

# ゲノム情報とゲノム編集技術を用いたカイコ変態制御機構の解明

大門 高明 (京都大学大学院農学研究科応用生物科学専攻)

daimon.takaaki.7a@kyoto-u.ac.jp

## はじめに

完全変態昆虫の幼虫は、幼虫から幼虫への脱皮を繰り返して体サイズを大きくしていき、ある一定のサイズに達すると幼虫から蛹へと変態する。昆虫の脱皮変態は、主に脱皮ホルモンと幼若ホルモンによって制御されている。脱皮ホルモンは脱皮をトリガーする働きを示すが、幼若ホルモンは幼虫から蛹への変態を抑制する作用を示し、幼若ホルモンの存在下では幼虫は幼虫へと現状維持の脱皮を行い、蛹へ変態することはできない。演者は、カイコの眠性変異体（幼虫の脱皮回数が通常と異なる変異体）やゲノム編集ツールを用いた遺伝子ノックアウトカイコの作出・解析を通じて、幼若ホルモンの抗変態作用の分子機構の解明を行い、以下に述べる知見を得た。

## カイコの2眠蚕変異体：幼若ホルモン生合成変異体の発見

カイコは昆虫生理学・遺伝学における古典的なモデル昆虫であり、これまでに多くの自然突然変異体が収集・保存されてきた。その中には、幼虫の脱皮回数が異なる変異体（眠性変異体）も含まれている。通常のカイコの幼虫は4回の脱皮を行い、大きな5齢幼虫と成長してから蛹へと変態する。しかし、眠性変異体には、幼虫の脱皮回数が2回、3回と減るものや、5回へと増えてしまうものが存在する。このような脱皮回数の変異体は他の昆虫では知られておらず、その原因を突き止めることで、昆虫の発育・変態を調節する重要な因子が見つかることが期待されていた。しかし、演者が研究を開始した当時は、カイコの全ゲノム配列が得られておらず、その同定は極めて困難であった。演者はカイコゲノム解析の国際プロジェクトのメンバーとして活動しながら、カイコの生理的形質をカイコゲノムへマッピングする研究を進め、カイコの笹繭遺伝子(1)や体色・色素形成に関わる遺伝子(2-4)を明らかにしていった。その中で、眠性変異体の1つである2眠蚕（にみんさん）(*mod*; *dimolting*)について、その原因遺伝子をついに突き止めることができた(5, 6)。 *mod* の幼虫は通常の5齢ではなく3齢または4齢から早熟変態し、小さな蛹・成虫になってしまう。 *mod* ではチトクローム P450 遺伝子の1つである *CYP15C1* が機能を失っていることを見出し、生化学的解析から、*CYP15C1* は幼若ホルモン生合成の1つのステップ（ファルネセン酸をエポキシ化して幼若ホルモン酸に変換する反応）を触媒することが判明した。 *mod* の体内からは幼若ホルモンが完全に消失していたことから、*CYP15C1* は幼若ホルモン生合成に必須の酵素であることが示唆された。以上から、 *mod* が3齢または4齢から早熟変態する理由は、体内で幼若ホルモンを生合成できないためであると結論された。これは幼若ホルモンを生合成できない変異体として世界で初めての報告例である。

*mod* が早熟変態する理由は判明したものの、この研究



カイコの2眠蚕変異体（右）

は大きな疑問を生むことになった。それは、*mod* の早熟変態はなぜ3 齢以降にしか起きないのか、ということである。これまでの昆虫生理学における常識から考えると、幼若ホルモンが無い昆虫では、いつでも、つまり1 齢や2 齢からでも、蛹へと変態することができるはずである。しかし、*mod* の1 齢・2 齢幼虫が蛹へ変態することは決してなかった。従って、昆虫の幼虫が蛹へ変態するためには、体内からの幼若ホルモンの消失以外にも、何らかの未知の条件が満たされる必要があると考えられた。この問題をさらに追求するために、演者は開発されて間もないゲノム編集ツールのカイコへの応用に取り組み、TALEN 法による遺伝子ノックアウト解析・モザイク解析を実用レベルのツールへと高度化させた(7-12)。

### ゲノム編集カイコを用いた蛹変態の制御機構の解析

1930 年代の Bounhiol, 福田から始まる実験形態学的な研究や、RNAi を用いた研究(13)からも、昆虫の幼虫は若齢のうちには幼若ホルモンがあっても無くても必ず幼虫脱皮を行う可能性が指摘されてきた。しかし、先行研究にはそれぞれ技術的な「穴」があり、この説を証明する決定的な証拠は得られていなかった。そこで演者は TALEN を用いて幼若ホルモンの生合成遺伝子および受容体遺伝子を欠損させたノックアウトカイコを作出し、この説の正否を遺伝学的に厳密に検証することにした(14)。前者は体内に幼若ホルモンが無いカイコとなり、後者は体内に幼若ホルモンがあっても受容体が無いために機能できないカイコとなる。

前者の幼若ホルモンが無いカイコでは、1 齢、2 齢幼虫が蛹に変態することは無く、最も早く変態が誘導されたのは3 齢幼虫になった後からであった。一方、後者の幼若ホルモンの受容体を欠損させたカイコでも、皮膚のごく一部を除いては3 齢幼虫に達するまで幼虫脱皮が起きた。この結果は、幼若ホルモンの有無に関わらず、1 齢幼虫は必ず2 齢へと幼虫脱皮を行うこと、そして、ごく一部の組織を除けば2 齢幼虫も3 齢幼虫へと幼虫脱皮を行うことを示している。つまり、カイコは JH が無ければいつでも蛹変態できる、というわけではないことが明らかになった。

幼若ホルモン受容体のノックアウトカイコは3 齢幼虫に脱皮する際に致死してしまうため、3 齢幼虫より後での表現型を観察することができない。そこで、カイコの遺伝的モザイクシステムを利用して、体の半分だけで幼若ホルモン受容体が機能しない半身モザイクカイコを作出した。この半身モザイク個体でも、やはり1 齢幼虫、2 齢幼虫が蛹に変態することはなく通常の3 齢幼虫になった。ところが、このモザイク個体が4 齢幼虫へ脱皮する際には、体の半身全体で蛹変態が誘導され、その結果、体の半分が蛹・半分が幼虫という半身モザイク個体となった。つまり、蛹へと変態した半身においては、幼若ホルモンが機能していないにも関わらず、3 齢になるまでは蛹へと変態できなかったことになる。この結果は、幼虫の細胞は成長に伴って徐々に蛹への変態能力を獲得していくことを強



幼若ホルモン受容体のモザイクカイコ。右半身で幼若ホルモン受容体遺伝子が壊れているため、右半身だけ蛹に早熟変態する。正常な左半身は幼虫（4 齢）のままである。

く示唆している(13, 14)。

### 蛹変態の条件は？

以上の結果から、カイコの幼虫は若齢のうちには幼若ホルモンがあっても無くても幼虫脱皮を行う(＝蛹へと変態できない)ことが遺伝学的に証明された。それでは、なぜ若齢のカイコは蛹へと変態できないのだろうか？1つの可能性として、幼虫が蛹へ変態するためには体サイズに依存的に産生される因子が必要となるということが考えられる。1930年代、ドイツのPiephoはハチノスツヅリガの1齢幼虫の皮膚を終齢幼虫に移植すると、移植された1齢幼虫の皮膚がダイレクトに蛹の皮膚へと変態できることを報告した。この結果と私たちの結果を合わせると、組織レベルでは1齢幼虫の組織は蛹へと変態できるものの、個体レベルでは1齢幼虫は蛹へと変態できないものと考えられる。おそらく、Piephoの実験においては、終齢幼虫の体液中に存在する液性因子が、1齢の移植片に変態するための能力を付与したために1齢からの蛹変態が可能になったのだと考えられる。一方で、私たちの半身蛹・半身幼虫モザイク個体においては、幼虫の皮膚は成長に伴って徐々に蛹変態能力を獲得していったために、3齢になって初めて蛹化能力を獲得し、4齢への脱皮の際に蛹化したのだと考えられる。

### おわりに

本研究では、カイコの蛹変態の制御機構について、特に幼若ホルモンに着目して研究を行った。幼若ホルモンは昆虫特異的に存在するため、そのアナログは害虫の防除剤や有用昆虫の成長制御剤として利用されている。幼若ホルモンをターゲットとした新規薬剤を開発するには、幼若ホルモンの作用機構の遺伝子基盤を理解する必要がある。また、本研究では、幼虫が蛹へ変態するためには体サイズに依存的に産生される蛹化能力付与因子が必要となる、という新たなパラダイムを提案した。本研究の成果は、昆虫の脱皮変態メカニズムの新たな局面を示したばかりでなく、応用面においても全く新しい作用機構をもつ昆虫成長制御剤や、繭層重や織度をターゲットとしたカイコ品種の分子育種へとつながるものと期待される。カイコは古典的なモデル生物であり、昆虫の脱皮変態という現象もまた、昆虫生理学の古典的な研究課題である。今後も古典的な知を現代の生物学と統合させることで、新たな研究の地平を開拓していきたい。

### 謝辞

本研究は主に、国立研究開発法人農業生物資源研究所昆虫成長制御研究ユニット（生物研；現・国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構）と、東京大学大学院農学生命科学研究科生産・環境生物学専攻昆虫遺伝研究室において実施したものです。本研究にあたり、多大なご指導・ご支援をいただいた、嶋田透教授（東京大学）、篠田徹郎博士（生物研）、瀬筒秀樹博士（生物研）に深く感謝いたします。また、研究の様々な場面でご協力・ご支援を頂いた田村俊樹博士（生物研）、高須陽子博士（生物研）、内堀美和博士（生物研）、内野啓郎博士（生物研）、勝間進准教授（東京大学）、木内隆史助教（東京大学）、伴野豊准教授（九州大学）、比留間潔名誉教授（弘前大学）、そして共同研究していただいた多くの先生方、学生諸氏、研究をサポートしてくださった技術支援者の方々に深く御礼申し上げます。最後に、本賞にご推薦いただいた日本蚕糸学会の皆様にも深く感謝いたします。

## 引用文献

1. Daimon T, *et al.* (2010) The silkworm *Green b* locus encodes a quercetin 5-*O*-glucosyltransferase that produces green cocoons with UV-shielding properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(25):11471-11476.
2. Tatematsu K, *et al.* (2011) Positional cloning of silkworm *white egg 2 (w-2)* locus shows functional conservation and diversification of ABC transporters for pigmentation in insects. *Genes to Cells* 16(4):331-342.
3. Futahashi R, *et al.* (2008) *yellow* and *ebony* are the responsible genes for the larval color mutants of the silkworm *Bombyx mori*. *Genetics* 180(4):1995-2005.
4. Meng Y, *et al.* (2009) The silkworm mutant *lemon (lemon lethal)* is a potential insect model for human sepiapterin reductase deficiency. *Journal of Biological Chemistry* 284(17):11698-11705.
5. Daimon T, *et al.* (2012) Precocious metamorphosis in the juvenile hormone-deficient mutant of the silkworm, *Bombyx mori*. *PLoS Genet* 8(3):e1002486.
6. Daimon T & Shinoda T (2013) Function, diversity, and application of insect juvenile hormone epoxidases (CYP15). *Biotech Appl Biochem* 60(1):82-91.
7. Daimon T (2015) Highly efficient targeted gene disruption in the silkworm, *Bombyx mori*, using genome editing tools. In: *Targeted genome editing using site-specific nucleases* (Yamamoto T ed.) Springer Japan, Tokyo, pp 81-96.
8. Daimon T, Kiuchi T, & Takasu Y (2014) Recent progress in genome engineering techniques in the silkworm, *Bombyx mori*. *Dev Growth Differ* 56(1):14-25.
9. Nakade S, *et al.* (2014) Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9. *Nat Commun* 5:5560.
10. Yoda S, *et al.* (2014) The transcription factor Aponitic-like controls diverse colouration pattern in caterpillars. *Nat Commun* 5:4936.
11. 大門高明 (2014) カイコにおける TALEN を用いた遺伝子改変. *今すぐ始めるゲノム編集*, 山本卓 編 (羊土社, 東京), pp 140-148.
12. 大門高明 (2015) カイコでのゲノム編集. *論文だけではわからない ゲノム編集成功の秘訣 Q&A*, 山本卓 編 (羊土社, 東京), pp 211-219.
13. Smykal V, *et al.* (2014) Importance of juvenile hormone signaling arises with competence of insect larvae to metamorphose. *Dev Biol* 390(2):221-230.
14. Daimon T, Uchibori M, Nakao H, Sezutsu H, & Shinoda T (2015) Knockout silkworms reveal a dispensable role for juvenile hormones in holometabolous life cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(31):E4226-4235.