジョウバエのオス脳特異的な遺伝子の探索である。テナガシヨウジョウバエのオスは近縁種と比べて顕著に闘争性が高い一方, メスの闘争性には種間で違いは見られない。テナガシヨウジョウバエのオスにおける闘争性亢進に関与する遺伝子

を探索するために、テナガショウジョウバエと近縁種の脳内トランスクリプトームを比較したところ、テナガショウジョウバエのオスだけで発現量が変化している 21 の遺伝子が明らかになった (Kudo et al., 2017). さらに、これらの遺伝子の中からテナガショウジョウバエの高い闘争性に関与する遺伝子を絞り込むために、多くの動物で闘争性に影響を与えることが知られている“社会経験”による遺伝子発現の変化を調べた結果、羽化後に集団で過ごしたオスでは単独で過ごしたオスに比べて、発現量が顕著に低下する遺伝子 (*astray*) が見つかった.

もう一つの研究は、交尾受容性を制御する遺伝子座の探索である. テナガショウジョウバエは、近縁種と比較して交尾受容性が低いことが知られており (Setoguchi et al., 2014), 系統間でも顕著な違いがある (Kudo et al., 2015; Setoguchi et al., 2015). 交尾受容性の高い系統と交尾受容性の低い系統との交配によって得られた子では、それぞれの系統の中間よりも交尾受容性が高くなったことから、高い交尾受容性が不完全優性の表現型であることが示されている (Hitoshi et al., 2016a). 続いて、交尾受容性を制御する遺伝子を明らかにするために、交尾受容性の異なる 2 系統を用いた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が行われた. キイロショウジョウバエゲノムへのマッピングの結果、イントログレッション領域に座上し、交尾受容性を制御している可能性のある 476 の候補遺伝子が見つかった (等ら, 未発表). 以上 2 つの探索的研究に加えて、15 系統の内、特に行動に特徴のある 3 系統 (BaVi043, SaPa008, SaPa010) は、HiSeq システム (illumina 社) を用いたシーケンス解析によってコンティグレベルのドラフトシーケンスが得られているため、標的遺伝子の配列情報を迅速に得ることもできる (松尾, 未発表).

以上のような順遺伝学的な解析によって、テナガショウジョウバエの特徴的な形質を制御する遺伝子の候補が見つかってきている. これらの候補遺伝子の機能を実際に確かめるための逆遺伝学的技術の導入が必要な段階に来たといえる.

1-6. 本論文の構成

一度確立してしまえば、繰り返し、高効率に遺伝子を組み込むことが可能な *phiC31/attP* システムをテナガシヨウジョウバエに導入することには極めて重要な意味がある。上述の通り、テナガシヨウジョウバエは興味深い形態・行動形質をいくつも有しているため、多岐にわたる研究テーマにアプローチすることができる。その上、遺伝学的な解析を行う上では複数の単一メス由来自殖系統が確立されており、行動に特徴のある 3 系統についてはコンティグレレベルのドラフトシーケンスが得られていることも奏功すると期待できる。そこで本論文では、効率的で精確性の高い遺伝子導入システムをテナガシヨウジョウバエへ導入することを目的とした。まず第 2 章では、*piggyBac* トランスポゾンを用いた形質転換がテナガシヨウジョウバエにおいても有効に利用できるかを確かめると同時に、第 3 章で利用する *phiC31* インテグレースの認識配列である *attP* 配列をゲノム内に導入した (図 1-3)。第 3 章では、*phiC31/attP* システムを用いて、テナガシヨウジョウバエのゲノム内に遺伝子を導入することができるかどうかを確かめた (図 1-3)。

表 1-1. 昆虫において形質転換に利用されたトランスポゾン.

トランスポゾン	分類階級ごとの数			
	目	科	属	種
<i>Hermes</i>	3	5	8	8
<i>Herves</i> *	1	1	1	1
<i>hobo</i> *	1	1	1	2
<i>hopper</i>	1	2	2	2
<i>mariner/Mos1</i>	1	3	3	4
<i>Minos</i>	3	6	6	6
<i>P</i> *	1	1	1	2
<i>piggyBac</i>	5	20	23	40
<i>Tn5</i>	1	1	1	1

*シヨウジョウバエ類でのみ利用されたトランスポゾンを示す.

表 1-2. 各遺伝子導入技術の特徴.

特徴	<i>piggyBac</i>	<i>phiC31/attP</i>	CRISPR/Cas9
ターゲット	ランダム (TTAA : 4bp)	配列特異的 (<i>attP</i> : 39bp)	配列特異的 (20bp + NGG)
組み込める 遺伝子サイズ	制限あり	制限なし	制限あり
適用可能な 分類群	広い (昆虫, 哺乳類 など)	広い (甲殻類, 魚類, 両 生類, 鳥類, 哺乳類, 植物 など)	広い (菌類, 甲殻類, 魚類, 両生類, 爬虫類, 鳥類, 哺乳類, 植物 など)
ポジション効果	制御できない	一定にできる	一定にできる
オフターゲット効果	-	なし	あり

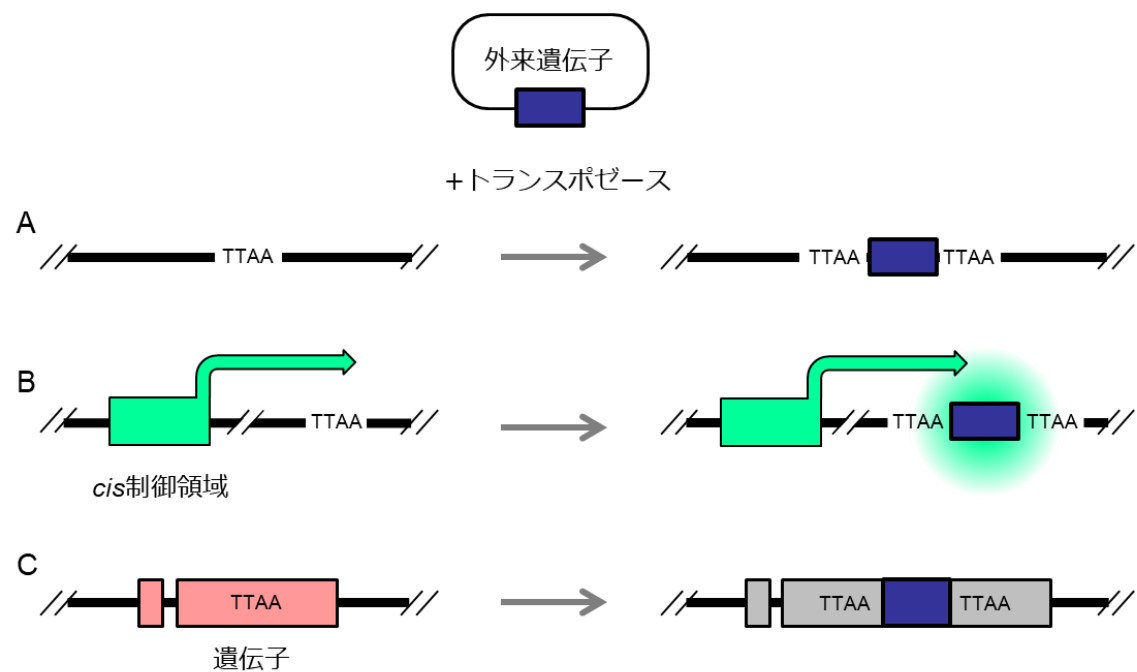


図 1-1. トランスポゼースを用いた形質転換 (例: *piggyBac*). (A) トランスポゼースは 2~4bp 程度の数塩基の配列 (*piggyBac*: TTAA) を認識して, ゲノム上のランダムな部位に外来遺伝子を組み込む. (B) 組み込み部位によっては *cis* 制御領域からの影響を受けることがある. (C) 遺伝子内に組み込まれると機能欠損の原因となる.

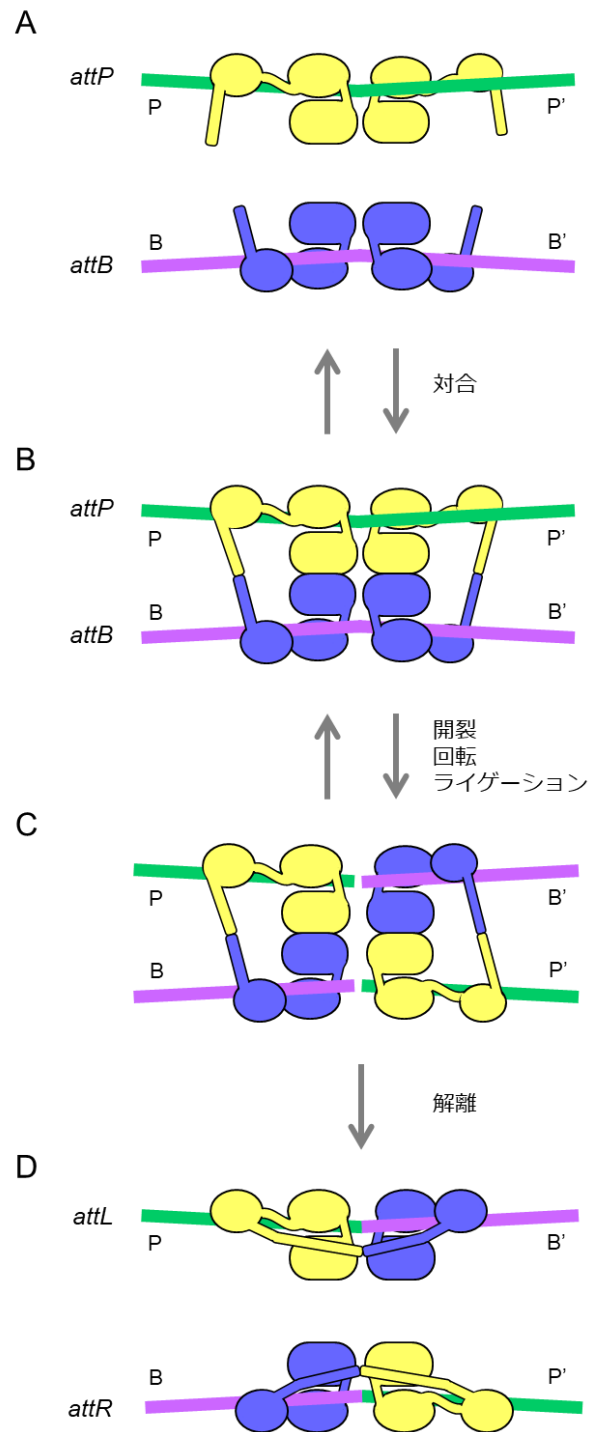
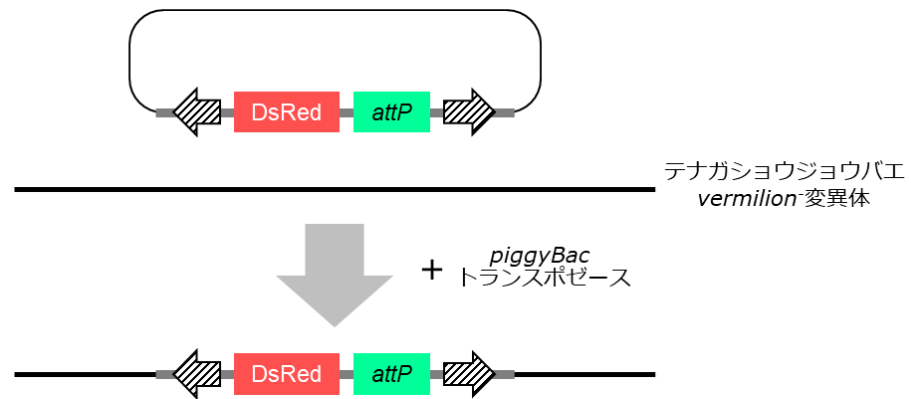


図 1-2. インテグレースによる組換え. インテグレースを黄色および青色で示している. phiC31 インテグレースは二量体を形成して *attP* 配列と *attB* 配列に結合し (A), 対合させる (B). その後, 各配列の中央で鎖が開裂, 180°回転し, ライゲーションによって鎖が連結され (C), *attL* 配列と *attR* 配列が形成される (D). Rutherford et al., 2013 より改変.

第2章



第3章

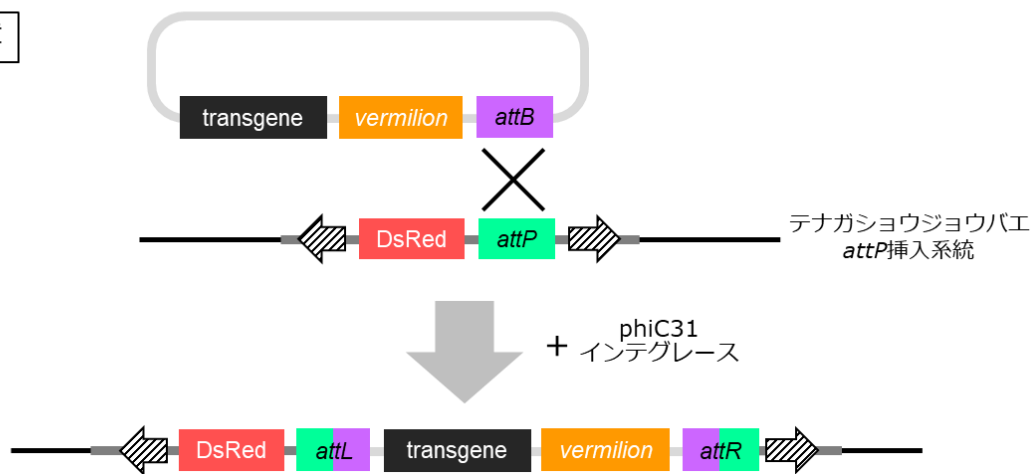


図 1-3. 本研究における実験のプロセス. 第 2 章では, *piggyBac* を用いた形質転換によって attachment P (*attP*) 配列をゲノム内に組み込む. 第 3 章では, *phiC31* インテグレースを用いた相同組換えによって *attP* 配列特異的に遺伝子を導入する. *piggyBac* トランスポゼースは, *piggyBac* terminal inverted repeats (TIRs: 矢印で示す) を認識し, TIRs とその間の領域をランダムにゲノムに組み込む. なお, 組み込む際のマーカーとして, 蛍光タンパク質 DsRed を利用した. *attP* 配列がホモ接合化された系統を確立し, 第 3 章で利用した. *phiC31* インテグレースは, *attP* 配列 (テナガショウジョウバエのゲノム内に組み込まれた) と *attB* 配列 (ベクターに組み込まれているもの) 間の配列特異的な組換えを触媒し, *attL* 配列と *attR* 配列にする. この際, *vermilion*⁺ による成虫の眼の色の変化によって, 遺伝子を組み込んだかを判断した.

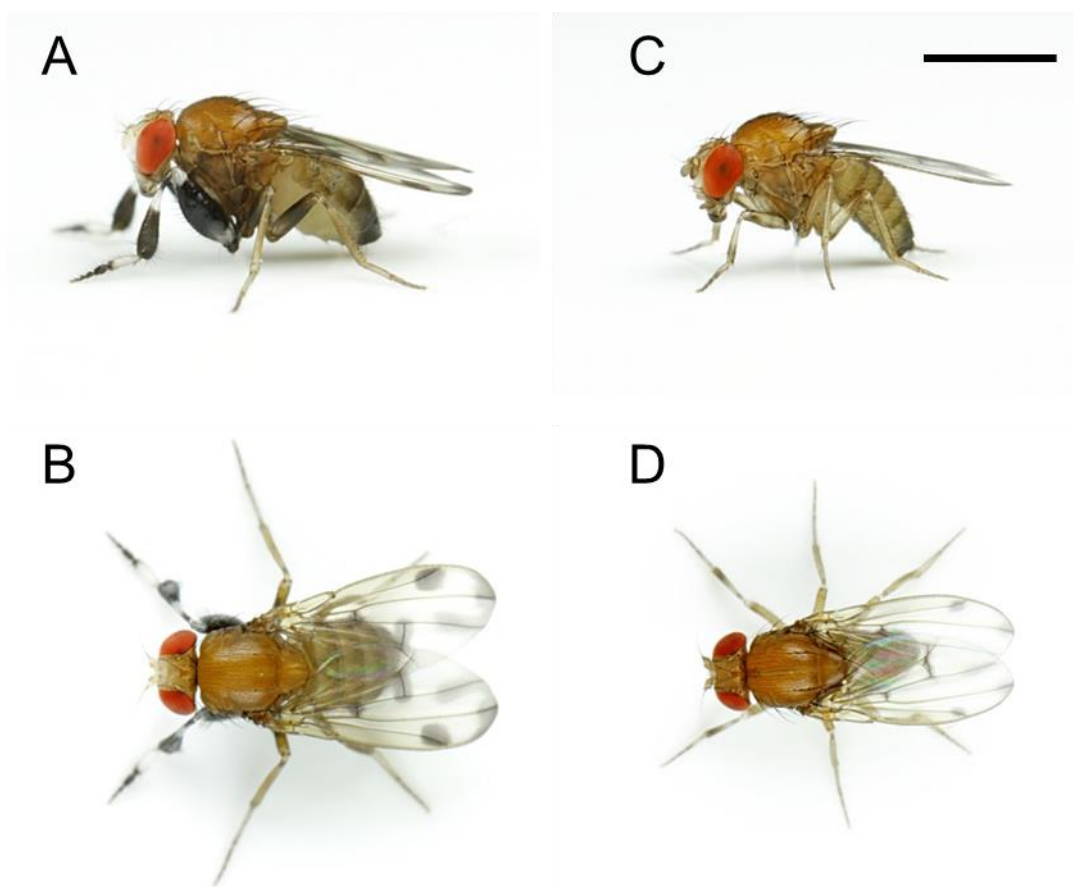


図 1-4. テナガシヨウジヨウバエの成虫．(A, B) オス．(C, D) メス．(A, C) 側面図．(B, D) 上面図．スケールバーは 2mm を示す．

第2章 テナガシヨウジヨウバエにおける *piggyBac* トランスポゼースを用いた遺伝子導入

2-1. 緒言

形質転換を行うための技術には、第1章で紹介したようにいくつか種類がある（表 1-2）。その中でもトランスポゾンを用いた形質転換は、効率や汎用性の面から便利な技術だと言えよう。トランスポゾンはその転移メカニズムによって、Class I に分類される RNA 型トランスポゾン（以下、レトロトランスポゾン）と Class II に分類される DNA 型トランスポゾン（以下、トランスポゾン）の2種類に大別される（Bouuaert & Chalmers, 2010）。レトロトランスポゾンは一旦 mRNA に転写され、逆転写により生成された DNA 断片が別の部位に組み込まれるため、転移する度にコピー数が増加する（図 2-1A）。一方、トランスポゾンはゲノムから切り出され、そのまま別の部位に組み込まれるため、コピー数は増加しない（図 2-1B）。遺伝子の組み込み部位を確かめ、機能を明らかにする上ではコピー数が増加しないトランスポゾンの方が都合がよいため、形質転換に用いられてきた。これまでに様々なトランスポゾンが見つかったが、トランスポゾンと生物種の組み合わせによってはトランスポゾンの転移効率が悪かったり、そもそも転移しなかったりした（Handler, 2001；Atkinson & James, 2002；Fraser, 2012）。例えば、キイロシヨウジヨウバエから発見された *P-element* は、ごく近縁な種であっても本来の宿主であるキイロシヨウジヨウバエに比べると転移しにくく、*Drosophila* 以外のハエではほとんど転移しないことが知られている（Handler et al., 1993）。一方で、多様な種で転移能力を有するトランスポゾンもあり、その内の1つが *piggyBac* である（表 1-1, 図 2-2）。

piggyBac はイラクサギンウワバ *Trichoplusia ni* の培養細胞 TN-368 に感染した核多角体病ウイルス（Nuclear Polyhedrosis Virus：NPV）のゲノムから発見されたトランスポゾンである（Cary et al., 1989）。*piggyBac* のサイズは 2457bp であり、13bp の末端反復配列（Terminal Inverted Repeats：TIRs）と 19bp の副末端

反復配列（sub-Terminal Inverted Repeats：sub-TIRs）およびトランスポゼースを有する．初期の研究では，*piggyBac* が転移する際には宿主が持つ因子が必要であるためイラクサギンウワバでしか利用できないと考えられていたが，2000年にミカンコミバエ *Bactrocera dorsalis* の生殖細胞における形質転換が成功したのを皮切りに，一気に利用が拡大した（Handler & McCombs, 2000）．現在では，*piggyBac* は酵母から哺乳類に至るまで多くの生物で利用されている（Schulte et al., 2014；Caroti et al., 2015；Yusa et al., 2015；Genc et al., 2016；Xu et al., 2016；Chu et al., 2017）．

piggyBac の特徴の 1 つは，一度組み込んだ遺伝子を痕跡なく取り除くことができることである（Elick et al., 1996；Fraser et al., 1996；Thibault et al., 2004）．多くのトランスポゾンでは，ゲノム内に組み込む際に宿主が有する修復タンパク質を利用してターゲット配列の末端部分を合成するため，転移した後に宿主のゲノム内に余分な配列（footprint）を残してしまい，変異源となりうる．このように切り出しを精確に行わないトランスポズンを用いた場合，一度組み込まれた遺伝子が footprint だけを残して異なる部位に移動する“hit & run”現象が起ると遺伝学的な解析が複雑になってしまう（Rio et al., 1986；Metaxakis et al., 2005）．一方，*piggyBac* はたとえ違う部位に移動したとしても，組み込まれていた部分の配列は元通りに修復されるため変異源にはならない．以上のように優れた特徴を持ちながらも *piggyBac* を用いた形質転換では解決できない問題も残っている．まず，効率よく運搬できる遺伝子のサイズに制限があり，10kb 程度が上限だとされている（Ding et al., 2005；Wang et al., 2008）．また，*piggyBac* は“TTAA”というごく短い配列をターゲットとしてランダムに遺伝子を組み込むため，ポジション効果を制御することができない．そこで，サイズの制限なく配列特異的に遺伝子を組み込むことが可能な phiC31/*attP* システムと併用することでこの問題を解決したいと考えた．

ところで，形質転換に成功したかを判断するためには可視マーカーが必要である．形質転換に用いられる可視マーカーとして広く利用されている遺伝子は，

white である (Sarkar & Collins, 2000 ; Huang et al., 2016). *white* は ABC トランスポーターのサブユニットをコードする遺伝子で, 色素の前駆体を複眼, 単眼, マルピーギ管および精巢の色素顆粒に輸送し, 蓄積させる機能を有しており, *white* 変異体では眼が白色になる (図 2-3 : O'Hare et al., 1984 ; Hazelrigg, 1987). 加えて, White タンパク質は生体アミン, 神経伝達物質, セカンドメッセンジャーなどの輸送も担っており (Anaka et al., 2008 ; Borycz et al., 2008 ; Evans et al., 2008 ; Sitaraman et al., 2008), 野生型に比べて白眼のオスはオスへの求愛頻度が上昇したり (Zhang & Odenwald, 1995 ; Hing & Carlson, 1996 ; Krstic et al., 2013), 交尾成功率が低くなったりするという報告がある (Sturtevant, 1915 ; Reed & Reed, 1950 ; Xiao et al., 2017). 以上のことから, 特に行動を扱う実験系においては *white* は適切な可視マーカーであるとは言えない. それのみか, これまでにテナガシヨウジョウバエにおいても自然突然変異型と薬剤誘導変異型の *white* 変異体を数頭観察しているが, どの個体からも子を得ることができなかった (松尾・工藤, 未発表). 一方で, *white* ほど頻度は高くないものの, キイロシヨウジョウバエや他の昆虫で可視マーカーとして利用されている *vermilion* は, トリプトファンオキシゲナーゼをコードする遺伝子である (図 2-3 : Linzen, 1974 ; Walker et al., 1986 ; Frindell & Searles, 1991 ; Huang et al., 2016). 現在までのところ *vermilion* には, 眼の褐色色素 xanthommatin を合成する過程で酵素として働く以外の機能は知られていない.

そこで本章では, *piggyBac* を用いた形質転換技術をテナガシヨウジョウバエでも利用できるか確かめるとともに, ENU を用いた変異誘導によって作製した *vermilion*⁺ をマーカーとして *phiC31/attP* システムによる遺伝子導入を行うための *attP* 挿入系統の確立を目的とした.

2-2. 材料および方法

2-2-1. 供試昆虫

vermilion⁻ 系統は, エチルニトロソ尿素 (N-ethyl-N-nitrosourea : 以下, ENU)

を用いた点突然変異の誘導により, BaVi044 系統から作成した(図 2-4). BaVi044 系統は, 繁殖力が高く標準的な行動を示すため使用することにした. この BaVi044 系統は, 2005 年 4 月に高森久樹博士によってベトナム Ba Vi にて採集された 1 頭の既交尾メスの子から同系交配を続けることによって確立した系統群のうちの 1 つである (Kudo et al., 2015). *vermilion* 系統は, A1070G という塩基置換による L358R というアミノ酸置換により鮮赤色の眼をもつ変異系統である. この変異は甲殻類で保存性の高い疎水残基上に存在しており, Vermilion タンパク質の機能を阻害していると示唆されている.

テナガショウジョウバエは 23°C以上の気温で正常な発育が阻害されるため, 全ての実験および飼育は 20°C下で行った (Hitoshi et al., 2016b). 光周条件を 12L12D サイクルとし, 一般的なショウジョウバエの餌を用いて飼育した (Setoguchi et al., 2014).

2-2-2. ドナーおよびヘルパープラスミド

pBac[3xP3DsRed-*attP*(AF)]プラスミドおよび pSP64_poly(A)/*piggyBac*_ORF プラスミドは, 杏林大学医学部栗崎健教授によって作成され, 分譲されたものである. pBac[3xP3DsRed-*attP*(AF)]プラスミドは, *piggyBac* の TIRs 間に 3xP3 プロモーターと赤色蛍光タンパク質発現遺伝子 DsRed および phiC31/*attP* システムを用いた遺伝子導入(第 3 章)で利用される *attP* 配列が組み込まれている(図 2-5). 3xP3 プロモーターは, *rhodopsin1* の P3/RCS1 プロモーターを元に人工的に作製されたプロモーターであり, *eyeless* という転写因子の結合配列を 3 つ含んでいることから名付けられた. そもそも *eyeless* とは, 昆虫から脊椎動物に至るまで広く保存され, 発生の調節に関わる転写因子の一つであり, 眼の発生を制御する Pax-6 というホメオボックスの昆虫ホモログである (Sheng et al., 1997). 3xP3 プロモーターは眼および中枢神経系での遺伝子発現を駆動しており, 種間でよく保存されていることから, 蛍光タンパク質と組み合わせて可視マーカーとして多くの昆虫で利用されている (Berghammer et al., 1999; Quring et al.,

1994 ; Handler & O'Brochta, 2012 ; Schetelig & Handler, 2013).

pSP64_poly(A)/*piggyBac*_ORF プラスミドは *piggyBac* トランスポゼース mRNA を *in vitro* で転写するために用いた.

2-2-3. インジェクション液の調製

pBac[3xP3DsRed-*attP*(AF)]プラスミド (以下, ベクターDNA) は, QIAGEN Plasmid Mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて精製した. *piggyBac* トランスポゼースは, *EcoRI* (NIPPON GENE, Toyama, Japan) で直鎖化した pSP64_poly(A)/*piggyBac*_ORF から mMESSAGE mMACHINE SP6 kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) を用いて *in vitro* で mRNA に転写した. 合成された *piggyBac* トランスポゼース mRNA は, MEGAclean kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて精製した. ベクターDNA は効率を比較するため, 最終濃度 300ng/μL と 500ng/μL の 2 つの濃度になるように, それぞれ *piggyBac* トランスポゼース mRNA (最終濃度 300ng/μL) と混合して調節した.

2-2-4. マイクロインジェクション

採卵のために, 性成熟した 7~15 日齢の成虫 100 頭 (性比 1:1) を用いた. 採卵用の培地には, ショウジョウバエ用の飼料 (Formula 4-24 Blue, Carolina Biological Supply Co., South Carolina, USA) と同量のグルコースと水, 少量の乾燥酵母を混合したものを使用した. 産卵された卵は 1 時間以内に回収し, マイクロインジェクションに供試した. ピンセットを用いて採卵用の培地から卵を取り出して水でゆすいだ後, 両面テープ (Scotch® W-18, 3M Japan, Tokyo, Japan) を貼ったスライドガラスの上に並べた. これらの卵は数分間乾燥させた後, ピンセットを用いて卵殻を除去し, 両面テープからヘプタン抽出した糊を塗布した新しいスライドガラスに並べ直した. さらに数分間乾燥させた後, シリコンオイル (FL-100-1000CS, Shin-Etsu Chemical Co. Ltd., Tokyo, Japan) で卵を被い, 乾燥を防いだ. マイクロインジェクションは, 位相差顕微鏡 (Primo vert, Carl

Zeiss Microscopy, Jena, Germany) とジョイスティックマイクロマニピュレーター (MN151, Narishige, Tokyo, Japan) に取り付けた Femtotips II (Eppendorf, Hamburg, Germany) を用いて行った。マイクロインジェクションを施した卵が並べられたスライドガラスは加湿したプラスチックケースの中に約 2 日間静置し、孵化した幼虫は集めて餌入りのバイアルで飼育した。

2-2-5. 形質転換体の掛け合わせと確認

未交尾の G_0 世代の成虫は、異なる性別の *vermilion* 系統の未交尾成虫と掛け合わせた (図 2-6)。 G_1 世代の幼虫は、蛍光立体顕微鏡 (MZ-FL III, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を用いて赤色蛍光によってスクリーニングをした。赤色蛍光を発していた G_1 世代の幼虫は、各 G_0 世代の系統ごとに集めて新しい餌バイアルに移した。未交尾の G_1 世代の成虫は、異なる性別の *vermilion* 系統の未交尾成虫と掛け合わせた (図 2-6)。それぞれの G_0 系統につき、 G_1 世代の成虫と *vermilion* 系統の成虫との掛け合わせを最大 5 セット行った。赤色蛍光を発していた G_2 世代の幼虫は、新しい餌バイアルに移した。羽化した G_2 成虫は、同じ親 (G_1 世代) に由来するものどうしを掛け合わせた。 G_3 世代の幼虫は、*DsRed* の蛍光強度によってホモ接合型の幼虫を選抜した。 G_3 世代の成虫は、同じ G_1 成虫に由来するものどうしを雌雄各 1 頭ずつ掛け合わせた。掛け合わせる数は、ホモ接合型とヘテロ接合型を赤色蛍光の強度によって区別できたか否かによって異なり、区別できたものは最大 5 ペア、区別できなかったものは最大 25 ペア掛け合わせを行った。ホモ接合化に成功したかどうかは、 G_4 世代の未交尾メス成虫と *vermilion* 系統のオス成虫を少なくとも 3 ペア以上掛け合わせることによって確かめた。全てのペアで、全ての幼虫が蛍光を発していた場合にのみ、 G_4 世代でホモ接合化できていると判定した。

2-3. 結果

2-3-1. *piggyBac* を用いたテナガシヨウジョウバエの形質転換

vermilion 系統の卵は、野生型 (BaVi044) 系統と同様に、卵殻を除去した状態であっても高い孵化率を維持した (表 2-1). ベクター DNA の濃度を変えた 2 つの実験を行ったが、どちらの濃度であっても孵化率はおおよそ 50%であった (表 2-2). 孵化した幼虫のうち、おおよそ半数が成虫まで生存し、そのうち 3 分の 2 から次世代が得られた (表 2-2). 次世代が得られた G_0 世代の成虫を母数とした場合の形質転換効率はベクター DNA の濃度が高い方が 2 倍以上高かった (表 2-2).

各形質転換体はさらなる掛け合わせによってホモ接合系統を確立した (図 2-5). 単一の G_0 世代の形質転換体由来としても、ゲノム上の複数の部位に遺伝子が組み込まれている可能性があるため、 G_0 世代の成虫は *vermilion* 変異系統の成虫と掛け合わせた. 同様に、 G_1 世代の成虫も *vermilion* 変異系統の成虫と掛け合わせた. 同じ G_0 世代の形質転換体由来する G_2 世代の幼虫が発する DsRed の蛍光パターンが異なっている場合は、それぞれ独立の系統とした. 結果として、10 系統 (*attP223*, *attP243*, *attP252*, *attP403*, *attP415*, *attP418*, *attP429*, *attP506*, *attP589*, *attP602*) を A と B の 2 つの系統に分けた. この段階では、56 のヘテロ接合型系統を確立することができた. なお、各系統の名前は G_0 世代におけるシリアルナンバーとした. 今回の実験では、掛け合わせによって性染色体上に *attP* 配列が組み込まれた系統を意図的に除いたわけではないが、常染色体上に組み込まれた系統しか得られず、その原因は分かっていない.

ベクター DNA をヘテロ接合型で有する個体に比べて、ホモ接合型で有する個体における DsRed の蛍光が強いという傾向があったため、スクリーニングに利用した. テナガシヨウジョウバエには、バランス染色体や染色体マーカーが存在しないため、ホモ接合化系統を確立するのに大きな労力がかかった. 結果として G_3 世代では 413, G_4 世代では 620 の掛け合わせを行い、37 の *attP* 配列をホモ接合型で持つ系統 (以下、*attP* 挿入系統) を確立することができた.

2-3-2. 蛍光パターン

全ての蛍光を発する個体は、蛍光を発していない個体と容易に区別することができた（図 2-7）。3xP3 プロモーターによる DsRed の発現は、幼虫・前蛹期においては bolwig's organ（幼虫の眼）、中枢神経系（Central nervous system：CNS）および anal pads で確認され、成虫期には単眼で観察された（図 2-7H, J, P）。系統間では、異なる発現パターンや強度が観察されることもあった（図 2-7D, F）。*attP243* 系統のみ、幼虫の頭部表皮組織が蛍光を発していた（図 2-7L）

2-4. 考察

昆虫の胚は卵殻と卵黄膜に被われており、卵殻は卵黄膜に比べ硬いため、マイクロインジェクションに用いるガラスの微針で孔を空けることが困難である。そのためキイロショウジョウバエでは次亜塩素酸ナトリウム液に浸して卵殻を溶かしたり、ピンセットを用いて卵殻の除去を行ったりした上でマイクロインジェクションを行うことで上記の問題を解決している。しかしながら多くの昆虫では、卵殻を除去した状態の初期胚は生存率が低く、そのことが遺伝子導入効率自体を低下させる一因となっている。キイロショウジョウバエに近縁な種であっても卵殻を除去した場合に孵化率が著しく低下する種もいるため、本研究ではまずテナガショウジョウバエにおける卵殻の除去が孵化率に及ぼす影響を調べることにした。すると幸いにも、テナガショウジョウバエの 15 系統の内、飼育環境下で最も増殖効率の良い BaVi044 系統とそれに由来する *vermilion* 系統では、外殻を除去した状態であっても非常に高い生存率を示すことが分かった（表 2-1）。このことは、今回の実験のみならず今後遺伝子導入実験を何度も行っていく上でも非常に大きな利点であるといえよう。

研究室における準備や保存の簡便さから、形質転換に必要な酵素であるトランスポゼースは一般的にはヘルパープラスミドとして DNA の状態で初期胚に供給されている。しかしながらこの方法には問題点が多く、例えば、ヘルパープラスミドは mRNA よりも細胞内毒性が高いという報告がある（表 2-3：

Shinmyo et al., 2004). また、近縁のモデル種で開発されたプラスミドを非モデル種に転用する場合にはトランスポゼースを効率的に発現させるために用いるプロモーターの機能が種間で共通しているかどうかも重要になる。一方、mRNAは合成に手間とコストがかかる上に保存と使用には注意が必要になるが、細胞内毒性やプロモーターの保存性に関する問題を解決することができる(表 2-3)。以上の理由から、テナガショウジョウバエの形質転換においては *piggyBac* トランスポゼースを mRNA の状態で初期胚に供給した。結果として、テナガショウジョウバエで *piggyBac* を用いた場合の総形質転換効率 2.2%は、他のショウジョウバエにおける効率(キイロショウジョウバエ 0.2-0.6%, *Drosophila wilsoni* 0.7%, *Drosophila suzukii* の 5.3%)に比べて高い傾向にあった(Handler & Harrell, 1999; Finokiet et al., 2007; Schetelig & Handler 2013)。他のショウジョウバエと比べてテナガショウジョウバエでは、マイクロインジェクションによる G0 世代の死亡率が低かったことも高い総形質転換効率に影響したかもしれない。

piggyBac トランスポゼースを用いた遺伝子導入のように、ゲノム上のランダムな部位に遺伝子を組み込む方法ではポジション効果が問題となる。今回の実験においても、3xP3 プロモーター制御下の DsRed の蛍光パターンが系統間で大きく異なっていたことから、組み込まれた部位によって遺伝子が受けるポジション効果が異なっていることが示唆された。ポジション効果がより大きな問題となるのは生存に影響を及ぼす場合であるが、本章で確立された系統についてはホモ接合型として 20 世代以上維持できているため概ね問題ないようである。

本章で確立した *attP* 挿入系統は、次章において *phiC31* インテグレースを用いた遺伝子導入に利用する。*attP* 配列が組み込まれた部位は遺伝子の導入効率にも影響を及ぼす可能性がある(Bischof et al., 2007)。そこで次章では、最も効率よく遺伝子を導入できる *attP* 挿入系統の探索も行う。

表 2-1. 初期胚の生存率.

系統	処理	初期胚数	孵化幼虫数	生存率 (%)
BaVi044	コントロール	30	22	73
	卵殻除去	117	83	71
<i>vermilion⁻</i>	卵殻除去	148	112	76

表 2-2. *piggyBac* を用いたテナガシヨウジヨウバエの形質転換効率.

実験	ベクター/ ヘルパー濃度 (ng/ μ L)	マイクロ インジェクション した初期胚数	孵化 幼虫数	G ₀ 成虫数	次世代が得られた G ₀ 成虫数	形質転換 G ₀ 成虫数 [†]	形質転換 効率(%) [‡]	総形質転換 効率(%) [§]
1	300/300	764	351 (45.9%)	159 (45.3%)	110 (69.2%)	5	4.5	0.7
2	500/300	1264	805 (63.7%)	465 (57.8%)	362 (77.8%)	39	10.8	3.1
合計	-	2028	1156 (57.0%)	624 (54.0%)	472 (75.6%)	44	9.3	2.2

[†] G₁ 世代において, *DsRed* の蛍光が観察された子を産んだ G₀ 世代の成虫数.

[‡] 次世代が得られた G₀ 世代の成虫のうち, 形質転換に成功した G₀ 世代の成虫の割合.

[§] マイクロインジェクションした初期胚のうち, 形質転換に成功した G₀ 世代の成虫の割合.

表 2-3. トランスポゼースの供給方法の比較.

特徴	プラスミド DNA	mRNA
準備・保存	簡単	手間がかかる
細胞内毒性	高い	低い
プロモーター	種間で機能が一致している必要あり (他種のベクターを利用する場合)	必要なし

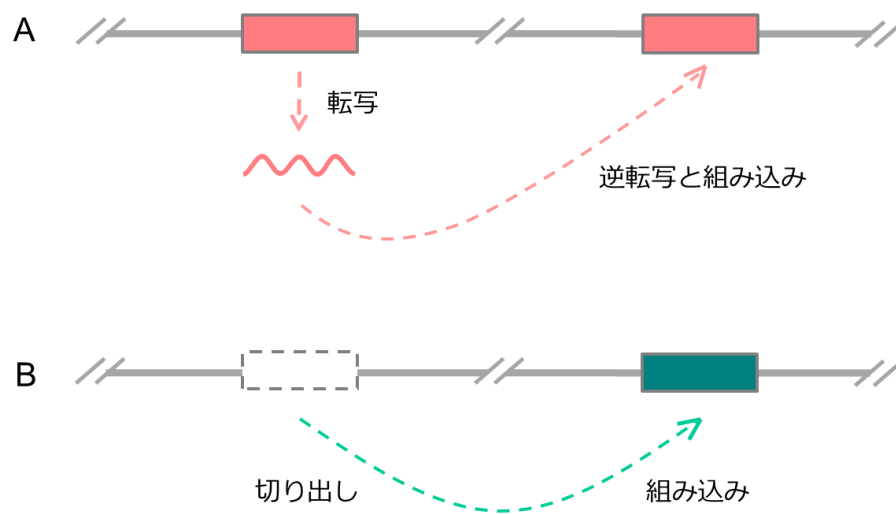


図 2-1. レトロトランスポゾンとトランスポゾン. (A) レトロトランスポゾンは、一旦 mRNA に転写され、逆転写によって合成された DNA が別の部位へ組み込まれる. (B) トランスポゾンは、切り出された DNA 断片が別の部位へ組み込まれる.

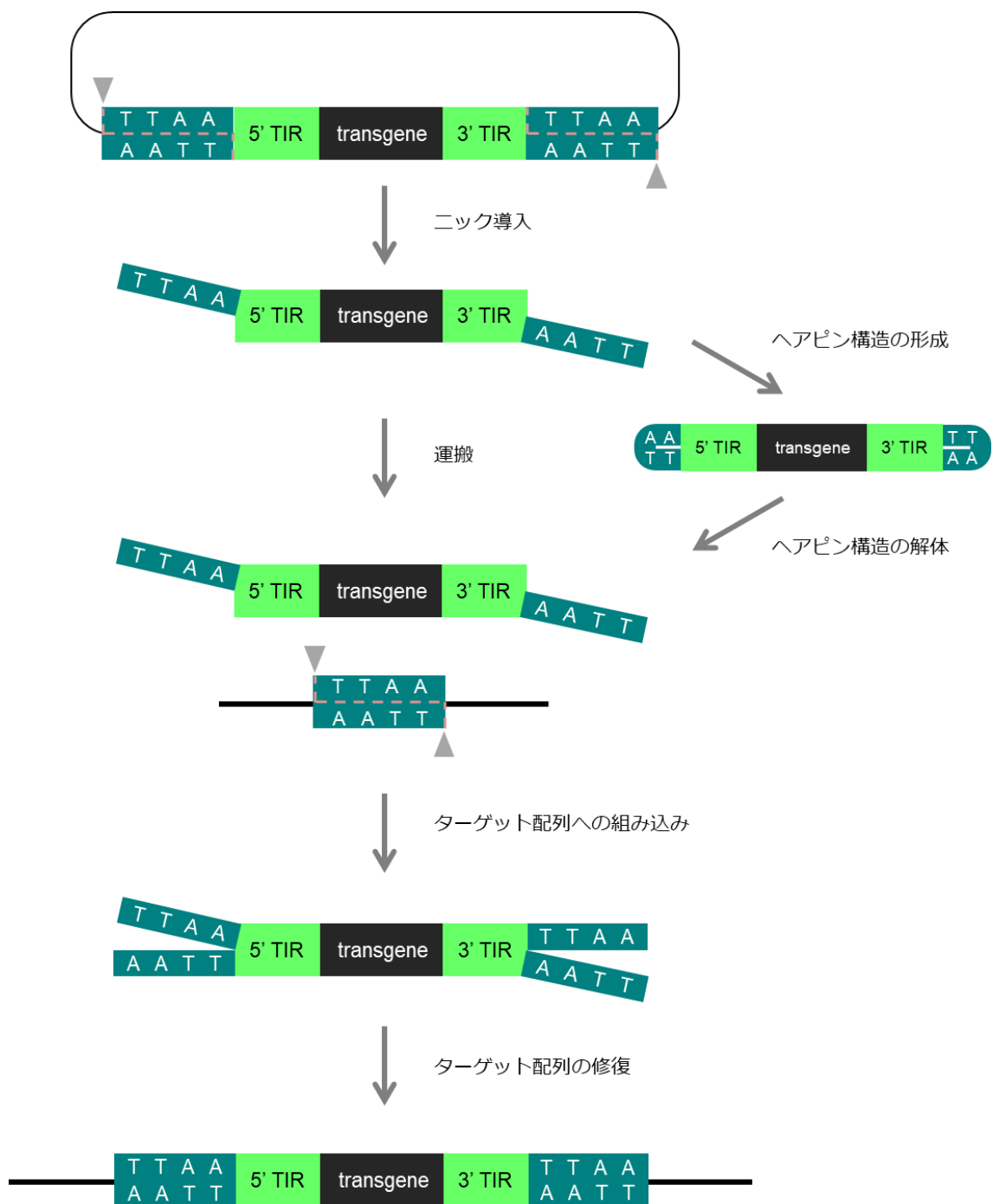


図 2-2. *piggyBac* トランスポゼースを用いた遺伝子の組み込み．灰色の矢頭は，ニックが導入される位置を示す．TIR：Terminal Inverted Repeat の配列．

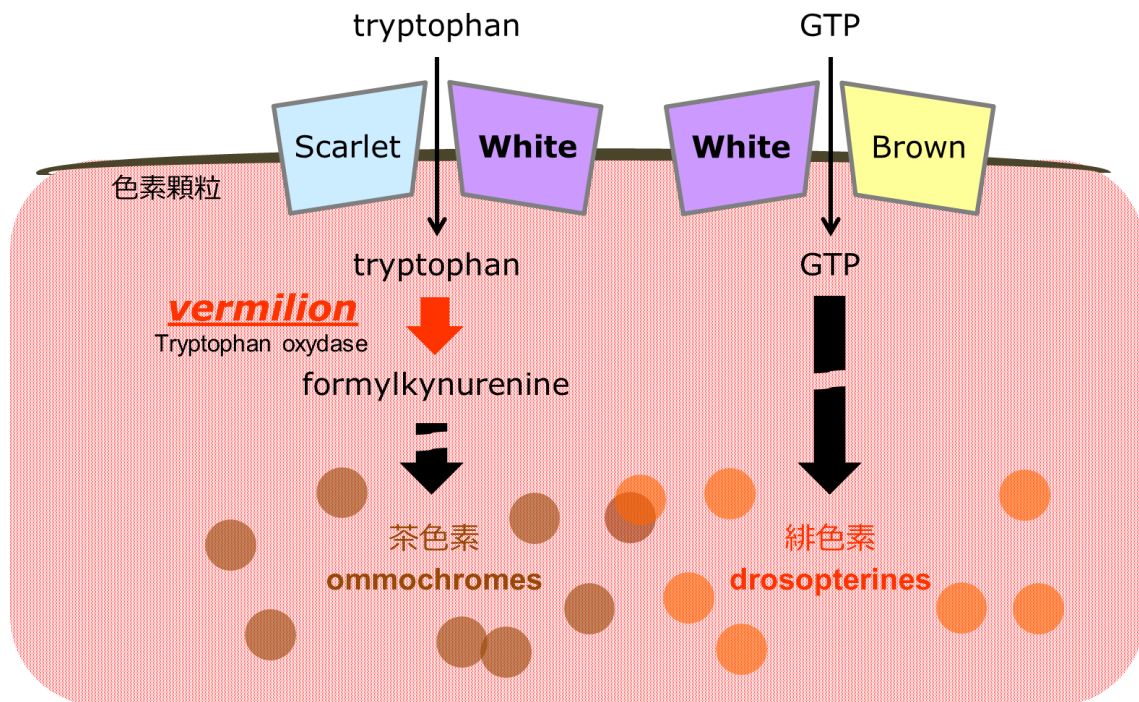


図 2-3. *white* と *vermilion* の色素に関する機能. *white* は ABC トランスポーターのサブユニットとしての機能を有する. *White* は *Scarlet* や *Brown* とそれぞれ 2 量体を形成し, ommochromes (茶色色素) と dorosopterines (緋色素) の前駆体を色素顆粒に取り込む役割を担うため, *white* 欠損個体ではどちらの色素も合成されず, 白眼になる. *vermilion* は, ommochromes を合成する過程で働く, トリプトファンオキシゲナーゼをコードしている. *vermilion* 欠損個体では, drosopterines のみが合成されるため, 眼は鮮赤色を呈する.

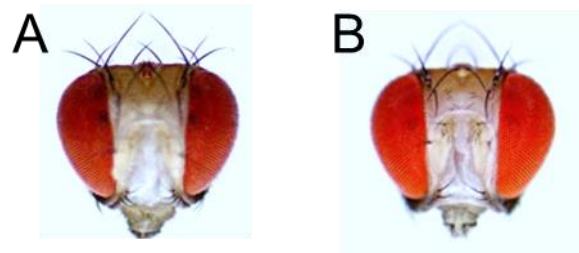


図 2-4. テナガシヨウジョウバエの眼の色調. (A) 野生型. (B) *vermilion*.

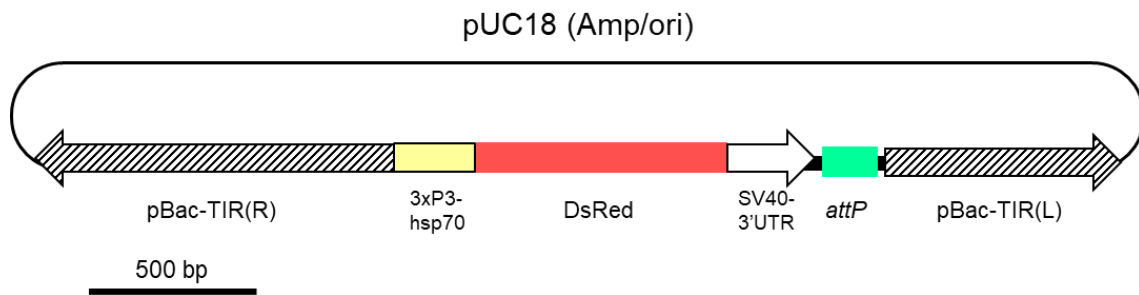


図 2-5. pBac[3xP3DsRed-*attP*(AF)]プラスミドの構造. pBac-TIR : *piggyBac* Terminal Inverted Repeat の配列, 3xP3-hsp70 : 3 つの *eyeless* 転写因子の結合配列と *hsp70* の最小プロモーター領域とが接続された配列.

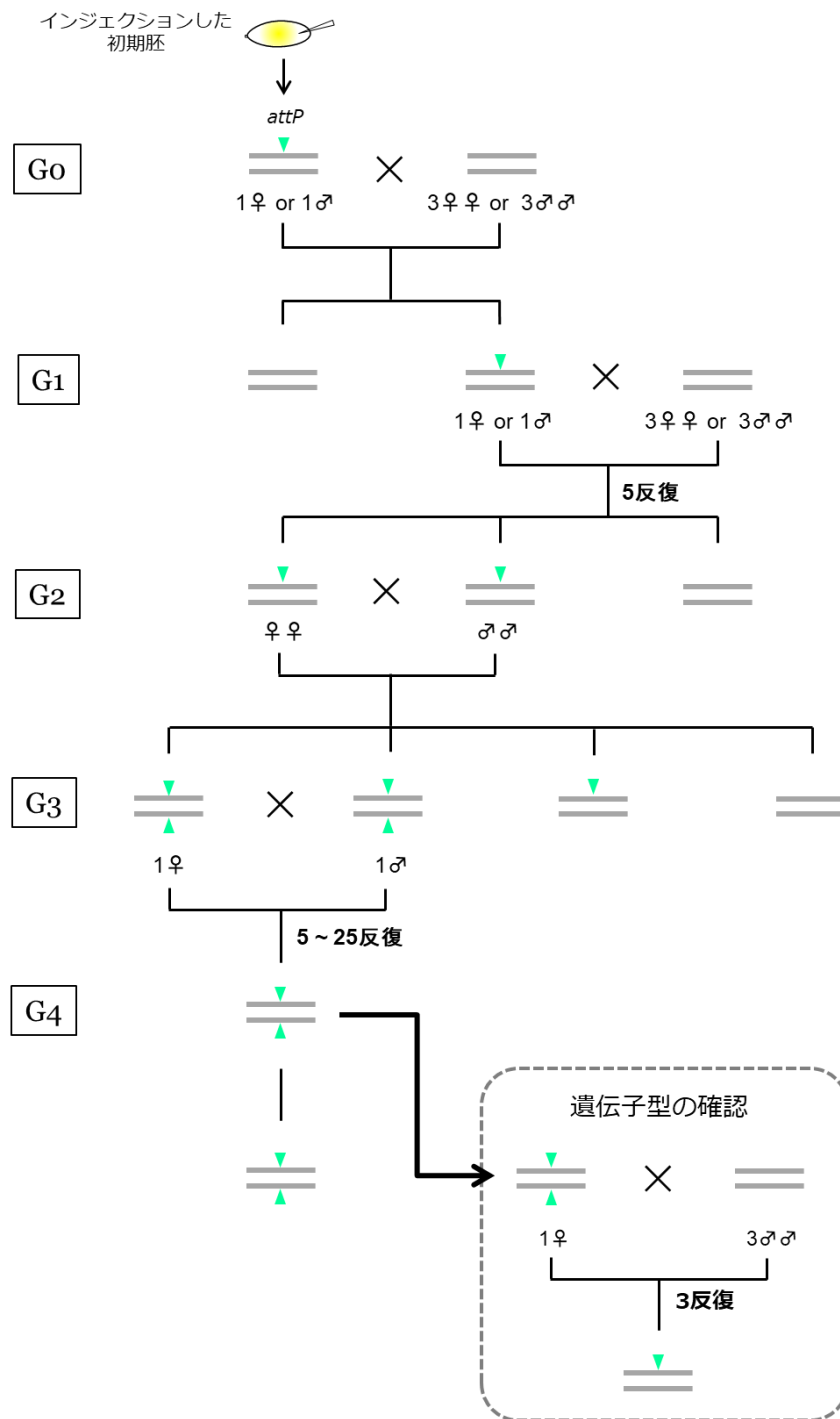


図 2-6. *piggyBac* を用いた形質転換における掛け合わせ方法. 灰色の線は、ゲノムを表しており (G_0 世代においては、生殖細胞のゲノムを表している), 矢じりは *attP* 配列の挿入を示している. また, 単純化するために, 1 ペアの常染色体のみ示している. 掛け合わせた個体数は, ♀もしくは♂の場合は 1 頭, ♀♀もしくは♂♂の場合は複数頭である (前に数字が付く場合は個体数を示している).

マイクロインジェクションした初期胚から発生した G_0 世代の成虫はそれぞれ 1 頭ずつ掛け合わせて、 G_1 世代の幼虫を得た。これらの G_1 世代の幼虫は DsRed の蛍光マーカーによってスクリーニングした。各 G_0 世代の成虫について、5 頭の G_1 世代成虫から G_2 世代の子を得て、再び DsRed の蛍光マーカーによってスクリーニングした。同じ G_1 世代の成虫に由来する G_2 世代の成虫を掛け合わせて、 G_3 世代の子を得た。 G_3 世代では、ホモ接合型の蛍光強度がヘテロ接合型よりも強いことを利用して、ホモ接合型の幼虫を同定した。 G_3 世代の成虫は、雌雄 1 頭ずつ掛け合わせ（蛍光強度によって、ホモ接合型が見分けられる場合は最大 5 ペア、見分けられない場合は最大 25 ペア）、ホモ接合系統を確立した。 G_4 世代ファミリーは、3 反復の掛け合わせによって遺伝子型を確認した。

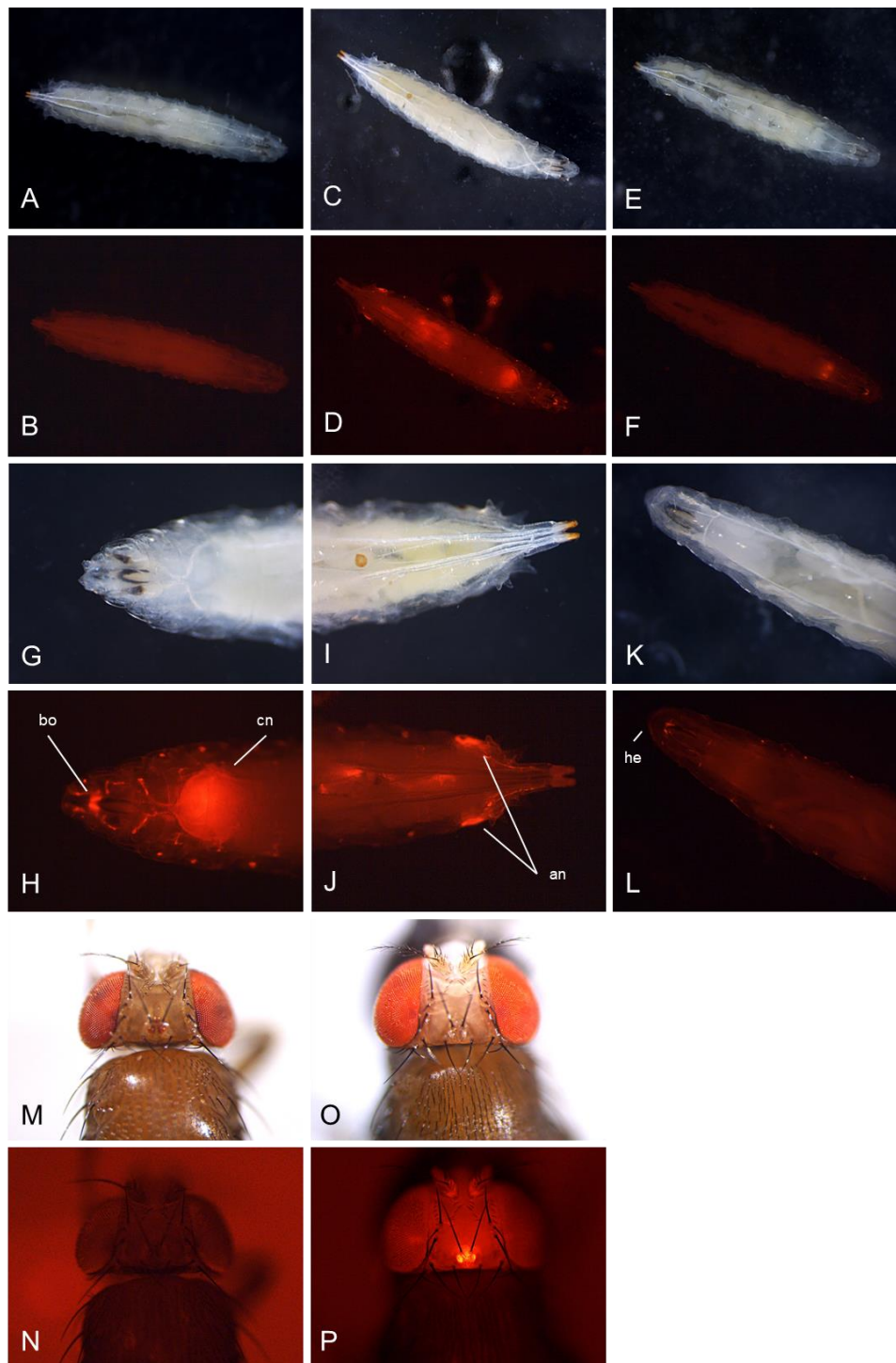


図 2-7. 形質転換体の蛍光パターン. (A, B, M, N) 野生型. (C, D) *attP243* 系統. (E, F) *attP252A* 系統. (G~J, O, P) *attP460* 系統. bo : bolwig's organ, cn : CNS, an : anal pads. (K, L) *attP243* 系統. he : head region. (A, C, E, G, I, K, M, O) 自然光. (B, D, F, H, J, L, N, P) DsRed フィルター.

第3章 テナガショウジョウバエにおける phiC31/*attP* システムを用いた部位特異的な遺伝子導入

3-1. 緒言

第2章で利用した *piggyBac* を用いた形質転換法は多様な生物種で利用できるという利点がある一方、運搬できる遺伝子サイズに制限があり、ポジション効果を制御できないという問題があった。ポジション効果の制御は遺伝子の機能を精確に確かめるには必要不可欠であり、そのための方法の一つは、インスレーターの利用である (Roseman et al., 1995)。インスレーターとは、遺伝子の周囲に存在する *cis* 制御領域からの効果をブロックする配列のことである (Bell & Felsenfeld, 1999)。インスレーターを用いることで、ゲノム上の異なる部位に組み込まれた遺伝子をより正確に比較することが可能になる (Roseman et al., 1995; Venken & Bellen, 2007)。

外来遺伝子の周囲の環境を一定にするために、異なる遺伝子をゲノム上の同じ部位に組み込み、比較してもよい。自由に遺伝子を組み込む場所を事前に決められるという点で最も精度の高い機能解析を行うことができる技術は相同組換え (Homologous recombination: HR) 法であるが、組換え頻度が非常に低いという欠点があった。例えば哺乳類細胞では、 10^{-6} の頻度でしか組換えが起こらず、二本鎖切断酵素を用いて導入効率を高めた場合であっても 1% に満たない効率でしか組み込むことができなかった (図 3-1A: Portes & Annals, 2011)。

相同組換え法に対して配列特異的な遺伝子導入法は、予めゲノム内に組換え酵素が認識するターゲット配列を組み込んでおく必要があるため手間はかかるものの、効率の高さや運搬できる遺伝子サイズの大きさから多くのモデル種で利用されている (Hardy et al., 2010; Olorunniji et al., 2016)。配列特異的組換え酵素として主要なものには、チロシンリコンビナーゼファミリーに属する Cre と Flp およびセリンインテグレースファミリーに属する phiC31 がある。バクテリアオファージ P1 由来の Cre リコンビナーゼと *Saccharomyces cerevisiae* 由来の

Flp リコンビナーゼは、それぞれ 1 組の *loxP* 配列および *FRT* 配列間の組換えを触媒する（図 3-1B：Siegal & Hartl, 1996；Golic et al., 1997）。これらの酵素は遺伝子の組み込みだけでなく切り出しも触媒するため、ゲノム内に組み込んだ遺伝子が安定的に維持されず、導入効率が低かった。

一方、*Streptomyces* 属に感染するテンプレートバクテリオファージに由来する phiC31 インテグレースは、*attP* 配列と *attB* 配列という相同性の低い 2 つの配列を認識して、遺伝子を組み込む（図 3-1C：Lomovskaya et al., 1970）。組み込まれた遺伝子の両末端には、*attP* 配列と *attB* 配列を半分ずつ有する *attL* 配列と *attR* 配列が新たに生成され、切り出し反応におけるターゲットとなる。Cre や Flp などのリコンビナーゼとは異なり、phiC31 インテグレースは付属タンパク質である gp3（Recombination directionality factors：RDFs の一種）が存在しない条件下では切り出し反応を触媒しない（Khaleel et al., 2011）。よって、phiC31 を用いて組み込んだ遺伝子はゲノム内に安定的に維持されるため、遺伝子導入効率はリコンビナーゼを用いた場合よりも高くなる。加えて phiC31 には、組み込むことのできる遺伝子のサイズに上限がなく、大きなサイズの遺伝子であっても効率良く組み込めるという利点がある（Venken et al., 2006）。Groth らは 2004 年に、昆虫では初めてキイロショウジョウバエで phiC31/*attP* システムを遺伝子導入に利用した（Groth et al., 2004）。phiC31/*attP* システムを用いた遺伝子導入は、*attP* 配列、*attB* 配列およびインテグレースさえあればよいから、植物から脊椎動物までのあらゆる生物種で用いられている（Groth et al., 2000, 2004；Lutz et al., 2004；Allen & Weeks, 2005；Chalberg et al., 2005；Bateman et al., 2006；Nimmo et al., 2006；Ma et al., 2006, 2014；Venken et al., 2006；Bischof et al., 2007；Kittiwongwattana et al., 2007；Leighton et al., 2008；Rubtsova et al., 2008；Schetelig et al., 2009；Kempe et al., 2010；Labbe et al., 2010；Lister, 2010；Thomson et al., 2010；Chen et al., 2011；Franz et al., 2011；Lu et al., 2011；Meredith et al., 2011, 2013；Kapusi et al., 2012；Yonemura et al., 2012, 2013；Long et al., 2013；Kirchmaier et al., 2013；Mosimann et al., 2013；Sekhavati et al., 2013；Meza et al., 2014；

Pondevill et al., 2014).

本章の目的は、第2章で確立した37の *attP* 挿入系統に対して、*phiC31* インテグラーゼを用いた遺伝子導入が可能かどうかを確かめ、系統間で遺伝子導入効率を比較して、実用性の高い系統を選抜することである。以上の目的を達成するために必要な最小限の要素は可視マーカーとして利用する *vermilion*⁺のみである。ところで、テナガショウジョウバエはキイロショウジョウバエに近縁であるため、キイロショウジョウバエ用に作製されたコンストラクトを用いることができれば、ベクター作製にかかる手間やコストを抑えられる。そのためには、キイロショウジョウバエの *vermilion*⁺によってテナガショウジョウバエの *vermilion*⁻変異体の眼の色が野生型に復帰するかどうかを調べる必要がある。以上に加えて、遺伝子の組み込みには少なからず手間がかかるため、将来的に有用な遺伝子も組み込んでおきたいと考え、コンストラクトにはキイロショウジョウバエ用に作製された *pBFv-nosP-Cas9* を選んだ。このコンストラクトには、キイロショウジョウバエの *vermilion*⁺と生殖細胞特異的に *Cas9* エンドヌクレアーゼを発現させる *nosP-Cas9* が含まれている (Kondo & Ueda, 2013)。*Cas9* エンドヌクレアーゼとはゲノム編集技術の一種である CRISPR/*Cas9* システムにおいて二本鎖を切断する酵素であり、このコンストラクトをテナガショウジョウバエに組み込むことができれば、短い sgRNA を設計して初期胚にマイクロインジェクションするだけで、ゲノム上の特定の部位にある遺伝子を狙って高効率に遺伝子操作を行うことが可能になる。

3-2. 材料および方法

3-2-1. 供試昆虫

第2章で確立した *attP* 挿入系統のうち、ホモ接合型として維持することができた37系統を用いた。12:12時間明暗サイクル、20℃条件下で実験を行った。全てのステージについて、一般的なショウジョウバエの餌を用いて飼育した。

3-2-2. ドナーおよびヘルパープラスミド

pBFv-*nosP-Cas9* プラスミド (Kondo & Ueda, 2013) は、改変せずに使用した。また、pET11phiC31poly(A) プラスミドは Michele Calos 博士より分譲していただいた (Addgene plasmid # 18942 ; Groth et al., 2004)。

3-2-3. インジェクション液の調製

pBFv-*nosP-Cas9* プラスミド (以下、ベクターDNA) は、QIAGEN Plasmid Mini kit を用いて精製した。phiC31 インテグレース (以下、ヘルパーRNA) は、*Bam*HI (NIPPON GENE, Toyama, Japan) で直鎖化した pET11phiC31poly(A) から mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて、*in vitro* で mRNA に転写した。合成された phiC31 インテグレース mRNA は、MEGAclear kit を用いて精製した。ベクターDNA は、最終濃度 600ng/μL になるようにヘルパーRNA (最終濃度 200ng/μL) と混合して調整した。

3-2-4. マイクロインジェクション

マイクロインジェクションは第 2 章に記述した方法で行った。

3-2-5. 形質転換体の掛け合わせと確認

未交尾の G_0 世代の成虫は、異なる性別の *vermilion*⁻ の未交尾成虫と掛け合わせた (図 3-2)。 G_1 世代の成虫は眼の色によってスクリーニングを行い、*vermilion*⁺ 成虫を遺伝子導入に成功した個体とした (図 3-2)。羽化した G_2 世代の成虫は、同じ G_1 世代の成虫に由来するものどうしを掛け合わせた。

ホモ接合化に成功したかどうかは、 G_4 世代の未交尾メス成虫と *vermilion*⁻ 系統のオス成虫を少なくとも 3 ペア以上かけ合わせることによって確かめた。全てのペアで、全ての幼虫が蛍光を発していた場合に、 G_4 世代でホモ接合化に成功していたと判断した。

3-3. 結果

テナガシヨウジョウバエにおいても、*phiC31/attP* システムを用いた遺伝子導入法を利用できるかどうかを確かめるために、キイロシヨウジョウバエで開発されていた *nosP-Cas9* コンストラクト (Kondo & Ueda, 2013) を使用した。遺伝子導入時のマーカーとしてキイロシヨウジョウバエの *vermilion*⁺を用いた。*nos-Cas9* コンストラクトの組み込みに成功した G₁ 世代の個体では、眼の色が鮮赤色から赤色に復帰していた。ただし、テナガシヨウジョウバエの野生型と成虫の眼の色を比較すると *nos-Cas9* 導入系統の眼の色はやや明るかった。

本実験では、*phiC31/attP* システムによって遺伝子を組み込めるかを確かめると同時に *attP* 挿入系統ごとの遺伝子導入効率も評価した。*attP* 配列のゲノム上の組み込み部位によって遺伝子導入効率は異なっており、実際に利用する上で有用になる遺伝子導入効率の高い系統を選別したいためである。マイクロインジェクションを行った際の遺伝子導入効率が 3%程度であれば、およそ 100 個の初期胚にマイクロインジェクションを行えば 95%の確率で 1 頭は形質転換体を得ることができる。この確率を目安に、各 *attP* 挿入系統について 200 個程度の初期胚にマイクロインジェクションを行い、G₁ 世代で形質転換体を得られた G₀ 世代の個体の数についてマイクロインジェクションした初期胚に対する割合を計算した。その結果、遺伝子導入効率が 3%以上だった系統として *attP429A* と *attP449* を得ることができ、2%以上だった系統として *attP243*, *attP252B*, *attP420*, *attP440*, *attP460*, *attP506*, *attP539*, *attP566* を得ることができた (表 3-1)。これらの系統の中でも特に遺伝子導入効率が高かった *attP429A* 系統と *attP449* 系統は、今後高効率に遺伝子導入を行う上で役立つと期待できる。一方、*attP178*, *attP223*, *attP252A*, *attP415A*, *attP429B*, *attP441*, *attP589A*, *attP602B* の 8 系統を用いた場合、200 個の初期胚にマイクロインジェクションを行うだけでは遺伝子を組み込むことができなかった (表 3-1)。

3-4. 考察

キイロショウジョウバエ用に作製されたベクターを改変することなくテナガショウジョウバエでも利用するには、これらの2種間でプロモーターやマーカ―遺伝子の機能が保存されている必要がある。今回の実験では、キイロショウジョウバエの *vermilion*⁺によってテナガショウジョウバエの *vermilion* 変異体の眼が野生型に近い色まで復帰したことから、2種間で *vermilion* の機能は最低限保存されていることが示された。よってキイロショウジョウバエの *vermilion*⁺ は、今後も遺伝子導入時の可視マーカーとして利用することができる。ただし、野生型と比べると *nos-Cas9* 導入系統では眼の色が若干明るいため、ポジション効果を差し引いて考えても、全く同じ機能を有しているわけではないと示唆された。

外来遺伝子の発現パターンは組み込まれた部位の周囲の遺伝的な環境に影響を受けることが知られている。そのため実際に利用する際には、同じコンストラクトを組み込んだ複数の *attP* 挿入系統を比較し、ポジション効果が表現型に及ぼす影響を確かめなくてはならない (Bischof et al., 2007; Stern et al., 2017)。また、様々な実験で何度も遺伝子を組み込みたいので、願わくはこれらの *attP* 挿入系統における遺伝子導入効率が高いものであってほしい。これらの要件を満たすために、できる限り多くの *attP* 挿入系統を第2章で確立した。第2章では、56の *attP* 挿入系統が見出され、その内37の系統についてホモ接合化することができた。第3章で、これらの系統について *nosP-Cas9* コンストラクトを用いて遺伝子導入効率（マイクロインジェクションした初期胚の内、遺伝子導入に成功した G₀ 成虫の割合）を調べた結果、0～3.4%と系統間で差があった。このように、*attP* 挿入系統間での遺伝子導入効率に違いに影響を及ぼし得る要因はいくつかある。まず、系統間で *attP* 配列が組み込まれた部位周辺の染色体環境が異なり、*phiC31* インテグレースと *attP* 配列との結合効率に影響を与えていると考えられる。あるいは、実験操作上のアーティファクトであるかもしれない。例えば、卵を産んだ成虫の交尾経験や栄養状態も卵の孵化率を通して遺

伝子導入効率に影響したかもしれないし、ベクターDNAと共にマイクロインジェクションした phiC31 インテグレース mRNA の質が遺伝子導入効率を左右したかもしれない。以上の3つの要因の内、アーティファクトである可能性については、各実験を分割して行うことによって極力取り除くように努めた。まず、産卵に用いる成虫の質をできるだけ一定にするために飼育環境を揃えるのはもちろん、同じ系統へのマイクロインジェクションは何日かに分けて行った。そして、mRNAの質を系統間で揃えるために同一系統へのマイクロインジェクションを異なるロットの mRNA を用いて行った。これらの調整により実験上のアーティファクトが遺伝子導入効率に与える影響をある程度制御することができたといえよう。従って、本実験で得ることができた遺伝子導入効率が高い *attP* 挿入系統は、今後も高効率に遺伝子導入を行えることが示唆された。

表 3-1. phiC31 インテグレースを用いたテナガシヨウバエへの遺伝子導入.

系統名	マイクロ インジェクション した初期胚数	孵化		G ₀ 成虫数	次世代が得られた G ₀ 成虫数	形質転換 G ₀ 成虫数 [†]	形質転換 効率(%) [‡]	総形質転換 効率(%) [§]
		幼虫数	成虫数					
<i>attP35</i>	199	105 (52.8%)	55 (52.4%)	27 (49.1%)	2	7.4	1.0	
<i>attP42</i>	182	79 (43.4%)	43 (54.4%)	31 (72.1%)	1	3.2	0.5	
<i>attP54</i>	197	136 (69.0%)	92 (67.6%)	55 (59.8%)	3	5.5	1.5	
<i>attP55</i>	197	124 (62.9%)	69 (55.6%)	35 (50.7%)	1	2.9	0.5	
<i>attP87</i>	210	108 (51.4%)	75 (69.4%)	55 (73.3%)	2	3.6	1.0	
<i>attP91</i>	194	112 (57.7%)	64 (57.1%)	49 (76.6%)	3	6.1	1.5	
<i>attP178</i>	198	146 (73.7%)	92 (63.0%)	73 (79.3%)	0	0.0	0.0	
<i>attP223</i>	191	114 (59.7%)	61 (53.5%)	34 (55.7%)	0	0.0	0.0	
<i>attP243</i>	202	111 (55.0%)	65 (58.6%)	52 (80.0%)	5	9.6	2.5	
<i>attP252A</i>	205	131 (63.9%)	87 (66.4%)	68 (78.2%)	0	0.0	0.0	
<i>attP252B</i>	197	129 (65.5%)	88 (68.2%)	49 (55.7%)	4	8.2	2.0	
<i>attP403B</i>	201	132 (65.7%)	69 (52.3%)	33 (47.8%)	2	6.1	1.0	
<i>attP405</i>	199	132 (66.3%)	91 (68.9%)	73 (80.2%)	2	2.7	1.0	
<i>attP413</i>	198	139 (70.2%)	92 (66.2%)	73 (79.3%)	3	4.1	1.5	
<i>attP415A</i>	194	122 (62.9%)	80 (65.6%)	45 (56.3%)	0	0.0	0.0	
<i>attP415B</i>	194	122 (62.9%)	77 (63.1%)	48 (62.3%)	1	2.1	0.5	
<i>attP420</i>	196	117 (59.7%)	74 (63.2%)	58 (78.4%)	5	8.6	2.6	

[†] G₁ 世代において, *vermillion*⁺ の子を産んだ G₀ 世代の成虫数.

[‡] 次世代が得られた G₀ 世代の成虫の内, 遺伝子導入に成功した G₀ 世代の成虫の割合.

[§] マイクロインジェクションした初期胚の内, 遺伝子導入に成功した G₀ 世代の成虫の割合.

表 3-1. 続き.

系統名	マイクロ インジェクション した初期胚数	孵化 幼虫数	G ₀ 成虫数	次世代が得られた G ₀ 成虫数	形質転換 G ₀ 成虫数 [†]	形質転換 効率(%) [‡]	総形質転換 効率(%) [§]
<i>attP429A</i>	202	130 (64.4%)	79 (60.8%)	55 (69.6%)	6	10.9	3.0
<i>attP429B</i>	213	148 (69.5%)	81 (54.7%)	42 (51.9%)	0	0.0	0.0
<i>attP440</i>	194	127 (65.5%)	93 (73.2%)	61 (65.6%)	5	8.2	2.6
<i>attP441</i>	202	131 (64.9%)	54 (41.2%)	37 (68.5%)	0	0.0	0.0
<i>attP446</i>	197	114 (57.9%)	87 (76.3%)	64 (73.6%)	3	4.7	1.5
<i>attP449</i>	204	124 (60.8%)	75 (60.5%)	44 (58.7%)	7	15.9	3.4
<i>attP460</i>	197	112 (56.9%)	76 (67.9%)	42 (55.3%)	5	11.9	2.5
<i>attP490</i>	199	121 (60.8%)	75 (62.0%)	44 (58.7%)	1	2.3	0.5
<i>attP506</i>	190	110 (57.9%)	65 (59.1%)	46 (70.8%)	4	8.7	2.1
<i>attP525</i>	199	124 (62.3%)	80 (64.5%)	71 (88.8%)	3	4.2	1.5
<i>attP539</i>	196	137 (69.9%)	69 (50.4%)	40 (58.0%)	5	12.5	2.6
<i>attP557</i>	209	138 (66.0%)	78 (56.5%)	57 (73.1%)	2	3.5	1.0
<i>attP566</i>	210	123 (58.6%)	75 (61.0%)	54 (72.0%)	5	9.3	2.4
<i>attP589A</i>	199	132 (66.3%)	94 (71.2%)	58 (61.7%)	0	0.0	0.0
<i>attP589B</i>	194	133 (68.6%)	103 (77.4%)	60 (58.3%)	1	1.7	0.5
<i>attP602B</i>	196	145 (74.0%)	67 (46.2%)	55 (82.1%)	0	0.0	0.0
<i>attP623</i>	196	110 (56.1%)	71 (64.5%)	53 (74.6%)	2	3.8	1.0
<i>attP634</i>	199	143 (71.9%)	83 (58.0%)	59 (71.1%)	3	5.1	1.5
<i>attP635</i>	196	121 (61.7%)	69 (57.0%)	44 (63.8%)	1	2.3	0.5
<i>attP636</i>	198	98 (49.5%)	41 (41.8%)	15 (36.6%)	1	6.7	0.5

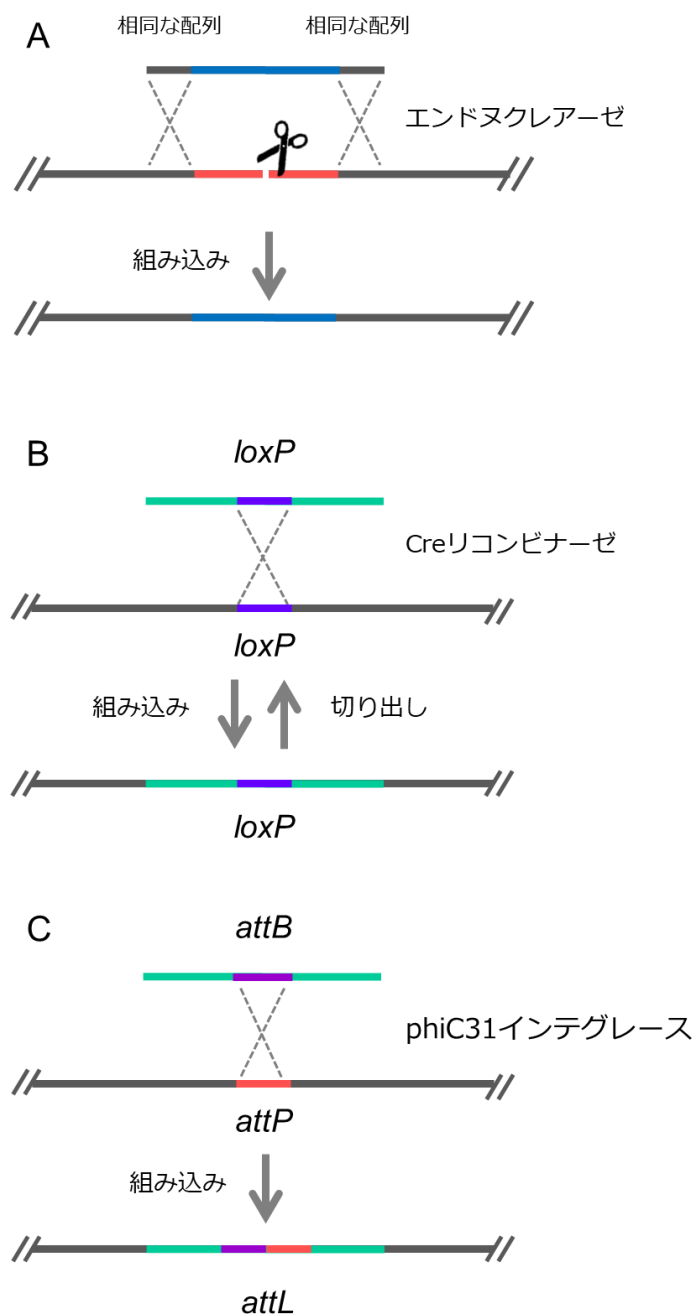


図 3-1. ポジション効果を制御可能な遺伝子導入法. (A) 相同組換えを用いた遺伝子導入法. (B) リコンビナーゼを用いた遺伝子導入法. 図では, Cre リコンビナーゼによる *loxP* 配列間の組換えを示した. (C) インテグラーゼを用いた遺伝子導入法. 図では, phiC31 インテグラーゼによる *attP* 配列と *attB* 配列間の組換えを示した.

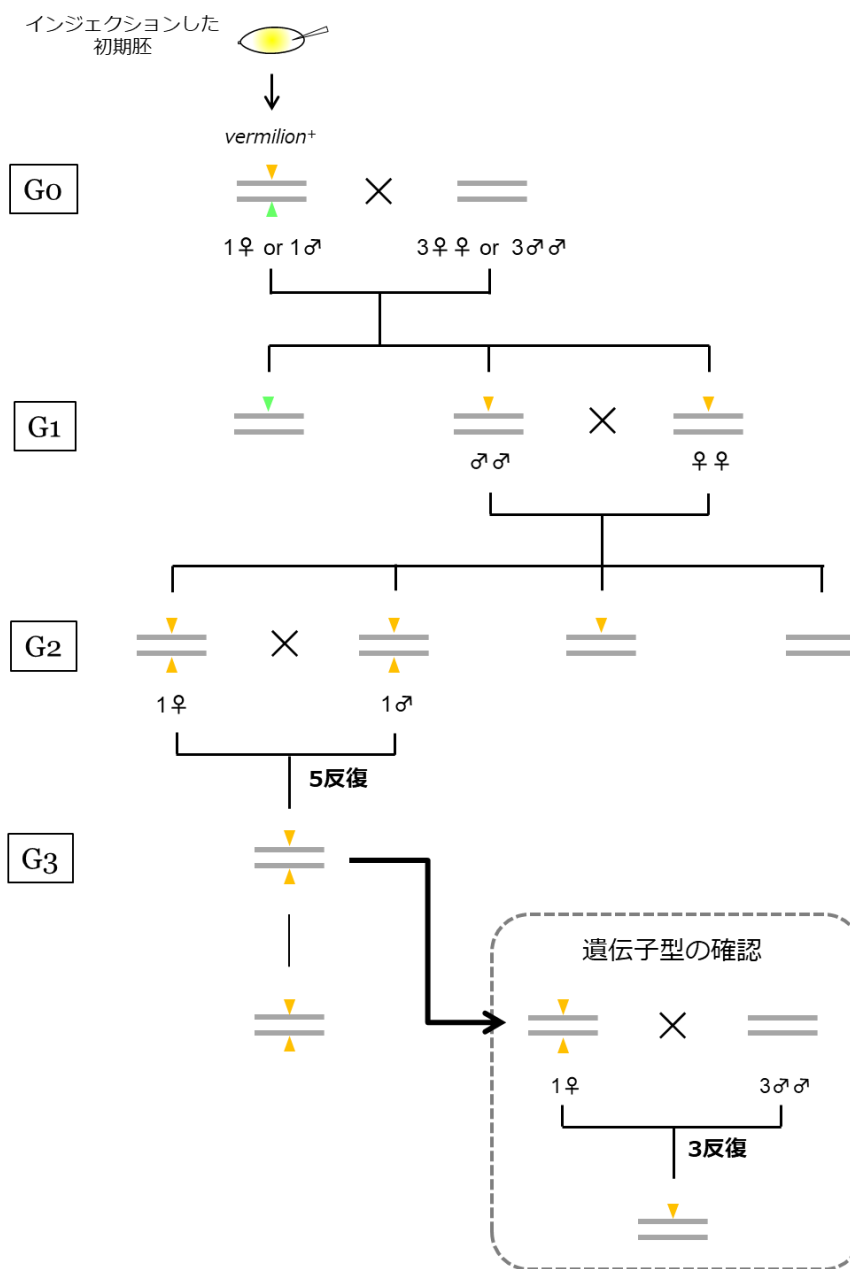


図 3-2. phiC31 インテグレースを用いた遺伝子導入における掛け合わせ. 灰色の線は、ゲノムを表しており (G₀ 世代においては、生殖細胞のゲノムを表している), 緑色の矢じりは *attP* 配列の組み込み位置を示しており, 橙色の矢じりは *attP* 配列に組み込んだ *nosP-Cas9* を示している. また, 単純化するために, 1 ペアの常染色体のみ示している. 掛け合わせた個体数は, ♀もしくは♂の場合は 1 頭, ♀♀もしくは♂♂の場合は複数頭である (前に数字が付く場合は個体数を示している). マイクロインジェクションした初期胚から育成した G₀ 世代の成虫はそれぞれ 1 頭ずつ掛け合わせて, G₁ 世代の成虫を得た. これらの G₁ 世代の成虫は眼の色 (*vermilion*⁺) によってスクリーニングした. 同じ G₀ 系統に由来する G₁ 世代の *vermilion*⁺

成虫を掛け合わせて、 G_2 世代の子を得た。 G_2 世代では、ホモ接合型の蛍光強度がヘテロ接合型よりも強いことを利用して、ホモ接合型の幼虫を同定した。 G_2 世代の成虫は、雌雄1頭ずつ掛け合わせた。ホモ接合系統を確立した。 G_3 世代ファミリーは、3反復の掛け合わせによって遺伝子型を確認した。

第4章 総合考察

本研究では、テナガショウジョウバエに高効率で精確性の高い遺伝子導入技術を導入することを目的とした。そのため、第2章においては *piggyBac* トランスポゾンを用いてゲノム上のランダムな部位に *phiC31/attP* システムを用いるための *attP* 配列を組み込んだ。続く第3章では、テナガショウジョウバエのゲノム内に組み込んだ *attP* 配列をターゲットとして *phiC31* インテグレースを用いた遺伝子導入を行った。以上の結果を踏まえて、テナガショウジョウバエにおける遺伝子導入技術の利用について考察したい。

4-1. テナガショウジョウバエにおけるマイクロインジェクション技術の整備

逆遺伝学的システムを非モデル昆虫に導入する上では、利用したい昆虫で実際にそのシステムが機能するかももちろん重要ではあるが、技術的な面がハードルとなることも多い。遺伝子導入で言えば、マイクロインジェクションに関わる技術がそれに当たるだろう。言い換えれば、ある昆虫で遺伝子導入を行えるか否かは、効率の良い採卵方法やマイクロインジェクションによる生存率の維持、掛け合わせにかかる労力の負うところが大きい。

テナガショウジョウバエはキイロショウジョウバエに近縁であるため、マイクロインジェクションの方法についてキイロショウジョウバエで既に確立された技術を応用することができた部分もある。しかしながら、近縁であるとはいえ、テナガショウジョウバエ独自に確立しなければならない点も多かった。この観点から、テナガショウジョウバエにおける遺伝子導入の具体的な方法についての説明を付章として加えた。以下に、テナガショウジョウバエの初期胚を扱う上で工夫したことを簡単に説明する。

次世代に遺伝子操作の効果を引き継がせるためには、細胞分裂前の初期胚にマイクロインジェクションを行う必要がある。ショウジョウバエでは、1つの核のみを有する最初期の胚から、①多核化する、②分裂した核が表層に並ぶ、

③核を中心に細胞ができるというプロセスで発生が進行していく（図 4-1）。胚の後方には極細胞質が存在しており，細胞分裂の際に極細胞質を取り込んだ細胞が後に生殖細胞へと分化する．最初期の胚から細胞分裂が起こるまでの期間はおおよそ 1 時間程度であるため，マイクロインジェクションを行う際には素早く十分な量の卵を集める必要がある．例えば，キイロショウジョウバエでは，オレンジジュースなどを含む寒天培地を用いて採卵する（Park & Lim, 1995）．寒天培地に産下された卵は，培地の表面を水で流すだけで採集することが可能で，素早く大量の卵を集めるのに適している．当初，テナガショウジョウバエにおいてもこの方法を採用しようとしたが，ジュースの種類・濃度および寒天の固さなどを変えても産卵数が増加しなかった．そこで，行動実験時の餌として利用していた Formula 4-24 Blue Drosophila Medium（ポテト餌）に水，砂糖およびイースト添加した培地を用いたところ，コンスタントに十分な量の卵を採取することに成功した（付章 A. 1-2）．ただし，ポテト培地に産下された卵は一つずつピンセットで集めて水で洗う必要があり手間がかかるため，改善が必要であるかもしれない．

テナガショウジョウバエの卵にマイクロインジェクションを行う上では，卵殻をどのように処理するかも重要な問題である．昆虫の卵は，卵黄膜と卵殻という 2 種類の膜に被われている．一般的に卵黄膜に比べて卵殻は硬いが，昆虫の種類によっては卵殻に特別な処理をすることなく，ガラスの微針でマイクロインジェクションを行うことが可能である（e.g., ハマダラカの 1 種 *Anopheles stephensi* : Catteruccia et al., 2000 ; ナミテントウ *Harmonia axyridis* : Kuwayama et al., 2006 ; ヒロズキンバエ *Lucilia sericata*, ヒツジキンバエ *Lucilia cuprina* : Concha et al., 2011 ; アワノメイガ *Ostrinia furnacalis* : Liu et al., 2012 など）．一方で，次亜塩素酸ナトリウム水溶液に浸して卵殻を薄く，柔らかくしたり（e.g., ミカンコミバエ *Bactrocera dorsalis* : Handler & McCombs, 2000 ; イエバエ *Musca domestica* : Hediger et al., 2001 ; ショウジョウバエ類 : Rubin & Spradling, 1982）, ピンセットで卵殻を除去したり（e.g., ショウジョウバエ類 : Depra et al., 2004）,

あるいはタングステンの微針を用いて卵殻に孔を開けてからマイクロインジェクションを行わなければならない種も存在する (e.g., カイコ: Tamura et al., 2007). 卵殻の除去なしにマイクロインジェクションを行うことができない種では卵殻を除去した際の初期胚の生存率は全体の作業効率に影響するため非常に重要であるが、ほとんど昆虫でその生存率は低い。そのため、テナガショウジョウバエにおいても卵殻を除去した際の生存率の低さを憂慮していたが、幸いにも、飼育下で最も増殖効率の良い BaVi044 系統とそれに由来する *vermilion* 系統の卵殻をピンセットで除去した際の孵化率は、無処理のものと比較しても同程度に高かった。

本研究で、テナガショウジョウバエのマイクロインジェクションに関わる諸所のパラメータを最適化することができたことにより、テナガショウジョウバエで遺伝学的な解析を行うための技術基盤を固めることができたといえる。

4-2. *phiC31/attP* システムの利用

遺伝子導入技術にはいくつかの種類があり、それぞれに利点と欠点がある。ある生物へ新たな遺伝子導入技術を導入するためにかかる労力やコストは大きい場合、どの技術を利用するかについては目的を踏まえた上での検討が必要不可欠となる。例えば、第 2 章で利用した *piggyBac* トランスポゾンを利用できる種の範囲が広く、効率よく遺伝子を組み込むことができる一方、組み込み部位のランダム性によってポジション効果や遺伝子の破壊が問題となった。それに対して、第 3 章で利用した *phiC31/attP* システムは配列特異的に遺伝子を組み込むことが可能であるため、ポジション効果を一定にすることが可能で、組み込むことができる遺伝子サイズに上限がないという利点がある一方、利用に際しては、事前に *attP* 配列をゲノム内に組み込んでおく必要があり、労力がかかってしまう。

本研究では、テナガショウジョウバエで遺伝子導入を行うための技術として *phiC31/attP* システムを選択した。なぜなら、たとえ手間がかかるとしてもテナ

ガショウジョウバエにおいて遺伝子の発現を低下させたり機能を欠失させたりするだけでなく、サイズやポジション効果の違いを考慮せずに遺伝子を組み込めるようになるメリットは計り知れないからである。テナガショウジョウバエはその形態もさることながら、オス間での激しい闘争や固有の求愛行動および求愛戦術の可塑性、メスの交尾受容性の低さなど非常に興味深い行動も有している。形態とは異なり行動は状況によっても変化してしまうため、各行動形質に関わる遺伝子を探索する上で、ポジション効果を一定にすることが可能な *phiC31/attP* システムを用いることができるようになったことは非常に意義深い。また、神経遺伝学的な解析を行うことも可能である (Jones, 2009)。例えば、熱遺伝学 (Thermo-genetics) や光遺伝学 (Opto-genetics) を併用すれば、特定の神経を強制的に発火させたり抑制させたりすることもでき、それに伴う行動の解発も観察することができる (Owald et al., 2015)。このような高度な遺伝学的操作に用いられるコンストラクトは、マーカー遺伝子だけでなくプロモーターなどの制御配列を含むためにサイズが大きく (e.g., Bosch et al., 2015)、トランスポゾンや CRISPR/Cas9 システムでは組み込めたとしても非常に効率が悪い。そのため、*phiC31/attP* システムを利用することによってこれらのコンストラクトを効率よく導入することが可能になる。

これまで非モデル昆虫で利用されてきた RNA 干渉は機能欠損型の遺伝子操作しか行うことができなかった。たとえ RNA 干渉で遺伝子の発現を低下させたとしても、他の遺伝子はその機能を補完すれば、表現型への影響が検出されにくくなってしまう。一方で、*phiC31/attP* システムによる遺伝子導入は機能獲得型の遺伝子操作であり、機能欠損型の操作に比べて表現型の変化が起こる可能性が高くなるため、非モデル生物における遺伝子機能の解析がよりスムーズに行えるようになると期待できる。

本研究で遺伝子導入システムの導入を目指したテナガショウジョウバエは、形態や行動が非常にユニークである。現在、オスの闘争行動およびメスの受容性に関わる遺伝子の特定が進められており、いくつかの候補遺伝子が見つかった。

てきている (Kudo et al., 2017; 等ら, 未発表). 候補遺伝子の中から偽陽性の遺伝子を排除し, 真のターゲットを抽出するためには, それぞれの遺伝子が表現型に及ぼす影響を精確に把握する必要がある. 本研究で確立した *attP* 挿入系統を用いれば, 遺伝的背景を揃えた上で, ゲノム上の同じ部位に異なる遺伝子が組み込まれた個体を用いて表現型を比較することが可能になるため, テナガシヨウジョウバエで見つかった候補遺伝子を精査できる段階に至ったといえる. また, 他の昆虫と比べて遜色ない効率で遺伝子導入できる *attP* 挿入系統を選抜することができたことで, ある形質を制御する遺伝子の候補が複数ある場合であっても対応できる.

4-3. 今後の展望

本研究で確立した *attP* 挿入系統を遺伝子導入実験に利用する前に, まず各系統について Inverse PCR を用いた *attP* 配列の組み込み部位の特定を行い, キイロシヨウジョウバエのゲノム情報と比較して組み込まれた部位の近傍に位置する遺伝子を調べる必要がある. そして, 遺伝子導入による他の遺伝子への影響が少ない系統を選抜し, 遺伝子導入効率に関する情報も併せて, 実際に利用する系統を絞り込むべきである.

遺伝子導入効率が高く, 周辺の遺伝子に影響が少ない *attP* 挿入系統が選抜できた場合に導入する遺伝子の第一候補としては, テナガシヨウジョウバエのオス脳特異的に発現していた遺伝子として特に発現量が高かった 6 遺伝子 (*astray*, *astrocytic leucine-rich repeat molecule*, *Septin 4*, *Sialyltransferase*, *windpipe*, *α -Esterase-5*) がよいだろう. これらの遺伝子をテナガシヨウジョウバエのゲノムに組み込み, 闘争行動などの表現型を観察することによって, それぞれの遺伝子がテナガシヨウジョウバエのオスに特有の行動にどの程度寄与しているかを明らかにできると期待できる (Kudo et al., 2017).

オプトジェネティクス用のコンストラクトを導入すれば, 闘争やテナガシヨウジョウバエ固有の求愛行動である Leg vibration を制御するコマンドニューロ

ンの探索も可能になる．また，カルシウムイメージングを利用すれば，闘争や求愛時のテナガショウジョウバエ脳内における神経活動のリアルタイムな観察も実現できる．さらに，形態に関しても，キイロショウジョウバエや他の昆虫で既に機能が明らかになっているプロモーターや遺伝子に操作を加えることができれば，テナガショウジョウバエの特徴的な体サイズや前脚の発生を制御する遺伝子を解明できるかもしれない．

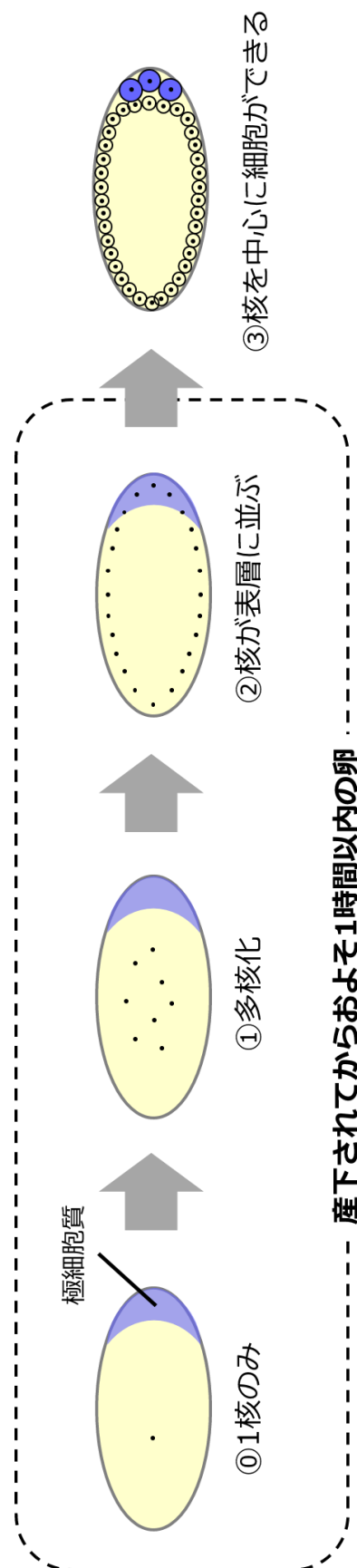


図 4-1. 初期胚の発生の概略図. ①発生が全く進んでいない状態の初期胚. 核は細胞内に1つのみ存在する. ①細胞分裂を伴わず, 核のみが分裂して多核化する. ②核が表層に並ぶ. この段階までには, 発生が始まってからおよそ1時間経過している. ④表層に並んだ核を中心に細胞ができる.

付章 プロトコル

付章 A. *piggyBac* トランスポゼースを用いた遺伝子導入

目次

	ページ
1. ハエのステージング	
1-1. 系統	60
1-2. 採卵用成虫の準備	60
2. インジェクション液	
2-1. プラスミド	63
2-2. ヘルパーRNA合成と精製, クオリティチェック	63
2-3. インジェクション液の調製	64
2-4. 溶液の保存と使用回数	65
3. マイクロインジェクション	
3-1. マイクロインジェクション用の器具	66
3-2. 採卵およびマイクロインジェクションのためのセッティング	69
3-3. マイクロインジェクション	72
3-4. 孵化幼虫の回収	74
4. 導入遺伝子のホモ接合化 (<i>attP</i> 系統の確立)	
4-1. 各世代における掛け合わせ	76
4-2. 各世代におけるスクリーニング	76
4-3. 幼虫の蛍光観察	79
付録A-1. <i>attP</i> 配列のホモ接合化のための掛け合わせ手順の図解	82

1. ハエのステージング

1-1. 系統

phiC31 インテグレースによる遺伝子導入時の可視マーカーとするため、テナガシヨウジヨウバエの *vermilion*⁻ 系統を用いた。なお、*vermilion*⁻ 系統は、野生型 (BaVi044) 系統にエチルニトロソ尿素 (N-ethyl-N-nitrosourea : ENU) で変異を誘発させることにより作成した。X 染色体上の *vermilion* ORF の 1070 番目の塩基がアデニン (A) からグアニン (G) に置換したことで、358 番目のアミノ酸がロイシンからアルギニンに置換したミスセンス突然変異体である。

1-2. 採卵用成虫の準備

1-2-1. 羽化成虫を集める

■ 0～5 日齢まで

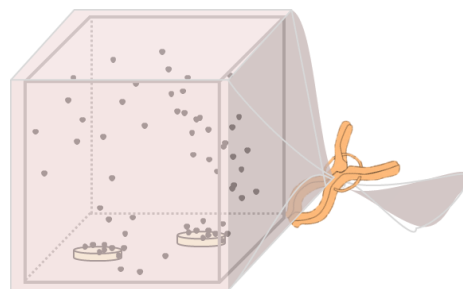
6×11cm の紙 (ティッシュなどの柔らかい紙ではなく、ペーパータオルなどの堅めの紙) を半分に折って挿した餌ボトルを用意し、1 ボトルにつき 150～200 頭の密度で飼育する。低密度で飼育する方が成虫の死亡率は低くなる。密度が高いからといって 1 頭当たりの産卵数が減るわけではないようだが、餌上で各個体どうしが重なり合わないくらいの密度にとどめておくのが良い。なお、この間に餌ボトルを替える必要はない。

■ 6 日齢以降

採卵するために成虫を入れる容器は、①網ケージと②ボトルの 2 種類ある。①網ケージは一度にたくさん採卵したい場合に適しているが、場所をとってしまうため複数系統を同時に扱う場合には不向きである。一方、②ボトルは場所をとらないため複数系統を同時に扱う場合に適しているが、内部が狭いため加えられる成虫数は限られ、翅が折れるなど成虫の劣化が早い。

① 網ケージの場合

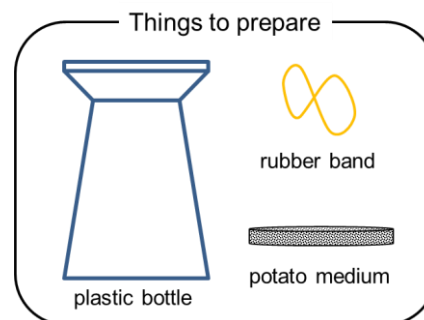
網ケージ（15×15×15cm）に飼育ボトル 2～3 本分の成虫を移し、産卵させる。成虫の餌および産卵用の培地として、Formula 4-24 Blue Drosophila Medium（以下、ポテト餌）を水でふ



やかし、砂糖などを添加したもの（ポテト餌：グルコース：水：ドライイースト＝1：1：1：少々）を直径 3.5 cm のシャーレに入れて、ケージ内に 2 つ設置する。マイクロインジェクションを行う日は、この培地を 1 時間おきに交換する。マイクロインジェクションを行わない日であっても乾燥しやすいため、朝・晩 1 回ずつ交換することが望ましい。なお、成虫をケージに移した後、1 週間程度は効率良く採卵できる。

② ボトルの場合

底に複数の空気孔を開けたボトルに、飼育ボトル 1 本分の成虫を移し、産卵させる。成虫の餌および産卵用の培地は網ケージの場合と同じだが、内部が狭くて湿気やすいため、水を少なめにした方が



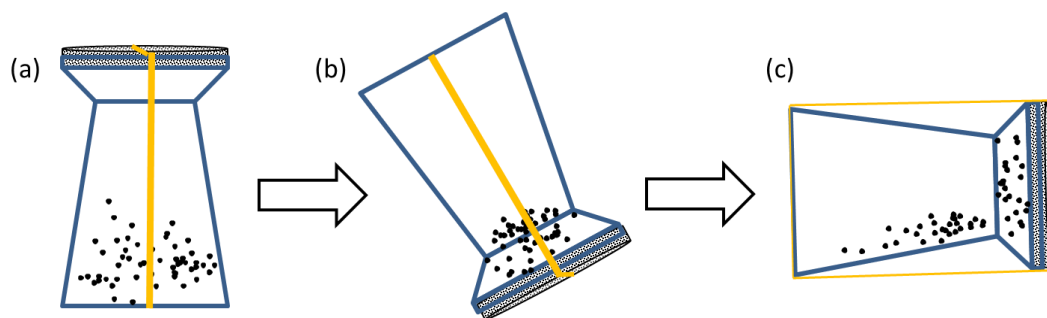
—手順

(a) 空気孔を開けたボトルに飼育ボトル 1 本分の成虫を移し、培地シャーレ（直径 3.5cm）でふたをし、ゴムで固定する。

(b) 逆さまにして軽く容器をたたき、成虫を培地上に落とす。

☞ 一度培地の上に乗ると、ハエが落ち着く。

(c) ボトルを横たえて，静置する．



なお，採卵が終了したら成虫を通常の餌ボトルに戻しておくと，1週間程度は効率よく採卵できる．

2. インジェクション液

2-1. プラスミド

piggyBac トランスポゼースを用いて *attP* 配列を組み込むために，トランスポゼース RNA（以下，ヘルパー RNA）転写用プラスミド

pSP64_poly(A)/*piggyBac*_ORF および *piggyBac* ウイング配列と *attP* 配列を持ったベクタープラスミド pBac[3xP3DsRed-*attP*(AF)]（以下，ベクター DNA）を用いた．

2-1-1. プラスミド DNA の調製

ベクター DNA は，滴下カラムを用いた高品質の精製を行う必要がある．培地の準備や培養については通常通りに行う．

—プラスミド DNA の精製

pSP64_poly(A)/*piggyBac*_ORF プラスミドと pBac[3xP3DsRed-*attP*(AF)] プラスミドは共に高コピープラスミドである．pBac[3xP3DsRed-*attP*(AF)] プラスミドは DNA のままマイクロインジェクションするので，精製度の高いキット（e.g., QIAGEN Plasmid Mini kit）で精製する必要がある．一方，pSP64_poly(A)/*piggyBac*_ORF プラスミドは RNA に転写してからマイクロインジェクションに用いるので，そこまで高い精製を行う必要がない（e.g., FastGene Plasmid Mini kit）．

2-2. ヘルパー RNA の合成と精製，クオリティチェック

pSP64_poly(A)/*piggyBac*_ORF プラスミドは制限酵素（*EcoRI*）を用いて直鎖化してから，RNA 合成（e.g., mMESSAGE mMACHINE SP6 kit）と精製（MEGAclean kit），およびヘルパー RNA のクオリティチェックを行う．

ーヘルパーRNA のクオリティチェック

■ 濃度測定

濃度：ベクターDNA と混合して利用するため、ベクターDNA やインジェクションする際に必要な濃度にもよるが、 $1\mu\text{g}/1\mu\text{L}$ 以上は必要である。
A260/A280 値：2.1 程度であればよい

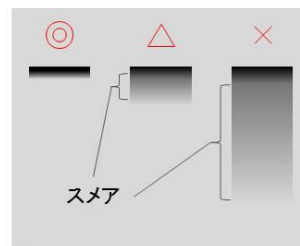
■ 電気泳動

1% MOPS アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、サイズとスメアの有無を確認する。



①Millennium Markers™

②piggyBacトランスポゼース mRNA



- ◎ スメアがほぼない: 用いてよい
- △ スメアが少しある: 用いてよい
- × スメアが長い: RNAが分解している可能性があるため用いない

2-3. インジェクション液の調製

ヘルパーRNA とベクターDNA の混合液は、それぞれ精製したものを混ぜて作成する。溶媒として Nuclease free water を用いる。

2-4. 溶液の保存と使用回数

ーストック溶液

■ RNA

作成した RNA は 3 μ L ずつに分注し，-70℃以下のフリーザーで保管するとよい．インジェクション液を調整するために DNA と混合する際には，1 チューブずつ取り出して全量を使いきり，再利用（再凍結・保存）はしない．

■ DNA

作成した DNA は 5 μ L ずつを 2 本に分注し，冷凍庫で保存するとよい．ストックは一度に全て使いきり，再利用しない．RNA 合成用のテンプレート DNA は分けずに 1 つの 2mL チューブに入れ，冷凍庫で保存する．

■ インジェクション液（調整済み）

一回に混合する量は，総量が 10 μ L 以内にする（1 週間以内に使いきることが可能で，なおかつ混ぜムラができないように混合できる量）．凍結・融解は 5 回以上にならないようにする．また，1 週間を越えても使いきれず残った場合は処分する．調整したインジェクション液は冷蔵庫で保存する．

3. マイクロインジェクション

3-1. マイクロインジェクション用の器具

3-1-1. ガラス微針

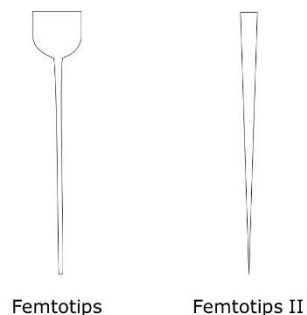
市販されているもの（e.g., Femtotips および Femtotips II：Eppendorf 社製）を利用しても，自作したものを利用してもよい．

—先端の形状と特徴例

Femtotips：先端から中腹まで同じ太さであるため，折れても針の太さが変わりにくい．また，針の根本が丸みをおびており，つまりにくい．

Femtotips II：先端が Femtotips より細いため，マイクロインジェクション時に卵を破損しにくい一方，つまりやすく，折れやすい．

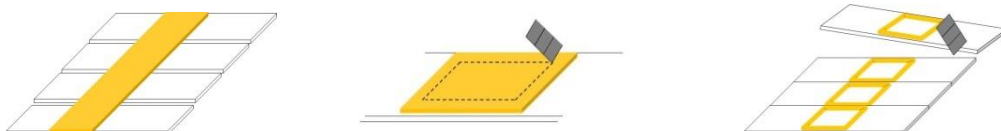
テナガショウジョウバエの卵には先が細い Femtotips II が適している．



3-1-2. 事前に作製しておくもの

—土手つきスライドガラス

- (a) スライドガラスを並べる．
- (b) 真ん中にビニールテープを 3 重に貼る．
- (c) ビニールテープの中をくりぬく．
- (d) スライドガラスどうしを切り離す．

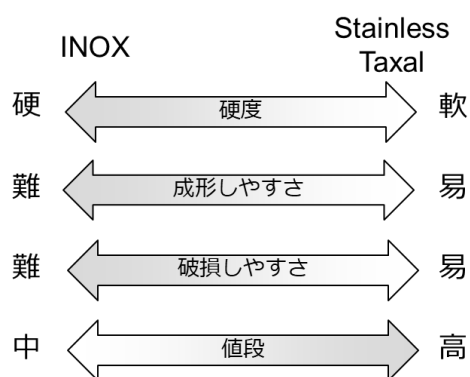


- (e) もう一度，ビニールテープをよく圧着する．
- (f) 50mL バイアルに両面テープ（Scotch® W-18：透明両面テープ）を丸めたものを詰め込んで，両面テープが浸るぐらいヘプタンを加える．
- (f) 糊が溶けだしてきたら，パスツールピペットで土手の内側に塗っていく（土手際だけでよい）．乾いたら再度塗り，2，3度繰り返す．



3-1-3. ピンセット

ーピンセットの特徴



ピンセットの例

メーカー	商品名	素材
FONTAX	INOX 5	INOX
	INOX 4	INOX
regine 5	titanium	Titan
スガワラ	ST	Stainless (?)
Delta	stainless	Stainless
KFIピンセット	K-20 RR	Stainless
	K-3 GG	Stainless

ーピンセットの研ぎ方

準備するもの

油砥石用オイル（品番 851／100mL） 株式会社エーゼット

砥石 Pocket oil stone （No. Ap. 12）

ピンセット （No.5 INOX） FONTAX 社

(a) 以下の作業は，実体顕微鏡下で行う．

(b) 砥石の上に油砥石用オイルを1滴垂らす．

- ☞ オイルは口から垂れやすいので，片付けるときに気を付ける．垂れた場合はティッシュで拭き取る．

(c) ピンセット閉じて持ち、砥石に対して垂直に立てて数回軽く砥石をひっかく。これにより、ピンセットの先端の長さを揃えることができる。

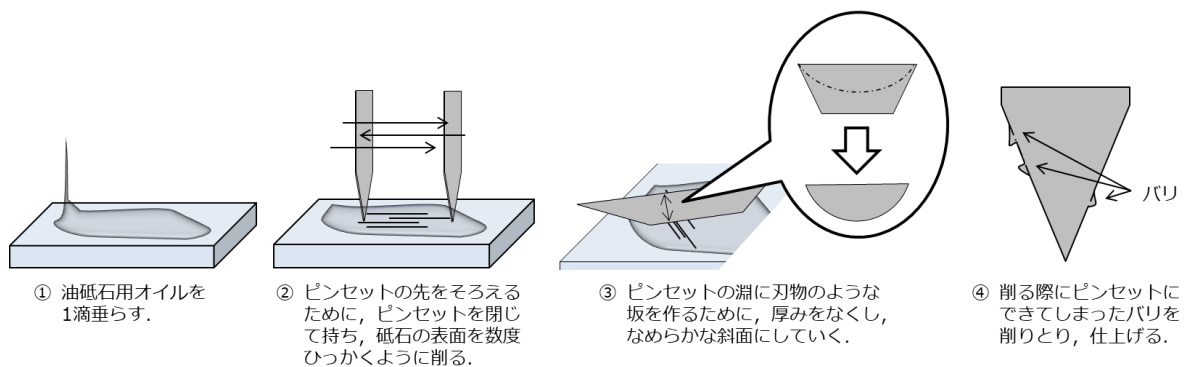
☞ 軽くひっかいた後にティッシュで油や削りかすをふき取り、実体顕微鏡でピンセットの先の状態を確認する。揃っていない場合はもう一度軽くひっかけ、先端の長さが揃うまで繰り返し行う。

(d) ピンセットを開いて持ち、片側の先の甲を研いでいく。これにより、ピンセットの厚みを薄くする。

(e) ピンセットの先端の縁をなめらかな坂にするように研いでいく。刃物のように、縁の厚みがなくなるまで研ぐ。

(f) ピンセットを閉じて持ち、先端や横側を砥石で軽くひっかく。これにより、ピンセットの先端や横のバリを取り除く。

☞ ピンセットの先にバリが残っていると、卵に傷を付けて壊しやすくなってしまうので、できるだけ滑らかになるようにする。



3-2. 採卵およびマイクロインジェクションのためのセッティング

—準備するもの

成虫ケージまたはボトル

ポテト餌入りプラシャーレ（直径 3.5cm）

スライドガラス

両面テープ（Scotch W-18, 3M）

土手つきスライドガラス

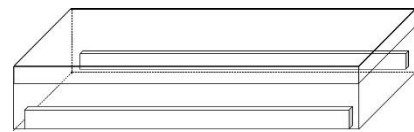
FL-100-1000CS シリコンオイル

レールつきプラケース（18×8×3cm：右図）

ピンセット

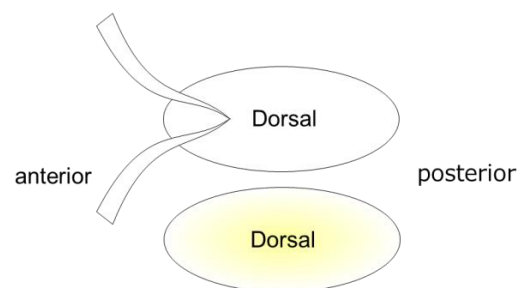
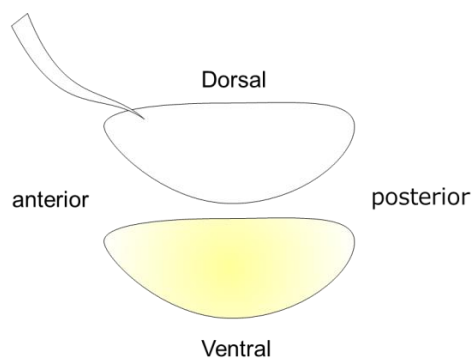
水入りガラスシャーレ（直径 4.5cm）

黒色ろ紙



—卵の向き

卵ひげが生えている方が背側前方であり，腹側より平らになっている．始原生殖細胞は卵の後方にあるため，後方よりマイクロインジェクションを行う．



—採卵およびセッティング

(a) 実験の 2 時間前に，成虫ケージ内の餌培地を新しいものに替える（実験には用いずに，捨てる）．

(b) 実験の 1 時間前に成虫ケージ内の餌培地を新しいものに替える（実験には用いず，捨てる）。

(c) 室温を 18～22℃に設定しておく。

(d) 成虫ケージから餌シャーレを取り出し，新しい餌を入れる。

(e) スライドガラスに両面テープを貼りつけ，両面テープの端に水滴を置く。

(f) 実体顕微鏡下でひげをピンセットで摘み，ポテト餌から卵を取り出す。

(g) 両面テープ上の水滴で卵を湿らし，乾いた部分に 5 分間並べる。

☞ 両面テープ上の水滴が乾いたら，ピンセットで水をすくって足す。

(h) 5 分後，はじめに並べた卵から順番にピンセットで卵殻を除去していく。

(i) 卵殻を除去した卵は土手つきスライドガラスの糊の上に並べていく。このとき，卵の突起が土手に近い側になるようにする。

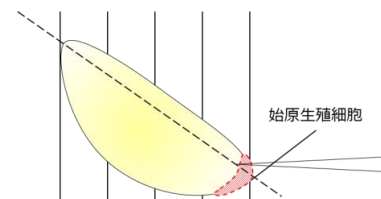
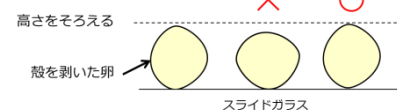
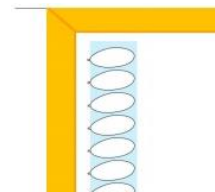
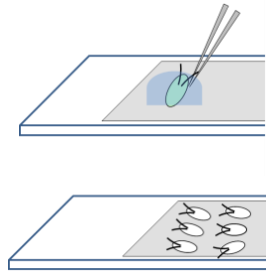
☞ 卵どうしが重ならないように並べていく

（だいたい，卵横幅 0.5 個分程度空ければよい）。間隔が広すぎると，一度に並べられる卵の数が少なくなる。

☞ 卵のおしり（突起のない方）の高さをできるだけ揃えて並べていくと，マイクロインジェクション時に針の高さを逐一変えずに済む。

☞ 斜め 30℃程度に傾けて並べると針が刺さりやすく，マイクロインジェクションを行いやすい。

(j) 1 分から 1 分半の間，一枚のスライドガラスに



卵（およそ 15 個）を並べる．

☞ これ以上だと卵の乾きにムラが出すぎてしまう．

☞ ただし，その日の湿度によっても乾き方が異なる．雨の日（湿度が高い日）は，もう少し長く乾かす（2 分程度）．逆に，冷房や暖房を付けていて部屋が乾燥している日は乾かす時間を短めにする（1 分以内）．

☞ 乾き具合は実体顕微鏡で，判断するのが難しい．シリコンオイルをかけた後に光学顕微鏡で観察すると，乾きすぎた卵は萎んで見える．萎んだ卵はマイクロインジェクションせずに取り除き，次のスライドを乾かす時間を 30 秒程度短くすると良い．

(k) 2 枚目のスライドガラスに卵を並べ終わったら，一つ前のスライドガラス上の卵にシリコンオイルをかける．

(l) 3 枚分のスライドに並べ終わったら，マイクロインジェクションを行う．

☞ 最後のスライドガラスは一枚目のスライドガラス上の卵にマイクロインジェクションし終わったら，シリコンオイルをかける．

(m) 次の採卵までの 1 時間は同じ餌シャーレから採卵して良い．

(n) 採卵から 1 時間後，成虫ケージの餌シャーレを新しいものと取り換える．

☞ （明期：8：30～20：30 の場合）朝 10：00 くらいから，夜 8：30 まで採卵することが可能ではあるが，夕方付近に採卵効率が低下する（成虫数が十分な場合は，効率が低下してもマイクロインジェクションに十分な数を採卵できる場合もある）．そのため，朝から始めて夕方を目途にマイクロインジェクションを終えると良い．

3-3. マイクロインジェクション

3-3-1. マイクロインジェクションの準備

—使用する機器

Primo Vert 位相差顕微鏡

ジョイスティックマイクロマニピュレーター MN-151

—マイクロインジェクションを行う前の準備

(a) 1 μ L インジェクション液を針内に注入する.

☞ 多すぎると、使いきる前に針が壊れてインジェクション液が無駄になってしまう.

☞ マイクロインジェクションに用いる針内の液を使いきっておらず、針が壊れていない場合であっても、3~4 時間程度経過したらインジェクション針とインジェクション液を交換した方が良い(インジェクション液に含まれる RNA が分解している可能性があるため).

(b) 針の縦・横の位置と傾斜角度を横から確認しながらセットする.

☞ 傾斜角度はなだらかな方がいいが、平らすぎると針が壁面などにぶつかり、下がらなくなってしまう.

(c) レールつきプラケースに水を張っておく.

3-3-2. マイクロインジェクション

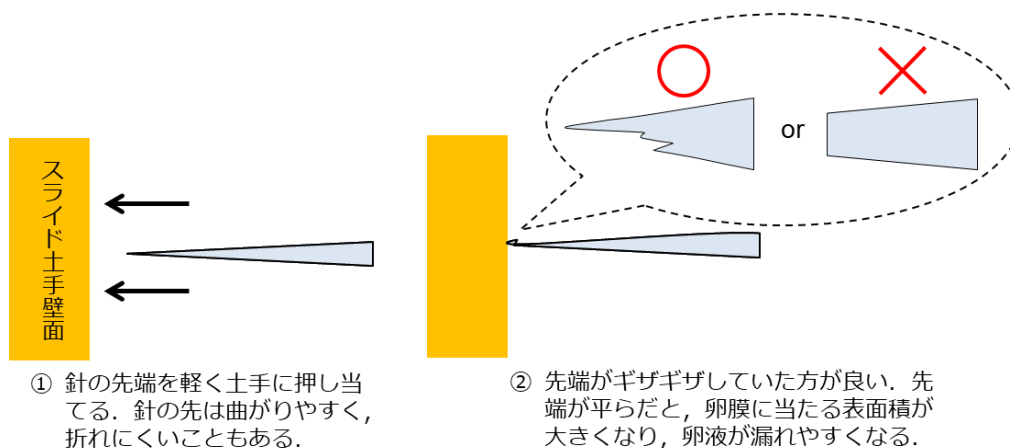
—手順

(a) 対物レンズを 10 倍 (10 倍の接眼レンズを用いた場合) にセットした顕微鏡に、卵を並べたスライドガラスをセットする.

(b) 顕微鏡を覗かずに針を下げていき、シリコンオイルに浸るようにする.

(c) 土手の壁面にインジェクション針を軽く押あて、先を少し折る.

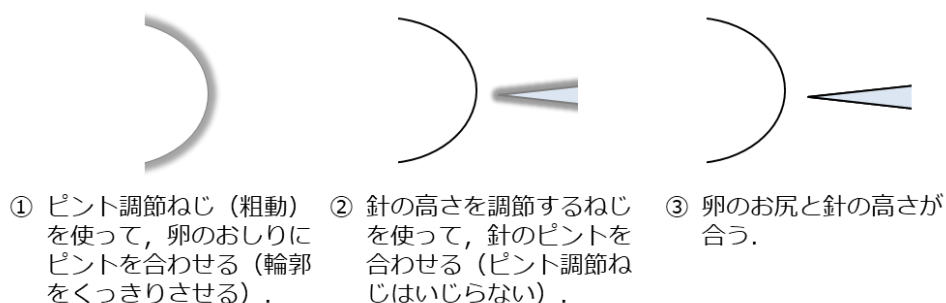
☞ インジェクション針の先を折ることで、インジェクション液がスムーズに出るようになる.



(d) 空気を送り、針からインジェクション液が出るかどうかを確認する

☞ 始めは先端に残っていた空気が押し出される。

(e) 対物レンズを 20 倍にセットし、卵のおしり（突起のない方）の高さと針の高さを Z 軸操作ハンドル（粗動）で合わせる。



(f) 針の先端を卵に刺し入れ、空気を送る。

☞ 卵の内側に白い泡のようなもの（大きさ：卵の横幅の 8 分の 1 程度）が現れれば、インジェクション液が注入されたといえる。

☞ 始生殖細胞がお尻側（後端）に移動しまっているような発生が進みすぎてしまっている卵にはマイクロインジェクションせず、位置を記録しておく（このように発生が進みすぎている卵は後で取り除く。このような卵に針を刺してしまうと針を壊しかねないので、針ではつぶさない）。

- ☞ 乾かしすぎると卵膜にしわが寄り、内液と間ができる。また、インジェクション針を刺すと内側に大きくへこむ。乾きすぎた卵は孵化しないため、マイクロインジェクションには用いないようにする。
- ☞ 針が詰まったり、卵液が逆流したりしてしまった場合は針を交換する。
- (g) 適した条件の卵にはマイクロインジェクションを行い、マイクロインジェクションしなかった卵は位置を記録する。スライド 1 枚（およそ卵 15 個）あたり 1 分半くらいでできるようになるとよい（1 個につき、5～7 秒）。
- (h) スライド 3 枚分の卵にマイクロインジェクションし終わったら、実体顕微鏡下でピンセットを用いて、マイクロインジェクションしなかった卵を取り除く。
- (i) ラベルを記入し、水を張ったレーンつきプラケースに並べる。
- (j) 6 枚並べ終わったら、ふたをして、容器とふたの隙間をパラフィルムを巻いて封じる。
 - ☞ 乾燥しないよう、容器に水を張る。この際、濡れティッシュなどは使わない（孵化した幼虫が潜り込んでしまい、見つけづらくなるのを防ぐため。また、水に浮いていると見つけやすい）。
 - ☞ パラフィルムで封じないと、隙間から幼虫が逃げ出してしまう。
 - ☞ 室温が 20℃に保たれている飼育室に置いておく。
 - ☞ 1 日あたりスライド 20 枚程度（300 卵）が限度である。

3-4. 孵化幼虫の回収

一回収する時期と飼育密度

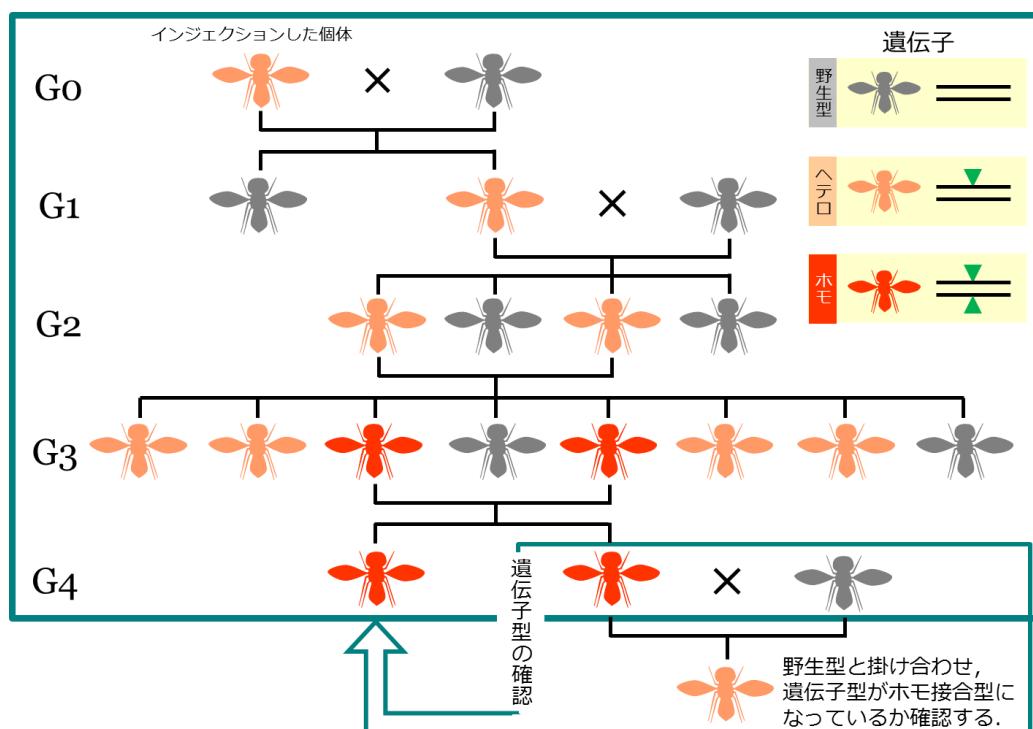
- (a) マイクロインジェクションをしてから 48 時間後、幼虫を拾い出し餌バイアルに移す。
 - ☞ 先の細い筆で幼虫を拾いあげる。
 - ☞ 幼虫は、シリコンオイルや容器に入れた水の中はもちろん、スライドガラス間の隙間やビニールテープの下にもいることがある。そのため、ス

- ライドガラスを裏返したり土手を剥がしたりして、注意深く探すこと。
- ☞ バイアルの餌量は深さ 2cm、幼虫密度は 1 バイアルあたり 15 頭程度とする。一本当たりの幼虫数が多すぎると羽化率が低下する。
- (b) 餌バイアルに移したら、20℃で羽化するまで静置する。
- (c) 始めの成虫個体が羽化してきたら、餌に張りついて死ぬ個体を減らすために、容器を逆さまにしておく。
- ☞ 餌表面の乾燥状態に応じて変化させる。具体的には、餌表面にテカリがあり、羽化成虫の翅や脚が餌に張り付くようなら逆さまにしておいた方がよい。ただし、逆さまにしておいた場合には、毎日羽化幼虫を餌バイアルに回収する必要がある（絶食によって死んでしまうため）。餌表面にテカリがなく、翅などが張り付かない場合には、逆さまにはせず、そのままにしておけば一日置きに回収しても死亡率は低い。

4. 導入遺伝子のホモ接合化 (*attP* 挿入系統の確立)

4-1. 各世代における掛け合わせ

—掛け合わせ概略図



上記表のように掛け合わせを行う。

4-2. 各世代におけるスクリーニング

4-2-1. G₀ 世代

(a) 蛍光観察する幼虫の飼育用にコーンミール (90g) の代わりとして, コーンフラワー (60g) とコーングリッツ (30g) を配合した餌を作製しておく。

☞ 餌の量はバイアルの深さ 1cm 程度が好ましい。深すぎると, 幼虫が底まで潜行できず餌全体が液状に柔らかくならないため, 幼虫の洗い出しに手間がかかってしまう。

(b) 羽化した成虫は, 異なる性別の *vermilion* 成虫 3 頭とともに新しい餌バイアルに移す。

- (c) 8 日後に 1 回目の餌替えを行い，さらにその 5 日後に成虫を捨てる．
- (d) 各バイアル内の幼虫は 3 齢のワンダリング期まで成長したら蛍光観察を行い，蛍光を発する形質転換個体をスクリーニングする．なお，それぞれの G_0 成虫 1 頭につき，バイアル 2 本分の G_1 幼虫について蛍光観察を行う．
 - ☞ 形質転換幼虫のみ，新しい餌バイアルに移す．
 - ☞ 同じバイアル由来の形質転換幼虫は，同じ餌バイアルに入れてよい．

4-2-2. G_1 世代

- (a) 羽化した成虫は，異なる性別の *vermilion* 成虫 3 頭とともに新しい餌バイアルに移す．
- (b) 8 日後に 1 回目の餌替えを行い，さらにその 5 日後に成虫を捨てる．
- (c) 各バイアル内の G_2 幼虫は 3 齢のワンダリング期まで成長したら，蛍光観察を行い，蛍光を発する形質転換個体をスクリーニングする．
 - ☞ 次世代 (G_3) を高効率に増やすためには，形質転換 G_2 成虫を 5 頭程度得ることが望ましいが，10 頭以上と多すぎる場合も，幼虫やスクリーニング作業が無駄になってしまう．そこで，1 本目のバイアルを用いてスクリーニングした際に，10 頭以上の形質転換 G_2 幼虫が得られた場合には，2 本目のバイアルはスクリーニングに用いず捨ててよい．

4-2-3. G_2 世代

- (a) 羽化した成虫は G_1 親ごとに新しい餌バイアルに移し，集団で交配させる．
- (b) 8 日後に 1 回目の餌替えを行う．
- (c) さらにその 5 日後ごとに餌替えを行い，3 バイアル分の幼虫を得る．
- (d) 蛍光強度によって幼虫を選抜する．
 - ☞ 幼虫の蛍光強度の違いから，ホモ接合体のみを選抜できた場合：50 頭程度の幼虫をスクリーニングすればよく，蛍光の強いホモ接合体の幼虫 10～15 頭を得るようにする（親成虫のコンディションにもよるが，バ

イアル 1~2 本分).

- ☞ ホモ接合体の幼虫とヘテロ接合体の幼虫を蛍光の強さでは区別できない
場合：80 頭程度の幼虫をスクリーニングする必要がある，蛍光を発している幼虫 50~60 頭を得るようにする（バイアル 3~4 本分）.
- ☞ 同じ G0-ID であるにもかかわらず，蛍光を発している部位が異なる場合は sub ラインとして別々に維持する.

4-2-4. G₃ 世代

(a) 羽化した成虫は雌雄各 1 頭ずつペアにし，交配させる.

- ☞ 幼虫の蛍光強度の違いから，ホモ接合体のみを選抜できた場合：最大 5 ペア
- ☞ 幼虫の蛍光強度の違いから，ホモ接合体とヘテロ接合体の区別ができない場合：最低 25 ペア

(b) 8 日後に 1 回目の餌替えを行う.

(c) さらにその 5 日後に成虫を捨てる.

(d) バイアル 2 本分の幼虫を蛍光観察し，全ての幼虫が蛍光を発している場合のみ幼虫を拾い集めて，維持する.

4-2-5. G₄ 世代および遺伝子型の確認

(a) 羽化した成虫はランダムに選び出し，遺伝子型を確認するため *vermilion*⁻ の成虫と掛け合わせる．G₄ 世代のメス 1 頭につき，*vermilion*⁻ のオス 3 頭を 1 本のバイアルに入れる．これを 4 本作る．それ以外の成虫は G₃ 親ごとと同じバイアルに入れて，集団で維持する．

(b) *vermilion*⁻ のオス成虫と掛け合わせたものについて，バイアル 1 本分の幼虫を得る．

- ☞ 8 日後に餌の状態を観察し，複数幼虫がいるようなら成虫を捨てる．あまり幼虫がいらないようであれば，餌を替え，さらにもう 1 バイアル分の

幼虫を得る．

(c) b で得た幼虫について蛍光観察を行う．

☞ 用意した 4 本のバイアルの内、幼虫が存在しているバイアルを 3 本観察する．もし、2 本以下のバイアルからしか幼虫が発生しなければ、さらに 2 本作成する．

☞ 3 本のバイアル全てにおいて、全ての幼虫が蛍光を発していた場合、ホモ接合化が成功したと考えられる．

☞ 3 本いずれかのバイアルで、蛍光を発していない幼虫がいた場合、ホモ接合化は成功していない．

(d) 各 G0-ID について、sub ラインがあるものを除き 1 つを残し捨てる．sub ラインがあるものは、sub ラインごとに維持する．

4-3. 幼虫の蛍光観察

4-3-1. 観察時期

ワンダリングステージから蛹になる個体が観察されるようになった頃までにスクリーニングを行う（1 齢であっても蛍光は観察できるが、蛹になる直前の 3 齢幼虫は大きく、最も観察しやすい）．

4-3-2. 幼虫の洗い出し

(a) 直径 10cm のプラシャーレの真ん中に水を滴下しておく

☞ 幼虫が多い場合は 800～1000 μ L、少ない場合は 500 μ L 程度が適当．

(b) 蛍光観察する幼虫の入ったバイアルに水を注ぎ、1 分間待つ．

(c) 1 分経過したら、大きめの筆で餌をかき混ぜ、餌と水を攪拌する．

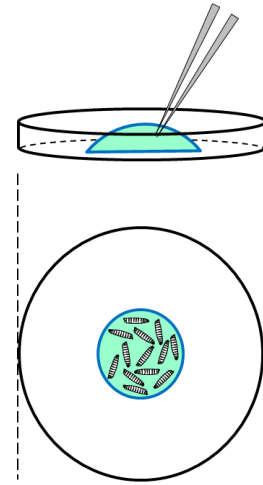
(d) ドロドロになった餌を直径 16cm のガラスシャーレに流し入れる．

(e) 濁りすぎていて幼虫が見えにくかったり、幼虫に餌が付着していたりする場合はさらに水を加える．

(f) 水に浮かんだ幼虫をピンセットで掬いあげ、プラシャーレの中心の水滴に

浮かべていく。

- ☞ 幼虫の拾い出しや蛍光観察は、まとめて行う方が作業効率が良い。そのため、バイアル 2~3 本分の幼虫を平行してシャーレに移し、蛍光観察する。
- ☞ ただし、幼虫は水に浮かべてから時間が経ちすぎると逃げたり弱ってしまったりする。そのため、幼虫を水に浮かべ出してから 10 分以内に蛍光観察することが望ましい。



4-3-3. 蛍光観察用の顕微鏡とその注意点

—使用する機器例

蛍光立体顕微鏡：MZ-FL III

フィルター：DsRED

—蛍光観察時の注意点

- ☞ サンプルに励起光を当て続けると、蛍光が弱まるのでピントなどは事前に確かめてセットしておくといい。

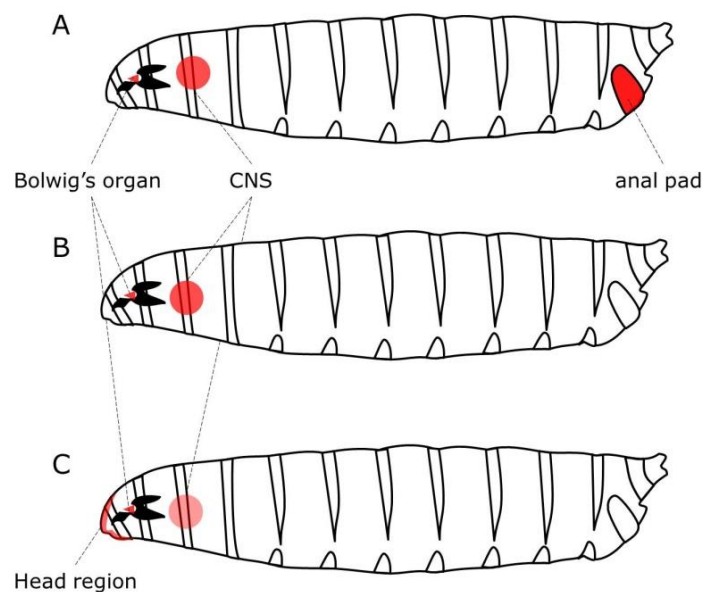
4-3-4. 蛍光観察

- (a) 滴下した水中に浮かぶ幼虫を観察する。
- (b) 蛍光を発している幼虫は細筆で拾い上げて餌バイアルに移す。
- (c) 残りの幼虫は熱湯で殺して捨てる。

—蛍光を発する部位

蛍光を発する部位は、Bolwig's organ (幼虫の眼)、CNS (中枢神経)、anal pads (肛門板) および head region (頭部の周辺) である。これらのうち、CNS は比較的大きく、若齢幼虫でも観察可能である。一方、anal pads は CNS より大きい

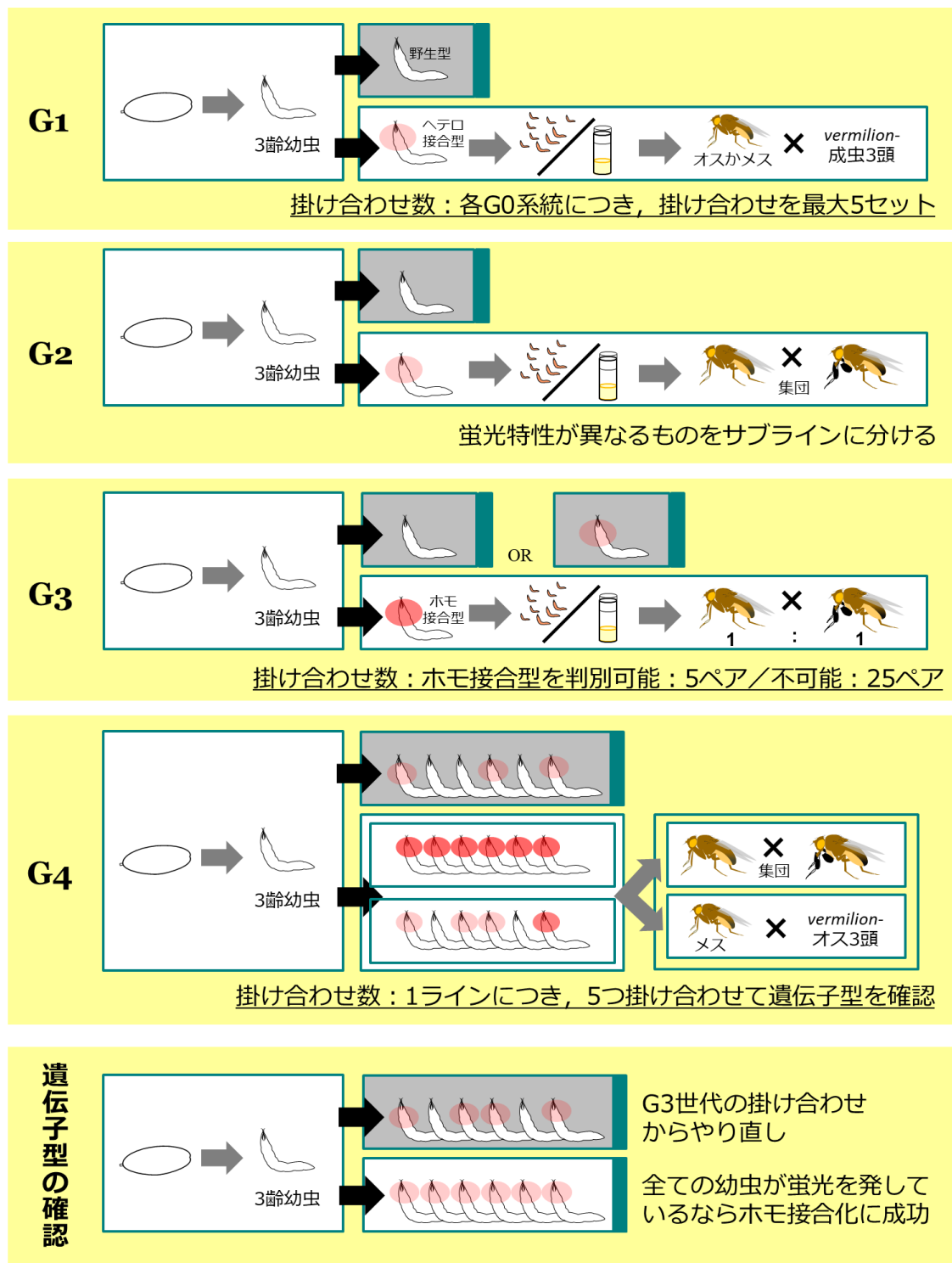
ものの、若齢では見えにくい（通常幼虫は anal pads を下にして、這っているため、幼虫をひっくり返してみると見えやすくなる）。bolwigs' organ, anal pads および head region は形質転換体によって、蛍光が弱かったり、蛍光を発していなかったりする幼虫もある。これは、ゲノム上の組み込み部位の違いに起因すると考えられる。



—留意点

これらの他に自家蛍光として、腸や後呼吸管（posterior horn）が蛍光を発している。また、ポテト餌も蛍光を発しているかのように見えるため、できる限り幼虫に付着しないようにする。

付録 A-1. *attP* 配列のホモ接合化のための掛け合わせ手順の図解。



B. phiC31/*attP* システムを用いた部位特異的な遺伝子導入

目次

	ページ
1. ハエのステージング	
1-1. 系統	84
2. インジェクション液	
2-1. プラスミド	85
2-2. ヘルパーRNA 合成と精製, クオリティチェック	86
2-3. インジェクション液の調製	87
3. 挿入遺伝子のホモ接合化 (導入遺伝子系統の確立)	
3-1. 各世代における掛け合わせ	88
3-2. 各世代におけるスクリーニング	88
付録 B-1. <i>attP</i> 配列へ組み込んだ外来遺伝子のホモ接合型のための掛け合わせ手順の図解	91
付録 B-2. <i>attP</i> が常染色体と性染色体のどちらに座上するかを判別する方法	92

1. ハエのステージング

1-1. 系統

piggyBac トランスポゼースを用いて、テナガショウジョウバエのゲノム内に組み込んだ *attP* 配列を掛け合わせによってホモ接合化した系統（以下、*attP* 挿入系統）を用いる。なお、系統名は *piggyBac* トランスポゼースを用いた *attP* 配列の挿入実験における G₀ 世代のシリアルナンバーに由来する。

採卵用成虫の準備に関しては、「付章 A. *piggyBac* トランスポゼースを用いた遺伝子導入 1. ハエのステージング 1-2. 採卵用成虫の準備」を参照のこと。

2. インジェクション液

2-1. プラスミド

phiC31 インテグレースを用いた遺伝子の導入効率を *attP* 挿入系統ごとに比較するために、インテグレース RNA（ヘルパーRNA）転写用プラスミド pET11phiC31poly(A)と、*attB* 配列を有し、*vermilion* をマーカーにしたベクタープラスミドとして pBFv-*nosP-Cas9*（ベクターDNA；Kondo & Ueda, 2013）を用いた。なお、pET11phiC31poly(A)は、Michele Calos 博士より分譲いただいたものである（Addgene plasmid # 18942；Groth et al., 2004）。

2-1-1. プラスミド DNA の調製

ベクターDNA は、滴下カラムを用いた高品質の精製を行う必要がある。培地の準備や培養については通常通りに行う。

ープラスミド DNA の精製

pBFv-*nosP-Cas9* プラスミドは、DNA のままマイクロインジェクションするので、精製度の高いキット（e.g., QIAGEN Plasmid Mini kit）で精製する必要がある。一方、pET11phiC31poly(A)プラスミドは、RNA に転写してからマイクロインジェクションするので、そこまで高い精製を行う必要がない（e.g., Fastgene Plasmid Mini kit）。なお、pET11phiC31poly(A)プラスミドは低コピープラスミドであるため、低コピープラスミド用のプロトコルがあればそちらを用いた方がよい。

2-2. ヘルパーRNA 合成と精製, クオリティチェック

pET11phiC31poly(A)プラスミドは制限酵素 (*Bam*HI) を用いて直鎖化してから, RNA 合成 (mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra kit) と精製 (MEGAclear kit), およびヘルパーRNA のクオリティチェックを行う.

ーヘルパーRNA のクオリティチェック

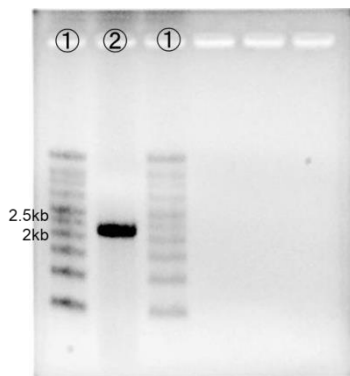
■ 濃度測定

濃度: ベクターDNA と混合して利用するため, ベクターDNA やインジェクションする際の濃度にもよるが, 1.5ug/uL 以上であると使いやすい.

A260/A280 値: 2.00 前後 (大概 2.3 程度)

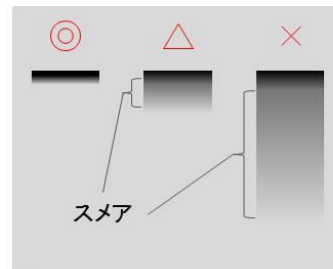
■ 電気泳動

1% MOPS アガロースゲルを用いて電気泳動を行い, サイズとスメアの有無を確認する.



①RNA size standard makers II

②phiC31インテグレース mRNA



◎ スメアがほぼない: 用いてよい

△ スメアが少しある: 用いてよい

× スメアが長い: RNAが分解している可能性があるため用いない

2-3. インジェクション液の調製

ヘルパーRNA とベクターDNA の混合液は，それぞれ精製したものを混ぜて作成する．溶媒として Nuclease free water を用いる．

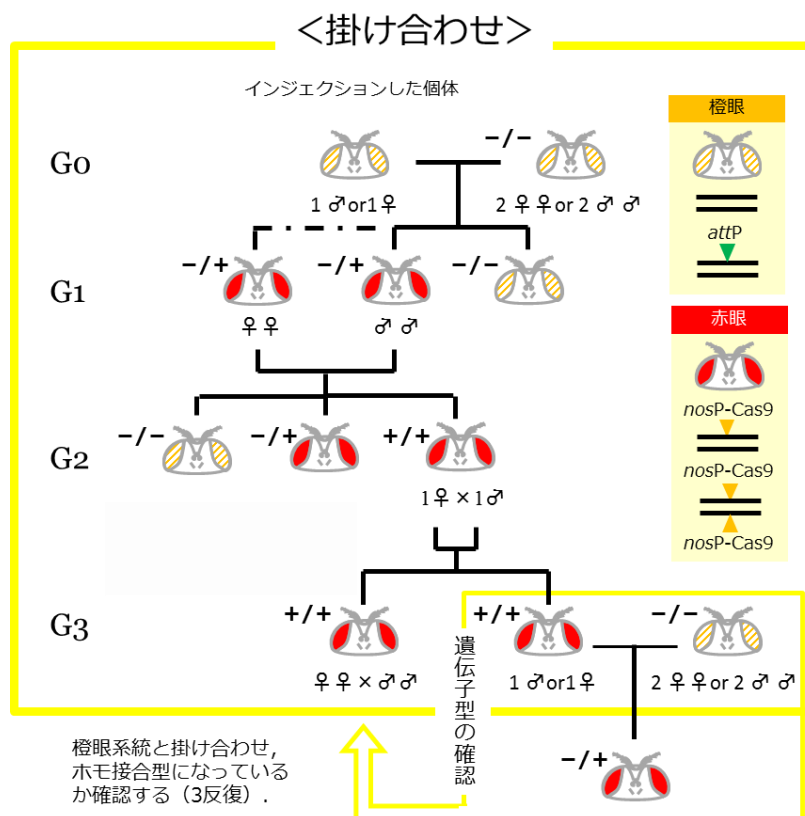
溶液の保存と使用回数に関しては，「付章 A. *piggyBac* トランスポゼースを用いた遺伝子導入 2. インジェクション液 2-4. 溶液の保存と使用回数」を参照のこと．

マイクロインジェクションの方法に関しては，「付章 A. *piggyBac* トランスポゼースを用いた遺伝子導入 3. マイクロインジェクション」の項を参照のこと．

3. 導入遺伝子のホモ接合化（導入遺伝子系統の確立）

3-1. 各世代における掛け合わせ

—掛け合わせ概略図



上記表のように掛け合わせを行う。

3-2. 各世代におけるスクリーニング

3-2-1. G₀ 世代

- 羽化した成虫は，異なる性別の *vermilion*⁻ 成虫 3 頭とともに新しい餌バイアルに移す。
- 8 日後に 1 回目の餌替えを行い，さらにその 5 日後に成虫を捨てる。
- 各バイアルの成虫が羽化したら，成虫の眼の色を観察し，赤眼 (*vermilion*⁺) の成虫のみを集める。

- ☞ 赤眼の成虫のみ，新しい餌バイアルに移す．
- ☞ 同じバイアル由来の形質転換成虫は，同じ餌バイアルに入れてよい．
- ☞ ホモ化するためには，毎日観察を行い未交尾の成虫を集める必要がある．
- ☞ *attP* 挿入系統ごとに，1 つでもホモ接合化できればよい．なので，赤眼の成虫が得られた *attP* 挿入系統の残りのバイアルは，形質転換効率のみを記録すればよいので，3 日置きに確認すればよい．

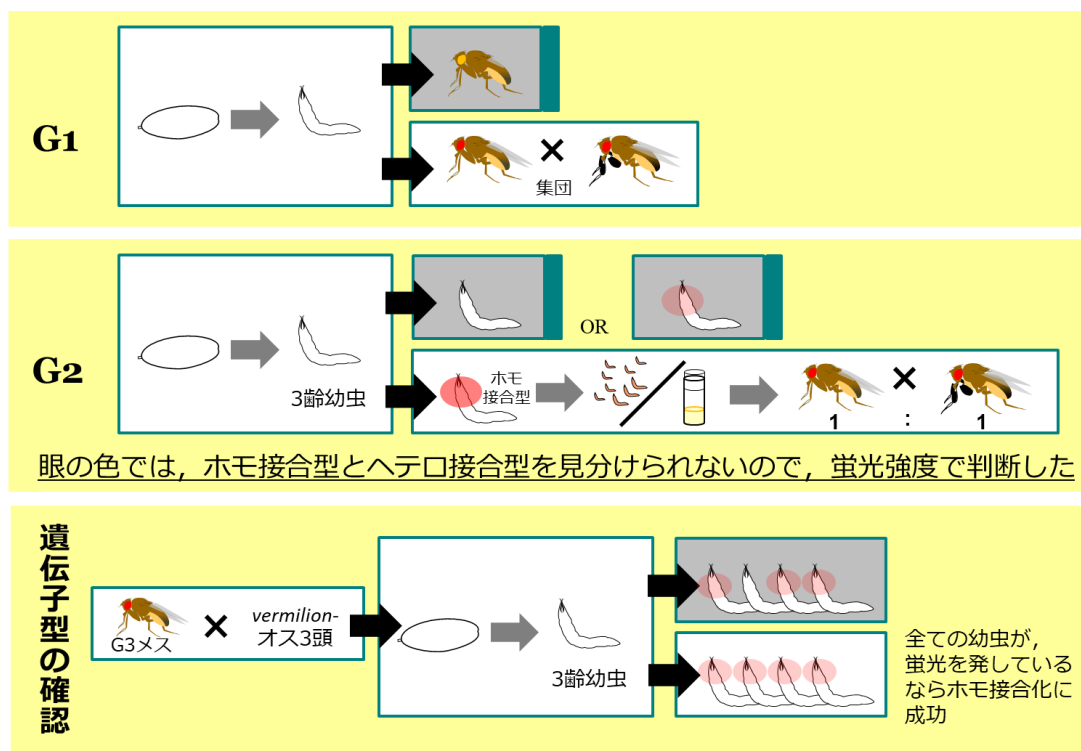
3-2-2. ホモ接合化のための掛け合わせ

- (a) G₂ 世代以降，赤眼成虫のみを集団で累代飼育している．
- (b) それらのバイアルの内，ワンダリング期の幼虫がいるものを用いて，蛍光強度によってホモ接合体と思われる幼虫を選抜する．
 - ☞ 幼虫の蛍光強度の違いからヘテロ接合体とホモ接合体を区別できると分かっている系統のみをホモ接合化する．
- (c) 蛍光強度によって選抜した幼虫を入れたバイアルから，新たに羽化した成虫はランダムに選び出し，遺伝子型確認のため，*vermilion*⁻成虫と掛け合わせる．メス 1 頭につき，*vermilion*⁻のオス 3 頭を 1 本のバイアルに入れる．これを 4 本作る．それ以外の成虫は *attP* 挿入系統ごとに同じバイアルに入れて，集団で維持する．
- (d) *vermilion*⁻と掛け合わせたものについて，バイアル 1 本分の幼虫を得る．
 - ☞ 8 日後に餌の状態を観察し，複数幼虫がいるようなら成虫を捨てる．幼虫が少なければ，餌を替え，さらにもう 1 本分の幼虫を得る．
- (e) *vermilion*⁻と掛け合わせたものについて，蛍光観察を行う．
 - ☞ 用意した 4 本のバイアルの内，幼虫が存在しているバイアルを 3 本観察する．もし，2 本以下のバイアルからしか幼虫が発生しなければ，さらに 2 本作成する．
 - ☞ 3 本のバイアル全てで，全ての幼虫が蛍光を発していた場合，ホモ接合化が成功したと考えられる．

- ☞ 3本いずれかのバイアルで、蛍光を発していない幼虫がいた場合、ホモ接合化は成功していない。

幼虫の蛍光観察の方法に関しては、「付章 A. *piggyBac* トランスポゼースを用いた遺伝子導入 4. 導入遺伝子のホモ接合化 4-3. 幼虫の蛍光観察」を参照のこと。

付録 B-1 : *attP* 配列へ組み込んだ外来遺伝子のホモ接合型のための
掛け合わせ手順の図解.

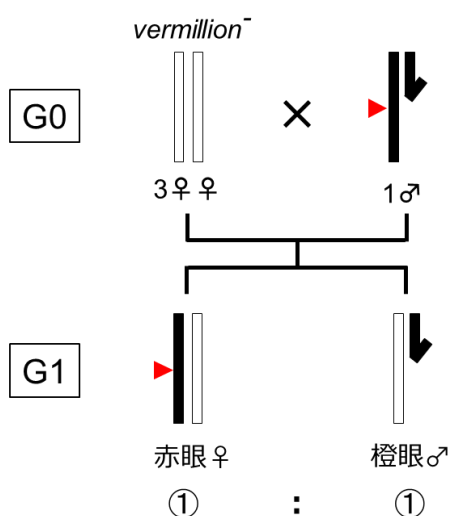


付録 B-2 : *attP* 配列が常染色体と性染色体のどちらに座上するかを
判別する方法

① 性染色体に座上している場合

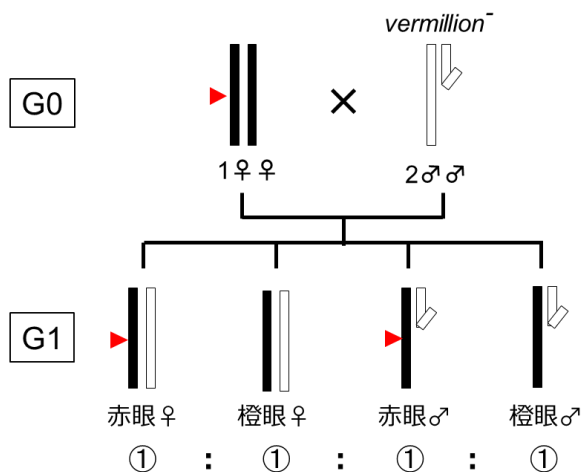
■ G_0 世代の成虫がオス

☞ *vermillion*⁻系統のメスと掛け合わせた場合、 G_1 世代で観察される赤眼の
成虫はメスのみである（以下、赤い矢じりは *vermillion*⁺を示す）。



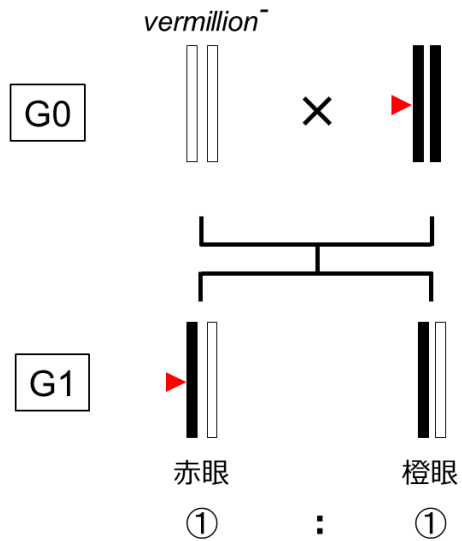
■ G_0 世代の成虫がメス

☞ *vermillion*⁻系統のオスと掛け合わせた場合、 G_1 世代において雌雄区別な
く赤眼と橙眼が 1 : 1 の割合で出現する。



② 常染色体に座している場合

☞ *vermillion* 系統と掛け合わせた場合、 G_1 世代において雌雄区別なく赤眼と橙眼が 1 : 1 の割合で出現する。



以上のことから、 G_0 世代の成虫がオスであった場合には、 G_1 世代に赤眼のオスがいるかどうかで性染色体上にあるか、常染色体上にあるかを判断できる。

- ☞ G_1 世代における赤眼の成虫がメスのみ：性染色体に座している。
- ☞ G_1 世代における赤眼の成虫が雌雄共に存在している：常染色体上に座している。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、指導教官である松尾隆嗣准教授には研究だけでなく研究者としての立ち振る舞いなどについて非常に多くのご指導を賜った。石川幸男教授には、セミナーや研究発表におけるアドバイスや英文校正で大変お世話になった。星崎杉彦助教には、昆虫のみならず幅広い生物の知識を賜った。また、杏林大学医学研究科の栗崎健教授には、ご自身が作製したプラスミドベクターの使用を快く許可していただいたばかりか、蛍光写真撮影方法などでご助力をいただいた。

応用昆虫学研究室の先輩・後輩の方々、特に戒煙さんと等百合佳さんには研究内容だけでなく日々の生活のたわいもない話を聞いていただくことで、研究を遂行する上での癒しの時間を提供していただいた。また、小島渉さん、砂村栄力さん、藤井毅助教、中野亮さん、長峯啓佑さんには研究内容の相談から日常生活の悩みにいたるまで多くの相談に乗っていただいた。

最後に、ろくに家事を手伝いもせずにはいた娘を、多少なりともたしなめながらも、温かく見守ってくれた家族に感謝いたします。

引用文献

- Adams, M. D. & Celniker, S. E. & Holt, R. A. & Evans, C. A. & Gocayne, J. D. & Amanatides, P. G. & Scherer, S. E. & Li, P. W. & Hoskins, R. A. & Galle, R. F. & George, R. A. & Lewis, S. E. & Richards, S. & Ashburner, M. & Henderson, S. N. & Sutton, G. G. & Wortman, J. R. & Yandell, M. D. & Zhang, Q. & Chen, L. X. & Brandon, R. C. & Rogers, Y. H. C. & Blazej, R. G. & Champe, M. & Pfeiffer, B. D. & Wan, K. H. & Doyle, C. & Baxter, E. G. & Helt, G. & Nelson, C. R. & Miklos, G. L. G. & Abril, J. F. & Agbayani, A. & An, H. J. & Andrews-Pfannkoch, C. & Baldwin, D. & Ballew, R. M. & Basu, A. & Baxendale, J. & Bayraktaroglu, L. & Beasley, E. M. & Beeson, K. Y. & Benos, P. V. & Berman, B. P. & Bhandari, D. & Bolshakov, S. & Borkova, D. & Botchan, M. R. & Bouck, J. & Brokstein, P. & Brottier, P. & Burtis, K. C. & Busam, D. A. & Butler, H. & Cadieu, E. & Center, A. & Chandra, I. & Cherry, J. M. & Cawley, S. & Dahlke, C. & Davenport, L. B. & Davies, A. & de Pablos, B. & Delcher, A. & Deng, Z. M. & Mays, A. D. & Dew, I. & Dietz, S. M. & Dodson, K. & Doup, L. E. & Downes, M. & Dugan-Rocha, S. & Dunkov, B. C. & Dunn, P. & Durbin, K. J. & Evangelista, C. C. & Ferraz, C. & Ferriera, S. & Fleischmann, W. & Fosler, C. & Gabrielian, A. E. & Garg, N. S. & Gelbart, W. M. & Glasser, K. & Glodek, A. & Gong, F. C. & Gorrell, J. H. & Gu, Z. P. & Guan, P. & Harris, M. & Harris, N. L. & Harvey, D. & Heiman, T. J. & Hernandez, J. R. & Houck, J. & Hostin, D. & Houston, D. A. & Howland, T. J. & Wei, M. H. & Ibegwam, C., et al. 2000: The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**, 2185-2195.
- Allen, B. G. & Weeks, D. L. 2005: Transgenic *Xenopus laevis* embryos can be generated using ϕ C31 integrase. *Nature Methods* **2**, 975-979.
- Anaka, M., MacDonald, C. D., Barkova, E., Simon, K., Rostom, R., Godoy, R. A., Haigh, A. J., Meinertzhagen, I. A. & Lloyd, V. 2008: The white gene of *Drosophila melanogaster* encodes a protein with a role in courtship behavior. *Journal of Neurogenetics* **22**, 243-276.
- Ashwini, M., Murugan, S. B., Balamurugan, S. & Sathishkumar, R. 2016: Advances in molecular cloning. *Molecular Biology* **50**, 1-6.
- Atkinson, P. W. & James, A. A. 2002: Germline transformants spreading out to many insect species. *Advances in Genetics* **47**, 49-86.

- Bassett, A. R. & Liu, J. L. 2014: CRISPR/Cas9 and genome editing in *Drosophila*. *Journal of Genetics and Genomics* **41**, 7-19.
- Bateman, J. R., Lee, A. M. & Wu, C. T. 2006: Site-specific transformation of *Drosophila* via ϕ C31 integrase-mediated cassette exchange. *Genetics* **173**, 769-777.
- Baum, J. A., Bogaert, T., Clinton, W., Heck, G. R., Feldmann, P., Ilagan, O., Johnson, S., Plaetinck, G., Munyikwa, T., Pleau, M., Vaughn, T. & Roberts, J. 2007: Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology* **25**, 1322-1326.
- Beaudette, K., Hughes, T. M. & Marcus, J. M. 2014: Improved injection needles facilitate germline transformation of the buckeye butterfly *Junonia coenia*. *Biotechniques* **56**, 142-144.
- Bell, A. C. & Felsenfeld, G. 1999: Stopped at the border: boundaries and insulators. *Current Opinion in Genetics & Development* **9**, 191-198.
- Berghammer, A. J., Klingler, M. & Wimmer, E. A. 1999: Genetic techniques - A universal marker for transgenic insects. *Nature* **402**, 370-371.
- Bischof, J., Maeda, R. K., Hediger, M., Karch, F. & Basler, K. 2007: An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific ϕ C31 integrases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 3312-3317.
- Blanckenhorn, W. U., Meier, R. & Teder, T. 2007: Rensch's rule in insects: patterns among and within species. In *Sex, Size & Gender Roles. Evolutionary Studies of Sexual Size Dimorphism*. (ed. Fairbrain, D. J., Blanckenhorn, W. U. & Székely, T.), pp. 60-70. *Oxford University Press Inc., NY: Oxford University Press*.
- Borycz, J., Borycz, J. A., Kubow, A., Lloyd, V. & Meinertzhagen, I. A. 2008: *Drosophila* ABC transporter mutants *white*, *brown* and *scarlet* have altered contents and distribution of biogenic amines in the brain. *Journal of Experimental Biology* **211**, 3454-3466.
- Bosch, J. A., Tran, N. H. & Hariharan, I. K. 2015: CoinFLP: a system for efficient mosaic screening and for visualizing clonal boundaries in *Drosophila*. *Development* **142**, 597-606.

- Bouuaert, C. C. & Chalmers, R. M. 2010: Gene therapy vectors: the prospects and potentials of the cut-and-paste transposons. *Genetica* **138**, 473-484.
- Boy, A. L., Zhai, Z. Z., Habring-Muller, A., Kussler-Schneider, Y., Kaspar, P. & Lohmann, I. 2010: Vectors for efficient and high-throughput construction of fluorescent *Drosophila* reporters using the phiC31 site-specific integration system. *Genesis* **48**, 452-456.
- Caroti, F., Urbansky, S., Wosch, M. & Lemke, S. 2015: Germ line transformation and in vivo labeling of nuclei in Diptera: report on *Megaselia abdita* (Phoridae) and *Chironomus riparius* (Chironomidae). *Development Genes and Evolution* **225**, 179-186.
- Cary, L. C., Goebel, M., Corsaro, B. G., Wang, H. G., Rosen, E. & Fraser, M. J. 1989: Transposon mutagenesis of baculoviruses – analysis of *Trichoplusia ni* transposon IFP2 insertions within the FP-locus of nuclear polyhedrosis viruses. *Virology* **172**, 156-169.
- Catteruccia, F., Nolan, T., Loukeris, T. G., Blass, C., Savakis, C., Kafatos, F. C. & Crisanti, A. 2000: Stable germline transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi*. *Nature* **405**, 959-962.
- Chalberg, T. W., Genise, H. L., Vollrath, D. & Calos, M. P. 2005: ϕ C31 integrase confers genomic integration and long-term transgene expression in rat retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **46**, 2140-2146.
- Chen, C. M., Krohn, J., Bhattacharya, S. & Davies, B. 2011: A comparison of exogenous promoter activity at the ROSA26 locus using a phiC31 integrase mediated cassette exchange approach in mouse ES cells. *PLoS ONE* **6**, e23376.
- Chu, F., Klobasa, W., Wu, P., Pinzi, S., Grubbs, N., Gorski, S., Cardoza, Y. & Lorenzen, M. D. 2017: Germline transformation of the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. *Insect Molecular Biology* **26**, 440-452.
- Concha, C., Belikoff, E. J., Carey, B. L., Li, F., Schiemann, A. H. & Scott, M. J. 2011: Efficient germ-line transformation of the economically important pest species *Lucilia cuprina* and *Lucilia sericata* (Diptera, Calliphoridae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **41**, 70-75.

- Depra, M., Sepel, L. M. N. & da Silva Loreto, E. L. 2004: A low-cost apparatus for transforming *Drosophila* and detecting green fluorescent protein (GFP) genetic markers. *Genetics and Molecular Biology* **27**, 70-73.
- Ding, S., Wu, X. H., Li, G., Han, M., Zhuang, Y. & Xu, T. 2005: Efficient transposition of the *piggyBac* resource (PB) transposon in mammalian cells and mice. *Cell* **122**, 473-483.
- Ekblom, R. & Galindo, J. 2011: Applications of next generation sequencing in molecular ecology of non-model organisms. *Heredity* **107**, 1-15.
- Elick, T. A., Bauser, C. A. & Fraser, M. J. 1996: Excision of the *piggyBac* transposable element in vitro is a precise event that is enhanced by the expression of its encoded transposase. *Genetica* **98**, 33-41.
- Evans, J. M., Day, J. P., Cabrero, P., Dow, J. A. T. & Davies, S. A. 2008: A new role for a classical gene: White transports cyclic GMP. *Journal of Experimental Biology* **211**, 890-899.
- Finokiet, M., Goni, B. & Loreto, E. L. S. 2007: Genetic transformation of *Drosophila willistoni* using piggyBac transposon and GFP. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **50**, 113-120.
- Fire, A., Xu, S. Q., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. & Mello, C. C. 1998: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811.
- Fogg, P. C. M., Colloms, S., Rosser, S., Stark, M. & Smith, M. C. M. 2014: New applications for phage integrases. *Journal of Molecular Biology* **426**, 2703-2716.
- Franz, A. W. E., Jasinskiene, N., Sanchez-Vargas, I., Isaacs, A. T., Smith, M. R., Khoo, C. C. H., Heersink, M. S., James, A. A. & Olson, K. E. 2011: Comparison of transgene expression in *Aedes aegypti* generated by mariner *Mos1* transposition and $\phi C31$ site-directed recombination. *Insect Molecular Biology* **20**, 587-598.
- Fraser, M. J. 2012: Insect transgenesis: Current applications and future prospects. *Annual Review of Entomology*, **57**, 267-289.

- Fraser, M. J., Coszczon, T., Elick, T. & Bauser, C. 1996: Precise excision of TTA-specific lepidopteran transposons *piggyBac* (IFP2) and *tagalong* (TFP3) from the baculovirus genome in cell lines from two species of Lepidoptera. *Insect Molecular Biology* **5**, 141-151.
- Fridell, Y. W. C. & Searles, L. L. 1991: *Vermilion* as a small selectable marker gene for *Drosophila* transformation. *Nucleic Acids Research* **19**, 5082-5082.
- Genc, H., Schetelig, M. F., Nirmala, X. & Handler, A. M. 2016: Germline transformation of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera: Tephritidae), with a *piggyBac* transposon vector. *Turkish Journal of Biology* **40**, 845-855.
- Gilles, A. F., Schinko, J. B. & Averof, M. 2015: Efficient CRISPR-mediated gene targeting and transgene replacement in the beetle *Tribolium castaneum*. *Development* **142**, 2832-2839.
- Golic, M. M., Rong, Y. S., Petersen, R. B., Lindquist, S. L. & Golic, K. G. 1997: FLP-mediated DNA mobilization to specific target sites in *Drosophila* chromosomes. *Nucleic Acids Research* **25**, 3665-3671.
- Gramates, L. S., Marygold, S. J., dosSantos, G., Urbano, J. M., Antonazzo, G., Matthews, B. B., Rey, A. J., Tabone, C. J., Crosby, M. A., Emmert, D. B., Falls, K., Goodman, J. L., Hu, Y., Ponting, L., Schroeder, A. J., Strelets, V. B., Thurmond, J., Zhou, P. & FlyBase Consortium. 2017: FlyBase at 25: looking to the future. *Nucleic Acids Research* **45**, D663-D671.
- Gratz, S. J., Cummings, A. M., Nguyen, J. N., Hamm, D. C., Donohue, L. K., Harrison, M. M., Wildonger, J. & O'Connor-Giles, K. M. 2013: Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. *Genetics* **194**, 1029-1035.
- Gratz, S. J., Ukken, F. P., Rubinstein, C. D., Thiede, G., Donohue, L. K., Cummings, A. M. & O'Connor-Giles, K. M. 2014: Highly specific and efficient CRISPR/Cas9-catalyzed homology-directed repair in *Drosophila*. *Genetics* **196**, 961-971.
- Groth, A. C. & Calos, M. P. 2004: Phage integrases: Biology and applications. *Journal of Molecular Biology* **335**, 667-678.

- Groth, A. C., Fish, M., Nusse, R. & Calos, M. P. 2004: Construction of transgenic *Drosophila* by using the site-specific integrase from phage ϕ C31. *Genetics* **166**, 1775-1782.
- Groth, A. C., Olivares, E. C., Thyagarajan, B. & Calos, M. P. 2000: A phage integrase directs efficient site-specific integration in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 5995-6000.
- Handler, A. M. 2001: A current perspective on insect gene transformation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **31**, 111-128.
- Handler, A. M., Gomez, S. P. & Obrochta, D. A. 1993: A functional-analysis of the P-element gene-transfer vector in insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **22**, 373-384.
- Handler, A. M. & Harrell, R. A. 1999: Germline transformation of *Drosophila melanogaster* with the *piggyBac* transposon vector. *Insect Molecular Biology* **8**, 449-457.
- Handler, A. M. & McCombs, S. D. 2000: The *piggyBac* transposon mediates germ-line transformation in the Oriental fruit fly and closely related elements exist in its genome. *Insect Molecular Biology* **9**, 605-612.
- Handler, A. M. & O'Brochta, D. A. 2012: Transposable elements for insect transformation. In *Insect Molecular Biology and Biochemistry*. (ed. Gill, S. & Jindra, M.), pp. 91-133. *Elsevier/Academic Press, London*.
- Hardy, S., Legagneux, V., Audic, Y. & Paillard, L. 2010: Reverse genetics in eukaryotes. *Biology of the Cell* **102**, 561-580.
- Hartley, J. L., Temple, G. F. & Brasch, M. A. 2000: DNA cloning using *in vitro* site-specific recombination. *Genome Research* **10**, 1788-1795.
- Hazelrigg, T. 1987: The *Drosophila white* gene - a molecular update. *Trends in Genetics* **3**, 43-47.
- Hediger, M., Niessen, M., Wimmer, E. A., Dubendorfer, A. & Bopp, D. 2001: Genetic transformation of the housefly *Musca domestica* with the lepidopteran derived transposon *piggyBac*. *Insect Molecular Biology* **10**, 113-119.

- Hing, A. L. Y. & Carlson, J. R. 1996: Male-male courtship behavior induced by ectopic expression of the *Drosophila white* gene: Role of sensory function and age. *Journal of Neurobiology* **30**, 454-464.
- Hitoshi, Y., Ishikawa, Y. & Matsuo, T. 2016a: Inheritance pattern of female receptivity in *Drosophila prolongata*. *Zoological Science* **33**, 455-460.
- Hitoshi, Y., Ishikawa, Y. & Matsuo, T. 2016b: Intraspecific variation in heat tolerance of *Drosophila prolongata* (Diptera: Drosophilidae). *Applied Entomology and Zoology* **51**, 515-520.
- Huang, Y. P., Liu, Z. P. & Rong, Y. K. S. 2016: Genome editing: from *Drosophila* to non-model insects and beyond. *Journal of Genetics and Genomics* **43**, 263-272.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A. & Charpentier, E. 2012: A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**, 816-821.
- Jones, W. D. 2009: The expanding reach of the GAL4/UAS system into the behavioral neurobiology of *Drosophila*. *BMB Reports* **42**, 705-712.
- Kapusi, E., Kempe, K., Rubtsova, M., Kumlehn, J. & Gils, M. 2012: phiC31 integrase-mediated site-specific recombination in barley. *PLoS ONE* **7**, e45353.
- Kempe, K., Rubtsova, M., Berger, C., Kumlehn, J., Schollmeier, C. & Gils, M. 2010: Transgene excision from wheat chromosomes by phage phiC31 integrase. *Plant Molecular Biology* **72**, 673-687.
- Khaleel, T., Younger, E., McEwan, A. R., Varghese, A. S. & Smith, M. C. M. 2011: A phage protein that binds phiC31 integrase to switch its directionality. *Molecular Microbiology* **80**, 1450-1463.
- Kim, A. & Pyykko, I. 2011: Size matters: versatile use of *PiggyBac* transposons as a genetic manipulation tool. *Molecular and Cellular Biochemistry* **354**, 301-309.
- Kirchmaier, S., Hockendorf, B., Moller, E. K., Bornhorst, D., Spitz, F. & Wittbrodt, J. 2013: Efficient site-specific transgenesis and enhancer activity tests in medaka using PhiC31 integrase. *Development* **140**, 4287-4295.

- Kittiwongwattana, C., Lutz, K., Clark, M. & Maliga, P. 2007: Plastid marker gene excision by the ϕ C31 phage site-specific recombinase. *Plant Molecular Biology* **64**, 137-143.
- Kola, V. S. R., Renuka, P., Madhav, M. S. & Mangrauthia, S. K. 2015: Key enzymes and proteins of crop insects as candidate for RNAi based gene silencing. *Frontiers in Physiology* **6**, 119.
- Kondo, S. & Ueda, R. 2013: Highly improved gene targeting by germline-specific Cas9 expression in *Drosophila*. *Genetics* **195**, 715-721.
- Krappmann, S. 2017: CRISPR-Cas9, the new kid on the block of fungal molecular biology. *Medical Mycology* **55**, 16-23.
- Krstic, D., Boll, W. & Noll, M. 2013: Influence of the *white* locus on the courtship behavior of *Drosophila* males. *PLoS ONE* **8**, e77904.
- Kudo, A., Shigenobu, S., Kadota, K., Nozawa, M., Shibata, T. F., Ishikawa, Y. & Matsuo, T. 2017: Comparative analysis of the brain transcriptome in a hyper-aggressive fruit fly, *Drosophila prolongata*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **82**, 11-20.
- Kudo, A., Takamori, H., Watabe, H., Ishikawa, Y. & Matsuo, T. 2015: Variation in morphological and behavioral traits among isofemale strains of *Drosophila prolongata* (Diptera: Drosophilidae). *Entomological Science* **18**, 221-229.
- Kuwayama, H., Yaginuma, T., Yamashita, O. & Niimi, T. 2006: Germ-line transformation and RNAi of the ladybird beetle, *Harmonia axyridis*. *Insect Molecular Biology* **15**, 507-512.
- Labbe, G. M. C., Nimmo, D. D. & Alphey, L. 2010: *piggybac*- and ϕ C31-mediated genetic transformation of the asian tiger mosquito, *Aedes albopictus* (Skuse). *PLoS Neglected Tropical Diseases* **4**, e788.
- Leighton, P. A., Van De Lavoie, M.-C., Diamond, J. H., Xia, C. & Etches, R. J. 2008: Genetic modification of primordial germ cells by gene trapping, gene targeting, and ϕ C31 integrase. *Molecular Reproduction and Development* **75**, 1163-1175.
- Li, M. A., Pettitt, S. J., Eckert, S., Ning, Z. M., Rice, S., Cadinanos, J., Yusa, K., Conte, N. & Bradley, A. 2013: The *piggyBac* transposon displays local and

- distant reintegration preferences and can cause mutations at noncanonical integration sites. *Molecular and Cellular Biology* **33**, 1317-1330.
- Linzen, B. 1974: Thetryptophan – ommochrome pathway in insects. *Advances in Insect Physiology* **10**, 117-246.
- Lister, J. A. 2010: Transgene excision in zebrafish using the phiC31 integrase. *Genesis* **48**, 137-143.
- Liu, D., Yan, S. C., Huang, Y. P., Tan, A. J., Stanley, D. W. & Song, Q. S. 2012: Genetic transformation mediated by *piggyBac* in the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **80**, 140-150.
- Lomovskaya, N. D., Emeljanova, L. K. & Alikhanian, S. I. 1970: The genetic location of prophage on the chromosome of *Streptomyces coelicolor*. *Genetics* **68**, 341-347.
- Long, D. P., Zhao, A. C., Xu, L. X., Lu, W. J., Guo, Q., Zhang, Y. & Xiang, Z. H. 2013: *In vivo* site-specific integration of transgene in silkworm via PhiC31 integrase-mediated cassette exchange. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **43**, 997-1008.
- Lu, J. J., Maddison, L. A. & Chen, W. B. 2011: PhiC31 integrase induces efficient site-specific excision in zebrafish. *Transgenic Research* **20**, 183-189.
- Lutz, K. A., Corneille, S., Azhagiri, A. K., Svab, Z. & Maliga, P. 2004: A novel approach to plastid transformation utilizes the phiC31 phage integrase. *Plant Journal* **37**, 906-913.
- Ma, H. Y., Ma, Q. W., Lu, Y., Wang, J., Hu, W., Gong, Z. J., Cai, L. L., Huang, Y., Huang, S. Z. & Zeng, F. Y. 2014: PhiC31 integrase induces efficient site-specific recombination in the *Capra hircus* genome. *DNA and Cell Biology* **33**, 484-491.
- Ma, Q. W., Sheng, H. Q., Yan, J. B., Cheng, S., Huang, Y., Chen-Tsai, Y., Ren, Z. R., Huang, S. Z. & Zeng, Y. T. 2006: Identification of pseudo *attP* sites for phage ϕ C31 integrase in bovine genome. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **345**, 984-988.

- Mao, Y. B., Cai, W. J., Wang, J. W., Hong, G. J., Tao, X. Y., Wang, L. J., Huang, Y. P. & Chen, X. Y. 2007: Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nature Biotechnology* **25**, 1307-1313.
- Markstein, M., Pitsouli, C., Villalta, C., Celniker, S. E. & Perrimon, N. 2008: Exploiting position effects and the gypsy retrovirus insulator to engineer precisely expressed transgenes. *Nature Genetics* **40**, 476-483.
- McClintock, B. 1950: The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **36**, 344-355.
- McGuire, S. E., Roman, G. & Davis, R. L. 2004: Gene expression systems in *Drosophila*: a synthesis of time and space. *Trends in Genetics* **20**, 384-391.
- Meredith, J. M., Basu, S., Nimmo, D. D., Larget-Thiery, I., Warr, E. L., Underhill, A., McArthur, C. C., Carter, V., Hurd, H., Bourgouin, C. & Eggleston, P. 2011: Site-specific integration and expression of an anti-malarial gene in transgenic *Anopheles gambiae* significantly reduces plasmodium infections. *PLoS ONE* **6**, e14587.
- Meredith, J. M., Underhill, A., McArthur, C. C. & Eggleston, P. 2013: Next-generation site-directed transgenesis in the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae*: self-docking strains expressing germline-specific phiC31 integrase. *PLoS ONE* **8**, e59264.
- Metaxakis, A., Oehler, S., Klinakis, A. & Savakis, C. 2005: *Minos* as a genetic and genomic tool in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **171**, 571-581.
- Meza, J. S., Diaz-Fleischer, F., Sanchez-Velasquez, L. R., Zepeda-Cisneros, C. S., Handler, A. M. & Schetelig, M. F. 2014: Fitness cost implications of phiC31-mediated site-specific integrations in target-site strains of the Mexican fruit fly, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). *PLoS ONE* **9**, e109690.
- Momose, T. & Concordet, J. P. 2016: Diving into marine genomics with CRISPR/Cas9 systems. *Marine Genomics* **30**, 55-65.

- Mosimann, C., Puller, A. C., Lawson, K. L., Tschopp, P., Amsterdam, A. & Zon, L. I. 2013: Site-directed zebrafish transgenesis into single landing sites with the phiC31 integrase system. *Developmental Dynamics* **242**, 949-963.
- Nakamura, T., Yoshizaki, M., Ogawa, S., Okamoto, H., Shinmyo, Y., Bando, T., Ohuchi, H., Noji, S. & Mito, T. 2010: Imaging of transgenic cricket embryos reveals cell movements consistent with a syncytial patterning mechanism. *Current Biology* **20**, 1641-1647.
- Ni, J. Q., Liu, L. P., Binari, R., Hardy, R., Shim, H. S., Cavallaro, A., Booker, M., Pfeiffer, B. D., Markstein, M., Wang, H., Villalta, C., Lavery, T. R., Perkins, L. A. & Perrimon, N. 2009: A *Drosophila* resource of transgenic RNAi lines for neurogenetics. *Genetics* **182**, 1089-1100.
- Nimmo, D. D., Alphey, L., Meredith, J. M. & Eggleston, P. 2006: High efficiency site-specific genetic engineering of the mosquito genome. *Insect Molecular Biology* **15**, 129-136.
- O'Hare, K., Murphy, C., Levis, R. & Rubin, G. M. 1984: DNA sequence of the *white* locus of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Molecular Biology* **180**, 437-455.
- Olivares, E. C., Hollis, R. P., Chalberg, T. W., Meuse, L., Kay, M. A. & Calos, M. P. 2002: Site-specific genomic integration produces therapeutic Factor IX levels in mice. *Nature Biotechnology* **20**, 1124-1128.
- Olorunniji, F. J., Buck, D. E., Colloms, S. D., McEwan, A. R., Smith, M. C. M., Stark, W. M. & Rosser, S. J. 2012: Gated rotation mechanism of site-specific recombination by ϕ C31 integrase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 19661-19666.
- Olorunniji, F. J., Rosser, S. J. & Stark, W. M. 2016: Site-specific recombinases: molecular machines for the Genetic Revolution. *Biochemical Journal* **473**, 673-684.
- Owald, D., Lin, S. W. & Waddell, S. 2015: Light, heat, action: neural control of fruit fly behaviour. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* **370**, 20140211.

- Park, S. & Lim, J. K. 1995: A microinjection technique for ethanol-treated eggs and a mating scheme for detection of germ line transformations. *Drosophila Information Service* **76**, 197-199.
- Pavlopoulos, A., Oehler, S., Kapetanaki, M. G. & Savakis, C. 2007: The DNA transposon *Minos* as a tool for transgenesis and functional genomic analysis in vertebrates and invertebrates. *Genome Biology* **8**, S2.
- Pondeville, E., Puchot, N., Meredith, J. M., Lynd, A., Vernick, K. D., Lycett, G. J., Eggleston, P. & Bourgouin, C. 2014: Efficient ϕ C31 integrase-mediated site-specific germline transformation of *Anopheles gambiae*. *Nature Protocols* **9**, 1698-1712.
- Porteus, M. & Annals, N. Y. A. S. 2011: Homologous recombination-based gene therapy for the primary immunodeficiencies. *Year in Human and Medical Genetics: Inborn Errors of Immunity II* **1246**, 131-140.
- Quiring, R., Walldorf, U., Kloter, U. & Gehring, W. J. 1994: Homology of the *eyeless* gene of *Drosophila* to the *Small eye* gene in mice and *Aniridia* in humans. *Science* **265**, 785-789.
- Reed, S. C. & Reed, E. W. 1950: Natural selection in laboratory populations of *Drosophila*. II. Competition between a *white-eye* gene and its wild type allele. *Evolution* **4**, 34-42.
- Rio, D. C., Laski, F. A. & Rubin, G. M. 1986: Identification and immunochemical analysis of biologically active *Drosophila* P element transposase. *Cell* **44**, 21-32.
- Roseman, R. R., Swan, J. R. & Geyer, P. K. 1995: A *Drosophila* insulator protein facilitates dosage compensation of the X chromosome *mini-white* gene located at autosomal insertion sites. *Development* **121**, 3573-3582.
- Rubin, G. M. & Spradling, A. C. 1982: Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* **218**, 348-353.
- Rubtsova, M., Kempe, K., Gils, A., Ismagul, A., Weyen, J. & Gils, M. 2008: Expression of active *Streptomyces* phage ϕ C31 integrase in transgenic wheat plants. *Plant Cell Reports* **27**, 1821-1831.

- Rutherford, K., Yuan, P., Perry, K., Sharp, R. & Van Duyne, G. D. 2013: Attachment site recognition and regulation of directionality by the serine integrases. *Nucleic Acids Research* **41**, 8341-8356.
- Salsman, J. & Delliare, G. 2017: Precision genome editing in the CRISPR era. *Biochemistry and Cell Biology* **95**, 187-201.
- Sarkar, A. & Collins, F. H. 2000: Eye color genes for selection of transgenic insects. In *Insect Transgenesis: Methods and Applications*. (ed. Handler, A. M. & James, A. A.), pp. 79-91. *CRC press, FL*.
- Schetelig, M. F. & Handler, A. M. 2013: Germline transformation of the spotted wing drosophilid, *Drosophila suzukii*, with a *piggyBac* transposon vector. *Genetica* **141**, 189-193.
- Schetelig, M. F., Scolari, F., Handler, A. M., Kittelmann, S., Gasperi, G. & Wimmer, E. A. 2009: Site-specific recombination for the modification of transgenic strains of the Mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 18171-18176.
- Schulte, C., Theilenberg, E., Muller-Borg, M., Gempe, T. & Beye, M. 2014: Highly efficient integration and expression of *piggyBac*-derived cassettes in the honeybee (*Apis mellifera*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 9003-9008.
- Sekhavi, M. H., Dormiani, K., Ghaedi, K., Khazaie, Y., Hosseini, M., Tahmoorspur, M., Nassiri, M. R., Foruzanfar, M. & Esfahani, M. H. N. 2013: Identification of a specific pseudo *attP* site for phage phiC3 integrase in the genome of Chinese hamster in CHO-K1 cell line. *Iranian Journal of Biotechnology* **11**, 54-58.
- Setoguchi, S., Kudo, A., Takanashi, T., Ishikawa, Y. & Matsuo, T. 2015: Social context-dependent modification of courtship behaviour in *Drosophila prolongata*. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **282**, 20151377.
- Setoguchi, S., Takamori, H., Aotsuka, T., Sese, J., Ishikawa, Y. & Matsuo, T. 2014: Sexual dimorphism and courtship behavior in *Drosophila prolongata*. *Journal of Ethology* **32**, 91-102.

- Sheng, G. J., Thouvenot, E., Schmucker, D., Wilson, D. S. & Desplan, C. 1997: Direct regulation of *rhodopsin 1* by *Pax-6/eyeless* in *Drosophila*: Evidence for a conserved function in photoreceptors. *Genes & Development* **11**, 1122-1131.
- Shinmyo, Y., Mito, T., Matsushita, T., Sarashina, I., Miyawaki, K., Ohuchi, H. & Noji, S. 2004: *piggyBac*-mediated somatic transformation of the two-spotted cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Development Growth & Differentiation* **46**, 343-349.
- Siegal, M. L. & Hartl, D. L. 1996: Transgene coplacement and high efficiency site-specific recombination with the Cre/*loxP* system in *Drosophila*. *Genetics* **144**, 715-726.
- Singh, B. K. & Gupta, J. P. 1977: Subgenus *Drosophila* (*Scaptodrosophila*) in India (Diptera-Drosophilidae). *Oriental Insects* **11**, 237-241.
- Sitaraman, D., Zars, M., LaFerriere, H., Chen, Y. C., Sable-Smith, A., Kitamoto, T., Rottinghaus, G. E. & Zars, T. 2008: Serotonin is necessary for place memory in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 5579-5584.
- Smith, M. C. M., Brown, W. R. A., McEwan, A. R. & Rowley, P. A. 2010: Site-specific recombination by ϕ C31 integrase and other large serine recombinases. *Biochemical Society Transactions* **38**, 388-394.
- Starr, C. K. 2017: How many insect species are in your country? The example of Trinidad and Tobago. *Journal of Natural History* **51**, 1589-1592.
- Stern, D. L., Crocker, J., Ding, Y., Frankel, N., Kappes, G., Kim, E., Kuzmickas, R., Lemire, A., Mast, J. D. & Picard, S. 2017: Genetic and transgenic reagents for *Drosophila simulans*, *D. mauritiana*, *D. yakuba*, *D. santomea*, and *D. virilis*. *G3-Genes Genomes Genetics* **7**, 1339-1347.
- Sturtevant, A. H. 1915: Experiments on sex recognition and the problem of sexual selection in *Drosophila*. *Journal of Animal Behavior* **5**, 351-366.
- Tamura, T., Kuwabara, N., Uchino, K., Kobayashi, I. & Kanda, T. 2007: An improved DNA injection method for silkworm eggs drastically increases the efficiency of producing transgenic silkworms. *Journal of Insect Biotechnology and Sericology* **76**, 155-159.

- Taning, C. N. T., Van Eynde, B., Yu, N., Ma, S. Y. & Smagghe, G. 2017: CRISPR/Cas9 in insects: Applications, best practices and biosafety concerns. *Journal of Insect Physiology* **98**, 245-257.
- Thibault, S. T., Singer, M. A., Miyazaki, W. Y., Milash, B., Dompe, N. A., Singh, C. M., Buchholz, R., Demsky, M., Fawcett, R., Francis-Lang, H. L., Ryner, L., Cheung, L. M., Chong, A., Erickson, C., Fisher, W. W., Greer, K., Hartouni, S. R., Howie, E., Jakkula, L., Joo, D., Killpack, K., Laufer, A., Mazzotta, J., Smith, R. D., Stevens, L. M., Stuber, C., Tan, L. R., Ventura, R., Woo, A., Zakrajsek, I., Zhao, L., Chen, F., Swimmer, C., Kopczynski, C., Duyk, G., Winberg, M. L. & Margolis, J. 2004: A complementary transposon tool kit for *Drosophila melanogaster* using *P* and *piggyBac*. *Nature Genetics* **36**, 283-287.
- Thomson, J. G., Chan, R., Thilmony, R., Yau, Y. Y. & Ow, D. W. 2010: PhiC31 recombination system demonstrates heritable germinal transmission of site-specific excision from the Arabidopsis genome. *BMC Biotechnology* **10**, 17.
- Thorpe, H. M. & Smith, M. C. M. 1998: *In vitro* site-specific integration of bacteriophage DNA catalyzed by a recombinase of the resolvase/invertase family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 5505-5510.
- Thyagarajan, B., Olivares, E. C., Hollis, R. P., Ginsburg, D. S. & Calos, M. P. 2001: Site-specific genomic integration in mammalian cells mediated by phage ϕ C31 integrase. *Molecular and Cellular Biology* **21**, 3926-3934.
- Toda, M. J. 1991: Drosophilidae (Diptera) in Myanmar (Burma) .7. The *Drosophila melanogaster* species-group, excepting the *D. montium* species-subgroup. *Oriental Insects* **25**, 69-94.
- Tomoyasu, Y. & Denell, R. E. 2004: Larval RNAi in *Tribolium* (Coleoptera) for analyzing adult development. *Development Genes and Evolution* **214**, 575-578.
- Venken, K. J. T. & Bellen, H. J. 2007: Transgenesis upgrades for *Drosophila melanogaster*. *Development* **134**, 3571-3584.

- Venken, K. J. T. & Bellen, H. J. 2014: Chemical mutagens, transposons, and transgenes to interrogate gene function in *Drosophila melanogaster*. *Methods* **68**, 15-28.
- Venken, K. J. T., He, Y. C., Hoskins, R. A. & Bellen, H. J. 2006: Pacman : A BAC transgenic platform for targeted insertion of large DNA fragments in *D. melanogaster*. *Science* **314**, 1747-1751.
- Walker, A. R., Howells, A. J. & Tearle, R. G. 1986: Cloning and characterization of the *vermillion* gene of *Drosophila melanogaster*. *Molecular & General Genetics* **202**, 102-107.
- Wang, H. Y., Yang, H., Shivalila, C. S., Dawlaty, M. M., Cheng, A. W., Zhang, F. & Jaenisch, R. 2013: One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* **153**, 910-918.
- Wang, W., Lin, C. Y., Lu, D., Ning, Z. M., Cox, T., Melvin, D., Wang, X. Z., Bradley, A. & Liu, P. T. 2008: Chromosomal transposition of *PiggyBac* in mouse embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 9290-9295.
- Warren, I. A., Fowler, K. & Smith, H. 2010: Germline transformation of the stalk-eyed fly, *Teleopsis dalmanni*. *BMC Molecular Biology* **11**, 86.
- Xiao, C. F., Qiu, S. & Robertson, M. 2017: The *white* gene controls copulation success in *Drosophila melanogaster*. *Scientific Reports* **7**, 7712.
- Xu, Q., Guerrero, F. D., Palavesam, A. & de Leon, A. A. P. 2016: Use of electroporation as an option to transform the horn fly, *Haematobia irritans*: a species recalcitrant to microinjection. *Insect Science* **23**, 621-629.
- Yonemura, N., Tamura, T., Uchino, K., Kobayashi, I., Tatematsu, K., Iizuka, T., Sezutsu, H., Muthulakshmi, M., Nagaraju, J. & Kusakabe, T. 2012: PhiC31 integrase-mediated cassette exchange in silkworm embryos. *Molecular Genetics and Genomics* **287**, 731-739.
- Yonemura, N., Tamura, T., Uchino, K., Kobayashi, I., Tatematsu, K., Iizuka, T., Tsubota, T., Sezutsu, H., Muthulakshmi, M., Nagaraju, J. & Kusakabe, T. 2013: phiC31-integrase-mediated, site-specific integration of transgenes in

the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *Applied Entomology and Zoology* **48**, 265-273.

Yu, Z. S., Chen, H. Q., Liu, J. Y., Zhang, H. T., Yan, Y., Zhu, N. N., Guo, Y. W., Yang, B., Chang, Y., Dai, F., Liang, X. H., Chen, Y. X., Shen, Y., Deng, W. M., Chen, J. M., Zhang, B., Li, C. Q. & Jiao, R. J. 2014: Various applications of TALEN- and CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination to modify the *Drosophila* genome. *Biology Open* **3**, 271-280.

Yusa, K. 2015: *piggyBac* Transposon. *Microbiology Spectrum* **3**, MDNA3-0028-2014.

Zhang, S. D. & Odenwald, W. F. 1995: Misexpression of the white (w) gene triggers male-male courtship in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 5525-5529.