

令和 2 年 7 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03945

研究課題名(和文) 不完全変態昆虫モデルシステムを用いた後胚期形態形成の制御機構解明

研究課題名(英文) Study on regulatory mechanisms of postembryonic development in a model system of hemimetabolous insects

研究代表者

三戸 太郎 (MITO, Taro)

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(生物資源産業学域)・准教授

研究者番号：80322254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000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、後胚発生を制御する遺伝子の発現と機能の解析を行った。ゲノム編集技術を活用したエンハンサートラップシステムやRNA干渉法などを用いて、幼虫(若虫)期を通じた遺伝子の発現動態や、機能を明らかにした。翅形成に関わる遺伝子について、翅の形態形成における細胞増殖制御への関与を示唆する結果が得られた。また、コオロギにおける変態の制御機構の特徴を明らかにし、不完全変態昆虫の幼虫期における蛹に相当する時期に関する仮説の提唱に至った。さらに、ゲノム編集を基盤とした新たな遺伝子改変技術をコオロギに導入することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

(1) 不完全変態昆虫の発生を制御するゲノム機能に関する新しい知見が得られる。不完全変態昆虫の後胚発生メカニズムとその進化に関する知見が得られる。さらに、コオロギに近縁なバツタをはじめとする害虫種の発生過程の理解につながり、防除研究への応用が期待される。

(2) 非モデル昆虫にも応用可能なゲノム操作の新しい技術基盤が確立される。昆虫ゲノムの構造・機能・進化を究明する新しい研究分野の発展につながる。

研究成果の概要(英文)：We analyzed expression and function of genes regulating postembryonic development in *Gryllus bimaculatus*, a hemimetabolous insect model system. Using genome-editing based enhancer trap system and an RNAi method, gene expression dynamics through nymphal stages and gene functions have been revealed. Especially, involvement of a wing development gene in regulation of cell proliferation during wing morphogenesis. In addition, we found features of regulatory mechanisms for metamorphosis in the cricket and proposed a hypothesis on a specific nymphal stage corresponding to the pupal stage in holometabolous insects based on the results of this study. Furthermore, we successfully introduced additional genome-editing based technologies into the cricket system.

研究分野：昆虫科学, 発生生物学

キーワード：昆虫発生 ゲノム編集 後胚発生 形態形成

1. 研究開始当初の背景

不完全変態昆虫では、完全変態類と異なり胚発生期に成虫ボディプランの基本型が生成される。胚発生初期から中期に体節のパターン形成が行われる点は完全変態類と共通しているが、後期には不完全変態類に特徴的な成虫のミニチュア型の幼虫(若虫)形態が形成される。翅や生殖器など、成虫を特徴づける器官は後胚期(幼虫期)に出現し、段階的に成長し形作られる。完全変態型の発生様式は進化的には新しく、昆虫の発生、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後胚発生メカニズムの解明は不可欠である。

2. 研究の目的

不完全変態昆虫の成虫形態を生み出す後胚発生メカニズムの解明という困難な課題に、技術と情報の基盤が整いつつあるフタホシコオロギをモデルシステムとして用いることでアプローチ可能であるとの着想に至った。

したがって本研究では、フタホシコオロギで開発されたゲノム改変技術を応用し、幼虫における遺伝子発現・機能を高い精度で解析することにより、不完全変態型の後胚発生メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

コオロギの成虫器官の形成メカニズムと幼若・脱皮ホルモンによる制御機構の解明を目的とし、以下の研究を行なった。

(1) 後胚発生に関わる遺伝子の時間空間的発現パターンの解明: ゲノム編集技術を用いた遺伝子ノックインによるエンハンサートラップ系統の作出により、発生過程を通じた遺伝子発現パターンの解析を行なった。

(2) 器官形成や脱皮・変態に関わる遺伝子機能の解明: ゲノム編集技術や RNAi 法による遺伝子機能解析を行なった。

(3) ゲノム情報の整備と遺伝子改変技術の開発: 現有のフタホシコオロギのドラフトゲノム配列について、配列の精度を高めるために PacBio ロングリードのデータの追加によるギャップクローズを行なった。得られた配列情報を、ゲノム編集の標的配列デザインに使用した。一方、コオロギにおける発生研究をさらに発展させるため、ゲノム編集技術をベースに新たな遺伝子改変技術の開発を行なった。

4. 研究成果

(1) 後胚発生に関わる遺伝子の時間空間的発現パターンの解明

ショウジョウバエの翅形成に関わる遺伝子のコオロギホモログについて、エンハンサートラップ系統の作成を行なった。遺伝子の上流約 1kb の領域に CRISPR/Cas9 によるゲノム編集の標的部位を設定し、非相同末端結合による GFP の発現カセットのノックインを試みた。インジェクション当代で、GFP ノックインによる蛍光を発する個体が複数得られ、それらを成虫まで育てて次世代を得た。次世代で GFP 遺伝子の伝搬が確認され、ノックイン系統を樹立した。次世代以降 GFP ノックインのホモ接合体として系統を維持し、発現解析に用いた。当該系統の個体では、標的遺伝子のエンハンサートラップによると考えられる特異的な GFP 発現が観察され、*in situ* ハイブリダイゼーションの結果と比較したところ内在の遺伝子発現と一致することが確認された。得られたエンハンサートラップ系統を用いて、発生過程を通じた遺伝子発現パターンが明らかになった。特に、翅芽(翅原基)での発現パターンを継時的に解析することに成功し(図1)、*scalloped* 遺伝子が翅形成時に原基周縁部での特異的な発現とその動態が明らかになった。

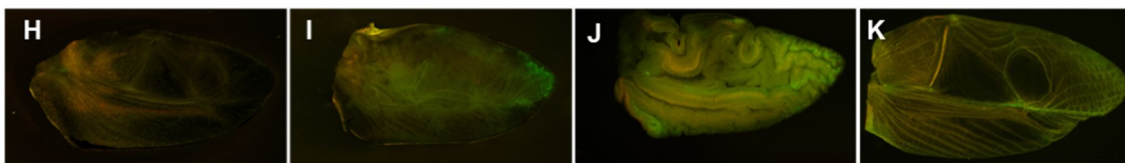


図1 コオロギ翅芽におけるエンハンサートラップによる GFP 発現の変化

(2) 器官形成や脱皮・変態に関わる遺伝子機能の解明

コオロギ翅形成に関与する遺伝子について機能解析を行なった。胚発生期に遺伝子機能が阻害されると致死になるケースがあったため、翅形成に関わる時期の機能解析には幼虫への二本鎖 RNA の導入による RNAi 法を選択した。*scalloped* 遺伝子について、エンハンサートラップで示された翅芽周縁部での発現と対応し、翅の周縁部が欠損する表現型が得られた(図2)。本遺伝子が、翅芽周縁部での細胞増殖に関与する可能性が示唆された(論文投稿準備中)。

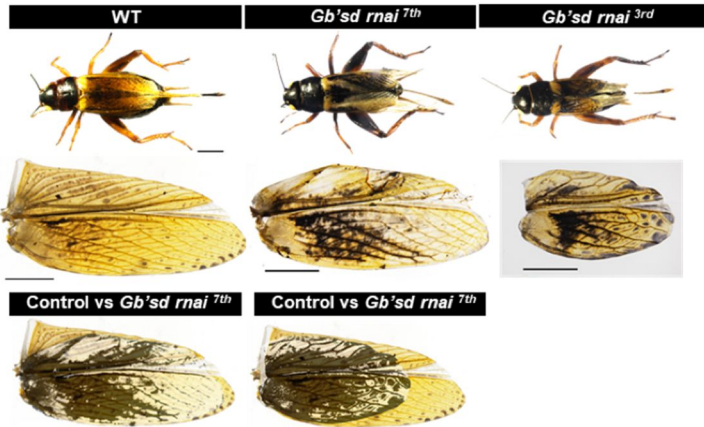


図 2 翅形成遺伝子の機能解析

一方、脱皮・変態に関わる遺伝子の機能解析を行なった。完全変態昆虫では、エクダイソンの初期誘導遺伝子である *Broad* (蛹化誘導因子) と *E93* (成虫化決定因子) および幼若ホルモンのシグナル伝達の鍵遺伝子である *Kr-h1* (変態抑制因子) が相互作用することで劇的な変態 (蛹化、羽化) が正常に制御されている。近年、完全変態類の各遺伝子オースログが一部の不完全変態昆虫の変態制御にも関与することが報告されたが、異なる昆虫種間でその分子メカニズムがどの程度保存されているかは未だ不明である。フタホシココロギは、孵化後に7回の幼虫脱皮を行い、8齢 (終齢) 幼虫になった後に成虫へと変態する。*Kr-h1* と *Broad* は6齢幼虫で発現量のピーク値を示した後、7齢 (終前齢) で減少することが示された。各遺伝子の RNAi 実験を5齢幼虫で行った結果、本来8齢から成虫に変態するはずの幼虫が6齢で早熟変態を引き起こし、体サイズも矮小化された。一方、*E93* は7齢で発現ピークを迎えることが明らかになった。本遺伝子の RNAi を行うと、成虫への変態が抑制され幼虫の過剰脱皮を繰り返して巨大化した。さらに、RNAi 個体を用いて各遺伝子の発現を解析した結果、*Kr-h1* または *Broad* の RNAi により6齢幼虫で *E93* 発現が早期誘導され、逆に、7齢における *Kr-h1* と *Broad* の発現低下が *E93* RNAi により抑制された。従って、*Kr-h1* と *Broad* が *E93* 発現を抑制することで6齢幼虫から終前齢-終齢幼虫へと正常に脱皮した後、*E93* が *Kr-h1* と *Broad* を抑制すると成虫変態に至ることが示された (図3)。本研究により、この抑制的な相互機能は完全変態と不完全変態昆虫で普遍的なメカニズムであることが示唆された。不完全変態昆虫の幼虫期で蛹に相当する時期が存在し、それは終前齢-終齢幼虫期である新たな仮説をコオロギで提唱した。

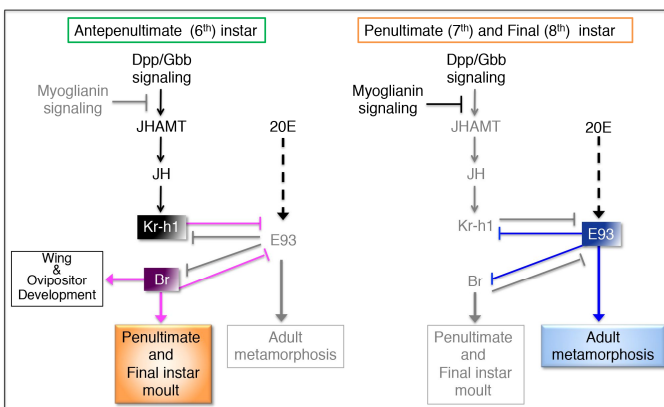


図 3 コオロギの成虫変態を制御するメカニズム

(3) ゲノム情報の整備と遺伝子改変技術の開発

Illumina ショートリードによるゲノムアセンブリに対し、PacBio ロングリードによるギャップクローリングを行なった。コンティグのギャップが減少し (N の数が約 60% 減少) ゲノム配列の精度が向上した。

一方、ゲノム編集技術をベースに新たな遺伝子改変技術の開発をすすめるため、一本鎖オリゴを用いた His タグ導入や大規模欠損の導入が可能であることを示す結果を得た。また、マイクロホモロジー依存的な遺伝子ノックインについても導入に成功し (図4)、発生研究に利用可能な解析ツールの幅が広がった。

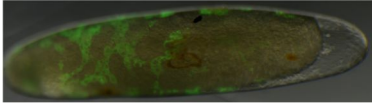


図4 マイクロホモロジー依存的ノックインによるアクチン遺伝子座への GFP 遺伝子導入（融合タンパク質として発現；胞胚期）

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ishimaru Y, Bando T, Ohuchi H, Noji S, Mito T.	4. 巻 60
2. 論文標題 Bone morphogenetic protein signaling in distal patterning and intercalation during leg regeneration of the cricket, <i>Gryllus bimaculatus</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Dev Growth Differ.	6. 最初と最後の頁 377-386
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12560	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Bando T, Mito T, Hamada Y, Ishimaru Y, Noji S, Ohuchi H.	4. 巻 62
2. 論文標題 Molecular mechanisms of limb regeneration: insights from regenerating legs of the cricket <i>Gryllus bimaculatus</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Dev Biol.	6. 最初と最後の頁 559-569
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1387/ijdb.180048ho	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishimaru Yoshiyasu, Tomonari Sayuri, Watanabe Takahito, Noji Sumihare, Mito Taro	4. 巻 374
2. 論文標題 Regulatory mechanisms underlying the specification of the pupal-homologous stage in a hemimetabolous insect	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences	6. 最初と最後の頁 20190225
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1098/rstb.2019.0225	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 石丸善康, 野地澄晴, 三戸太郎	4. 巻 54
2. 論文標題 昆虫変態の分子機構：コオロギの研究から	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 昆虫と自然	6. 最初と最後の頁 38-41
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yu-ki Nakamura, Ko-hei Kawamoto, Sayuri Tomonari, Takahito Watanabe, Yoshiyasu Ishimaru, Sumihare Noji, Taro Mito
2. 発表標題 Gene knock-out analysis of a segmentation gene even-skipped in the cricket <i>Gryllus bimaculatus</i>
3. 学会等名 第51回日本発生生物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三戸太郎
2. 発表標題 フタホシコオロギを用いた研究におけるゲノム編集技術の活用
3. 学会等名 第63回日本応用動物昆虫学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下貴久, 松田まゆこ, 川本晃平, 渡邊崇人, 友成さゆり, 石丸善康, 野地濟晴, 三戸太郎
2. 発表標題 Generation of an enhancer-trap strain of the scalloped gene in the cricket <i>Gryllus bimaculatus</i>
3. 学会等名 第89回日本動物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 友成さゆり, 中村雄軌, 川本晃平, 渡邊崇人, 石丸善康, 野地澄晴, 三戸太郎
2. 発表標題 フタホシコオロギの体節形成に関わる遺伝子の発現と機能の解析
3. 学会等名 第89回日本動物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川本晃平, 松田まゆこ, 山下貴久, 渡邊崇人, 友成さゆり, 石丸善康, 野地澄晴, 三戸太郎
2. 発表標題 Precise in-frame integration of a GFP gene using microhomology-mediated knock-in technology in <i>Gryllus bimaculatus</i>
3. 学会等名 第89回日本動物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 遺伝子ノックイン技術の応用によるレポーターコオロギ系統の作製
3. 学会等名 第88回日本動物学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Matsuda Mayuko, Matsuoka Yuji, Yoshiyasu Ishimaru, Sayuri Tomonari, Takahito Watanabe, Sumihare Noji and Taro Mito
2. 発表標題 Functional analysis of a Hox gene, abdominal-A, in the cricket <i>Gryllus bimaculatus</i> using a CRISPR/Cas9-mediated gene knock-in system
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nakamura Yu-Ki, Kawamoto Kohei, Sayuri Tomonari, Matsuda Mayuko, Takahito Watanabe, Yoshiyasu Ishimaru, Uemura Natsuki, Sumihare Noji and Taro Mito
2. 発表標題 even-skipped is required for segmentation and elongation of embryos in the cricket <i>Gryllus bimaculatus</i> revealed by CRISPR/Cas9-based gene knock-out
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kohei Kawamoto, Mayuko Matsuda, Takahisa Yamashita, Takahito Watanabe, Sayuri Tomonari, Yoshiyasu Ishimaru, Sumihare Noji, Taro Mito,
2. 発表標題 Precise in-frame integration of a GFP gene using microhomology-mediated knock-in technology in <i>Gryllus bimaculatus</i>
3. 学会等名 52nd Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahisa Yamashita, Taro Mito, Yoshiyasu Ishimaru, Takahito Watanabe, Sayuri Tomonari, Kohei Kawamoto, Mayuko Matsuda
2. 発表標題 Generation of an enhancer-trap strain of the scalloped gene in the cricket <i>Gryllus bimaculatus</i>
3. 学会等名 52nd Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuki Nakamura, Sayuri Tomonari, Kohei Kawamoto, Takahito Watanabe, Yoshiyasu Ishimaru, Sumihare Noji, Taro Mito
2. 発表標題 Resolving the correlation between phenotype and genotype in a segmentation gene even-skipped in the cricket <i>Gryllus bimaculatus</i>
3. 学会等名 52nd Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takuya Watari, Yoshiyasu Ishimaru, Sumihare Noji, Taro Mito
2. 発表標題 Involvement of macrophages in leg regeneration of the cricket <i>Gryllus bimaculatus</i>
3. 学会等名 52nd Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大出高弘, 三戸太郎, 新美輝幸
2. 発表標題 フタホシコオロギの翅発生から探る翅の進化的起源
3. 学会等名 第90回日本動物学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 日本動物学会編, Cooper, M.D., 上田恵介, 角井敬知, 藍 浩 之, 上野秀一, 陰山大輔, 阿形清和, 内田勝久, 笠原正典, 秋元信一, 内田清薫, 柁 原 宏, 浅岡美穂, 浦野明央, 粕谷英一, 浅 島 誠, 占部城太郎, 片倉晴雄, 浅見崇比呂, 三戸太郎, 他著者289名	4. 発行年 2019年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 770
3. 書名 動物学の百科事典	

1. 著者名 Watanabe T. Noji S. Mito T (Hatada I ed.)	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 256
3. 書名 Genome Editing in Animals	

1. 著者名 Hadley Wilson Horch, Taro Mito, Aleksandar Popadic, Hideyo Ohuchi, Sumihare Noji eds.	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Springer Japan	5. 総ページ数 376
3. 書名 The Cricket as a Model Organism	

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 遺伝子改変不完全変態昆虫の作製方法	発明者 三戸太郎, 渡辺崇人	権利者 徳島大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-196367, 特開2019-068762	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 コオロギ育成装置及びコオロギ育成方法	発明者 渡辺崇人, 三戸太郎	権利者 徳島大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-019352	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	友成 さゆり (TOMONARI Sayuri) (40448345)	徳島大学・技術支援部常三島技術部門・技術専門職員 (16101)	
研究 分担者	石丸 善康 (ISHIMARU Yoshiyasu) (50435525)	徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(生物資源産業学 域)・助教 (16101)	