

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25650080

研究課題名(和文) ゲノム編集による遺伝子ネットワークの in vivo再構成技術を用いた進化発生研究

研究課題名(英文) Evolutionary developmental study by using genome-editing technologies for in vivo reconstruction of gene networks

研究代表者

三戸 太郎 (Mito, Taro)

徳島大学・ソシオテクノサイエンス研究部・助教

研究者番号：80322254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：発生を制御する遺伝子ネットワークの進化プロセスについては未だ不明な点が多く、実験的な検証が可能なケースも限られている。本研究は、ゲノム編集技術の応用により遺伝子ネットワークを再構築する技術確立することを目的とした。発生・再生研究のモデル昆虫、フタホシコオロギを使用し、CRISPR/Cas9システムによるゲノム編集を用いた遺伝子ノックアウトおよびノックインに成功した。さらに、標的遺伝子のエンハンサートラップにより遺伝子発現をモニターするシステムを作出した。コオロギにおいて、シス転写調節領域の操作による遺伝子ネットワーク改変実験を可能とする技術基盤が確立された。

研究成果の概要(英文)：It remains unclear how the gene networks regulating development in multicellular organisms evolved. The experimental variation of such evolutionary processes has been possible only in limited cases. In the present study, we aimed to establish a method for in vivo reconstruction of gene networks using genome-editing technologies. We used a model insect, *Gryllus bimaculatus*, and achieved targeted gene knockout and knockin with CRISPR/Cas9 system. In addition, we produced genetic strains expressing a marker gene in a similar pattern of a targeted gene via enhancer trap. Thus, we established a technical basis for experimental modification of gene networks by modifying cis-regulatory sequences.

研究分野：発生生物学

キーワード：ゲノム編集 昆虫

### 1. 研究開始当初の背景

生物個体の発生システムの進化の背景にある遺伝子ネットワーク進化のプロセスやメカニズムについては、優れた理論的研究があるものの、未だ不明な点が多い。その大きな原因は実験的な検証が困難な点にある。進化の過程では特定の遺伝子の欠失や重複、塩基配列の変化だけでなくシス転写調節配列（以下シス配列）の改変によるネットワークの組換えが頻繁に起こっている可能性が高いことが示唆されている。したがって、自在に遺伝子ネットワークを組換え、*in vivo* でその影響を解析可能な系がこの分野の発展のために強く求められている。

我々は以前に、発生・再生研究の新しいモデル生物であるフタホシコオロギにおいて、人工ヌクレアーゼを用いたゲノム編集による遺伝子ノックアウトに成功している (*Nature Commun.* 2012;3:1017)。この系を進展させることでシス配列を操作する技術の確立が可能であり、遺伝子ネットワークの改変実験による進化モデルの実験的検証が個体レベルで可能になると考えた。

### 2. 研究の目的

(1) 人工ヌクレアーゼを用いたゲノム編集技術の応用により、遺伝子ネットワークを再構築する技術の確立する。

(2) 遺伝子ネットワーク改変の影響を個体レベルで定量的に解析可能にする。

### 3. 研究の方法

(1) 遺伝子ノックイン技術の確立と効率化

ゲノム編集により標的部位に任意の配列を導入する技術をコオロギで確立ことを目指した。特に CRISPR/Cas9 システムを導入し、遺伝子ノックインおよびノックイン法の確立を試みた。実験条件を最適化するため、人工ヌクレアーゼ導入量や導入時期などの条件を検討した。

(2) シス配列操作の技術的基盤の確立

遺伝子ノックイン技術による、蛍光タンパク質遺伝子の発現カセットの標的遺伝子への導入を試みた。標的遺伝子の発現を蛍光発現によりモニター可能な系統の作出をおこなった。

(3) ゲノムおよびトランスクリプトーム解析とその成果の利用

これまでに RNAi による遺伝子機能解析やトランスクリプトーム解析を通じてコオロギにおける遺伝子ネットワークについての情報を獲得してきたが、さらに大規模にデータを得ることを上記技術的基盤の確立と並行して進めた

### 4. 研究成果

(1) CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集技術のコオロギへの導入に成功した。ZFN や TALEN を用いた過去の研究で、コオロギ

Laccase2 遺伝子をノックアウトすると体色が白くなることがわかっている。この表現型を指標に、CRISPR/Cas9 システムの効果をまず検証した。その結果、インジェクション当代で体の広範囲にわたって白色化する個体が多数得られ、変異導入効率が非常に高いことが示唆された。次世代への変異の伝搬効率（生殖系列への変異導入効率）は約 77% であり、ZFN/TALEN を用いた場合（～50%）よりも高かった。

その他の発生関連遺伝子について、遺伝子ノックアウト実験を行った。体節形成に関わる *even-skipped* 遺伝子や *Ultrabithorax* (*Ubx*) などについてノックアウトの表現型を得た。

(2) ガイド RNA や Cas9 のコオロギ卵への導入時期、導入量を検討し、ノックアウト実験の最適条件を明らかにした。

(3) CRISPR/Cas9 システムを用いた、非同末端結合を介した遺伝子ノックイン技術をコオロギで確立した。*Ubx* および *abd-A* 遺伝子座へ GFP 遺伝子を導入することに成功した（図 1）。導入された GFP 遺伝子の発現は標的遺伝子の発現パターンに対応しており、エンハンサーがトラップされたものと考えられる。

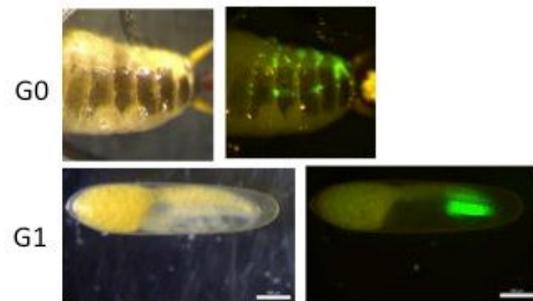


図 1 *abd-A* 遺伝子座への GFP 遺伝子ノックイン [*abd-A* の発現部位（幼虫や胚の腹部）で GFP が発現している]

上記のように、遺伝子ネットワーク改変実験のための基盤となる技術を確立した。これに加え、コオロギのゲノムおよびトランスクリプトーム解析を進め、その情報を整備、利用した（ゲノム解析について論文執筆中）。特にゲノム解析により、多数の発生関連遺伝子の構造を明らかにした。これにより、ゲノム編集のための標的配列決定に必要な情報を充実させることができた。

### 今後の展望

CRISPR/Cas9 システムの利用により、コオロギにおいて遺伝子ノックアウト、ノックインを高効率で達成できるようになった。また、発現レポーター系統の作製にも成功した。これら技術基盤を活用することで、シス配列の

操作や発現変動のモニター実験が可能であり、遺伝子ネットワーク研究が飛躍的に進むと期待できる。

#### 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 7 件)

1. Awata H, Watanabe T, Hamanaka Y, Mito T, Noji S, Mizunami M. (2015) Knockout crickets for the study of learning and memory: Dopamine receptor Dop1 mediates aversive but not appetitive reinforcement in crickets. *Scientific Reports*, Nov; 5:15885. (doi: 10.1038/srep15885) 査読あり.
2. Watanabe T, Noji S, \*Mito T (\*corresponding author). (2014) Gene knockout by targeted mutagenesis in a hemimetabolous insect, the two-spotted cricket *Gryllus bimaculatus*, using TALENs. *Methods* Aug;69:17-21. (doi:10.1007/978-1-4939-2932-0\_12) 査読あり.
3. Yasue A, Mitsui S, Watanabe T, Sakuma T, Oyadomari S, Yamamoto T, Noji S, Mito T, Tanaka E. (2014). Highly efficient targeted mutagenesis in one-cell mouse embryos mediated by the TALEN and CRISPR/Cas systems, *Scientific Reports*, Jul;4:5705(10 pages). (doi: 10.1038/srep05705) 査読あり.
4. 渡辺崇人, 三戸太郎, 大内淑代, 野地澄晴 (2014) コオロギにおける ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子改変, *実験医学* (別冊) Apr.;149-158. 査読無し.
5. Matsumoto CS, Shidara H, Matsuda K, Nakamura T, Mito T, Matsumoto Y, Oka K, Ogawa H. (2013) Targeted gene delivery in the cricket brain, using *in vivo* electroporation. *J Insect Physiol.* Oct;59(12):1235-1241. (doi: 10.1016/j.jinsphys.2013.10.001.) 査読あり.
6. Zeng V, Ewen-Campen B, Horch HW, Roth S, Mito T, Extavour CG. (2013) Developmental gene discovery in a hemimetabolous insect: de novo assembly and annotation of a transcriptome for the cricket *Gryllus bimaculatus*. *PLoS ONE* May;8(5): e61479 (22 pages). (doi:10.1371/journal.pone.0061479.) 査読あり.
7. 渡辺崇人, 三戸太郎, 野地澄晴 (2013) ZFN/TALEN を用いたコオロギの遺伝子ノックアウト, *細胞工学* Apr.;32(5):

543-549. 査読無し.

〔学会発表〕(計 24 件)

1. 三戸太郎: CRISPR/Cas システムを用いた昆虫ゲノム改変技術の開発, 第 86 回日本動物学会大会[シンポジウム: 昆虫の生得的行動の分子・神経基盤の解析 ゲノム編集技術の適用例と可能性 (オーガナイザー: 久保健雄, 水波誠)], 朱鷺メッセ (新潟県新潟市), 2015 年 9 月 17 日.
2. Yuji Matsuoka, Takahito Watanabe, Sayuri Tomonari, Sumihare Noji, Taro Mito: Functional analysis of a Hox gene, *abdominal-A*, using CRISPR/Cas9 system in the cricket *Gryllus bimaculatus*, International Tribolium Meeting 2015, Berkeley, USA, August 4, 2015.
3. Takahito Watanabe, Yuji Matsuoka, Sayuri Tomonari, Chinami Kurita, Sumihare Noji, Taro Mito: Genome editing in the two-spotted cricket, *Gryllus bimaculatus*, using CRISPR/Cas9 system, Insect Genetic Technologies Workshop, Manhattan, Kansas, USA, June 17, 2015.
4. Taro Mito, Takehiko Itoh, Hiroya Morimoto, Ray Kajitani, Atsushi Toyoda, Sayuri Tomonari, Masao Fuketa, Takahito Watanabe, Yuji Matsuoka, Sumihare Noji: Genome sequencing and annotation of the cricket *Gryllus bimaculatus*, a hemimetabolous insect model, Ninth Annual Arthropod Genomics Symposium, Manhattan, Kansas, USA June 17-19, 2015.
5. Taro Mito: Whole-genome sequencing and targeted genome editing in the cricket *G. bimaculatus*, In the workshop "Ethology, neuroscience and genetics in crickets: How can they meet?" Hokkaido Neuroethology Workshops 2014, 北海道大学 (北海道札幌市), July 27, 2014.
6. Takahito Watanabe, Yuji Matsuoka, Sumihare Noji, Taro Mito: Targeted genome editing in the cricket, *Gryllus bimaculatus*, using CRISPR/Cas9 system, FASEB SRC on Genome Engineering-Cutting-Edge Research and Applications, Nassau, Bahamas, June 22-27, 2014.
7. 三戸太郎, 渡辺崇人, 野地澄晴: CRISPR/Cas システムを用いたフタホシコオロギにおけるゲノム編集, [小集会: TALEN 等のゲノム編集技術の昆虫への適用の現状と課題 (オーガナイザー: 丹羽隆介, 篠田徹郎)], 第 58 回日本応用動物昆虫学会大会, 高知大学 (高知県高

- 知市), 2014年3月28日.
8. Taro Mito: RNAi analysis and genome sequencing in the cricket *Gryllus bimaculatus*, a model for evolutionary developmental studies, *International Symposium on RNAi and Genome editing methods*, 徳島大学(徳島県徳島市), Mar.14-16, 2014.
  9. Taro Mito, Takahito Watanabe, Sumihare Noji: Genome modification technology in the cricket *Gryllus bimaculatus* (tentative title), 1st Asian Invertebrate Immunity Symposium, Busan, Korea, Feb.15, 2014.
  10. 渡辺崇人, 松岡佑児, 石原聡, 山本卓, 野地澄晴, 三戸太郎: ゲノム編集技術によるノックアウトコオロギの作製, [ワークショップ: 昆虫の形態多様性をもたらす遺伝子の機能(オーガナイザー: 行弘研司)] 第15回日本進化学会大会, 筑波大学(茨城県つくば市), 2013年8月28-31日.

[図書](計2件)

1. Watanabe T, Noji S, Mito T (2015) GeneKnockout by Targeted Mutagenesis in a Hemimetabolous Insect, the Two-Spotted Cricket *Gryllus bimaculatus*, using TALENs. *In* TALENs: Methods and Protocols (Ralf Kuhn et al. eds.), Methods in Molecular Biology, pp. 143-155, Total number of pages: 274, Springer, New York.
2. 渡辺崇人, 松岡佑児, 野地澄晴, 三戸太郎(2015)進化するゲノム編集技術(真下知士, 城石俊彦監修)第2編第2章第4節 フタホシコオロギにおけるゲノム編集, pp.201-207, 総ページ数 341, エヌ・ティー・エス.

6. 研究組織

(1)研究代表者

三戸 太郎 (MITO TARO)

徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス  
研究部・助教

研究者番号: 80322254