

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292176

研究課題名(和文) 新規ゲノム改変技術の応用による不完全変態昆虫における形態形成のゲノム基盤解明

研究課題名(英文) Study on genomic basis of morphogenesis in hemimetabolous insects using novel genetic modification techniques

研究代表者

三戸 太郎 (Mito, Taro)

徳島大学・生物資源学部・准教授

研究者番号：80322254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：不完全変態昆虫のモデルシステムであるフタホシコオロギにおいて、胚発生を制御する遺伝子の *in vivo* 発現解析と機能解析の技術基盤を構築した。CRISPR/Casシステムによる遺伝子ノックイン技術確立した。本技術の応用により、マーカー遺伝子導入による遺伝子ノックアウト個体単離の効率化や、発現パターンの継続的な観察に成功した。特に、Hox遺伝子の発現と機能について、後胚発生期における発現パターンを含む新しい知見を得た。また、本技術の応用によるエンハンサートラップ解析の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We established a technical basis for *in vivo* analysis of expression patterns and functional analysis of genes regulating embryogenesis in *Gryllus bimaculatus*, a hemimetabolous insect model system. Using CRISPR/Cas9 system, we developed a gene knock-in technique in the cricket. We applied this technique to knock-in/knockout for efficient identification of knock-out individuals by detecting marker gene expression. In addition, we succeeded in observation of gene expression patterns through developmental stages via marker gene knock-in. Data of expression and function of Hox genes was obtained, including spatial expression patterns in postembryonic stages. Furthermore, we showed availability of our knock-in method to enhancer trap analysis.

研究分野：発生生物学・昆虫科学

キーワード：ゲノム編集 昆虫 胚発生 後胚発生

1. 研究開始当初の背景

(1) 昆虫ボディプランの形成プロセスは完全変態類と不完全変態類で異なっている。完全変態型の発生様式は進化的には新しく、昆虫の形態形成の基本原則と進化を理解するうえで不完全変態型の胚発生メカニズムの解明は重要である。

(2) 昆虫の種を特徴付ける形態が顕著になる胚発生後期の形態形成メカニズムの解析については、技術的に困難な面もあり、特に不完全変態類での研究はほとんど行われていない。

(3) 本課題に対して、不完全変態昆虫のモデルシステムであるフタホシコオロギを用いての、ゲノム編集技術を利用したアプローチが有効と考えられる。

2. 研究の目的

ゲノム編集技術を活用し、フタホシコオロギにおける新規 *in vivo* 発現解析システムを確立する。同技術により後期胚における形態形成遺伝子の発現パターンを明らかにする。さらに、遺伝子機能やシス調節配列の働きを解明する。

3. 研究の方法

1) ゲノム編集技術を用いた遺伝子ノックイン技術を開発する。

2) 蛍光レポーターノックインにより *in vivo* 発現解析システムを確立し、発現パターンの解析を行う。

3) 開発したゲノム改変技術を活用して、形態形成に関わる遺伝子の機能解析を行う。

4. 研究成果

(1) コオロギ遺伝子の *in vivo* 発現解析と機能解析の技術基盤の確立

Hox 遺伝子である *Ultrabithorax (Ubx)* および *abdominal-A (abd-A)* 遺伝子について、GFP 遺伝子発現カセットを含むノックインベクターを構築し、CRISPR/Cas システムを用いた非相同末端結合によるノックインを試みた。その結果、標的部位への GFP 遺伝子の導入がみとめられ、標的遺伝子と同様のパターンでの発現が検出された (図1)。生殖系列への伝搬効率は 25-50% 程度であった。本手法により、GFP 遺伝子を含むベクターを標的遺伝子エクソンに挿入することで GFP 蛍光を指標としてノックアウト個体を簡便に選別することができるようになった (図3 参照)。

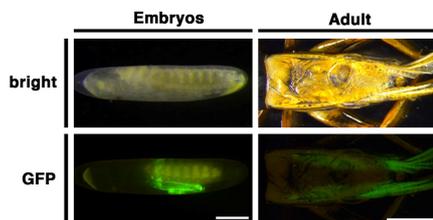


図1: *Ubx* 遺伝子座への GFP 遺伝子ノックイン系統のコオロギ

また、エンハンサートラップによる発現解析も可能となった。

(2) 遺伝子ノックアウト系統の樹立と表現型解析

Hox 遺伝子である *Ubx* および *abd-A* 遺伝子について、完全な遺伝子欠損型の表現型を得ることができた。特に *abd-A* の表現型は、他の昆虫での結果から予想されていたよりもシビアな腹部の形態変化を生じた。一方、標的遺伝子座に導入された GFP 遺伝子が標的遺伝子と同様の発現パターンを示すことを利用し、これまで解析が困難であった、後期胚や幼虫期における空間的発現パターンを明らかにした。その他の遺伝子についても解析を進めており、RNAi 解析のみでは不明瞭な部分のあった胚発生における詳しい機能が明らかになった。

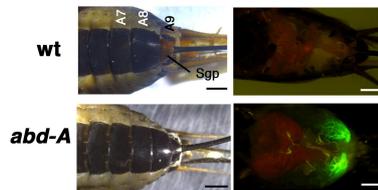


図2: GFP 遺伝子ノックインにより明らかになった *abd-A* 遺伝子の組織特異的な発現

(3) 発生関連遺伝子の機能解析

遺伝子ノックイン技術を利用した遺伝子ノックアウト系統の樹立や表現型解析をさらに進め、複数の発生関連遺伝子の機能を明らかにした。特に、*even-skipped* や Hox 遺伝子の機能を詳細に解析した。コオロギにおいて *even-skipped* は、前頭部以外のすべての体節の形成に関与していることを示した。コオロギ *even-skipped* 遺伝子の機能は他の短胚型昆虫で示されている機能と共通する部分があり、ショウジョウバエなどより祖先的な機能を有していると考えられる。また、ゲノム編集で標的とするエクソンによって表現型が異なるケースを見出した。選択的スプライシングが関わっている可能性が考えられ、解析を進めている。複数の転写産物の機能を個別に調べるために、ゲノム編集技術が有効であることが示唆される。*abd-A* について、前年度までに見出されていたノックアウト変異体の腹部に形成される付属肢様の構造について、詳しく解析した。付属肢のマーカー遺伝子発現などを調べた結果、脚での発現パターンと対応することが示され、付属肢様構造が脚の原基であることが示唆された (図3)。また、付属肢様構造の形成に腹部体節間で違いがあり、後部の数体節でより発達した構造が形成されていることが明らかとなった。他の Hox 遺伝子との協調作用が腹部体節間で異なっていることを反映していると考えられる。他の昆虫との比較から、*abd-A* 遺伝子のコオロギにおける機能はより

派生的な種よりも腹部形成への関与の度合いが高い可能性が考えられた。

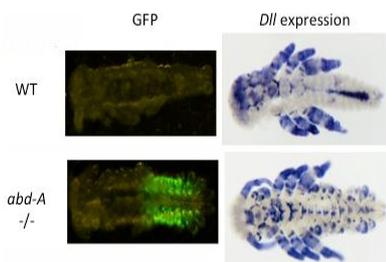


図 3: *abd-A* 遺伝子のノックアウト個体の同定(左)と腹部における付属肢様構造(右)

一方、遺伝子ノックイン技術を応用し、遺伝子のプロモーター領域に GFP 発現カセットを導入する実験を行った。インジェクション当りでのノックインイベントを検出した。詳細な解析を継続中であるが、内因性のエンハンサーを利用した遺伝子機能解析が可能であることが示された。

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 8 件)

1. Ishimaru Y, Tomonari S, Matsuoka Y, Watanabe T, Miyawaki K, Bando T, Tomioka K, Ohuchi H, Noji S, Mito T (2016) TGF- signaling in insects regulates metamorphosis via juvenile hormone biosynthesis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(20):5634-9. doi: 10.1073/pnas.1600612113.
2. Hamada Y, Bando T, Nakamura T, Ishimaru Y, Mito T, Noji S, Tomioka K, Ohuchi H (2015) Leg regeneration is epigenetically regulated by histone H3K27 methylation in the cricket *Gryllus bimaculatus*, *Development* 142(17):2916-27. doi: 10.1242/dev.122598
3. 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, *Sci Rep.* 5:15885. doi: 10.1038/srep15885.
4. Matsuoka Y, Bando T, Watanabe T, Ishimaru Y, Noji S, Popadic A, Mito T (2015) Short germ insects utilize both the ancestral and derived mode of Polycomb group-mediated epigenetic silencing of Hox genes, *Biol Open.* 4(6):702-9. doi: 10.1242/bio.201411064.
5. Ishimaru Y, Nakamura T, Bando T, Matsuoka Y, Ohuchi H, Noji S, Mito T

(2015) Involvement of dachshund and Distal-less in distal pattern formation of the cricket leg during regeneration, *Sci Rep.* 5:8387. doi: 10.1038/srep08387.

6. Yasue A, Mitsui SN, 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, *Sci Rep.* 4:5705. doi: 10.1038/srep05705.
7. Watanabe T, Noji S, Mito T (2014) Gene knockout by targeted mutagenesis in a hemimetabolous insect, the two-spotted cricket *Gryllus bimaculatus*, using TALENs, *Methods* 69(1):17-21. doi: 10.1016/j.ymeth.2014.05.006.
8. 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.

[学会発表](計 16 件)

1. 三戸太郎, モデル昆虫(コオロギ)を用いた研究におけるゲノム編集技術の活用, 第 3 回日本生物工学会西日本支部講演会, 2016 年 12 月 10 日, 徳島大学, 徳島県・徳島市.
2. 三戸太郎, 直翅目昆虫フタホシコオロギにおけるゲノム編集, 第 87 回日本動物学会大会[シンポジウム: 昆虫ゲノム編集の進展(オーガナイザー: 畠山正統, 三戸太郎)], 2016 年 11 月 17 日, 沖縄コンベンションセンター, 沖縄県・宜野湾市.
3. Mito T, Genome editing in the cricket *Gryllus bimaculatus*, XXV International Congress of Entomology, 2016 年 9 月 26 日, Orlando FL, USA.
4. 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)], 2015 年 9 月 18 日, 新潟コンベンションセンター, 新潟県・新潟市.
5. Mito T, Whole-genome sequencing and targeted genome editing in the cricket *G. bimaculatus*, Hokkaido Neuroethology Workshops 2014, 2014 年 6 月 27 日, 北海道大学, 北海道・札幌市.
6. Mito T, Itoh T, Morimoto H, Kajitani R, Toyoda A, Tomonari S, Fuketa M, Watanabe T, Matsuoka Y, Noji S, Genome

sequencing and annotation of the cricket *Gryllus bimaculatus*, a hemimetabolous insect model, Ninth Annual Arthropod Genome Symposium, 2015年6月17日, Manhattan KS, USA.

〔図書〕(計5件)

1. Watanabe T, Noji S, Mito T, Genome editing in the cricket *Gryllus bimaculatus*. In “Genome Editing in Animals (I.Hatada ed.)”, (2017; 印刷中) (Springer Japan, Tokyo).
2. Horch HW, Mito T, Ohuchi H, Popadic A, Noji S (編著), Cricket as a model Organism - Development Regeneration and Behavior, 総ページ数 376, (2017) (Springer Japan, Tokyo).
3. Watanabe T, Noji S, Mito T, GeneKnockout by Targeted Mutagenesis in a Hemimetabolous Insect, the Two-Spotted Cricket *Gryllus bimaculatus*, using TALENs. In “TALENs: Methods and Protocols (R.Kuhn et al. eds.; Methods in Molecular Biology)”, pp.143-155, (2016) (Springer New York).
4. 渡辺 崇人, 三戸 太郎, 松岡 佑児, 野地 澄晴, 三戸 太郎, 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, (2015) (エヌ・ティー・エス).
5. 渡辺崇人, 三戸太郎, 大内淑代, 野地澄晴, 実験医学別冊 今すぐ始めるゲノム編集(山本卓編)第10章 コオロギにおけるZFN, TALEN, CRISPR/Cas9を用いた遺伝子改変, pp.149-158 (2014) (羊土社).

6. 研究組織

(1)研究代表者

三戸 太郎 (MITO TARO)
徳島大学・大学院生物資源産業学研究部・
准教授
研究者番号：80322254

(2)研究分担者

渡辺 崇人 (WATANABE TAKAHITO)
徳島県立農林水産総合技術支援センター・
資源環境研究課・研究員
研究者番号：30709481

友成 さゆり (TOMONARI SAYURI)
徳島大学・大学院理工学研究部・技術専門
職員
研究者番号：40448345