

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H05047

研究課題名(和文)カイコにおける胚休眠制御カスケードの全容解明

研究課題名(英文)Studies on regulation of embryonic diapause in the silkworm, *Bombyx mori*

研究代表者

木内 隆史 (Kiuchi, Takashi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教

研究者番号：60622892

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,200,000円

研究成果の概要(和文)：カイコの卵が休眠するか否かは母親が育った環境により決定されるが、その詳細な分子機構は不明である。私たちはこの分子機構の解明の鍵となるいくつかの遺伝子を同定しており、本研究ではこれら遺伝子をもとにその全容を明らかにしようとした。鍵となるある遺伝子と同じシステムに関わるいくつかの遺伝子をゲノム編集技術により網羅的に機能破壊した。すると、これら遺伝子を失ったカイコでは、休眠するはずの卵が休眠しなかった。この結果は、このシステムが休眠を誘導するために必要なことを示す。また本研究では、卵が休眠に入るときに機能するいくつかの鍵遺伝子を機能破壊し、その際に発現が変化する遺伝子群を俯瞰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

休眠は昆虫の優れた環境適応能力の一つである。昆虫は外部環境を読み取ることで適切なタイミングに休眠を誘導し、不適な環境を凌ぐ。カイコは休眠ホルモンの発見をはじめ、休眠のメカニズムが最もよく研究されてきた昆虫の一つである。しかし、胚子期あるいは幼虫期に受容した温度や日長条件に応じて次世代の卵の休眠性が決定されることはわかっているが、その分子メカニズムは不明である。本研究では、休眠制御に関わるシステムおよび卵において休眠を誘導する遺伝子に制御される遺伝子群を明らかにすることに成功した。これらの知見はカイコの休眠を自在に操る技術や休眠攪乱を利用した害虫防除システムの開発につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Embryonic diapause in the silkworm, *Bombyx mori*, is regulated by temperature and photoperiodic conditions during the preceding generation, but the molecular mechanism is not fully elucidated. The goal of this study is to get the whole picture of the embryonic diapause regulation. We have identified a gene that is key to understand the molecular mechanism. The silkworms which lost the key gene produce non-diapause eggs under diapause-inducing conditions. The key gene controls a system together with several genes. In this study, CRISPR/Cas9-mediated gene editing was performed in these several genes. Most of the knockout silkworms as well as the key gene knockout laid non-diapause eggs under diapause-inducing conditions, indicating that the system itself regulates the embryonic diapause. Furthermore, transcriptome analyses identified a group of genes whose expression was altered when a few diapause-inducing genes were disrupted by the gene editing.

研究分野：昆虫分子生物学

キーワード：カイコ 休眠 ゲノム編集 トランスクリプトーム ChIP-seq

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

昆虫は全動物種の7割以上を占めると言われるほど地球上で最も繁栄した動物の一群である。昆虫の繁栄を支えるのはその環境適応能力であり、翅の獲得、完全変態化と並び、環境依存的な休眠発現機構の獲得は進化的にみても重要なイベントであった。休眠は耐寒性や耐乾性が高まるものの、発育、発生、活動が停止状態に陥ることから発現時期を間違えると非適応的な形質である。そのため昆虫は、環境シグナルを正確に読み取り、適切な時期に休眠を発現するシステムを備えている。しかし、そのシステムの分子機構、すなわち休眠制御カスケードの全容は明らかではない。

研究が進展しない要因の一つに、あらゆる実験手法が可能なキイロショウジョウバエにおいては、環境に応じたはっきりとした休眠性が見られず、研究材料として適さないことがあげられる。一方、同じ双翅目昆虫で研究が進んでいる蚊においては、近年、生殖休眠制御のカスケードが次第に明らかにされつつある。蚊では卵巣発育を促す幼若ホルモンの分泌に転写因子であるFOXO (forkhead transcription factor) が関与することがわかっており (Sim and Denlinger, 2008, PNAS), FOXO が結合する配列を探索することで、下流のカスケードを解き明かそうとする試みがされている (Sim et al., 2015, PNAS)。また、半翅目昆虫のホソヘリカメムシでは時計遺伝子が生殖休眠の制御に関わることがわかっているが、その下流のカスケードは不明である (Ikeno et al., 2010, BMC Biol.)。蚊とカメムシに共通するのは、RNAi による遺伝子の機能抑制が効果的である点である。そのため、候補遺伝子の働きを抑制することで、休眠に関与するか否かを実験的に証明できることが研究の進展につながった。

胚子期に休眠するカイコは休眠ホルモンが同定されるなど、最も休眠の研究が進んだ昆虫であった。*Lm* (伴性晩成) や *V* (化性) など、休眠性に関与する遺伝子の座位もわかっている。しかし、休眠性は量的形質でありファインマッピングが難しいこと、また鱗翅目昆虫は胚子期を除いてRNAi が効きにくいことから、これら遺伝子の分子実体が同定されることはなかった。

カイコの胚休眠は胚子期の温度と日長、幼虫期の日長や栄養条件により制御される。最近、TRPA1 が胚子期において温度を感知する受容体として機能することが報告された (Sato et al., 2014, PNAS)。一方、私たちは日長による休眠制御に関わる遺伝子 *Lm* のコンジェニックラインを作成することで、ついに *Lm* の同定に成功した (投稿準備中)。*Lm* はその存在がはじめて報告されてから90年間謎にまつまっていた遺伝子である。私たちは、ゲノム編集を用いることで *Lm* 遺伝子ノックアウト (KO) カイコを作成し、休眠性への関与をダイレクトに証明した。また、胚子期における休眠誘導に関与すると考えられる遺伝子 *pnd* および *pnd-2* の分子実体が同定されている (城所ら, 第82会蚕糸学会)。これらがコードするタンパク質の具体的な機能は明らかではないが、私たちは *pnd* と *pnd-2* 遺伝子の KO カイコを作成し、休眠誘導への関与の証明に成功している (未発表)。これら遺伝子は、胚休眠制御カスケードの全容を明らかにするための重要なピースとなりうる。

2. 研究の目的

私たちの先行研究からも明白だが、ゲノム編集技術は休眠制御機構を解明する上でも威力を発揮するはずである。さまざまな昆虫において、休眠への関与が報告された遺伝子や機能的にみて休眠に関与すると予想される遺伝子を破壊し、休眠性が変化するか否かを確認するような研究は世界的にも進められていくだろう。しかし、そのようなアプローチを取る限り、休眠制御機構のピースは飛び飛びに埋められていくことしか期待できない。本研究では現状あるピース (*Lm*, *pnd* 等) をもとに、ゲノム編集やRNA-seq, ChIP-seqなどの手法を最大限に活用したアプローチをとることで、胚休眠制御カスケードの全容を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *Lm* 制御下にある遺伝子の同定

私たちが同定に成功した *Lm* 遺伝子は転写因子をコードしている。そこで、*Lm* 制御下にある遺伝子を同定するために、CETCh-seq (Savic et al., 2015, Genome Res.) により *Lm* 結合領域を探索する。ゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 システムを用いて *Lm* 遺伝子の下流に 3×FLAG タグを導入したノックイン (KI) カイコを作出する。KI カイコから組織を回収し、抗 FLAG 抗体を用いて ChIP-seq を行う。

(2) *Lm* 発現部位におけるトランスクリプトーム解析

CRISPR/Cas9 システムを用いて、*Lm* 遺伝子の下流に *EGFP* を導入した *Lm-EGFP* システムを作出する。また、*Lm* 遺伝子を *EGFP* に置換した *Lm KO-EGFP* システムを作出する。作出した KI カイコの脳を解剖により取り出し、凍結切片を作製する。レーザーマイクロディセクションにより *EGFP* の蛍光部位を切り出す (Cao et al., 2014, Genetics.)。組織片から RNA を抽出し、RNA-seq を行うことで *Lm* 発現部位におけるトランスクリプトーム情報を得る。

(3) 新規の休眠制御遺伝子の同定

全ゲノム解析にも用いられた標準系統 p50T を用いて作出された *Lm KO* システムは非休眠性を示したが、休眠性が強い系統である C108T の雌との交配で得た F₁ は Z 染色体が父蛾である *Lm KO* システムと同一にも関わらず休眠性を示した (カイコの性染色体構成は ZW 型)。この結果は、Z 染色体に座乗する *Lm* の効果を打ち消す新規休眠制御遺伝子 (*Lm-2* と名付ける) が C108T の常染色体上に存在することを示す。そこで、ポジショナルクローニングにより *Lm-2* を同定する。

(4) 胚子の休眠誘導に関与する遺伝子の同定

カイコの休眠卵は着色する一方、非休眠卵は着色しない。そのため、卵は着色するものの非休眠となる変異体 *pnd* および *pnd-2* の原因遺伝子は休眠誘導に関与すると考えられている。カイコ p50T システムとそのシステムをもとに作出した *pnd KO* システムおよび *pnd-2 KO* システムの胚子を用いて経時的な RNA-seq を行い、両遺伝子の制御下にある遺伝子を同定する。同定された遺伝子を胚子期 RNAi 法により KD し、休眠制御への関与を証明する。

(5) 休眠カスケードの種間比較

家畜化や進化の過程において休眠制御カスケードがどのように変遷してきたかを調べるために、カイコで明らかとなった胚休眠制御カスケードを野生種のクワコ (胚休眠) や比較的近縁なヤマモロコシ科シンジュサン (蛹休眠) と比較する。RNA-seq によるトランスクリプトームの比較と制御遺伝子の RNAi、ゲノム編集による機能解析を行う。

4. 研究成果

(1) *Lm* 制御下にある遺伝子の同定

生体組織を用いて ChIP-seq を行うために、CRISPR/Cas9 システムを用いて、解析しようとする *Lm* 遺伝子の下流に 3×FLAG タグを導入した KI カイコを作出しようとした。さまざまな条件検討を行ったが、これを達成するに至らなかった。そのうち、下記に記す成果により、休眠制御に必要なのは *Lm* タンパク質の転写因子としての機能ではなく、*Lm* が関与するシステム自体であることがわかり、研究の方針を変更した。しかし、カイコにおける CETCh-seq の確立は今後の研究においても重要なため、そして *Lm* 結合部位を特定すること自体にも意義があるため、今後も KI カイコの作出と ChIP-seq には取り組んでいく予定である。

(2) *Lm* 発現部位におけるトランスクリプトーム解析

(1)と同様、*EGFP* KI カイコの作出に至らなかった。上記の理由から本研究では方針を変更したが、*Lm* の ChIP-seq のデータを発現遺伝子のデータと合わせて考察するために、今後も KI 系統の作出を進める予定である。

(3) 新規の休眠制御遺伝子の同定

p50T 系統をもとに作出した *Lm* KO 系統の雌に、C108T 系統の雌と *Lm* KO 系統の雄を交配して作出した F₁ の雄を交配することで BC₁ を得た。しかし、BC₁ の雌が産んだ卵の休眠性を調査したところ、形質が分離しなかった。そこで、再び F₁ の休眠性を調査したところ、高温で卵を保持した場合にはすべての卵が休眠卵となるが、低温で保持した場合にはすべての卵が非休眠卵になることがわかり、*Lm* KO の影響よりも温度の影響を強く受けることが判明した。おそらく、C108T 系統の常染色体上にある温度受容に関与する遺伝子の影響を強く受けていると推測される。そこで方針を変更し、*Lm* と同じシステムにある他の遺伝子を KO し、逆遺伝学的に休眠性に関与する新規遺伝子を同定しようと試みた。その結果、同システムに関わる遺伝子の KO は、*Lm* KO と同様に非休眠化を促すことがわかり、*Lm* の転写因子としての機能が重要なわけではなく、むしろ *Lm* が関与するシステムそのものが休眠を誘導していることが示唆された。

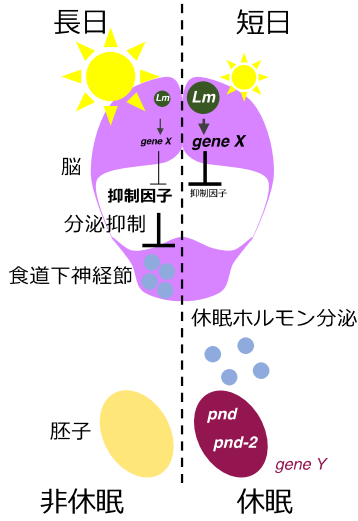
(4) 胚子の休眠誘導に関与する遺伝子の同定

pnd および *pnd-2* KO 系統に加え、対照として *Lm* KO 系統（非休眠）と p50T 系統（休眠）の胚子を用いて経時的な RNA-seq を行い、発現変動遺伝子を同定した。これら遺伝子は *pnd* および *pnd-2* の下流で働く遺伝子である可能性が高い。さらに休眠誘導に関与する遺伝子を絞り込むために、卵の着色は不十分で非休眠となりかつ発生途中で致死する変異体 *l-n* の原因遺伝子を同定し、KO 系統を作出した。また、経時的な RNA-seq を行うことで発現変動遺伝子を同定した。今後、これらトランスクリプトーム解析により絞り込まれた胚子の休眠誘導に関与する遺伝子の候補を胚子期 RNAi 法により KD する、あるいは候補遺伝子の KO 系統を作出することで、その機能を証明する予定である。

(5) 休眠カスケードの種間比較

野生種のクワコにおいて *Lm* 遺伝子の KO を行おうとしたが、卵への注射により孵化率が大きく低下し、変異導入個体を得ることができなかった。カイコと同様の手法で容易に KO 系統を作出できると考えていたが、条件検討が必要であることがわかった。一方、ヤマユガ科であるシンジュサンの蛹休眠を制御する遺伝子を同定するために、シンジュサンに非休眠性であるエリサンの戻し交配を繰り返すことで作出した休眠エリサンの全ゲノムリシーケンスを行った。絞り込んだ責任領域には *Lm* 相同遺伝子は存在しないことから、カイコとは異なる休眠制御機構を備えていると考えられる。責任領域内にある遺伝子の配列比較の結果、蛹休眠制御遺伝子の有力な候補が得られており、今後ゲノム編集による機能解析を行う予定である。

研究開始当初のモデル



研究成果から推測されたモデル

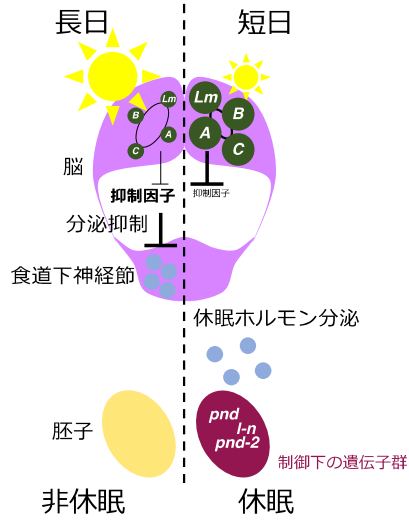


図. 研究成果の概要

本研究の目的は幼虫の脳で機能すると推定される睡眠制御遺伝子 *Lm* につながる遺伝子 *X*、睡眠ホルモンを分泌する遺伝子 *pnd*、*pnd-2* につながる遺伝子 *Y* を同定し、睡眠制御カスケードの全容を明らかにすることである。研究開始当初、*Lm* は転写因子をコードしていたため、その制御下にある遺伝子 *X* を同定しようと考えた（左）。しかし、本研究の成果により、*Lm* は同じシステムに関与する遺伝子 *A*、*B*、*C* と協調して働くことで睡眠を制御していることが明らかになった（右）。*Lm* の KO カイコと同様、*A*、*B*、*C* 遺伝子らのいずれの KO カイコも睡眠を誘導する短日条件下にもかかわらず、非睡眠卵を産下した。また、本研究では *pnd* および *pnd-2* と同様の時期に働く遺伝子 *l-n* の分子実体を同定した。さらに、*pnd*、*pnd-2* および *l-n* 遺伝子の KO カイコのトランスクリプトーム解析により、これら遺伝子の制御下で機能すると予想される遺伝子群を同定した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Tomihara K, Satta K, Shimada T, Kiuchi T.	4. 巻 88
2. 論文標題 CRISPR/Cas9-mediated somatic mutation of the sex-linked translucent (os) gene in the silkworm, <i>Bombyx mori</i> .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Insect Biotechnology and Sericology	6. 最初と最後の頁 31-38
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11416/jibs.88.2_031	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 飛田永・勝間進・木内隆史
2. 発表標題 時計遺伝子のノックアウトがカイコの休眠性へ与える影響
3. 学会等名 令和2年度 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 富原健太・薩た克也・勝間進・木内隆史
2. 発表標題 カイコ第4褐卵（b-4）変異体の責任遺伝子の同定
3. 学会等名 令和2年度 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 薩た克也・木内隆史・勝間進・嶋田透
2. 発表標題 カイコ生種死卵(l-n)原因遺伝子の同定と機能解析
3. 学会等名 平成31年度 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 富原健太・薩た克也・勝間進・嶋田透・木内隆史
2. 発表標題 伴性油(os)遺伝子のCRISPR/Cas9システムによるノックアウト
3. 学会等名 平成31年度 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Lee Jung, Takashi Kiuchi, Hironobu Uchiyama, Takayuki Nagashima, Toru Shimada
2. 発表標題 Positional cloning of responsible genes for pupal diapause of <i>Samia cynthia pryeri</i>
3. 学会等名 The 6th Asia-Pacific Congress of Sericulture and Insect Biotechnology (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

昆虫遺伝研究室ホームページ https://sites.google.com/view/igblab-ut-aba/top
--

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