

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840115

研究課題名(和文) ミジンコの単為発生卵で起こる特殊な減数分裂解析のためのゲノム編集基盤の確立

研究課題名(英文) Development of a genome editing system for analyzing the molecular mechanism of parthenogenesis in the water flea *Daphnia pulex*

研究代表者

蛭田 千鶴江 (Hiruta, Chizue)

岩手医科大学・教養教育センター・助教

研究者番号：20723018

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ミジンコの単為発生卵で起こる特殊な減数分裂を解析するため、人工制限酵素TALENを用いたゲノム編集基盤の確立を目指した。その結果、Platinum TALENによる標的遺伝子のノックアウト法を確立した。さらに、TAL-PITCh法を用いたノックイン法の確立に着手した。また、ゲノム編集法を用いた遺伝子の機能解析で必要となる胚発生ステージ表を作成した。

研究成果の概要(英文)：In order to be able to reveal the molecular mechanism of the parthenogenetic oogenesis in the water flea *Daphnia pulex*, I conducted microinjection of TALEN mRNAs into early embryos and examined the possibility of using TALEN to edit the genome. As a result, I have succeeded the development of targeted gene disruption (knock-out) by using Platinum TALEN in *D. pulex*. Now, I am engaged on the development of knock-in system by using TAL-PITCh. Moreover, I described the developmental staging of both sexes during embryogenesis in *D. pulex* to use for its phenotype analysis of knock-in/out strains.

研究分野：生殖発生生物学

キーワード：モデル生物開発 ゲノム編集 単為生殖 ミジンコ ノックアウト TALEN

### 1. 研究開始当初の背景

ミジンコは、実験室内での大量飼育が容易な小型の甲殻類である。繁殖周期が短いこと、発生段階を揃えた卵の採取が可能であることなど実験動物としての利点を多く備えており、生物学の様々な分野で新しいモデル生物として注目されている (Jenner & Wills, 2007; Stollewerk, 2010; Harris *et al.*, 2012)。さらに甲殻類で初めて全ゲノムが解読され (Colbourne *et al.*, 2011)、ゲノム研究の情報基盤が整ってきている。しかし、表現型可塑性 (例えば、環境依存型性決定、捕食者誘導方防衛, Tollrian & Harvell, 1999) など興味深い現象が次々と報告されるものの、そのメカニズムを明らかにするための遺伝子の機能解析手法やゲノム編集に係る技術開発が遅れていた。

研究代表者は、ミジンコが環境変化にตอบสนองしてみせる単為生殖と有性生殖それぞれの生殖様式とその切り換えに注目している。通常はメスだけで増える単為生殖で増殖するが、短日、高密度、餌不足などの変化を感知するとオスを産み、有性生殖を行う。いずれの生殖様式でも2倍体卵をつくり、単為発生の際には第1減数分裂に相当する分裂を途中でスキップする「減数しない減数分裂」を行うことが分かっている (Hiruta *et al.*, 2010)。しかし、その詳細な分子機構は明らかではない。

近年の人工制限酵素を利用した新しいゲノム編集技術の開発により、これまで一部のモデル生物に限られてきた標的遺伝子の改変は、原理的には全ての生物で可能になった (Sakuma & Woltjen, 2014)。その1つである TALEN (Transcription activator-like effector nuclease) は、標的配列に結合すると DNA 切断ドメインが二量体を形成し、DNA 二本鎖に切断を誘導する。切断された DNA は修復されるが、その過程で塩基の欠失や挿入により遺伝子が破壊される。さらに、ターゲティングベクターや一本鎖オリゴ DNA (ssODN) を共導入することで目的の遺伝子を導入することも可能である。

研究代表者は、これまでにミジンコにおいてマイクロインジェクションによる RNAi 法の確立に成功している (Hiruta *et al.*, 2013)。それにより胚発生初期において遺伝子の機能解析が可能となったが、解析可能な時期が一時的であるという問題点を抱えていた。つまり、ミジンコを用いた研究の進展には、目的とする遺伝子を導入あるいは欠損させることで、その遺伝子の機能を生体レベルで解析する手法の開発が欠かせない段階にきていた。

### 2. 研究の目的

- (1) ミジンコのゲノム編集基盤を確立し、標的組織の可視化や細胞系譜解析および gain-of-function/loss-of-function 解析を可能にすることでモデル生物

化することを第1の目的とする。

- (2) 確立したゲノム編集のシステムを用いて、単為生殖で起こる特殊な減数分裂の分子メカニズムを明らかにすることを第2の目的とする。

### 3. 研究の方法

ミジンコのゲノム編集基盤を確立するため、次の3点からのアプローチを行った。

- (1) 標的遺伝子の破壊 (ノックアウト) 法の確立

TALEN の標的遺伝子として、*Distal-less (Dll)* を選定した。この遺伝子はホメオボックスをもつ転写因子で、節足動物では付属肢の遠位部形成に関わることが分かっている。RNAi 法を確立する際に、すでにミジンコでの発現部位や表現型の解析を行っており、それらのデータとも比較することで TALEN のシステムがミジンコで機能しているかを検証することができると考えた。*Dll* 遺伝子を標的とする TALEN の mRNA を合成し、マイクロインジェクションにより産卵直後の胚に導入し、発生した胚の *Dll* 遺伝子の塩基配列と表現型解析を行った。

- (2) 外来遺伝子の付加 (ノックイン) 法の確立

TAL-PITCh 法 (Nakade *et al.*, 2014; Sakuma *et al.*, 2015) というマイクロホモロジー媒介末端結合 (MMEJ) を利用した細胞周期に依存せず、相同組換えを必要としないノックイン方法を用いることにした。レポーター遺伝子として蛍光タンパク質 (EGFP) を標的遺伝子の開始コドン直後または終止コドン直前に連結し発現をモニター出来るように TALEN およびドナーベクターを設計した。標的遺伝子には、*Dll* 遺伝子およびヒートショックタンパク質 (HSP) 遺伝子を選定した。後者については、時期特異的あるいは組織特異的な遺伝子操作を視野に入れて、ミジンコでヒートショック応答が利用できるか確かめるために選定した。TALEN の mRNA を合成し、ドナーベクターと共にマイクロインジェクションにより産卵直後の胚に導入した。

- (3) 胚発生ステージ表の作成

遺伝子改変個体の表現型を評価するために基準となる胚発生ステージ表を作成した。ミジンコの雌雄それぞれについて、産卵直後から2時間おきに1齢個体になるまで写真を撮影し、各段階の体サイズも測定した。さらに実体顕微鏡下で視認できる組織・器官の形成時期を観察した。

#### 4. 研究成果

- (1) 研究開始当初、主流であった Golden TALEN を用いたミジンコのノックアウトでは、変異導入が認められなかった。そこで、TALEN の DNA 結合モジュールにアミノ酸改変を入れることで高い活性を実現した Platinum TALEN を用いることにした。その結果、TALEN 導入個体では、*Dll* の RNAi 表現型と同様に第2触角を含む付属肢の遠位部の形成が阻害された表現型が得られた(図1)。続いて、*Dll* 遺伝子の塩基配列を確認したところ、数塩基の欠失が認められ、さらにその変異が次世代に受け継がれることも確認できた。このことから、ミジンコにおいてTALENを初期胚に導入することで、標的遺伝子を破壊してその機能を解析することが可能になった(業績2)。

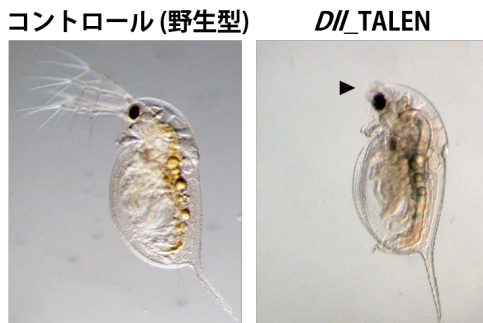


図1 *Dll* 遺伝子のノックアウトにより、第2触角の先端部が欠失した(矢頭)。左:何も導入していないコントロール個体。右: *Dll* 遺伝子を標的とする TALEN の mRNAs を導入した個体。

- (2) 続いて、ノックイン法の確立に着手した。*Dll* 遺伝子については、開始コドン直後に EGFP をノックインできるように、*Hsp* 遺伝子については、終止コドン直前に EGFP をノックインできるようにそれぞれ TALEN を設計した。ノックイン法の確立にあたり、今後の遺伝子機能解析への応用可能性を高めるため、内在遺伝子を破壊しつつ発現をモニターする、内在遺伝子の機能を維持しつつ発現をモニターする、ヒートショック応答を利用した時期または組織特異的な遺伝子操作をすることが可能であることを明らかにすることをねらいとした。現在、TAL-PITCh 法がミジンコで機能しているか検証中である。
- (3) ゲノム編集法を用いた遺伝子の機能解析において、表現型解析に利用できる胚発生のステージ表を雌雄それぞれについて作成した(業績1, 図2)。日長や温度などの条件を一定にして、産卵直後の胚が1齢幼体になるまでを経時的に観察して記載した。それにより、正常胚と遺伝子操作胚について発生時間、体サイズ、各組織や器官の形成時期を比較するこ

とが出来るようになった。

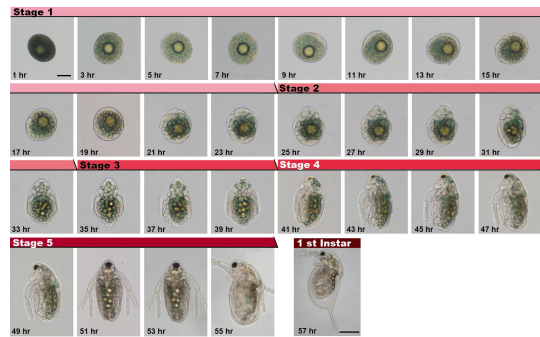


図2 ミジンコ( )の発生ステージ表

本研究では、第1の目的であるゲノム編集基盤の確立が当初の予定よりも長くかかってしまったため、第2の目的である単為生殖で起こる特殊な減数分裂の分子メカニズムを明らかにしていくことができなかった。これについては今後の課題として引き続き研究に取り組んでいく。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件; 全て査読有)

- Kenji Toyota\*, Chizue Hiruta\*, Yukiko Ogino, Shinichi Miyagawa, Tetsuro Okamura, Yuta Onishi, Norihisa Tatarazako, Taisen Iguchi (\*: equally contribution) (2016) Comparative developmental staging of the female and male water fleas *Daphnia pulex* and *Daphnia magna* during embryogenesis. *Zoological Science* 33 31-37 DOI: 10.2108/zs150116
- Chizue Hiruta, Yukiko Ogino, Tetsushi Sakuma, Kenji Toyota, Shinichi Miyagawa, Takashi Yamamoto, Taisen Iguchi (2014) Targeted gene disruption by use of transcription activator-like effector nuclease (TALEN) in the water flea *Daphnia pulex*. *BMC Biotechnology* 14 95 DOI: 10.1186/s12896-014-0095-7

〔学会発表〕(計5件)

- Chizue Hiruta, Abortive meiosis found in the parthenogenetic water flea *Daphnia pulex*. Oocyte Maturation and Fertilization Meeting IV, Asamushi, Aomori, Japan, 2015/6/17 (招待講演)
- 蛭田千鶴江, 田中大介, 宮川信一, 宮川一志, 豊田賢治, 角谷絵里, 井口泰泉, ミジンコの単為発生卵を凍結保存する技術の確立に向けて, Cryopreservation Conference 2014, 岡崎コンファレンスセンター, 2014年10月23日
- 蛭田千鶴江, 荻野由紀子, 佐久間哲史,

豊田賢治, 山本卓, 井口泰泉, ミジンコ(*Daphnia pulex*)における Platinum TALEN を用いた標的遺伝子破壊法の確立, 第4回ゲノム編集研究会, 広島国際会議場, 2014年10月6日

4. 蛭田千鶴江, 荻野由紀子, 豊田賢治, 佐久間哲史, 山本卓, 井口泰泉, ミジンコにおける人工制限酵素 TALEN を用いた遺伝子破壊法の確立, 日本動物学会第85回大会, 東北大学, 2014年9月13日
5. Chizue Hiruta, Yukiko Ogino, Kenji Toyota, Taisen Iguchi, Approach to establishing a tool for targeted gene disruption by using TALEN in the water flea *Daphnia pulex*, 日本発牛生物学会第47回大会, ウィンク愛知, 2014年5月28・29日

〔その他〕

プレスリリース

大学共同利用機関法人 自然科学研究機構  
基礎生物学研究所

「ミジンコにおける人工制限酵素 Platinum TALEN を用いた遺伝子破壊法の確立」

<http://www.nibb.ac.jp/pressroom/news/2014/12/19.html>

科学新聞(株式会社科学新聞社)

「ミジンコ遺伝子の機能解析に必要な遺伝子破壊法を確立」

<http://sci-news.co.jp/news/%E3%83%9F%E3%82%B8%E3%83%B3%E3%82%B3%E9%81%BA%E4%BC%9D%E5%AD%90%E3%81%AE%E6%A9%9F%E8%83%BD%E8%A7%A3%E6%9E%90%E3%81%AB%E5%BF%85%E8%A6%81%E3%81%AA%E9%81%BA%E4%BC%9D%E5%AD%90%E7%A0%B4%E5%A3%8A%E6%B3%95/>

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/chizuehiruta/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蛭田 千鶴江 (HIRUTA, Chizue)

岩手医科大学・全学教育推進機構教養教育センター生物学科・助教

研究者番号: 20723018