ゲノム編集技術を用いた昆虫の体節形成機構の解明

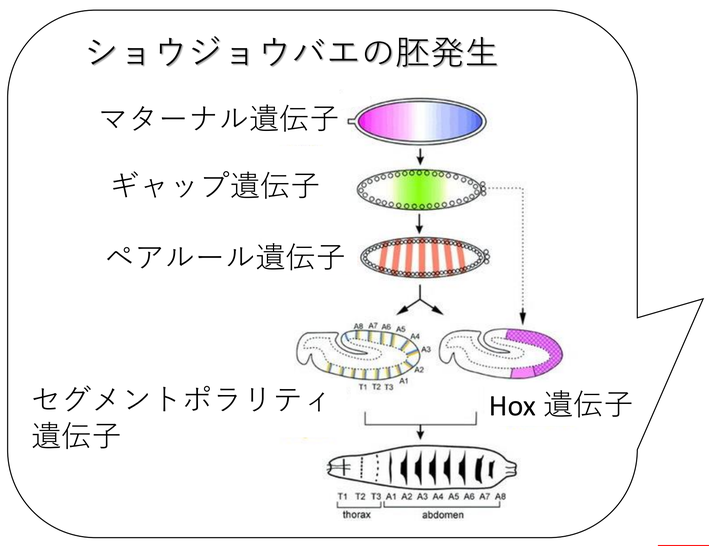
徳島大学・大学院先端技術科学教育部・生命テクノサイエンスコース・
A8研究室　博士後期課程4年　中村雄軌

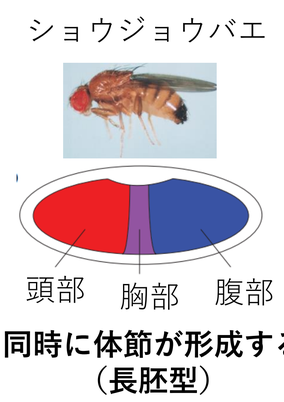
背景

体節とは

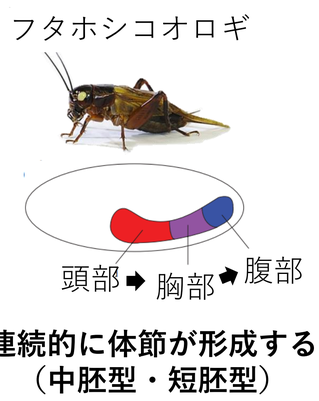
- 体軸方向に形成される繰り返し構造
- 昆虫は、基本的に頭部・胸部・腹部の体節で構成される

昆虫の体節形成における遺伝子メカニズム





同時に体節が形成する（長胚型）



連続的に体節が形成する（中胚型・短胚型）

- 昆虫によって胚発生様式が異なる
- ショウジョウバエと異なる胚発生様式をもつ昆虫は、遺伝子メカニズムも異なる可能性がある

昆虫の体節形成に関わる遺伝子のメカニズムを解析し、異なる胚発生様式を持つ種間で比較することで、体節形成機構の進化への理解を深めることができる。

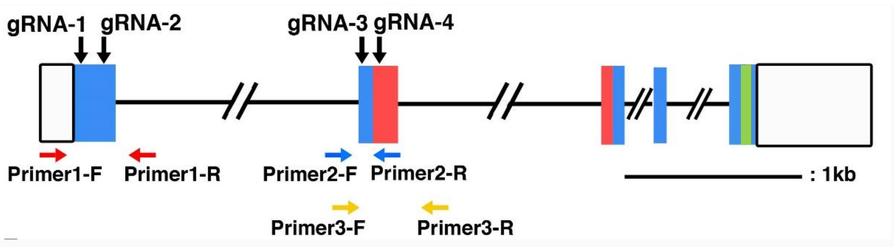
目的

本研究室で飼育しているフタホシコオロギは、進化的に祖先的な胚発生様式を持つ昆虫である。また、RNA干渉法を用いて、フタホシコオロギにおける体節形成遺伝子の機能解析が進められていた。しかし、RNA干渉法による遺伝子ノックダウンは、原理的に標的遺伝子の機能を完全には抑制できない。さらに、表現型にばらつきが出てしまい、解析困難になる場合もあった。

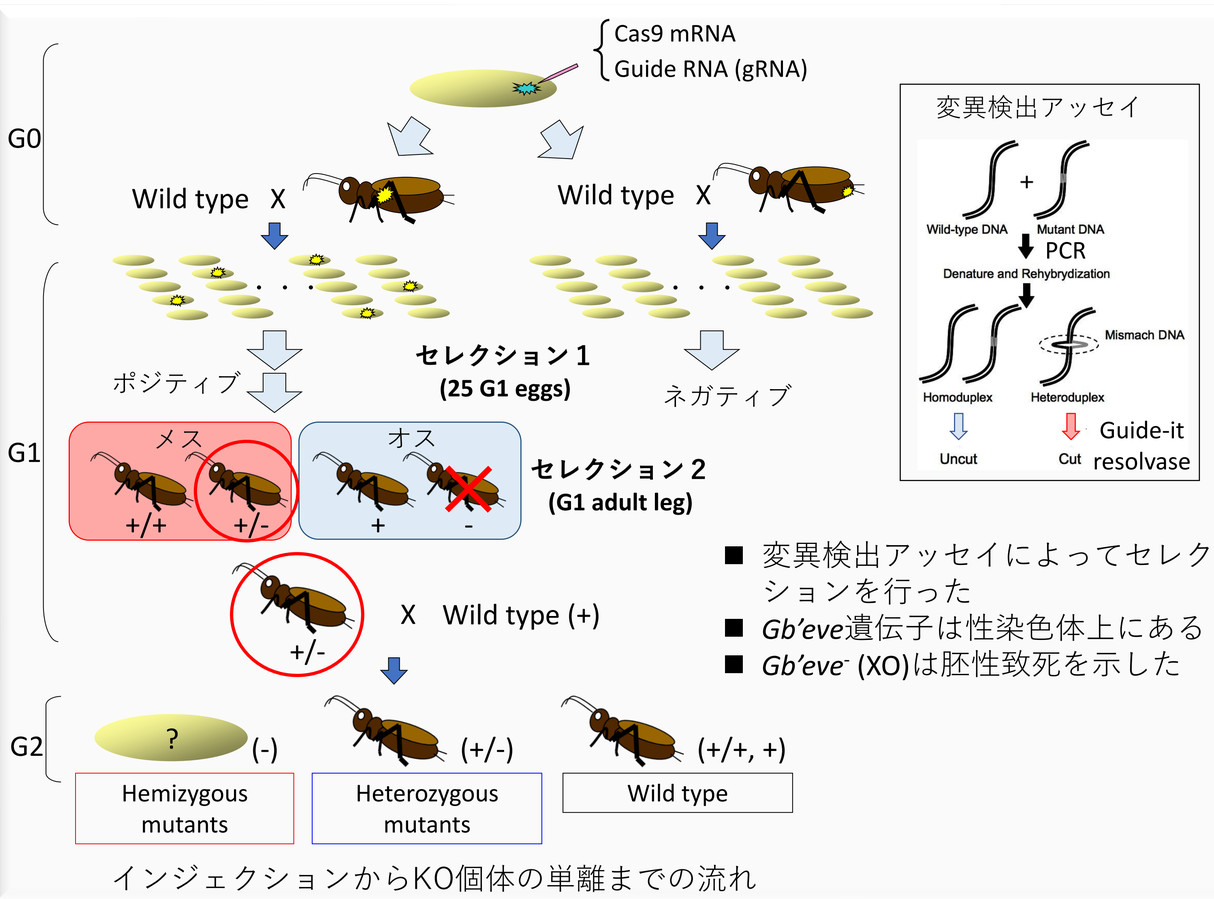
本研究では、ペアルール遺伝子の1つである ***even-skipped* (*eve*)遺伝子**を標的とした、**CRISPR/Cas9システムによる遺伝子ノックアウト**解析を目的とする。

結果・考察

*Gb'eve*相同遺伝子のノックアウト系統作製



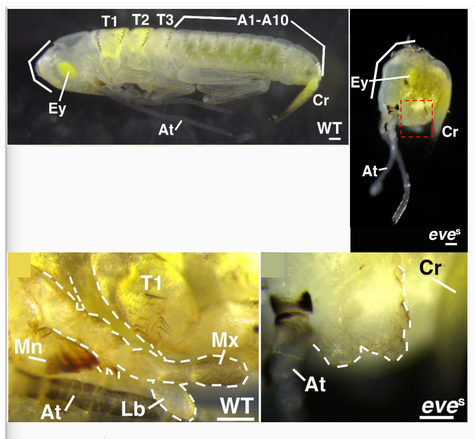
Gryllus even-skipped (*Gb'eve*) 遺伝子構造とgRNA標的サイト



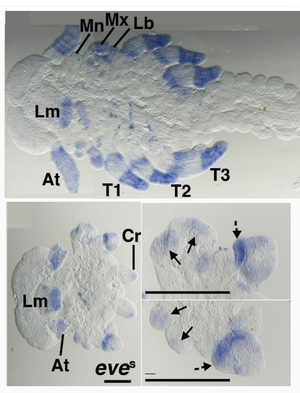
- 変異検出アッセイによってセレクションを行った
- *Gb'eve*遺伝子は性染色体上にある
- *Gb'eve*$^{-}$ (XO)は胚性致死を示した

インジェクションからKO個体の単離までの流れ

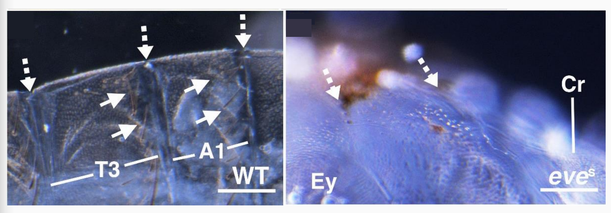
eve^{S} 変異体胚における形態観察



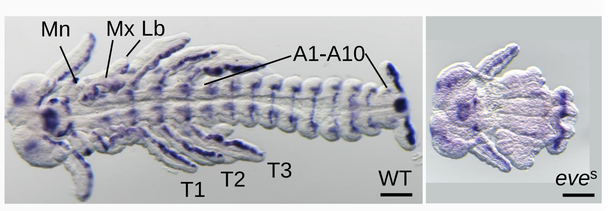
eve^{S} 変異体胚における付属肢



付属肢マーカー遺伝子 *Gryllus Distal-less* (*Gb'Dll*)の発現



eve^{S} 変異体胚における体節構造



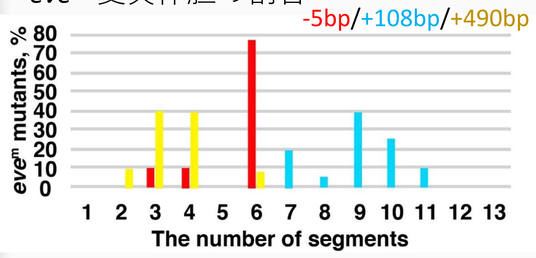
体節マーカー遺伝子 *Gryllus wingless* (*Gb'wg*)の発現

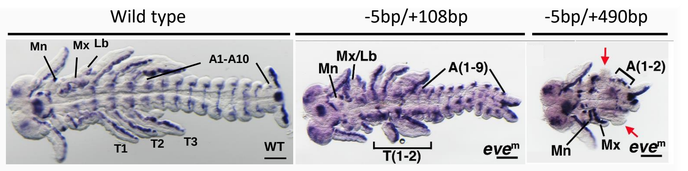
eve^{S}変異体胚の突起構造は、顎部と胸部の付属肢としての痕跡を示していた。

また、顎部第1体節から腹部第10体節までの体節境界が形成されていなかった

eve^{M} 変異体胚における形態観察

様々な胸部と腹部の総体節数を持つ *eve*^{M} 変異体胚の割合

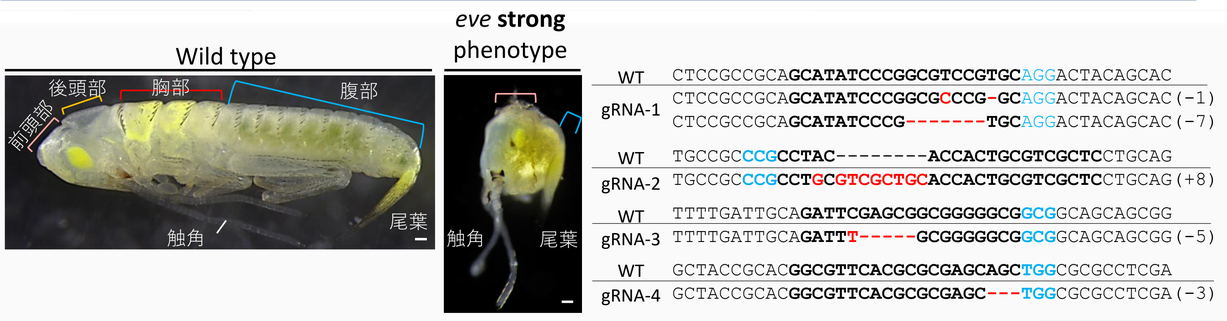




体節マーカー遺伝子 *Gb'wg*の発現

eve^{M}変異体胚における胸部と腹部の体節数は、大きく変動していた。*Gb'wg*の発現パターンは、表現型がシビアになるにつれて、*eve*^{S}変異体胚に類似していた

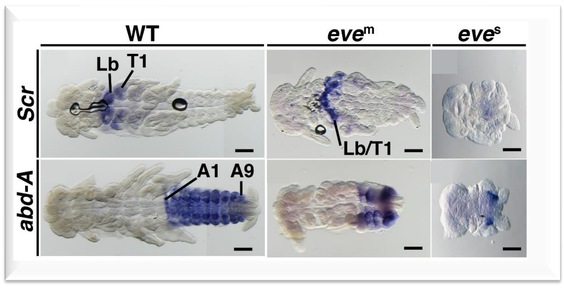
G2ヘミ変異体の単離



黒（太字）：gRNA標的配列
青：PAM配列
赤：変異塩基配列

＊CRISPR/Cas9システムと一本鎖オリゴDNA(ssODN)を同時併用時に得られた系統

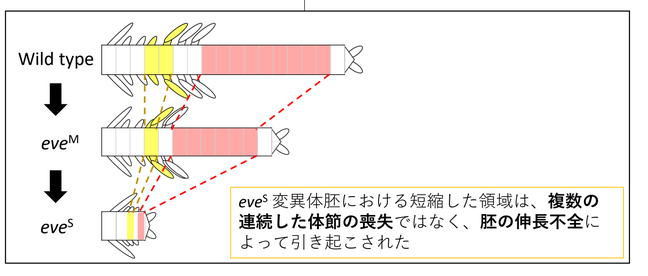
eve^{S} と*eve*^{M} 変異体胚におけるHox遺伝子の発現



顎胸部と腹部で発現するHox遺伝子の位置関係は、両方の*eve*変異体胚に維持されていた

Gb'eve遺伝子の機能

表現型	機能
• Hox遺伝子の発現ドメインが段階的に減少している • 体節マーカー遺伝子の発現パターンにおける変移が連続的である（最終的には発現が見られない）	*Gb'eve*は顎部から腹部領域における**胚の伸長**と**体節境界の形成**に関わる



*Gb'eve*遺伝子の4つの標的配列にそれぞれ変異を導入した場合、前頭部と腹部末端の尾葉しか形成されていない表現型胚（*eve* strong phenotype; *eve*^{S}）が得られた。この表現型が、遺伝的ヌルであると示唆される。一方、gRNA-1標的配列に変異が導入された場合のみ、胸部と腹部の数体節が減少した表現型胚（*eve* moderate phenotype; *eve*^{M}）が得られた。*eve*^{M}表現型は、*eve*^{S}表現型と比較してハイポモルフ（低形質）であると考えられる。結果として、8つの*Gb'eve*ノックアウト系統を作製することに成功した。