

機関番号：16101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009年～2010年

課題番号：21770237

研究課題名 (和文) 新規高効率遺伝子導入法の開発とそれを用いたコロオギにおける体軸決定機構の解明

研究課題名 (英文) Development of novel efficient techniques for genetic manipulation and their application to explore the mechanisms of body axis determination in the cricket *Gryllus bimaculatus*

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

研究成果の概要 (和文) : ショウジョウバエと異なる卵形成および胚発生の様式をとる昆虫のモデルであるフタホシコロオギについて、遺伝子改変技術 (トランスジェニック個体作製および標的特異的変異導入の技術) を確立した。また、その技術を用いて細胞/核を蛍光ラベルし初期発生過程の細胞動態をライブイメージング解析することに成功し、胞胚形成過程および胚原基形成過程での非常にダイナミックな細胞移動が明らかとなった。さらに、ライブイメージング解析を RNA 干渉による遺伝子機能阻害実験と組み合わせ、胞胚期後期のダイナミックな細胞移動の起こる前に *orthodenticle* 遺伝子等により予定胚細胞群が領域決定されていることを示唆する結果を得た。

研究成果の概要 (英文) : We established techniques of genetic modification (transgenesis and targeted mutagenesis) in the cricket *Gryllus bimaculatus*, of which the modes of oogenesis and embryogenesis differ from those of *Drosophila*. Using the transgenic cricket system, we investigated cell behaviors during early embryogenesis via live imaging of fluorescently labeled embryonic cells/nuclei and revealed very dynamic features of blastoderm cells. Furthermore, results from our live imaging analysis of RNAi-treated embryos suggested that the presumptive embryonic cells are regionally specified by genes such as *orthodenticle* before the dynamic cell movement in late blastoderm stages.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：遺伝子導入, 昆虫, 体軸決定

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ショウジョウバエと異なる卵形成様式の昆虫における体軸決定機構は不明である。

(2) コロオギは非 Bicoid 型胚発生のモデ

ルシステムである。コロオギの卵形成、胚発生の様式はショウジョウバエと大きく異なっており、昆虫発生様式の進化的研究のモデルとなっている。我々のこれまでのコロオギの発生メカニズムの研究成果を生かすこと

ができる。

(3) コオロギでは RNAi による迅速な機能スクリーニングが可能である。

(4) 新規の遺伝子改変技術の開発によりコオロギ卵・胚形成における体軸決定機構の詳細な解析が可能となる。

## 2. 研究の目的

(1) コオロギの体軸（主として前後軸）決定に関わる因子を同定する。

(2) コオロギで新規の遺伝子改変技術を確認する。

(3) 新規の遺伝子改変技術を用い、体軸決定機構を解明する。

## 3. 研究の方法

(1) ショウジョウバエの体軸決定に関わる因子のコオロギホモログの機能喪失実験を RNAi により行う。RNAi により体軸形成異常を生じる遺伝子をスクリーニングする。

(2) 新規の遺伝子導入法を確認し、その技術を用いてライブイメージング解析および遺伝子機能解析を行う。

## 4. 研究成果

### (1) RNAi スクリーニング

体体軸決定に関わる遺伝子の候補についてクローニングおよび RNAi による機能解析を行った。Wnt シグナル経路に関わる遺伝子について、胚原基の前後軸に沿った形態パターンが異常となる表現型を得た。また、*orthodenticle (otd)* 遺伝子の RNAi により、胚原基の段階で予定前頭部領域の欠損が起こることが明らかとなった。これらについてトランスジェニックコオロギを用いたさらに詳細な解析を行った（下記(4)）。

### (2) トランスジェニックコオロギ作製技術の確立

トランスポゾン (*piggyBac*) を利用し、蛍光タンパク質 GFP 遺伝子をコオロギ染色体に組み込むことに成功した（図1）。本方法による形質転換効率（インジェクションした世代が形質転換個体を産む割合）は約16%であり十分実用的なレベルであった。

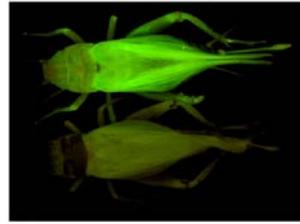


図1：GFPを発現するトランスジェニックコオロギ（上）と野生型コオロギ（下）

### (3) ライブイメージング解析による初期発生時の細胞動態の解明

GFPを発現するトランスジェニックコオロギを用いたライブイメージングの系を確認した。産卵後の初期の卵における位置情報の付与に関する知見を得るために、初期発生過程の細胞動態の解析を行った。その結果、コオロギの初期胚体（胚原基）は完全変態類と異なり、胞胚から非常にダイナミックな細胞移動を経て形成されることが示された（図2）。さらに、初期発生過程にはショウジョウバエ同様シンシチウム胞胚の時期が存在することが明らかとなった。この時期にはショウジョウバエのように転写因子が拡散により濃度勾配を作り位置情報をもたらしている可能性が示唆される。胚原基形成時の細胞移動の過程で個々の予定胚体細胞は相対的な位置関係を維持しており、したがって移動前（胞胚期）までにすでに位置情報を受け取っていると考えられる。ところが、ギャップ遺伝子

(*hunchback*, *Kruppel*) の領域特異的発現ドメインの確立は胚原基形成以降であり、多核の胞胚で同ドメインが確立するショウジョウバエの場合と大きく異なっていることが明らかとなった。

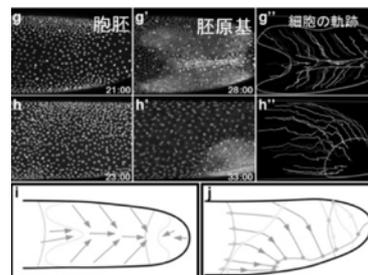


図2：ライブイメージングによるコオロギ胚原基形成時の細胞動態の解析

### (4) 前後軸形成に関わる遺伝子の機能解明

ライブイメージング解析をRNA干渉による遺伝子機能阻害実験と組み合わせ、胞胚期後期

のダイナミックな細胞移動の起こる前に *orthodenticle* (*otd*) 遺伝子等により予定胚細胞群が領域決定されていることを示唆する結果を得た。さらに、Wnt シグナル経路に関わる因子が胚原基形成時の適切な細胞移動に重要な役割を担っていることを示す結果を得た。

(5) Zinc-finger nuclease (ZFN)による標的特異的遺伝子改変技術の確立

ZFN mRNA のコオロギ卵へのインジェクションにより、トランスジーン (GFP 遺伝子) および体色制御に関わる内在遺伝子の変異体作製に成功した。この技術の応用による遺伝子ノックイン実験を開始している。

#### 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 4 件)

1. Bando T, Mito T, Nakamura T, Ohuchi H, Noji S. Regulation of leg size and shape: involvement of the Dachshous/Fat signaling pathway. *Developmental Dynamics* 2011, in press. 査読有り.
2. Mito T\*, Nakamura T, Bando T, Ohuchi H, Noji S (2011) The advent of RNA interference in Entomology. *Entomological Science*, 14:1-8. 査読有り.
3. Nakamura T, Yoshizaki M, Ogawa S, Okamoto H, Shinmyo Y, Bando T, Ohuchi H, Noji S, Mito T\*. (2010) Imaging of transgenic cricket embryos reveals cell movements consistent with a syncytial patterning mechanism. *Curr Biol*. 20(18):1641-1647. 査読有り.
4. Mito T\*, Nakamura T, Noji S. (2010) Evolution of insect development: to the hemimetabolous paradigm. *Curr Opin Genet Dev*. 20(4):355-361. 査読有り.

[学会発表] (計 8 件)

1. 吉崎正人他. Functions of the *orthodenticle*-related genes during embryogenesis in the cricket *Gryllus bimaculatus*. 第33回日本分子生物学会年会. 2010年12月7-10日, 神戸ポートアイランド.
2. Nakamura T, et al. Dynamic control of positional specification in a primitive mode of insect segmentation.

3rd EuroEvoDevo Conference. 2010年7月8日. パリ第7大学 (フランス).

3. 中村 太郎他. 祖先的な昆虫における体節形成のダイナミックな制御. 日本発生物学会 第43回大会 (APDBN共催). 2010年6月22日, 国立京都国際会館 (京都府).
4. Mito T, et al. Highly dynamic cell behavior during early development in the intermediate germ insect *Gryllus bimaculatus*, as revealed by analyses of transgenic embryos. 51th Annual Drosophila Research Conference. April 7-11, 2010, Washington DC, USA.
5. 三戸太郎. 新規モデル生物: 発生と再生研究に有用なコオロギ (*Gryllus bimaculatus*). 第32回日本分子生物学会. 2009年12月9日, 横浜.
6. 三戸太郎. RNAi法を用いた昆虫 (コオロギ) の発生・再生メカニズムの研究. 日本比較生理生化学会第31回大会. 2009年10月22日, 大阪.
7. Nakamura, T他. Dynamics of cellular aggregation and differentiation during early development of transgenic crickets. 16th International Society of Developmental Biologists Congress. 2009年9月7日, Edinburgh, UK.
8. Nakamura, T 他. Cellular dynamics during blastoderm stages and early embryogenesis, as revealed by transgenic cricket, *Gryllus bimaculatus*. 日本発生物学会第42回大会. 2009年5月30日, 新潟.

[図書] (計 1 件)

1. 三戸太郎 (2010) 古生物学事典 第2版 (棚部一成, 北里洋編) 朝倉書店. (発生と進化に関連する9項目を担当) [著書, 分担執筆]

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: トランスジェニック不完全変態類昆虫の作成方法、トランスジェニック不完全変態類昆虫の卵の作成方法、トランスジェニック不完全変態昆虫およびキット

発明者: 野地澄晴, 大内淑代, 三戸太郎, 中村太郎, 三ツ森正之

権利者: 国立大学法人徳島大学, アロカ株式会社/野地澄晴, 大内淑代, 三戸太郎, 中村太郎, 三ツ森正之

種類: 特許権

番号: 特願 2009-238841

出願年月日: 2009年10月16日

国内外の別: 国内

〔その他〕

○新聞報道

1. 読売新聞, 2010年11月8日, 15ページ  
「緑のコオロギ」.
2. 朝日新聞, 2010年9月7日, 18ページ  
「“光るコオロギ”作製」.
3. 徳島新聞, 2010年8月27日, 1ページ  
「緑に光るコオロギ」.

○一般科学雑誌における紹介記事

1. 学研りすうか (学研教育出版) Vol. 2,  
p27, 2010年. mini News「光るコオロギ」.

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

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：