

CRISPR/Cas9システムを利用したハチ目モデル昆虫のゲノム編集

畠山 正統・木村 澄・炭谷 めぐみ・横井 翔・芳山 三喜雄

Masatsugu HATAKAYEMA¹⁾, Kiyoshi KIMURA²⁾, Megumi SUMITANI³⁾, Kakeru YOKOI¹⁾
and Mikio YOSHIYAMA²⁾: CRISPR/Cas9-mediated Genome Editing in Hymenopteran Model
Insects*

¹⁾ *Insect Genome Research and Engineering Unit, Division of Applied Genetics, Institute of Agrobiological Sciences, NARO, Owashi, Tsukuba, Ibaraki 305–8634, Japan*

²⁾ *Animal Genetics Unit, Division of Animal Breeding and Reproduction Research, Institute of Livestock and Grassland Science, NARO, Ikenodai, Tsukuba, Ibaraki 305–0901, Japan*

³⁾ *Transgenic Silkworm Research Unit, Division of Biotechnology, Institute of Agrobiological Sciences, NARO, Owashi, Tsukuba, Ibaraki 305–8634, Japan*

E-mail: sawfly@affrc.go.jp (MH)

ハチ目は、祖先的な広腰亜目と派生的な細腰亜目のふたつの亜目で構成される。形態的あるいは分子系統解析から、完全変態昆虫で最も祖先的なグループに位置づけられており (Misof et al., 2014)、不完全変態から完全変態への進化を考察するうえで重要な昆虫目として認識されている。ハチ目昆虫は通常、雄産生単為生殖を行い、受精卵からは二倍体の雌を、未受精卵からは半数体の雄を生じる半数-倍数性である (Crozier, 1977)。また、植物食性のもの、寄生性のもの、社会性をもつものなど、このグループの生物学的な興味から、いくつかの種では遺伝子機能解析をめざして、全ゲノム配列が解読・公開され (The Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006; Werren et al., 2010; i5K Consortium, 2013)、RNAi 法や遺伝子組換え技術などの遺伝子機能解析技術が確立されている (Hatakeyama et al., 2009; Lynch 2015; Cridge et al., 2016)。これまで昆虫に活用されてきた RNAi や遺伝子組換えは、非常に強力な遺伝子操作技術ではあるものの、同時にいくつかの制約がある。RNAi による遺伝子ノックダウンは効果が一過的で、種によっては効果がみられない場合もある。遺伝子組換えでは、ゲノム内の狙ったところに目的遺伝子を導入できるわけではない。このような背景から、部位特異的ヌクレアーゼを利用したゲノム編集技術が注目されている。なかでも CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-Associated protein 9) システムは、精度、簡易性、汎用性、応用の拡張性、さらに経済性に優れ、近年急速に昆虫への利用が拡大してきた (Gilles and Averof, 2014; Chen et al., 2016; Cui et al., 2017; Taning et al., 2017; Sun et al., 2017; Gantz and Akbari, 2018)。ここでは、広腰亜目のモデル種であるカブラハバチ (*Athalia rosae*) と細腰亜目のモデル種であるセイヨウミツバチ (*Apis*

mellifera) を用いた CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集 (遺伝子ノックアウト) の結果を報告する。

カブラハバチでは、眼で特異的に緑色蛍光タンパク質 (EGFP) を発現する遺伝子組換え系統 (Hatakeyama et al., 2016) を用い、EGFP 遺伝子の発色団に対応する遺伝子配列を標的にして single-guide RNA (sgRNA) を作製し、DNA 切断酵素の Cas9 タンパク質をコードする mRNA とともに、成熟未受精卵に注入した。これらを単為発生させた注入当代 (G_0) で、EGFP がモザイク状に検出される体細胞モザイク個体が出現し、交配により EGFP ノックアウト G_1 個体が得られた。これらの EGFP ノックアウト個体の標的配列には挿入/欠失が生じており、正常な遺伝子産物は産出されないことがわかった。セイヨウミツバチでは、交尾済みの女王に産卵させた細胞性胚期に至るまでの初期胚に、眼色合成関連酵素のキヌレンモノオキシゲナーゼ (*kynurenine 3-monooxygenase: kmo*) 遺伝子を標的に作製した sgRNA と Cas9 mRNA とを注入した。これらを人工的に飼養して得られた注入当代 (G_0) の遺伝子型判定を行ったところ、*kmo* 遺伝子配列にさまざまな欠失が確認できた。このようにカブラハバチとセイヨウミツバチで、CRISPR/Cas9 システムによる遺伝子ノックアウトが可能なが実証された。

引用文献

- Chen, L., G. Wang, Y.N. Zhu, H. Xiang and W. Wang (2016) Advances and perspectives in the application of CRISPR/Cas9 in insects. *Zoological Research*, **37**, 220–228.
- Cridge, A.G., M.R. Lovegrove, J.G. Skelly, S.E. Taylor, E.G.L. Petersen, R.C. Cameron and P.K. Dearden (2017) The honeybee as a model insect for developmental genetics. *Genesis*, **55**, e23019.
- Crozier, R.H. (1977) Evolutionary genetics of the Hymenoptera.

- Annual Review of Entomology, **22**, 263–288.
- Cui, Y., J.L. Sun and L.L. Yu (2017) Application of the CRISPR gene-editing technique in insect functional genome studies – a review. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **162**, 124–132.
- Gantz, V.M. and O.S. Akbari (2018) Gene editing technologies and applications for insects. *Current Opinion in Insect Science*, **28**, 66–72.
- Gilles, A.F. and M. Averof (2014) Functional genetics for all: engineered nucleases, CRISPR and the gene editing revolution. *EvoDevo*, **5**, 43.
- Hatakeyama, M., M. Sumitani, D.S. Yamamoto, J.M. Lee and K. Oka (2009) The sawfly, *Athalia rosae ruficornis* (Hymenoptera) as a model insect for developmental and reproductive biology: What has been done and what should be done? *Proceedings of the Arthropodan Embryological Society of Japan*, **44**, 1–12.
- Hatakeyama, M., J. Yatomi, M. Sumitani, Y. Takasu, K. Sekiné, T. Niimi and H. Sezutsu (2016) Knockout of a transgene by transcription activator-like effector nucleases (TALENs) in the sawfly, *Athalia rosae* (Hymenoptera) and the ladybird beetle, *Harmonia axyridis* (Coleoptera). *Insect Molecular Biology*, **25**, 24–31.
- i5K Consortium (2013) The i5K initiative: Advancing arthropod genomics for knowledge, human health, agriculture, and the environment. *Journal of Heredity*, **104**, 595–600.
- Misof, B., S. Liu, K. Meusemann, R.S. Peters, A. Donath, C. Mayer, P.B. Frandsen, J. Ware, T. Flouri, R.G. Beutel, O. Niehuis, M. Petersen, F. Izquierdo-Carrasco, T. Wappler, J. Rust, A.J. Aberer, U. Aspöck, H. Aspöck, D. Bartel, A. Blanke, S. Berger, A. Böhm, T.R. Buckley, B. Calcott, J. Chen, F. Friedrich, M. Fukui, M. Fujita, C. Greve, P. Grobe, S. Gu, Y. Huang, L.S. Jermin, A.Y. Kawahara, L. Krogmann, M. Kubiak, R. Lanfear, H. Letsch, Y. Li, Z. Li, J. Li, H. Lu, R. Machida, Y. Mashimo, P. Kapli, D.D. McKenna, G. Meng, Y. Nakagaki, J.L. Navarrete-Heredia, M. Ott, Y. Ou, G. Pass, L. Podsiadlowski, H. Pohl, B.M. von Reumont, K. Schütte, K. Sekiya, S. Shimizu, A. Slipinski, A. Stamatakis, W. Song, X. Su, N.U. Szucsich, M. Tan, X. Tan, M. Tang, J. Tang, G. Timelthaler, S. Tomizuka, M. Trautwein, X. Tong, T. Uchifune, M.G. Walz, B.M. Wiegmann, J. Wilbrandt, B. Wipfler, T.K.F. Wong, Q. Wu, G. Wu, Y. Xie, S. Yang, Q. Yang, D.K. Yeates, K. Yoshizawa, Q. Zhang, R. Zhang, W. Zhang, Y. Zhang, J. Zhao, C. Zhou, L. Zhou, T. Ziesmann, S. Zou, Y. Li, X. Xu, Y. Zhang, H. Yang, J. Wang, K.M. Kjer and X. Zhou (2014) Phylogenomics resolves timing and pattern of insect evolution. *Science*, **346**: 763–767.
- Lynch, J.A. (2015) The expanding genetic toolbox of the wasp *Nasonia vitripennis* and its relatives. *Genetics*, **199**, 897–904.
- Sun, D., Z. Guo, Y. Liu and Y. Zhang (2017) Progress and prospects of CRISPR/Cas systems in insects and other arthropods. *Frontiers in Physiology*, **8**, 608.
- Taning, C.N.T., B. Van Ende, N. Yu, S. Ma and G. Smagghe (2017) CRISPR/Cas9 in insects: Applications, best practices and biosafety concerns. *Journal of Insect Physiology*, **98**, 245–257.
- The Honey Bee Genome Sequencing Consortium (2006) Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, **443**, 931–949.
- Werren, J.H., S. Richards, C.A. Desjardins, O. Niehuis, J. Gadau, J.K. Colbourne and The *Nasonia* Genome Working Group (2010) Functional and evolutionary insights from the genomes of three parasitoid *Nasonia* species. *Science*, **327**, 343–348.