

氏名(本籍)	よし やま みき お 芳 山 三喜雄 (愛知県)		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博甲第2449号		
学位授与年月日	平成12年6月30日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	農学研究科		
学位論文題目	転移因子マリナーの昆虫種間における動態と形質転換イエバエ作出のための基礎研究		
主査	筑波大学教授	農学博士	河野 義明
副査	筑波大学併任教授	理学博士	山川 稔 (蚕糸・昆虫農業技術研究所)
副査	筑波大学教授	理学博士	小熊 譲
副査	筑波大学助教授	農学博士	本田 洋

論文の内容の要旨

農業害虫や、衛生害虫に対しては殺虫剤を利用した化学的防除がひろく行われている。しかし、各種殺虫剤に強い抵抗性をしめす系統が現われて大きな問題になっており、殺虫剤抵抗性機構の解明はこの問題の対策に必要である。

イエバエ (*Musca domestica*) は世界的に化学的防除の対象となった害虫であり、殺虫剤抵抗性の発達例も数多く報告されている。そのため抵抗性に関連した生化学的研究が盛んになされており、突然変異系統など遺伝学的蓄積も多い。近年、分子遺伝学の発展に伴い、多くの殺虫剤抵抗性関連遺伝子が単離されている。これら得られた遺伝子の機能を解析するため、例えば、感受性系統に抵抗性遺伝子を導入しその発現と抵抗性との関係等を分子生物学的側面から研究することは抵抗性機構の一端を解明するうえで非常に有効な手段である。このためイエバエにおける形質転換技術の確立は重要である。本研究では、転移因子であるマリナー因子の昆虫種間における動態の解明と同因子を用いたイエバエにおける形質転換個体作出技術の確立を目指した。

現在のところ、昆虫においては、ショウジョウバエでトランスポゾンP因子を用いた形質転換昆虫作成技術が確立されており、ショウジョウバエの多くの研究分野で利用されているが、他の昆虫種ではこの分野の研究は遅れている。P因子はイエバエでは利用できず、これにかわるトランスポゾンとしてモーリシャスショウジョウバエ (*Drosophila mauritiana*) で単離されたマリナー因子が注目されている。マリナー様因子は広範囲の生物種でその存在が報告されており、分子遺伝学的にも興味深い因子である。

第一段階として、マリナー様因子の昆虫種間における分布を解明するために、地理的に隔離されている場所で採集された近縁関係にある鱗翅目チャノコカクモンハマキ (*Adoxophyes honmai*) とリンゴコカクモンハマキ (*Adoxophyes orana fasciata*) を用いて、マリナー様因子の分布の調査を行った結果、両ハマキゲノムには同一の2種類のマリナー様因子が存在し、これらの種に水平伝播してきたと考えられた。

さらにこの水平伝播機構を理解するため、同ハマキガの寄生蜂である、ハマキコウラコミュバチ (*Ascogaster reticulatus*) に注目し、同寄生蜂のゲノムから、寄主であるハマキガのマリナー様因子と高い相同性を示す因子を単離した。このことから、マリナー様因子の水平伝播には寄主寄生関係が関与していることが示唆された。

また、マリナー因子は幅広い生物種での形質転換ベクターとしての利用が期待されている。しかしこれまでに

イエバエにおけるマリナー因子の研究はなされていない。そこで、イエバエにおけるマリナー様因子の探索を試みた結果、イエバエゲノムにはマリナー様因子が存在するが、構造的に不活性型で転移能はないことを明らかにした。このことは逆に、他の生物種の活性型マリナー因子、例えば、Mos1を導入すれば、転移の可能性があり、形質転換ベクター等の分子生物学的道具として利用が可能であることを示した。次に形質転換体作成に不可欠なイエバエの卵内への外来遺伝子導入のためのマイクロインジェクション法を確立するため、高いふ化率を得られる卵殻除去法、最適導入時期と卵の発育段階との関係などの諸条件を決定した。つづいてこれらの条件を用いて眼色遺伝子、toを眼色突然変異系統であるgreen系統に導入して、to遺伝子が発現し眼色を野性型に復帰させることに成功し、上述の条件が有効であることを実証するとともに、形質転換体を選別する際にto遺伝子がイエバエにおいて標識遺伝子として使用可能なことを示した。さらに、形質転換の前段階として、Excision assay法を用いてマーカー付きマリナー因子がイエバエ卵内で転移することを検証した結果、転移酵素を供給した場合に、プラスミドからマリナー因子が転移することが確認され、転移酵素を持つ活性型のマリナー因子の形質転換ベクターとしての利用の可能性が支持された。

最後に、実際に活性型マリナー因子、Mos1をイエバエ卵に導入し、マリナー因子が生殖細胞に組み込まれたイエバエを作出し、次世代以降に伝播していくか確認した結果、4系統においてマリナー因子のゲノムへの組み込みが確認され、12世代までその安定した存在が確認された。以上のことから、マリナー因子が形質転換ベクターとして利用が可能であることを実証した。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、遺伝子転移因子のひとつであるマリナー様因子の昆虫種間における動態の解明とマリナー様因子を用いたイエバエにおける形質転換個体作出技術の確立を目的として行われた。昆虫におけるこの種の研究は、トランスポゾンP因子を用いてショウジョウバエで研究が進んでおり、形質転換昆虫作成技術も確立されている。形質転換技術は害虫防除への応用や遺伝子発現の研究に非常に有用な手段であるが、ショウジョウバエ以外の昆虫種ではこの分野の研究は遅れている。マリナー様因子は広範囲の生物種に存在し、P因子が他の昆虫に応用が難しいのに比べて利用価値が高く、この因子の存在様式やこの因子を使った形質転換技術の研究は将来の応用に欠くことができない。

マリナー様因子が地理的に隔離されたチャノコカクモンハマキ2系統及び近縁種リングコカクモンハマキのゲノムに同一の2種類のマリナー様因子が存在することを示し、さらに、これらハマキガの寄生蜂であるハマキコウラカマユバチのゲノムにも、寄主のマリナー様因子と高い相同性をもつ因子の存在を示したことは、マリナー様因子の水平伝播に寄主寄生関係の関与を初めて示唆した点で優れた成果であった。

イエバエのゲノムに構造的に不活性なマリナー様因子が存在することを明らかにし、卵殻を除去した卵への遺伝子導入の方法としてマイクロインジェクション法を確立し、この方法によって実際に眼色遺伝子をイエバエに導入して発現させたことは、マリナー様因子の有用性を実証した点で高く評価される。

さらに、活性型マリナー因子、Mos1をイエバエ卵に導入し、マリナー因子が生殖細胞に組み込まれ次世代以降に伝播していくことを確認し、マリナー因子が形質転換ベクターとして利用できることを実証した点も重要である。これによって、少なくともイエバエにおいては遺伝子の形質転換による特定遺伝子の発現の研究に直ちに役立ち、他の昆虫での形質転換法の開発も容易となると考えられる。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。