

ハエ目(双翅目)におけるゲノム編集研究

誌名	蚕糸・昆虫バイオテック = Sanshi-konchu biotec
ISSN	18810551
著者名	山本,大介
発行元	日本蚕糸学会
巻/号	86巻2号
巻号補足	
掲載ページ	p. 105-114
発行年月	2017年8月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



特集「ゲノム編集：昆虫分子生物学を塗り替える革新的技術」

ハエ目(双翅目)におけるゲノム編集研究

山本 大介*

自治医科大学医学部 感染・免疫学講座 医動物学部門

1. はじめに

ハエ目は完全変態昆虫で、系統学的には最も進化的なグループの一つに属する (Misof et al. 2014)。短角亜目 (Brachycera) と長角亜目 (糸角亜目: Nematocera) の二つの亜目に分けられ、短角亜目にはハエやアブが属し、長角亜目にはカ、ユスリカ、ブユなどが属している。これらのなかには、モデル生物のキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*)、感染症を媒介する吸血性のカやサシチョウバエ、ツェツェバエなどの衛生害虫、ミバエなどの農業害虫など、様々な分野で重要な種が含まれる。遺伝子組換え技術をはじめとした分子生物学的手法は、主にキイロショウジョウバエで最初に確立され、その技術をもとにして、その他の種ではそれぞれの種の特性に合わせながら導入されている。ハエ目の昆虫において人工ヌクレアーゼを利用したゲノム編集技術は zinc finger nuclease (ZFN) の利用によってキイロショウジョウバエで最初に成功し、その後、カでも成功した (Reid and O'Brochta 2016)。近年、transcription activator-like effector nuclease (TALEN), clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) /CRISPR associated protein 9 (CRISPR/Cas9) の技術開発によってゲノム編集が比較的容易になったことにより、カにおいては遺伝子の機能解析だけでなく、害虫制御技術への応用が期待されている。本稿では、筆者が研究に用いている「準モ

デル昆虫」の力を中心に、ハエ目の昆虫におけるゲノム編集研究の現状について述べる。

2. キイロショウジョウバエにおけるゲノム編集技術

キイロショウジョウバエは、ハエ目においてだけでなく、昆虫で初めて人工ヌクレアーゼを利用したゲノム編集に成功した種である。ZFN を利用した方法が 2002 年に初めて報告されたが、このときはまず ZFN の片側ずつを発現する遺伝子を導入した遺伝子組換え個体をそれぞれ作出し、2 系統を交配した後の世代で変異を導入する方法であった (Bibikova et al. 2002)。その後、TALEN と CRISPR/Cas9 の技術が開発されると、キイロショウジョウバエでもそれらの技術に移行し、特に技術の利便性から CRISPR/Cas9 が主流になっている。TALEN による変異導入の方法では mRNA を初期胚にインジェクションする方法で行われている。CRISPR/Cas9 の場合には、Cas9 の mRNA と single-guide RNA (sgRNA) を初期胚にインジェクションする方法の他に、それらが発現するプラスミドをインジェクションに用いることもある。また、ZFN の場合と同様に、Cas9 や sgRNA を導入した遺伝子組換え系統を用いる実験も多数報告されている (Reid and O'Brochta 2016)。遺伝子組換え系統を用いる場合には、実験の簡便さから、*nanos* 遺伝子や *vasa* 遺伝子などの生殖細胞で働くプロモーターで Cas9 が発現する系統の初期胚に、sgRNA 発現プラスミドをインジェクションする方法がよく行われている (図 1) (Xu et al. 2015)。また、Cas9 発現系統と sgRNA 発現系統を交配し、その後の世代 (F2) において変異を誘導する方法も可能である (Kondo and Ueda 2013)。キイロショウジョウ

*〒329-0498 栃木県下野市薬師寺 3311-1
自治医科大学医学部 感染・免疫学講座 医動物学部門
E-mail: daisukey@jichi.ac.jp
Tel: 0285-58-7339 Fax: 0285-44-6489

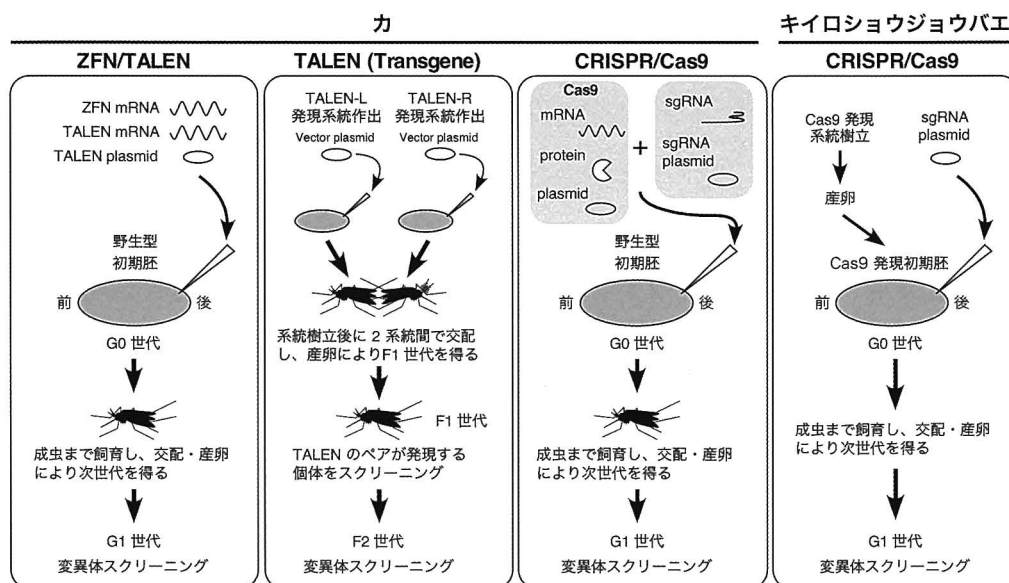


図1. カおよびキロショウジョウバエにおける主なゲノム編集個体作出方法の概略図

カでゲノム編集を行う場合には、通常、ZFN は mRNA, TALEN は mRNA またはプラスミド, CRISPR/Cas9 の場合には Cas9 (mRNA またはタンパク質) と sgRNA を、初期胚へインジェクションする。インジェクションした個体を成虫まで飼育し、交配・吸血（カは卵成熟のために吸血が必要）させたのち、産卵させて次世代で変異体をスクリーニングする。今のところ発現プラスミドを使用した場合、カでは成功例は少ない。TALEN (Transgene) は Smidler et al. (2013) で報告された方法で、TALEN を発現する遺伝子組換え系統を用いた。キロショウジョウバエの図は CRISPR/Cas9 でよく利用される方法を示した。生殖細胞で機能する *nanos* などのプロモーターで Cas9 が発現する系統から得られた初期胚に sgRNA 発現プラスミドをインジェクションする方法がよく利用される。それぞれの方法で、ノックインの場合はこれらに加えてドナーベクター用のプラスミドを一緒にインジェクションする。キロショウジョウバエでは一本鎖 DNA がドナーに利用されることもある。

バエは、モデル生物として、ゲノム編集技術を改良したツールの適応が先行しており、DNA 切断酵素活性のみを欠失させた Cas9 (nuclease-dead Cas9; dCas9) を利用した、特異性と効率の高いノックダウン法 (CRISPR interference; CRISPRi) や転写活性化法 (CRISPR activation; CRISPRa) が可能である (Ghosh et al. 2016; Lin et al. 2015)。体色に関わる遺伝子のように変異体の表現型がマーカーになる遺伝子の sgRNA と目的の遺伝子の sgRNA を共発現させることで、目的の遺伝子の変異体を効率良くスクリーニングする実験系 (Co-CRISPR) もキロショウジョウバエでは有効なことが報告されている (Kane et al. 2017)。また、バイナリ発現系 (GAL4/UAS) などの技術との融合による発現調節も可能である (Xue et al. 2014)。今後、他の昆虫では、これらの情報を利用しつつ、材料に合わせて技術を導入していくことが予想される。キロショウジョウバエにおけるゲノム編集技術の詳細については以下に挙げる総説を参照されたい (Bassett and Liu 2014; Huang et al. 2016; Reid and O'Brochta 2016; Taning et al. 2017; Xu et al. 2015)。

3. カにおけるゲノム編集技術

カはマラリアやデング熱をはじめとし、黄熱、日本脳炎、ウエストナイル熱、チクングニア熱、ジカ熱、フィ

ラリア症などの様々な感染症の媒介者（ベクター）として世界中で脅威となっている衛生害虫であり、以前より研究材料とされてきた。日本においても、2014 年の東京におけるデング熱の流行から、カへの関心が高まっている。これまで、カにおける遺伝子組換え技術を含めた分子生物学的手法は、ハマダラカ属 (*Anopheles*) とヤブカ属 (*Aedes*) で特に研究が進んでいる。ハマダラカ属は世界三大感染症の一つであるマラリアのベクターとして研究されている。一方、ヤブカ属は主にデング熱やジカ熱のベクターとして研究されている。

カにおける遺伝子操作は、主にカと病原体間の相互作用の解析や、吸血行動におけるヒトや動物に対する宿主認識機構の解析などのベクターバイオロジー研究に用いられるのに加えて、新しいベクターコントロール対策への応用面でも期待されている。以前は、カにおいては任意の遺伝子を標的としたノックアウト・ノックインは困難であったが、ゲノム編集技術の開発によって可能になった。カにおけるゲノム編集は、2013 年に最初にネッタイシマカ (*Aedes aegypti*) において ZFN で成功した (DeGennaro et al. 2013)。ネッタイシマカでは、その後すぐに TALEN, CRISPR/Cas9 による方法に移行している (Aryan et al. 2013; Basu et al. 2015; Dong et al. 2015; Kistler et al. 2015)。一方、ハマダラカでもゲノム編集はガンビ

アハマダラカ (*Anopheles gambiae*) で TALEN を用いて最初に成功し (Smidler et al. 2013), その後, CRISPR/Cas9 を利用してガンビアハマダラカとステフェンスハマダラカ (*Anopheles stephensi*) で成功している (Galizi et al. 2016; Gantz et al. 2015; Hammond et al. 2016)。また, イエカ属のネッタイエカ (*Culex quinquefasciatus*) においても TALEN および CRISPR/Cas9 によるゲノム編集の成功例が報告されている (Itokawa et al. 2016)。

カで報告されているゲノム編集の結果を表に示した (表 1)。一般的に, カにおけるゲノム編集のほとんどは初期胚へのインジェクションにより行われている (図 1)。ZFN による方法では, ZFN の mRNA のインジェクションによる成功例が報告されている (Reid and O'Brochta 2016)。TALEN では mRNA に加えて, TALEN をコードするプラスミドをインジェクションした場合でも成功した報告がある。CRISPR/Cas9 では Cas9 の mRNA やタンパク質と sgRNA を混合し, インジェクションしている。特に Cas9 タンパク質を使用する場合, 市販の物を利用した場合に成功率が高かったという報告がある (Kistler et al. 2015)。一方, ネッタシマカでは Cas9 をコードする発現プラスミドを使用した場合は成功していない (Dong et al. 2015; Kistler et al. 2015)。sgRNA の導入については, キイロショウジョウバエでは RNA ポリメラーゼ III 依存型 *U6* プロモーター (*U6* プロモーター) で sgRNA が発現するプラスミドをインジェクションに用いることが一般的であるが (Kondo and Ueda 2013), カでは *in vitro* で転写した sgRNA を利用することが多い。ネッタシマカにおいて, ネッタシマカ由来の *U6* プロモーター, あるいはキイロショウジョウバエ由来の *U6* プロモーターで sgRNA が発現するプラスミドを使用した場合はゲノム編集には成功していない (Dong et al. 2015)。ネッタイエカにおいて, キイロショウジョウバエ由来の *U6* プロモーターで sgRNA が発現するプラスミドをインジェクションに利用した実験でも成功していない (Itokawa et al. 2016)。現在のところ, *in vivo* で sgRNA の発現を誘導しゲノム編集に成功したことが報告されているのは, ハマダラカにおいてその種由来の *U6* プロモーターを利用した場合のみである (Galizi et al. 2016; Gantz et al. 2015; Hammond et al. 2016)。また, ハマダラカでは, キイロショウジョウバエと同様に, TALEN の片側ずつを生殖細胞で個別に発現する遺伝子組換え系統をそれぞれ作出し, 二つの系統を交配して得られた個体の次世代 (F2) で変異を誘導した例が報告されている (Smidler et al. 2013)。他の昆虫種と同様に, 非相同末端結合 (non-homologous end joining; NHEJ) によるノック

アウトの効率は高く, トランスポゾンによる遺伝子導入の効率と比べて高い場合もある (Gregory et al. 2016; Reid and O'Brochta 2016)。また, インジェクションした個体 (G_0 世代) での体細胞モザイクにおける表現型解析が可能な場合があることも他の昆虫種と同様である (Aryan et al. 2014)。一方, 相同性組換え修復 (homology-directed repair; HDR) によるノックインの効率は低く, 通常は 1% に満たないことが報告されている (Reid and O'Brochta 2016)。カイコではノックイン効率の高い技術として precise integration into target chromosome (PITCh) 法が開発されているが (Nakade et al. 2014), 今後はカにおいても PITCh 法のようなノックイン効率を向上させる技術の開発が期待される。

4. ベクター制御に向けたカの遺伝子解析

カでのゲノム編集は, 技術開発のためにマーカーになるような眼の色素関連の遺伝子などで試されたあとは, 主として病原体との相互作用 (感染機構または防御機構), 吸血行動, さらには性決定などに関連する遺伝子の解析に利用されている。まず, ネッタシマカでは嗅覚受容体と複合体を形成する受容体遺伝子 (*olfactory receptor co-receptor: orco*) のノックアウト解析を行い, ノックアウト個体での忌避剤の DEET に対する反応の低下が見られた (DeGennaro et al. 2013)。宿主探索に重要な CO_2 感知に関与する味覚受容体 (*tastatory receptors*) の遺伝子 (*Gr3*) のノックアウト個体およびノックイン個体では宿主探索行動への異常が出た例が報告されている (McMeniman et al. 2014)。このような研究は新たな忌避剤の開発などにつながる。その他に, 吸血後における宿主探索行動の抑制に関与するとされるペプチド神経伝達物質の遺伝子 (*neuropeptide Y-like receptor*) を解析した例がある (Liesch et al. 2013)。また, 性決定遺伝子や生殖に関連する遺伝子の解析にも利用されている。これらは, 変異を導入すると致死や不妊の表現型が出て系統の樹立が困難であるが, G_0 世代の個体での体細胞モザイクにおける表現型解析が可能である。ネッタシマカの雄性決定遺伝子 (*Nix*) を CRISPR/Cas9 を利用してノックアウトした解析では, G_0 個体成虫で体の一部が雌化した表現型が見られている (Hall et al. 2015)。ネッタシマカのマイクロ RNA の一つである miR-309 の CRISPR/Cas9 によるノックアウト解析では, G_0 個体成虫で卵巣の発育不良が起こり, miR-309 が卵巣の発生制御に関与することが示唆された (Zhang et al. 2016)。

ハマダラカでは, マラリア原虫感染に関与する遺伝子を解析することでマラリアを媒介できない系統 (詳細は

表 1. ショウジョウバエ以外のハエ目の昆虫におけるゲノム編集¹⁾

種名	ゲノム編集の タイプ	ツール導入のタイプ ²⁾	遺伝子	変異のタイプ	文献・備考
ネッタイシマカ (<i>Aedes aegypti</i>)	ZFN	mRNA	<i>orco</i> , <i>EGFP</i>	ノックアウト	DeGennaro et al. 2013
	ZFN	mRNA	<i>npylr-1</i>	ノックアウト ノックイン	Liesch et al. 2013
	ZFN	mRNA	<i>Gr3</i>	ノックアウト ノックイン	McMeniman et al. 2014
	TALEN	Plasmid	<i>kmo</i>	ノックアウト	Aryan et al. 2013
	TALEN, CRISPR/Cas9	mRNA, Protein (市販) sgRNA	<i>kmo</i> , <i>lig4</i> , <i>ku70</i> , <i>r2d2</i> , <i>loqs</i>	ノックアウト	Basu et al. 2015
	CRISPR/Cas9	mRNA, Plasmid, sgRNA, sgRNA (Plasmid)	<i>ECFP</i>	ノックアウト	Dong et al. 2015
	CRISPR/Cas9	mRNA, Protein (市販), Plasmid, sgRNA	<i>wtrw</i> <i>AAEL010779</i> <i>AAEL004091</i> <i>AAEL000926</i> <i>AAEL014228</i> <i>AAEL002575</i> <i>AAEL013647</i> <i>AAEL000582</i>	ノックアウト ノックイン	Kistler et al. 2015
	CRISPR/Cas9	Protein, sgRNA	<i>Nix</i>	ノックアウト (G ₀ somatic cells) ³⁾	Hall et al. 2015
	CRISPR/Cas9	Protein (市販), sgRNA	<i>miR-309</i> <i>kmo</i>	ノックアウト (G ₀ somatic cells) ³⁾	Zhang et al. 2016
ガンビアハマダラカ (<i>Anopheles gambiae</i>)	TALEN	Transgene	<i>TEP1</i>	ノックアウト	Smidler et al. 2013
	TALEN CRISPR/Cas9	Plasmid, sgRNA (Plasmid)	<i>AGAP005958</i> <i>AGAP011377</i> <i>AGAP007280</i>	ノックイン	Hammond et al. 2016 (遺伝子ドライブ)
	CRISPR/Cas9	Transgene	rDNA	ノックアウト	Galizi et al. 2016 (SRD)
ステフェンスハマダラカ (<i>Anopheles stephensi</i>)	CRISPR/Cas9	Plasmid, Protein, sgRNA (Plasmid)	<i>kmo</i>	ノックイン	Gantz et al. 2015 (遺伝子ドライブ)
	TALEN	mRNA	<i>kmo</i>	ノックアウト	Yamamoto et al. unpublished
ネッタイイエカ (<i>Culex quinquefasciatus</i>)	TALEN CRISPR/Cas9	mRNA, sgRNA, sgRNA (Plasmid)	<i>CYP9M10</i>	ノックアウト	Itokawa et al. 2016
イエバエ (<i>Musca domestica</i>)	CRISPR/Cas9	Protein, sgRNA	<i>yellow</i>	ノックアウト	Heinze et al. 2017
チチュウカイミバエ (<i>Ceratitis capitata</i>)	CRISPR/Cas9	Protein, sgRNA	<i>white</i> <i>paired</i>	ノックアウト	Meccariello et al. 2017

¹⁾ Reid and O'Brochta 2016, Taning et al. 2017 を参照しつつ、最近の情報を追加して作成した。

²⁾ mRNA, Protein, Plasmid; それぞれ初期胚にインジェクションした ZFN, TALEN, Cas9 のタイプを示す。Transgene; TALEN あるいは CRISPR/Cas9 のコンストラクトをゲノムに挿入した系統の次世代でゲノム編集が行われている。sgRNA; *in vitro* で転写して作製した sgRNA を使用している。sgRNA (Plasmid); sgRNA 発現プラスミドがインジェクションに使用されている。Cas9 に関して市販のものを使用したことを論文中に明記してある場合には、そのことを書き添えた。

³⁾ G₀ somatic cells; 系統の樹立は行わず、G₀ 個体において表現型解析が行われている。

後述) の作製や、新たなマラリア伝播阻止薬の開発が期待できる。ハマダラカの抗マラリア原虫因子の一つとして知られる *thioester containing protein 1* (*TEP1*) を、TALEN を利用してノックアウトすると、マラリア感受

性が上がる(抵抗性が下がる)ことが報告されている (Smidler et al. 2013)。また、ハマダラカにおけるマラリア原虫の感染に重要な体内因子としてキサンツレン酸が報告されているが (Billker et al. 1998)、筆者らのグルー

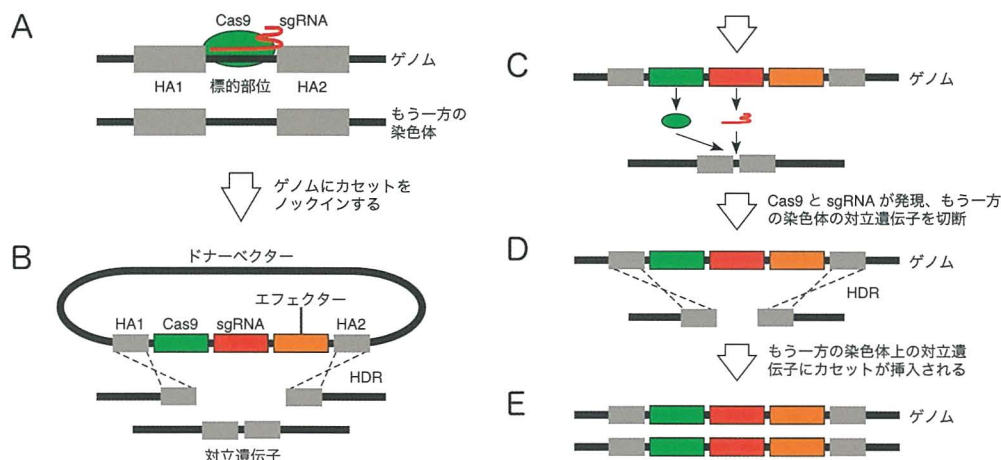


図2. Mutagenic chain reaction (MCR) 法

(A) ゲノム上の標的部点を Cas9 と標的部点に対する sgRNA で切断する。(B) Cas9、標的部点に対する sgRNA、エフェクターがそれぞれ発現するコンストラクトを繋げたカセットを、標的部点の両側の相同部位 (homology arm; HA) で挟んだドナーベクタープラスミドから相同性組換え修復 (homology directed repair; HDR) を介して標的部点に挿入 (ノックイン) する。(C) 挿入したカセットから Cas9 と sgRNA が発現する。(D) もう一方の染色体上にある対立遺伝子が Cas9 と sgRNA により切断され、再び HDR によりカセットが挿入される。(E) その結果、Cas9、sgRNA、エフェクターをホモ接合にもつようになる。

プの解析において、キサンツレン酸の合成経路の *kynurenine 3-monooxygenase* (*kmo*) 遺伝子を TALEN を利用してノックアウトし、キサンツレン酸合成を抑制することでマラリア原虫感染に対する感受性が下がることが確認されている (山本ら、未発表)。その他に、ネッタイエカでは殺虫剤抵抗性に関与するシトクロム P450 酸化酵素について、TALEN と CRISPR/Cas9 によるノックアウト解析が報告されている (Itokawa et al. 2016)。

5. ベクター制御技術開発におけるゲノム編集

マラリアやデング熱などの対策には、ベクターである力のコントロールは有効である。しかし、従来の殺虫剤および殺虫剤を練り込んだ蚊帳の使用による方法は抵抗性個体の増加により効果が減ってきている (Churcher et al. 2016; Gattton et al. 2013; Hemingway et al. 2016)。そこで、力が媒介する感染症のコントロールに向けた新しい対策として、遺伝子操作による力のコントロール技術の開発が行われている。その一つに、遺伝子操作によりマラリア原虫やデングウイルスなどの病原体への抵抗性を力に付与し、野外の集団と置換する方法が考えられている。ハマダラカではこれまで、従来の遺伝子組換えによる方法で多数のマラリア原虫の感染に抵抗性を持たせた系統が作出されている (Adelman et al. 2016)。マラリアの媒介阻止率も向上しており (Isaacs et al. 2012; Sumitani et al. 2013; Yamamoto et al. 2016; Yoshida et al. 2007)、マラリアを媒介できないハマダラカ系統 (マラリア非媒介蚊) の作出も現実的なものとなっている。しかし、マラリア非媒介蚊が作出できた場合でも野外に放出して野生

集団と置き換えるには、これらの力に生涯を通じて高い競争力を持たせて、さらにマラリア抵抗性の形質 (配偶子) をより多くの子孫に伝える技術が必要になる。このことがボトルネックとなって、マラリア非媒介蚊のベクターコントロール技術への応用はまだ困難とされていた。ゲノム編集技術はこの問題の解決策を生み出せるものとして期待されている。

近年、マラリア非媒介蚊などの有用形質を持たせた変異個体を野生集団内に効率よく広める方法として、遺伝子ドライブ (gene drive) と呼ばれる手法が注目を集めている。遺伝子ドライブは、特定の遺伝因子を親から子へ伝える際に、メンデルの遺伝の法則を超えた比率で伝える技術で、これにより特定の遺伝形質を生物集団内に優先的に拡散させることができる (Champer et al. 2016; Esvelt et al. 2014)。遺伝子ドライブ技術の研究は、以前より *Medea* のような利己的遺伝因子やホーミングエンドヌクレアーゼを利用した実験が行われていたが、効果が限定的で実用化には困難とされていた。しかし、近年、Gantz らにより、キイロショウジョウバエにおいて CRISPR/Cas9 を利用した mutagenic chain reaction (MCR) と呼ばれる方法で遺伝子ドライブを効率良く行えることが報告された (Gantz and Bier 2015)。Gantz らの方法では、Cas9 遺伝子と sgRNA が発現するコンストラクトをカセットにして標的配列にノックインする。一度、片方の染色体にノックインされると、挿入されたカセットから発現した Cas9 と sgRNA がもう一方の染色体の対立遺伝子を切断し、自身のカセットをノックインし続けるようになる (図2)。

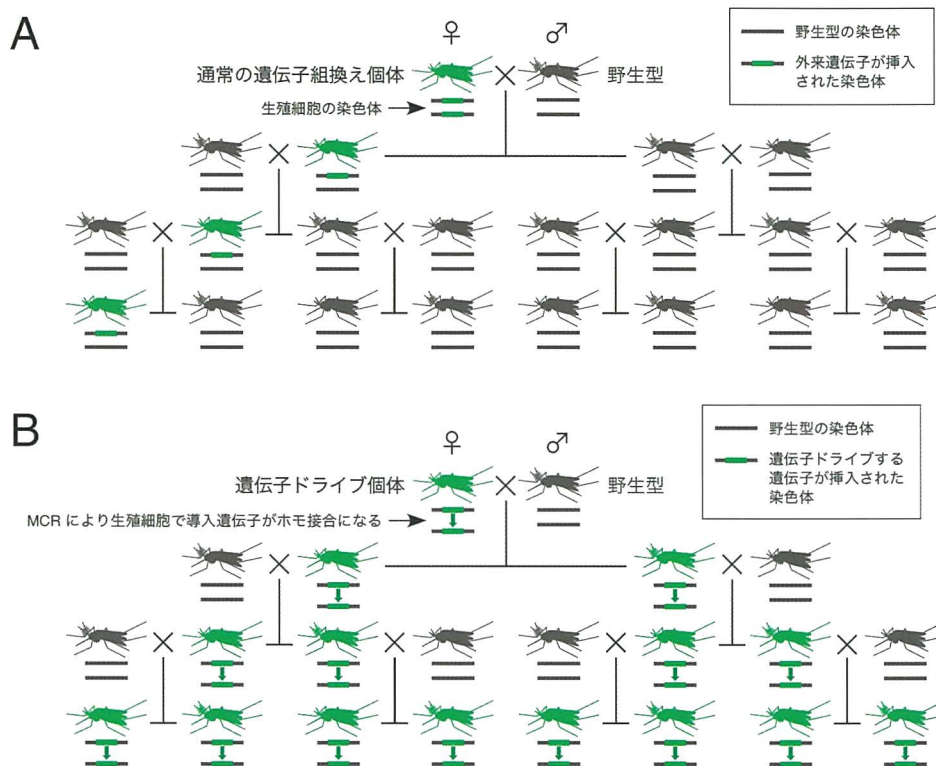


図3. MCR法を利用した遺伝子ドライブ法の模式図

(A) 通常の遺伝子組換え個体の場合、導入遺伝子による特定の形質はメンデルの遺伝の法則に従って50%の子孫にしか受け継がれない。その結果、その形質は集団内で優先的に拡散しづらい。(B) 遺伝子ドライブ個体の場合、体細胞で導入遺伝子をヘテロ接合にもつ個体においても、生殖細胞ではMCRにより導入遺伝子がホモ接合になる。その結果、理論的には導入した形質が集団内で優先的に拡散し、数世代で野生型の形質と置き換わる。

GantzらはこのMCRを利用した方法がステフェンスハマダラカでも可能なことを報告した(Gantz et al. 2015)。Gantzらは、生殖細胞特異的に働くステフェンスハマダラカ由来の *vasa* 遺伝子のプロモーターをつなげた Cas9 遺伝子と、ステフェンスハマダラカ由来の *U6* プロモーターをつなげた sgRNA 発現コンストラクトに加えて、ハマダラカ体内でマラリア原虫の成長を阻害するエフェクター分子(マラリア原虫の抗原に対する2種類の一本鎖抗体遺伝子)をカセットにしてゲノム上の sgRNA の標的部位にノックインした。これにより、マラリアに抵抗性のある遺伝子をもつ個体が集団内で優先的に増えることが出来る。実験室内集団においてこの系統と野生型を交配すると、通常は50%の配偶子に挿入した遺伝子が伝搬されるところが、98%以上になることが示されている(Gantz et al. 2015)。このことから、理論的にはマラリア非媒介個体を野外集団内で急速に拡散させて、数世代で野外個体と置換出来ると考えられる(図3)。昆虫では、ゲノム編集技術を利用した遺伝子ドライブ技術は、キイロショウジョウバエとハマダラカで成功しているが、今後はデング熱やジカ熱などのベクターであるネッタイシマカでの開発も期待されている。他にもフィ

リリア症を媒介する種(ヤブカ、ハマダラカ、イエカなど複数の属に見られる)にフィリリア抵抗性のエフェクターを挿入して野生個体と置換することへの利用も期待できる(Zamanian and Andersen 2016)。このような病気を媒介しない形質を拡散する技術開発への利用とは別に、遺伝子ドライブは一方の性特異的に不妊化を誘導する系統による集団個体数を減少させる技術にも利用できる(Hammond et al. 2016)。また、既存の殺虫剤に対する抵抗性が問題になっているような種では、遺伝子ドライブ技術によって感受性を高めた個体に置き換えることで防除を容易にするという利用法も考えられる(Reid and O'Brochta 2016)。これは病気媒介性の昆虫以外にも応用できることから、遺伝子ドライブ技術は様々な害虫の新しい防除法の開発につながるものとして期待される。しかし、MCR法を用いた遺伝子ドライブには弱点もあり、標的配列において集団内で変異を持つ個体がいると、その個体の子孫には挿入が起らず、効率の低下や効果が制限されることが予想される(Callaway 2017; Miles et al. 2016)。したがって、標的配列にはその種で変異の少ないゲノム領域を選択することはもちろん、標的配列について集団内での遺伝的多様性を調査しておく

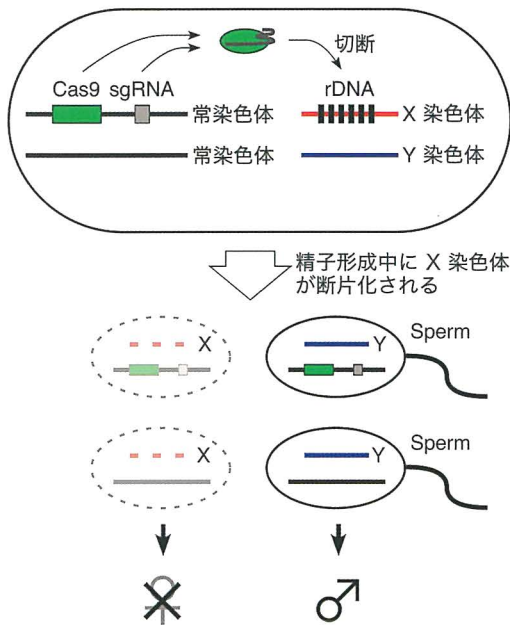


図 4. ゲノム編集技術を利用した sex-ratio distortion system 最初に, *piggyBac* ベクターで Cas9 とハマダラカ X 染色体上のリボソーム DNA 遺伝子 (複数コピー遺伝子) に対する sgRNA を発現するカセットをゲノムに導入する。Cas9 を雄の生殖細胞特異的プロモーターで誘導し, ゲノム編集を行うことで, 減数分裂中に X 染色体の断片化が起こる。その結果, Y 染色体を受け継いだ精子の比率が増大し, この個体の子孫は雄に偏る。Galizi et al. (2016) では, カセットが常染色体に導入されたため, 子孫の 50% が導入遺伝子を受け継いだ, 今後, Y 染色体にノックインできれば, 理論上, 子孫の 100% が導入遺伝子を受け継ぐことになり, 確実な効果が期待できるようになると考えられる。

ことが重要になる。

遺伝子ドライブ以外にもゲノム編集技術を利用した害虫制御の方法としては, 性染色体をゲノム編集の標的とすることによる性比異常を誘導する方法 (sex-ratio distortion system: SRD system) が考えられている (図 4)。SRD system もゲノム編集技術が取り入れられる以前から試されていた方法である。ハマダラカの X 染色体上に存在するリボソーム DNA 遺伝子配列を選択的に切断するエンドヌクレアーゼ (I-PpoI) をゲノムに組み込み, これを精巣で発現させることで精子形成中の X 染色体を断片化し, X 染色体を持つ精子を選択的に破壊することが出来る。この系統の雄と交配した雌から得られる次世代個体は 95% 以上が雄になり, 継代飼育の結果, 集団内の個体数が減った例が報告されている (Galizi et al. 2014)。この技術を CRISPR/Cas9 と融合させた方法では, ハマダラカ X 染色体上のリボソーム DNA 遺伝子を標的とする sgRNA と Cas9 遺伝子の発現コンストラクトをカセットにして導入した遺伝子組換え系統を作製する。Cas9 を雄の精巣特異的プロモーターで発現させることで, 精巣特異的に X 染色体の rDNA の切断を行った (図

4)。この方法では I-PpoI を導入した遺伝子組換え系統と同等の性比異常を誘導でき, さらに, I-PpoI を導入した場合よりも妊性 (孵化率) への影響が少ないことが示された (Galizi et al. 2016)。CRISPR/Cas9 によって, より妊性や競争力に影響の少ない X 染色体上の領域を標的にする, さらには Cas9 と sgRNA の発現カセットを Y 染色体にノックインすることが出来れば, より確実な効果が期待できる。このように, ベクターコントロール研究において, ゲノム編集技術は, 既存の技術の問題点を打破し, より効率の良い技術の開発を可能にする能力を秘めている。

6. その他のハエ目の昆虫におけるゲノム編集技術

ショウジョウバエとカ以外の種に目を向けると, 最近, イエバエ (*Musca domestica*) において Cas9 タンパク質と sgRNA を複合体にした後に初期胚にインジェクションする方法で, 体色が黄色になる変異体の原因遺伝子である *yellow* をノックアウト出来たことが報告された (Heinze et al. 2017)。また, チチュウカイミバエ (*Ceratitidis capitata*) においても同様の方法で, CRISPR/Cas9 により, 白眼の変異体の原因遺伝子の一つである *white* および胚発生初期に働くペアルール遺伝子の一つである *paired* のノックアウトが報告された (Meccariello et al. 2017)。昆虫でのゲノム編集は, 既存の遺伝子組換え技術と同じく, 初期胚へのインジェクションによる方法が適応できるため, 遺伝子組換え技術が確立されている種では (Gregory et al. 2016), 近い将来, ゲノム編集技術の確立も可能になることが予想される。その際には, 生物種に応じて, 初期胚にインジェクションする TALEN や Cas9/sgRNA のタイプについて, mRNA, タンパク質, 発現プラスミドなどから適したものを選択していく必要があると考えられる (Reid and O'Brochta 2016; Taning et al. 2017)。また, CRISPR/Cas9 の場合には, キイロショウジョウバエのように, Cas9 や sgRNA を発現する遺伝子組換え系統を利用した方法も候補になりうる。

ユスリカの 1 種であるネムリユスリカ (*Polypedilum vanderplanki*) は, 幼虫期に非常に強い乾燥耐性能力を持つことから (Cornette and Kikawada 2011), 耐性機構の解析や乾燥保存技術開発の研究が行われている種として知られ, CRISPR/Cas9 によるゲノム編集が試みられている。ネムリユスリカでは乾燥耐性能力を保持した培養細胞株が存在し, この細胞において遺伝子導入が可能なが報告されており, 培養細胞でのゲノム編集による遺伝子機能解析が期待できるようになっている (Sogame et al. 2017)。

ハエ目にはカ以外にも吸血性を示し、感染症のベクターである種が複数存在している。その中にはリーシュマニア症（病原体はリーシュマニア原虫）のベクターであるサシチョウバエ（*Phlebotomus* 属, *Lutzomyia* 属）やアフリカ睡眠病（病原体はアフリカトリパノソーマ原虫）のベクターであるツェツェバエ（*Glossina* 属）が含まれる。リーシュマニア症やアフリカ睡眠病は「顧みられない熱帯病（neglected tropical diseases: NTDs）」として近年重要視されており、その対策としてベクターの基礎研究やその制御も重要である（Hotez et al. 2016）。しかし、これらの種ではまだゲノム編集に重要な初期胚へのインジェクションの方法が確立されていない。今後これらの種でもゲノム編集技術の確立が望まれる。特にツェツェバエは、卵胎生の生殖様式を行う（胚ではなく蛹化直前の3齢幼虫を産下する）ため、初期胚へのインジェクションが出来ない。したがって、インジェクションに代わる CRISPR/Cas9 などの導入方法を検討し（Taning et al. 2017）、確立する必要があると考えられる。

7. おわりに

人工ヌクレアーゼによるゲノム編集技術はノックアウトとノックインの技術を広い種で可能にした。特にハエ目においては、基礎研究のツールとしてだけではなく、個体数の制御や生体への病原体の感染抑制など、様々な害虫の新しいコントロール技術開発の強力なツールになっていくと考えられる。一方、これらの技術のリスクを認識し、管理する体制の必要性が生じている。特に、遺伝子ドライブ技術は1匹の個体からでも野生集団全体、さらには生態系をも変えてしまう潜在的能力がある。したがって、遺伝子ドライブ生物の取り扱いには従来の遺伝子組換え個体以上に注意を払い、野外放飼などの実用化には社会の理解や許容を含め、より慎重な議論が必要となる（Akbari et al. 2015; 河本 2017）。しかし、マラリアやデング熱のような、世界中で多くの犠牲を出し、実用化ワクチンもない感染症への対策として、このような技術開発の研究を進める価値は十分にあると考えられる。また、これら技術の開発のためにもそれぞれの種におけるノックインの高効率化や、より詳細なゲノム情報の蓄積が求められている。

謝 辞

本稿を執筆する機会を下さった国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構の坪田拓也博士に深く感謝いたします。

引用文献

- Adelman ZN, Basu S and Myles KM (2016) Engineering pathogen resistance in mosquitoes. In: *Genetic Control of Malaria and Dengue*. pp. 277-304. Academic Press, Boston.
- Akbari OS, Bellen HJ, Bier E, Bullock SL, Burt A, Church GM, Cook KR, Duchek P, Edwards OR, Esvelt KM, Gantz VM, Golic KG, Gratz SJ, Harrison MM, Hayes KR, James AA, Kaufman TC, Knoblich J, Malik HS, Matthews KA, O'Connor-Giles KM, Parks AL, Perrimon N, Port F, Russell S, Ueda R and Wildonger J (2015) Safeguarding gene drive experiments in the laboratory. *Science* **349**: 927-929.
- Aryan A, Anderson MA, Myles KM and Adelman ZN (2013) TALEN-based gene disruption in the dengue vector *Aedes aegypti*. *PLoS One* **8**: e60082.
- Aryan A, Myles KM and Adelman ZN (2014) Targeted genome editing in *Aedes aegypti* using TALENs. *Methods* **69**: 38-45.
- Bassett AR and Liu JL (2014) CRISPR/Cas9 and genome editing in *Drosophila*. *J Genet Genomics* **41**: 7-19.
- Basu S, Aryan A, Overcash JM, Samuel GH, Anderson MA, Dahlem TJ, Myles KM and Adelman ZN (2015) Silencing of end-joining repair for efficient site-specific gene insertion after TALEN/CRISPR mutagenesis in *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**: 4038-4043.
- Bibikova M, Golic M, Golic KG and Carroll D (2002) Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics* **161**: 1169-1175.
- Billker O, Lindo V, Panico M, Etienne AE, Paxton T, Dell A, Rogers M, Sinden RE and Morris HR (1998) Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *Nature* **392**: 289-292.
- Callaway E (2017) Gene drives thwarted by emergence of resistant organisms. *Nature* **542**: 15.
- Champer J, Buchman A and Akbari OS (2016) Cheating evolution: engineering gene drives to manipulate the fate of wild populations. *Nat Rev Genet* **17**: 146-159.
- Churcher TS, Lissenden N, Griffin JT, Worrall E and Ranson H (2016) The impact of pyrethroid resistance on the efficacy and effectiveness of bednets for malaria control in Africa. *Elife* **5**: e16090.
- Cornette R and Kikawada T (2011) The induction of anhydrobiosis in the sleeping chironomid: current status of our knowledge. *IUBMB Life* **63**: 419-429.
- DeGennaro M, McBride CS, Seeholzer L, Nakagawa T, Dennis EJ, Goldman C, Jasinskiene N, James AA and Vosshall LB (2013) orco mutant mosquitoes lose strong preference for humans and are not repelled by volatile DEET. *Nature* **498**: 487-491.
- Dong S, Lin J, Held NL, Clem RJ, Passarelli AL and Franz AW (2015) Heritable CRISPR/Cas9-mediated genome editing in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *PLoS One* **10**: e0122353.
- Esvelt KM, Smidler AL, Catteruccia F and Church GM (2014) Concerning RNA-guided gene drives for the alteration of wild populations. *Elife* **3**: e03401.
- Galizi R, Doyle LA, Menichelli M, Bernardini F, Deredec A, Burt A, Stoddard BL, Windbichler N and Crisanti A (2014) A synthetic sex ratio distortion system for the control of the human malaria mosquito. *Nat Commun* **5**: 3977.

- Galizi R, Hammond A, Kyrou K, Taxiarchi C, Bernardini F, O'Loughlin SM, Papathanos PA, Nolan T, Windbichler N and Crisanti A (2016) A CRISPR-Cas9 sex-ratio distortion system for genetic control. *Sci Rep* 6: 31139.
- Gantz VM and Bier E (2015) The mutagenic chain reaction: a method for converting heterozygous to homozygous mutations. *Science* 348: 442-444.
- Gantz VM, Jasinskiene N, Tatarenkova O, Fazekas A, Macias VM, Bier E and James AA (2015) Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Proc Natl Acad Sci USA* 112: E6736-E6743.
- Gatton ML, Chitnis N, Churcher T, Donnelly MJ, Ghani AC, Godfray HC, Gould F, Hastings I, Marshall J, Ranson H, Rowland M, Shaman J and Lindsay SW (2013) The importance of mosquito behavioural adaptations to malaria control in Africa. *Evolution* 67: 1218-1230.
- Ghosh S, Tibbit C and Liu JL (2016) Effective knockdown of *Drosophila* long non-coding RNAs by CRISPR interference. *Nucleic Acids Res* 44: e84.
- Gregory M, Alphey L, Morrison NI and Shimeld SM (2016) Insect transformation with *piggyBac*: getting the number of injections just right. *Insect Mol Biol* 25: 259-271.
- Hall AB, Basu S, Jiang X, Qi Y, Timoshevskiy VA, Biedler JK, Sharakhova MV, Elahi R, Anderson MA, Chen XG, Sharakhov IV, Adelman ZN and Tu Z (2015) A male-determining factor in the mosquito *Aedes aegypti*. *Science* 348: 1268-1270.
- Hammond A, Galizi R, Kyrou K, Simoni A, Siniscalchi C, Katsanos D, Gribble M, Baker D, Marois E, Russell S, Burt A, Windbichler N, Crisanti A and Nolan T (2016) A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. *Nat Biotechnol* 34: 78-83.
- Heinze SD, Kohlbrenner T, Ippolito D, Meccariello A, Burger A, Mosimann C, Saccone G and Bopp D (2017) CRISPR-Cas9 targeted disruption of the *yellow* ortholog in the housefly identifies the *brown body* locus. *Preprint at bioRxiv*: <https://doi.org/10.1101/105023>.
- Hemingway J, Ranson H, Magill A, Kolaczinski J, Fornadel C, Gimnig J, Coetzee M, Simard F, Roch DK, Hinzoumbe CK, Pickett J, Schellenberg D, Gething P, Hoppe M and Hamon N (2016) Averting a malaria disaster: will insecticide resistance derail malaria control? *Lancet* 387: 1785-8.
- Hotez PJ, Pecoul B, Rijal S, Boehme C, Aksoy S, Malecela M, Tapia-Conyer R and Reeder JC (2016) Eliminating the neglected tropical diseases: translational science and new technologies. *PLoS Negl Trop Dis* 10: e0003895.
- Huang Y, Liu Z and Rong YS (2016) Genome editing: from *Drosophila* to non-model insects and beyond. *J Genet Genomics* 43: 263-272.
- Isaacs AT, Jasinskiene N, Tretiakov M, Thiery I, Zettor A, Bourgouin C and James AA (2012) Transgenic *Anopheles stephensi* coexpressing single-chain antibodies resist *Plasmodium falciparum* development. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: E1922-E1930.
- Itokawa K, Komagata O, Kasai S, Ogawa K and Tomita T (2016) Testing the causality between *CYP9M10* and pyrethroid resistance using the TALEN and CRISPR/Cas9 technologies. *Sci Rep* 6: 24652.
- Kane NS, Vora M, Varre KJ and Padgett RW (2017) Efficient screening of CRISPR/Cas9-induced events in *Drosophila* using a Co-CRISPR strategy. *G3 (Bethesda)* 7: 87-93.
- Kistler KE, Vossall LB and Matthews BJ (2015) Genome engineering with CRISPR-Cas9 in the mosquito *Aedes aegypti*. *Cell Rep* 11: 51-60.
- 河本夏雄 (2017) ゲノム編集昆虫の安全性評価と規制の可能性. 蚕糸・昆虫バイオテック 86: 125-133.
- Kondo S and Ueda R (2013) Highly improved gene targeting by germline-specific Cas9 expression in *Drosophila*. *Genetics* 195: 715-721.
- Liesch J, Bellani LL and Vossall LB (2013) Functional and genetic characterization of neuropeptide Y-like receptors in *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis* 7: e2486.
- Lin S, Ewen-Campen B, Ni X, Housden BE and Perrimon N (2015) In vivo transcriptional activation using CRISPR/Cas9 in *Drosophila*. *Genetics* 201: 433-442.
- McMeniman CJ, Corfas RA, Matthews BJ, Ritchie SA and Vossall LB (2014) Multimodal integration of carbon dioxide and other sensory cues drives mosquito attraction to humans. *Cell* 156: 1060-1071.
- Meccariello A, Monti S, Romanelli A, Colonna R, Primo P, Inghilterra MG, Del Corsano G, Ramaglia A, Iazzetti G, Chiarore A, Patti F, Heinze SD, Salvemini M, Lindsay H, Chiavacci E, Burger A, Robinson M, Mosimann C, Bopp D and Saccone G (2017) Highly efficient DNA-free gene disruption in the agricultural pest *Ceratitis capitata* by CRISPR-Cas9 RNPs. *Preprint at bioRxiv*: <https://doi.org/10.1101/127506>.
- Miles A, Harding NJ, Botta G, Clarkson C, Antao T, Kozak K, Schrider D, Kern A, Redmond S, Sharakhov I, Pearson R, Bergey C, Fontaine M, Troco A, Diabate A, Costantini C, Rohatgi K, Elissa N, Coulibaly B, Dinis J, Midega J, Mbogo C, Mawejje H, Stalker J, Rockett K, Drury E, Mead D, Jeffreys A, Hubbard C, Rowlands K, Isaacs A, Jyothi D, Malangone C, Vauterin P, Jeffrey B, Wright I, Hart L, Kluczynski K, Cornelius V, MacInnis B, Henrichs C, Giacomantonio R, Ayala D, Bejon P, Besansky N, Burt A, Caputo B, della Torre A, Godfray C, Hahn M, Neafsey D, O'Loughlin S, Pinto J, Riehle M, Vernick K, Weetman D, Wilding C, White B, Lawniczak M, Donnelly M and Kwiatkowski D (2016) Natural diversity of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Preprint at bioRxiv*: <https://doi.org/10.1101/096289>.
- Misof B, Liu S, Meusemann K, Peters RS, Donath A, Mayer C, Frandsen PB, Ware J, Flouri T, Beutel RG, Niehuis O, Petersen M, Izquierdo-Carrasco F, Wappler T, Rust J, Aberer AJ, Aspöck U, Aspöck H, Bartel D, Blanke A, Berger S, Böhm A, Buckley TR, Calcott B, Chen J, Friedrich F, Fukui M, Fujita M, Greve C, Grobe P, Gu S, Huang Y, Jermini LS, Kawahara AY, Krogmann L, Kubiak M, Lanfear R, Letsch H, Li Y, Li Z, Li J, Lu H, Machida R, Mashimo Y, Kapli P, McKenna DD, Meng G, Nakagaki Y, Navarrete-Heredia JL, Ott M, Ou Y, Pass G, Podsiadlowski L, Pohl H, von Reumont BM, Schütte K, Sekiya K, Shimizu S, Slipinski A, Stamatakis A, Song W, Su X, Szucsich NU, Tan M, Tan X, Tang M, Tang J, Timelthaler G, Tomizuka S, Trautwein M, Tong X, Uchifune T, Walz MG, Wiegmann BM, Wilbrandt J, Wipfler B, Wong TK, Wu Q, Wu G, Xie Y, Yang S, Yang Q, Yeates DK, Yoshizawa K, Zhang Q, Zhang R, Zhang W, Zhang Y, Zhao J, Zhou C, Zhou L, Ziesmann T, Zou S, Li Y, Xu X,

- Zhang Y, Yang H, Wang J, Wang J, Kjer KM and Zhou X (2014) Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science* **346**: 763-767.
- Nakade S, Tsubota T, Sakane Y, Kume S, Sakamoto N, Obara M, Daimon T, Sezutsu H, Yamamoto T, Sakuma T and Suzuki KT (2014) Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9. *Nat Commun* **5**: 5560.
- Reid W and O'Brochta DA (2016) Applications of genome editing in insects. *Curr Opin Insect Sci* **13**: 43-54.
- Smidler AL, Terenzi O, Soichot J, Levashina EA and Marois E (2013) Targeted mutagenesis in the malaria mosquito using TALE nucleases. *PLoS One* **8**: e74511.
- Sogame Y, Okada J, Kikuta S, Miyata Y, Cornette R, Gusev O and Kikawada T (2017) Establishment of gene transfer and gene silencing methods in a desiccation-tolerant cell line, Pv11. *Extremophiles* **21**: 65-72.
- Sumitani M, Kasashima K, Yamamoto DS, Yagi K, Yuda M, Matsuoka H and Yoshida S (2013) Reduction of malaria transmission by transgenic mosquitoes expressing an antisporeozoite antibody in their salivary glands. *Insect Mol Biol* **22**: 41-51.
- Taning CN, Van Eynde B, Yu N, Ma S and Smagghe G (2017) CRISPR/Cas9 in insects: applications, best practices and bio-safety concerns. *J Insect Physiol* **98**: 245-257.
- Xu J, Ren X, Sun J, Wang X, Qiao HH, Xu BW, Liu LP and Ni JQ (2015) A toolkit of CRISPR-based genome editing systems in *Drosophila*. *J Genet Genomics* **42**: 141-149.
- Xue Z, Wu M, Wen K, Ren M, Long L, Zhang X and Gao G (2014) CRISPR/Cas9 mediates efficient conditional mutagenesis in *Drosophila*. *G3 (Bethesda)* **4**: 2167-2173.
- Yamamoto DS, Sumitani M, Kasashima K, Sezutsu H and Matsuoka H (2016) Inhibition of malaria infection in transgenic anopheline mosquitoes lacking salivary gland cells. *PLoS Pathog* **12**: e1005872.
- Yoshida S, Shimada Y, Kondoh D, Kouzuma Y, Ghosh AK, Jacobs-Lorena M and Sinden RE (2007) Hemolytic C-type lectin CEL-III from sea cucumber expressed in transgenic mosquitoes impairs malaria parasite development. *PLoS Pathog* **3**: e192.
- Zamanian M and Andersen EC (2016) Prospects and challenges of CRISPR/Cas genome editing for the study and control of neglected vector-borne nematode diseases. *FEBS J* **283**: 3204-3221.
- Zhang Y, Zhao B, Roy S, Saha TT, Kokoza VA, Li M and Raikhel AS (2016) microRNA-309 targets the Homeobox gene *SIX4* and controls ovarian development in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci USA* **113**: E4828-E4836.