

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21311

研究課題名(和文) 広宿主域・高活性の卵移行リガンドの開発による昆虫のゲノム編集革命の創出

研究課題名(英文) Development of a novel method for insect gene editing by adult injection

研究代表者

大門 高明(Daimon, Takaaki)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：70451846

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、昆虫のメス成虫へのインジェクションによってゲノム編集を可能とする、革新的なゲノム編集法の開発を目的とした。本課題では、(1)成虫インジェクションには汎用的に用いられる市販のCas9を用いれば良いこと、(2)卵黄形成期を適切に狙って注射することにより、ゲノム編集効率を飛躍的に高めることができること、(3)遺伝子ノックイン個体の作出にも適用できること、などを明らかにした。本課題で開発した新法(Direct Parental CRISPR、DIPA-CRISPR)は、今後の昆虫ゲノムの人為操作を飛躍的に容易にするものと期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昆虫科学は昆虫の特異な形態・生理・生態を理解することで将来にわたる人類の生存を保証しようとする学問分野である。本課題では、革新的な昆虫ゲノム編集法を開発に取り組み、成虫に注射することで高効率にゲノム編集を行うことができる方法(DIPA-CRISPR)を確立した。本法の開発によって、ゲノム編集ツールCas9 RNP(市販品でよい)を成虫に注射するだけ、という簡便な方法で昆虫のゲノム編集を行うことができるようになった。

研究成果の概要(英文)：In this project, we developed a simple and accessible method for insect gene editing, termed Direct Parental CRISPR (DIPA-CRISPR). We show that injection of Cas9 ribonucleoproteins (RNPs) into the haemocoel of adult females efficiently introduces heritable mutations in developing oocytes. Importantly, commercially available standard Cas9 protein can be directly used for DIPA-CRISPR, which makes this approach highly practical and feasible. DIPA-CRISPR enables highly efficient gene editing in the cockroaches, on which conventional approaches cannot be applied, and in the model beetle *Tribolium castaneum*. Due to its simplicity and accessibility, DIPA-CRISPR will greatly extend the application of gene editing technology to a wide variety of insects.

研究分野：昆虫科学

キーワード：ゲノム編集 遺伝子編集 昆虫 形質デザイン 昆虫機能利用

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

これまで、昆虫のゲノム編集は、受精直後の初期胚にマイクロインジェクションする方法に依存してきた。しかし、この方法が極めて困難か、あるいは事実上不可能な昆虫が存在する。昆虫の中には、卵鞘、卵胎生、膠着物質、極端に硬い卵殻を持つものが存在し、これらの種には従来の初期胚へのインジェクションが適用できない。2018年、このような「難インジェクション昆虫」問題の解決策となる可能性をもった新しい方法が提案された。これは、ショウジョウバエの卵黄タンパク YP1 の断片を Cas9 に融合させ、それを卵黄形成期のメス成虫の体腔内に注射する、という方法である(Chaverra-Rodrigues et al. 2018 Nat Commun; 原報では蚊でゲノム編集)。しかし、この方法はゲノム編集効率が低く、また、特別な準備(Cas9 のエンジニアリング等)も必要であることから、様々な昆虫で広く使われる方法への一般化が困難であった。

### 2. 研究の目的

そこで本研究は、成虫注射によって効率よく様々な昆虫種で使用できる、より汎用性の高い昆虫ゲノム編集法の開発を目的とした。誰でも、すぐに、簡単に、あらゆる昆虫で使用可能なゲノム編集法を確立することができれば、それは昆虫科学の発展を基礎・応用の両面から強力に牽引してくれるはずである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 卵移行リガンドの探索：

本研究ではまず、幅広い昆虫種で機能する、高宿主域の卵移行ペプチドの探索・開発を試みた。昆虫の卵黄タンパク質の前駆体であるピテロジェニンの断片を、GFP に融合させ、その融合タンパク質をメス成虫にインジェクションした。卵母細胞への GFP の取り込み(緑色蛍光)を指標に、ピテロジェニン断片の卵移行能力をテストし、複数の断片において卵移行能力を比較、評価した。

#### (2) 市販の Cas9 の成虫注射によるゲノム編集法の開発：

上記のプロジェクトを行う過程で、市販品の Cas9 を並行してテストしたところ、これの注射によっても昆虫のゲノム編集を行うことができることを見出した。そこで、各種の実験条件を検討することで、この方法(DIPA-CRISPR 法と命名)の実現可能性を追求した。

#### (3) DIPA-CRISPR 法の最適化：

チャバネゴキブリ(ゴキブリ目)、コクヌストモドキ(コウチュウ目)をモデルとして、DIPA-CRISPR 法の最適化を行った。用いる試薬の種類・量、注射のタイミング、スクリーニングのデザイン等を検討し、DIPA-CRISPR 法による昆虫ゲノム編集の効率の最大化を行った。

#### (4) DIPA-CRISPR 法による遺伝子ノックイン：

DIPA-CRISPR 法が遺伝子ノックインにも用いることができるか否かを調べるために、コクヌストモドキにおいて遺伝子ノックイン実験を行った。テンプレートとして ssODN(single strand oligonucleotide)を用い、これを Cas9 RNP (ribonucleoprotein) と co-injection し、遺伝子ノックイン個体のスクリーニングを行い、その効率を評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 卵移行リガンドの探索：

受容体と結合すると予測されたピテロジェニン(カイコ由来)の領域の断片配列を GFP 配列と融合させ、そのリコンビナントタンパクを大腸菌で発現・精製し、メス成虫(蛾、甲虫、ゴキブリ、コオロギ等)に注射した。注射後半日程度で卵巣を解剖し、卵母細胞内に GFP が取り込まれたか否かを調査した。その結果、ある断片において卵母細胞内の GFP シグナルが顕著に増加することを見出した。そこで、この断片を Cas9 に融合させ、それを用いて成虫注射によるゲノム編集を試みた。ところが、期待に反して、ゲノム編集個体を得ることができなかった。

(2) 市販の Cas9 の成虫注射によるゲノム編集法の開発 :

(1) において、ゲノム編集個体が得られなかったため、その原因を追求することにした。その過程で、ネガティブコントロールとして市販品の Cas9 を並行してテストしたところ、予想に反して、こちらではゲノム編集個体が多数得られることを見出した。テストしたコクヌストモドキ、チャバネゴキブリの両者においてゲノム編集個体が再現性良く得られたため、この方法を DIPA-CRISPR (Direct parental CRISPR) と命名し、DIPA-CRISPR 法の最適化を行うことにした。

(3) DIPA-CRISPR 法の最適化 :

チャバネゴキブリ、コクヌストモドキを用いて、DIPA-CRISPR 法の最適化を試みた。評価した項目は、(i) 注射するタイミング、(ii) 用いる試薬の種類、(iii) 注射する試薬の量、(iv) スクリーニングの方法、などである。

(i) 注射するタイミング: 我々がテストした結果、DIPA-CRISPR 法の成否/効率の鍵を握る最も重要なパラメータが注射する成虫のステージであることが判明した。卵黄形成期のメス成虫を適切に狙うことによって、チャバネゴキブリではゲノム編集効率(生まれた子のうち何割の子が変異アリルをもつか)は 20% に達し、コクヌストモドキでは 50% を超えるほどの高効率化を達成することができた(図 1、2)。

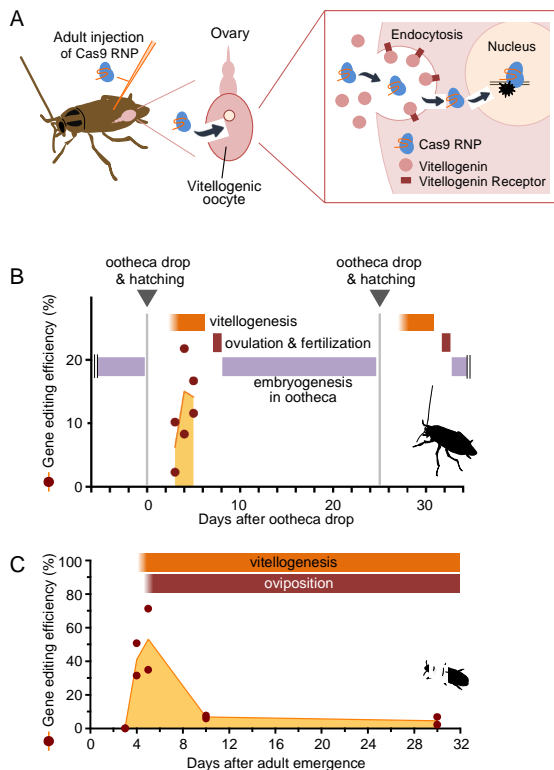


図 1. DIPA-CRISPR 法による昆虫ゲノム編集

(A) DIPA-CRISPR 法の原理。体腔内に Cas9 RNP を注射すると、その一部がエンドサイトーシスによって非選択的に卵母細胞内に取り込まれる。

(B) チャバネゴキブリにおけるゲノム編集効率。卵黄形成期(図中の vitellogenesis の時期)に注射すると、ゲノム編集効率(赤丸)は 20% に達する。

(C) コクヌストモドキにおけるゲノム編集効率。羽化後、卵黄形成が開始されるタイミングで注射すると、ゲノム編集効率は 50% を超えるようになる。



図 2. ゲノム編集によって作出した遺伝子ノックアウトゴキブリ

DIPA-CRISPR によって樹立した、眼の黒色素を欠損したノックアウトゴキブリ系統(チャバネゴキブリ)。

(ii) 用いる試薬: CRISPR/Cas9 システムにおいて、Cas9 と gRNA は必須のコンポーネントで

あるが、成虫注射によるアプローチにおいては、さらに Endosomal Escape Reagent (EER) の使用が提案されていた。我々の検討の結果、実験に用いる Cas9 は特定のメーカーのものである必要はなく、供試した 4 社の Cas9 はすべて同等のパフォーマンスを示すことが明らかになった (図 3)。また、EER の使用によってゲノム編集効率が顕著に向上することはなく、むしろ、産卵数や生存率に悪影響を及ぼすことが明らかになった。したがって、DIPA-CRISPR 法には、Cas9 と gRNA という、最小限のコンポーネントの使用で十分であることになる。

Company	Stage of injection	EER	Females injected	Survival rates	Screened G <sub>0</sub>	G <sub>0</sub> edited animals		Gene editing efficiency (GEF)
						white	mosaic	
IDT	4 days AE	-	73	100%	63	25	7	50.8%
		-	36	97.2%	54	12	5	31.5%
Sigma-Aldrich	4 days AE	-	59	100%	22	3	3	27.3%
		-	76	98.7%	55	14		25.5%
FUJIFILM Wako	4 days AE	-	73	98.6%	101	14	10	23.8%
		-	78	100%	29	6	1	24.1%
Fasmac	4 days AE	-	50	100%	22	6	1	31.8%

図 3 . Cas9 の性能比較

4 社から市販される Cas9 をコクヌストモドキでテストしたところ、DIPA-CRISPR に用いた際のゲノム編集効率はすべて同程度であった。

(iii) 注射する試薬の量： 注射する Cas9 RNP の量を段階的に減らし、ゲノム編集効率に与える影響を調査した。その結果、注射する量が減るにしたがってゲノム編集効率も低下していくことがあきらかになった (図 4)。試薬の量が増えるとコストも増大するが、その増加分はゲノム編集効率の上昇によって相殺される。したがって、高濃度の Cas9 RNP を注射することが実用的であるものと考えられた。

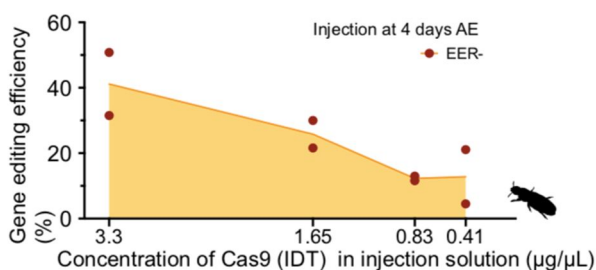


図 4 . Cas9 RNP の濃度とゲノム編集効率との関係

ゲノム編集効率は、注射する試薬の量を減らすと量依存的に低下していく。しかし、テストした最低濃度においてもなお、高効率なゲノム編集が可能であった点に注意。

(iv) スクリーニングの方法： 成虫に注射した Cas9 RNP は、時間経過とともに分解されていくと考えられる。実際に、注射後の経過時間と、その間に産み落とされた卵におけるゲノム編集効率の関係を調査したところ、注射後 24 時間以内に産み落とされた卵において、ゲノム編集効率が最も高くなり、48 時間以降に産み落とされた卵においてはほとんどゲノム編集が起きていないことがあきらかになった。

(4) DIPA-CRISPR 法による遺伝子ノックイン：

以上のように、DIPA-CRISPR 法の基本技術を完成させることができたため、さらに、DIPA-CRISPR 法を遺伝子ノックインへと応用できるか調査した。DNA 修復のドナーとして ssODN を Cas9 RNP とともに co-injection し、生まれた子世代において遺伝子ノックイン個体をスクリーニングした。その結果、得られた白眼個体 (全身ノックアウトであると考えられる) 245 匹のうち、3 匹がノックインアレルを期待通りに保持していた (1.2% = 3/245) (図 5)。現状ではこのノックイン効率は実用レベルとは言い難いが、今後、ノックイン用に改変された Cas9 を用いること等により、ノックイン効率を引き上げることができると期待される。

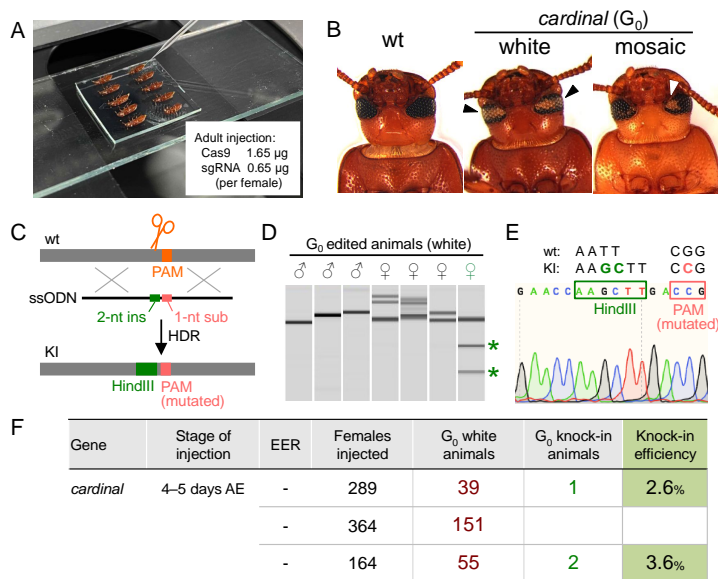


図5. コクヌストモドキにおける DIPA-CRISPR によるゲノム編集

- (A) 成虫にインジェクションする様子。  
 (B) 得られた変異体(右)の例。  
 (C) ノックイン実験のスキーム。2塩基を挿入することにより、新たな HindIII サイトが現れるように ssODN を設計した。  
 (D) 白眼個体のスクリーニング。PCR 産物を HindIII で消化し、切断産物を検出した(緑のアスタリスク)。  
 (E) ノックインアレルの配列。  
 (F) ノックインの効率。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shirai Yu, Ohde Takahiro, Daimon Takaaki	4. 巻 128
2. 論文標題 Functional conservation and diversification of yellow-y in lepidopteran insects	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Insect Biochemistry and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 103515 ~ 103515
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ibmb.2020.103515	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 Shirai Yu, Daimon Takaaki	4. 巻 529
2. 論文標題 Mutations in cardinal are responsible for the red-1 and peach eye color mutants of the red flour beetle <i>Tribolium castaneum</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 372 ~ 378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.05.214	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 Shirai Yu, Piulachs Maria-Dolors, Belles Xavier, Daimon Takaaki	4. 巻 5
2. 論文標題 DIPA-CRISPR is a simple and accessible method for insect gene editing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports Methods	6. 最初と最後の頁 100215 ~ 100215
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.crmeth.2022.100215	査読の有無 有
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 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 白井雄、大出高広、大門高明
2. 発表標題 昆虫の卵巣発達を利用した新規ゲノム編集法
3. 学会等名 第65回応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 白井雄、大出高広、大門高明
2. 発表標題 成虫へのインジェクションによる新規ゲノム編集法の最適化とその汎用性の検証
3. 学会等名 令和3年度 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 白井雄、Maria-Dolors Piulachs、Xavier Belles、大門高明
2. 発表標題 Direct parental CRISPRによる昆虫ゲノム編集の高度化
3. 学会等名 令和4年度 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋 桃世, 白井 雄, 日本 典秀, 大門 高明
2. 発表標題 parental CRISPR法によるタイリクヒメハナカメムシのゲノム編集
3. 学会等名 第66回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白井雄、Maria-Dolors Piulachs、Xavier Belles、大門高明
2. 発表標題 Direct parental CRISPR: a simple and efficient method for insect gene editing
3. 学会等名 第66回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2022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		
スペイン	Institute of Evolutionary Biology		