

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850228

研究課題名(和文)カイコ小球細胞欠如突然変異体の原因遺伝子の同定～存在意義が不明な血球の謎に迫る～

研究課題名(英文) Identification of the gene responsible for the spherulocyte-lacking mutant in the silkworm, Bombyx mori

研究代表者

木内 隆史 (Kiuchi, Takashi)

東京大学・農学生命科学研究科・助教

研究者番号：60622892

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：5種類に分類されるカイコの血球のうち、小球細胞はその役割や由来が全くわかっていない。私たちは小球細胞を欠くカイコの突然変異体の原因遺伝子を突き止めることでその謎に迫ろうとした。遺伝学的方法を用いることで原因遺伝子の候補を絞り込むことに成功した。さらに、ある候補遺伝子の配列内部に突然変異体に特徴的な欠失を発見した。また、カイコにおいてターゲット遺伝子に人為的に変異を導入する手法を開発した。今後はその手法を用いて候補遺伝子の機能を破壊し、突然変異体の原因遺伝子であることを証明する。また、人為的に小球細胞を失わせたカイコを作ることで、その役割や由来を明らかにすることができる。

研究成果の概要(英文)：Hemocytes of the silkworm, Bombyx mori, are classified into five subsets. It is believed that those functions are basically involved in immune system. However, the function and the origin of spherulocytes are completely unknown. To solve these mysteries, we use the silkworm mutant which lack spherulocyte.

We narrowed the responsible gene for the spherulocyte-lacking mutant by genetic strategy. A deletion in a candidate gene was identified in the mutant strain. We also developed the genetic engineering methods to introduce the mutation in a target gene. The function of the candidate gene in spherulocyte differentiation will be elucidated by the developed method. Furthermore, the artificial spherulocyte-lacking silkworm can reveal the function and origin of spherulocyte.

研究分野：昆虫分子生物学

キーワード：カイコ突然変異体 血球 小球細胞 分化系譜 ゲノム編集 遺伝学 分子生物学

1. 研究開始当初の背景

昆虫の血球は一般には原白血球、プラズマ細胞、顆粒細胞、エノシトイド、そして小球細胞(図1)の5種類に分類される(Gupta, 1979, Insect Hemocytes)。基本的には体内に侵入する異物などに対しての生体防御と傷の治療に参与している(Wago, 1991, Immunology of Insects and Other Arthropods, Lavine & Strand, 2002, Insect Biochem Mol Biol)。また近年では、各血球の分化系譜も次第に明らかにされつつある(Nakahara et al., 2010, PLoS One)。しかしながら小球細胞に関しては、その機能および分化系譜は推測こそされているものの未知であり(Yamashita & Iwabuchi, 2001, J Insect Physiol)それを保有しない種も存在することから存在意義が全く謎である。カイコでは小球細胞を欠く突然変異体が存在し、かつその原因遺伝子が劣性に働くものと優性に働くものと独立に2つあることが報告されている(入野野, 1960, 蚕誌報)。

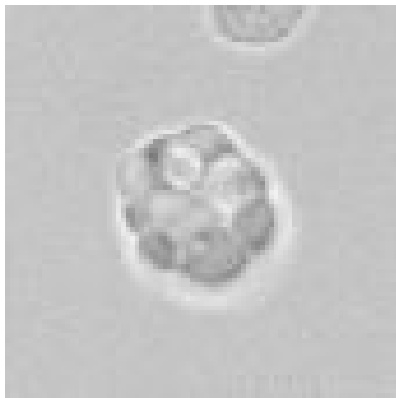


図1. 小球細胞

2. 研究の目的

小球細胞欠如突然変異体の原因遺伝子を同定することで小球細胞の分化系譜を明らかにする。また、遺伝子工学的に小球細胞を欠く系統を作ることによって、その機能に迫る。

3. 研究の方法(図2)

(1) 劣性小球細胞欠如突然変異体(*spr*)と優性小球細胞欠如突然変異体(*Sph*)の候補遺伝子をポジショナルクローニングにより絞り込む。

(2) 血球培養系(Nakahara et al., 2010, PLoS One)を利用して候補遺伝子を細胞内に導入し、突然変異体の血球を小球細胞に分化させる。

(3) embryonic RNAi法(Yamaguchi et al., 2011, PLoS One)を用いて、候補遺伝子のノックダウンを行い、小球細胞への分化が抑制されることを確認する。

(4) 培養系や siRNA での機能証明が困難な場合には、候補遺伝子を導入したバキュロウ

イルス AcMNPV を個体に注射し、感染させることで分化を誘導する(Katsuma et al., 2008, Virus Res)。

(5) Transcription Activator-Like Effector Nuclease (TALEN) を用いて突然変異体の原因遺伝子を欠失させたノックアウトカイコを作成し(Takasu et al., 2013, PLoS One)、小球細胞の有無で個体にどのような影響が生じるかを調べる。とくに基本的な血球の機能とされている免疫応答に違いがあるか、古くから指摘されている計量形質(幼虫経過日数および繭重量)に差が生じるかを調査する。

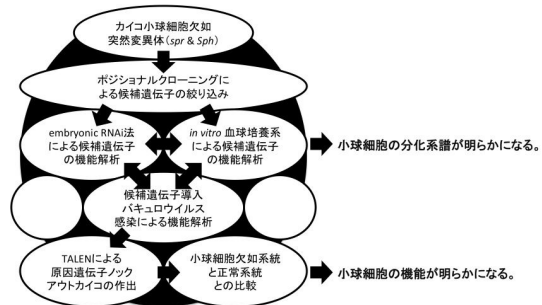


図2. 本研究のスキーム図

4. 研究成果

(1) 遺伝学的手法を用いて劣性小球細胞欠如突然変異体(*spr*)の原因遺伝子の同定を試みた。平成25年度に行った九大 t90 系統(*spr*, *w-3^{ol}*)と東大 C108T 系統(*+^{spr}*, *+^{w-3}*)の BC1 個体を用いたポジショナルクローニングにより *spr* の候補遺伝子を 10 番染色体の約 260 kb の領域に含まれる 7 個の予測遺伝子に絞り込んだ。平成 26 年度はさらに絞り込みを進め、最終的に 2 個の予測遺伝子に絞り込むことができた。そのうちの 1 つの遺伝子は機能既知の遺伝子であり、候補から除外することができたため、もう 1 つの遺伝子が原因遺伝子であると予想し配列解析を行った。その結果、突然変異体では遺伝子配列内に欠失が存在することが判明し、完全な形のタンパク質が翻訳されていない可能性が示唆された。また、その欠失はゲノム上の欠失に由来することが確かめられた。以上の結果から、この遺伝子の欠失が小球細胞を欠く原因である可能性が高い。現在、RACE 法を用いることで原因遺伝子の全長配列を決定し、数系統間で配列を比較している。

(2) 優性小球細胞欠如突然変異体(*Sph*)の同定も平行して行った。九大 n15 系統(*Sph*)と東大 C108T 系統(*+^{Sph}*)の BC1 個体を用いて *Sph* のポジショナルクローニングを行い、候補遺伝子が存在する Scaffold を特定することができた。しかし、その後予想に反し PCR 多型マーカーを構築することに困難を要したため、それ以上の絞り込みを行うことができなかった。今後は SNP マーカーを用いる等の対策を行う必要がある。

(3)当初は血球培養系での細胞内遺伝子導入を行う予定であったが、より生体内の環境が反映される生体内遺伝子導入を試すことにした。欠失が確認された原因遺伝子の機能的な証明を行うために、in vivo transfection法 (Kamimura et al., 2012, J Biol Chem)により原因遺伝子を変異系統に一過的に導入し、小球細胞が生じるかどうかを調べた。結果として小球細胞様の血球を確認することができたが、完全な復帰までには至らなかったため実験系の再検討が必要である。

(4) embryonic RNAi 法やバキュロウイルスによる強制発現系よりも原因遺伝子の直接的な機能証明が可能な遺伝子ノックアウトを優先して行うことにした。当初はTALENを用いて原因遺伝子のノックアウトを行う予定であったが、手順が簡便な clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR associated proteins (CRISPR/Cas9) システムを早期に構築できたため (図3) こちらの手法を用いることにした (Daimon et al., 2014, Dev Growth Differ)。本手法の確立は今までショウジョウバエ以外では困難とされてきたターゲットングを簡便に実現できる点で昆虫科学会に大きなインパクトを与えうる。本研究での利用はもちろん、様々な研究分野に波及していくことが期待できる技術である。

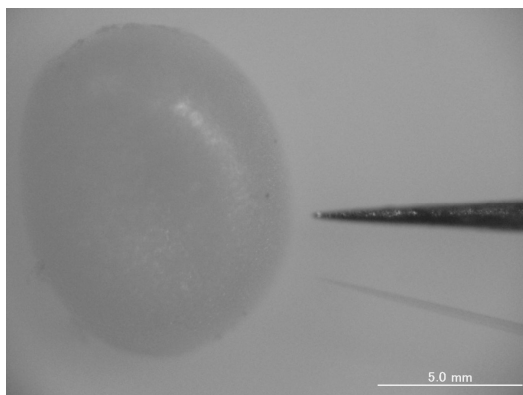


図3. 遺伝子ノックアウトシステムの確立

しかし残念なことに、通常ノックアウトカイコの樹立に用いる非休眠系統はそもそも小球細胞が存在しないことが判明し、原因遺伝子をノックアウトしても表現型を確認することができないことがわかった。一方、標準型として用いているC108T系統は基本的に休眠卵を産下するため、ノックアウトカイコの作出に必須な卵への核酸注入に適さないといった問題があった。この問題を解決するために、休眠に関与する遺伝子をsiRNAでノックダウンする (Yamaguchi et al., 2011, PLoS One) ことで休眠を打破しつつCRISPR RNAやガイドRNAを注入する方法を考案した。今後は、考案した方法でノックアウトカイコを樹立し、原因遺伝子の機能を証明することと、樹立したノックアウトカイコを用いて小球

細胞の機能と分化系譜を明らかにしたいと考えている。

<引用文献>

Gupta AP (1979) Hemocyte types: their structures, synonymies, interrelationships, and taxonomic significance. In: Gupta AP, ed. Insect Hemocytes. Cambridge: Cambridge University Press. pp 86-127.

Wago H (1991) Phagocytic recognition in *Bombyx mori*. In: Gupta AP, ed. Immunology of Insects and Other Arthropods. Boca Raton: CRC Press. pp 215-235.

Lavine MD, Strand MR (2002) Insect hemocytes and their role in immunity. Insect Biochem Mol Biol 32: 1295-1309.

Nakahara Y, Kanamori Y, Kiuchi M, Kamimura M (2010) Two hemocyte lineages exist in silkworm larval hematopoietic organ. PLoS One 5: e11816.

Yamashita M, Iwabuchi K (2001) *Bombyx mori* prohemocyte division and differentiation in individual microcultures. J Insect Physiol 47: 325-331.

入戸野 康彦 (1960) 家蚕の血球に関する研究. 蚕試報 16: 171-253.

Yamaguchi J, Mizoguchi T, Fujiwara H (2011) siRNAs induce efficient RNAi response in *Bombyx mori* embryos. PLoS One 6: e25469.

Katsuma S, Horie S, Shimada T (2008) The fibroblast growth factor homolog of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus enhances systemic virus propagation in *B. mori* larvae. Virus Res 137: 80-85.

Takasu Y, Sajwan S, Daimon T, Osanai-Futahashi M, Uchino K, Sezutsu H, Tamura T, Zurovec M (2013) Efficient TALEN construction for *Bombyx mori* gene targeting. PLoS One 8: e73458

Kamimura M, Saito H, Niwa R, Niimi T, Toyoda K, Ueno C, Kanamori Y, Shimura S, Kiuchi M (2012) Fungal ecdysteroid-22-oxidase, a new tool for manipulating ecdysteroid signaling and insect development. J Biol Chem 287: 16488-16498.

Daimon T, Kiuchi T, and Takasu Y (2014) Recent progress in genome engineering techniques in the silkworm, *Bombyx mori*. Dev Growth Differ 56: 14-25.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Takaaki Daimon, Takashi Kiuchi, and Yoko Takasu (2014) Recent progress in genome engineering techniques in the silkworm, *Bombyx mori*. *Development, Growth and Differentiation* 56(1): 14-25.
DOI: 10.1111/dgd.12096, 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

木内 隆史・北村 基・菅野 雄大・岡村 岳季・福井 崇弘・古賀 光・山野 峻・庄司 佳祐・勝間 進・嶋田 透、カイコ劣性小球細胞欠如突然変異体の原因遺伝子の同定、平成 27 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会、2015 年 9 月 26-27 日、北海道大学(札幌)

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://papilio.ab.a.u-tokyo.ac.jp/igb/>

6. 研究組織

(1)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・助教

研究者番号：60622892