HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ハシリショウジョウバエにおける遺伝子組換え系統の確立
Author(s)	島田, 公夫
Citation	低温科学, 69, 151-155 生物進化研究のモデル生物群としてのショウジョウバエ. 北海道大学低温科学研究所編
Issue Date	2011-03-31
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/45199
Type	bulletin (article)
File Information	LTS69_017.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

低温科学 69 （2011） 151-155

ハシリショウジョウバエにおける遺伝子組換え系統の確立

島田　公夫[1),*]

2010 年 12 月 14 日受付，2010 年 12 月 20 日受理

ハシリショウジョウバエの一種，*Chymomyza costata* は北半球の冷温帯と亜寒帯に広く分布し，ショウジョウバエ科の中では珍しく，幼虫で休眠し越冬する．幼虫休眠の誘導には短日が有効で，札幌産では臨界日長が 14 時間付近にある．臨界日長はどのように計られるのだろうか？ 「光周反応の測時機構に概日時計が関わっている」という Bünning (1936) の仮説があり，この証明を目指して行った *C. costata* における遺伝子組換え実験の概要を紹介する．ターゲットにした遺伝子は *timeless* で，*piggyBac* と呼ばれるトランスポゾン由来の遺伝子組換えベクターを介して，*timeless* の強制発現系統やノックアウト系統を確立した．

Establishment of transgenic lines in *Chymomyza costata*

Kimio Shimada[1,*]

A drosophilid fly, *Chymomyza costata* is living in the cool temperate and subarctic zones of the Northern Hemisphere. This species enters winter diapause at the larval stage in contrast to most of other drosophilid species. Short-day photoperiods are effective for the induction of larval diapause. The critical photoperiod of a wild-type strain collected in Sapporo is about 14 hours. How is the length of day or night measured? Bünning (1936) has proposed a hypothesis that the photoperiodic time measurement system involves the circadian clock. To test this hypothesis, I prepared two transgenic lines of *C. costata*. In these lines, the expression of a circadian clock gene, *timeless*, was enhanced or inhibited with heat shock treatment. The germline transformation was mediated by a lepidopteran transposon, *piggyBac*.

1. はじめに

マエグロハシリショウジョウバエ *Chymomyza costata* (Zetterstedt, 1838) は，ショウジョウバエ科，ハシリショウジョウバエ属の昆虫で，北半球の冷温帯と亜寒帯に広く分布する．分布域は北極圏にも及び，寒極の町として知られる東シベリアのベルホヤンスクでも採集されている．寒冷地域に生息するショウジョウバエ科の多くの種が成虫で越冬するのに対して，このハシリショウジョウバエは 3 齢（終齢）幼虫で休眠し，越冬する．

本種の幼虫休眠は，光周反応によって誘導され，短日が休眠の誘導に有効である．分布域の南限に近い札幌（北緯 43 度）産の個体群の臨界日長は，15°Cで飼育した場合，14 時間付近にある（Riihimaa and Kimura, 1989）．臨界日長は緯度が高くなる程，長くなる傾向があり，フィンランドのヴァルカウス（Varkaus，北緯 62 度）産では 19 時間 30 分である（Riihimaa and Kimura, 1989）．一方，光周反応を示さない非休眠系統も知られており，これは，北海道大学苫小牧研究林（北緯 42 度 40 分）で採集されたハエの子孫から交配実験によって選抜された（Riihimaa and Kimura, 1988）．

C. costata における臨界日長の地理的変異や光周反応を示さない系統の存在は，昆虫の光周反応を分子生物学的に解明するために重要である．私はチェコの昆虫学研究所の Kostal らとの共同研究によって，光周反応を示す系統と示さない系統における概日時計遺伝子の発現状態を比較し，光周反応を示さない非休眠系統では，本来，昼夜で振幅する *period* の発現が弱くなっていることを見出した（Kostal and Shimada, 2001）．さらに，光周反応を示さない系統では，*timeless* の発現が全く見られないことを突き止めた（Pavelka et al., 2003; Steh-

１）北海道大学低温科学研究所
[1] Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan
* 現住所　〒004-0032　札幌市厚別区上野幌 2-4-2-7
* Current address: Atsubetsu-ku, Kaminopporo 2-4-2-7, Sapporo 004-0032, Japan

lik et al., 2008)．こうした事実は，光周反応，特に昼あるいは夜の長さを計る測時機構に概日時計が関わっているというBünningの仮説を支持しているように見える．

しかし，概日時計遺伝子が光周反応に関わっていることを，もっと強力に証明するためには，光周反応を示さない系統で*timeless*を強制的に発現させて休眠性を回復させてみる必要がある．また，正常に光周反応を示す系統で*timeless*の発現をノックアウトして休眠性が失われることを確かめてみる必要がある．本報告では，こうした目的のためにトランスポゾン由来の遺伝子組換え用ベクターを用いて，*timeless*の強制発現系統とノックアウト系統を確立した方法を紹介する．

2．材料と方法

2.1　遺伝子組換え実験に用いたショウジョウバエ

実験に用いたショウジョウバエは，札幌産（野生型）の*C. costata*と苫小牧産の同種の子孫から分離された光周反応を示さない非休眠系統である．札幌産のハエは18°C16時間明期の長日条件で，非休眠系統は18°C10時間明期の短日条件で，ともに，ドライイースト，コーンミール，麦芽を含む寒天培地で継代飼育した．

2.2　遺伝子組換え用ベクターの作成

目的の遺伝子を強制発現あるいはノックアウトするための遺伝子組換え用のベクターは，pBac{3xP3-EGFPafm} (Horn et al., 2000) を改変することによって構築した．このプラスミド型のベクターは，鱗翅目昆虫のイラクサギンウワバ*Trichoplusia ni*のトランスポゾンである*piggyBac*に，緑色蛍光蛋白質（GFP）のDNA配列を乗せ，pUC18に組込んだものである．緑色蛍光蛋白質は，遺伝子組換えの成否を可視化するマーカーとして組込まれ，その発現は，3xP3プロモーターに眼の発生に関わる転写因子のPax-6/eyelessが結合することによって促進される．pBac{3xP3-EGFPafm}にはマルチクローニングサイトがあり，制限酵素の*Asc*I，*Fse*I，*Bgl*IIによって切断される．この部位に目的のDNA配列を挿入することができる．

*timeless*遺伝子を強制発現させるためのベクター，pBac{EGFP-tim}は，pBac{3xP3-EGFPafm}の*Asc*Iサイトに*C. costata*の*timeless* cDNAをヒートショック蛋白質，*hsp70*のプロモーターとターミネーター（polyA付加配列）の間に挟んで挿入したものである．まず，*timeless* cDNA (GenBank accession No. AB073724) の塩基配列番号452–4522の翻訳領域を逆転写PCR (RT-PCR) 法によって増幅した．鋳型には*C. costata*の成虫頭部から抽出した総RNAを用いた．プライマーの配列は，timF（5’-AAGCGGCCGCATGGACTGGTTACTCGCAAC-3’）（センス配列）とtimR（5’-AAGCGGCCGCTCAATGATAGTAGGGCACAC-3’）（アンチセンス配列）で，ともに5’側に*Not*Iで切断される配列が付加されている．PCR産物をWizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) で精製後，*Not*Iで処理した．つぎに，*hsp70*のプロモーターとターミネーターの配列を持つP因子ベクター，pP{CaSpeR-hs}のマルチクローニングサイトを制限酵素の*Not*Iで切断し，開いた部位に上記のPCR産物をT4リガーゼを用いて連結した．*timeless* cDNAの配列を含むpP{CaSpeR-hs}をDH5αコンピテントセルに取込み，LB寒天培地で培養した．増殖したpP{CaSpeR-hs}をアルカリSDS法で抽出・精製し，これを鋳型にして，*timeless* cDNAを組込んだ*hsp70*プロモーターからターミネーターまでの部分をPCRで増幅した．プライマーの配列は，hspF (5’-AAGGCGCGCCATCCCAAAACAAACTGGTTA-3’) とhspR (5’-AAGGCGCGCCTCCTGACCGTCCATCGCAAT-3’) で，ともに5’側に*Asc*Iで切断される配列が付加されている．このPCR産物を前述のPromegaのキットで精製し，*Asc*Iで処理後，同じく*Asc*Iで処理されたpBac{3xP3-EGFPafm}に連結した．こうして構築されたpBac{EGFP-tim}をDH5αに取込んで増殖し，Plasmid Mini Kit (Qiagen) で精製後，遺伝子組換え実験に用いた．

*timeless*遺伝子をノックアウトするためのベクター，pBac{EGFP-timIR}は，pBac{EGFP-tim}の*timeless* cDNA翻訳配列を逆向き反復配列に置換えたものである．まず，*timeless* cDNA (GenBank accession No. AB073724) の塩基配列番号883–1214の翻訳領域を，前述の総RNAを鋳型にして，逆転写PCR法で増幅した．プライマーの配列は，timIRF (5’-AAGAATTCTCGGAGACCAAGCTATCACC-3’) とtimIRR (5’-AAGGCCGGCCGACAATGACGCCTCAAACC-3’) で，それぞれ，5’側に*Eco*RIあるいは*Fse*Iで切断される配列が付加されている．PCR産物を精製後，*Eco*RIで処理し，消化物同士をリガーゼで連結して逆向き反復配列を作成した．つぎに，pP{CaSpeR-hs}の*hsp70*のプロモーターとターミネーターの配列を別々にPCR法で増幅した．プロモーター用のプライマーはhspF（前述）とhspPR (5’-AAGGCCGGCCTATTCAGAGTTCTCTTCTTG-3’) で，それぞれ，5’側に*Asc*Iあるいは*Fse*Iで切断される配列が付加されている．ターミネーター用のプライマーはhspTF (5’-AAGGCCGGCCGTCGACTAAGGCCAAAGAGT-3’) とhspTR (5’-AAAGATCTTCCTGACCGTCCATCGCAAT-3’) で，それぞれ，5’側に*Fse*Iあるいは*Bgl*IIで切断される配列が付加されている．ふたつのPCR産物を*Fse*Iで処理しリガーゼで連結した後，*Asc*Iおよび*Bgl*IIで処理した．消化物を同様に制限酵素処理されたpBac{3xP3-EGFPafm}に組

込み，DH5α に取込んで増殖した．増殖したベクターを精製後 *Fse*I で処理し，同じ制限酵素で処理した逆向き反復配列と連結した．こうして作成された pBac{EGFP-timIR}は SURE コンピテントセルに取込んで増殖し，Qiagen のキットで精製後，組換え実験に用いた．

2.3 遺伝子組換え用ベクターの注入

遺伝子組換え用ベクター，pBac{EGFP-tim}あるいは pBac{EGFP-timIR}と，転移酵素発現用のベクター（ヘルパーベクター），phspBac (Handler and Harrell, 1999) は，ともに注入緩衝液（5 mM KCl，0.1 mM NaH_2PO_4，pH 6.8）に溶解し，マイクロピペットを用いて，*C. costata* の初期胚に注入した．強制発現用の pBac{EGFP-tim}は光周反応を失った非休眠系統に，ノックアウト用の pBac{EGFP-timIR}は光周反応を示す札幌産（野生型）の初期胚に注入した．初期胚は産卵後 1 時間以内に採取した胞胚期以前の胚を使用した．胚をカバーグラス（5×18 mm）に貼付けた両面テープ上に整列し，70%エタノールに 1 分間浸けて除菌した後，実体顕微鏡のステージに固定した．マイクロピペットは外径 1 mm のガラスキャピラリー（GD-1, Narishige）をマイクロピペットプーラー（PC-10, Narishige）で引いて作成した．遺伝子組換え用ベクター（200 ng/μL）と転移酵素発現用ベクター（100 ng/μL）の混合液 2 μL をマイクロピペットに充填し，マニピュレーター（MN-153, Narishige）に固定した．マイクロピペットを流動パラフィンを充填したインジェクター（IM-6, Narishige）につなぎ，顕微鏡のステージとマニピュレーターを操作しながら，初期胚の後端に遺伝子組換え用混合液（10 nL）を注入した．初期胚の後端には，極細胞と呼ばれ後に生殖細胞に分化する細胞群がある．ショウジョウバエの遺伝子組換え体は，この極細胞の核 DNA に外来の遺伝子を組込むことによって作成される．

2.4 遺伝子組換え体のスクリーニング

遺伝子組換えベクターを注入された初期胚は，両面テープに貼付けたまま小型シャーレに移し寒天培地上で 25°Cで培養した．注入から 1 日後，初期胚を 38°Cで 30 分間熱処理して，転移酵素発現用ベクターを活性化し遺伝子組換えを促進した．孵化した幼虫はガラス管瓶（外径 3 cm，高さ 10 cm）に移し成虫まで寒天培地で飼育した．羽化した成虫（G 0 世代）同士を雌雄 1 個体ずつ交配し次世代（G 1 世代）を得た．G 1 世代の 2 齢および 3 齢幼虫を飼育瓶のガラス越しに簡易蛍光実体顕微鏡で観察し，中枢神経系から緑色蛍光を発する個体を選別した．簡易蛍光実体顕微鏡は，青色発光ダイオード（NSPB500S，日亜化学）を光源に使い，古い実体顕微鏡の対物レンズに UV フィルターとしてサングラスのレンズを被せた簡便なものである．選別した個体に由来する雌雄を継代飼育して組換え遺伝子がホモ接合（homozygous）である系統を確立した．

2.5 組換え遺伝子の発現確認

確立された遺伝子組換え系統における遺伝子の発現は，逆転写 PCR (RT-PCR) 法によって作成した cDNA の配列を解析して確認した．蛹化間近な 3 齢幼虫を 38°Cで 30 分間熱処理した後，中枢神経系を含む前端部分を 10 個体集め，RNeasy (Qiagen) で総 RNA を抽出した．この RNA を鋳型にして，ThermoScript RT-PCR System (Invitrogen) で cDNA を作成した．プライマーには，Qt (5'-CCAGTGAGCAGAGTGACGAGGACTCGAGCTCAAGCTTTTTTTTTTTTTTTT-3') を使用した．作成した cDNA を鋳型にして，*timeless* の組換え遺伝子を PCR 法で増幅した．プライマーには前述の timF と Qt および Qo（5'-CCAGTGAGCAGAGTGACG-3'）を使用した．組換え遺伝子 *timeless* の後端部の DNA 配列を BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) で増幅した．プライマーには timSF (5'-GCAGTCAGTTCCAAGCAGGCC-3') を用いた．配列の決定には，ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer を利用した．

3. 結果と考察

マエグロハシリショウジョウバエ *C. costata* を使った遺伝子組換え実験の組換え効率等を表 1 に示す．pBac{EGFP-tim}と pBac{EGFP-timIR}を構築するために

表 1：マエグロハシリショウジョウバエにおける遺伝子組換え効率

ベクター (Kbp)	初期胚	幼虫（%）	蛹（%）	成虫（%）	G 1 組換え体（%）	組換え系統（%）	世代数*
pBac{EGFP}** (6.5)	800	152 (19.0)	128 (16.0)	68 (8.5)	15 (1.875)	1 (0.125)	42
pBac{EGFP-tim} (11.5)	954	174 (18.2)		84 (8.8)	1 (0.1)	1 (0.1)	30
pBac{EGFP-timIR} (8.2)	1320	146 (11.1)		78 (5.9)	3 (0.23)	2 (0.15)	16

*2010 年 12 月現在の世代数
**pBac{3xP3-EGFPafm}の略

用いた元ベクター，pBac{3xP3-EGFPafm}を初期胚に注入した場合，800 卵の胚から 152 個体（19.0%）の幼虫が孵化した．しかし成虫に羽化したのは 68 個体（8.5%）であった．羽化した雌雄（G 0 世代）を 1 個体ずつ交配して得られた G 1 世代の幼虫を蛍光実体顕微鏡で観察して，中枢神経系から緑色蛍光を発する個体を選別した結果，15 個体（1.875%）の遺伝子組換え体が得られた．鱗翅目昆虫のトランスポゾン，*piggyBac* を組込んだプラスミド型ベクターは，*C. costata* の遺伝子組換えにも有効であった．キイロショウジョウバエに由来する 3xP3 プロモーターも有効に働いて，緑色蛍光蛋白質を発現させた．しかし，このハシリショウジョウバエは，白眼のような，成虫でも緑色蛍光を識別できる系統を持たないので，遺伝子組換えのスクリーニングは幼虫でしか行えない．飼育瓶のガラス越しのスクリーニングでは見逃される組換え体もある．15 個体の遺伝子組換え幼虫に由来する雌雄を 1 個体ずつ交配し，これを数世代繰り返して，ホモ接合な系統を確立した．この過程で，産卵数の少ない雌雄は除かれたので，確立された系統はひとつだけであった．

timeless cDNA の翻訳領域や逆向き反復配列を pBac{3xP3-EGFPafm}に組込んで組換え実験を行った場合，幼虫の孵化率（18.2，11.1%）や成虫の羽化率（8.8，5.9%）に大きな変化はなかったが，組換え率（0.1，0.23%）は 1/10 近く減少した．組換えベクターの DNA サイズが大きくなる程，組換えが難しくなるものと思われる．結局，ホモ接合な組換え系統は，pBac{EGFP-tim}で 1 系統，pBac{EGFP-timIR}で 2 系統確立された．

pBac{EGFP-tim}を介して *timeless* の翻訳領域の cDNA が組込まれた，光周反応を示さない非休眠系統の幼虫では，38°C30 分の熱処理後，*timeless* mRNA の発現が見られた．図 1 に RT-PCR 産物をアガロース上で電気泳動した結果を示す．組換え系統を熱処理した場合，4Kbp 付近に *timeless* に由来すると思われる PCR 産物が確認できた．熱処理しなかった場合や非組換え系統では，*timeless* の発現は確認できなかった．キイロショウジョウバエ由来の *hsp70* のプロモーターはマエグロハシリショウジョウバエでも有効であった．

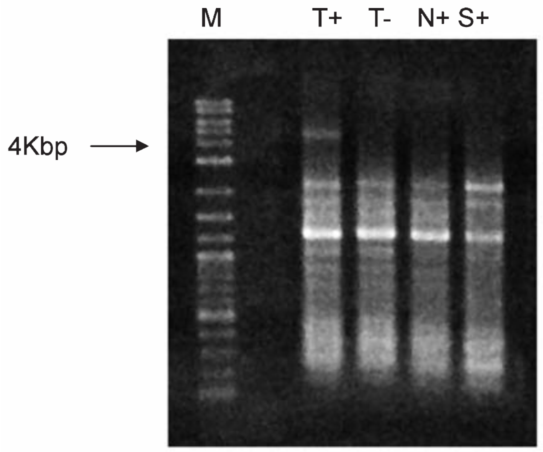

図 1：マエグロハシリショウジョウバエの遺伝子組換え幼虫における *timeless* 遺伝子の強制発現．図は，逆転写 PCR (RT-PCR) 産物のアガロース電気泳動図．M, 2-Log DNA Ladder (New England Biolabs)，矢印は 4Kbp を示す；T, pBac{EGFP-tim}による遺伝子組換え系統，＋は熱処理個体，－は非熱処理；N, 光周反応を示さない非休眠系統；S, 光周反応を示す札幌産野生型．

熱処理によって強制発現された *timelss* mRNA (cDNA) の配列は，図 2 に示すように，翻訳領域後端に続く非翻訳領域が *hsp70* のターミネーターの配列になっており，遺伝子組換えの事実がさらに確認できた．

謝辞

遺伝子組換え用ベクターの基礎となるベクターは次の方々から提供して頂きました．pBac{3xP3-EGFPafm}は Byreuth 大学の E. A. Wimmer 氏の許可を得て，広島県産業科学研究所の冨田正浩氏から提供して頂きました．pP{CaSpeR-hs}は Howard Hughes Medical Institute の粟崎健氏から，phspBac は U. S. Department of

>tim_transgenic
CGGCATCTGTATACGAAAACGAGATGGCCAACTGCGACAATATATCGATGGCTTCGGAT
CTAGAGCATATGTATGTCAGTGATGAGGAGGACACACATGAGATACATGAGCAGCGTGT
GCCCTACTATCATTGAGCGGCCGCGGTCTAGAAGGCCTAATTCCAGCTGAGCGCCGGTC
GCTACCATTACCAGTTGGTCTGGTGTCGGGGATCCGTCGACTAAGGCCAAAGAGTCTAA
TTTTTGTTCATCAATGGGTTATAACATATGGGTTATATTATAAGTTTGTTTTAAGTTTT
TGAGACTGATAAGAATGTTTCGATCGAATATTCCATAGAACAACAATAGTATTACCTAA
TTACCAAGTCTTAATTTAGCAAAAATGTTATTGCTTATAGAAAAAATAAATTATTTATT
TGAAATTTAAAAAAAAAAAAAAAA

図 2：遺伝子組換え系統において強制発現させた *timeless* mRNA (cDNA) の塩基配列．緑色配列は，*timeless* 翻訳領域の後端．黒色配列は非翻訳領域で，pBac{EGFP-tim}中の *hsp70* ターミネーターの配列になっている．

Agriculture の A. M. Handler 氏から提供して頂きました．ご提供に深く感謝いたします．

参考文献

Bünning, E. (1936) Die endonome Tagesrhythmik als Grundlage der photoperiodischen Reaktion. *Ber. Deut. Bot. Ges*., **54**, 590–607.

Handler, A. M., and R. A. Harrell (1999) Germline transformation of *Drosophila melanogaster* with the *piggyBac* trasposon vector. *Insect Mol. Biol*., **8**, 449–457.

Horn, C., B. Jaunich, and E. A. Wimmer (2000) Highly sensitive, fluorescent transformation marker for *Drosophila* transgenesis. *Dev. Genes Evol*., **210**, 623–629.

Kostal, V., and K. Shimada (2001) Malfunction of circadian clock in the *non-photoperiodic-diapause* mutants of the drosophilid fly, *Chymomyza costata*. *J. Insect Physiol*., **47**, 1269–1274.

Pavelka, J., K. Shimada, and V. Kostal (2003) TIMELESS: A link between fly's circadian and photoperiodic clocks? *Eur. J. Entomol*., **100**, 255–265.

Riihimaa, A., and M. T. Kimura (1988) A mutant strain of *Chymomyza costata* (Diptera: Drosophilidae) insensitive to diapause-inducing action of photoperiod. *Physiol. Entomol*., **13**, 441–445.

Riihimaa, A., and M. T. Kimura (1989) Genetics of the photoperiodic larval diapause in *Chymomyza costata* (Diptera; Drosophilidae). *Hereditas*, **110**, 193–200.

Stehlik, J., R. Zavodska, K. Shimada, I. Sauman, and V. Kostal (2008) Photoperiodic induction of diapause requires regulated transcription of *timeless* in the larval brain of *Chymomyza costata*. *J. Biol. Rhythms*, **23**, 129–139.