

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2022

課題番号：17K08161

研究課題名（和文）細胞死誘導システムを用いた病害虫・有用昆虫の不妊化システムの作出

研究課題名（英文）Generic cell ablation system: sterile-insect technique for control of infectious disease vector and prevention of leakage of beneficial insect strains

研究代表者

笠嶋 めぐみ（Kasashima, Megumi）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・上級研究員

研究者番号：90458290

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）：有用カイコ系統の流出を防止するために、遺伝子組換えカイコを任意の世代で不妊化する実用的な技術開発が必要である。そこで、細胞死を誘導できるエフェクター遺伝子を開発した。この遺伝子の発現させた組織に細胞死が誘導されることは、カイコの絹糸腺など複数の組織で確認した。次に、マラリア媒介ハマダラカの精巣にこの遺伝子を発現させ、不妊化を実現できることを確かめた。また、不妊化に必要な部位特異的ノックイン技術の開発のため、絹糸腺で発現する遺伝子の開始メチオニンを標的としたGal4遺伝子の挿入を行い、ノックインシステムを樹立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

The apoptosis gene used in this study can induce cell death in vivo regardless of insect type or tissue. It can be used not only as a sterilization technique, but also as a highly versatile system for functional analysis of nerves or specific tissues in Entomology.

研究成果の概要（英文）：Considering the Genetic Resource Security Strategy, it is necessary to develop a practical technique for sterilizing silkworms in order to prevent the unauthorized export or dissemination of valuable strains. First, we developed an effector utilizing mammalian apoptosis-associated gene and verified its ability to induce cell death in silkworms. Next, we expressed this gene in the testes of malaria-vector mosquitoes and confirmed that sterilization of male mosquito can be achieved. In addition, to develop the site-specific knock-in technology required for inducible sterilization, we established a knock-in strain by inserting the Gal4 gene that is expressed under the native initiation codon of the silk gland expressed gene.

研究分野：Insect genetics

キーワード：Transgenic silkworm Genome editing Specific gene expression Sterilization apoptosis cell death

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 F-19-2

1. 研究開始当初の背景

遺伝子組換え技術を利用した有用なカイコ系統の開発が進められている。このような有用カイコ系統の流出を防止して維持するために、遺伝子組換えカイコを任意の世代で不妊化する技術が必要であるが、実用的な系はなかった。

申請者らはこれまでに、昆虫に汎用性のある細胞死誘導が可能な遺伝子コンストラクトを開発していた。この細胞死誘導システムを利用して、有用昆虫の不妊化ができる可能性が考えられた。また、実用的な不妊化や昆虫制御のためには、ゲノム編集技術の高度化が求められていた。

2. 研究の目的

(1) 細胞死誘導エフェクター因子による昆虫の不妊化

細胞死誘導システムとは、特定の細胞や組織にアポトーシス（細胞死）を誘導して細胞を殺す技術である。これは発生生物学や神経生物学において特定の細胞が持つ機能を明らかにするための強力な研究ツールとして利用できる。しかしながら、従来の仕組みでは、種特異性や組織特性の問題から、昆虫で広く応用できる仕組みの開発には至っていなかった。本研究では、哺乳類の遺伝子を利用して、どのような昆虫でも特定の細胞・組織を選択的に除去することができるエフェクター因子を開発し、この因子によって昆虫の不妊化が可能であるか検証する。

(2) カイコにおける部位特異的ノックインの実施

ゲノム編集とは、TALEN や CRISPR/Cas9 などの部位特異的ヌクレアーゼを用いて、細胞内で特定の塩基配列を改変する技術である。これによって、これまで遺伝子組換えが難しかった生物種においても遺伝子ノックアウトや遺伝子ノックインが可能となっており、さまざまな生物で技術の高度化が進められている。本研究では、内在性のプロモーターエンハンサーを利用した遺伝子発現誘導の仕組みを構築するため、特異的発現遺伝子領域への Gal4 の導入を行い、特異的ノックインが可能か検証する。

(3) カイコオス特異的発現遺伝子の探索と CRISPR-Cas9 によるカイコ突然変異体の作出

生殖細胞特異的発現プロモーターの単離を目的として、幼虫の RNA-seq を実施し、特異的発現遺伝子を探索する。また、ゲノム編集技術の高度化に向けて CRISPR-Cas9 を用いた突然変異体を作出し、CRISPR-Cas9 による配列の認識の傾向を調べる。

3. 研究の方法

(1) Gal4-UAS によるバイナリシステムにより、特定の細胞に哺乳類の Bcl-2 タンパク質 Bax を発現させる（図 1）。カイコを用いて Gal4 依存的に Bax タンパク質を発現させると、特定の組織のみに細胞死を誘導することができる（図 2）。

そこで、病気媒介蚊であるハマダラカの不妊化を目的として、オス生殖細胞特異的発現プロモーターを新たに単離した（図 3A）。このプロモーターに Bax を誘導させ、発現組織の観察や交配実験を行った。

(2) 絹糸腺特異的に発現することがわかっているフィブロイン遺伝子を標的として、PITCh 法 (Nakade et al, 2014) による部位特異的組換えを行った。はじめに、特異的部位に挿入する Gal4 を含むプラスミド DNA を構築した。また、標的部位の TALEN を設計した。このプラスミド DNA と標的部位を認識する TALEN の mRNA を産卵直後のカイコ胚に注入し、飼育した。眼で発現する DsRed を選別マーカーとしてノックイン個体を選別した。（図 4）。Gal4 の発現組織の同定は、RT-PCR および UAS-GFP 系統との交配による GFP の発現により調べた。

(3) カイコ幼虫の各組織を採取して、RNA を抽出し、RNA-seq を実施した。また、機能不明な遺伝子のコード領域を認識する CRISPR のガイド RNA を 4 つデザインし、これを Cas9 タンパク質と混合してそれぞれカイコ胚に注入した。G0 世代における標的配列の変異について PCR を用いて調べ、標的の認識効率について調べた。

1. 研究成果

(1) 病気媒介蚊のオス生殖細胞特異的発現プロモーターを新たに単離した（図 3A）。このプロモーターに mBax を誘導させた組換え蚊は、精子が発達せずオス不妊になった（図 3B）。今後は、組織特異的プロモーターを開発することで、カイコを含む様々な昆虫の基礎研究や不妊化が可能となる。このシステムは、様々な昆虫で、組織を問わず細胞死を誘導できる汎用性の高いシステムである。本成果は、カイコにおけるメス致死や不妊化は、遺伝子組換え有用系統の流出防止のために有用な仕組みである。本研究のシステムは、そのような仕組みの開発に役立つ。また、不妊化には、生殖に関わる組織特異的プロモーターの開発が不可欠であるが、近年の遺伝子発現解析技術の躍進により、それらの単離も簡便になると予想される。

(2) ノックイン個体を分離し、この系統と UAS の下流で EGFP を発現するカイコを交配し、F1 における EGFP の発現を調べたところ、ノックインの標的遺伝子と同様に、後部絹糸腺特異的に EGFP

が観察され、Gal4 がフィブロインの発現と同様の調節を受けることが確かめられた (図 6)。この技術は、内在性のエンハンサーやプロモーターを利用した、精密な遺伝子誘導システムに応用できる (図 5)。

(3) RNA-seq を元に単離したカイコ幼虫の精巣特異的遺伝子について、調節領域を含むと推定される遺伝子上流域をクローニングした。今後、遺伝子組換えカイコを作出して調節領域のプロモーター活性について解析を続ける予定である。また、CRISPR-Cas9 による配列の認識の傾向を確認するための突然変異体の作出では、デザインした 4 つの CRISPR のガイド RNA のうち、一つは効率よく突然変異を得ることができたが、他の 3 つでは全く変異個体が検出できなかった。この効率の差が何に由来するのかは不明である。今後のノックインへの応用では、標的配列によって全く効率が異なることを考慮する必要がある。

UAS-GAL4-Based Gene Expression System

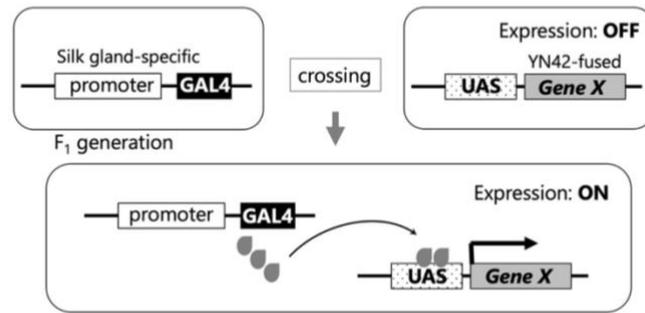


図 1: Gal4/UAS バイナリーシステム。GeneX に細胞死誘導遺伝子を用いると、Gal4 依存的な細胞死の誘導が実現できる。

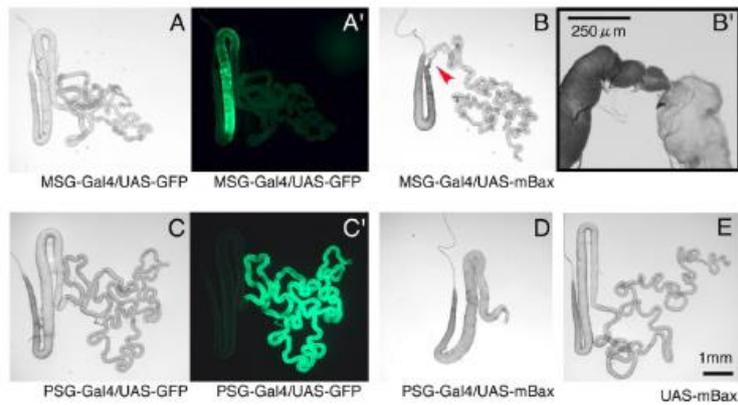


図 2: mBax による細胞死誘導の効果。緑色蛍光が観察される部位が Gal4 発現細胞。mBax により、Gal4 発現組織が消失している。

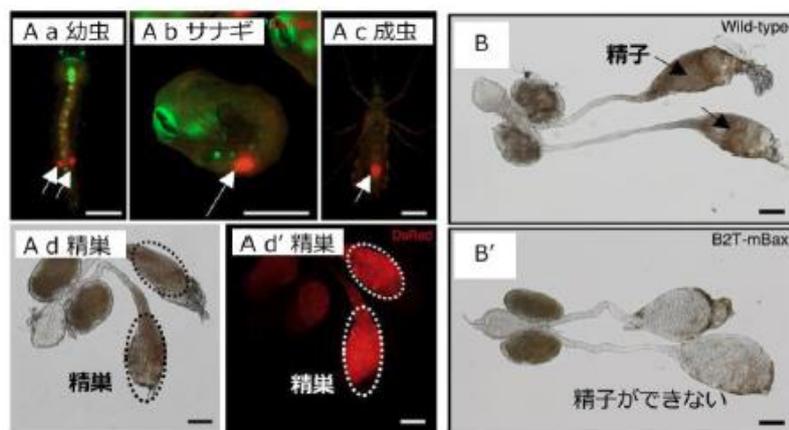


図 3: mBax のハマダラカを用いた不妊化オス作出の実証実験。新たに単離した精巣特異的発現遺伝子プロモーターにより mBax を発現させると (A: 赤の部位)、オスの精子ができなくなった。

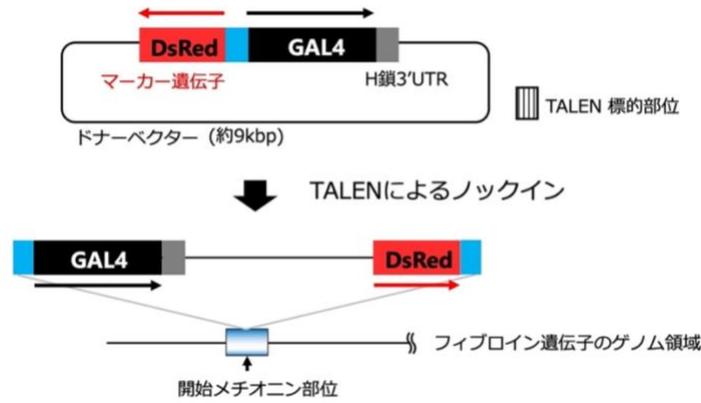


図4: TALENによる部位特異的ノックイン。ノックインのドナーベクターの構造と、標的部への挿入イメージ。矢印はTALENの標的配列を示す。

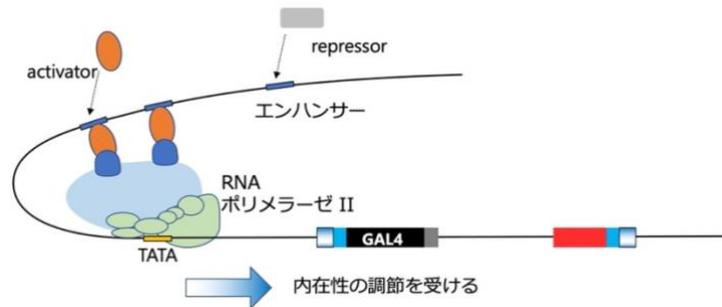


図5: 内在性のエンハンサーやプロモーターによって調節を受けるGal4。組織・時期特異的発現システムの構築に活用できる

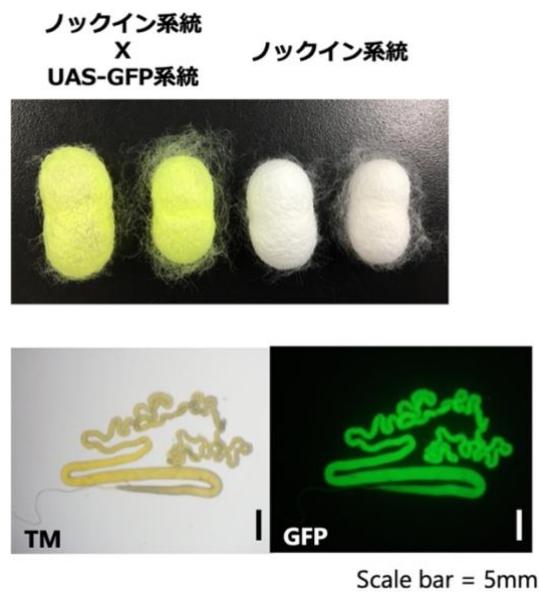


図6: ノックイン系統の繭と絹糸腺。UAS-GFP系統と交配したF1世代の繭は、Gal4の誘導によって絹糸腺でEGFPが発現するため、繭に緑色蛍光が観察される(上段)。後部絹糸腺で発現したGFPは絹糸腺ルーメン内に分泌されるため、絹糸腺全体に緑色蛍光が観察される。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Daisuke S. Yamamoto, Megumi Sumitani, Katsumi Kasashima, Hideki Sezutsu, Hiroyuki Matsuoka & Hiroto Kato	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 A synthetic male-specific sterilization system using the mammalian pro-apoptotic factor in a malaria vector mosquito	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 印刷中
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 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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 笠嶋めぐみ・笠嶋克巳・近藤まり・一ノ瀬清・行弘文子・田中博光・飯塚 哲也・内野恵郎、瀬筒秀樹
2. 発表標題 カイコ創薬の新展開 ~蚕業革命の推進~ TFAM の過剰発現によるミトコンドリア機能異常カイコモデルの構築
3. 学会等名 日本薬学会第139会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 一ノ瀬清・近藤まり・山田信人・飯塚哲也・瀬筒秀樹・笠嶋めぐみ
2. 発表標題 TFAMの過剰発現による疾患モデルカイコの構築
3. 学会等名 つくば医工連携フォーラム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本大介・笠嶋めぐみ・加藤大智
2. 発表標題 doublesexノックアウトハマダラカの中朝における遺伝子転写産物の解析
3. 学会等名 日本応用動物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 一ノ瀬清・近藤まり・山田信人・飯塚哲也・瀬筒秀樹・笠嶋めぐみ
2. 発表標題 BmTFAM 過剰発現カイコの表現型解析
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 2019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
研究分担者	山本 大介 (Yamamoto Daisuke) (90597189)	自治医科大学・医学部・准教授 (32202)	

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
---------	---------