

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 4 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19213

研究課題名（和文）光遺伝学を利用して昆虫後胚期形態形成機構を理解する

研究課題名（英文）Optogenetics-based approach for understanding postembryonic development in insects

研究代表者

大出 高弘（Ohde, Takahiro）

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：60742111

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、不完全変態発生モデルであるフタホシコオロギにおける光遺伝学による遺伝子発現操作技術の開発を主たる目的とした。当初外来遺伝子カセットの導入にあたって技術的問題に直面したが、改良型のトランスポゾン転移酵素を用いた遺伝子組換え技術をフタホシコオロギに適用することで、導入効率を従来の報告より最大6倍程度に上昇させることに成功した。この技術を用いて光遺伝学的制御に必要なフタホシコオロギ系統の作出に成功し、照射による遺伝子発現操作を試みた。結果的に発現を検出するには至らず、今後さらなる外来遺伝子カセットの改善が必要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来多くの昆虫における遺伝子組換え効率は非常に低く、実用性が低かった。本研究は、不完全変態昆虫個体において改良型のトランスポゾン転移酵素を用いた遺伝子組換えが非常に高い効率で生じることを初めて示した。また、非モデル昆虫における光遺伝学技術の利用に挑戦し、課題とその解決策を明らかにできた。今後これらの技術を用いることで、モデル生物に限らず、多様な昆虫種における学術および応用の進展が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, I aimed to develop an optogenetical system for manipulating spatiotemporal gene expression in the hemimetabolous insect model, the two-spotted cricket *Gryllus bimaculatus*. I had a technical issue for introducing exogenous gene cassettes to *Gryllus* genome, but successfully overcome it by applying an improved transposase for transgenesis. This technique increased germ transformation efficiency up to 6-fold than that in a previous report. I could successfully generate cricket strains that are needed for testing optogenetics in *Gryllus*, and attempted to induce exogenous gene expression. It has so far not succeeded to detect the signal, and results suggest that further optimization of exogenous gene cassette will improve this system.

研究分野：進化発生学

キーワード：光遺伝学 後胚発生 遺伝子組換え 昆虫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

昆虫は脱皮のプロセスを経て変形する能力を有する。この能力は、地球上最も種数の多い動物である昆虫の多様な形態進化の鍵となるものであるが、脱皮に伴った局所的な形態改変を制御する分子機構についてはほとんど理解が進んでいない。その原因の一端は、従来モデル昆虫となってきたキロショウジョウバエやカイコは、幼虫、蛹、成虫と全身的に大幅な形態改変を伴う完全変態昆虫であるため、脱皮ごとの形態改変について、細胞を追跡して解析することが困難だったことにある。不完全変態昆虫であるフタホシコオロギは、孵化した時点で基本的な解剖学的パーツが形成されており、翅に代表されるように、ある部位のみが孵化後(後胚期)に著しい成長・分化を示すため、脱皮ごとの形態改変機構の理解にあたり適したモデルである。

しかし一方で、コオロギを含めた非モデル昆虫において現状利用可能な技術では、時空間的な遺伝子機能を詳細に解析することは困難である。このことは、局所的な形態改変の分子機構を理解する上で大きな制約となっている。近年、青色光照射により構造変化するタンパク質を利用した光遺伝学的方法を利用して転写を制御する技術が、ショウジョウバエやゼブラフィッシュで実用化されている(図)。この方法は、従来非モデル生物の時期・組織特異的遺伝子機能解析の障壁となっていた、転写調節に関わる内在性 DNA エレメントの探索を必要とせず、外部刺激により高い精度で時期・組織特異的に遺伝子発現を制御することが可能である。体の深部で成虫器官の発生が進行する完全変態昆虫と異なり、体の表層でその発生が進行する不完全変態昆虫は、外部からの光刺激による遺伝子発現操作技術との親和性も高いことから、フタホシコオロギをモデルとした光遺伝学技術の発展性が期待された。

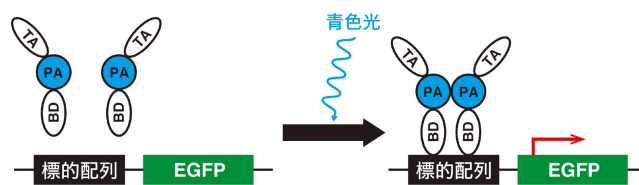


図 青色光依存性な転写制御

BD: DNA結合ドメイン, PA: 青色光応答性ドメイン, TA: 転写活性化ドメイン, EGFP: 緑色蛍光タンパク質

2. 研究の目的

本研究では、(1)フタホシコオロギにおいて光遺伝学による遺伝子発現の時期・組織特異的人工制御法を確立し、(2)後胚期の遺伝子、特に局所的な機能の理解が進んでいない脱皮ホルモンシグナリング関連遺伝子群を標的として、人為的に転写を促進/抑制することで昆虫の局所的な改変を制御する分子発生の理解を目指した。

3. 研究の方法

- (1) ゲノム編集を利用した光遺伝学的操作に必要なフタホシコオロギ系統の作出
- (2) 遺伝子組換えを利用した光遺伝学的操作に必要なフタホシコオロギ系統の作出
- (3) 青色光照射による遺伝子発現誘導

4. 研究成果

(1) フタホシコオロギにおける高効率遺伝子組換え法の適用

フタホシコオロギで光遺伝学による遺伝子発現操作を実現するにあたり、GAVPO/GAVTA タンパク質が青色光依存的にホモ二量体を形成し、標的 DNA 配列である UAS に結合し、緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現するというシステムを構築するため、標的となる UAS-GFP カセットのコオロギゲノムへの導入を目指した。生物ゲノムへの外来遺伝子導入法を大別して、ゲノム編集による方法とトランスポゾンによる方法がある。ゲノム編集を利用した場合、ガイド RNA によりゲノムの特定の領域を標的として DNA 切断をおこし、そこに外来遺伝子を導入することができる一方で、トランスポゾンによる方法はゲノムのほぼランダムな場所に導入される。

まず、ゲノム編集法を利用して、Yellow タンパク質のコーディング配列を標的とした UAS-GFP カセットの導入を試みた。Yellow タンパク質は黒色のメラニン合成に関与する。孵化後のフタホシコオロギは体表のクチクラに黒色メラニンが蓄積することで光透過性が著しく低くなり、外部からの光刺激による遺伝子発現操作や、蛍光タンパク質シグナルの観察が困難である。本研究では Yellow タンパク質のノックアウトと UAS-GFP カセットのノックインを同時に行うことで、黒色着色の阻害と光遺伝学的手法の確立という「一石二鳥」を試みた。複数の yellow 遺伝子座を標的とするガイド RNA を試した結果、yellow 遺伝子のノックアウトには成功したものの、結果的に UAS-GFP のノックインは生じなかった。

そこで、異なる原理に基づく外来遺伝子導入法であるトランスポゾンによる方法を用いて UAS-GFP カセットの導入を試みた。従来 piggyBac トランスポゾンシステムを利用した昆虫ゲノムへの外来遺伝子導入の成功率は高くても 15%程度であった。これに関して、アメリカのグループは改良型の piggyBac トランスポゾン転移酵素である hyPBBase を開発し、従来型と比較して 10-15 倍もの効率上昇を報告している (Yusa et al., 2012)。そこで本研究ではこの hyPBBase を用いて

UAS-GFP カセットの導入を行ったところ、35%程度の効率で遺伝子組換えコオロギを作出することに成功した（大出、未発表）。完全変態昆虫については hyPBase を用いた高効率での遺伝子組換え体の作出がすでに報告されているが（Eckermann et al., 2017）、不完全変態昆虫での適用は本研究が初めてである。昆虫個体での遺伝子組換え体の作出は低い成功率が障壁となってきたが、今後幅広い系統分類群での遺伝子組換え技術の活用が期待される。

（2）フタホシコオロギにおける光刺激による遺伝子発現操作の試み

（1）で作製した UAS-GFP ホモ接合フタホシコオロギ系統から採卵し、GAVPO/GAVTA タンパク質をコードする mRNA を初期胚に注射した後、青色光を照射して遺伝子発現の誘導を試みた。LED ライト、蛍光実体顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡といった複数の方法により光照射を行い、照射時間も 1 分から 1 時間まで試みたものの、照射後の細胞から GFP の発現は検出できなかった。（1）の遺伝子組換え法について、ゲノムに導入された外来遺伝子の発現レベルは挿入されたゲノム領域に大きく依存することが見いだされている（大出、未発表）。本研究で光刺激依存性の GFP 発現が検出できなかった理由として、UAS-GFP が挿入された領域に原因がある可能性が挙げられる。また、今回使用した UAS-GFP カセットの発現を制御するプロモーターにはキイロショウジョウバエゲノム由来の配列を流用しており、フタホシコオロギ用に最適化されていない。従って、UAS-GFP カセットの配列を最適化した後に、異なるゲノム領域にこのカセットが導入された遺伝子組換え体を複数作出して試験することで、挿入された遺伝子の発現レベルが改善される可能性がある。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Takahiro Ohde, Toshinori Minemura, Eiichi Hirose, Takaaki Daimon	4. 巻 164
2. 論文標題 Egg Microinjection and Efficient Mating for Genome Editing in the Firebrat <i>Thermobia domestica</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 e61885
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3791/61885	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takahiro Ohde, Taro Mito, Teruyuki Niimi
2. 発表標題 A hemimetabolous wing development implicates an essential step for novel insect wing evolution
3. 学会等名 MBSJ2020（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松山涼・大出高弘
2. 発表標題 フタホシコオロギの触角場形成に関するホメオボックス遺伝子の発見
3. 学会等名 第65回日本応用動物昆虫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大出高弘・大門高明
2. 発表標題 hyPBaseを用いた高効率での遺伝子組換えコオロギの作出
3. 学会等名 第65回日本応用動物昆虫学会
4. 発表年 2021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 日本動物学会第90回大阪大会
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 有翅昆虫と無翅昆虫の発生比較から探る翅の進化的起源
3. 学会等名 第20回日本進化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takahiro Ohde, Taro Mito, Teruyuki Niimi
2. 発表標題 On the evolutionary origin of insect wings: insights from basal insects
3. 学会等名 The 46th Naito Conference "Mechanisms of Evolution and Biodiversity" (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大出高弘
2. 発表標題 無変態昆虫マダラシミにおけるゲノム編集の現状
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

〔図書〕 計1件

1. 著者名 大出高弘・新美輝幸（分担執筆）	4. 発行年 2020年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 772
3. 書名 動物の事典（「昆虫の上陸と翅の進化」の項を分担執筆）	

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------