

遺伝子工学を用いた無公害な害虫駆除法開発のための

基礎研究

Basic research for developing non-chemical pesticide by genetically engineered sibling species

研究代表者 高橋 文 国立遺伝学研究所 集団遺伝研究系 助教

Aya Takahashi

Assistant professor,

Division of Population Genetics, National Institute of Genetics

和文アブストラクト

環境問題を考えるに当たり、農薬などに頼らずに生物種そのものを利用したクリーンな環境浄化法や害虫駆除法を開発することは現代における大きな課題である。本研究ではその一環として、比較的最近種分化した後、同所的に共存している近縁種を利用するという新規のアイデアに着目した。それは、近縁種間の交尾行動の違いをつかさどる遺伝子を明らかにし、害虫とは交配するが子孫は残せないような遺伝子操作した近縁種を開発しそれを温室内など生態系に影響のない場所で大量放逐することでそこにいる害虫の数を効果的に減少させられる可能性があるというものである。具体的には、ゲノム情報もあり遺伝的研究の材料として優れたキイロショウジョウバエとその近縁種であるオナジショウジョウバエ間での交尾行動の違いについて、それに関わる遺伝子を誘導的 RNAi という新しい手法を生かした方法により発見し、解析することを目指している。

Abstract

Developing non-chemical pesticides can have a strong impact on our society's movement for solving the environmental problems. The future goal of this research is to propose a novel way to control pests. That is to release abundant number of individuals of the genetically engineered sibling species, which would willingly mate with the pest species but would not produce fertile hybrid offspring. This method can effectively decrease the number of pests without spraying any toxic chemicals to the environment. In order to develop such biological pesticides, the basic information about the genes responsible for the species specific mating behavior is indispensable. This project focuses on identifying genes responsible for the premating reproductive isolation between *Drosophila melanogaster* and its sibling species by utilizing the newly developed inducible RNAi technique.

1. 研究目的

本研究は、キイロショウジョウバエとその近縁種オナジショウジョウバエ間の交尾前生殖的隔離機構に関わる遺伝子を探索するために RNAi による遺伝子ノックアウト (またはノックダウン) を利用したスクリーニングにより発見するというのが目的である。

2. 研究経過

まず第一に行ったのは、キイロショウジョウバエの雌とオナジショウジョウバエの雄の間の交尾に影響を与える雌側の遺伝子としてその可能性が示唆されている *yellow* について、RNAi ノックダウンの効果を見ることである。このために、本研究代表者の所属する研究機関内で開発している GAL4-UAS 遺伝子強制発現系を利用した誘導型 RNAi のシステムを用いて、交尾行動への影響を見る実験を行った結果、従来の見解とは異なり *yellow* 遺伝子の発現量を低下させても他種への交尾行動に影響を与えないことが明らかとなった。

パイロット実験として行った上記 *yellow* 遺伝子の実験が、これまでの見解と異なり交尾行動に影響しないということがわかり、遺伝的なバックグラウンドをきちんとそろえた誘導的 RNAi による実験の重要性を認識した。このことにより、これまで交尾行動に影響を与える遺伝子とされているものからスクリーニングするという戦略から、ある程度遺伝的マッピングにより近縁種間の交尾前生殖的隔離機構に関わる遺伝子があるとされる領域を絞った後に、その中の遺

伝子についてスクリーニングするという戦略に切り替えることにした。幸いに、複数の系統間で交配実験のスクリーニングを行った結果、オナジショウジョウバエの雌に対して雄の交尾率が大きく異なる 2 つのキイロショウジョウバエ系統を見つけることができた。更に、これら同種の 2 系統間で種内交配を行った結果、雄が交尾相手を選択する際に系統間で好みの違いがあることがわかった。これらの情報から RNAi ノックダウンを利用して上記 2 系統に関する遺伝学的解析を進め、下記の成果をあげることができた。

3. 研究成果

本研究の成果としては、GAL4-UAS 遺伝子強制発現系を利用した誘導型 RNAi のシステムを利用して、種内の交尾相手選好性に影響を与える遺伝子の一つ同定できたことが非常に大きかった。下記にこの点についての成果を報告する。

以前の研究から交尾相手の選好性に成虫の胸部背面にある三叉模様の色素沈着度 (図 1) が関係しているのではないかとされていた。そこで、この表現型変異に寄与

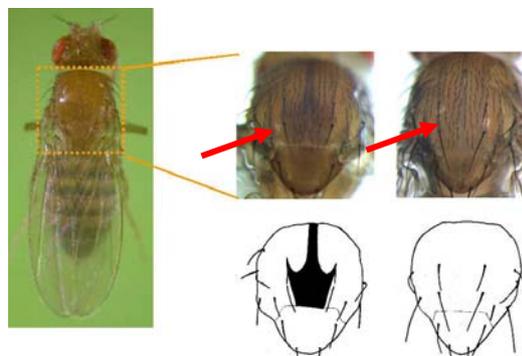


図 1. キイロショウジョウバエ成虫における胸部三叉模様の色素沈着度の変異

する遺伝子を同定できれば、交尾相手選好性に関与する遺伝子を同定できるのではないかと考えた。

この点に注目して、まずこの表現型変異について交尾相手選好性の異なる上記 2 系統を用いて、遺伝子マッピングを進め、第 3 染色体上の一つの領域 (約 75 kb) 内の 7 つの遺伝子に原因遺伝子を絞り込むことができた。次に、その領域内に含まれていた候補遺伝子について GAL4-UAS 遺伝子強制発現系を利用した誘導型 RNAi を用いて表現型に与える影響を調べた。その結果、*ebony* という色素合成系に発現する酵素をコードする遺伝子をアクチンの ubiquitous GAL4 ドライバを用いてノックダウンすると成虫の胸部三叉模様色素沈着度が高くなることが明らかとなった (図 2)。よって

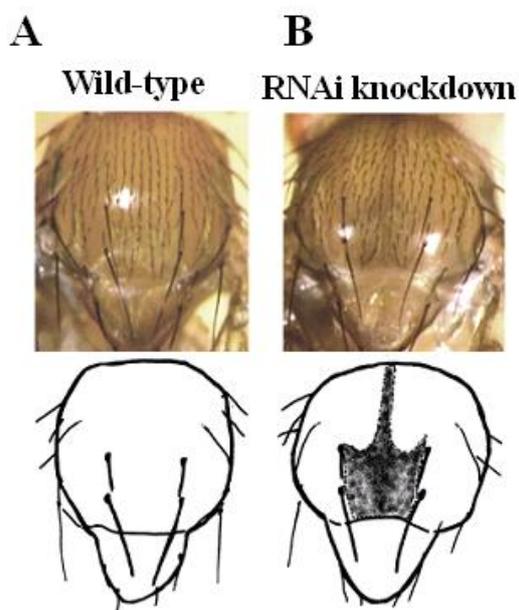


図 2. *ebony* 遺伝子の誘導型 RNAi ノックダウンによる成虫胸部三叉模様への影響

この遺伝子の発現量の違いが胸部三叉模様の色素沈着度を規定していることが明らかとなった。更に、qRT-PCR や

complementation test などの方法でこの遺伝子が原因遺伝子であることを確認した。この遺伝子は、神経系での発現も確認されており、交尾行動への影響も興味深い。これらの研究成果は、論文にまとめ、現在投稿中である。

また、上記のような誘導型 RNAi を用いた実験より得られた成果から発展し、以下のような興味深い成果を得ることができた。

もしもこの遺伝子の発現量の違いが交尾相手の選好性に影響を与えているとしたら、本研究代表者の専門である集団遺伝学的観点から考えると、この種の自然集団中の遺伝子型変異を見ると非ランダム交配により生じたゆがみのトレースが観察される可能性がある。具体的には、理想集団中の進化的に中立な遺伝子が、Hardy-Weinberg 平衡に達しているのに関して同類交配や集団の分化、自然選択の影響などによりこの平衡から予測される遺伝子型頻度から有意にずれることが予想される。そこで、*ebony* 遺伝子の発現量について上記のような解析を試みた結果、予想通りの方向へのずれが観察された。このように野外の集団についてこのような非ランダムな交配を規定する遺伝子の情報が得られた例はなく、その意義は大きい。こちらも現在データをまとめ、論文投稿準備中である。

4. 今後の課題と発展

また、今回明らかとなった *ebony* 遺伝子は種内系統間での交尾相手選好性に寄与していることは明らかとなったが近縁種間の交配に影響があるのかどうか明確でないので、RNAi ノックダウン系統を用いて調べ

てみる計画である。種間での同種認識に効いていれば、本研究の将来的な目標である無公害の害虫駆除法の開発に用いることができる可能性がある。

本研究により同定された交尾相手選好性に影響を与える遺伝子である *ebony* は、クチクラの色素沈着（胸部三叉の色素沈着）及び交尾行動の両方に影響を与えるということである。本研究で用いた手法である GAL4-UAS 遺伝子強制発現系を利用した誘導型 RNAi の手法の優れた点は、各組織で特異的に目的の遺伝子をノックダウンすることができる点である。よってクチクラの下部にある表皮細胞、また神経系で特異的に *ebony* 遺伝子のノックダウンを行うことが可能である。今後は、本研究で用いた ubiquitous に RNAi を誘導できるアクチンのドライバ以外に様々な組織特異的な GAL4 ドライバを用いてこの遺伝子のノックダウン実験を行っていきたいと考えている。

また、本研究を行っていく中で、これまでの種間の交尾率の測定方法は、交尾が実際に起きたかどうかで判定していたが、交尾行動をよく観察してみると、オスが交尾行動をイニシエートするかどうか、どれだけ積極的に求愛するかどうかなど複数の要素を考慮する必要があることに気がついた。そこで、ビデオカメラ及びカメラによる撮影を用いてこれらの要素を定量化する試みを行った。この結果、交尾相手選好性に違いのある 2 つの系統間で交尾前 0.5 秒以内の雌雄の距離が系統間で大きく異なることがわかった（図 3）。これは雄が雌の生殖器との接合のタイミングを認識する機構が違うためであると予想される。また、交尾前

0.5 秒時の wing vibration 行動についてもその形態に違いがあることが明らかとなった。

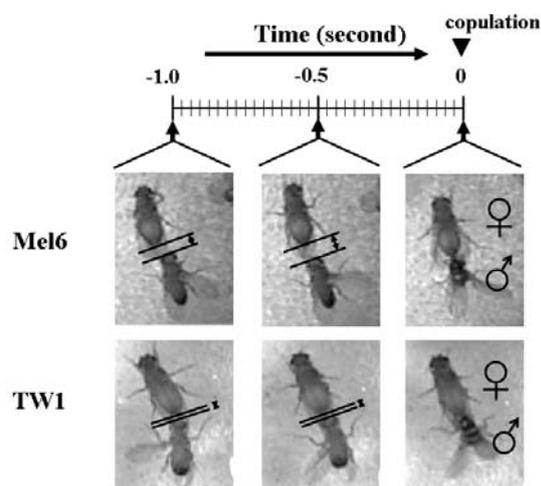


図 3. 交尾相手選好性に違いのある 2 つの系統 (Mel16 及び TW1 系統) における交配直前の雌雄間距離の違い

この微細な交尾行動の変異は、第 3 染色体上にその行動を制御する要素が存在することがわかっており、今後このような行動の違いについても遺伝子マッピングを進めるとともに、GAL4-UAS システムを用いた誘導型 RNAi の手法をうまく利用することにより原因遺伝子をマッピングしていきたいと考えている。

5. 発表論文

Takahashi, A., Takahashi, K., Ueda, R. and Takano-Shimizu, T. Natural variants of a pigmentation-controlling gene essential for normal vision and behavior in *Drosophila*. (投稿中)

Takahashi, A. and Takano-Shimizu, T. (2005) A high frequency null mutant of an odorant-binding protein gene, *Obp57e*, in *Drosophila melanogaster*. **Genetics** 170:709-18.