

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18586

研究課題名(和文) 新奇性はどうやって生まれるのか? ゲノム編集によるアプローチ

研究課題名(英文) How do evolutionary novelties emerge? An approach with genome editing

研究代表者

越川 滋行 (Koshikawa, Shigeyuki)

京都大学・白眉センター・特定助教

研究者番号：30714498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：翅に水玉模様をもつミズタマシヨウジョウバエに対してCRISPR/Cas9法によるゲノム編集技術の導入を試み、遺伝子の模様形成に果たす役割と、遺伝子相互の調節関係を明らかにすることを試みた。

まず翅の着色の発達を画像解析により定量的に測定する方法を確立した。次に、CRISPR/Cas9法について、キイロシヨウジョウバエで用いられている方法を参考に、方法の有効性を簡便に示すため、X染色体上の遺伝子をターゲットとした。試行錯誤の結果、複数の遺伝子について、インジェクション当該世代G0モザイク個体と、生殖系列に変異が伝わることで樹立されたノックアウト系統を作成する方法を確立した。

研究成果の概要(英文)：We attempted to introduce genome editing technique by CRISPR / Cas9 system to *Drosophila guttifera*, aiming to clarify the role of genes in color pattern formation and the regulatory relationship among genes.

We first established a method to quantitatively measure development of pigmentation in wings by image analysis. Next, with reference to the method used in *Drosophila melanogaster* CRISPR / Cas 9 system, genes on the X chromosome were targeted to show the effectiveness of the method. As a result of trial and error, we established a method to make G0 mosaic individuals and knockout strains with mutation in the germline.

研究分野：進化発生生物学

キーワード：進化発生学 ショウジョウバエ 模様 ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

ミズタマシヨウジョウバエ (*Drosophila guttifera*) はシヨウジョウバエ科の昆虫で、翅に黒色の水玉模様を持つ。モデル実験動物であるキロシヨウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) において開発された実験法をある程度利用でき、模様の形成メカニズムの研究モデルとして有用である。これまでにトランスポゾンによる遺伝子導入の技術は確立していたが、ゲノム編集技術の導入により、さらに模様形成メカニズムの研究が進展することが期待されていた。

2. 研究の目的

模様形成の一般的なロジックを理解するとともに、近縁種との比較により、模様形成システムがどのように進化してきたのかを明らかにする。そのために、まずはミズタマシヨウジョウバエにおいて、蛹期の着色の進行を正確に記述することを目的とした。さらに、近年急速に発展しつつある CRISPR/Cas9 法を用いたゲノム編集技術を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

ミズタマシヨウジョウバエの蛹期の形態の記述と、それらに基づいた詳細なステージングを行った。さらに、画像解析により、蛹期から成虫期の翅において、メラニン色素が沈着する量を定量する方法を開発した。また、ゲノム編集 (CRISPR/Cas9 法) による遺伝子ノックアウトについて、様々な条件 (導入する RNA の種類、Cas9 の導入方法、それぞれの濃度など) を試行した。方法の有効性を簡便に示すため、X 染色体上の遺伝子で、かつノックアウトにより明瞭に表現型が現れると予想される遺伝子をターゲットとした。

4. 研究成果

ミズタマシヨウジョウバエの蛹期の詳細なステージングを行い、外見に基づいて P1 から P15(ii) に分類した。それぞれのステージの長さを連続観察により測定した。また翅の模様の着色がどのように進行するのかを定量的に明らかにした。着色は蛹期の P10 ごろから始まり、羽化後約 24 時間後まで継続することを明らかにした。メラニン色素の着色に必要であると考えられている *yellow* 遺伝子のエンハンサーに蛍光レポーターを結合して導入した系統を用いて、*yellow* 遺伝子の発現が開始する時期を P7 と特定した。また、成虫に羽化したのち、翅の表皮細胞が体幹に回収される現象が観察され (wing cell clearance と呼ぶ) 着色はその時期を過ぎても進行することから、細胞外に分泌されクチュクラ層に留まっているタンパク質などが着色の継続に寄与していることが明らかになった (Fukutomi et al. 2017)。
ゲノム編集技術については、試行錯誤の結果、高い効率で G0 (インジェクション当該世代)

のモザイク変異体、および変異が生殖細胞系列を通じて受け継がれたノックアウト系統を得られる方法を確立した。詳細について論文を準備中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

1. Fukutomi Y, Matsumoto K, Agata K, Funayama N, Koshikawa S (2017) Pupal development and pigmentation process of a polka-dotted fruit fly, *Drosophila guttifera* (Insecta, Diptera) *Development Genes and Evolution* 227(3): 171-180, 査読あり, doi: 10.1007/s00427-017-0578-3

2. Hashimoto T, Horikawa DD, Saito Y, Kuwahara H, Kozuka-Hata H, Shin-I T, Minakuchi Y, Ohishi K, Motoyama A, Aizu T, Enomoto A, Kondo K, Tanaka S, Hara Y, Koshikawa S, Sagara H, Miura T, Yokobori S, Miyagawa K, Suzuki Y, Kubo T, Oyama M, Kohara Y, Fujiyama A, Arakawa K, Katayama T, Toyoda A, Kunieda T (2016) Extremotolerant tardigrade genome and improved radiotolerance of human cultured cells by tardigrade-unique protein. *Nature Communications* 7, 12808, 査読あり, doi: 10.1038/ncomms12808

3. Izumitani HF, Kusaka Y, Koshikawa S, Toda MJ, Katoh T (2016) Phylogeography of the subgenus *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae): Evolutionary history of faunal divergence between the Old and the New Worlds. *PLoS ONE* 11(7), e0160051, 査読あり, doi: 10.1371/journal.pone.0160051

4. Sugime Y, Ogawa K, Watanabe D, Shimoji H, Koshikawa S, Miura T (2015) Expansion of presoldier cuticle contributes to head elongation during soldier differentiation in termites. *The Science of Nature (Naturwissenschaften)* 102(11-12): 71, 査読あり, doi: 10.1007/s00114-015-1322-3

5. Koshikawa S, Giorgianni MW, Vaccaro K, Kassner VA, Yoder JH, Thomas T, Carroll SB (2015) Gain of *cis*-regulatory activities underlies novel domains of wingless gene expression in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 7524-7529, 査読あり, doi: 10.1073/pnas.1509022112

6. Koshikawa S (2015) Enhancer modularity and the evolution of new traits. *Fly (Austin)* 9(4) 155-159, 査読あり, doi: 10.1080/19336934.2016.1151129

〔学会発表〕(計 19 件)

1. 越川滋行 ミズタマショウジョウバエの模様形成の仕組み 第 87 回日本蚕糸学会(招待講演)、2017 年 03 月 21 日、農林水産技術会議事務局 筑波産学連携支援センター(茨城県・つくば市)
2. 越川滋行、松本圭司、福富雄一 ミズタマショウジョウバエの水玉模様には意味があるのか? -模様の生態における機能を探る-第64回日本生態学会(口頭発表)、2017 年03月15日、早稲田大学早稲田キャンパス(東京都・新宿区)
3. Koshikawa, S Origins of evolutionary novelty: Developmental regulation and evolution of color pattern formation in a polka-dotted fruit fly, *Drosophila guttifer* NIGシンポジウム2016 New Frontiers of Genetics (招待講演)、2016年12月26日、国立遺伝学研究所(静岡県・三島市)
4. 越川滋行、福富雄一、松本圭司 Wing color pattern formation in a polka-dotted fruit fly *Drosophila guttifer* 第22回国際動物学会 / 第87回日本動物学会合同大会(国際学会、ポスター発表)、2016年11月17日~2016年11月18日、沖縄コンベンションセンター(沖縄県・宜野湾市)
5. 福富雄一、船山典子、越川滋行 Unique mechanism of pigmentation pattern formation in the polka-dotted fly, *Drosophila guttifer* 第22回国際動物学会 / 第87回日本動物学会合同大会(国際学会、ポスター発表)、2016年11月17日~2016年11月18日、沖縄コンベンションセンター(沖縄県・宜野湾市)
6. Koshikawa S *Drosophila guttifer*: a model system for understanding color pattern formation 模様形成を理解するためのモデル系としてのミズタマショウジョウバエモデル動物研究会「ムシサカナの会@金沢」(招待講演)、2016年10月7日、金沢大学宝町キャンパス(石川県・金沢市)
7. Koshikawa S How did the novel pigmentation pattern of *Drosophila* appear? ショウジョウバエの新しい模様はどのように生じたか 遺伝研研究集会 分子進化学の現状と今後の展望(招待講演)、2016年8月20日、国立遺伝学研究所(静岡県・三島市)
8. 越川滋行、福富雄一、松本圭司 ミズタマショウジョウバエの模様形成機構の理解に向けて 日本遺伝学会第88回大会 ワークショップ1 ショウジョウバエの進化・集

団遺伝学(招待講演)、2016年09月7日、日本大学三島駅北口校舎(静岡県・三島市)

9. Koshikawa S, Fukutomi Y, Matsumoto K *Drosophila guttifer* as a model system for elucidating color pattern formation チョウの斑紋多様性理解に向けた統合的アプローチ(ポスター発表)2016年8月2日-2016年8月3日、中部大学春日井キャンパス(愛知県・春日井市)
10. 越川滋行 ミズタマショウジョウバエの模様形成の仕組み 昆虫デザイン研究会 家畜化過程の理解とポスト家畜化(招待講演)、2016年7月7日、岡崎コンファレンスセンター(愛知県・岡崎市)
11. 越川滋行 ミズタマショウジョウバエの模様が形成される仕組みと機能を考える 第9回Evo-Devo青年の会 現代の形態学は大進化を解き得るか?(ポスター発表)、2016年6月25日、岡崎コンファレンスセンター(愛知県・岡崎市)
12. 福富雄一、船山典子、阿形清和、越川滋行 Wing development and pigmentation process in pupae of polka-dotted fly *Drosophila guttifer* JSDB Special Symposium: Frontier of Developmental Biology (+ 49th Meeting)(国際学会、ポスター発表)2016年06月02日、東京大学本郷キャンパス(東京都・文京区)
13. 福富雄一、阿形清和、越川滋行 ミズタマショウジョウバエの蛹期の翅の発生様式と斑紋形成プロセス 日本昆虫学会第76回大会・第60回日本応用動物昆虫学会大会合同大会(ポスター発表)、2016年03月27日、大阪府立大学中百舌鳥キャンパス(大阪府・堺市)
14. 越川滋行 *Drosophila guttifer*における水玉模様の形成と進化 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会合同大会 ワークショップ オモロい生き物の分子生物学(口頭発表)、2015年12月3日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)
15. 越川滋行 *Drosophila guttifer* における水玉模様形成とその進化 ショウジョウバエ多様性研究会(口頭発表)、2015年9月28日、国立遺伝学研究所(静岡県・三島市)
16. 越川滋行 ミズタマショウジョウバエの翅の模様を制御する因子 日本動物学会第86回大会(口頭発表)、2015年9月17日、朱鷺メッセ(新潟県・新潟市)
17. 越川滋行 模様の進化を引き起こした遺伝的变化 日本進化学会第17回大会 シ

ンポジウム 転写制御と遺伝的変異の発生と進化 - ゲノム情報、ゲノム編集、エンハンサー解析 - (口頭発表)、2015年08月21日、中央大学後楽園キャンパス(東京都・文京区)

18. 越川滋行 ミズタマシヨウジョウバエの模様をめぐる進化発生学 第8回 Evo-Devo青年の会 進化の「実証」を試みる(ポスター発表)、2015年6月27日、名古屋大学東山キャンパス(愛知県・名古屋市)

19. Koshikawa S, Giorgianni MW, Vaccaro K, Kassner VA, Yoder JH, Werner T, Carroll SB Toward understanding color pattern formation and evolution in *Drosophila* 日本発生生物学学会第48回大会(口頭発表)、2015年06月03日、つくば国際会議場(茨城県・つくば市)

〔図書〕(計 2件)

1. Koshikawa S, Fukutomi Y, Matsumoto K (分担) (2017) *Drosophila guttifera* as a model system for unraveling color pattern formation 『Diversity and evolution of butterfly wing patterns: an integrative approach』. Springer, in press

2. 越川滋行、福富雄一、松本圭司 (分担) (2017) 模様形成の仕組みを明らかにするためのモデルシステムとしてのミズタマシヨウジョウバエ 『チョウの斑紋多様性と進化 - 統合的アプローチ』海游舎、印刷中

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

<報道関連情報>

1. 斑点の有無、特定の塩基配列で決まる?! 京都新聞 日刊 教育欄 2015年6月

27日

<アウトリーチ活動情報>

1. 越川滋行 模様はどのようにしてつくられるのか: ミズタマシヨウジョウバエを例に京都大学総合博物館 企画展 虫を知りつくす 京都大学の挑戦 特別講演会シリーズ 昆虫アカデミア(講演) 2016年8月6日、京都大学総合博物館(京都府・京都市)

2. Koshikawa S Gain of cis-regulatory activities and evolution of novel traits in *Drosophila* 果蝇进化遗传学术报告(招待講演) 2015年10月24日、華南農業大学(広州市、中華人民共和国)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

越川滋行(KOSHIKAWA, Shigeyuki)

京都大学・白眉センター・特定助教

研究者番号: 30714498

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

福富雄一(FUKUTOMI, Yuichi)

京都大学・大学院理学研究科・大学院生

松本圭司(KEIJI, Matsumoto)

京都大学・大学院理学研究科・研究員