

膜翅目昆虫カブラハバチにおける外来遺伝子導入系の開発

炭谷 めぐみ・畠山 正統・大石 陸生

Megumi SUMITANI¹⁾, Masatsugu HATAKEYAMA²⁾ and Kugao OISHI^{1,2)}: Introduction of an exogenous gene by microinjection of plasmid DNA into eggs of the sawfly, *Athalia rosae ruficornis* (Hymenoptera)*

¹⁾ Department of Biology, 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

カブラハバチ *Athalia rosae ruficornis* は膜翅目の昆虫で、成熟未受精卵を人為的に付活して単為発生を開始させることができ、これらはすべて半数体の雄となる。また、昆虫で唯一、卵細胞質内精子注入法 (ICSI 法) により体外人工授精ができる、などというユニークな特長をもっている (Oishi *et al.*, 1993, 1995, 1998)。私たちは、これらの特長を利用して、カブラハバチを発生生物学的研究の新しいモデル生物として開発しようとしている。しかしながら、カブラハバチには現在のところ、他のモデル生物で開発されているような外来遺伝子を導入する系がない。発生初期の遺伝子発現や遺伝子機能の解明には、有効な遺伝子導入・形質転換系の開発が不可欠である。

そこで、カブラハバチ成虫雌卵巣より採取した成熟未受精卵に DNA を顕微注入する方法で、外来遺伝子の導入および形質転換が可能かどうかを調べた。顕微注入には、レポーター遺伝子として緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を組み込んだプラスミド DNA を用い、これらはキイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* の熱ショックタンパク質プロモーター (hsp70) を上流に持ち、温度処理によって GFP の発現を誘導することができる。このプラスミド DNA (500 ng/ μ l) を成熟未受精卵に注入した。胚は 25°C で 2 時間飼育し、その後、30°C で 24 時間、熱ショックを与えた。注入後 48 時間の胚を蛍光顕微鏡下で観察し、GFP の発現を調べた。

卵の前極からプラスミド DNA を注入したところ、そのうちの約 6% の胚で頭部の全体または局所的に GFP が発現していることが観察された (Table 1, I)。しかしこの発現は頭部のみで、生殖細胞周辺では全く見られないことから、次世代には受け継がれないと考えた。そこで、将来、生殖細胞が形成される卵の後極からプラスミド DNA を注入したところ、そのうち約 3% で GFP の発現が観察された (Table 1, II)。これらの胚では尾部に局所的に蛍光が見られ、いくつかのものについては生殖細胞と思われる細胞で GFP の発現が確認された。

また、精子とともにプラスミド DNA を卵の前極から注入したところ、注入した卵のうちの約 6% に GFP の発現が確認された (Table 1, III)。多くの胚では、卵前極からプラスミド DNA のみを注入した場合と同様の頭部の局所的な発現ではあったが、蛍光が観察された胚のうちの約 28% では胚帯全域にわたって GFP が発現していた。眼が着色しない突然変異 (*cream eye color: cec*) (Lee *et al.*, 1998) を用いることにより、胚帯全域で GFP が発現している胚は受精個体 (二倍体雌) であることも確認できた。

このように、プラスミド DNA を成熟未受精卵にそのまま、あるいは精子とともに注入することにより、外来遺伝子を胚で発現させることができた。プラスミド DNA の後極からの注入で生殖細胞付近での発現が確認できたものと、精子とともに卵の前極から注入して胚帯全域での発現が確認できたものについては、ゲノム内に外来遺伝子が組み込まれて次世代に受け継がれる可能性がある。今後、これらの胚を飼育し子孫検定を行い、形質転換系統を単離できるかを検討する。

* Abstract of paper read at the 35th Annual Meeting of Arthropodan Embryological Society of Japan, June 4–5, 1999 (Okayama, Okayama).

Table 1 Expression of an exogenous gene (GFP) introduced by microinjection of plasmid DNA in *Athalia rosae ruficornis* embryos.

Injection at	Heat treatment (30°C, 24 h)	No. of eggs injected (%)	No. of embryos normally developing after 48 h (%)	No. of embryos expressing GFP
I. Anterior end	+	157 (100)	33 (21.0)	9 (5.7)
	—	202 (100)	22 (10.9)	1 (0.5)
II. Posterior end	+	451 (100)	60 (13.3)	15 (3.3)
	—	222 (100)	30 (13.5)	0
III. Anterior end with sperm	+	399 (100)	161 (40.4)	25* (6.3)

*Includes seven embryos in which GFP were expressed along with entire germ band.

引用文献

- Lee, J.M., Y. Hashino, M. Hatakeyama, K. Oishi and T. Naito (1998) *J. Insect Behav.*, **11**, 419–428.
 Oishi, K., M. Sawa, M. Hatakeyama and Y. Kageyama (1993) *Genetica*, **88**, 119–127.
 Oishi, K., M. Sawa and M. Hatakeyama (1995) *Proc. Arthropod. Embryol. Soc. Jpn.*, **30**, 1–8.
 Oishi, K., M. Hatakeyama and M. Sawa (1998) In R. N. Chatterjee and L. Sanchez (eds.), *Genome Analysis in Eukaryotes: Developmental and evolutionary aspects*, pp. 51–64. Narosa Publishing House, New Delhi.