

博士論文

カイコの「かすり」変異体に関する分子遺伝学的研究

湯浅正志

## 目次

【序論】 .....	1
【第一章】 かすり変異体のポジショナルクローニング	
緒言 .....	10
材料と方法 .....	13
結果 .....	16
考察 .....	21
図表 .....	23
【第二章】 CRSIPR/Cas9 システムによる <i>BmGC-I</i> のノックアウト	
緒言 .....	30
材料と方法 .....	32
結果 .....	36
考察 .....	38
図表 .....	40
【第三章】 <i>BmGC-I</i> 遺伝子の機能に関する解析	
緒言 .....	43
材料と方法 .....	45
結果 .....	48
考察 .....	52
図表 .....	55
【総合考察】 .....	62
【摘要】 .....	72
【引用文献】 .....	77
【謝辞】 .....	94

## 序論

### 色彩パターンの多様性とその生物学的意義

生物には驚くほど多種多様な色彩パターンが存在している。多様な色彩パターンは人間から見ると、美しさや複雑さが目を引くが、生物学的には、個体の生存や生殖に有利に働く極めて重要な形質の一つである (Romoser and Stoffolano, 1994)。すなわち、色彩パターンは天敵から身を守る手段、生殖ための手段、生理的な機能として役立ち、例えば、周辺環境へと自分の姿を隠すための保護色や、毒性などの自身の危険性を示すことで天敵からの攻撃を避けるための警告色、あるいはそれら警告色を示すものへと類似したパターンを作ることで天敵から身を守る擬態、同じ種の個体の認識、交尾相手の健康や高い魅力の選択のための目印、熱の吸収による体温の調節や紫外線に対する防御など、様々な目的に用いられている。このような生物における多種多様な色彩パターンは、様々な環境への適応進化の結果だと考えられている。そのため、色彩パターンの形成メカニズムを理解することは、生物の適応進化の過程を理解する上で重要な足がかりとなりうる。

### 昆虫を用いた色彩パターンの研究

様々な生物において色彩パターンは観察できるが、とりわけ多様な色彩パターンを示すのが昆虫である。昆虫では多様な色彩パターンが種間だけでなくその種内においても観察でき、それに加えて、発生段階ごとに異なる色彩パターンを示す種も存在している。現在昆虫は100万種以上が同定されており、世界中の様々な環境に生息していることがわかっている。要するに、昆虫の色彩パターンの多様性は世界中の様々な地理的環境へ適応した

結果を反映していると考えられる。

昆虫の色彩パターンは、複数の種類の色素による組合せと光の反射を利用した構造色により構成されるが、現在までの研究は色素の合成や制御に関わる遺伝子を主な対象に行われている。昆虫における色彩パターンの形成に関わる遺伝子については、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) とその近縁種、また、チョウ目昆虫に翅の紋様形成に関する研究の貢献が大きく、それにより、色素の生合成に関わる遺伝子や色彩パターンを規定するシグナル伝達に関わる遺伝子など多数の遺伝子が色彩パターンに関わることが明らかになっている (Monterio, 2015; True, 2003)。

#### 成虫の翅における色彩パターンの形成の分子基盤

色彩パターンの中でもっともよくわかっているのが、黒色の色彩パターンの形成についてである。昆虫の黒色系の色素はチロシンの代謝産物であるメラニンであるが、これらが生産される位置と割合により黒色の色彩パターンが決定される。この内、位置情報は発生と密接に結びついたものであり、初期発生に必要な遺伝子の発現と翅の紋様の一致が報告されている。しかしながら、遺伝子の機能と色彩パターンとの関連を検証した実験は多くない。関連が明確に示された例の一つが、ショウジョウバエの翅の発生に必要な分泌性タンパク質である *wingless* ファミリーの遺伝子で、ショウジョウバエでは *wingless* ファミリーの *Wnt1* が翅の黒色斑紋に関与することが *Wnt1* の異所的発現により証明されている (Koshikawa et al., 2015; Werner et al., 2010)。 *Wnt1* はモルフォゲンとして機能し、 *Wnt1* の発現箇所が黒色パターンの誘導を起す。 *wingless* ファミリーの遺伝子はチョウ目でも同じよ

うに機能し、ドクチョウ属 (*Heliconius*)やアメリカアオイチョモンジ (*Limenitis arthemis*, タテハチョウ科)では *wingless* ファミリーの *WntA* が前翅の黒色斑紋の制御に関与していることが関連解析 (Association analysis)や RNA 干渉実験により示されている (Gallant et al., 2014; Martin et al., 2012)。

ショウジョウバエの翅や脚の発生において、*Wnt1* に応答する *Dorsal-less (Dll)* も *Drosophila* で黒色斑紋の形成に関与している。一方で、*Dll* については種ごとにその働きが異なることもわかっている。*Drosophila biarmipes* では *Wnt1* と同じように、翅での *Dll* の異所的発現は黒色の斑紋を誘導する。この際、*Dll* はメラニン合成に関わる *yellow* の発現分布を変化させ、メラニンの前駆体であるドーパミンを黄色の色素である N- $\beta$ -アラニルドーパミン (NBAD)に変換する *ebony* の発現を阻害する。一方、*Drosophila ananasae* では、*Dll* を翅で異所的に発現させても黒色の紋様は誘導されない (Arnoult et al., 2013)。同じように、チョウ目でも *Dll* の働きの違いが報告されている。タテハチョウ科では *Dll* の発現は翅の目玉模様と一致し、眠期における *Dll* の発現は目玉模様の黒色部の誘導を起こす。しかし、モンシロチョウ (*Pieris rapae*, シロチョウ科)では *Dll* の発現は黒色パターンと一致していない (Monterio et al., 2006; Monterio et al., 2013; Reed and Serfas, 2004)。一方、モンシロチョウと *Bicyclus anynana* (タテハチョウ科)では *Dll* とは別の *spalt* という転写因子が黒色斑紋のパターンと一致していることが報告されている (Stoehr et al., 2013)。*spalt* の働きはよくわかっていないが、このことは *Dll* と *spalt* が冗長な機能をもち、シロチョウ科では黒色パターンにおける *Dll* の働きが失われ、*spalt* が黒色の紋様の誘導に働いている可能性を示している。

翅における赤色や橙色の色彩パターンはオモクロームやプテリンにより構成される。これらによる色彩パターンの形成についてはチョウ目昆虫で研究が進められている。それにより、種内で多様な色彩パターンを示すドクチョウ属ではホメオボックスドメインをもつ *optix* 遺伝子が翅の赤色斑紋の制御に関わることが示唆されている (Martin et al., 2014; Reed et al., 2011)。 *Heliconius erato* ではオモクローム合成に必要な *cinnabar* 遺伝子の発現が赤色の斑紋で上昇していることから (Reed et al., 2008)、 *optix* はオモクローム合成に必要な遺伝子の発現を誘導すると考えられる。

これとは別にオオカバマダラ (*Danaus plexippus*、タテハチョウ科)でも、オレンジの色彩パターンに関連している遺伝子が同定されている。オオカバマダラは通常、オレンジ色の翅紋様をもつが、ハワイには“*nivosus*”と呼ばれる白い翅紋様をもつ集団の存在が知られている。比較ゲノムと関連解析によって、翅紋様の違いの原因遺伝子としてミオシン遺伝子が同定されている。ミオシン遺伝子は細胞内のモーター分子として知られているので、*nivosus* では色素輸送に異常が起きている可能性が考えられている (Zhan et al., 2014)。

#### チョウ目昆虫の幼虫における色彩パターンの分子基盤

このように、成虫においてはそれぞれの色素のパターンを制御する遺伝子の研究が進められている。一方で、多種多様な色彩パターンが幼虫においても観察されているにもかかわらず、幼虫における色彩パターンの研究はほとんど進んでいない。この理由としては、広く用いられているモデル生物であるショウジョウバエでは幼虫が色彩パターンを示さないことが理由の一つとして考えられる。もう一つの理由としては幼虫では脱皮のたびに

色彩パターンの形成を繰り返す必要があるなどの複雑性を示すことも関係しているのかもしれない。そのため、幼虫における色彩パターンの情報は乏しく、成虫と幼虫で同じ分子基盤を共有しているのかどうかといったことや、種間で共通した分子基盤を用いているかということもよくわかってない。

幼虫における色彩パターンは遺伝学的解析よりも生化学的解析が多く行われており、色彩パターンの制御因子としては幼若ホルモン (JH) と脱皮ホルモン (20E) がメラニン合成に必要であることが知られている (Hiruma and Riddiford, 2009)。脱皮期においては、メラニン合成に必要な *yellow* のような遺伝子は 20E の濃度依存的に発現を増加させる。一方、*dopa decarboxylase (DDC)* や *tyrosine hydroxylase (TH)* のような遺伝子は発現の上昇の開始には 20E の濃度の増加を必要とするが、実際の発現量の上昇には 20E の濃度の低下が必要となる。JH の産生器官であるアラタ体を除去すると、眠期の *DDC* の遺伝子発現のピークが上昇することから、JH は遺伝子の発現のピークの制御に働いていると考えられている。一方、JH はまた、オモクロームの合成にも必要であることが、ヨトウガ (*Mamestra brassicae*、ヤガ科) の幼虫のアラタ体を除去すると皮膚が赤褐色にならないことからわかっている (Hiruma et al., 1984)。JH と 20E に加え、melanization and reddish colouration hormone (MRCH) もまたメラニン合成とオモクローム合成に必要であることも報告されている (Hiruma et al., 1984; Ogura, 1975)。

JH のもう一つの役割は色彩パターンの転換を制御することである。ナミアゲハ (*Papilio xuthus*、アゲハチョウ科) の幼虫は 4 齢までは鳥の糞に擬態した色彩パターンをしているが、一転して終齢には周囲の葉の色に擬態した緑色の色彩パターンを示す。JH はこの終齢期に

おける色彩パターンの転換に作用し、JH の濃度の低下により緑色の色彩パターンが現れることがわかっている (Futahashi and Fujiwara, 2008)。ただし、これらの結果はホルモンが色彩パターンの継時変化に重要であることを示しているものの、どこにどのような色彩パターンが作られるかという点についてはほとんど情報をもたらしていない。

斑紋の現れる位置に関しては、ナミアゲハ、キアゲハ (*Papilio machaon*)、シロオビアゲハ (*Papilio polytes*) の幼虫において、色素合成や輸送に関わる遺伝子の発現が斑紋と一致していること (Futahashi et al., 2010; Shirataki et al., 2010) が *in situ* ハイブリダイゼーションによって示されており、これらの遺伝子の発現を制御する位置情報が存在することを暗示している。しかし、その位置情報の実体については知られていない。

#### 幼虫の色彩パターン形成のモデルとしてのカイコ

そのような中で、チョウ目昆虫のモデル生物であるカイコは、遺伝子資源の豊富さや、ゲノム情報が整備されていることから、色彩パターン形成のメカニズムを研究する上で有利な材料である。特に遺伝子資源の豊富さは、他のチョウ目昆虫を圧倒しており、特に幼虫の色彩パターンに関連した変異体は、ショウジョウバエにもほとんど存在せず、カイコの材料としての最大の利点である。また、体細胞で遺伝子ノックダウンを起こす *in vivo* エレクトロポレーション法が開発されたこと (Ando and Fujiwara, 2013) や、ゲノム編集技術の適応が可能になったことは、色彩パターンを研究する上での追い風になっている。

カイコの色彩パターンは主に3つの色素、すなわち黒色や茶色の色素であるメラニン、黄色系色素であるプテリジン、橙色や紫色系色素であるオモクロームの組合せにより構成

される (Mazda et al., 1980; Ohashi et al., 1983; 吉武ら., 1951)。カイコに豊富に存在する色彩パターンの突然変異体の解析により、それらの合成経路に関わる遺伝子が次第に明らかになってきている (Fig. 1; Dai et al., 2010; Fujii et al., 2013; Futahashi et al., 2008; Futahashi et al., 2010; Liu et al., 2010; Meng et al., 2009a; Meng et al., 2009b; Osanai-Futahashi et al., 2015; Zhan et al., 2010)。加えて、最近の研究によって、幼虫の色彩パターン (斑紋)を規定する遺伝子も明らかになっている。Yamaguchi et al. (2013)は褐円 (*Multihunar*, *L*)変異体の原因遺伝子として *Wnt1* を同定し、*Wnt1* の異所的な発現が、各体節の背面に過剰な褐色の円形ないし半円形の斑紋を作り出すことを明らかにしている。この結果の重要な点として、*Wnt1* の働きがカイコの野生種とされるクワコでも観察できることから、変異体の解析を通して野生昆虫で観察される幼虫の色彩パターンの形成メカニズムの解明につながるということがわかったことにある。また、*wingless* ファミリー遺伝子が幼虫と成虫で同じように黒色斑紋の形成に関与することが明らかになった。また、Yoda et al. (2014)は、幼虫の複雑で多様なメラニン斑紋を支配する複対立遺伝子である *plain (p)* の責任遺伝子として、*apontic-like (apt-like)* を同定している。*apt-like* は *Wnt1* の下流で働くと考えられる転写因子で、メラニン合成に関わる遺伝子の発現を誘導する。Yoda et al. (2014)の結果は、*p* の各遺伝子座は皮膚における *apt-like* の発現部位を変化させることで、多様な色彩パターンがつくられることを示唆している。一方で、これら変異体の解析から、タテハチョウ科の翅の目玉紋様の形成に重要な *Dll* はカイコの幼虫の黒色斑紋の形成に関与していないことも示されている。これら一連の研究結果は、カイコの変異体の解析によって初めて明らかになったものであり、色彩パターンの制御メカニズムの解明にカイコが役立つことを示している。

一方で、カイコの変異体解析を通して、幼虫のメラニンの黒色斑紋の形成のメカニズムの解明は進んだが、他の色素であるプテリジンやオモクロームのパターンの制御メカニズムについては、解明が進んでいない。現在、未だ原因の明らかになっていない色彩パターンの変異体が 20 以上存在することから、それらの解析により幼虫の色彩パターン制御の新規のメカニズムを明らかできると期待される。

本研究ではそのような色彩パターン変異体の中で、かすり(*quail*, *q*)という変異体に着目し、その原因遺伝子の同定を試みた。*q* はメラニン、プテリジン、オモクロームという複数の色素合成経路に異常をもつ点が特徴的な変異体である。そのため、*q* の解析によって、色彩パターン形成を制御する遺伝子、特にプテリジンやオモクロームの色彩パターンに関わる遺伝子の同定が期待された。第一章ではポジショナルクローニングによる *q* の責任遺伝子の同定を試みた。第二章では同定された *q* の責任遺伝子の証明のために、近年になって開発されたゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 システムを使って解析を行った。第三章では、*q* の責任遺伝子の機能を推察するために、その性質を特徴づける種々の解析を行った。最後に、本研究で得られた研究をもとに、*q* と色彩パターンの関係およびこの遺伝子の生物学的意味について考察した。

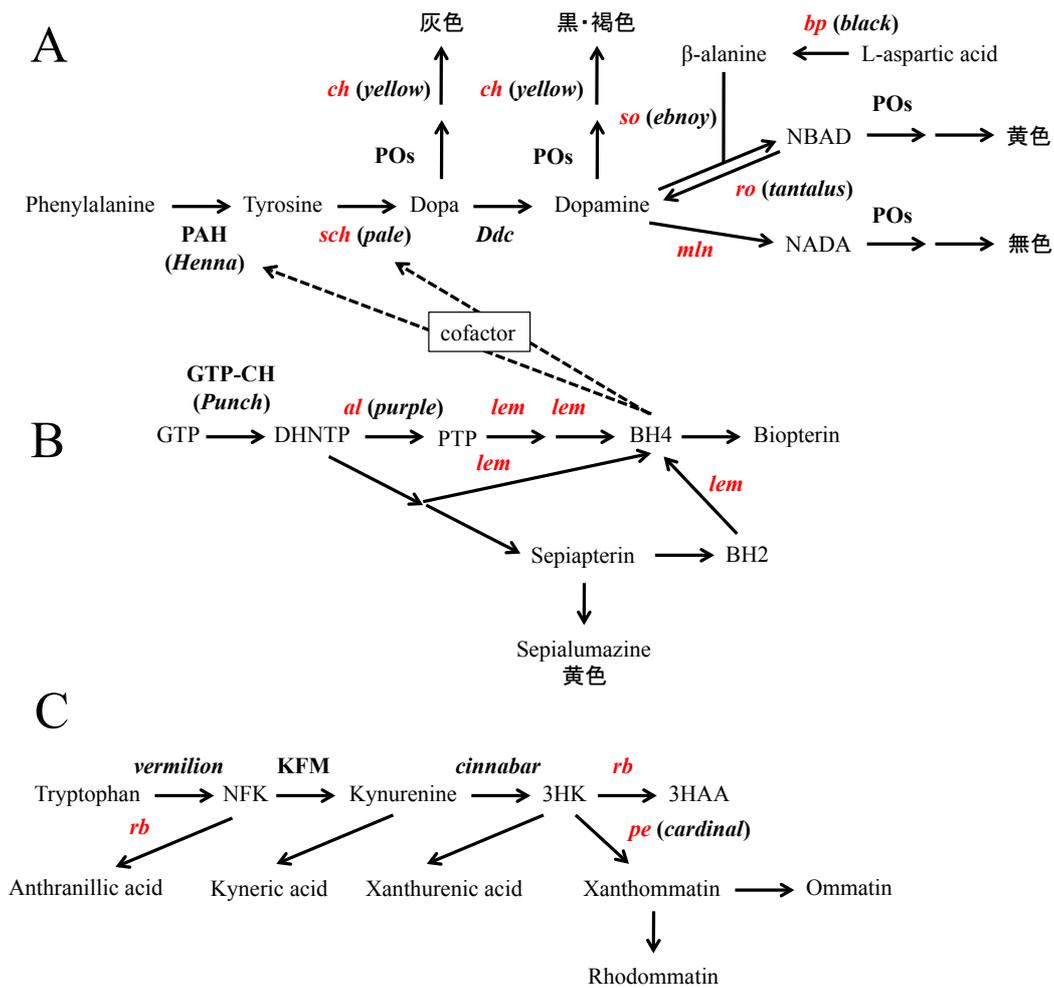


Fig.1 カイコ変異体と色素合成経路。

(A), (B), (C)はそれぞれメラニン、プテリジン、オモクローム合成経路を示している。赤字の斜体はその経路に関連するカイコ変異体を示す。黒字斜体はショウジョウバエの変異体を示す。黒字の太字は経路に関連する酵素を示す。PAH, phenylalanine hydroxylase; POs, phenoloxidases; NBAD, N-β-alanyl dopamine; NADA, N-acetyl dopamine; GTP-CH, GTP cyclohydrolase; DHNTP, dihydroneopterin triphosphate; PTP, 6-pyruvoyl-tetrahydropterin; BH4, tetrahydrobiopterin; BH2, dihydrobiopterin; KFM, kynurenine formidase; NFK, N-Formylkynurenine; 3HK, 3-hydroxykynurenine; 3HAA, 3-hydroxyanthranilic acid.

## かすり変異体のポジショナルクローニング

### 緒言

かすり(*quail, q*)は幼虫の体色に異常を示す変異体の一つである (Fig. 2)。*q* の皮膚は正常系統と比べピンク色を呈し、背面全体、特に後部に擦った傷のような黒色素のパターンを生じ、加えて半月紋および星状紋から後部に流れるような不規則な線状の模様をもっている。*q* のこの形質は複数の色素、すなわちメラニン、オモクローム、およびプテリジンの異常な蓄積により引き起こされる (Kato et al., 2006; 川瀬, 1955; Ohashi et al., 1983)。この変異体を対象とした先行研究は、*q* の形質に様々な因子が関与することを明らかにしてきた。まず、木口 (1973)は*q* の形質が幼若ホルモンによって弱まることを示し、ホルモン制御による形質制御の可能性を示した。また、Sawada et al. (1990, 1997)は、*q* の皮膚に多く存在するオモクローム顆粒から、オモクロームと結合する ommochrome-binding protein (OBP)を同定し、OBP が顆粒に局在して、オモクローム蓄積に寄与していることを明らかにした。一方で、Kato et al. (2006)はプテリジン合成の律速酵素である GTP cyclohydrolase I (GTP-CHI) に着目した研究により、*q* の皮膚では GTP-CHI の遺伝子発現および酵素活性が亢進していることを明らかにした。さらに、Nie et al. (2014)は*q* の皮膚における遺伝子発現について次世代シーケンサーを用いて解析を行い、*q* ではメラニン、プテリジン、オモクロームの合成といった色素合成に関わる遺伝子に加えて、幼若ホルモン代謝およびクチクラタンパク質の生産、キチン代謝、核内受容体に関わる遺伝子など非常に多様な遺伝子の発現が変動していることを明らかにした。しかし、これらの結果は*q* の形質を説明するには十分であったが、*q* の原因となる因子は不明なままであった。*q* は劣性の単一の遺伝子であり、

橋本 (1934)と土井良 (1992)による遺伝解析により、第7染色体に座乗することがわかっている。第一章では、 $q$ の色彩パターンの制御メカニズムの解明を目指し、ポジショナルクローニング法によって $q$ の原因遺伝子の同定を試みた。



Fig. 2 かすり (*quail, q*)と正常系統の幼虫の色彩パターン。

(A) 正常系統の皮膚は白色で、半月紋および星状紋を示す。(B) *q* 変異体の皮膚はピンク色を呈し、背面全体に擦った傷のような黒色素パターンおよび、半月紋および星状紋から後部に流れるような不規則な線状の紋様をもっている。Scale bar, 1cm.

## 材料と方法

### 供試系統

カイコは25°C、明期 12 時間:暗期 12 時間の光周条件下で桑葉を用いて飼育した。p50T 系統は当研究室で維持しているものを用いた。c55、b32、k01、k02、m42、d33、p54 系統はナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP)の中核拠点である九州大学の遺伝子資源開発研究センターから分譲された。No.120、128、144、145、146、940、941 の 7 系統は国立研究開発法人農業生物資源研究所ジーンバンクから分譲された。

### ゲノミック DNA の抽出

ゲノミック DNA は HotSHOT 法により抽出した (Truett et al., 2000)。カイコの成虫の脚 1 本を 1.5 ml チューブに回収し、100  $\mu$ l の 50 mM NaOH、0.1% Triton X-100 を加え、96°C で 15 分間処理し、100  $\mu$ l の 200 mM の Tris-HCl (pH8.0)を加え、中和した。これをポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)の鋳型として用いた。

### ポジショナルクローニング

連鎖解析には、戻し交配世代 (BC1)の 531 個体を供試した。BC1 は、正常系統の p50T と *q* 遺伝子をホモ接合で有する c55 を交配して得た F1 雑種の雄に、c55 の雌を戻し交配して作出した。220 頭の *q* 形質を示す幼虫と 311 頭の正常形質を示す幼虫を、連鎖解析に用いた。ジェノタイピングには、第 7 染色体の一部に対応し、かつ系統間で PCR 産物の長さが異なるマーカーを用いた。ジェノタイピングに用いたプライマーは Table 1 に示した。

PCR 反応は TaKaRa Ex Taq (Takara Bio Inc., Otsu, Japan) を用い、PCR 条件は変性を 94°C で 2 分、その後、変性を 94°C で 30 秒、アニーリングを 60°C で 30 秒、伸長を 72°C で 1 分というプロセスを 35-40 サイクル行った。

#### Total RNA の抽出

逆転写反応のために、正常系統と *q* 系統の皮膚から Total RNA の抽出を行った。抽出には TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いた。摘出した 4 眠期のカイコ幼虫の皮膚に 500  $\mu$ l の TRIzol Reagent を加え、ペッスルを用いて組織を摩砕した。100  $\mu$ l のクロロホルムを加え、ボルテックスし、3 分間室温でインキュベートした後、12,000  $\times$ g、4°C、15 分間遠心した。水層を回収し、250  $\mu$ l のイソプロパノールを加え、ボルテックスし、10 分間室温でインキュベートした後、12,000  $\times$ g、4°C、10 分間遠心した。上清を取り除き、500  $\mu$ l のエタノール (75%) を加え、7,500  $\times$ g、4°C、5 分間遠心した。上清を取り除き、風乾させ、RNase フリーの蒸留水に溶かし、Nano Drop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) により RNA の濃度を測定した。

#### 逆転写反応と rapid amplification of cDNA end (RACE)

逆転写反応は TaKaRa RNA reverse transcription kit (Takara) を用いて行った。Total RNA を鋳型として、oligo(dT) primer (5'-GTTTTCCCAGTCACGACTTTTTTTTTTTTTTTT-3') を用いて反応させた。合成した 1st strand cDNA は Tris-EDTA 緩衝液 (pH 8.0) により 3 倍に希釈し、これをその後の反応に用いた。RT-PCR は TaKaRa Ex Taq (Takara) を用いて、以下の条件で

行った。変性を94°Cで2分間行った後、94°Cで30秒、アニーリングを60°Cで30秒、伸長を72°Cで1分のプロセスを35-40サイクル行った。*BmGC-I*の全長cDNAを得るために、GeneRacer Kit (Invitrogene)を用いてRACEを行った。RACEの際のPCRはKOD FX Neo (Toyobo Inc., Osaka, Japan)を用いて、変性を94°Cで2分間した後、98°Cで10秒、アニーリングを58°Cで30秒、伸長を68°Cで0.5-1分を40サイクル行った。RT-PCRおよびRACEに用いたプライマーはTable 2に示した。

## 結果

### *q* のポジショナルクローニング

かすり (*quial*, *q*)の原因遺伝子の同定のために、ポジショナルクローニングを行った (Fig. 3A)。*q* のマッピングには、戻し交配世代 (BC1)を用いた。正常系統の p50T と *q* 系統の c55 を掛合わせ F1 雑種を作出し、その F1 雑種の雄に c55 の雌を戻し交配することで BC1 集団を得た。*q* は第 7 染色体に座乗することがわかっているので、マッピングのために p50T 系統と c55 系統間で PCR 産物の長さが異なる PCR 多型マーカーを第 7 染色体上に 9 つ作成した (Table 1)。まず、48 頭の BC1 個体を用いて、*q* のラフなマッピングを行った。結果として、*q* の責任領域を bsc15k4105 と M13 という 2 つのマーカー間の 2.0 Mb の範囲にまで絞り込むことができた。次に、この領域に新たにマーカーを 4 つ作成し、483 の BC1 個体を用いて *q* の細かいマッピングを行った。その結果、*q* の責任領域を bsc15k5877 と M13 の間の 1.1 Mb の範囲にまで絞り込むことができた。責任領域は 2 つのスキヤッフオルド、Bm\_scaf15 と Bm\_scaf407 に股がっており、この中にはカイコゲノム上で 11 個のタンパク質コード遺伝子 (*BGIBMGA010295*, *BGIBMGA010099*, *BGIBMGA010098*, *BGIBMGA010097*, *BGIBMGA010096*, *BGIBMGA010095*, *BGIBMGA010094*, *BGIBMGA010093*, *BGIBMGA010296*, *BGIBMGA010092* と *BGIBMGA010091*) が予測されていた (Yamamoto et al., 2006, 2008; Silkworm Genome Consortium)。これら 11 個の予測遺伝子を *q* の原因遺伝子の候補として、以降の解析を行った。

### *q* の候補遺伝子の解析

*q* の原因遺伝子の同定のために、まず、RT-PCR によって正常系統と *q* 系統の幼虫の皮膚における 11 個の候補遺伝子の発現を調べた。11 個の候補遺伝子のうち、正常系統と *q* 系統の両方で *BGIBMGA010094*、*BGIBMGA010093*、*BGIBMGA010092* と *BGIBMGA010091* の発現が検出できた (Fig. 3B)。これら 4 つの候補遺伝子は既に単離・同定が行われているタンパク質をコードしていた。*BGIBMGA010094* は *Bombyx mori* glutathione S-transferase (GST) epsilon 4 (*BmGSTe4*) をコードし、*BGIBMGA010093* は同じく *BmGSTe5* をコードしていた (Yu et al., 2008)。一方、*BGIBMGA010092* と *BGIBMGA010091* は同じ遺伝子の一部分であり、その遺伝子は *Bombyx* guanylyl cyclase-I (*BmGC-I*) をコードしていた (Tanoue et al., 2001)。これら 3 つの候補遺伝子について、従来色彩パターンと関連しているという報告はなかったため、どれもが *q* の原因遺伝子である可能性は残った。そこで、次に 3 つの候補遺伝子の cDNA の塩基配列を決定し、正常系統と *q* 系統で変異が生じているかを比較した。その結果、*q* 系統は *BmGSTe4* と *BmGC-I* の 2 つの遺伝子に変異をもつことがわかった。

1 つ目の遺伝子 *BmGSTe4* では、*q* において、エクソン 2 と 3 を欠いた短い転写産物の発現が検出できた (Fig. 4A)。この短い転写産物が生じる原因を調べるために、*BmGSTe4* のゲノム配列を調べたところ、*q* では *BmGSTe4* 遺伝子のイントロン 2 のスプライシング供与部位のコンセンサス配列である GT が GC に変異していた。つまり、*q* の短い *BmGSTe4* 転写産物はエクソンスキッピングにより生じていることが示唆された。この短い *BmGSTe4* mRNA からは GST C 末端 delta-epsilon ドメインと GST N 末端 delta-epsilon ドメインのそれぞれの一部分を欠いた不完全なタンパク質が翻訳されると予想される (Fig. 4B)。*q* で欠けている部分は、Yamamoto et al. (2013) により報告された *BmGSTe4* タンパク質の酵素活性に

重要なアミノ酸配列を含んでいるため、*q* の *BmGSTe4* から翻訳されるタンパクは GST 活性が損なわれていると推定された。

一方、2 つ目の *BmGC-I* 遺伝子では、*q* において、エクソン 2 にフレームシフトを起こして、premature stop codon が生じる 16 bp の欠失が存在することがわかった (Fig. 5A)。この変異によって生じる *BmGC-I* タンパク質は、受容体型グアニル酸シクラーゼの機能に重要だと考えられる細胞外リガンド結合ドメイン (ECD)、キナーゼホモロジドメイン (KHD) およびグアニル酸シクラーゼ触媒ドメイン (CYC) の 3 つドメインをすべて欠いていると予想された。そのため、*q* の *BmGC-I* は、完全に機能を喪失したヌル遺伝子だと考えられる (Fig. 5B)。以上をまとめると、*q* は機能を損なっていると考えられる遺伝子を 2 つ (*BmGSTe4* と *BmGC-I*) もっており、*BmGSTe4* と *BmGC-I* のどちらか、あるいは両方が、*q* の原因遺伝子であると考えられた。

次に、これら 2 つの遺伝子の変異が他の *q* 系統でも検出できるかどうかを調べた。すなわち、c55 以外の 12 の *q* 系統 (k01、k02、m42、No. 120、No. 128、No. 144、No. 145、No. 146、No. 940、No. 941、d33q、p54) を新たに解析に用いた。RT-PCR の結果、*BmGSTe4* については d33q と p54 以外の 10 つの *q* 系統で c55 と同じエクソンスキッピングを起こしていることがわかった (Fig. 4C)。c55 と同じ変異を持たなかった 2 つの系統のうち、p54 の *BmGSTe4* では 1 つの非同義置換が見つかった。この変異は GST C 末端 delta-epsilon ドメイン内の 171 番目のバリンをグリシン (V171G) に変化させる。一方、d33q の *BmGSTe4* では *q* 特異的な変異は見つからなかった。ただし、d33q では *BmGSTe4* と隣接して存在している類似の遺伝子 *BmGSTe1* に、69 bp の欠失が見つかった。この変異により GST C 末端

delta-epsilon ドメインと GSTN 末端 delta-epsilon ドメインのそれぞれの一部分的に欠いた *BmGSTe1* タンパク質が作られるので、d33q の *BmGSTe1* 遺伝子も機能を損なったタンパク質をつくることが予想された (Figs. 6A and B)。この *BmGSTe1* と同じ変異は他の *q* 系統では検出されなかった。

一方、*BmGC-I* に関しては、p54 以外のすべての *q* 系統で、c55 系統と同じ 16 bp の欠失が検出された (Fig. 5C)。ところが、p54 の *BmGC-I* では、この 16 bp の欠失ではなく、1 つの非同義置換が見つかった。この変異により、ECD 内の 386 番目のアラニンがバリン (A386V) に変わっていた。

以上をまとめると、*BmGC-I* 遺伝子では、すべての *q* 系統で変異が検出することができたので、*BmGC-I* が *q* の責任遺伝子である可能性が高い。しかしながら、p54 で見られた *BmGC-I* の非同義置換が、タンパク質の機能に影響しているかどうかはわからない。また、*BmGSTe4* の変異は *q* 系統で高度に保存されており、加えて、d33q では *BmGSTe4* ではないが *BmGSTe1* に変異がみられたことから、*BmGSTe4* または *BmGSTe1* が *q* の形質に寄与している可能性は排除できない。そこで、GST 遺伝子が *q* の形質に関与しているか否かを明確にするために、d33q (*BmGC-I*<sup>Δ16/Δ16</sup>; *BmGSTe4*<sup>+/+</sup>; *BmGSTe1*<sup>Δ69/Δ69</sup>) と c55 (*BmGC-I*<sup>Δ16/Δ16</sup>; *BmGSTe4*<sup>Δ201/Δ201</sup>; *BmGSTe1*<sup>+/+</sup>) を交配し、*BmGC-I* のみで変異をホモにもつ F1 雑種を作出することにした (Fig. 7A)。その結果、*BmGC-I* に変異をホモにもち、*BmGSTe4* と *BmGSTe1* に変異をヘテロにもつ個体 (*BmGC-I*<sup>Δ16/Δ16</sup>; *BmGSTe4*<sup>Δ201/+</sup>; *BmGSTe1*<sup>Δ69/+</sup>) は、すべて *q* 形質を示すことがわかった。さらに、c55 と *BmGC-I* に 1 つの非同義置換をもつ p54 とを交配さ

せて作出したF1雑種もすべて $q$ の形質を示した (Fig. 7B)。これらの結果は、*BmGC-I*が $q$ の原因遺伝子であることを示唆している。

## 第1章 考察

本章に述べたポジショナルクローニングの結果は、受容体型グアニル酸シクラーゼをコードする *BmGC-I* が、*q* の原因遺伝子であることを示した。一方で、本研究で用いたほとんどの *q* 系統では、*BmGC-I* だけでなく、*BmGSte4* にも変異を持っていたことが、原因遺伝子の特定を困難にした。

本章の結果を考察するにあたり、*q* 形質の起源をたどることは有意義である。平塚 (1969) は、1804 年頃に現在の兵庫県である但馬国から秋田藩に分譲された日本在来種の種子島種の中に存在した *q* の形質を示すカイコがその後の *q* 系統の祖先であると推察している。本研究で、ほとんどの *q* 系統から同一の *BmGC-I* の変異が検出されたことは、平塚の推察とよく一致しており、現在の *q* 系統は同一の祖先—おそらく種子島種—に由来することを示している。*BmGSte4* の変異が系統を超えて保存されているのは、この祖先系統がもともと *BmGSte4* の変異をもち、その上に *BmGC-I* に変異が起きたか、あるいは *BmGC-I* の変異が起きたあと比較的早い時期に *BmGSte4* の変異が起きたか、いずれかであろう。一方で、p54 系統は中国に由来する独立の *q* 系統なので、*BmGC-I* に他の *q* 系統とは異なる変異をもつことは、上記の仮説とも符号している。

グアニル酸シクラーゼは可溶性型と受容体型の主に2つのタイプに分類され、どちらのタイプもリガンドの結合により cGMP 生産が促進される。哺乳類の受容体型グアニル酸シクラーゼは広く研究が進められ、それらのリガンドも明らかになっている。GC-A と GC-B は利尿ペプチドがリガンドであり (Koller et al., 1991; Suga et al., 1992)、GC-C は病原性細菌由来の heat stable enterotoxin (Sta) や内因性の gunanylin や uroguanylin がリガンドである

(Field et al., 1978; Hamra et al., 1993; Hughes et al., 1978)。一方で、これら細胞外のリガンドを受容する場合だけでなく、GC-E やGC-F のように、細胞内の guanylyl cyclase activator proteins (GCAPs) がリガンドとして同定されている場合もある (Dizhoor et al., 1994; Dizhoor et al., 1995; Gorczyca et al., 1994; Palczewski et al., 1994)。加えて、ヒトの GC-E はリン酸化された p21-activated kinase (PAK) の結合によっても、cGMP 産生が活性化される (Guo et al., 2007)。*q* 系統の 1 つである p54 では、細胞外リガンド結合ドメイン内に非同義置換が検出できた。このことは、BmGC-I が細胞外のリガンドを受け取ることにより、cGMP 産生が活性化されることを示唆している。昆虫の膜受容体型グアニル酸シクラーゼのリガンドとしては、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の Gyc76C の NPLP1-VQQ (Overend et al., 2012) とミカンコミバエ (*Bactrocera dorsalis*) の BdmGC-1 の羽化ホルモン (Chang et al., 2009) という 2 つの神経ペプチドが同定されていることから、BmGC-I も神経ペプチドをリガンドとしている可能性が考えられる。

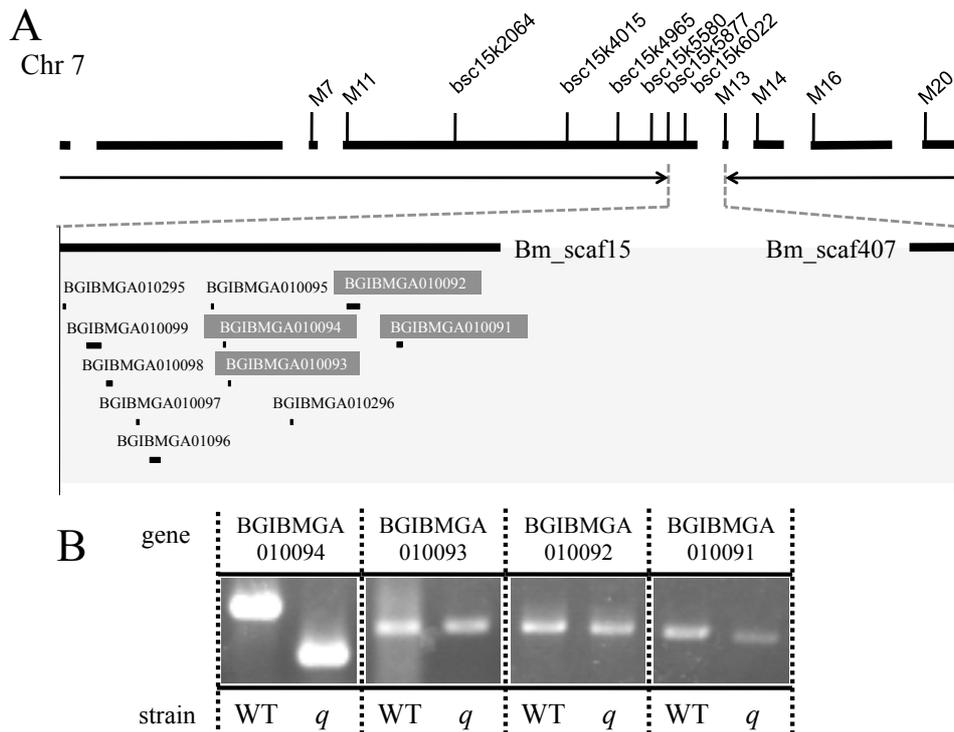


Fig. 3 第7染色体の *q* 遺伝子座の連鎖地図。

(A) *q* の責任領域を示した遺伝子地図は 531 個体の BC1 個体のジェノタイピングにより得られた。垂直線はマッピングに用いたマーカーの位置を示している。*q* の責任領域は bsc15k5877 と M13 マーカーに挟まれる 1.1 Mb の範囲に絞り込むことができた。この領域は 2 つのスキヤッフオルド、Bm\_scaf15 と Bm\_scaf407 に股がっており、11 個の予測遺伝子 (*BGIBMGA10295*, *BGIBMGA10296*, *BGIBMGA10099*, *BGIBMGA10098*, *BGIBMGA10097*, *BGIBMGA10096*, *BGIBMGA10095*, *BGIBMGA10094*, *BGIBMGA10093*, *BGIBMGA10092*, *BGIBMGA10091*) を含んでいた。(B) 正常系統と *q* 系統の皮膚における候補遺伝子 *BGIBMGA10094*, *BGIBMGA10093*, *BGIBMGA10092*, *BGIBMGA10091* の RT-PCR 解析。

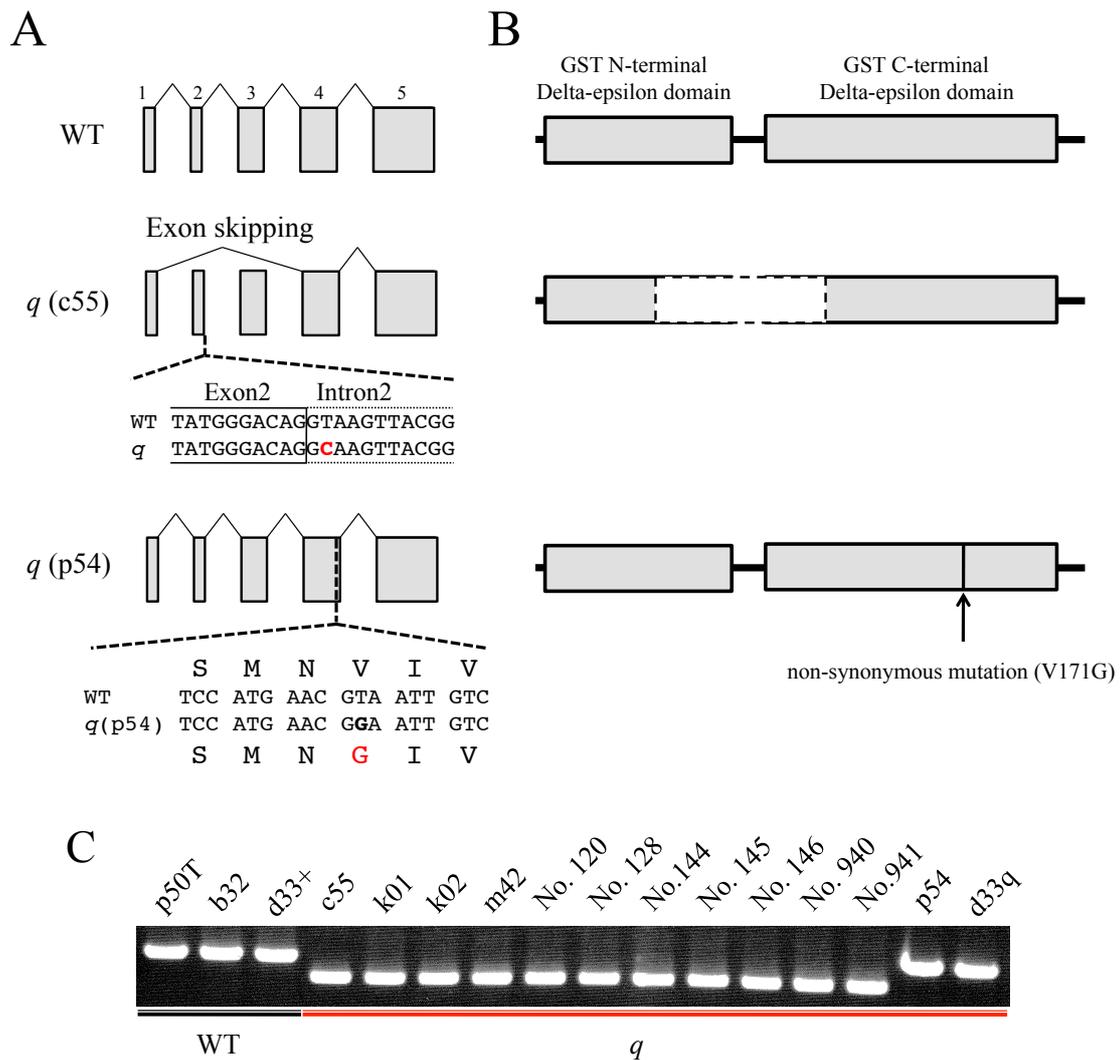


Fig.4 正常系統と *q* 系統間の *BmGSTe4* の差異。

(A) *BmGSTe4* mRNA の構造。c55 を含むほとんどの *q* 系統では、*BmGSTe4* は第2 と第3 エクソンを欠いた短い転写産物をもつ。この短い転写産物は第2イントロンのスプライシング供与部位の変異によるエクソンスキッピングで生じている。p54 系統の *BmGSTe4* mRNA は第4 エクソンに1つの非同義置換をもっていた。(B) *BmGSTe4* タンパク質の構造。c55 系統の *BmGSTe4* タンパク質は GST N 末端 delta-epsilon ドメインと C 末端 delta-epsilon ドメインの一部を欠如している。欠如部分は Yamamoto et al. (2013) により報告された *BmGSTe4* の酵素活性に重要なアミノ酸を含んでいた。p54 系統の *BmGSTe4* タンパク質は171番目バリンがグリシンに変異していた。(C) *q* 系統における *BmGSTe4* の RT-PCR 解析。p54 と d33q を除く11の *q* 系統 (c55, k01, k02, m42, No. 120, No. 128, No. 144, No.145, No. 146, No. 940, No. 941) で共通の欠失が検出された。

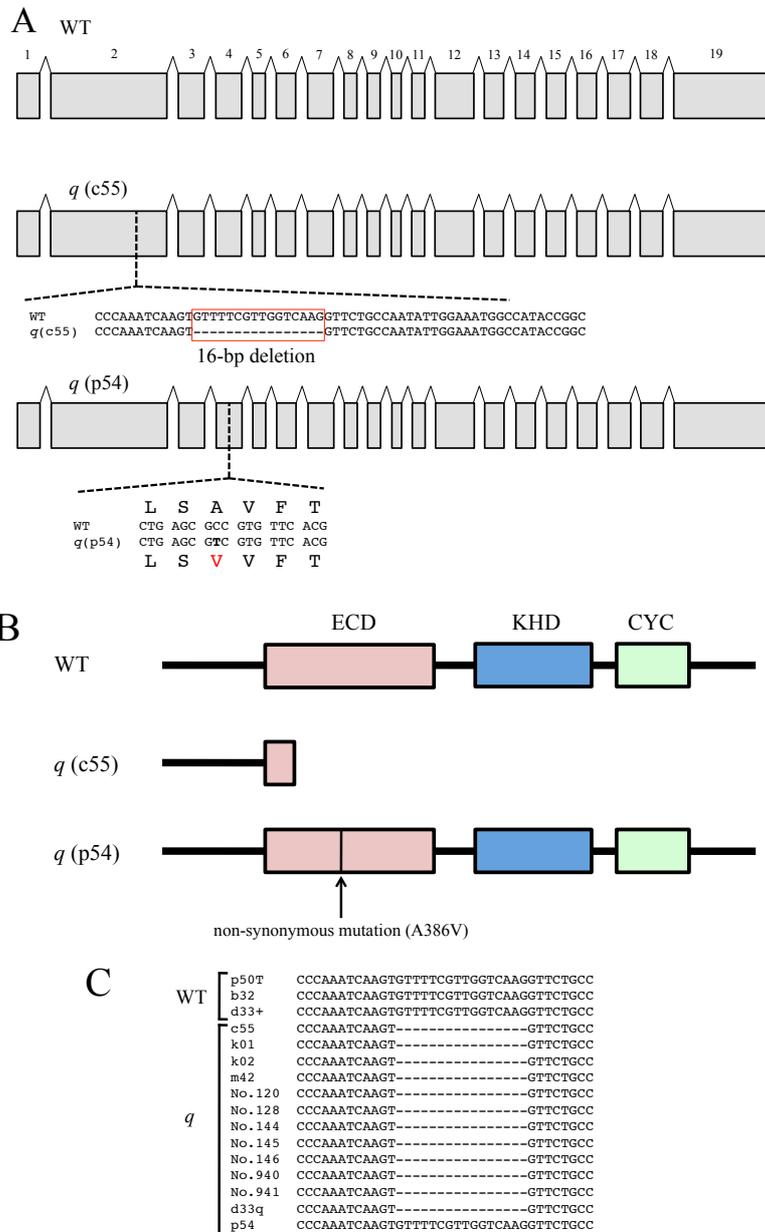


Fig. 5 正常系統と *q* 系統間の *BmGC-I* の差異。

(A) *BmGC-I* mRNA の構造。p54 を除く *q* 系統では、*BmGC-I* は premature stop codon を引き起こす 16 bp の欠失をもつ。p54 系統の *BmGC-I* mRNA は第 4 エクソンに 1 つの非同義置換をもっていた。(B) *BmGC-I* タンパク質の構造。c55 系統の *BmGC-I* タンパク質は細胞外リガンド結合ドメイン (ECD)、キナーゼホモロジードメイン (KHD)、グアニル酸シクラーゼ触媒ドメイン (CYC) を欠如している。p54 系統の *BmGC-I* タンパク質は ECD 内の 386 番目アラニンがバリンに変異していた。(C) *q* 系統における *BmGC-I* mRNA の配列比較。p54 を除く 12 の *q* 系統 (c55, k01, k02, m42, No. 120, No. 128, No. 144, No. 145, No. 146, No. 940, No. 941, d33q) で共通の 16 bp の欠失が検出された。

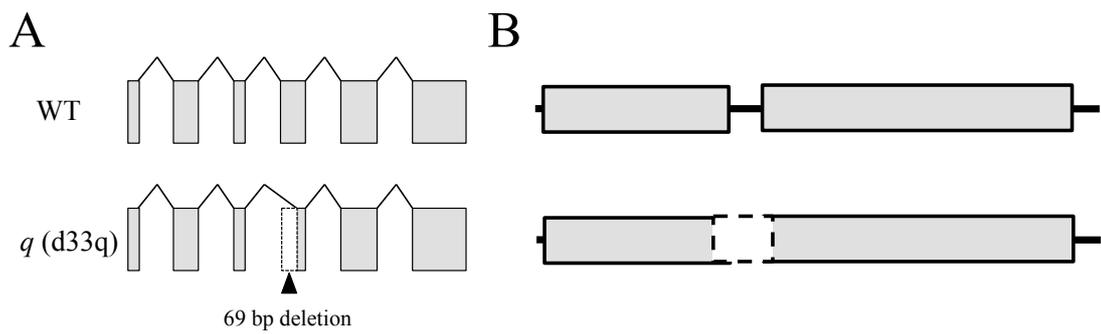


Fig.6 正常系統と *q* 系統間の *BmGSTe1* の差異。

(A) *BmGSTe1* mRNA の構造。 *q* 系統の d33q では、 *BmGSTe1* mRNA に 69 bp の欠失をもっていた。(B) *BmGSTe1* タンパク質の構造。 d33q 系統の *BmGSTe1* タンパク質は GSTN 末端 delta-epsilon ドメインと C 末端 delta-epsilon ドメインの一部を欠如している。

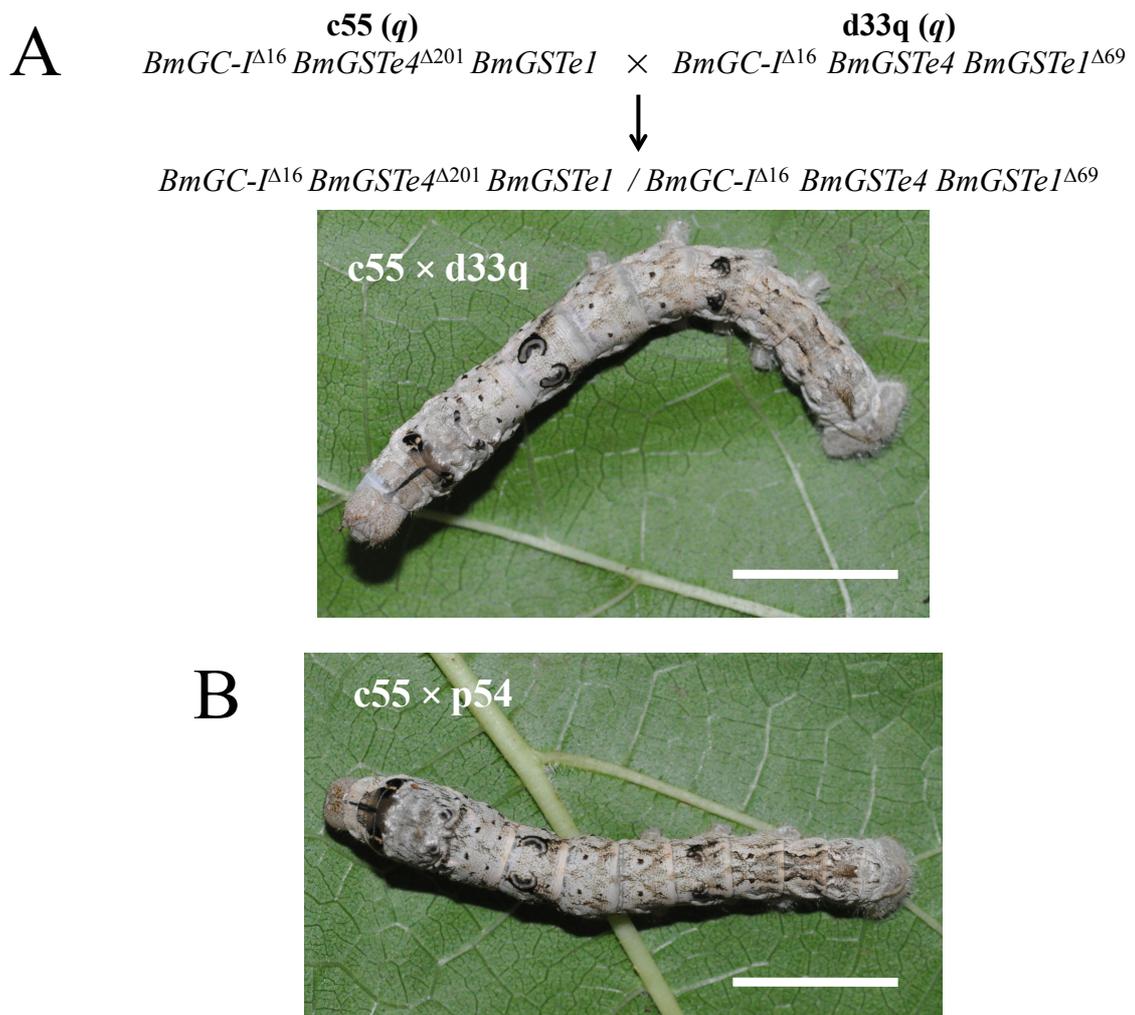


Fig. 7 *q* 系統の交配試験。

(A) *c55* 系統と *d33q* 系統の交配。 *c55* 系統は *BmGC-I<sup>ΔA</sup>*, *BmGSTe4<sup>ΔA</sup>*, *BmGSTeI<sup>+/+</sup>* という遺伝子構成をもつ。一方、 *d33q* 系統は *BmGC-I<sup>ΔA</sup>*, *BmGSTe4<sup>+/+</sup>*, *BmGSTeI<sup>ΔA</sup>* という遺伝子構成をもつ。それゆえに、作出した *c55* と *d33q* の F1 雑種は *BmGC-I<sup>ΔA</sup>*, *BmGSTe4<sup>Δ+</sup>*, *BmGSTeI<sup>Δ+</sup>* という遺伝子構成をもつ。この F1 雑種の個体はすべて *q* の形質を示した。(B) *c55* 系統と *p54* 系統の交配。 *p54* 系統は *BmGSTe4* と *BmGC-I* の両方に 1 つの非同義置換をもつ。 *c55* 系統と *p54* 系統の F1 雑種の個体はすべて *q* の形質を示した。 Scale bar, 1cm.

Table 1. Primer sets for linkage analysis

Marker name	Marker position	Forward Primer(5'-3')	Reverse Primer(5'-3')
chr7_M20	Bm_scaf132:72881..73829	GTTCCCTAATTAAGCAAACCTGAGACG	ACCATAACTTAACCTAACGCCTTTC
chr7_M16	Bm_scaf90:5527..6052	AAATAGCTACCAGTCTCGAACACTC	TCTACACTCGGGCTATTGTCTTAAC
chr7_M14	Bm_scaf136:32425..33716	CTCTTTCTGGTTTCAATGTCCTATG	GCCCTCTGGTATTCTATATCTCAC
chr7_M13	Bm_scaf407:53655..54532	ACATACACATCACCTACACCTACC	CAAGGGAGTCGATTCTTTTTAGTG
bsc15k6022	Bm_scaf15:6022669..6023584	TGATGTAGGAAGGCAAACCGTGTAT	ATCGTGGGTGTATGTCGACTGAAAT
bsc15k5877	Bm_scaf15:5877469..5878366	AAGATGAACAGTAAGGCCATATGG	CCGCGAGTATTTATACCATCCAG
bsc15k5570	Bm_scaf15:5570177..5571094	TTCCTATGCGGCAGCGACGCGATT	AAATGACACCGTTCGAGGCACCGT
bsc15k4965	Bm_scaf15:4965722..4966572	GTGGCAAAGATGAGACACTTTTATTC	ACTTACTGGCTGTCTAAATGTGTCCG
bsc15k4015	Bm_scaf15:4015024..4015981	GTTGTCGAAACTGGAGCTCTCAC	TGGTGTAACAGGAGAGATAGTGACG
bsc15k2064	Bm_scaf15:2064867..2065621	GTCAAATATACGGAAGCGTGTGTA	GCGTATCCGACACTTGTACCATGAC
chr7_M11	Bm_scaf15:55245..56342	ATTAAGGGAAAGAGCAACTAGACC	TATTTTTAGAGCAACTGAGGAGACG
chr7_M7	Bm_scaf179:3270..4392	CTAATTCGACAACTCTACGGTATC	GTTGTGGCGGACTTTTATTAGATC

Table 2. Primers used for RT-PCR and RACE

Name	Sequence (5'-3' end)	Object
BGIBMGA010295F1	CGGCGTATTCATCAAACATGCTA	RT-PCR for BGIBMGA010295
BGIBMGA010295R1	GTTCTTTGGAGTATCCAAGTCAAG	
BGIBMGA010099F1	AGCCCATATTGCAATTGATAG	RT-PCR for BGIBMGA010099
BGIBMGA010099R1	TTCAAACACCGGGTCACCATATA	
BGIBMGA010098F1	GAGGTAAATCGTCAGAAGAACGGATT	RT-PCR for BGIBMGA010098
BGIBMGA010098R1	CTGGTACAAAGGCACGTGCAGTGCCT	
BGIBMGA010097F1	AGACTGCTCAGACAGAACCA	RT-PCR for BGIBMGA010097
BGIBMGA010097R1	TACACTTTTCTCACTCTGGG	
BGIBMGA010096F1	ATGCACCGCATCGTGCTGCTGAT	RT-PCR for BGIBMGA010096
BGIBMGA010096R1	AAGTTTGTATCCTACATCCCAGG	
BGIBMGA010095F1	ATGAATGAGCTGATGAAAAGG	RT-PCR for BGIBMGA010095
BGIBMGA010095R1	AGTTTCTTGCTGCCAATTCTTC	
BGIBMGA010094F1	TCAGACCGTAACGAAAAGAAGACAAC	RT-PCR for BGIBMGA010094
BGIBMGA010094R1	TTCATCTCGAAGCCACCACAAAAC	
BGIBMGA010094R2	CTATGAATTTCTTCAAGCCTGGTTC	
BGIBMGA010093F1	ACTCTTTATAAGTTGGACGCCAGTC	RT-PCR for BGIBMGA010093
BGIBMGA010093R1	TTTTGCCCGTACTTGTAAGACC	
BGIBMGA010093R2	AATATCTCTCGGAATTGCAGAAGTC	
BGIBMGA010296F1	TGAAAATCCCGATTATCCATCG	RT-PCR for BGIBMGA010296
BGIBMGA010296R1	TTACTCCGCCGAAAGATCGGGAG	
BGIBMGA010092F1	TGGAGGGTTAGCTGGAGTGATGT	RT-PCR for BGIBMGA010092
BGIBMGA010092R1	CCAGAATGTAATCCGATCCGAAG	
BGIBMGA010091F1	ATGCGCAAAGGACATGTGTGCATG	RT-PCR for BGIBMGA010091
BGIBMGA010091R1	GGACAGTTTGTGAAGGAGCTCCTTG	
BmGC-I_F1	AGACACACCGGTGAGAAGAAAG	RT-PCR for BmGC-I
BmGC-I_R1	GGAGCAATGACGTA CTGCAAC	
BmGC-I_F2	ATGTTAGTGGAGATCGTGCAAG	
BmGC-I_R2	CTATACCTTCATGGCGACCTCC	
BmGC-I_F3	ACGTCATTGCTCCGGTGGCAAG	
BmGC-I_R3	TCGTCACGGTCAGCACAGCACT	
BmGC-I_F4	TAAAACACTACAGTTCACCGAG	
BmGC-I_R4	CAATACTGAGAATCGCGTAAAC	
BmGC-I_F5	CCTTTGCTATTGTCATGCACGA	
BmGC-I_R5	TTCGCAAGATCGGTGATGAGAC	
BmGC-I_F6	GGAAACCATAGGTGATGCGTAC	
BmGC-I_R6	CCTATGCCCTAACCATTTAGAC	
BmGC-I_F7	GGATCCAAC TGAAGACCTGAC	
BmGC-I_R7	ATACGGGAAAGCAGGTTGTCTA	
BmGC-I_R8	CACTATAGAATCATTAGGTGTATCGGC	
GC_RACE_F1	CAGTCAGTGGTAGCGAAACCTTGAAC	RACE for BmGC-I
GC_RACE_R1	GGGGATGGCCAATGGCGCGGGTATCATC	

## 第二章 CRISPR/Cas9 システムによる *BmGC-I* のノックアウト

### 緒言

多細胞生物において、ある突然変異の原因遺伝子の機能を証明するには、個体におけるその遺伝子の表現型への影響を評価する必要がある。しかしながら、広く用いられているキイロショウジョウバエや線虫、ゼブラフィッシュ、マウスといったモデル生物以外では、そのためのツールや遺伝的リソースは十分に整備されているとは言いがたい。一方、ゲノム編集技術はゲノムの任意の位置に正確に変異を導入できる技術であり、この技術の近年の発展によって、モデル生物以外の様々な生物でも、遺伝子改変が可能になってきている。ただ、Zinc finger nuclease (ZFN)や Transcription activator-like effector nuclease (TALEN)を利用したゲノム編集の方法は、十分な費用や設計の労力を必要とするという問題点もあった。しかし、近年、細菌の免疫システムを利用した Clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR associated proteins (CRISPR/Cas9)システムによるゲノム編集技術が開発され (Cong et al., 2013; Mali et al., 2013)、その設計の簡便さから急速にゲノム編集に使われるようになり、様々な生物で CRISPR/Cas9 システムによる遺伝子機能の解明が報告されている (Bassett et al., 2013; Friedland et al., 2013; Gilles et al., 2015; Hwang et al., 2013; Wang et al., 2013a)。カイコにおいては TALEN の利用がそのゲノム編集の効率の高さから多く報告されてきたが (Daimon et al., 2015; Enya et al., 2015; Ma et al., 2012; Osanai-Futahashi et al., 2015; Shiomi et al., 2015; Takasu et al., 2013; Xu et al., 2014; Yoda et al., 2014)、最近になって CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集の報告もなされており (Ling et al., 2015; Ma et al., 2014; Wang et al., 2013b; Wei et al., 2014; Zhang et al., 2015)、今後、広く研究に利用されること

が期待されている。第一章ではポジショナルクローニングにより *BmGC-I* が *q* の原因遺伝子であるという結果を得ることができた。しかしながら、*q* 系統で広く保存された *BmGSte4* の変異および d33q 系統で見つかった *BmGSte1* の変異が *q* の形質に関連しているという可能性を完全に除外できた訳ではない。そのため第二章では、CRSIPR/Cas9 システムを用いて *q* の原因遺伝子であると考えられる *BmGC-I* 遺伝子およびその可能性が残っている *BmGSte4* の改変を試み、カイコの色彩パターンへの影響を評価することにした。

## 材料と方法

synthetic guide RNA (sgRNA)の合成

sgRNA と *Cas9* mRNA の合成は Bassett et al. (2013)の報告を参考にして行った。sgRNA の合成のために、T7 promoter の配列と sgRNA の標的配列を含むオリゴヌクレオチドを設計した。*BmGSt4* を標的としたオリゴヌクレオチドは

5'-GAAATTAATACGACTCACTATAGGAGCTCGGAATTTATGACGGTTTTAGAGCTAG

AAATAGC-3' で、*BmGC-I* を標的にしたオリゴヌクレオチドは

5'-GAAATTAATACGACTCACTATAGGAGTCTCTTAACGATAAGGGTTTTAGAGCTAG

AAATAGC-3' (target1) および

5'-GAAATTAATACGACTCACTATAGGTGGAAGCTGGTGCCTCTCTGTTTTAGAGCTAG

AAATAGC-3' (target2)である。また、共通の sgRNA 配列を含むオリゴヌクレオチド

5'-AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTT

AACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC-3' (sgRNA oligo) を設計した。sgRNA の鋳型を合成

するために Phusion DNA polymerase (NEB, Inc., Beverly, MA, USA)を使って、sgRNA oligo と

標的配列を含むオリゴヌクレオチドを加え PCR を行った。PCR の条件は以下の通りである。

変性 98°C を 30 秒間した後、変性を 98°C で 10 秒、アニーリング 60°C で 30 秒、伸長

を 72°C で 15 秒というプロセスを 35 サイクル行った後、72°C で 10 分間反応させた。PCR

産物は QIAGEN Gel Extraction Kit により精製した。精製した DNA、300 ng を鋳型にして、

MEGAscript Kit (Ambion Inc., Austin, TX, USA)を用いて、sgRNA 合成を行った。*in vitro*

transcription により合成した sgRNA は Acid-Phenol:Chloroform, pH 4.5 (with IAA, 125:24:1,

Ambion)を加え、フェノールクロロホルム抽出した後、等量のイソプロパノールを加え、イソプロパノール沈殿により精製した。

#### Cas9 mRNA の合成

Cas9 mRNA の合成は MLM3613 プラスミド (Addgene, plasmid #42251) を鋳型に用いた。

MLM3613 プラスミドは PmeI(NEB) で切断して、線形化した。線形化 MLM3613 プラスミド

1  $\mu$ g を鋳型にして、mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra kit (Ambion) を使って、Cas9

mRNA を合成した。in vitro transcription により合成した Cas9 mRNA は等量の

Acid-Phenol:Chloroform, pH 4.5 (with IAA, 125:24:1, Ambion) を加え、フェノールクロロホルム

抽出した後、等量のイソプロパノールを加え、イソプロパノール沈殿により精製した。

#### Cas9 mRNA と sgRNA 混合液の調製

10  $\mu$ g の Cas9 mRNA と 500 ng の sgRNA を混合して、30  $\mu$ l にメスアップし、3  $\mu$ l の 3M

酢酸ナトリウム、90  $\mu$ l のエタノール (99.5%) を加え、20,630  $\times$ g、4°C、30 分間遠心して、

上清を取り除き、1 ml のエタノール (70%) を加え、20,630  $\times$ g、4°C、5 分間遠心、上清

を取り除き、再度 1 ml のエタノール (70%) を加え、20,630  $\times$ g、4°C、5 分間遠心して、上

清取り除き、風乾させた。これを 11  $\mu$ l のインジェクションバッファー (100 mM 酢酸カリ

ウム、2 mM 酢酸マグネシウム、30 mM HEPES-水酸化カリウム、pH 7.4) に溶解し、イン

ジェクションに用いた。

### Cas9 mRNA と sgRNA のインジェクション

インジェクションには非休眠卵を産む p50TN 系統を用いた。産下後 3 時間以内の p50TN の卵をプレパラート上にアロンアルファを使って接着して並べた。タングステン針を用いて、卵に穴をあけ、ガラスキャピラリーにより sgRNA と Cas9 mRNA 混合液をインジェクションした。インジェクションした卵は 25°C で、12L12D の条件下で孵化させ、桑葉によって飼育した。

### T7 endonuclease I アッセイ

ノックアウトによる変異の導入を確認するために、T7 endonuclease I アッセイを行った。まず、ノックアウトした個体または集団から HotSHOT 法により DNA を抽出した。これを鋳型にして、ノックアウトの標的配列を含む領域で PCR を行った。PCR 産物は 95°C で 10 分、85°C で 1 分、75°C で 1 分、65°C で 1 分、55°C で 1 分、45°C で 1 分、35°C で 1 分、25°C で 1 分反応させ、ハイブリダイゼーションさせた。これを 5  $\mu$ l を取り、10X NEBuffer を 1  $\mu$ l、DW を 4  $\mu$ l、T7 endonuclease I (10U/ $\mu$ l, NEB) を 0.2  $\mu$ l を加え、37°C で 60 分間反応させた。Tris-Borate-EDTA (TBE) バッファーにより作成した、Gel Red (Wako Pure Chemicals, Tokyo, Japan) 含有 2.5% アガロースゲルを使って電気泳動を行い、切断の有無を確認した。T7 endonuclease I アッセイに用いたプライマーは Table 3 に示した。

### ノックアウト系統の樹立

インジェクションした卵の世代 (Generation 0; G0) の個体は無処理の p50TN の蛾と掛合わ

せ、次世代G1を作成した。G1において、変異が導入されているかどうかはT7 endonuclease Iを使って調べた。G1の同一の蛾区内の変異をもつ個体同士を交配し、G2を作出した。G2の個体の変異はT7 endonuclease I アッセイおよびシーケンシングによって確認し、ノックアウト系統を確立した。

## 結果

*BmGC-I* 遺伝子および *BmGSte4* のカイコの色彩パターンへの影響を評価するために、CRISPR/Cas9 システムを使って、それぞれの遺伝子のノックアウト (KO)カイコの作出を行った。まず、*BmGC-I* を KO するにあたり、*BmGC-I* のエクソン 2 の 2 箇所の塩基配列 (Target1 と Target2)を標的に選んだ。標的配列の探索には ZiFiT の CRISPR/Cas Nucleases プログラム (<http://zifit.partners.org/ZiFiT/Introduction.aspx>)を用いた。Target1 は *BmGC-I* の細胞外リガンド結合ドメイン (ECD)の近傍の上流配列に設計した (Fig. 8A)。一方、Target2 は以前に報告されていた *BmGC-I* の配列 (Tanoue et al., 2001)には存在しない、本研究で新たに単離した *BmGC-I* 全長 cDNA の配列上に設計した (Fig. 8D)。Target2 は開始コドンの近傍の、30 塩基の下流に位置している。*BmGC-I* の KO の結果は、どちらを標的にした KO カイコも *q* 様の異常な色彩パターンを示した (Figs. 8C and F)。つまり、体色が正常系統に比べ、ピンク色を呈し、不規則な黒色素のパターンを示していた。この *q* 様の表現型を示す KO 個体から DNA を抽出し、標的配列のシーケンシングを行ったところ、*BmGC-I* 遺伝子に変異が導入できていることも確認できた。Target1 では 2 塩基欠失 ( $\Delta 2$ )、4 塩基欠失 ( $\Delta 4$ )、4 塩基挿入 (+4)の 3 つの異なる変異が検出でき、一方 Target2 では 1 塩基の欠失 ( $\Delta 1$ )が検出できた (Figs. 8B and 8E)。これらのすべての変異は *BmGC-I* 遺伝子にフレームシフトを起こし、premature stop codon を生じる。つまり、*q* 系統のほとんどの *BmGC-I* の変異と同じように、ECD、KHD、CYC を欠いたタンパク質が KO 個体では作られる。Target1 の  $\Delta 2$  をホモ接合でもつ系統 (*BmGC-I* <sup>$\Delta 2/\Delta 2$</sup> )と Target2 の  $\Delta 1$  をホモ接合でもつ系統 (*BmGC-I* <sup>$\Delta 1/\Delta 1$</sup> )をそれぞれ確立したが、すべての個体が *q* 様の表現型を示した。

次に、*BmGC-I*と同様に*BmGSTe4*を標的にしたKOも行った。その際のKOの標的には*BmGSTe4*遺伝子のエクソン1を選んだ (Fig. 9A)。第一章の結果と一致して、*BmGSTe4*<sup>KO</sup>カイコでは*q*様の色素パターンの異常を示すものが観察できなかった (Fig. 9C)。また、KOが確実に行われているかどうかは、シーケンシングにより確認した。それにより、*BmGSTe4*遺伝子にはフレームシフト、そしてそれに伴う premature stop codon 起こす1塩基欠失 ( $\Delta 1$ )と44塩基欠失 ( $\Delta 44$ )の2種類の変異を導入できていることが確認できた (Fig. 9B)。*BmGSTe4*<sup>KO</sup>はGST N末端 delta-epsilon ドメインとC末端 delata-epsilon ドメインを欠いたタンパク質をつくるため、その機能は損なわれていることが予想された。しかしながら、*BmGSTe4*<sup>KO</sup>カイコは色彩パターンに異常は見られず、成長遅延や発生異常など一切の表現型を示さなかった。これらの結果は、*BmGC-I*が*q*の単独で原因遺伝子であることを示している。

## 考察

*BmGC-I* 遺伝子の KO が示す表現型の解析結果は、*q* のポジショナルクローニングの結果と一致し、*BmGC-I* 遺伝子が *q* の原因遺伝子であることを証明している。*q* 様の異常な色彩パターン—ピンク色の皮膚と不規則な黒色素パターン—は2つの異なる標的に行った KO のどちらでも観察できたことから、ゲノム上の他の遺伝子に生じたかもしれない変異の影響 (オフターゲット効果) によるものではなく、真に *BmGC-I* が *q* の形質を支配していることを示している。一方、予想通り、*BmGSte4*<sup>KO</sup> カイコでは異常な色彩パターンは観察されなかったが、その他の発生の異常、成長の遅延などの表現型も観察されなかった。そのため、*BmGSte4* のカイコにおける役割は不明なままである。*BmGSte4* はカイコゲノム上では、祖先系統の進化過程での遺伝子重複により生じたと考えられる *BmGSte1* と *BmGSte5* とともにタンデムに並んで存在していることから (Yu et al., 2008)、これら3つの遺伝子が冗長的に機能しているために、*BmGSte4*<sup>KO</sup> カイコでは表現型が観察されなかったのかもしれない。

また、*BmGC-I* の KO は *q* 様の表現型を再現したが、Fig. 2 に示したような *q* 系統と完全に同一な表現型を示さず、やや薄い黒色斑紋を示した。*q* の表現型は、別の幼虫の色彩パターンを制御する遺伝子座である *plain* (*p*) の影響を受けることが知られているが (Ohashi et al., 1983)、今回 KO に用いた系統と Fig. 2 の *q* 系統の *p* 遺伝子座のバックグラウンドは同一であった。このことは *p* 遺伝子座以外にも *BmGC-I* に影響する因子が存在していることを示している。色素合成系の制御に関わる因子や cGMP シグナル伝達経路に関わる因子が *BmGC-I* の異常による *q* の形質に影響を及ぼしているのかもしれない。

Target2 における *BmGC-I* の KO の結果は、本研究で単離した *BmGC-I* 全長 cDNA が *q* 形質に重要な働きをしていることを示した。第一章で述べたように、本研究で単離した *BmGC-I* の配列は、以前に報告された *BmGC-I* の配列とは異なっていた。Tanoue et al. (2001) の単離した *BmGC-I* は 1126AA をコードする 4769 塩基の cDNA であったが、本研究で単離したものは 1429AA をコードする 4729 塩基の cDNA であった。Western Blotting の結果は Tanoue et al. の単離した *BmGC-I* の推定タンパク質の分子量と一致していたが (Tanoue et al., 2001)、KO の結果は本研究で単離した *BmGC-I* が *q* の原因遺伝子であることを示していた。この違いは単離の方法と用いたカイコの系統の違いを反映しているのかもしれない。Tanoue et al. はヒトの GC-A をもとにした縮重プライマーと雄の触角由来の cDNA ライブラリーをもとに単離を行っているが、本研究では RACE 法により、同定を行った。また、用いたカイコの系統も違うために、バリエーションや系統間で異なる転写物が単離された可能性もあり、今後検討が必要である。

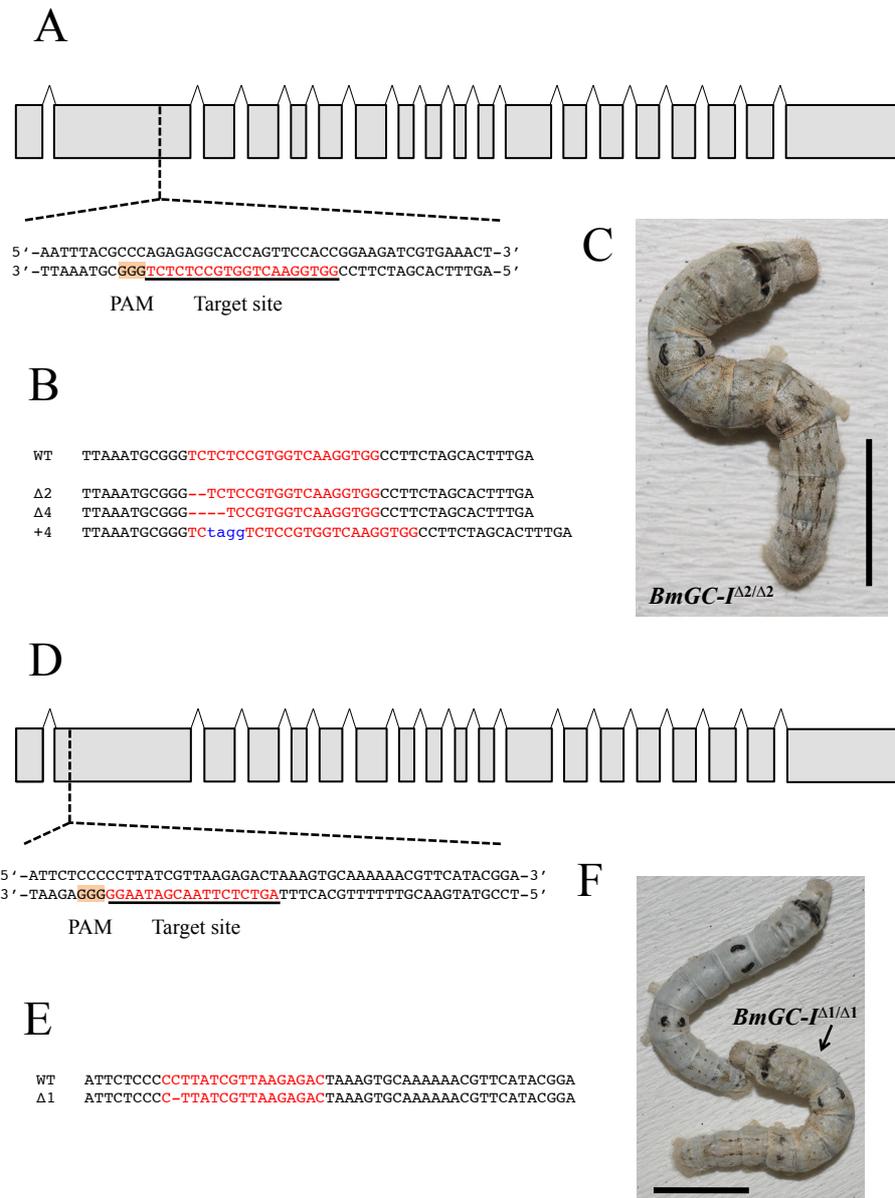


Fig. 8 CRISPR/Cas9 システムによる *BmGC-I* のノックアウト。

(A and D) *BmGC-I* のノックアウトの標的配列。赤文字は標的配列を、オレンジのボックスは protospacer adjacent motif (PAM) をそれぞれ示している。(B and E) ノックアウトに導入された *BmGC-I* の変異配列。一番上に正常系統 (WT) の *BmGC-I* の配列を示している。赤文字と破線はそれぞれ標的配列と欠失を示している。青色の小文字は挿入された配列を示している。それぞれの変異は *BmGC-I* に premature stop codon を引き起こしている。(C and F) *BmGC-I<sup>KO</sup>* カイコの色彩パターン。ノックアウトカイコの皮膚はピンク色を呈し、追加の黒色素パターンを示した。C は *BmGC-I $\Delta 2/\Delta 2$*  カイコを、D は *BmGC-I $\Delta 1/\Delta 1$*  をそれぞれ示している。Scale bar, 1cm.

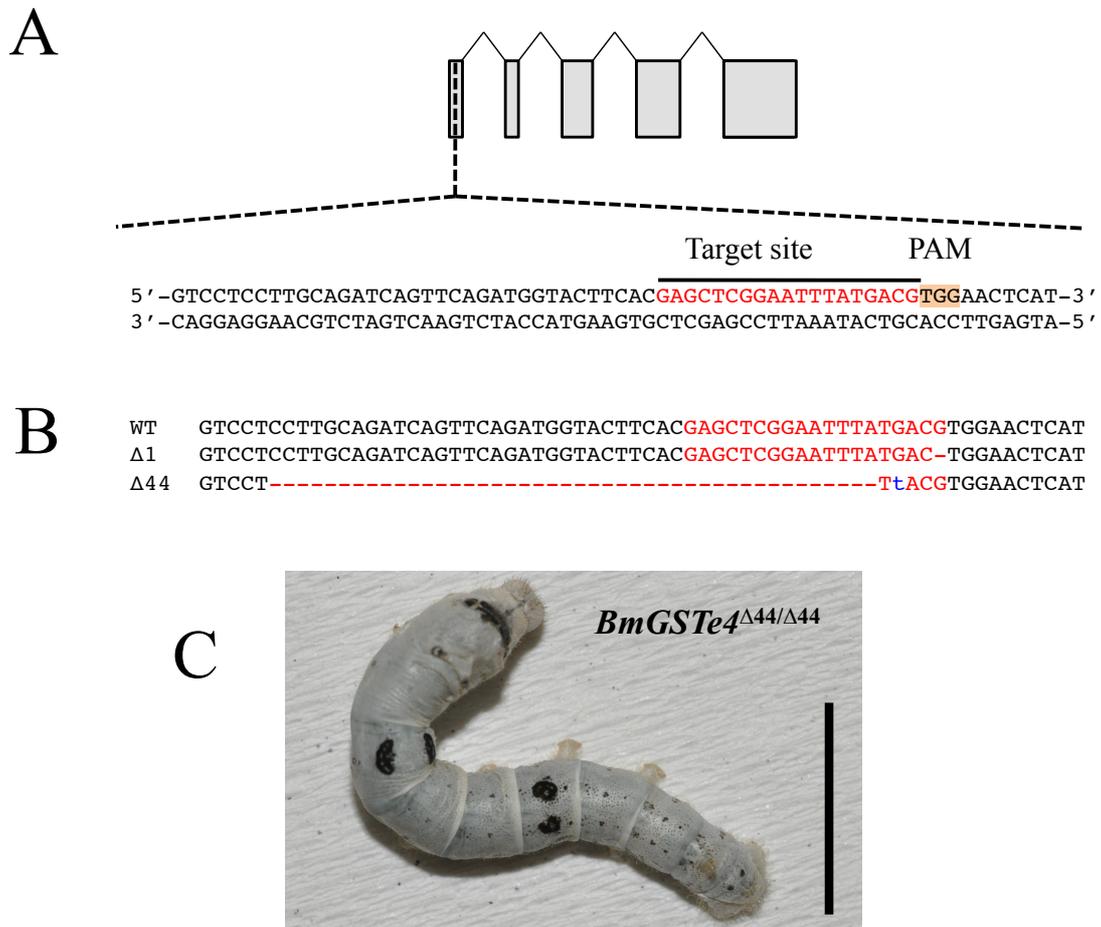


Fig. 9 CRISPR/Cas9 システムによる *BmGSTe4* のノックアウト。

(A) *BmGSTe4* のノックアウトの標的配列。赤文字は標的配列を、オレンジのボックスは protospacer adjacent motif (PAM) をそれぞれ示している。(B) ノックアウトに導入された *BmGSTe4* の変異配列。一番上に正常系統 (WT) の *BmGSTe4* の配列を示している。赤文字と破線はそれぞれ標的配列と欠失を示している。青色の小文字は置換配列を示している。それぞれの変異は *BmGSTe4* に premature stop codon を引き起こしている。(C) *BmGSTe4*<sup>KO</sup> カイコの色彩パターン。*BmGSTe4*<sup>KO</sup> カイコの皮膚は正常な色彩パターンを示した。Scale bar, 1 cm.

Table 3. Primers used in T7N1 assay

Name	Sequence (5'-3' end)	Target
GC_cF2.2	GAGCAACGAAGATTTGACCAAC	BmGC-I Target1
GC_cR2.2	GTATCTCTGTAGTCCACCAGTA	
GC_cF1	TTCGCTTCGCGTATCGCTAATG	BmGC-I Target2
GC_cR1	CACACGTAAAGAACCAGGAATG	
BmGSTe4_cF1	ATAAGTAGGCCCCACAAGAGGT	BmGSTe4
BmGSTe4_cR1	TGACGATCAGCTTTCAATAGGA	