

高度な昆虫遺伝子制御技術による性決定と幼虫形質発現の機構解明

木内隆史（東京大学大学院農学生命科学研究科）

kiuchi@ss.ab.a.u-tokyo.ac.jp

はじめに

カイコはもはや絹糸を得るためだけに飼育される昆虫ではない。蛍光シルクなど付加価値を高めた糸はもちろん、医薬品の生産にも利用されるし、創薬モデルとして有用なことも実証された。さらに遺伝子組換えカイコ（図1）の第一種使用規定の承認の後押しを受けて、今後の新“蚕”業創出の動きが益々活発化している。このような背景のもと、より便利かつ有能で使いやすいカイコの作出が望まれている。カイコを改良するためには基礎科学と応用科学の双方の充実が不可欠である。すなわち、生命現象の遺伝子レベルでの理解と遺伝子改変技術の向上が重要である。

演者らは、カイコの性を自由に操作することを目指し、カイコの性決定の分子機構を明らかにした。また、カイコのゲノムを改変する際の形質マーカーとして有用な、幼虫の体色や斑紋形成に関与する遺伝子の同定と機能解析を行った。



図1. 遺伝子組換えカイコ
蛍光タンパク質が複眼で発現している。

カイコ雌化因子の発見

絹糸の生産効率は雌よりも雄の方が高く、また繭糸も雄の方が細く長い。そのため、効率よく織度が均一な生糸を生産できる雄のカイコのみを飼育する技術開発が古くから行われてきた。例えば、雌雄で体色や斑紋に異なる形質を示す雌雄鑑別が容易な限性系統の作出が行われた。しかし、はじめから雄のみを飼育できればそれに越したことはない。雄蚕飼育はタンパク質生産性の向上や遺伝子組換えカイコの流出を防ぐ上でも有効な手段となる。この理想を実現するためには、カイコの性決定機構を遺伝子レベルで理解し、性を制御する必要がある。しかしながら、カイコをはじめとしたチョウ目昆虫の性決定機構はほとんど明らかにされていなかった。

カイコの性染色体構成は雌 ZW/雄 ZZ の雌ヘテロ型であり、W 染色体があれば雌になることが 80 年以上前からわかっていた。しかし、W 染色体上にあると推測された雌決定遺伝子は、W 染色体の反復配列と雌で組換えが起きないという特徴により同定に困難を極めた。演者らは分子マーカーにより雌雄を分けた初期胚のトランスクリプトームを比較することで、雌のみで発現する W 染色体由来の転写産物 *Feminizer (Fem)* を発見した¹⁾。*Fem* は小分子 RNA の一つである PIWI interacting RNA (piRNA) の前駆体であったため、*Fem* に由来する piRNA (*Fem piRNA*) のはたらきを抑制することで、これが雌化因子であることを確かめる必要があった。演者らは *Fem piRNA* に相補な配列をもつインヒビター RNA を胚子にマイクロインジェクションすることで、その雌化能を証明するに至った¹⁾。カイコの性は図2に示す仕組みにより決められていることが明らかになった。

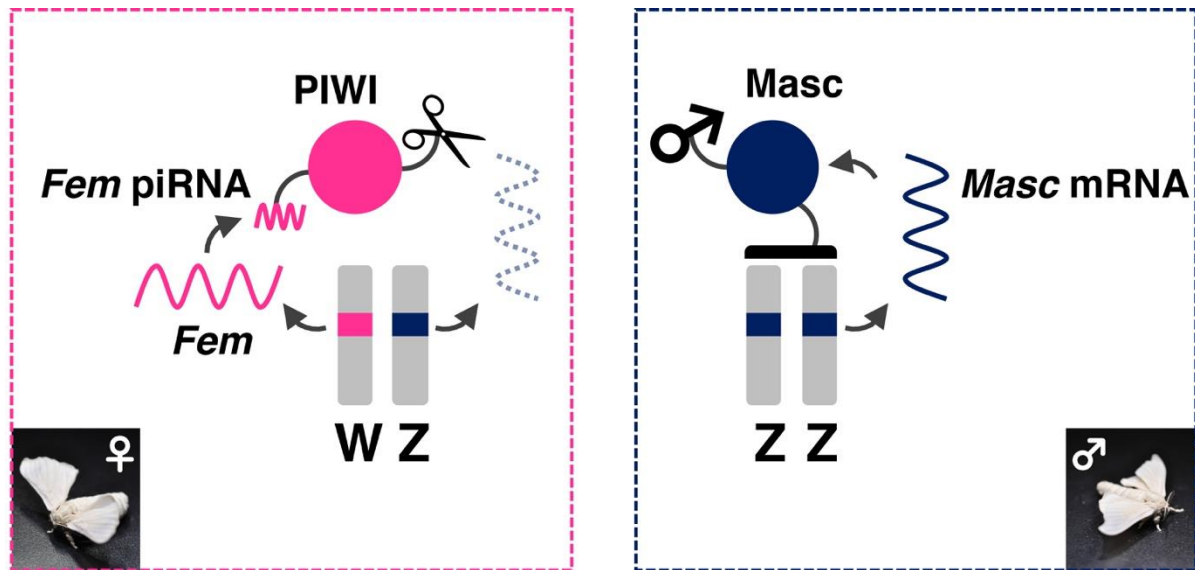


図2. カイコの性決定の分子メカニズム

雌においてはW染色体に由来する転写産物*Fem*から*Fem piRNA*が産生される。*Fem piRNA*はヌクレアーゼ活性をもつPIWIタンパク質と複合体を形成し、Z染色体に由来する*Masc mRNA*を切断し、分解する。その結果、雌になる。雄においてはW染色体が存在しないため、*Masc mRNA*は正常にタンパク質に翻訳される。*Masc*タンパク質は雄化と遺伝子量補正の二つの役割を担っており、雄で二本分あるZ染色体上にある遺伝子の発現を抑制する。

新奇雄化因子の発見

一般的に piRNA はトランスポゾンに相補な配列をもち、ヌクレアーゼ活性をもつ PIWI タンパク質と複合体を形成することでトランスポゾンを切断し、抑制している。しかし、*Fem piRNA* は Z 染色体上にある機能未知のタンパク質コード遺伝子を標的としていた¹⁾。そこでこの遺伝子の機能を調べるために、siRNA を設計し、胚子にマイクロインジェクションした。その結果、この遺伝子の雄化能を証明することに成功し、*Masculinizer (Masc)* と名付けた (図 2)¹⁾。同じ手法をカイコガ科の近縁種にも最適化し、イチジクカサンのオーソログも同様に雄化能をもつことが確認された²⁾。今のところ、チョウ目昆虫に共通の雄化因子であると考えている。

Masc の RNA 干渉の結果からは、さらに重要な知見が得られた。*Masc* の発現を抑制すると雄化が起こるだけでなく、Z 染色体上の遺伝子の発現が亢進し、胚致死となった¹⁾。この結果は *Masc* が雄化のみならず遺伝子量補正にも関与していることを示している (図 2)³⁾。これはチョウ目昆虫における遺伝子量補正機構の存在を明確に示した初めての例であった。

演者らは *Fem piRNA* によって標的にされない *Masc* 遺伝子 (*Masc-R*) をデザインし、雌に導入することで雄化を試みた⁴⁾。結局、*Masc-R* を強制発現した雌は致死してしまうため雄化できないことがわかったが、「雌蚕致死カイコ系統」として特許を出願した。今後、*Masc* の作用機序を完全に理解することで、性転換を実現したいと考えている。

共生細菌による宿主雄殺し現象の標的

トウモロコシの害虫であるアワノメイガでは共生細菌ボルバキアの感染により雄のみが致死する雄殺し現象が報告されている。ボルバキアによる宿主の性操作が行われていることがわかっているが、雄殺しの分子メカニズムは明らかになっていない。演者らはカイコ *Masc* の RNA 干渉で見られた雄特異的な胚致死と雄殺し現象との類似から、ボルバキアは *Masc* を標的とすることで遺伝子量補正を破綻させ、雄殺しを誘導していると仮説を立てた。そして、感染胚子と非感染胚子のトランスクリプト

ーム解析を行うことで、ボルバキアに感染している胚子では *Masc* の発現が抑制されていること、また、Z染色体上の遺伝子の発現が亢進していることを明らかにした(図3)⁵⁶⁾。さらに、演者らは合成した *Masc* cRNA のボルバキア感染胚子へのマイクロインジェクションを試み、雄殺しの回避に成功した⁵⁶⁾。自然界で利用されていることから、*Masc* は性操作の有効な標的であると期待される。

このように、カイコで得ら

れる知見は他のチョウ目昆虫の理解にも役に立つ。農作物の害虫はチョウ目昆虫が多いため、カイコをモデルとした基礎研究は害虫防除の観点からも重要な意味を持つ。

カイコ幼虫の体色と斑紋形成に関与する遺伝子の同定と機能解析

カイコにおいては体色や斑紋が異なる多くの突然変異体が保存されているが、これらの形質を引き起こす原因遺伝子が明らかになると、カイコに有用遺伝子を導入し維持するための形質マーカーとして利用することができる。演者らは、体色や斑紋形成に関わる複数の遺伝子を様々な遺伝子機能解析技術を用いることで明らかにした。

真皮細胞への尿酸の蓄積のため白く不透明なカイコの皮膚が半透明となる突然変異体 *ok* (金鶏竜油) と *otm* (t-斑油) の原因遺伝子が、それぞれ尿酸輸送と尿酸顆粒の形成に関わる遺伝子であることを、胚子あるいは幼虫真皮細胞における RNA 干渉により突き止めた^{7,8)}。また、ゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 システムを導入し⁹⁾、*ok* のパラログ *Bm-brown* のノックアウトを行うと、体色は変化しないもののマルピーギ管へのリポフラビン蓄積が阻害され黄色から白色になることがわかった¹⁰⁾。さらに、特徴的な斑紋形質を示す突然変異体 *q* (かすり) の原因遺伝子を純遺伝学的に絞り込み、ノックアウトすることで同様の斑紋形質を再現した(図4)¹¹⁾。

おわりに

今回、長年未知であった性決定に関わる因子が同定されたことで、カイコを性操作する際の標的遺伝子を得ることができた。今後、その作用機序を明らかにすることができれば完全な意味での雄蚕飼育が可能になる日も夢ではなくなるかもしれない。演者らは他に、休眠性、食性、生産性などの遺伝子レベルでの理解に取り組んでいる。また、遺伝子改変技術としてゲノム編集技術を用いたノックインシステムの確立を目指している。生命現象の理解とゲノム改変技術の向上を進め、次世代を担うカ

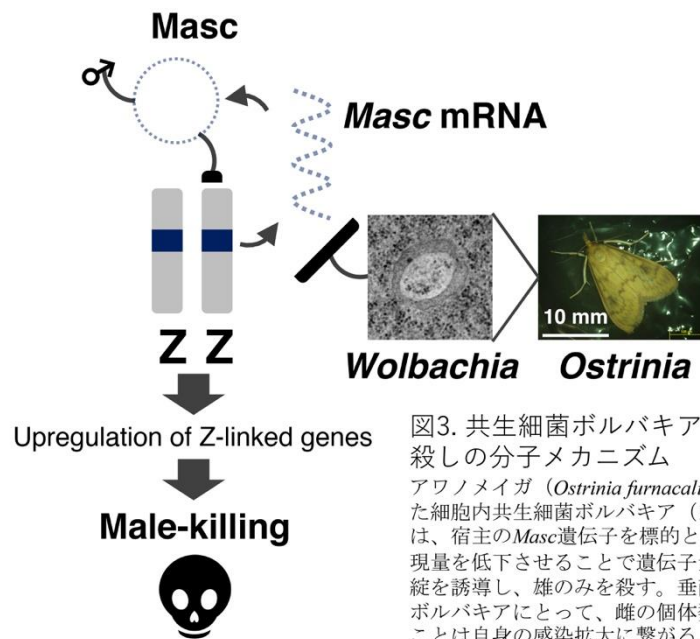


図3. 共生細菌ボルバキアによる雄殺しの分子メカニズム
アワノメイガ (*Ostrinia furnacalis*) に感染した細胞内共生細菌ボルバキア (*Wolbachia*) は、宿主の *Masc* 遺伝子を標的とし、その発現量を低下させることで遺伝子量補正の破綻を誘導し、雄のみを殺す。垂直伝播するボルバキアにとって、雌の個体数を増やすことは自身の感染拡大に繋がる。



図4. かすり変異体原因遺伝子のKO
上がWT、下がKO。斑紋が後方に流れたように見える。

イコを作出していきたい。

謝辞

本賞の受賞にあたっては、一般社団法人日本蚕糸学会から推薦を賜りました。嶋田透会長をはじめ関係の皆様には厚く御礼申し上げます。本講演で紹介した研究は主に、川本宗孝氏、菅野純夫教授、鈴木穰教授、鈴木雅京准教授、勝間進准教授、嶋田透教授（東京大学）、笠嶋めぐみ博士、瀬筒秀樹博士（農研機構）、伴野豊教授（九州大学）、大門高明教授（京都大学）との共同研究の成果です。特に、勝間進准教授、嶋田透教授には、研究を進める上で多大なご指導とご支援をいただきました。学生時代の恩師である青木不学教授（東京大学）、永田昌男博士には、現在の研究に繋がる知識と技術を学びました。また、東京大学昆虫遺伝研究室の皆様には研究の遂行にあたり多大なるご協力をいただきました。受賞に繋がる研究成果には、学生が主体になって進めてくれたものが多く含まれております。皆様に深く感謝し、心より御礼申し上げます。

引用文献

- 1) **Kiuchi T.**, Koga H., Kawamoto M., Shoji K., Sakai H., Arai Y., Ishihara G., Kawaoka S., Sugano S., Shimada T., Suzuki Y., Suzuki M.G. and Katsuma S.: *Nature* 509:633-636 (2014)
- 2) Lee J., **Kiuchi T.**, Kawamoto M., Shimada T. and Katsuma S.: *Insect Molecular Biology* 24:561-569 (2015)
- 3) 木内 隆史: 蚕糸・昆虫バイオテック, 84:17-24 (2015)
- 4) Sakai H., Sumitani M., Chikami Y., Yahata K., Uchino K., **Kiuchi T.**, Katsuma S., Aoki F., Sezutsu H. and Suzuki M.G.: *PLoS Genetics* 12:e1006203 (2016)
- 5) Fukui T*, Kawamoto M*, Shoji K*, **Kiuchi T***, Sugano S., Shimada T., Suzuki Y. and Katsuma S.: *PLoS Pathogens* 11:e1005048 (2015) (*These authors contributed equally to this work.)
- 6) 木内 隆史: *アグリバイオ*, 14:17-21 (2017)
- 7) Wang L., **Kiuchi T.**, Fujii T., Daimon T., Li M., Banno Y., Kikuta S., Kikawada T., Katsuma S. and Shimada T.: *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 43:562-571 (2013)
- 8) Zhang H., **Kiuchi T.**, Wang L., Kawamoto M., Suzuki Y., Sugano S., Banno Y., Katsuma S. and Shimada T.: *Gene* 629:92-100 (2017)
- 9) Daimon T., **Kiuchi T.** and Takasu Y.: *Development, Growth & Differentiation* 56:14-25 (2014)
- 10) Zhang H., **Kiuchi T.**, Hirayama C., Katsuma S. and Shimada T.: *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 92:65-72 (2018)
- 11) Yuasa M., **Kiuchi T.**, Banno Y., Katsuma S. and Shimada T.: *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 68:33-40 (2016)