

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 7 月 28 日現在

機関番号：82112

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660270

研究課題名(和文)カイコのフリーズドライ精子を用いた長期保存システムの構築

研究課題名(英文)Development of long preservation system by freeze dried sperm in silkworm, Bombyx mori

研究代表者

内野 恵郎(Uchino, Keiro)

独立行政法人農業生物資源研究所・遺伝子組換えカイコ研究開発ユニット・主任研究員

研究者番号：90563627

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：未受精卵に精子を人為的に注入し受精を促す方法(ICSI)をカイコで確立するため、未受精卵の細胞周期再開を検出する系の開発とトリガーとなる要因の探索を行った。その結果、MAPKのリン酸化/脱リン酸化型の動態を指標に検出系を開発し、未受精卵の細胞周期再開が熱処理で誘起されることが示唆された。また、フリーズドライした昆虫の精子に受精能力があるかどうかを調べるため、ICSIによる個体再生法が確立しているカブラハバチを用いて実験を行った。その結果、精子を注入した約1000個の未受精卵のうち約200個体で発生が進み、その内の1個体で精子由来のマーカー遺伝子の発現が確認された。

研究成果の概要(英文)：On development of intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI) in the silkworm, it is important to detect the cell cycle restart of unfertilized egg and discover triggers of the restart. We could detect the cell cycle restart of unfertilized egg examining phosphorylation or dephosphorylation of Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) as the evaluation index. And our results indicates that heat shock treatment make this restart.

In mammals it is known that freeze-dried sperms have fertility in ICSI. To investigate whether it is effective in insects as mammals or not, we examined using the sawfly, Athalia rosae in which ICSI is available. We tried the injection of freeze-dried sperms into unfertilized egg in about 1000 scale growing 200 embryos in which we found only one embryo which express marker gene derived from sperm, indicating the effectivity of ICSI using freeze-dried sperms in insect.

研究分野：昆虫科学

キーワード：フリーズドライ精子 顕微授精(ICSI) カイコ カブラハバチ

1. 研究開始当初の背景

カイコ (*Bombyx mori*) では2000年に遺伝子組換え技術が確立され (Nat Biotechnol. 2000)、近年遺伝子組換えカイコ (組換えカイコ) の作出は容易となっている。未知の遺伝子機能解析ツールとして開発されたエンハンサー・トラップ系では新規突然変異系統が多数得られている (IBMB 2008)。さらに、組換えカイコを用いた産業化の動きも加速しており、系統の保存は重要な課題となっている。カイコは、休眠の特性により1年間卵での保存が可能である。しかし、飼育スペースや労力には限界があり、病気や遺伝子変異の危険性を回避のため、液体窒素で凍結した精子や卵巣を個体に移植し、系統を再生する方法が開発された (J Insect Physiol. 2000)。液体窒素を用いた凍結保存ではコストがかかり、災害時に安全とは言い難い。一方、哺乳動物ではフリーズドライ精子を未受精卵に顕微授精 (ICSI) することで産子を誕生させることに成功している (PLoS One 2012)。そこで、この方法が昆虫にも適用できないかと着想した。ハチ目に属するカブラハバチ (*Athalia rosae*) は、未受精卵を水に浸すことで単為発生 (卵活性化) を誘発することができ、昆虫で唯一ICSIにより個体を再生することが可能である (Mech Dev. 2008)。また、チョウ目のカイコではこれまでにICSIに関する報告はないが、雌成虫体内の未受精卵を温湯処理することにより単為発生することができる。そこで、カイコにおけるICSI法の開発とカブラハバチを用いてフリーズドライ精子の受精能力の調査を下記のように行った。

2. 研究の目的

本研究は、フリーズドライした昆虫 (カブラハバチ、カイコ) の精子をもちいて遺伝子資源を長期に安定して保存するための新たな保存法の開発を目的として、以下の3点を検討した。

- (1) カイコ未受精卵の賦活化メカニズムの解析
- (2) カイコ未凍結精子における ICSI 法の開発
- (3) カブラハバチにおけるフリーズドライ精子の受精能と孵化個体の性状の調査

3. 研究の方法

(1) カイコ未受精卵の賦活化メカニズムの解析

カイコのゲノム情報 (Kaikobase: <http://sgp.dna.affrc.go.jp/KAIKObase/>) をもとに Mos 遺伝子のオーソログの探索を行った。また Mos/MEK/MAPK リン酸化経路の関与がカイコでも認められるかどうかを確認

するため、ウエスタンブロットによる解析を行った。実験には白眼非休眠性の w1-pnd 系統と高い単為発生能を有する P14 系統を用いた。単為発生処理は常法により、雌成虫体内から採取した卵を 25°C に 1 日保護し、翌日温湯による熱処理 (HS: 46°C 18 分, 15°C 15 分) を施しその後 15°C のインキュベーターに保護した。

(2) カイコにおける ICSI 法の開発

カイコ雄成虫の貯精嚢および交尾後の雌成虫の体内から精子を採取し、非休眠化処理と単為発生処理を施した P14 系統の未受精卵に ICSI を行い、発生状況と受精した核の分裂状況を調査した。

(3) フリーズドライ精子の受精能と孵化個体の性状の調査

本実験は、ICSI が確立しているカブラハバチを用いて実験を行った。フリーズドライに用いる精子は着色眼を有する野生型カブラハバチの雄成虫から採種し、京都大学医学研究科附属動物実験施設特定講師の金子武人氏の協力により哺乳動物で用いられている方法 (PLoS One 2012) を用いてフリーズドライ処理を施した。フリーズドライ精子は真空状態を保ったアンプル中で数週間冷蔵保存後、使用時に滅菌水を加えて ICSI 用の精子試料とした。ICSI に使うレシピエント卵には白眼を有する変異型カブラハバチの未交尾雌成虫が産んだ未受精卵を水に浸漬して賦活化処理して用いた。ICSI はカブラハバチで開発した常法 (Mech Dev. 2008) を用いて注射を行った。

4. 研究成果

(1) カイコの発生開始と Mos および MAPK リン酸化経路の関与

脊椎動物の未受精卵は減数分裂の特定の時期 (Meta-II) で停止しており、この原因因子として Mos と呼ばれる細胞分裂抑制因子を介したリン酸化シグナル伝達系の関与が知られている。昆虫においてはキロショウジョウバエやハマダラカ、カブラハバチなどで Mos ホモログが単離されているが、カイコではその存在は知られていない。そこで我々は他の昆虫種で知られている Mos タンパク質のアミノ酸配列情報をもとに Protein BLAST 検索を行った。Mos ホモログ中に特徴的な配列として認められる、ATP binding motif (GXGXXGXV) や Mg²⁺ binding loop (DFG)、serine/threonine protein kinase の活性ドメイン (WQM/L) を指標に探索を行ったが、特徴的な配列モチーフに一致するようなカイコの Mos ホモログを見つけることはできなかった。

次にカイコの発生開始前後における MEK/MAPK を介したリン酸化経路の関与について調査を行った。w1-pnd 系統の交配後の雌成虫から産卵前後の卵を採種し MAPK のリン酸化型 (p-MAPK) およびトータル MAPK (t-MAPK) をウエスタンブロットで検出

した。その結果、受精直後から p-MAPK の強いシグナルが検出され、30 分ではシグナルは弱まり、40 分以降ではほとんど検出されないレベルとなった(図 1)。

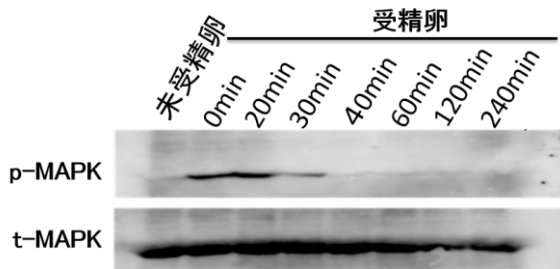


図 1 初期発生過程におけるカイコ卵の MAPK リン酸化の動態

P14 系統の単為発生処理時の卵を用いて同様の解析を行った。その結果、雌成虫から採取した卵を 25 °C に保護した区 (0, 6, 12, 18, 24h) では MAPK のリン酸化型は低いレベルであるのに対して、熱処理直後では図 1 の産卵直後の卵と同様に p-MAPK レベルが上がることを確認された(図 2)。

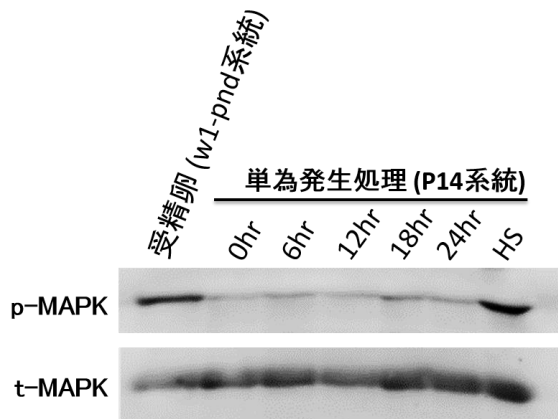


図 2 単為発生カイコの初期発生時における MAPK リン酸化の動態

w1-pnd 系統は単為発生処理による個体の発生を開始しないことが確認されていることから、単為発生処理(HS 処理)後に w1-pnd 系統と P14 系統の p-MAPK レベルの比較解析を行った。その結果、w1-pnd の未交尾雌成虫の体内から採取した未処理の卵では p-MAPK のシグナルはほとんど検出されなかった(図 1)のに対して、熱処理を施したものでは処理直後から 180 分まで同レベルで検出された。一方、P14 でも同様に熱処理直後から p-MAPK の強いシグナルが検出されたが、180 分後にはシグナルが著しく弱まっていた。このことから熱処理により未受精卵の賦活化の誘導

が単為発生系統のみならず、単為発生能を持たない w1-pnd 系統においても誘導されている可能性が示唆された。また、未受精卵の熱処理後 180 分後の p-MAPK レベルの差については、w1-pnd 系統と P14 系統の質的違いが単為発生能の有無として表れていることが示唆された。

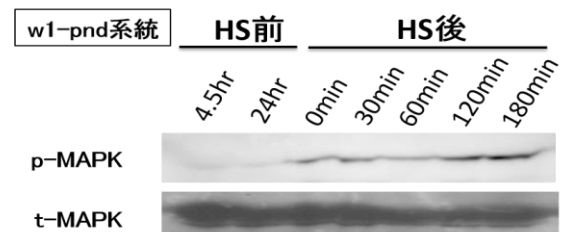
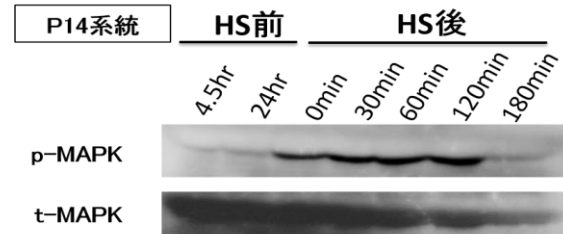


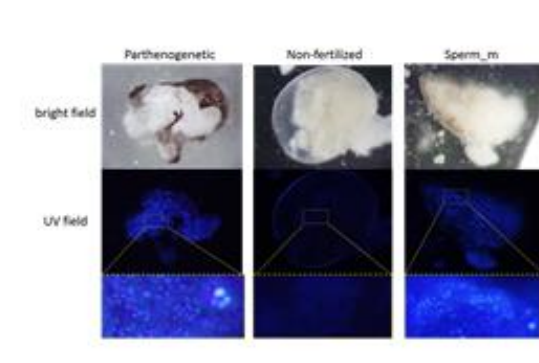
図 3 単為発生処理前後における MAPK リン酸化の動態

(2) カイコにおける ICSI 法の開発

昆虫ではこれまでカブラハバチ以外で ICSI 法により受精胚を得た例は報告されていない。その理由としてカブラハバチでは未受精卵を蒸留水に浸すことで人為的に賦活化させることができ、精子の注入により受精による発生の開始を可能にしている。同様にハマダラカでも未受精卵を蒸留水に浸すことで人為的に賦活化を誘導し受精卵と同様の着色卵が得られることが示されている。一方、カイコの場合、P14 系統は発生を開始すると卵の表面にカイコ特有の着色を呈するが、蒸留水に浸してもその後の卵に着色は認められない。そこで、P14 系統の未受精卵に雄成虫の貯精囊から採取した精子を注入し、その後の卵の着色の有無と卵内の核の分裂増殖の有無を観察した。その結果、多数の個体で受精卵の発生時に認められる色素形成が確認された。着色を呈した卵を解剖し、Hoechst 33342 で染色を行った。その結果、精子注入区の数個体で胚盤葉状の構造物と分裂核と思われる発光が観察された(図 4)。

そこで研究成果(1)で行った方法を用いて精子注入卵における p-MAPK の動態を調査した。その結果、精子の注入区で MAPK のリン酸化を示す明瞭なシグナルを検出することはできなかった。今回調査個体数も少なく、精子注入の個体による当たり外れもあることから、さらなる調査が必要と考えられた。未受精卵の熱処理により賦活化の可能性が

示唆されたことから(図 3)、w1-pnd 系統の雌成虫から採取した未受精卵に熱処理を施し、これに雄成虫の貯精囊および交尾後の雌体内から採取した精子を用いて ICSI を行った。同様に卵の非休眠化処理と単為発生処理を施した P14 系統の卵に組換えカイコの貯精囊



と受精囊由来の精子を用いて ICSI を行ったが、いずれも受精を示す個体の発生は認められなかった。

図 4 カイコ精子の注入区に見られた胚盤葉状の構造物

(3) カブラハバチにおけるフリーズドライ精子の受精能と孵化個体の性状の調査

哺乳動物ではフリーズドライした精子を用いた ICSI により個体の再生が可能となっている。そこで昆虫で唯一 ICSI が確立しているカブラハバチを用いてフリーズドライ精子の受精能の有無を調査するため、フリーズドライした精子試料を未受精卵約 1000 個に対して ICSI を行った。その結果、ICSI を行った卵のうち約 200 個の卵が発生を開始し、その内の 1 個体において単眼が赤く着色しているのを確認した(図 5)。着色眼の形質は変異型の白眼の形質に対して優性であることから、ICSI 後に発生を開始した個体中に認められた着色眼の個体はフリーズドライした精子の雄性核と未受精卵の雌性核の受精により生じたことが強く示唆された。カブラハバチは実験的に二倍体雄が生ずることが報告されていることから、今回出現した着色眼の雄が精子の雄性核の倍数化による二倍体雄である可能性は否定できない。そこで、生じた着色眼の個体の雌雄を蛹化以降に確認することで受精によるものか雄性核の倍数化によるものを判定することにしたが、3 齢幼虫で死亡してしまった。今回カブラハバチを材料としてフリーズドライ精子が受精能を有することが強く示唆されたが、断定するに至らなかった。仮に当該個体が受精によるものだと、ICSI を行った数に対して受精した個体は 1 個体(0.1%)しか得られなかったこと(対照区:普通凍結精子で 3.5%)、さらに

当該個体が 3 齢幼虫で死亡してしまったことから、フリーズドライ処理が精子の核やゲノム等に害を及ぼしていることが示唆される。とは言え今回の結果から昆虫においてもフリーズドライ精子による個体再生の可能性は皆無ではないことが示された。今後は、フリーズドライ時の精子の保護剤などを検討が個体再生率向上の鍵となると考えられる。



図 5 フリーズドライ精子を用いた ICSI により出現した野生型(着色眼:矢印)をカブラハバチの胚子

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内野 恵郎 (UCHINO Keiro)

国立研究開発法人 農業生物資源研究所・
遺伝子組換え研究センター・遺伝子組換え
カイコ研究開発ユニット・主任研究員
研究者番号: 90563627

(2) 研究分担者

笠嶋 めぐみ (KASASHIMA Megumi)

国立研究開発法人 農業生物資源研究所・
遺伝子組換え研究センター・遺伝子組換え
カイコ研究開発ユニット・任期付き研究員
研究者番号: 90458290