

研究題目 VIKING 法による昆虫を用いた高効率ノックイン手法の開発のための基盤構築

研究組織

研究代表者：梅津 大輝（大阪大学理学研究科）

共同研究者：沢津橋 俊（徳島大学先端酵素学研究所）

【1】研究の概要

[1-1] 本研究の目的・概要

昆虫は、種数が全生物種の半数以上を占めており、地球上で最も繁栄した生物群である。人に害を及ぼす害虫から、役に立つ益虫まであらゆる局面で人間の生活と深い関わりがある。養蚕や養蜂に代表されるように、古くから産業利用が行われてきたが、捕食性の昆虫を有害生物の駆除に用いる生物農薬、高栄養価な食材としての利用、患部の壊死した部分を食べさせて創傷の回復を早めるマゴットセラピーなど、多方面での産業応用的な利用は枚挙にいとまがない。膨大な種数を誇る昆虫には未知の機能を有する種の存在も期待され、昆虫の産業応用の気運は近年急速に高まってきている。一方、生態系に出来るだけ影響を及ぼさないような配慮も必要であり、飛べない昆虫や不稔の昆虫の導入など、より安全に産業利用するための有効な方法を模索することが求められる。

[1-2] 研究の方法・経過

近年、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集手法によって、容易に遺伝子組換え生物を作出することが可能になっている。一方で、手法によって遺伝子組換え効率が大幅に異なり、対象とする生物種に応じてゲノム編集技術を最適化する必要がある。徳島大学先端酵素学研究所の沢津橋博士らは、ヒト培養細胞を対象に、Non-Homologous End Joining (NHEJ) を応用した VIKING 法と呼ばれる高効率のゲノム編集技術を開発している (Sawatsubashi, et. al., Sci. Rep. 2018)。これまで VIKING 法を昆虫遺伝子組換え体の作出に応用した例はなく、昆虫

におけるゲノム編集技術の最適化を試みる上で、VIKING 法の検討が重要である。そこで、本研究ではモデル生物として最もよく用いられている昆虫であるショウジョウバエを用い、ショウジョウバエ由来の培養細胞に対する VIKING 法によるゲノム編集技術の導入を試みる。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果
ショウジョウバエ培養細胞 S2 細胞を用いて、VIKING 法を検討するため、Cas9/gRNA 共発現ベクター、VIKING でのノックイン用にユニバーサルな切断配列を挿入したマーカー遺伝子発現ベクターを構築した。まずは、検討した点は、Cas9、gRNA、マーカー遺伝子を発現させるプロモーターを選別した。その結果、タンパク発現用に Actin5c プロモーターと Hsp70 プロモーターが、gRNA 発現には U6 プロモーターが機能的であることが判明した。続いて、効率的な薬剤耐性遺伝子を探索したところ、ブラストサイジン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子が機能的であること、ネオマイシン耐性遺伝子は擬陽性が出やすいことが判明した。上記 3 種類の薬剤耐性遺伝子が選別できたことから、複数遺伝子のノックアウトも可能である可能性が得られた。さらに、VIKING 法の基盤技術である VKG 配列の探索を行ったところ、ショウジョウバエで利用される多くのプラスミド配列にも、哺乳類用ベクターで利用される発現ベクターと同様の VKG1 配列を有することが判明した。そこで、この VKG1 配列の類似の DNA 配列がショウジョウバエゲノ

ム DNA 配列に存在するかを検索したところ、相同な配列は存在せず、またオフターゲット候補となりうる 1 塩基の差異となる高い相同性配列も存在しなかった。そのため、これまでに実績の多数ある VKG1 配列を利用することとした。これまでの結果から、ショウジョウバエ細胞用に適した VIKING モジュールの作出が完了し、培養細胞での VIKING を実施することとした。ターゲットとした標的遺伝子は、昆虫の変態ホルモンであるエクダイソンを受容するエクダイソンレセプター (EcR) とし、EcR のアイソフォームに共通なエクソンに gRNA 配列を設計し、VIKING による遺伝子破壊を実施した。上記の VIKING モジュールをショウジョウバエ S2 細胞に共導入し、薬剤選別後に増殖する細胞群を得ることに成功した。得られた細胞群が EcR 遺伝子ノックアウトか否かを検討するため、エクダイソン応答レポーターを用いたレポーターアッセイにて、その応答の有無を検討したところ、エクダイソンアナログであるポナステロン A 依存的な転写活性化の機能を消失しており、遺伝子機能を欠損していることが判明した。これらの結果から、ショウジョウバエ細胞においても NHEJ を介した VIKING 法は利用可能であり、遺伝子の機能解析に有用な技術であるといえ、従来法に比べてより簡便な遺伝子破壊が可能となった。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

今後、VIKING 法を homology directed repair (HDR) を用いた従来のゲノム編集技術と比較し、遺伝子組換え効率や非特異的な挿入頻度などについて解析することで、改善点をあぶり出し、本手法の最適化に役立てる。昆虫における簡便で高効率のゲノム編集手法を確立することで、昆虫の産業応用を大きく加速することにつながると期待される。

【3】主な発表論文等

[3-1] 論文発表

無

[3-2] 学会発表

無

[3-3] 成果資料等

無

【4】今後の課題等

今回の研究では、ショウジョウバエの代表的な培養細胞である S2 細胞のみの検討である。今

後の課題としては今回の樹立された細胞株のみならず、特に申請者らが研究の対象とするショウジョウバエ個体に由来する血液細胞・貪食細胞を in vitro でゲノム編集し、再度個体へインジェクションし、機能解析をするなどといった初代培養が可能な細胞種への応用が可能であり、更なる開発を続ける必要がある。また、ショウジョウバエ個体においても、本研究で開発した VIKING モジュールを用いて、ターゲットのゲノム領域にレポーター遺伝子等を簡便に導入できると予想され、このような技術開発につなげていくことができると確信している。