

平成 28 年度 医療研究開発推進事業費補助金  
成果報告書

## I. 基本情報

事業名： (日本語) ナショナルバイオリソースプロジェクト  
(英語) National Bioresource Project

補助事業課題名： (日本語) 高性能な線虫バランスの整備  
(英語) Construction of high performance balancers for *C. elegans*

補助事業担当者 (日本語) 東京女子医科大学 医学部 第二生理学 教授・講座主任 三谷昌平  
所属 役職 氏名： (英語) Department of Physiology, Tokyo Women's Medical University School  
of Medicine, Professor and Chairperson, Shohei Mitani

実施期間： 平成 28 年 10 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 該当せず  
分担課題名： (英語) Not applicable

補助事業分担者 (日本語) 該当せず  
所属 役職 氏名： (英語) Not applicable

## II. 成果の概要 (総括成果報告)

線虫 *C. elegans* 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 balancer 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 balancer 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 balancer 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。

(1) 線虫 *C. elegans* について、染色体の改変を行うことで、バランスを作成する。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スを作成した。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スされた変異体は、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：①2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。②一つのバランス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スと違い、染色体の異数性が起こらないのでバランス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線誘発バランスと比べ、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、目的のバランスを作成した。実際に、致死変異体 *rab-5 (tm2456)* を新規バランス *tmC18* と既存の転座バランス *hT2* とでバランスし、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スのみの原因で胚致死となった。これらは、従来のバランスに比べて我々の作成したバランス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。

(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、pairing 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。

(3) バランス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 *C. elegans* 学会での発表の後に直ちに公開・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。

The nematode *Caenorhabditis elegans* is a model organism, whose whole genome sequence was sequenced in 1998 for the first animal. Using the information, researchers have been working on the reverse genetics and comprehensive functional genomics. To do these experiments, researchers tried to isolate deletion mutants using genome information. Deletion mutants, which knocked out

the genes of interest, served the good biological resources for functional genomics. Approximately 20% of the deletion mutants so far isolated show lethal or sterile phenotypes. These mutants should be stored by crossing to appropriate balancers as heterozygotes with rearranged chromosome structures, because *C. elegans* usually grow as hermaphrodites and heterozygous mutants are diluted and eventually lost. We aimed to prepare the balancer set to cover whole *C. elegans* genome. This will help our efforts to preserve and distribute deletion mutants and also many researchers to analyze mutant phenotypes with ease.

- (A) Generation of balancers by rearrangement of chromosomes. We used the method published by Iwata et al. (Scientific Reports 6: 33840, 2016). We cut two sites in a chromosome by the CRISPR/Cas9 system using two guide RNA. To make inversions, we used ssODN (single-stranded Oligo Deoxy Nucleotide), which are used as targeting vector sequence to attach two break points with as inverted direction into the original cut chromosome. In this way, we generated first inversion strains (*tmInxx*). Next, we designed second rearrangement sites: one inside of the first inversion and another in either left or right of the first inversion. Again, inversions were induced with the CRISPR/Cas9 system and obtained crossover suppressor balancers. To label and help mutant maintenance, we added knock-in of fluorescent protein reporters and small indel mutations giving rise to such as Unc (uncoordinated movement) and Dpy (dumpy) phenotypes. Balancers generated this way can be used to cross lethal or sterile mutations and stably maintain those mutants. The advantage to use crossover suppressor over previous translocation balancers are followings: (1) Because crossover suppressors have inversions for two times, they don't have homologous sequences near lethal or sterile mutations and thus resistant to re-arrangements. (2) One balancer can cover more wide regions. (3) Unlike classical translocation balancers, crossover balancers do not cause aneuploidy, and thus explanation of phenotypes can be clearer. (4) The rearranged chromosome structures are known unlike classical balancers generated by gamma-ray irradiation. Because preexisting crossover suppressor balancer only cover 15% of the *C. elegans* genome, we generated 13 sets of new crossover balancers to cover the most of the whole genome. We examined a lethal mutation of *rab-5* gene (*tm2456*) and used a crossover balancer *tmC18* and preexisting translocation balancer *hT2* and found that all the *tmC18*-balanced fluorescent negative progeny survived to the L1 stage. By contrast, only one third of *hT2*-balanced fluorescent negative progeny survived to the same stage probably due to aneuploidy. Thus, our crossover balancers will help researchers to obtain more reliable data.
- (B) We integrated crossover suppressors with fluorescent reporter transgenes, labeling with Venus. Animals without fluorescence can be identified homozygotes of mutants, with this way. We also integrated fluorescent reporters into the regions of pairing centers, which are difficult to rearrange by genome editing.
- (C) Balancers are listed and preserved. We are planning to post the database starting the July of this year, just after the international *C. elegans* meeting where we present the balancer project.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 1 件）

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

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

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 8<sup>th</sup> International Meeting of Asian Network of Research Resource Centers, 2016 年 9 月、京都

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 該当なし

(4) 特許出願

該当なし