

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：86103

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21199

研究課題名(和文)新規遺伝子改変技術を利用したコオロギの再生芽形成メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of mechanisms of regeneration-bud formation in the cricket using novel genetic engineering method

研究代表者

渡辺 崇人 (WATANABE, TAKAHITO)

徳島県立農林水産総合技術支援センター(試験研究部)・徳島県立農林水産総合技術支援センター(資源環境研究課)・研究員

研究者番号：30709481

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):ゲノム編集技術を用いて、コオロギのHox遺伝子に最小化プロモーターの下流にeGFP遺伝子を配置したベクターをノックインした結果、予想される発現パターンで蛍光が観察され、エンハンサートラップシステムを作製することに成功した。ノックインの方向及び結合部位を正確に組み込む方法として、MMEJの経路を用いたノックイン技術の導入を試み、標的遺伝子の終止コドン上にeGFP遺伝子を正確に組み込み、その発現を観察することができた。また、PacBioRSIIを用いたRNA-seq解析を行った。抽出したmRNAを分画し、4 cellずつシーケンズ解析を行った結果、合計で76万リード、2.25 Gbの配列が得られた。

研究成果の概要(英文): Using genome editing technology, knock-in vector containing eGFP gene under cricket minimal promoter was introduced into Hox gene loci in the cricket genome. eGFP fluorescent was observed as expected pattern. We succeeded to establish the method for generating enhancer trap line in the cricket. For introducing correctly knock-in direction and junction, knock-in method via MMEJ pathway was applied in the cricket. eGFP gene was correctly introduced into stop codon loci in target gene via MMEJ mediated knock-in, and eGFP expression was observed. In addition, RNA-seq analysis was performed using PacBioRSII. Extracted mRNA from cricket embryo and nymph was fractionated into four, and each fraction was sequenced in 4 cells. As a result, 760,000 reads and 2.25 Gb sequence was obtained in total.

研究分野：昆虫科学

キーワード：ゲノム編集 フタホシコオロギ ノックイン RNA-seq

1. 研究開始当初の背景

昆虫では、幅広い種において付属肢の高い再生性能を有することが知られている。一方、ヒトを含む高等な脊椎動物ではそのような再生性能は持たず、一度失われた付属肢は再生することは無い。応募者らは、不完全変態類昆虫であるフタホシコオロギに着目し、付属肢の再生システムについて研究を行ってきた。コオロギを用いた再生研究は RNA 干渉 (RNAi) による機能解析で既に多くの成果を上げてきているが、最近になり不完全変態類昆虫で初めてトランスジェニック作製技術やノックアウト作製技術の開発に成功した。

2. 研究の目的

付属肢再生過程においては、まず切断を受けた部位で上皮細胞が移動し、傷口の修復が起こったあと、再生芽と呼ばれる脱分化した幹細胞群が形成される。この再生芽の形成は、幹細胞が元々存在するプラナリアを除いた全ての再生過程において観察される現象であるが、その形成メカニズムは未だ明らかとなっていない。そこで本研究においては、コオロギをモデル生物としてトランスジェニック作製、ノックアウト作製技術に加えて、ノックイン技術や新たにコンディショナルノックアウト作製技術を開発し、複合的に駆使することにより世界に先駆けてこの謎を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

1. ゲノム編集技術を利用して新規遺伝子改変技術としてコンディショナルノックアウトおよびマルチプルノックアウト作製技術を確立する。
2. 再生芽と切断直後の比較 transcriptome 解析及び RNAi により再生芽形成遺伝子の候補を絞り込む。
3. RNAi で表現型が得られていない遺伝子についてノックアウトを作製し解析する。
4. 候補遺伝子について新規遺伝子改変技術を駆使して解析を行う。

4. 研究成果

フタホシコオロギにおいては、これまでの研究で CRISPR/Cas9 システムを導入することに成功し、ノックアウト系統の作製及びノックイン系統の作製が可能となっている。また、作製されたノックイン系統において、eGFP を標的遺伝子特異的に挿入し、その発現パターンをライブで観察することが可能となっている。標的遺伝子を時間・空間特異的にノックアウトするためには、対応するシス調節領域を破壊する必要があるが、シス調節領域が巨大である場合やそもそもの特定が困難である場合が多く、単純な変異導入ではコンディショナルノックアウト系統を作製することはできない。そ

こで、コンディショナルノックアウト系統を作製するために、CRISPR/Cas9 システムによるノックイン技術と piggyBac のような転移酵素を組み合わせる方法を考案した。まず、標的遺伝子の 5' exon の両側 intron に gRNA を設計し、転移酵素の認識配列である逆向き反復配列をノックインする。その後、時空間特異的なプロモーター (本研究では再生脚) で piggyBac が発現する系統と掛け合わせ、標的遺伝子から 5' exon を抜き出すことでコンディショナルに標的遺伝子をノックアウトする。これまでに、piggyBac のコンポーネントが組み込まれたノックインベクターを作製し、intron へのノックインを試みたが、正確な方向でノックインされた系統は得られなかった。これは、フタホシコオロギで用いているノックインの方法が NHEJ の経路を利用しているため、ノックインベクターが組み込まれる方向を制御することができないことが原因であると考えられた。そこで、ノックインの方向及び結合部位を正確に組み込む方法として、MMEJ の経路を用いたノックイン技術の導入を試みた。現在までに、標的遺伝子の終止コドン上に MMEJ によるノックインによって、eGFP 遺伝子を組み込み、その発現を観察することに成功している。また、ゲノム上からシス調節領域などの大きな領域を欠失させる方法として、ゲノムの 2 カ所を同時に切断し、その両端が結合することによる大規模な欠失を試みている。さらに、フタホシコオロギにおいて CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集を行う際には Cas9 mRNA を用いていたが、手順の簡略化及び高効率化を目指し、Cas9 タンパク質によるゲノム編集の確立を行った。その結果、効率が mRNA とほぼ同等の条件を明らかにし、手順を大幅に簡略化することに成功した。また、時空間特異的なプロモーターを獲得するために、ノックイン技術を活用したエンハンサートラップ系統の作製技術の確立を行った。その結果、eGFP 遺伝子を目的遺伝子近傍にノックインすることにより、遺伝子の機能を破壊することなく、目的遺伝子の発現を観察することが可能となった。

また、標的遺伝子の絞り込みのために、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 解析を行った。用いた機種は PacBioRSII で、シーケンス解析を行ったサンプルは 4 時間～84 時間胚から抽出した mRNA を用いた。抽出した mRNA を 1-2 kb, 2-3 kb, 3-6 kb, 5-10 kb に分画し、それぞれ 4 cell ずつシーケンス解析を行った。その結果、合計で 76 万リード、2.25 Gb の配列を得ることができた。PacBioRSII により得られた本シーケンスには、全長の mRNA 配列が多く含まれていると考えられる。現在、本シーケンスをゲノム情報にマッピングし、解析を進

めている。

今後は、コンディショナルノックアウト系統作製技術の確立を進めるとともに、今回明らかになった mRNA 情報を活用し、昆虫の脚再生メカニズムの解析を進める。

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. Xu T., Yasui H., Teale S.A., Fujiwara-Tsujii N., Wickham J.D., Fukaya M., Hansen L., Kiriya S., Hao D., Nakano A., Zhang L., Watanabe T., Tokoro M., Millar J.G., Identification of a male-produced sex-aggregation pheromone for a highly invasive cerambycid beetle, *Aromia bungii*. *Sci Rep.* 7:7330, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-07520-1.
2. Ueta R., Abe C., Watanabe T., Sugano S.S., Ishihara R., Ezura H., Osakabe Y., Osakabe K. Rapid breeding of parthenocarpic tomato plants using CRISPR/Cas9. *Sci Rep.* 7:507, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-00501-4.
3. Watanabe T., Noji S., Mito T., Genome Editing in the Cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Methods in Molecular Biology*, 1630: 219-233, 2017. doi: 10.1007/978-1-4939-7128-2_18.
4. Osakabe Y., Watanabe T., Sugano S.S., Ueta R., Ishihara R., Shinozaki K., Osakabe K. Optimization of CRISPR/Cas9 genome editing to modify abiotic stress responses in plants. *Sci Rep.* 6:26685. 2016. doi: 10.1038/srep26685.
5. Ishimaru Y., Tomonari S., Matsuoka Y., Watanabe T., Miyawaki K., Bando T., Tomioka K., Ohuchi H., Noji S., Mito T. TGF- signaling in insects regulates metamorphosis via juvenile hormone biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 113(20):5634-5639. 2016. doi: 10.1073/pnas.1600612113.
6. Watanabe T., Noji S., Mito T., GeneKnockout by Targeted Mutagenesis in a Hemimetabolous Insect, the Two-Spotted Cricket *Gryllus bimaculatus*, using TALENs. *Methods in Molecular Biology*, 1338: 143-155, 2016. doi: 10.1007/978-1-4939-2932-0_12.

[学会発表](計4件)

1. 上村 菜月, 友成 さゆり, 渡邊 崇人,

松岡 佑児, 石丸 善康, 野地 澄晴, 三戸 太郎: 遺伝子ノックイン技術の応用によるレポーターコロロギ系統の作製., 第88回日本動物学会. 2017年9月

2. Matsuda Mayuko, Matsuoka Yuji, Ishimaru Yoshiyasu, Tomonari Sayuri, Watanabe Takahito, Noji Sumihare and Mito Taro: Functional analysis of a Hox gene, abdominal-A, in the cricket *Gryllus bimaculatus* using a CRISPR/Cas9-mediated gene knock-in system., **Japanese Society of Developmental Biologists**. 2017年5月
3. Nakamura Yu-Ki, Kawamoto Kohei, Tomonari Sayuri, Matsuda Mayuko, Watanabe Takahito, Ishimaru Yoshiyasu, Uemura Natsuki, Noji Sumihare and Mito Taro: even-skipped is required for segmentation and elongation of embryos in the cricket *Gryllus bimaculatus* revealed by CRISPR/Cas9-based gene knock-out., **Japanese Society of Developmental Biologists**. 2017年5月
4. 川本 晃平, 友成 さゆり, 松岡 佑児, 渡邊 崇人, 石丸 善康, 野地 澄晴, 三戸 太郎: even-skipped acts principally as a gap gene in the cricket *Gryllus bimaculatus* as revealed by CRISPR/Cas9-based gene knockout analysis., **JSDB Special Symposium: Frontier of Developmental Biology Hosted by JSDB**. 2016年6月

[図書](計1件)

The Cricket as a Model Organism Development, Regeneration, and Behavior, Horch H.W., Liu J., Mito T., Popadic A. and Watanabe T. (Horch H.W., Mito T., Popadic A., Ohuchi H. and Noji S. eds), 327-370 (総ページ数 376), 2017, Springer Japan.

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：遺伝子改変不完全変態昆虫の作製方法

発明者：渡邊崇人、三戸太郎

権利者：国立大学法人徳島大学

種類：特許

番号：特願 2017-196367

出願年月日：2017 年

国内外の別： 国内

6．研究組織

(1)研究代表者

渡邊 崇人 (WATANABE, Takahito)

徳島県立農林水産総合技術支援センタ

ー・資源環境研究課・主任研究員

研究者番号：30709481