

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23687033

研究課題名(和文) 不完全変態昆虫(コオロギ)の胚形成における位置情報の形成と細胞移動のメカニズム

研究課題名(英文) Mechanisms for generating positional information and cell movements during early embryogenesis in the hemimetabolous insect (a cricket)

研究代表者

三戸 太郎(MITO, TARO)

徳島大学・ソシオテクノサイエンス研究部・助教

研究者番号：80322254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,800,000円、(間接経費) 5,340,000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コオロギの初期胚発生メカニズムの解析を行った。細胞動態を可視化するためにGFP発現システムを用い、Wnt、BMP等の主要な細胞シグナル経路に関わる因子のRNAi解析を行った。その結果、Wntが予定胚原基細胞の移動方向の制御に、BMPが背側から腹側への細胞移動に、それぞれ必要なことが明らかとなった。また、これらのシグナルがotd等のパターン形成遺伝子の発現制御に関与していることも示された。一方、新規のゲノム改変技術の開発を進め、遺伝子ノックアウトとノックインのシステムをほぼ確立することができ、ゲノム解読の進展と合わせて今後のさらに多様な研究の展開が可能となった。

研究成果の概要(英文)：We studied mechanisms of early embryogenesis in a cricket, a model system of hemimetabolous insects. We performed RNAi analyses for components of signaling pathways, such as Wnt and BMP pathways, using GFP-expressing transgenic embryos for visualizing cellular dynamics. We found that Wnt signaling is involved in regulation of direction of movements of presumptive embryonic cells, and that BMP signaling is required for cell migration from the dorsal side towards the ventral side. We also showed that these cell signalings are involved in regulation of expression of pattern formation genes, such as otd. On the other hand, we developed gene knock-out and knock-in techniques using genome editing technologies in the cricket. In addition to progress of whole genome sequencing, these techniques provides us strong tools for further studies based on various strategies.

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：胚発生 昆虫 細胞移動 位置情報

1. 研究開始当初の背景

(1) 昆虫発生システムの進化を理解する上では、完全変態型より原始的とされる不完全変態型の発生メカニズムの解明が不可欠である。

(2) コオロギは不完全変態類を代表する発生のモデル昆虫である。

(3) 研究代表者らは、コオロギで RNAi やトランスジェニック技術を開発し、さらにゲノム編集技術の導入も進めている。

(4) コオロギで利用可能な実験技術やゲノム情報などにより、不完全変態類昆虫の胚発生メカニズムの解明に迫ることが期待できる。

2. 研究の目的

(1) 胞胚期までに形成される位置情報の分子実体と形成機構を解明する。

(2) 位置情報に応じた予定胚体細胞の移動の制御機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) 位置情報関連遺伝子の候補について、RNAi 等による機能解析を行う。

(2) UAS/GAL4 システムを構築し、位置情報因子の候補の異所性発現実験を行う。

(3) ゲノム編集の応用によりコオロギにおける新規のゲノム改変技術を確認し、位置情報因子の機能や発現動態の解析を行う。

(4) フタホシコオロギのゲノム解読を進め上記研究に役立てる。

4. 研究成果

(1) 細胞間シグナルの胚形成関与の解析

主要なシグナル経路である Notch, Wnt, BMP シグナル経路等に関わる因子の働きを RNAi により解析した。Notch シグナルは、胚原基形成以降の後部伸長に必要なことが示唆された。Wnt と BMP シグナルについては、GFP 発現トランスジェニックコオロギを用いた RNAi 胚のライブイメージングにより、次の知見が得られた：

Wnt シグナルは予定胚原基細胞の移動方向の制御に、BMP シグナルが背側から腹側への細胞移動に、それぞれ必要なことが明らかとなった。また、これらのシグナルが *otd* や *caudal* などのパターン形成遺伝子の発現制御に関与していることも示された。

上記の結果から、初期の Wnt, BMP シグナルの働きで胚原基形成のための細胞移動が制御され、*Otd* や *Caudal* が胚の特定の位置での発現をもたらすことが示唆された。さらに下流のギャップ遺伝子の発現を誘導することで胚の領域特異化が起こると考えられる。一方、ショウジョウバエのギャップ遺伝子 *giant* や *knirps* のオースログをトランスクリプトームのデータより見だし、発現解析からこれらが胚原基形成後の後部領域のパターン形成に関与することを示唆する結果を

得た。Wnt, BMP シグナルの初期胚の細胞移動への関与については他の昆虫で報告がなく、昆虫発生の新しいメカニズムの一端を明らかにすることができた。

(2) ゲノム改変技術の開発

異所性発現系については UAS/GAL4 のシステムの構築には至らなかったが、人工制限酵素 ZFN に加えて新たに TALEN を用いた遺伝子ノックアウトの系を確立することに成功した。これによりターゲット配列の幅が格段に広がり、異所性発現実験を含めた様々な応用の可能性が広がった。

さらに、より新しいゲノム編集法である CRISPR/Cas システムによるコオロギゲノムへの標的特異的変異導入に成功し、しかも、本方法によって ZFN/TALEN よりも顕著に高い効率で変異導入が可能なることを示す結果を得た。

本 CRISPR/Cas システムの応用による遺伝子ノックインの系の構築を試みた。相同組換えによるノックインでは結果が得られなかったが、非相同組換えに依存した新しいノックインシステムを試したところ、インジェクション当代において標的特異的な配列導入が確認された。次世代へ受け継がれる効率の検証など系の効率化に向けた研究を続けており、今後のノックインによる異所性発現実験や発現レポーターシステムの構築に向け大きく前進した。

(3) ゲノム解読

コオロギゲノム解読について、新学術領域研究・ゲノム支援の支援課題としてシーケンシング情報解析の技術支援を受けたことにより、難航していたアセンブリの状況が大幅に改善された。スキヤフォールド N50 が 5Mb を越え、高品質なドラフトゲノム配列を得ることができ、本研究における遺伝子構造予測やゲノム編集の標的デザインに役立てることができた。当該ゲノム配列については、継続して共同研究者らとアノテーションを進めている。

今後の展望：

本研究を通じて、主要なシグナル経路である Notch, Wnt, BMP シグナル経路のコオロギ胚形成における役割が明らかになった。新規のゲノム改変技術の開発に時間を要したためそれを用いた位置情報因子の解析には至らなかったものの、トランスジェニックの系統を用いて細胞動態への影響を明らかにすることができた。最終的にはゲノム改変技術の開発に関して特筆すべき成果が得られた。遺伝子ノックアウト、ノックインとも不完全変態類の昆虫では他に成功例はなく、今後コオロギのシステムを用いた研究が、昆虫胚形成メカニズムのさらに深い理解につながると期待できる。

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 13 件)

1. Watanabe T, Noji S, *Mito I(*corresponding author). (2014) Gene knockout by targeted mutagenesis in a hemimetabolous insect, the two-spotted cricket *Gryllus bimaculatus*, using TALENs. *Methods*, in press. 査読有り.
2. 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.
3. Matsumoto CS, Shidara H, Matsuda K, Nakamura T, Mito I, Matsumoto Y, Oka K, Ogawa H. (2013) Targeted gene delivery in the cricket brain, using *in vivo* electroporation. *J Insect Physiol.* Oct;59(12):1235-1241. 査読有り.
4. Zeng V, Ewen-Campen B, Horch HW, Roth S, Mito I, Extavour CG. (2013) Developmental gene discovery in a hemimetabolous insect: de novo assembly and annotation of a transcriptome for the cricket *Gryllus bimaculatus*. *PLoS ONE* May;8(5):e61479. 査読有り.
5. 渡辺崇人, 三戸太郎, 野地澄晴 (2013) ZFN/TALEN を用いたコオロギの遺伝子ノックアウト, 細胞工学 Apr.;32(5): 543-549. 査読無し.
6. Bando T, Ishimaru Y, Kida T, Hamada Y, Matsuoka Y, Nakamura T, Ohuchi H, Noji S, *Mito I(*corresponding author). (2013) Analysis of RNA-Seq data reveals involvement of JAK/STAT signalling during leg regeneration in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Development.* Mar;140(5): 959-964. 査読有り.
7. Watanabe T, Ochiai H, Sakuma T, Horch HW, Hamaguchi N, Nakamura T, Bando T, Ohuchi H, Yamamoto T, Noji S, *Mito I(*corresponding author). (2012) Non-transgenic genome modifications in a hemimetabolous insect using zinc-finger and TAL effector nucleases. *Nature Communications* Aug;3:1017-1025. 査読有り.
8. Takagi A, Kurita K, Terasawa T, Nakamura T, Bando T, Moriyama Y, Mito I, Noji S, Ohuchi H. (2012) Functional analysis of the role of eyes absent and sine oculis in the developing eye of the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Dev Growth Differ.* Feb;54:227-240. 査読有り.
9. *Mito I (*corresponding author), Shinmyo Y, Kurita K, Nakamura T, Ohuchi H, Noji S. (2011) Ancestral functions of Delta/Notch signaling in the formation of body and leg segments in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Development*; Sep;138:3823-3833. 査読有り.
10. Dabour N, Bando T, Nakamura T, Miyawaki K, Mito I, Ohuchi H, Noji S. (2011) Cricket body size is altered by systemic RNAi against insulin signaling components and epidermal growth factor receptor. *Dev Growth Differ.* Sep;53: 857-869. 査読有り.

[学会発表](計 44 件)

1. Taro Mito et al.: Genome modification technology in the cricket *Gryllus bimaculatus* using a CRIPR/Cas system, 1st Asian Invertebrate Immunity Symposium, Feb.15, 2014, Pusan National University (Busan, Korea).
2. 三戸太郎 他: ゲノム編集技術によるノックアウトコオロギの作製, 第36回日本分子生物学会年会(ワークショップ; 分子生物・生命情報), 2013年12月4日, 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市).
3. Taro Mito et al.: *Gryllus bimaculatus* -a hemimetabolous insect model for functional genomics, *iBeetle symposium "New horizons in molecular Zoology"* Mar.25-26, 2013, Georg August University (Göttingen, Germany).
4. Taro Mito et al.: Genome modification in a hemimetabolous insect *Gryllus bimaculatus*, *Janelia Workshop on Genomic Modification in Model and Non-Model Insects*, Mar. 21-22, 2013, HHMI Janelia Farm Research Campus (Ashburn, USA).
5. Taro Mito et al.: Exploring mechanisms of embryonic patterning in *Gryllus bimaculatus*, a hemimetabolous insect model system, *24th International Congress of Entomology*, Aug.21, 2012, Hotel Inre-Burgo Exco (Daegu, Korea).
6. Taro Mito: Exploring molecular mechanisms of early embryogenesis in the cricket *Gryllus bimaculatus*, 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月16日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).
7. Taro Mito: Ancestral developmental mechanisms in insects revealed by RNAi analysis of cricket genes [Symposium]

osium: RNA interference- comparative studies of gene functions in invertebrates, 8th International Congress on Comparative Physiology and Biochemistry, 2011年6月1日, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市).

〔その他〕

新聞などでの報道

1. Nature ダイジェスト, 2014年3月25日, 18-21 ページ「ゲノム編集技術 CRISPR 法が世界を変える」.
2. 読売新聞, 2012年9月3日, 17 ページ「白いコオロギ, 体色黒くする遺伝子操作」.
3. 日経バイオテク ONLINE 2012年8月22日, 「ゲノム編集技術でコオロギの標的遺伝子破壊、徳島大と広島大が Nature 姉妹誌に発表」.
4. 朝日新聞, 2012年8月22日, 3 ページ「遺伝子操作 残らぬ痕跡」.
5. 中国新聞 Online 2012年8月22日「人工酵素でコオロギ突然変異」.

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