

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870415

研究課題名(和文)コンディショナルノックアウト技術を用いた不完全変態昆虫の翅形成メカニズムの解明

研究課題名(英文)Analysis of mechanisms of wing development in hemimetabolous insect using conditional knock-out method.

研究代表者

渡辺 崇人(Watanabe, Takahito)

徳島大学・農工商連携センター・特任助教

研究者番号：30709481

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：非相同末端結合によるノックインを試みた結果、フタホシコオロギにおいて初めてノックインに成功し、マーカー遺伝子をゲノムに組み込むことができた。現在コンディショナルノックアウト実現のためにpiggyBacのコンポーネントが組み込まれたノックインベクターを作製し、コオロギゲノムへ導入している。また、次世代シーケンサーのPacBio RSIIを用いてゲノム解析を進めており、これまでに約5Gbのシーケンズデータが得られ、Gap closing解析を行っている。

研究成果の概要(英文)：We attempted to establish the knock-in experiment mediated non-homologous end joining repair pathway in the two spotted cricket. As a result, for the first time in the cricket, we succeeded to generate some knock-in lines inserted the expression cassette of marker gene. For conditional knock-out experiment, we constructed the knock-in vector containing component of piggybac system, and introduce into cricket genome. Furthermore, genome sequence analysis was performed by next generation sequencer PacBio RSII. We obtained about 5Gb data as long read sequence, and assemble to cricket genome sequence for Gap-closing analysis.

研究分野：分子生物学

キーワード：ゲノム編集 ノックイン ノックアウト

1. 研究開始当初の背景

- (1) フタホシコオロギは不完全変態昆虫のモデル種である。
- (2) RNAi 実験やトランスジェニック系統作製が可能である。
- (3) ZFN/TALEN を用いて標的遺伝子特異的な遺伝子破壊が可能である。
- (4) CRISPR/Cas9 システムにより、より簡便に遺伝子破壊が可能となっている。
- (5) コンディショナルノックアウト技術は確立されておらず、胚発生後の遺伝子機能解析ができない。

2. 研究の目的

昆虫の発生には、胚発生だけでなく孵化後の幼虫期での発生・成長過程も大きな役割を担っている。特に、翅や生殖器などは幼虫の成長に伴って発生・成熟する。完全変態昆虫と不完全変態昆虫では発生様式が異なり、後者の発生メカニズムの解明は昆虫発生システムの理解に必須である。不完全変態昆虫では、成虫の器官は幼虫の器官が成長して形作られる。その中で、翅の構造は終齢幼虫もしくはその前齢幼虫から新たに形成が始まり、小さな翅様の突起物として観察され、最終的に脱皮を経て完全な成虫の翅が形成される。不完全変態昆虫における翅の形成過程においては、完全変態昆虫と異なる機構が存在すると考えられるが、そのような分子機構は明らかになっていない。本研究では、不完全変態類に属するフタホシコオロギを材料として、翅形成過程における分子メカニズムを解明することを目的とする。明らかにされつつあるゲノム解析の成果と新規ゲノム編集技術を利用することで、新たにコンディショナルノックアウト作製技術を開発し、翅形成過程における分子メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) CRISPR/Cas9 システムを用いたフタホシコオロギにおける標的遺伝子のコンディショナルノックアウト法を新たに確立する。
- (2) RNAi 解析や RNA-seq 解析により、翅形成に関わる候補遺伝子を絞り込む。
- (3) 現在進行中のゲノムプロジェクトを更に前進させ、コンディショナルノックアウト作製に必要な標的遺伝子のシス調節領域を明らかにする。
- (4) 候補遺伝子に対してコンディショナルノックアウトシステムを作製し、翅形成過程における分子基盤の理解を目指す。

4. 研究成果

フタホシコオロギではこれまでに

CRISPR/Cas9 システムを用いて、標的ゲノム領域へ特異的に変異を導入することに成功している。しかしながら、標的遺伝子を時間・空間特異的にノックアウトするためには、対応するシス調節領域を破壊する必要があるが、シス調節領域が巨大である場合やそもそもの特定が困難である場合が多く、単純な変異導入ではコンディショナルノックアウトシステムを作製することはできない。そこで、コンディショナルノックアウトシステムを作製するために、ゲノム中からシス調節領域を大きく抜き出す実験系の確立を試みた。標的遺伝子には actin 遺伝子を用いて、ショウジョウバエの報告を参考として実験を行ったところ、標的配列をゲノム上から抜き出すことに成功したものの、効率は大変低く実用性はなかった。そこで、新たにノックイン技術を応用したコンディショナルノックアウト法を考案した。ノックイン技術に関してはゼブラフィッシュの報告を参考とし、非相同末端結合によるノックインを試みた。条件検討の結果、フタホシコオロギにおいて初めて標的ゲノム中にドナーベクターをノックインすることに成功した。このノックイン技術を用いて、フタホシコオロギの Hox 遺伝子である abd-A, Ubx に GFP 遺伝子の発現カセットを組み込み、これらの遺伝子の発現をリアルタイムイメージングすることに成功した。現在、コンディショナルノックアウト法実現のために piggyBac のコンポーネントが組み込まれたノックインベクターを作製し、フタホシコオロギの標的遺伝子へ導入しているところである。

また、現在進行中のゲノム解析の結果を利用して発生に関わる遺伝子のシス調節領域の特定を試みた。しかしながら、フタホシコオロギの遺伝子は GC リッチな配列であることが多く、特にシス調節領域を含む転写開始点付近が GC リッチであり、Illumina 社の HiSeq を用いた解析では配列が明らかとなっていなかった。そこで、新たに long read で GC 含量に左右されずに解析が可能なシーケンサーである PacBio RSII を用いてゲノム解析を行った。解析には PacBio RSII のフローセル 5 個を用いた。その結果、それぞれのフローセルで約 1 Gb (平均 7.8kb, N50=16kb) のデータを取得することに成功した。現在、これまでのゲノム情報にマッピングし、Gap closing 解析を進めている。

今後は、コンディショナルノックアウト技術を確立し、発生の様々な stage に関わる遺伝子の機能解析を進めていく予定である。また、既に確立されたノックイン技術を用いて、マーカー遺伝子を標的遺伝子のゲノム領域に導入し、様々な遺

伝子の発現パターンを明らかとしていく。さらに、ゲノム解析の結果を活用し、発生に関わる遺伝子のシス調節領域を明らかとしていく。

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. Osakabe Y., Watanabe T., Sugano S.S., Ueta R., Ishihara R., Shinozaki K., Osakabe K. Optimization of CRISPR/Cas9 genome editing to modify abiotic stress responses in plants. **Sci Rep.** 6:26685. 2016. (査読有り) doi: 10.1038/srep26685.
2. Ishimaru Y., Tomonari S., Matsuoka Y., Watanabe T., Miyawaki K., Bando T., Tomioka K., Ohuchi H., Noji S., Mito T. TGF- β signaling in insects regulates metamorphosis via juvenile hormone biosynthesis. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 113(20):5634-5639. 2016. (査読有り) doi: 10.1073/pnas.1600612113.
3. Watanabe T., Noji S., Mito T., GeneKnockout by Targeted Mutagenesis in a Hemimetabolous Insect, the Two-Spotted Cricket *Gryllus bimaculatus*, using TALENs. **Methods in Molecular Biology**, pp143-155, 2016. (査読無し) doi: 10.1007/978-1-4939-2932-0_12.
4. Awata H., Watanabe T., Hamanaka Y., Mito T., Noji S., Mizunami M. Knockout crickets for the study of learning and memory: Dopamine receptor Dop1 mediates aversive but not appetitive reinforcement in crickets. **Sci Rep.** 5: 15885. 2015. (査読有り) doi: 10.1038/srep15885.
5. Matsuoka Y., Bando T., Watanabe T., Ishimaru Y., Noji S., Popadic A., Mito T. Short germ insects utilize both the ancestral and derived mode of Polycomb group-mediated epigenetic silencing of Hox genes. **Biol. Open**, 4(6): 702-709, 2015. (査読有り) doi: 10.1242/bio.201411064.
6. Yasue A., Mitsui S.N., Watanabe T., Sakuma T., Oyadomari S., Yamamoto T., Noji S., Mito T., Tanaka E. Highly efficient

targeted mutagenesis in one-cell mouse embryos mediated by the TALEN and CRISPR/Cas systems. **Sci Rep.** 4: 5705, 2014. (査読有り) doi: 10.1038/srep05705.

7. Watanabe T., Noji S., Mito T. Gene knockout by targeted mutagenesis in a hemimetabolous insect, the two-spotted cricket *Gryllus bimaculatus*, using TALENs. **Methods.** S1046-2023(14)00194-7. 2014. (査読有り) 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. 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**, pp149-158, 2014. (査読無し)

[学会発表](計5件)

1. Watanabe T., Matsuoka Y., Tomonari S., Kurita C., Noji S., Mito T. Genome editing in the two-spotted cricket, *Gryllus bimaculatus*, using CRISPR/Cas9 system, Insect Genetic Technologies WORKSHOP, Kansas, USA, 17 June 2015.
2. Mito T., Itoh T., Mirimoto H., Kijitani R., Toyoda A., Tomonari S., Fuketa M., Watanabe T., Matsuoka Y. Genome sequencing and annotation of the cricket *Gryllus bimaculatus*, a hemimetabolous insect model, 9th Annual Arthropod Genomics SYMPOSIUM, Kansas, USA, 18-19 June 2015
3. Matsuoka Y., Watanabe T., Kurita C., Tomonari S., Noji S., Mito T., Functional analysis of a Hox gene, *abdominal-A*, using CRISPR/Cas9 system in the cricket *Gryllus bimaculatus*, 第48回日本発生物学会年会, つくば国際会議場(茨城県つくば市), 2015年6月2日~5日.
4. Watanabe T., Matsuoka Y., Noji S. and Mito T. Targeted genome editing in the cricket, *Gryllus bimaculatus*, using CRISPR/Cas9 system, FASEB SRC on Genome Engineering - Cutting-Edge Research and Applications, Nassau, Bahamas, 22-27 June 2014.
5. Watanabe T., Matsuoka Y., Mito T., Noji S., Targeted gene disruptions in the cricket, *Gryllus bimaculatus*, using CRISPR/Cas9

system, 第47回日本発生生物学会年会, ウィンク愛知(愛知県名古屋市), 2014年5月27日~30日.

〔図書〕(計1件)

1. **渡辺崇人**, 松岡佑児, 野地澄晴, 三戸太郎『フタホシコオロギにおけるゲノム編集』『進化するゲノム編集技術』株式会社エヌ・ティー・エス, 386(201-207), 2015 [総説, 分担執筆]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 崇人 (WATANABE TAKAHITO)
徳島大学・農工商連携センター・特任
助教

研究者番号: 30709481