

令和 6 年 6 月 1 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02202

研究課題名(和文)カイコの寿命に關与するBmNRF6遺伝子ファミリーの表現型および生理機能の解析

研究課題名(英文)Functional analysis of the BmNRF6 gene family involved in lifespan of the silkworm

研究代表者

伊藤 克彦(Ito, Katsuhiko)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80725812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,700,000円

研究成果の概要(和文)：死蟻蚕変異体においては、ゲノム編集によるノックアウト個体と変異体との相補性検定により原因遺伝子を特定した。成虫短命変異体においては、体内のグリセロール量が変異体でのみ急速に減少していることを突き止め、エネルギー代謝異常が表現型に関わっている可能性を見出した。BmNRF6遺伝子群の解析においては、18種類すべてのBmNRF6における組織別(脳、神経、絹糸腺、精巣、卵巣、脂肪体、マルピギー管、前腸、中腸、後腸)の遺伝子の発現パターンを調査し、遺伝子ごとに発現組織さらには発現量が異なることを突き止めた。また、4種類のBmNRF6においてはゲノム編集によるノックアウト個体の作出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々はカイコのゲノム上に18種類のBmNRF6遺伝子が存在することを明らかにし、そのうちの2つがカイコの幼虫致死と成虫寿命に関わることを見出した。NRF6遺伝子は他生物種においてその機能がほとんど明らかになっていない。そのため、本研究で得られる成果はカイコのみならず昆虫の新たな生理機能の探索につながると考えられる。また本研究は、カイコを従来の養蚕業上重要な昆虫として位置づけるのではなく、作物の害虫であるチョウ目昆虫として考えることで、致死や短命という表現型をペストコントロールに展開することも目的としている。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to identify the function of BmNRF6 gene family responsible for the larval lethal and short life span of imago. In the l-nl gene responsible for lethality immediately after hatching, we have successfully isolated the causative gene throughout genome editing approach and allelic test between knockout individuals and mutants. In the sli gene responsible for short life span of imago, we found that the amount of glycerol in the moth body decreased rapidly only in the mutant, suggesting that the phenotype of short life span of imago may be related to abnormal energy metabolism. In the BmNRF6 gene family, we analyzed tissue-specific gene expression patterns in the brain, nervous system, silk gland, testis, ovary, fat body, malpighian tubules, foregut, midgut, and hindgut, in all 18 BmNRF6 gene, and found that each gene is expressed differently in each tissue and even in different amounts. In addition, we have successfully generated four types of BmNRF6 knockout lines.

研究分野：昆虫遺伝学

キーワード：カイコ 致死 寿命 突然変異 ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

チョウ目昆虫のモデル生物として位置づけられているカイコでは、今日までに、発育・成長、形態形成、生理形質、行動、さらには罹病性などに特徴がある数百の突然変異体が発見・作出されている。これらは長い養蚕の歴史の中で選抜された有用な遺伝資源であると言える。申請者はこれまで、これらの突然変異体の中でもカイコの致死および寿命に関係するものに着目し、その原因遺伝子の探索を進めてきた(基盤研究(C)H30-32, 研究代表: 伊藤克彦(本課題申請者))。研究対象として解析を進めた「死蟻蚕」突然変異体は、原因遺伝子(*l-nl*)をホモで持つと孵化後1~2時間で突然死する(図1A)。また、「成虫短命」と呼ばれる突然変異体は原因遺伝子(*sli*)をホモで持つと、その名の通り成虫寿命が短くなる(図1B)。申請者はこれらの突然変異の原因遺伝子の単離を進め、両突然変異体の有力な候補遺伝子が、ともに Nose resistant to fluoxetine protein 6 (以下、NRF6)と呼ばれるタンパク質をコードしていることを突き止めた。

また、カイコのゲノム上に存在する *NRF6* 遺伝子を調査したところ、興味深いことに申請者が明らかにした2つの *NRF6* 遺伝子の他にさらに16個、計18種類もの遺伝子が存在することが明らかになった(図2)。*NRF6* 遺伝子が数多く存在すること、そして、少なくともその中の2つが致死および寿命に関わっていることから、*NRF6* 遺伝子はカイコの生育において重要な機能を有することが予想された。さらに、*NRF6* をコードする遺伝子に関する先行研究を調査したところ、ショウジョウバエでは成虫寿命や消化機能および雌の不妊などに(Blumenthal, 2008)、線虫においては鼻における薬剤応答や卵での卵黄顆粒の輸送などに関わっていることがすでに報告されていた(Choy et al., 2006; Watts and Browse, 2006)。このことから、*NRF6* 遺伝子は節足動物や線形動物の生育に重要であると考えられた。しかしながら *NRF6* 遺伝子については、これら以外に詳細な報告例はなく、機能に関してはほとんどわかっていなかった。

2. 研究の目的

申請者はこれまでに、「幼虫の孵化直後の致死」および「成虫の寿命」に関わる2つの変異体の解析を進め、これらの表現型が *BmNRF6* 遺伝子ファミリーに所属する遺伝子によって制御されていることを発見した。*NRF6* 遺伝子は線虫とショウジョウバエで薬剤応答や成虫寿命等に関わることが報告されているが、これら以外には詳細な報告はなされていない。またカイコのゲノム上には、18種類の *BmNRF6* 遺伝子が存在するが、それらの機能も未知である。そこで本申請課題では、*BmNRF6* 遺伝子ファミリーのカイコの生理機能への影響を調べることで、チョウ目昆虫の生存にとっての *NRF6* 遺伝子の役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、以下に示す3つの課題に取り組んだ。

① 死蟻蚕 (*l-nl*)の機能解析

本課題では、死蟻蚕変異体の「幼虫の孵化直後の致死」という表現型が、どのような生理現象

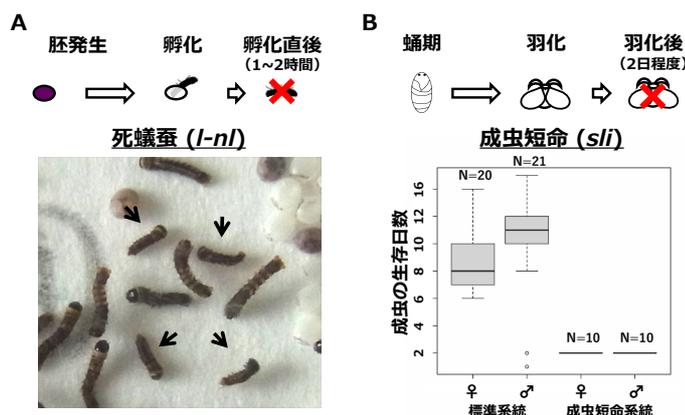


図1. 本研究で取り組むカイコの致死および成虫寿命に関わる突然変異。(A)死蟻蚕(原因遺伝子*l-nl*)の表現型。*l-nl*をホモで持つ個体は、孵化1~2時間以内で致死する(上図)。下図の黒矢印が変異形質を示す個体。(B)成虫短命(原因遺伝子*sli*)の表現型。*sli*をホモで持つ個体は、羽化後2日程度で致死する(上図)。下図は、標準系統と成虫短命系統の成虫の生存日数。標準系統が8~10日程度生存するのにに対し、変異系統は2日で致死する。致死については雌雄差はない。

また、カイコのゲノム上に存在する *NRF6* 遺伝子を調査したところ、興味深いことに申請者が明らかにした2つの *NRF6* 遺伝子の他にさらに16個、計18種類もの遺伝子が存在することが明らかになった(図2)。*NRF6* 遺伝子が数多く存在すること、そして、少なくともその中の2つが致死および寿命に関わっていることから、*NRF6* 遺伝子はカイコの生育において重要な機能を有することが予想された。さらに、*NRF6* をコードする遺伝子に関する先行研究を調査したところ、ショウジョウバエでは成虫寿命や消化機能および雌の不妊などに(Blumenthal, 2008)、線虫においては鼻における薬剤応答や卵での卵黄顆粒の輸送などに関わっていることがすでに報告されていた(Choy et al., 2006; Watts and Browse, 2006)。このことから、*NRF6* 遺伝子は節足動物や線形動物の生育に重要であると考えられた。しかしながら *NRF6* 遺伝子については、これら以外に詳細な報告例はなく、機能に関してはほとんどわかっていなかった。

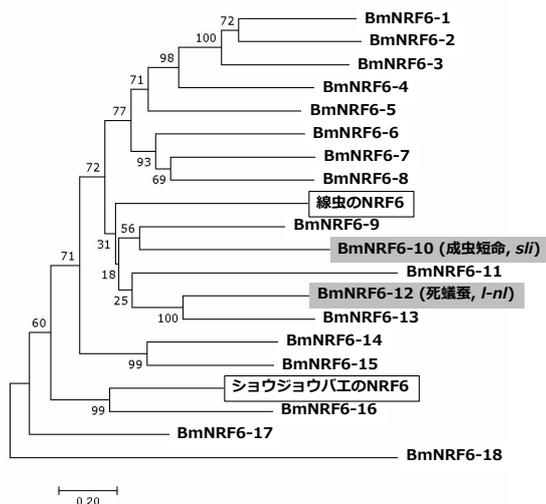


図2. *BmNRF6*ファミリーの系統樹。

カイコのゲノム上には18個の*BmNRF6*が存在する。灰色で示したものが死蟻蚕と成虫短命をコードする*BmNRF6-6*になる。先行研究により機能が報告されている線虫とショウジョウバエの*NRF6*を四角囲んで示している。

の異常により生じているのかを明らかにすることを目的とした。先行研究により、申請者は、*l-nl* が脂肪体で高発現している膜タンパク質をコードしていることを突き止めている。昆虫の脂肪体は、エネルギーの貯蔵や供給に関わる重要な組織であることから、死蟻蚕の原因は、脂肪体におけるエネルギー代謝異常により生命活動を維持できなくなり致死（飢餓）しているという仮説を立てた。そこで本課題では、死蟻蚕の表現型解析として、エネルギー代謝関連物質の比較定量を行った。具体的には、カイコ虫体内のグリセロール量とトリグリセリド量を測定し、標準系統と変異系統とで比較した。

加えて本課題では、*l-nl* 遺伝子産物が生体内でどのような役割を担っているのかを予測するため、より詳細な発現組織の特定を行った。死蟻蚕の表現型は、孵化直後の致死である。そのため、本膜タンパク質を特異的に認識する抗体を作製し、その抗体と孵化直後の幼虫のパラフィン切片を用いた免疫染色により、詳細な局在解析を行った。

② 成虫短命 (*sli*)の機能解析

本課題では、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集により、*sli* 候補遺伝子が本当に成虫短命変異体の表現型に関わっているのかを証明することを目的とした。申請者はこれまでの解析で、*sli* のゲノム上の候補領域をカイコ 25 番染色体上の 0.3 Mb 内に特定し、その中で一つの有力な候補遺伝子を単離している。この候補遺伝子は *NRF6* タンパク質をコードしており、標準系統と成虫短命系統間において翻訳されるアミノ酸配列に顕著な違いが存在することがわかっている。そこで、この遺伝子が *sli* 遺伝子本体であることを確かめるために、*sli* 候補遺伝子のノックアウト系統を作出し、その表現型を調査した。

また、標準系統と成虫短命系統間での表現型の比較解析を実施することで、何が原因で成虫寿命が短くなっているのかを考察した。具体的には、成虫期の体重の変化や体内水分量の推移を調査し、比較した。加えて、カイコ成虫は餌等を摂取することはないため、成虫短命の表現型も死蟻蚕と同様にエネルギー代謝に関わっている可能性を考えた。そこで、死蟻蚕の課題で確立した虫体内におけるエネルギー代謝関連物質の測定手法を用いて、標準系統および成虫短命系統間での比較定量を行った。

③ *BmNRF6* 遺伝子ファミリーの網羅的な機能解析

本課題では、*BmNRF6* 遺伝子ファミリーの機能を予測するために、各遺伝子の発現パターンを調査した。具体的には、ファミリー内の 18 種類全ての *BmNRF6* 遺伝子について、それぞれの発現時期（いつ）および発現組織（どこ）を RT-PCR により明らかにした。

また、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集により、*BmNRF6* 遺伝子ファミリーがどのような表現型に関与するのかについても調査した。ファミリー内の 18 種類全ての *BmNRF6* 遺伝子のゲノム編集系統の作出は系統の飼育および維持で多大な労力を要すると考え、まずは、線虫、*l-nl*、*sli* のクレードに所属する *BmNRF6-9*、*-11*、*-13* と、ショウジョウバエのオーソログに当たる *BmNRF6-16* (図 2)について解析を進め、それぞれの表現型と機能を考察した。

4. 研究成果

① 死蟻蚕 (*l-nl*)の機能解析

死蟻蚕変異体においては、ゲノム編集ならびにノックアウト個体と変異体との相補性検定により原因遺伝子を特定した。また、*l-nl* がコードする膜タンパク質を特異的に認識するペプチド抗体を作製し、組織切片の免疫染色を実施したが、タンパク質の局在は確認されなかった。この理由としては、使用した抗体がペプチド抗体のためエピトープの長さや特異性に問題があった可能性が考えられる。そのため、今後は精製タンパク質を用いた新たな抗体を作製する必要があると考えられた。また、エネルギー代謝関連物質としてグリセロールとトリグリセリドに着目し、虫体内におけるこれらの定量法の確立を行った。その結果、使用する抽出試薬や抽出法を検討することで、アッセイ系の構築に成功した。

② 成虫短命 (*sli*)の機能解析

成虫短命変異体においては、ゲノム編集による候補遺伝子の特定には至らなかった。それゆえ、今後は本実験を完結する必要がある。一方、成虫短命突然変異体と正常個体の表現型の比較解析を行い、変異体では成虫期に急激な体重の減少が認められ、死に至っていることを明らかにした。加えて加湿乾燥式水分計を用いた解析により、この体重の減少は体内における水分量の減少によるものではないことも明らかにした。また、エネルギー代謝異常により短命になっているという仮説を立て、変異体と正常個体間のエネルギー代謝関連物質（トリグリセリド量およびグリセロール量）の比較定量を実施した結果、トリグリセリド量については変異体と正常個体間で差はなかったものの、グリセロール量については、変異体で急速に減少していることが明らかになった。このことから、エネルギー代謝異常が成虫短命という表現型に関わっている可能性が示唆された。

③ *BmNRF6* 遺伝子ファミリーの網羅的な機能解析

BmNRF6 遺伝子群の解析においては、18 種類すべての *BmNRF6* における組織別（脳、神経、絹糸腺、精巣、卵巣、脂肪体、マルピギー管、前腸、中腸、後腸）の遺伝子の発現パターンを調査し、遺伝子によって発現の有無や発現組織さらには発現量が様々であることを突き止めた。また、4 種類の *BmNRF6* においてゲノム編集によるノックアウト個体の作出にも成功した。今後は、これらの表現型解析を進めていく予定である。

引用文献

1. Blumenthal, EM. 2008. Cloning of the neurodegeneration gene drop-dead and characterization of additional phenotypes of its mutation. *Fly*, 2, 180-188. DOI: 10.4161/fly.6546.
2. Choy RK, Kemner JM, Thomas JH. 2006. Fluoxetine-resistance genes in *Caenorhabditis elegans* function in the intestine and may act in drug transport. *Genetics*, 172, 885-892. DOI: 10.1534/genetics.103.024869.
3. Watts JL, Browse J. 2006. Dietary manipulation implicates lipid signaling in the regulation of germ cell maintenance in *C. elegans*. *Dev Biol.*, 292, 381-392. DOI: 10.1016/j.ydbio.2006.01.013.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 0件）

〔学会発表〕 計24件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 白田 乃々香・横山 岳・伊藤 克彦
2. 発表標題 ノックアウト個体を用いた卵致死に関わるカイコ発育遅延D遺伝子の同定
3. 学会等名 日本蚕糸学会第94回大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 諫早向日葵, 横山岳, 伊藤克彦
2. 発表標題 カイコのNRF6遺伝子の組織別発現解析とノックアウト個体の作出
3. 学会等名 日本蚕糸学会第94回大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 伊藤 克彦・横山 岳
2. 発表標題 RNA-seq解析によるカイコk不眠蚕の原因遺伝子の同定
3. 学会等名 日本蚕糸学会第94回大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 アドリアン トリアンディ・横山 岳・伊藤 克彦
2. 発表標題 Positional Cloning and Detection of Gene Responsible for Lethal “Non-Molting-K” Mutation in the Silkworm <i>Bombyx mori</i> .
3. 学会等名 日本蚕糸学会第93回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 諫早 向日葵・横山岳・伊藤克彦.
2. 発表標題 カイコNRF6遺伝子の発現解析および機能解析
3. 学会等名 日本蚕糸学会第93回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 諫早 向日葵・竹村 洋子・大沼 昭夫・持田 裕司・横山 岳・伊藤 克彦
2. 発表標題 カイコ新規致死突然変異体 light orange lethalの原因遺伝子(l-og)の同定
3. 学会等名 日本蚕糸学会第93回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 青木宗也, 横山岳, 伊藤克彦
2. 発表標題 カイコ発育遅延D突然変異体の胚致死形質に関わる原因遺伝子の単離
3. 学会等名 日本蚕糸学会第93回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小俣公洋・横山岳・伊藤克彦
2. 発表標題 カイコ成虫短命変異体の候補遺伝子の機能解析
3. 学会等名 日本蚕糸学会第92回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小俣公洋・横山岳・伊藤克彦
2. 発表標題 成虫短命変異体における原因遺伝子sliの探索
3. 学会等名 第6回蚕糸・昆虫機能利用関東地区学術講演会
4. 発表年 2021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	横山 岳 (Yokoyama Takeshi) (20210635)	東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授 (12605)	

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