

令和元年6月3日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K18810

研究課題名(和文)カイコの内分泌系を制御する新規尿酸関連遺伝子の研究

研究課題名(英文) Identification and characterization of a novel gene controlling the endocrine system and uric acid metabolism in Bombyx mori

研究代表者

藤井 告 (Fujii, Tsuguru)

九州大学・農学研究院・学術研究員

研究者番号：50507887

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：尿酸関連遺伝子がカイコの発育を制御するメカニズムを解明するために、多面的な形質の異常を伴うoel変異体の原因遺伝子を探索した。生理学的な解析によりoel遺伝子は尿酸合成の鍵酵素であるキサンチン水酸化酵素(XDH)の活性を支配していることが判明した。XDH活性を失っている他の変異体が示す形質異常との比較から、oel遺伝子はXDH活性に必須であるモリブデン補酵素の合成とは無関係であることが示唆された。次世代シーケンス解析により、抗酸化酵素をコードする遺伝子においてoel変異体特異的なフレームシフト突然変異が同定された。当該遺伝子は他生物では尿酸代謝との関連が報告されていなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

尿酸代謝や内分泌系に異常を示すカイコのoel変異体の遺伝・生理学的な解析により、尿酸代謝の鍵酵素であるキサンチン水酸化酵素(XDH)の活性を支配する新規な遺伝子が同定された。当該遺伝子の機能を解明することにより、尿酸代謝や内分泌系の破綻により害虫を駆除する新技術の開発に繋がる。また、XDHの活性はヒトでは痛風等の病態との関連が知られていることから、XDH活性を標的とした創薬研究の基盤となる。カイコには尿酸代謝に異常を有する突然変異が豊富に存在する。本研究により、カイコは尿酸代謝研究における優れたモデル生物であることが示された。

研究成果の概要(英文)：oel mutants of *B. mori* exhibit a pleiotropic phenotypic defect, including retarded growth, an extra larval molt, and translucent larval integument owing to a lack of uric acid. We physiologically and genetically characterized oel mutants to elucidate the dual function of oel controlling the endocrine system and uric acid metabolism. Rescue experiments using bovine xanthine oxidase revealed that oel governed the enzymatic activity of xanthine dehydrogenase (XDH), a key enzyme for uric acid synthesis. Phenotypic comparison of oel mutants and other XDH deficient mutants indicated that oel is unrelated to molybdenum cofactor synthesis, which is indispensable for the enzymatic activity of XDH. Moreover, DNA-seq and RNA-seq analysis identified a frameshift mutation in a gene encoding antioxidant protein. Although genes orthologous to the identified gene are present in other organisms, their involvement in uric acid metabolism has not been reported.

研究分野：1昆虫遺伝学

キーワード：尿酸 キサンチン水酸化酵素 キサンチン酸化酵素 モリブデン補酵素 XDH XO MoCo ゲノム編集

## 1. 研究開始当初の背景

昆虫の窒素代謝の最終産物である尿酸は、鱗翅目昆虫の幼虫では皮膚の真皮細胞に蓄積される。尿酸を合成・輸送・蓄積できないカイコの変異体では皮膚が油紙のように透明化することから、油蚕(あぶらこ)と称されている。新規な油蚕である無卵油(*oe1*)は、皮膚が透明になるだけでなく、幼虫期の成長が遅延し、5 齢が終齢とならず、1 回過剰に脱皮を行って6 齢で蛹化する。また、蛹化しても造卵が起こらず、次世代を残すことができない。

カイコが油蚕になる原因としては、尿酸の合成を支配する酵素の異常、尿酸やその前駆体のトランスポーターの異常、細胞内小器官における物質輸送システムであるあるメンブレントラフィックの異常の3パターンが知られている。しかしそれらの油蚕では、無卵油に認められるような多面的な形質の異常は認められない。*oe1* 遺伝子は、既知の尿酸関連遺伝子とは異なり、内分泌系の制御などの多様な機能を有していると考えられる。

正常なカイコは4回の幼虫脱皮の後に成虫へと変態する。この脱皮と変態は、前胸腺から分泌されるエクダイソンとアラタ体から分泌される幼若ホルモン(JH)によって支配されている。エクダイソンの作用時におけるJHの存否に応じて幼虫脱皮と蛹化が起こる。エクダイソンは、脱皮のタイミングを決定するだけでなく、雌においては蛹期における卵形成を支配している。JHの不在下においてエクダイソン濃度が一端上昇した後で低下することによって、卵母細胞への卵黄の取り込みとそれに続く卵殻形成が誘導される。幼虫の期間を決定するのがエクダイソンとJHのバランスであるとする、その間の成長速度を決定しているのはインスリン様ペプチドである。主に脳から体液中に栄養依存的に分泌されるインスリン様ペプチドは、インスリンシグナリングを介して、タンパク質合成等を促進させる。

上記3つのホルモンの分泌や作用が攪乱されると、早熟変態、過剰脱皮、不妊化、成長の遅延などの異常が起こる。昆虫の内分泌系の分子遺伝学的な研究は盛んに行われており、エクダイソンやJHの生合成経路の全貌が明らかになりつつある。内分泌系の下流で作用する遺伝子群とは対照的に、発育に応じたホルモンの分泌を調節する遺伝子、すなわち、内分泌系の上流で機能する遺伝子に関する知見は乏しい。

## 2. 研究の目的

*oe1* 変異体は、成長の遅延、脱皮回数の増加、造卵の欠如に加えて、尿酸の不在が原因で皮膚が透明化する。尿酸関連遺伝子である *oe1* は、幼虫の成長と蛹期の卵形成を支配する内分泌系で想定外の機能を有していると考えられ、内分泌系を制御する分子機構を解明する上で格好の研究対象である。そこで本研究は、*oe1* 遺伝子の生理・遺伝学的な解析を起点として、尿酸関連遺伝子 *oe1* がカイコの発育を制御するメカニズムを解明することを目的とする。すでに *oe1* 座のポジショナルクローニングは進んでおり、Z染色体(性染色体)上の222 kbの領域に絞り込まれている。そこに存在が予測されている7個の遺伝子の中には、尿酸のトランスポーターや尿酸の合成酵素をコードする遺伝子など、既知の油蚕の原因遺伝子と同様の機能を持っていることが推定されるものが含まれていないことから、*oe1* が新規な尿酸関連遺伝子であることが強く示唆される。

## 3. 研究の方法

尿酸代謝における油蚕変異体の原因遺伝子の機能は、尿酸合成と尿酸の輸送・蓄積の二つに分けることができる。体液や皮膚における尿酸蓄積量の定量や、尿酸合成の鍵酵素であるキサンチン脱水素酵素(XDH)の機能を代替可能なウシ由来のキサンチン酸化酵素(XO)を使ったレスキュー実験を行い、*oe1* 遺伝子の生理機能を探る。すでに *oe1* 座はすでに222kbの領域にまで絞りこまれている。次世代シーケンサーを使ったDNA-seq、RNA-seq解析を行い、当該領域内に存在すると考えられる *oe1* 変異体特異的な突然変異を同定する。尿酸合成を支配する遺伝子の機能解析を行うために、CRISPR/Cas9によるゲノム編集を行う。

## 4. 研究成果

### (1) 尿酸合成・蓄積における *oe1* 遺伝子の機能

幼虫の皮膚が透明化する変異体である油蚕は、体内で尿酸を合成できないタイプと、合成された尿酸を皮膚に蓄積できないタイプの二つに大別される。尿酸はキサンチン脱水素酵素(XDH)の働きによってキサンチンやヒポキサンチンから合成される。*oe1* 変異体がどちらのタイプの油蚕であるのか明らかにするために、XDHと同様の機能を有するキサンチン酸化酵素(ウシ由来)を無卵油に注射したところ、注射3日後には皮膚が不透明化すると同時に、正常幼虫と同程度の量の尿酸が皮膚に蓄積されることが判明した。この結果から、(i)無卵油はXDH活性に異常があるために尿酸を合成できないこと、(ii)*oe1* 遺伝子はXDH活性を制御する機能を有していることが示唆された。

### (2) 尿酸合成を支配する遺伝子群の同定

尿酸合成における *oe1* 遺伝子の機能を理解するために、カイコの尿酸合成を支配する遺伝子

群の解析を行った。XDHの活性はモリブデン補酵素(MoCo)に依存している。MoCoの合成経路は生物間でよく保存されており、4つの遺伝子(*MOCS1-3*, *GPHN*)の関与が知られている。それらの遺伝子のカイコホモログと、未解析の油蚕変異体との関係を遺伝学体で調査した結果、姫日油では*GPHN*遺伝子の発現量が低下しており、山本油では*MOCS1*遺伝子のORF内にフレームシフトを生じさせる突然変異が同定された。両油蚕ともに、キサンチン酸化酵素の注射によって皮膚が不透明化したことから、*MOCS1*と*GPHN*のそれぞれが、姫日油(*ohi*)と山本油(*oya*)の原因遺伝子であることが示唆された。

### (3) 油蚕原因遺伝子のゲノム編集

尿酸合成における*MOCS1*と*GPHN*の機能を解明するために、CRISPR/Cas9によるゲノム編集を行った。条件検討のため、まず初めに尿酸蓄積を支配していることが知られている*BmHPS5*遺伝子をターゲットにした。チョウ類で開発された方法に従い、市販のCas9タンパク質とターゲット遺伝子(*BmHPS5*)に設計したsgRNA2種を混合して非休眠系統p55の産下直後卵に注射を行い、孵化個体の表現型を調査した。*BmHPS5*遺伝子は真皮細胞で尿酸顆粒の蓄積を制御する遺伝子であるため、ノックアウトが成功した場合には、皮膚が透明化した幼虫が出現することが予想される。調査の結果、128頭中127頭の幼虫において、皮膚の完全な透明化や、モザイク形質が認められ、本方法のノックアウト効率は非常に高いことが示された。

次に、同様の方法により*ohi*および*oya*をターゲットとしたゲノム編集を行った。その結果、マイクロインジェクション当代において油蚕やモザイクの出現を確認し、シーケンスによっても両遺伝子に変異が導入されたことを確認した。さらに、キサンチン酸化酵素(ウシ由来)の注射により皮膚が不透明化したことから、*MOCS1*と*GPHN*がMoCoの合成を介してXDH活性を制御していることが示唆された。

### (4) カイコにおけるMoCo欠損に起因する形質異常

*MOCS1*と*GPHN*のノックアウト個体は、皮膚が透明化するだけでなく虫体が弛緩した状態ですべての幼虫が5齢の前半までに致死した。一方で、XDH活性に異常を有する*oq*変異体や*og*変異体では幼虫期の高い致死性は認められない。そのため、*MOCS1*と*GPHN*のノックアウト個体で認められた致死性はXDH活性の有無とは無関係であると考えられる。*oq*遺伝子はXDHをコードし、*og*遺伝子はMoCoの修飾を支配するMoCo硫化酵素(MoCoS)をコードする。酵素活性の発現においてMoCoに依存している酵素(molybdenum enzymes)には、XDHのようにMoCoSによる修飾を必要とするものの他に、亜硫酸酸化酵素(SO)のようにMoCoSによる修飾を必要としないものが存在することから、*MOCS1*と*GPHN*のノックアウト個体に認められた致死性には、MoCoSによる修飾を必要としないmolybdenum enzymesが関与していると考えられる。*oq*変異体、*og*変異体と同様に*oel*変異体においても*MOCS1*と*GPHN*のノックアウト個体に認められるような幼虫の致死性は認められない。このことから、*oel*遺伝子はMoCoの合成には関与していないことが示唆された。

### (5) *oel*遺伝子の同定

無卵油(*oel*)の原因遺伝子を特定するために、次世代シーケンサーを利用して変異体のゲノムのリシーケンスを行うと同時に、脂肪体由来のRNAをRNA-seq解析に供試した。得られたショートリード配列をカイコゲノムへマッピングし、無卵油特異的な突然変異を探索した。すでに*oel*座は222 kbの領域に絞り込まれているので、当該領域にマッピングされたリードの配列を精査したところ、一つのジーンモデルに対応する領域において、無卵油では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た。この突然変異は、無卵油幼虫から抽出した脂肪体および皮膚由来のRNAを利用したRT-PCRとその後のシーケンス解析においても再確認されたことから、無卵油変異体の原因であることが示唆された。

### (6) 卵形成における*oel*遺伝子の機能

*oel*変異体は皮膚が透明化するだけでなく、蛹期に卵巣が発育しないために卵を形成することができない。これまでに油蚕突然変異は遺伝子座にして30程が知られているが、その中で卵形成に顕著な異常を伴うのは*oq*変異体、*og*変異体、*oya*変異体であり、それらは共通してXDH活性を欠如している。本研究によって*oel*遺伝子がXDH活性を制御する機能を有していることが明らかになったことから、*oel*変異体にもとめられる卵形成の異常はXDH活性の異常に起因することが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

1, [Fujii Tsuguru](#), Banno Yutaka, Identification of a novel function of the silkworm integument in nitrogen metabolism: Uric acid is synthesized within the epidermal cells in *B. mori*. *Insect Biochem Mol Biol*. 査読あり, 2019 ;105:43-50. doi:10.1016/j.ibmb.2018.12.014.

2, [Fujii Tsuguru](#), Yamamoto Kazunori, Banno Yutaka, Translucent larval integument and flaccid paralysis caused by genome editing in a gene governing molybdenum cofactor biosynthesis in *Bombyx mori*. 査読あり, 2018;99:11-16. doi: 10.1016/j.ibmb.2018.04.008.

3, [Fujii Tsuguru](#), Banno Yutaka, Enlargement of egg size by CRISPR/Cas9-mediated knockout of a sex-linked gene in the silkworm, *Bombyx mori*. 査読あり, 2018;87:71-78. doi: [https://doi.org/10.11416/jibs.87.3\\_071](https://doi.org/10.11416/jibs.87.3_071)

4, [Fujii Tsuguru](#), Banno Yutaka, Unique phenotype of the metamorphosis-defective mutant Ishigameyoh (*gap*): Establishment of a PCR-based marker for efficacious mutant maintenance in *Bombyx mori*. J. insect biotechnol. Sericology. 査読あり, 2017;86:95-103. doi: [https://doi.org/10.11416/jibs.86.3\\_095](https://doi.org/10.11416/jibs.86.3_095)

5, [Fujii Tsuguru](#), Yamamoto Kimiko, Banno Yutaka, Molybdenum cofactor deficiency causes translucent integument, male-biased lethality, and flaccid paralysis in the silkworm *Bombyx mori*. Insect Biochem Mol Biol., 査読あり, 2016 ; 73, 20-26. doi: 10.1016/j.ibmb.2016.03.008.

6, [Fujii Tsuguru](#), Ohnuma Akio, Banno Yutaka, Abe Hiroaki, Structural analysis of spontaneous Z-W translocations in the silkworm, *Bombyx mori*. 査読あり, 2016;85:79-85. doi: [https://doi.org/10.11416/jibs.85.3\\_079](https://doi.org/10.11416/jibs.85.3_079)

〔学会発表〕(計 7 件)

1、藤井告、山本和典、西川和弘、田村圭、太田幸一、伴野豊、Cas9タンパク質とp55系統を活用した効率的なカイコのゲノム編集、第63回日本応用動物昆虫学会、2019年03月25日-27日、筑波大学

2、藤井告、川本宗孝、嶋田透、伴野豊、NGS解析で同定した新規油蚕系統特異的突然変異、第89回日本蚕糸学会大会、2019年3月22日-23日、東京農工大学

3、藤井告、伴野豊、伴性遺伝子*BmPHYDD1*のゲノム編集によるカイコ卵サイズの大型化、第62回日本応用動物昆虫学会、2018年03月25日-27日、鹿児島大学

4、藤井告、山本和典、福森寿善、伴野豊、CRISPR/Cas9による尿酸合成不全型油蚕(*oya, ohi, oq*)のモザイク解析、第88回日本蚕糸学会大会、2018年03月19日-18日、名古屋大学

5、藤井告、櫻井健志、門田幸二、神崎亮平、嶋田透、伴野豊、NBRPカイコの変異体を活用した遺伝子機能研究、第61回日本応用動物昆虫学会、2017年03月27日-29日、東京農工大学

6、藤井告、長崎紀代美、福森寿善、山本和典、田村圭、江口誠一、西川和弘、伴野豊、石亀蛹の遺伝学的解析と効率的保存方法の開発、第86回日本蚕糸学会大会、2016年03月17日-18日、京都工芸繊維大学

7、藤井告、山本公子、伴野豊、キサンチン酸化酵素の注射で皮膚が不透明化する油蚕の遺伝学的解析、第85回日本蚕糸学会大会、2015年09月26日-27日、北海道大学

〔図書〕(計 1 件)

藤井告、エヌ・ティー・エス、カイコの実験単、2019、304ページ、(分担執筆 pp. 150-155, 実験 16 カイコのさまざまな突然変異体の観察)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：  
ローマ字氏名：  
所属研究機関名：  
部局名：  
職名：  
研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

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、研究者個人に帰属されます。