

ゲノム改変技術を用いたフタホシコオロギの発生機構の研究

三戸 太郎

Taro MITO: Study on Developmental Mechanisms in *Gryllus bimaculatus* using Genome Modification Technologies*

Graduate School of Technology, Industrial and Social Sciences, Tokushima University, 2-1 Minami-Jyosanji-cho, Tokushima, 770-8513, Japan

E-mail: mito.taro@tokushima-u.ac.jp

昆虫の発生メカニズムについては主にショウジョウバエで研究されてきたが、より祖先的な発生様式の種との比較研究が進化的観点から重要である。このために我々は、フタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* (直翅目・コオロギ科) をモデルとして研究を行ってきた。また、コオロギなどの不完全変態類昆虫の幼虫の脚は切断後再生可能であり再生メカニズムの研究にも有用である。これまでに、本種において RNA 干渉法やトランスジェニック個体の作製技術を確立し、遺伝子機能解析の技術的基盤を構築してきた (Mito et al., 2011; Nakamura et al., 2010)。

ゲノム機能の研究をさらに発展させるために、近年ゲノム編集技術を導入し活用を進めている。ZFNs や TALENs を用いて、ホモ接合型の遺伝子ノックアウト個体作製にショウジョウバエ以外の昆虫で初めて成功した (Watanabe et al., 2012)。さらに、CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集に取り組んでいる。CRISPR/Cas9 システムによる遺伝子ノックアウトを行うために、複数の標的遺伝子についてガイド RNA をデザインし、それぞれ Cas9 mRNA と共にコオロギ卵へ顕微注射した。インジェクション当代において、標的遺伝子への高効率の変異導入が確認された。生殖系列への変異導入効率についても、ZFNs や TALENs の場合より顕著に高い傾向がみられた。次世代におけるヘテロ変異体の選抜と交配を経て、ホモ変異体を得た (Awata et al., 2015)。体節パターン形成遺伝子や Hox 遺伝子などの発生関連遺伝子について表現型が得られ胚発生における遺伝子機能を明らかにすることができた。さらに、CRISPR/Cas9 システムを用いて、非相同末端結合 (NHEJ) を介した遺伝子ノックインの系を構築した (Mito et al., manuscript in preparation)。本手法により GFP 遺伝子の発現カセットを標的遺伝子のエキソンに導入し遺伝子を破壊することで、蛍光検出によるノックアウト個体の識別が可能になった。また、エンハンサートラップシステムの作出も可能であることが示された。標的遺伝子のエンハンサートラップによる発現レポーターシステムを用いた胚発生過程での *in vivo* 発現解析などへの活用が期待される (Fig. 1)。

これらの遺伝子ノックアウト・ノックイン技術を活用して、本種コオロギの胚発生や脚再生に関わる様々な遺伝子の発現と機能の解析を進めている。一方で、CRISPR/Cas9 システムでのこれまでの成果をベースにコンディショナルノックアウトなどのより高度なゲノム改変に取り組み、不完全変態昆虫のモデルシステムとしての有用性を高めていきたい。

引用文献

- Awata, H., T. Watanabe, Y. Hamanaka, T. Mito, S. Noji and M. Mizunami (2015) Knockout crickets for the study of learning and memory: Dopamine receptor Dop1 mediates aversive but not appetitive reinforcement in crickets. *Scientific Reports*, **5**, 15885.
- Mito, T., T. Nakamura, T. Bando, H. Ohuchi and S. Noji (2011) The advent of RNA interference in Entomology. *Entomological Science*, **14**, 1–8.
- Nakamura, T., M. Yoshizaki, S. Ogawa, H. Okamoto, Y. Shinmyo, T. Bando, H. Ohuchi, S. Noji and T. Mito (2010) Imaging of transgenic cricket embryos reveals cell movements consistent with a syncytial patterning mechanism. *Curr Biol.*, **20**(18), 1641–1647.
- Watanabe, T., H. Ochiai, T. Sakuma, H.W. Horch, N. Hamaguchi, T. Nakamura, T. Bando, H. Ohuchi, T. Yamamoto, S. Noji and T. Mito (2012) Non-transgenic genome modifications in a hemimetabolous insect using zinc-finger and TAL effector nucleases. *Nature Communications*, **3**, 1017–1025.

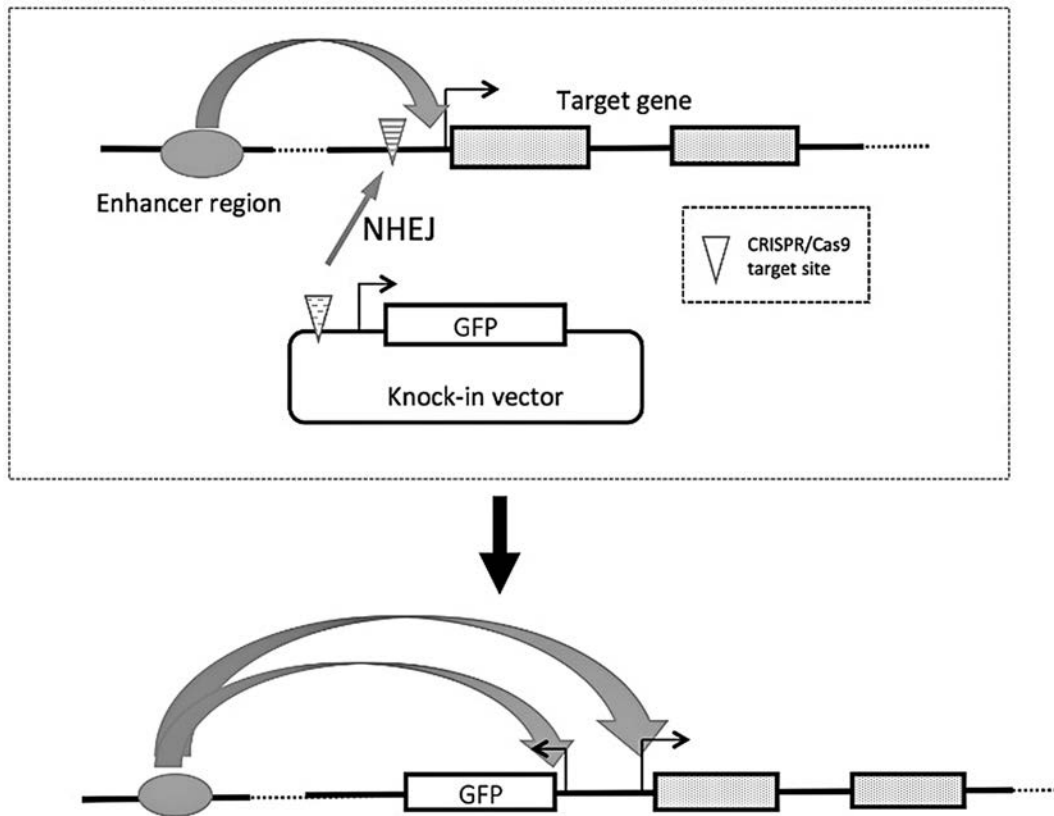


Fig. 1 Enhancer-trap strategy for generating expression-reporter crickets. The knock-in donor vector including a reporter gene (GFP in this figure) is integrated into a site upstream of the target gene via NHEJ-based DNA repair. As a result, the reporter gene is expressed under control of the target gene enhancer.