

令和元年6月5日現在

機関番号：63904

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19275

研究課題名(和文) 昆虫ポストゲノム研究を促進させる体細胞・生殖幹細胞を標的としたゲノム編集技術開発

研究課題名(英文) Development of genome editing technology targeting somatic and germline stem cells, which facilitates insect postgenomic researches

研究代表者

安藤 俊哉(Ando, Toshiya)

基礎生物学研究所・進化発生研究部門・助教

研究者番号：10709744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子操作が困難な非モデル昆虫において、ゲノム情報を活用した迅速な有用遺伝子の同定を可能にする、新規ゲノム編集ツール導入法の開発を目指した。エレクトロポレーションもしくは細胞透過ペプチドを利用したCas9-RNP導入法が体細胞におけるゲノム編集法として有効だということが判明した。一方で、生殖巣におけるゲノム編集は上記手法では困難であり、研究期間中に報告された卵黄タンパク質に付随して細胞内へCas9-RNPを輸送する手法(ReMOT法)程の効率でのゲノム編集は困難であった。体細胞で確立した細胞透過性ペプチドを利用する手法は、ReMOT法の効率を向上する上で有効な手法である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では確立した昆虫の体細胞におけるゲノム編集法は今後、ゲノム情報を利用して迅速に遺伝子機能を解明する、有効な遺伝子機能解析法として発展することが期待される。一方、本研究では農業利用に適した有用昆虫系統の作出の鍵となる生殖細胞でのゲノム編集法は残念ながら確立できなかった。本研究期間中に他の研究グループにより卵巣でのゲノム編集法が報告されたが、その作動原理を考慮すると、本研究で開発した手法と融合することでより効率的にゲノム編集システムを作出する手法として発展することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We aimed to develop a novel genome editing tool that enables rapid identification of agriculturally useful genes using genomic information in non-model insects that have been difficult to manipulate so far. This research project revealed that the Cas9-RNP introduction method using electroporation or cell penetrating peptide was effective as a genome editing method in somatic cells. On the other hand, genome editing in gonads was difficult with the above methods, and the genome editing efficiency far less efficient than the method in which Cas9-RNP is transported into cells concomitant with egg yolk proteins (ReMOT method), which was reported during this research project. It was suggested that the method using cell penetrating peptide established in somatic cells may be an effective method to improve the efficiency of ReMOT method.

研究分野：遺伝学

キーワード：ゲノム編集 昆虫 CRISPR-Cas9 エレクトロポレーション 細胞透過ペプチド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

次世代シーケンサー (NGS) 技術の急速な普及により、クジラや食虫植物等のこれまで遺伝学的解析が困難な為に解析されてこなかった生物の全ゲノム解読が進行している。一方、CRISPR-Cas9 に代表されるゲノム編集技術の発達により、受精卵への顕微注入ができれば、その世代で遺伝子破壊の影響を観察できるようにもなってきた。ゲノム情報を活かした非モデル生物の遺伝学研究が今まさに幕開けようとしている。しかし、受精卵の大量採取や顕微注入が困難な農業関連の多くの害虫や益虫に関しては、ゲノム情報が得られたものの、遺伝子改変昆虫作出による計画的害虫防除や人工的家畜系統の作出は実現しておらず、その為の遺伝子機能解明も進んでいない。

## 2. 研究の目的

本研究は、遺伝子操作が困難な非モデル昆虫において、NGS 解析データを活用した迅速な有用遺伝子の同定及び遺伝子改変昆虫作出を可能にする、新規ゲノム編集ツール導入法の開発を目的とする。研究代表者が、これまでに複数の昆虫種でのエレクトロポレーションを介した *in vivo* 遺伝子導入実験を通じた経験と、CRISPR-Cas9 を組み合わせて確立しつつある昆虫の体細胞・生殖幹細胞に対するゲノム編集技術を研究の起点とする。本技術と CRISPR-Cas9 の汎用性を組み合わせることで、ゲノム上のコード領域だけではなく非コード領域も含めた全ゲノム配列の機能解明とその操作に不可欠な以下の 4 種類の汎用遺伝学手法を構築し、害虫防除や人工的家畜設計を実現する技術基盤を整備する。

- (1) 体細胞組織及び生殖幹細胞における遺伝子破壊
- (2) 外来遺伝子配列のゲノムへの挿入 (ノックイン)
- (3) 特定遺伝子の強制発現・発現抑制 (プロモーター操作)
- (4) 非コード領域の DNA の活性操作 (エンハンサー操作)

## 3. 研究の方法

基本的なゲノム編集の条件検討には、非モデル昆虫であるナミテントウを利用した。本研究では、ゲノム編集ツール遺伝子 Cas9 を体細胞及び生殖細胞で強制発現するトランスジェニックシステムを使って効率的なゲノム編集を行う手法と、一過的に Cas9 を強制発現する方法、Cas9-RNP を導入する方法の 3 通りの方法を検討した。(1)~(4)の技術達成に向けて、適切な遺伝子導入技術を検討するとともに、目的に合わせて Cas9 発現用の DNA ベクターを構築し、遺伝子導入及びゲノム編集の条件検討を進めることにした。

## 4. 研究成果

### (1)体細胞組織及び生殖幹細胞における遺伝子破壊

トランスジェニックシステムを作出してエレクトロポレーションを行う効率的なゲノム編集手法と、一過的に Cas9 をエレクトロポレーションによって遺伝子導入する方法、Cas9-RNP をエレクトロポレーションによって導入する方法の 3 通りの方法の中で、ゲノム編集が成功したのは Cas9-RNP をエレクトロポレーションによって導入する方法であった。これは、培養細胞で近年確立されている手法と同様の手法で、黒色色素合成酵素遺伝子 *laccase2* を標的として *in vivo* の体細胞で変異体クローン細胞を作出することができた。一方で、生殖細胞エレクトロポレーションを利用した方法では電圧の条件検討や、摘出したサンプルにおいて遺伝子導入処理をして移植するなどの方法の検討を行なったが、ゲノム編集された次世代を得ることはできなかった。エレクトロポレーションによるダメージの影響を考え細胞透過性ペプチドを利用した Cas9 タンパク質の導入も試みたが、こちらの条件は体細胞でのゲノム編集には成功したが、生殖細胞においてゲノム編集を成功するには至らなかった。

他の 2 つの方法のうち、トランスジェニックシステムを作出する手法に関しては、生殖細胞で強く発現する遺伝子 *vasa* の全長 cDNA 配列を決定し、*vasa* プロモーターのクローニングを行い、トランスジェニックシステムの作出を試みた。しかし、研究室の移転に伴いトランスジェニックシステムの作製システムの設置条件が大きく変わってしまった関係で次世代の個体を得ることができず、システムの作出の条件検討を進めるにとどまった。

もう一つの、一過的に Cas9 を強制発現させる条件は、これまでの経験で予想された通り、プラスミド DNA の導入効率が低く、体細胞・生殖細胞を標的にした場合も実用に耐える条件は見出されなかった。

従って、エレクトロポレーションを介した遺伝子導入法として、Cas9-RNP を用いる方法が体細胞の導入に適していることが判明した。一方で、生殖細胞への遺伝子導入は本研究計画では、ゲノム編集は達成できなかった。しかし、条件検討を進める中、最終年度の後半に、蚊においてショウジョウバエの卵黄タンパク質タグを利用して、選択的に卵巣へ Cas9 タンパク質を輸送することに成功したという論文 (ReMOT 法) が報告された (引用文献 1)。そこで、論文の責任著者の Rasgon 氏が出席する Howard Hughes Medical Institute シンポジウム (2018 年度末に開催) に出席し、非モデル生物におけるゲノム編集の現状及び ReMOT 法の応用可能性についての情報共有を行うとともに、Rasgon 氏から ReMOT 法に用いるコンストラクトの供与を受け、テ

ントウムシでの条件検討用のリコンビナントタンパク質の精製を行なった。研究期間の終了により、インジェクションの条件検討までには至らなかったが、ReMOT 法と本研究で体細胞において成功した細胞透過性ペプチドタグを利用した方法を組み合わせることで、より効率的な生殖細胞におけるゲノム編集が実現することが期待された。

## (2)外来遺伝子配列のゲノムへの挿入（ノックイン）

本研究では、非同末端結合（NHEJ）を介した遺伝子導入を試みた。まず、受精卵へのインジェクションにおいて、ナミテントウにおいて NHEJ を介したノックインが成功するかが不明であったため、条件検討を進めた。その結果、標的遺伝子領域へ効率的に外来配列を導入する条件を見出せなかった。並行して、体細胞におけるエレクトロポレーションを介したノックイン実験の検討も試みたが、こちらの実験においても外来遺伝子の挿入は見出されなかった。ノックインを成功させるためには、体細胞においても、非同末端結合やマイクロホモロジー媒介非同末端結合といった外来遺伝子の挿入手法の中で効率的な挿入が誘導できる条件を網羅的に探索する必要があり、今後網羅的に条件検討を進める必要があるだろう。

## (3)特定遺伝子の強制発現・発現抑制（プロモーター操作）及び(4)非コード領域の DNA の活性操作（エンハンサー操作）

本研究では、転写活性化型の dCas9-VP64 と転写抑制型の dCas9-KRAB を利用して、体細胞を標的に RNP を利用した方法で、内在遺伝子のプロモーター及びエンハンサーの活性操作を試みた。その結果、これらのコンストラクトのエレクトロポレーションだけでは、内在遺伝子の活性操作は困難であることが判明した。dCas9-VP64 に関しては、より転写活性可能性が高い dCas9 バリエーションが近年報告されており（引用文献 2）、内在遺伝子の発現制御には、より転写活性の高いコンストラクトを利用し直すことが必要であることが判明した。

本研究計画では、体細胞を標的とした場合、エレクトロポレーションによる Cas9-RNP の導入法と細胞透過ペプチドを利用した Cas9-RNP の導入法が有効なゲノム編集の方法であることが判明した。本手法は今後、ゲノム情報を利用して、体細胞の機能解析法として新たな手法として発展することが期待される。一方で、これらのゲノム編集ツール導入手法を利用して Cas9 のバリエーションを介した遺伝子発現制御実験は残念ながら本研究の研究期間内では実用段階には持っていくことができなかった。本研究の実験では、培養細胞で既に確立しているゲノム編集ツールを *in vivo* で応用するには、細胞への導入量や酵素活性といった現実的に機能解析に利用できるレベルに達するために解決すべきいくつかの問題が存在することが明らかになった。このことは、標的の組織ごとに詳細な条件検討を必要とすることを意味し、今後さらなる検討を進めていく必要があるだろう。

体細胞でのゲノム編集技術開発と対照的に、生殖細胞を標的とした実験は成功例が得られなかった。この事実は、エレクトロポレーションを介した遺伝子導入では濾胞細胞という大きな物理障壁を超えるのが困難であることを示唆する。一方で、研究期間内に報告された卵巣を標的とした標的的特異的 Cas9 輸送法（ReMOT 法、引用文献 1）は、生殖細胞を標的としたゲノム編集法として画期的な手法であるが、Cas9 が細胞内にエンドサイトーシスされた後に、細胞内小胞を界面活性剤などで処理して破裂させ細胞質に移行させる条件が厳しいと報告されている。本研究において体細胞で成功した細胞透過ペプチドを ReMOT 法と組み合わせることでこの条件を緩和され、卵巣でのゲノム編集の効率を促進させる上で有効であると期待される。今後効率的かつ簡便な生殖細胞でのゲノム編集法を確立する上で、さらなる注入条件処理を進めていくことが重要になるだろう。

（引用文献 1）Chaverra-Rodriguez et al., *Nat Commun* **9**, 3008 (2018)

（引用文献 2）Li et al., *Nat Plants*, **3**(12), (2017)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

新美輝幸、**安藤俊哉**、ナミテントウにおけるゲノム編集技術開発の現状、日本蚕糸学会第 88 回大会(招待講演)、2018 年

**安藤俊哉**、新美輝幸、テントウムシの斑紋パターンを制御する遺伝子の同定、日本動物学会 第 89 回大会シンポジウム(招待講演)、2018 年（大会中止により要旨の掲載のみ）

**安藤俊哉**、テントウムシの斑紋多型を生じさせる遺伝的ホットスポット、日本進化学会第 20 回大会シンポジウム(招待講演)、2018 年

Toshiya Ando, Tetsuya Kojima, Haruhiko Fujiwara, Teruyuki Niimi, In vivo electroporation as a genetic tool for analyzing postembryonic patterning mechanisms in insects, Janelia Conference: New Genetic Tools for Non-Model Organisms (国際学会・口頭発表), 2019

〔図書〕(計 1 件)

金児 雄, 塩見 邦博, 天竺桂 弘子, 外川 徹, 横山 岳, 一般社団法人日本蚕糸学会, 「カイコの実験 単」企画・編集委員会, 安藤俊哉, 他 51 名, 生物の科学 遺伝別冊 No.23 カイコの実験単 ～カイコで生命科学をまるごと理解～, エヌ・ティー・エス, 2019 年, P156-161

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

なし

取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。