

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06075

研究課題名(和文) 真皮細胞における尿酸合成能の発見と生理・遺伝学的解析

研究課題名(英文) Identification and genetic characterization of uric acid synthesis in the integument of the silkworm, *Bombyx mori*

研究代表者

藤井 告 (Fujii, Tsuguru)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：50507887

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム情報が整備されたモデル昆虫であるカイコでは、真皮細胞の尿酸蓄積量が低下した変異体が多数分離されており、それらの皮膚が油紙のように透明化することから「油蚕：あぶらこ」と総称されている。カイコの油蚕は、チョウ目昆虫の幼虫が尿酸を真皮細胞に蓄積するメカニズムを分子遺伝学的に解明する上で好個な材料である。本研究では、RNA-seq解析やゲノム編集解析により、新たに3種の油蚕の原因遺伝子を同定することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カイコの油蚕変異体の原因遺伝子の解析を通じて、昆虫の窒素代謝の分子機構の理解が深まった。尿酸合成の鍵酵素であるキサンチン脱水素酵素(XDH)の活性に抗酸化酵素の一種であるペルオキシレドキシシン6(Prx6)が必須であるという知見は、尿酸代謝や抗酸化酵素の研究が盛んに行われている哺乳類においても知られていない。今後、カイコのPrx6がXDH活性を制御するメカニズムを解明することができれば、尿酸代謝の破綻を通じて害虫を不妊化する害虫駆除法の開発につながる。

研究成果の概要(英文)：The silkworm, *Bombyx mori*, is a model insect with high-quality genome assembly. In *B. mori*, uric acid accumulates in granules to yield a white color and opaqueness to the larval integument; consequently, lack of UA granules causes a translucent larval integument. *B. mori* is rich in translucent mutants that are useful for isolating the genes governing uric acid biosynthesis and accumulation. In this study, causative genes of three translucent mutants were identified.

研究分野：昆虫遺伝学

キーワード：昆虫 窒素代謝 尿酸 抗酸化酵素 ペルオキシレドキシシン ゲノム編集 CRISPR/Cas9 ノックイン

1. 研究開始当初の背景

動物や昆虫は、タンパク質などの含窒素化合物の代謝の過程で生じるアンモニアを体内で無毒化して排泄する。昆虫では、アンモニアを尿酸に変換して排泄するのが一般的である。一方チョウ目昆虫の幼虫は、尿酸を排泄すると同時に皮膚の真皮細胞に大量に蓄積する。その量は、カイコの場合には皮膚乾物重の1割を超える。尿酸は体内への紫外線の透過を物理的に遮断するだけでなく、抗酸化物質として機能し、活性酸素の発生を介した紫外線障害から虫体を保護している。チョウ目昆虫の幼虫は種ごとに異なった多種多様な体色や模様を有するが、カイコの白い虫体が尿酸に起因するように、尿酸は皮膚において白色の色素としても機能する。アゲハチョウの若齢幼虫が示す白色と黒色から構成された鳥のフン様の模様は、尿酸とメラニンが皮膚に排他的に存在することによって実現している。

ゲノム情報が整備されたモデル昆虫であるカイコでは、真皮細胞の尿酸蓄積量が低下した変異体が多数分離されており、それらの皮膚が油紙のように透明化することから「油蚕:あぶらこ」と総称されている。カイコの油蚕は、チョウ目昆虫の幼虫が尿酸を真皮細胞に蓄積するメカニズムを分子遺伝学的に解明する上で好適な材料である。尿酸を合成できない油蚕では、共通して蛹期での高い死亡率や成虫の不妊化が認められる。昆虫の尿酸合成を支配する分子機構が解明できれば、尿酸合成経路の破綻により害虫を致死・不妊化させる新規な防除法の開発に繋がる。

2. 研究の目的

1960年に発表された先駆的な研究に基づいて、カイコ幼虫の真皮細胞では尿酸を合成することができず、代わりに脂肪体で合成された尿酸が体液を經由して真皮細胞に集積されると考えられてきた。哺乳類では尿酸は主に肝臓で合成されるが、昆虫の脂肪体は哺乳類の肝臓に該当する器官であるため、この考えは国内外を通じて、現在に至るまで受け入れられてきた。

一方申請者は、尿酸合成を支配する遺伝子をターゲットにしたモザイク解析を行うと、透明な皮膚と不透明な皮膚を有したモザイク個体(油モザイク)が得られることを発見した(Fujii and Banno, 2019. *Insect Biochem Mol Biol*)。モザイク解析とは、一個体中に遺伝子型の異なる細胞を共存させ、遺伝子型と表現型との関係を調査する手法である。昆虫は開放血管系なので、体液を經由して真皮細胞へ運搬される尿酸の量はモザイク個体内のどの部位でも均一である。油モザイクの出現は、尿酸が真皮細胞で合成されていることを示す。この新発見は、チョウ目昆虫の幼虫の真皮細胞が尿酸合成能を有しているために、水に難溶の尿酸を真皮細胞に大量に蓄積可能であることを示唆する。チョウ目昆虫の幼虫が尿酸を真皮細胞に蓄積するメカニズムを解明するためには、真皮細胞の尿酸合成能を理解する必要がある。そこで本研究では、昆虫の尿酸合成における真皮細胞の役割を生理・遺伝学的に解析する。また、油蚕の原因遺伝子を同定することで、昆虫の尿酸合成を支配する分子機構を解明する。

3. 研究の方法

昆虫の尿酸合成を支配する鍵酵素はキサンチンデヒドロゲナーゼ(XDH)である。カイコの組織から抽出したタンパク質の Native-PAGE 後の活性染色やウェスタンブロッティングにより、XDH 活性や XDH の存在を検証する。ポジショナルクローニングや次世代シーケンス解析により油蚕の原因遺伝子を同定すると同時に、ゲノム編集により遺伝子の機能解析を行う。

4. 研究成果

- (1) 5 齢幼虫の皮膚由来のタンパク質において、Native-PAGE による XDH の活性染色を行ったが、脂肪体由来のタンパク質とは異なり、XDH の活性を検出することはできなかった。また、ウェスタンブロッティングにより真皮細胞における XDH の存在の確認を試みたが、作製した抗体がカイコの XDH を認識しなかった。そこで、カイコ XDH の生化学的研究を行うための材料として、CRISPR/Cas9 によるノックインにより XDH の C 末に FLAG タグを導入することを試みた。XDH 遺伝子の終止コドンの近傍を切断する sgRNA を 2 種、左右のホモロジーアームと FLAG タグ配列から構成される 144-nt の一本鎖オリゴを調整し、ノックイン実験を行った。その結果、終始コドンの上流に 24-bp の FLAG タグ配列を挿入することに成功し、ノックイン系統を樹立することもできた。しかし、上流のホモロジーアームが期待どおりに機能しなかったため、XDH 遺伝子に 10-bp の欠失を伴っており、フレームシフトのために XDH を FLAG タグで標識するには至らなかった。
- (2) 油蚕変異体の一種である p 油(*op*)の原因遺伝子を同定するために、皮膚において RNA-seq 解析を行った。得られたショートリードを HISAT2 で参照配列へマッピングし、Samtools で SNP や indel を網羅的に同定したあと、各変異がジーンモデルに与える影響を SnpEff で

予測した。その結果、*p*油では尿酸の前駆体であるイノシンの合成を支配する 5'-nucleotidase II (cN-II)のカイコホモログをコードする遺伝子において 4-bp の挿入変異があることが判明した。当該遺伝子をターゲットとしたゲノム編集実験を行った結果、*G*₀世代と *p*油との交配によって再び油蚕が生じたこと、イノシンの経口投与により油蚕が不透明化したことから、*op*座の原因遺伝子はカイコの *cN-II* であることが判明した。

- (3) 矮小不眠蚕(*nm-d*)は孵化個体が2齢になることなく致死する変異体である。矮小不眠蚕は自然突然変異として発見されたモザイク油の後代で発見されたことから、尿酸代謝に何らかの異常を有していることが推定されていた。そこで、矮小不眠蚕の原因遺伝子を同定するために、変異体(12頭)と正常個体(16頭)の1齢幼虫を集団でRNA-seq解析に供試した。得られたショートリードを参照配列へマッピングし、変異体でホモ型、正常個体でヘテロ型となったSNPを選抜し、*nm-d*が連鎖する第9染色体上でのSNPの分布を調査した。その結果、SNPが最も高密度に存在していた0.5 Mbの範囲内に位置し、尿酸の前駆体であるイノシンの合成を支配する 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase (ATIC)のカイコホモログをコードする遺伝子において、矮小不眠蚕特異的なエクソンスキップを同定した。当該遺伝子をターゲットとしたゲノム編集システムを確立した結果、矮小不眠蚕様の不眠蚕が分離し、その不眠蚕は *nm-d* 系統 a47 とゲノム編集システムとの交配によっても得られたことから、*nm-d*座の原因遺伝子はカイコの *ATIC* であることが判明した。
- (4) 無卵油 (*oel*)は、幼虫期には油蚕となり、成虫化しても造卵できない変異体である。*oel*座がZ染色体に連鎖しているため、原理的にホモ型の雄を得ることができない。ウシ由来のキサンチンオキシダーゼ(XO)を幼虫体内へ注射すると皮膚が不透明化することから、*oel*個体ではカイコの尿酸合成の鍵酵素であるXDHの活性に異常があることが推定されている。既にRNA-seq解析により、無卵油では抗酸化酵素の一種であるペルオキシレドキシシン(Prx)をコードする遺伝子(*Prx6*)においてフレームシフトを生じさせる1塩基欠失が存在することが判明している。Prxは幅広い生物において抗酸化機能を有することが知られている抗酸化酵素であるが、XDHやXOの活性制御との関連は不明である。そこで、カイコの尿酸代謝におけるPrxの役割を解明するためにCRISPR/Cas9によるゲノム編集を行った。カイコゲノムには5個のPrx遺伝子の存在が報告されている。Prxの機能の特異性と共通性を理解するために、*Prx1*についてもゲノム編集を行った。その結果、*Prx1*のノックアウト個体では発育の遅延が認められたが幼虫皮膚は正常であった。一方、*Prx6*のノックアウト個体では幼虫皮膚が透明化し、無卵油同様の形質異常を示した。この結果から、*Prx6*が*oel*座の原因遺伝子であることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fujii Tsuguru, Kakino Kohei, Fukumori Hisayoshi, Hino Masato, Lee Jae Man, Kusakabe Takahiro, Banno Yutaka	4. 巻 138
2. 論文標題 Non-molting dwarf (nm-d) as a mutant of Bombyx mori with a defect in purine synthesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Insect Biochemistry and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 103636 ~ 103636
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ibmb.2021.103636	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujii Tsuguru, Kakino Kohei, Tanaka Miyu, Lee Jae Man, Kusakabe Takahiro, Banno Yutaka	4. 巻 126
2. 論文標題 A defect in purine nucleotide metabolism in the silkworm, Bombyx mori, causes a translucent larval integument and male infertility	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Insect Biochemistry and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 103458 ~ 103458
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ibmb.2020.103458	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 藤井告	4. 巻 5
2. 論文標題 九州大学のカイコリソース：基礎研究から物質生産まで（特集 生物資源の保存と利用：ナショナルバイオリソースプロジェクト）	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 608-612
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 藤井告	4. 巻 56
2. 論文標題 カイコのゲノム編集と次世代シーケンス解析（特集 カイコガの最近の話題）	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 昆虫と自然	6. 最初と最後の頁 5-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤井告, 田中未祐, 柿野耕平, 福森寿善, 金児雄, 李在萬, 日下部宜宏, 伴野豊
2. 発表標題 カイコの尿酸代謝を支配する抗酸化酵素の同定
3. 学会等名 日本蚕糸学会第91回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井告, 柿野耕平, 李在萬, 日下部宜宏, 伴野豊
2. 発表標題 混合サンプルのRNA-seq 解析によるカイコの致死遺伝子の迅速同定
3. 学会等名 第65回日本応用動物昆虫学会大会,
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井告, 山本和典, 田村圭, 西川和弘, 伴野豊
2. 発表標題 RNA-seq解析とゲノム編集によるp油(op)の原因遺伝子の解明
3. 学会等名 日本蚕糸学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤井告, 伴野豊
2. 発表標題 クワコ染色体置換系統のカイコ変異体マッピングへの利用
3. 学会等名 日本応用動物昆虫学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------