

課題名	高性能な線虫バランサーの整備
課題管理者	三谷 昌平 学校法人東京女子医科大学 医学部
実施期間	2016 年度
概要・実施体制	線虫は生活環の短さが便利であることから遺伝学的な解析に多用されている。一方で、雌雄同体のために、致死不妊などの表現型を持つ個体は、短期間に希釈されて失われる危険が高い。そこで、従来整備されていなかった高性能な線虫バランサーを整備し、研究の進展に資する。
成果	<p>【概要】</p> <p>線虫 <i>C. elegans</i> は 1998 年に多細胞動物として最初にゲノム解読が完了し、逆遺伝学的なアプローチを用いて、網羅的な遺伝子機能解析が行われてきた。その際に、ゲノム配列情報を用いて、逆遺伝学的に欠失変異体を分離し、これをノックアウト株として使用することが汎用され、多くの業績が出されている。ノックアウト株の約 2 割程度は、致死・不妊となる。そのような株はヘテロ接合体として維持保存しなければならない。雌雄同体の自家受精で増殖する線虫の場合には、単純なヘテロ接合体は希釈されて、やがて失われるためである。そこで、染色体構造変化を持つバランサーと呼ばれる染色体とのヘテロ接合体として維持することが必要である。本課題では、このような目的に合致する高性能バランサーのセットを作成し、ナショナルバイオリソースプロジェクト中核機関として線虫の欠失変異体の収集・保存・提供の効率を上げると同時に、表現型解析の強力なツールとしてのバランサー株そのものをバイオリソースとして作成・保存・提供する体制を整えることを目的として実施した。</p> <p>(1) 線虫 <i>C. elegans</i> について、染色体の改変を行うことで、バランサーを作成する。Iwata et al. (Scientific Reports 6; 33840, 2016) の技術を用いた。具体的には、以下の方法を用いてバランサーを作成した。線虫染色体の 2 箇所に対して二本鎖切断を起こす guide RNA(gRNA)配列を設計する。2 箇所の断端が互いに反対方向となるように再度連結するために必要な糊付け配列 (ターゲティング配列) を、人工的に合成した ssODN (single-stranded Oligo Deoxy Nucleotide)により作成した。gRNA と Cas9 をコードするプラスミドと ssODN を混合して、線虫の生殖腺に注入することで、切断部位の 2 箇所を断端とする逆位の組換え体を作成した (tmInXX)。この株の逆位の内側に 1 箇所、左側あるいは右側にさらに 1 箇所の切断部位を同様に設計し、同様の生殖腺への注入を行うことで、2 回目の逆位を起こして crossover suppressor を作成した。さらに、crossover suppressor のホモ接合体を識別すると同時に、短時間で増殖して目的の変異体を希釈する危険を減らす目的で、crossover suppressor 染色体に蛍光標識のトランスジーンを挿入したり、成長が遅くなる Unc (uncoordinated movement)や Dpy (dumpy)などの変異を追加した。このようにして作成した染色体をヘテロ接合体として持ち、他の染色体に致死・不妊遺伝子を持つバランサーされた変異体は、成長が早いために維持が容易となる。crossover suppressor の利点は、以下の 4 点である：① 2 度の逆位リアレンジメントを持つため、致死遺伝子を持つ染色体の致死遺伝子の周辺部と crossover suppressor の染色体の対合の際に近傍の配列が相同性を持たない。そのため、組換えが抑制され、安定性が増す。② 一つのバランサーでより広い範囲をカバーできる。③ 従来の線虫の転座によるバランサーと違い、染色体の異数性が起こらないのでバランサー染色体そのものによる表現型によるデータの解釈の難しさを避けることができる。④ 従来の γ 線誘発バランサーと比べ、染色体構造が明確である。我々は、線虫の既存の crossover suppressor (γ 線で作成されたもの) がカバーする領域が全染色体の 15%程度しかなかったことから、残りの部分を 13 個の crossover suppressors でカバーすることとし、目的のバランサーを作成した。実際に、致死変異体 rab-5 (tm2456)を新規バランサー-tmC18 と既存の転座バランサー-hT2 とでバランサーし、ヘテロ接合体の子孫の表現型を比較したところ、tmC18 による株の子孫はほぼ 100%が L1 幼虫で成長停止して死んだのに対して、hT2 では 3 分の 1 程度しか L1 幼虫まで成長せず、多くは、核異数性によるバランサーのみの原因で胚致死となった。これらは、従来のバランサーに比べて我々の作成したバランサーによる表現型解析は、信頼性の高いデータを出すことが可能であることを示している。</p> <p>(2) 12 種類の crossover suppressors に対して、トランスジェニック法により、蛍光蛋白質 Venus の 1 コピー挿入による蛍光標識を行なった。これにより、蛍光の入っていない株は致死変異体のホモ接合体であることが容易に分かり、解析に好都合である。加えて、染色体再編成が困難であった pairing center 領域に蛍光蛋白質遺伝子を導入することで、paring center 領域に存在する致死・不妊遺伝子の維持保存を目的としたトランスジェニックアレルも作成した。</p> <p>(3) バランサーを安定的に維持保存し、提供できる状態とし、これらのリストを作成した。現在、国立遺伝学研究所の川本研究室と連絡を取り、本年の 6 月下旬に米国で行われる国際 <i>C. elegans</i> 学会での発表の後</p>

に直ちに公開・提供を開始できるようにデータベースの準備を進めている。

【学会誌・雑誌等における論文一覧】

1. Iwata S, Yoshina S, Suehiro Y, Hori S, Mitani S. Engineering new balancer chromosomes in *C. elegans* via CRISPR/Cas9. *Sci Rep.* 2016 Sep 21;6:33840. doi: 10.1038/srep33840. PubMed PMID: 27650892

【学会・シンポジウム等における口頭・ポスター】

1. Satoru Iwata, Katsufumi Dejima, Sayaka Hori, Sawako Yoshina, Yuji Suehiro, Tomoko Motohashi and Shohei Mitani, Generation of balancers for maintenance and storage of homozygous-inviable mutants of *Caenorhabditis elegans*. Poster presentation, at the 8th International Meeting of Asian Network of Research Resource Centers, 2016年9月、京都（ポスター）