

転移因子ベクターを用いた膜翅目カブラハバチの形質転換

炭谷 めぐみ・山本 大介・大石 陸生・李 載旻・畠山 正統

Megumi SUMITANI¹⁾, Daisuke S. YAMAMOTO¹⁾, Kugao OISHI^{1,2)}, Jae Min LEE³⁾
and Masatsugu HATAKEYAMA³⁾: Stable Germline Transformation in the Sawfly,
*Athalia rosae ruficornis**

¹⁾ Division of Bioscience, Graduate School of Science and Technology, Kobe University, Nada, Kobe, Hyogo 657-8501, Japan

²⁾ Department of Biology, Faculty of Science, Kobe University, Nada, Kobe, Hyogo 657-8501, Japan

³⁾ Developmental Mechanisms Laboratory, Developmental Biology Department, Institute of Insect and Animal Sciences, National Institute of Agrobiological Sciences, Owashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan

E-mail: sawfly@nias.affrc.go.jp (MH)

黄熱病を媒介するネッタイシマカ *Aedes aegypti*、産業に利用されているカイコガ *Bombyx mori* など昆虫とヒトとのかわりは深く、昆虫は多角的に研究されている。近年、昆虫の遺伝的形質を改変し、産業、農業、医学に応用しようとする研究が盛んに行われている。そのような昆虫における形質転換系は、1982年キョウジョウバエ *Drosophila melanogaster* において初めて成功した (Rubin and Spradling, 1982)。この系では転移因子 *P* をもとに作成したベクターと転移酵素のみを含むヘルパーが用いられた。転移因子 *P* のシステムを用いて他の昆虫における形質転換が試みられたが、ショウジョウバエ科以外の昆虫では成功しなかった。最近になってチチュウカイミバエ *Ceratitis capitata* が *Minos* を用いたシステムで形質転換に成功した例をかかわりに *P* 以外の転移因子を用いた系の開発が試みられるようになり、この分野は急速に発展してきた。*Hermes*、*Mos 1*、*hobo*、*piggyBac* などを用いて、これまでに双翅目 13 種、鱗翅目 2 種、甲虫目 1 種についての形質転換の成功例が報告されている (Atkinson et al., 2001; Handler, 2002)。

ミツバチや、生物農薬としての寄生蜂、花粉媒介昆虫としてのハナバチなどでも、優良形質の付加や、妊性のコントロールといった側面から遺伝子操作技術の必要性が指摘されてきた。しかしながら、これらの有用昆虫を含む膜翅目では形質転換系が確立されていない。

カブラハバチ *Athalia rosae ruficornis* は膜翅目広腰亜目 (Hymenoptera: Symphyta) に属し、社会性をもたず、実験室内で通年飼育ができる昆虫である。カブラハバチは研究を行う上で有利な特長をいくつか持っている新しいモデル生物でもある。しかしながら、遺伝子の発現や機能を研究する上で必要不可欠である形質転換系がない。カブラハバチにおけるこの系の開発はカブラハバチをモデルにした生物学的研究のみならず、他の膜翅目昆虫への応用も期待できるものである。そこで、カブラハバチにおけるこの系の開発を目的に *piggyBac* 因子を利用したベクター、ヘルパーを用いて形質転換を試みた。

Table 1 Results of injection of *piggyBac* vector and helper plasmids into mature unfertilized eggs of *Athalia rosae ruficornis* through the posterior pole.

No. eggs injected	No. 2-day-old embryos normally developing	No. larvae hatched	No. haploid male adults (Go) eclosed	No. fertile Go males	No. Go males producing GFP-positive progeny
278	112	91	61	57	3

* Abstract of paper read at the 38th Annual Meeting of Arthropodan Embryological Society of Japan, July 5-6, 2002 (Sugadaira, Nagano).

Table 2 Initial step in the establishment of GFP-positive (+) transformant lines in *Athalia rosae ruficornis*.

G ₀ males crossed	No. GFP-positive progeny (G ₁ embryos)	No. eclosed (G ₁ diploid females)	No. normally developing G ₂ embryos from <i>in vitro</i> activated eggs:		No. eclosed (G ₂ haploid males):	
			GFP +	GFP -	GFP +	GFP -
Tr-12-06	2	1	9	14	8	11
Tr-12-14	1	1	5	1	0	0
Tr-13-04	1	0				

ベクターには外来遺伝子としてキイロシヨウジョウバエの *hsp 70* プロモーターによって調節される GFP 遺伝子を組み込んだ。このベクターとともに *piggyBac* 転移酵素のみを含んだヘルパーを、成熟未受精卵の後極から顕微注入した。278 個体に注入したうち、61 個体が成虫まで育ち、これらはすべてオスであった。これらのオスをそれぞれ 2 ないし 3 個体のメスと交配した。交配できた 57 系統のうち次世代に GFP の発現が観察される個体を生じた系統が 3 得られた (Table 1)。そのうち 1 系統は維持することに成功している (Table 2)。サザン法により、維持できた系統にはゲノム DNA 中に外来遺伝子が 1 コピー挿入されており、安定に受け継がれることが確認できた。

引用文献

- Atkinson, P.W., A.C. Pinkerton and D.A. O'Brochta (2001) *Annu. Rev. Entomol.*, **46**, 317–346.
 Handler, A.M. (2002) *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **32**, 1211–1220.
 Rubin, G.M. and A.C. Spradling (1982) *Science*, **218**, 348–353.