

ハチ目(膜翅目)とコウチュウ目(鞘翅目)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	畠山,正統 千頭,康彦 新美,輝幸
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. 115-124
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」

ハチ目(膜翅目)とコウチュウ目(鞘翅目) におけるゲノム編集研究

畠山 正統^{1,*}・千頭 康彦²・新美 輝幸^{3,**}

¹ 農業・食品産業技術総合研究機構

² 総合研究大学院大学 生命科学研究科 (自然科学研究機構 基礎生物学研究所)

³ 自然科学研究機構 基礎生物学研究所・総合研究大学院大学 生命科学研究科

1. はじめに

ハチ目とコウチュウ目は、完全変態昆虫のなかで系統的に祖先的なグループに位置し (Misof et al., 2014), 不完全変態から完全変態への進化を考察するうえで重要な昆虫目として認識されている。加えて、いずれの目にも農業に深く関わる多くの種が含まれる。ハチ目にはハナバチ類に代表される受粉媒介昆虫や天敵寄生蜂などの有用種や、栽培・園芸作物や森林の害虫であるハバチ類が属している。また、コウチュウ目には捕食性天敵のテントウムシ類などの有用種や、作物や貯蔵穀物を食害する害虫が属している。これらのなかには実験昆虫として開発され、RNA 干渉 (RNA interference: RNAi) や遺伝子組換えなどの遺伝子操作技術を利用して、遺伝子機能の解析が進められているものも多い。さらに、次世代シーケンサーの登場は、実験昆虫だけでなく、一般 (普通) の昆虫でもゲノム情報やトランスクリプトーム情報の取得を容易にし、遺伝子機能の解析に大きく貢献している。

しかし、これまで昆虫に活用されてきた RNAi や遺伝子組換えは、非常に強力な遺伝子操作技術ではあるが、

同時にいくつかの制約もあった。たとえば、RNAi による遺伝子機能阻害 (ノックダウン) は、その効果が一過的だったり不完全だったり、あるいは、種によってはそもそも効果がみられない場合もある。また、トランスポゾンベクターを利用した遺伝子組換えでは、ゲノム内の狙ったところに目的遺伝子を導入できるわけではない。このような背景から、特集の冒頭記事にもあるように、近年急速な進展を見せている、ZFN (zinc finger nuclease), TALEN (transcription activator-like effector nuclease), CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein 9) といった部位特異的ヌクレアーゼを利用したゲノム編集技術が注目されている (Chen et al., 2014; Boettcher and McManus, 2015; Yamamoto, 2015)。なかでも、CRISPR/Cas9 システムは、精度、簡易性、汎用性、応用の拡張性、さらに経済性に優れ、さまざまな生物種でのさらなる技術開発と知見の蓄積が見込まれることから、昆虫への利用が拡大することは間違いない (Doench, 2016; Taniguchi et al., 2017)。ゲノム編集の効果、すなわち DNA の切断と修復は細胞核内で起きるイベントなので、初期胚発生の様式が表割とよばれる細胞分裂を伴わない核分裂のみである昆虫では、卵細胞あるいは核分裂期の初期胚 (多核性胞胚) に核酸やタンパク質を注入さえできれば、理論的にはどんな種でもゲノム編集は可能と思われる。また、昆虫でのゲノム編集には、ノックアウトやノックインなどを利用した変異誘導による遺伝子の機能解析だけでなく、遺伝子機能の改変による害虫の防除や有用昆虫の機能強化などについての応用も期待されている。

ここでは、多くの農業関連昆虫が属するハチ目とコウチュウ目で進められているゲノム編集について解説する。

*〒305-8634 茨城県つくば市大わし 1-2
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 先進昆虫ゲノム改変ユニット
E-mail: sawfly@affrc.go.jp
Tel/Fax: 029-838-6096

**〒444-8585 愛知県岡崎市明大寺町字西郷中 38
大学共同利用機関法人 自然科学研究機構
基礎生物学研究所 進化発生研究部門
E-mail: niimi@nibb.ac.jp
Tel/Fax: 0564-55-7606

表 1. ハチ目およびコウチュウ目の「準モデル昆虫」におけるゲノム情報と遺伝子操作技術

	全ゲノム情報	RNAi	遺伝子組換え	ゲノム編集
ハチ目				
カブラハバチ (<i>Athalia rosae</i>)	解読・公開 NCBI BioProjects: PRJNA282653, PRJNA167403	効果的 Sumitani et al. (2005); Yoshiyama et al. (2013)	<i>piggyBac</i> : Sumitani et al. (2003)	TALENs: Hatakeyama et al. (2016) CRISPR/Cas9: Hatakeyama & Sumitani (2016)
セイヨウミツバチ (<i>Apis mellifera</i>)	解読・公開 NCBI BioProjects: PRJNA10625 The Honeybee Genome Sequencing Consortium (2006)	限定的 Beye et al. (2002); Amdam et al. (2003); Jarosch & Moritz (2011)	<i>piggyBac</i> : Schulte et al. (2014)	CRISPR/Cas9: Kohno et al. (2016)
キョウソヤドリコバチ (<i>Nasonia vitripennis</i>)	解読・公開 NCBI BioProjects: PRJNA20073, PRJNA13660 Werren et al. (2010)	効果的 Lynch & Desplan (2006); Werren et al. (2009)		CRISPR/Cas9: Li et al. (2017)
コウチュウ目				
ナミテントウ (<i>Harmonia axyridis</i>)	ほぼ解読・未公開	効果的 Niimi et al. (2005); Kuwayama et al. (2006)	<i>piggyBac</i> : Kuwayama et al. (2006, 2014)	TALENs: Hatakeyama et al. (2016)
コクヌストモドキ (<i>Tribolium castaneum</i>)	解読・公開 NCBI BioProjects: PRJNA15718, PRJNA12540 Tribolium Genome Sequenc- ing Consortium (2008)	効果的 Bucher et al. (2002); Tomoyasu & Denell (2004)	<i>piggyBac</i> , <i>mariner</i> , <i>Minos</i> , <i>Hermes</i> : Berghammer et al. (1999); Lorenzen et al. (2003); Pavlopoulos et al. (2004)	CRISPR/Cas9: Gilles et al. (2015)

2. ハチ目のゲノム編集研究の現状

ハチ目は、ハバチ類が属する祖先的な広腰亜目 (Symphyta), すなわち完全変態昆虫でもっとも祖先的なグループと、寄生性や社会性を有するものを含む派生的な細腰亜目 (Apocrita) のふたつの亜目で構成される。これらのグループを代表する実験昆虫のうち、広腰亜目のカブラハバチ (*Athalia rosae*, ハバチ上科ハバチ科), 細腰亜目に属する寄生蜂のキョウソヤドリコバチ (*Nasonia vitripennis*, コバチ上科コガネコバチ科), セイヨウミツバチ (*Apis mellifera*, ミツバチ上科ミツバチ科) は、いずれも全ゲノム配列が解読・公開され、RNAi 法やトランスポゾンを利用した遺伝子組換え技術などの遺伝子機能解析ツールの開発が進んでいる「準モデル昆虫」である (畠山ら, 2006; Hatakeyama et al., 2009; Werren and Loehlin, 2009; Lynch, 2015; Evans et al., 2013) (表 1)。これらの 3 種では実験昆虫として確立されてきた背景を生かし、ゲノム編集技術の開発も進んでいる。

カブラハバチでは、ハチ目昆虫ではじめて TALEN を利用した遺伝子ノックアウトに成功している (Hatakeyama et al., 2016)。ハチ目昆虫の特徴は特有の生殖様式 (半数一倍数性) で、通常、受精卵からは二倍体の雌を、未受精卵からは半数体の雄を生じる (Crozier, 1977)。つま

り、遺伝子に生じた変異が可視的に検出できる形質であれば、たとえそれが劣性形質であっても、半数体の雄には表現型として現れる。したがって、このような形質の遺伝子を標的にすれば、注入当代 (G0) の半数体雄で、遺伝子に変異 (破壊) が生じた細胞がモザイク状に検出されるため (体細胞モザイク), 遺伝子ノックアウト効果を容易に確認することができる。そこでカブラハバチではゲノム編集効果の検証に、眼特異的に緑色蛍光タンパク質 (*EGFP*) 遺伝子を発現する遺伝子組換え系統を利用した。EGFP の発色団に相当する遺伝子配列を標的に作製した TALEN の mRNA (いずれも 500 ng/μl) を未受精卵に顕微注入すると (図 1), G0 世代で体細胞モザイク個体が出現した (図 2A)。カブラハバチの卵は外見上、前後と背腹を区別することができ、卵核は前部背側に位置し、細胞性胚期には胚後端に将来の生殖細胞となる極細胞が形成される (Nakao et al., 2006)。生殖細胞系列に変異を導入する場合には極細胞が形成される周辺、つまりカブラハバチでは後端、に注入することが一般的であるが、ここで標的にした *EGFP* 遺伝子は前部の頭部に形成される眼で特異的に発現することから、前端からの注入も行なって結果を比較している。予想通り、G0 世代での体細胞モザイク個体出現率は、前端からの注入の場合が約 63% で、後端注入 (約 15%) より高い。これ

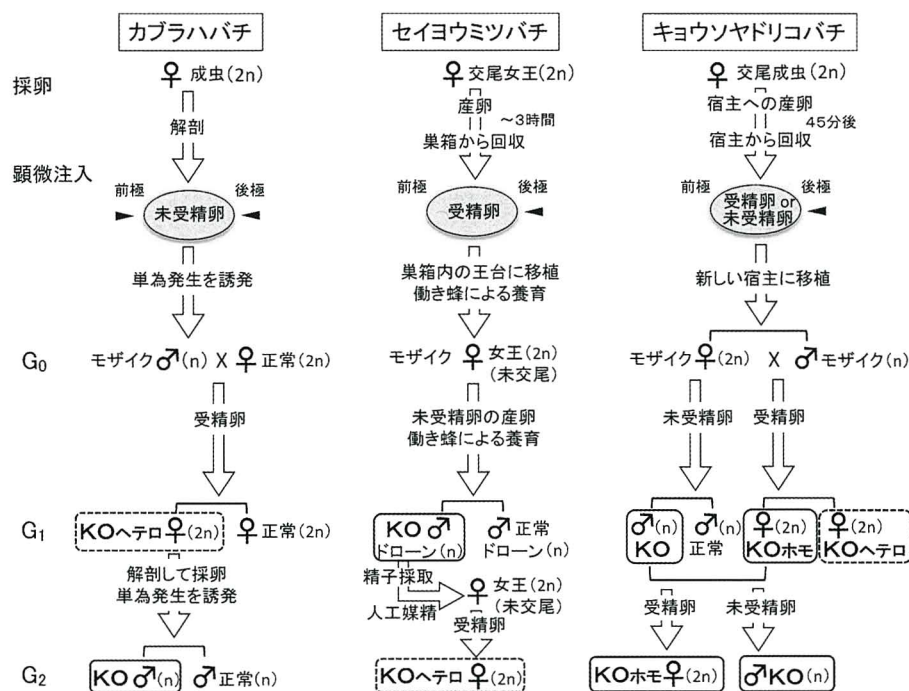


図 1. ハチ目昆虫のゲノム編集実験の概略図

カブラハバチではまず成虫雌から採取した未受精卵に顕微注入し、得られた G0 (半数体) 雄を野生型雌と交配して後代を得る。ミツバチでは女王に産卵させた受精卵に顕微注入し、巣箱に戻して G0 女王として生育させる。未交尾の G0 女王に未受精卵を産卵させ、ドローン (G1) として生育させる。Kohno et al. (2016) ではこれ以後の世代は得られていないが、ドローンから採取した精子を用いて人工媒精を行えば、後代の女王を得ることが可能。キョウソヤドリコバチでは、宿主のニクバエから卵 (初期胚) を回収して顕微注入し、再び宿主に戻して生育させて G0 雌雄個体を得る。これらをさまざまな組み合わせで交配して後代を得る。矢尻はゲノム編集用のコンストラクトを顕微注入する位置。実線で囲んだ個体はノックアウトホモあるいはノックアウトヘミ。破線で囲んだ個体はノックアウトヘテロ。

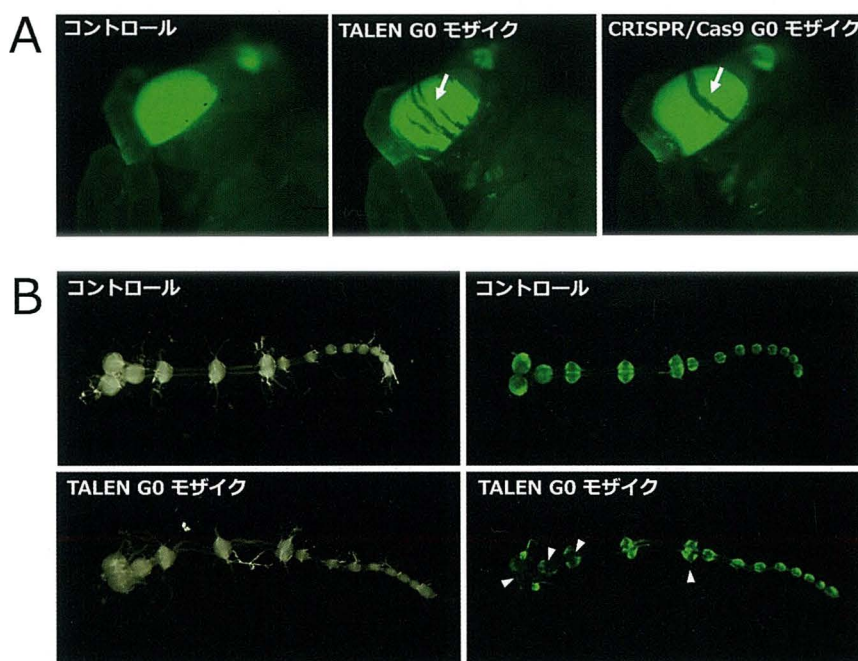


図 2. カブラハバチとナミテントウの体細胞モザイク個体 (G0 世代) の表現型

(A) カブラハバチの眼特異的に EGFP 遺伝子を発現する遺伝子組換え系統 (コントロール) では眼全体で EGFP が発色している (左)。EGFP 遺伝子を標的にした TALEN (中) あるいは CRISPR/Cas9 (右) による変異導入によって生じた G0 体細胞モザイク個体。黒く EGFP が検出できない部分 (矢印) は EGFP 遺伝子が破壊された細胞に由来する。(B) ナミテントウの EGFP 遺伝子を発現する遺伝子組換え系統 (コントロール) では中枢神経全体で EGFP が検出される (右上)。一方、TALEN mRNA を顕微注入した G0 世代では中枢神経の一部で EGFP の発色が見られず (矢印), 体細胞モザイク個体となった (右下)。明視野像 (左上下)。

表 2. ハチ目およびコウチュウ目の「準モデル昆虫」におけるゲノム編集効率と遺伝子組換え効率の比較

	ゲノム編集（ノックアウト）効率	遺伝子組換え効率
ハチ目		
カブラハバチ (<i>Athalia rosae</i>)	TALENs : 17.9% CRISPR/Cas9 : 10.5%	<i>piggyBac</i> : 5.3%
セイヨウミツバチ (<i>Apis mellifera</i>)	CRISPR/Cas9 : 50%* ¹	<i>piggyBac</i> : 4 ~ 43%
キョウソヤドリコバチ (<i>Nasonia vitripennis</i>)	CRISPR/Cas9 : 約 20%* ²	
コウチュウ目		
ナミテントウ (<i>Harmonia axyridis</i>)	TALENs : 20.8%	<i>piggyBac</i> : ~ 3.7%
コクヌストモドキ (<i>Tribolium castaneum</i>)	CRISPR/Cas9 : 71 ~ 100%	<i>piggyBac</i> : 22 ~ 56% <i>mariner</i> : 4% <i>Minos</i> : ~ 32.4% <i>Hermes</i> : 50%

*¹Kohno et al. (2016) より推定*²Li et al. (2017) より推定

らの体細胞モザイク個体の生殖細胞には *EGFP* 遺伝子が破壊された細胞も混じっており、その次世代 (G1) では *EGFP* 遺伝子は保持しているものの *EGFP* が検出されない、つまり *EGFP* 遺伝子ノックアウト個体が得られた (図 1)。表現型で体細胞モザイクを確認できない G0 個体も全て含め、子孫を残せた G0 個体の約 18% から *EGFP* 遺伝子がノックアウトされた個体が得られた (表 2)。この割合は、トランスポゾンを利用した遺伝子組換えの効率 (約 5%, Sumitani et al., 2003) よりも高い。*EGFP* 遺伝子ノックアウト個体が保持している *EGFP* 遺伝子の標的領域には、DNA 切断と修復の結果生じたさまざまな長さの塩基の欠失がみられ、転写産物からは発色団のアミノ酸を欠いたタンパク質や、フレームシフトにより機能を持たないタンパク質しか合成できない。また、これらの塩基欠失パターンから、マイクロホモロジー依存型の非同源性末端結合による修復が行われていることが示唆された (図 3)。

さらに、カブラハバチでは CRISPR/Cas9 システムも有効である (Hatakeyama and Sumitani, 2016)。TALEN の場合と同様に、*EGFP* の発色団を標的にして、今度は single-guide RNA (sgRNA) を作製し、RNA 誘導型ヌクレアーゼ Cas9 をコードする mRNA (いずれも 1 µg/µl) とともに *EGFP* 遺伝子組換えシステムの未受精卵に顕微注入した (図 1)。今のところ実験個体数は少ないものの、G0 世代の生存個体の約半数が体細胞モザイクとなり (図 2A)、G1 世代には *EGFP* 遺伝子は保持しながら *EGFP* が検出されない変異個体が出現した。標的にした *EGFP* 遺伝子領域の配列を調べると、PAM (protospacer adjacent motif)

配列の上流 3 ~ 4 塩基目に切断が生じており、その後の修復時に数塩基が挿入されたと考えられる。いずれの場合も *EGFP* 発色団をコードする配列付近に偶数塩基が挿入されていることから、遺伝子産物はフレームシフトにより機能を持たないタンパク質だと推測された (図 3)。すべての G0 個体のおよそ 1 割から *EGFP* 遺伝子がノックアウトされた子孫が得られている (表 2)。このように、カブラハバチでは、TALEN と CRISPR/Cas9 のいずれも遺伝子ノックアウトによる変異導入に有効であるが、現時点では相同組換え型修復機構を利用した外来遺伝子の挿入 (遺伝子ノックイン) には至っていない。

セイヨウミツバチは、ポリネーターとして重要であることは言うまでもなく、社会性行動における神経制御や分子機構を研究するためのモデル生物でもある (Kubo, 2012)。しかし、昆虫では最も簡便な遺伝子機能解析法である RNAi による遺伝子ノックダウンの効果が限定的であることなどから (Jarosch and Moritz, 2011)、遺伝子機能解析のツールが渴望されていた。このような背景から、セイヨウミツバチでは CRISPR/Cas9 システムを利用し、主要ロイヤルゼリータンパク質 (*major royal jelly protein 1: MRJP 1*) 遺伝子のノックアウトに成功している (Kohno et al., 2016)。*MRJP 1* 遺伝子は発現様式が明らかで、発生や生育には必須ではないと推測されるので (Drapeau et al., 2006; Kohno et al., 2016)、遺伝子ノックアウトの成否を調べるための標的候補遺伝子としては申し分ない。*MRJP 1* 遺伝子は第 2 エクソンの 5' 末端付近に翻訳開始点があり、その近傍にある PAM 配列を利用して sgRNA を作製し、Cas9 mRNA とともに産下後 3 時間

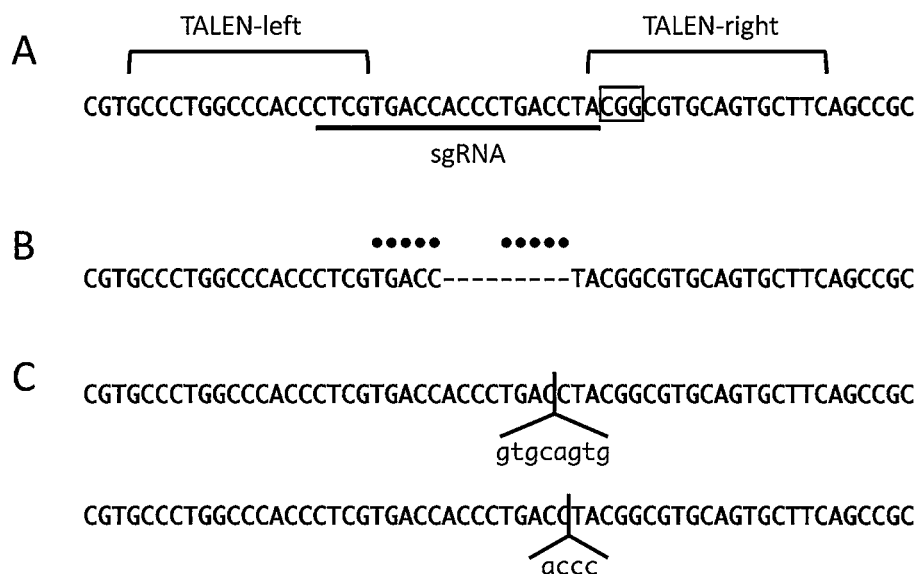


図3. カブラハバチおよびナミテントウのノックアウト個体に生じた標的配列の変異
(A) 標的にした *EGFP* 遺伝子の配列。TALEN の mRNA に対応する配列をクランプ、CRISPR/Cas9 システムの sgRNA に対応する配列を下線で示す。四角で囲んだ塩基が PAM 配列。(B) TALEN を用いて得られたカブラハバチおよびナミテントウの *EGFP* 遺伝子ノックアウト個体に高頻度で生じた欠失。上点はマイクロホモロジー配列を示す。(C) CRISPR/Cas9 システムを用いて得られた、カブラハバチの *EGFP* 遺伝子ノックアウト個体の標的領域の挿入変異。

の（受精）卵の後端に注入した（図1）。セイヨウミツバチでは巣箱外での人工飼養によって女王を得ることが難しいため、孵化した幼虫は巣箱の王台に戻して働き蜂に養育してもらわなければならない。また、*MRJP 1* 遺伝子に生じた変異は体細胞モザイクとして検出できないので、G0 女王には未受精卵を産ませて巣箱の中で養育し、生育した G1 世代の半数体の雄（ドローン）の *MRJP 1* 遺伝子領域の配列を確認する必要がある。子孫を残せた2個体の G0 女王のうち1個体から、*MRJP 1* 遺伝子がノックアウトされた複数の G1 ドローンが得られている。*MRJP 1* 遺伝子の標的配列には、塩基の欠失や修復時に生じた数塩基の挿入が検出され、推測される遺伝子産物はいずれも機能を持たないと考えられる。Kohno et al. (2016) は、得られた G1 ドローンのうち *MRJP 1* 遺伝子が破壊されていた個体の割合（20/161, 12.4%）を遺伝子ノックアウトの効率としているが、この一連の実験では数は少ないものの、半数の G0 女王の生殖細胞系列にノックアウト効果が生じていることから、CRISPR/Cas9 システムは効果的な変異導入法であるといえる。このように、セイヨウミツバチでは CRISPR/Cas9 を利用した遺伝子ノックアウトによる変異導入ができることがわかったが、残念ながらこの実験では、全ての G1 ドローンが働き蜂によって巣箱から排除され、ノックアウト個体の系統化や遺伝子機能解析はできていない。この点は社会性昆虫における遺伝子操作個体の系統維持の難しいところである。しかし、養蜂では人工媒精法が確立され

ており、これらの遺伝子ノックアウトドローンの精子を使って受精卵、すなわち女王や働き蜂を得ることが可能なので、今後はノックアウト個体の系統化も期待される。

ごく最近になって、キョウソヤドリコバチでも CRISPR/Cas9 システムを導入し、変異を可視的に検出できる、眼色の合成に必要なキヌレニン-3-モノオキシゲナーゼ (kynurenine-3-monooxygenase: kmo) をコードする *cinna-bar (cn)* 遺伝子をノックアウトした例が報告された (Li et al., 2017)。キョウソヤドリコバチはニクバエ (*Sarcophaga bullata*) などハエ目の幼虫を宿主とする寄生蜂で、生物農薬としても利用される有用種である。Li et al. (2017) はまず、その寄生性のためにこれまで制約があった、核酸やタンパク質の注入のための卵（初期胚）の宿主からの取り出しと、注射後に再び宿主に戻して生育させる方法を確立し、70% 以上の生存率で卵（初期胚）への顕微注入を可能にした。sgRNA 作製の標的配列として *cn* 遺伝子の第3エクソンの2カ所と第4エクソンの1カ所を設定し、Cas9 タンパク質とともに産下後45分の卵（初期胚）の後端に注入して変異導入を誘発している（図1）。*cn* 遺伝子に変異が生じると、通常黒色の眼色が赤褐色になるので、G0 成虫の眼色の表現型で体細胞モザイク個体を選抜することができる。まず、ひとつの sgRNA を使って、さまざまな濃度の sgRNA と Cas9 タンパク質の組み合わせ（20 ~ 320 ng/μl）で注入したところ、その濃度依存的に G0 成虫での体細胞モザイク個体の出現率が上昇（0 ~ 60%）する一方、生存率は低

下 (70 ~ 20%) することから、生存率と体細胞モザイク個体の出現率を考慮して注入条件を決定した (いずれも 160 ng/μl, 生存率: 約 40%, 体細胞モザイク出現率: 約 20%)。この条件で注入個体数を増やしたところ, G0 成虫の生存率はどの sgRNA を使っても 25% 前後であるのに対し, 体細胞モザイク出現率は標的にした sgRNA の位置によって異なる (10 ~ 36%) ことから, 複数の標的 sgRNA 配列を設計することが推奨されている。得られた G0 世代の体細胞モザイクの雌雄成虫は, いくつかの組み合わせで交配して子孫を得ることにより, *cn* 遺伝子に変異が導入された個体の系統化ができています。体細胞モザイクの G0 雌雄同士, 体細胞モザイクの G0 雄と野生型雌, 体細胞モザイクの G0 雌と野生型雄の交配に加え, 未交尾の体細胞モザイクの G0 雌の単為発生卵から G1 世代を産出し, その後さらに同胞交配 (兄妹交配) や変異個体同士の交配によって G3 世代には変異体系統を確立できる。G2 世代の変異個体の *cn* 遺伝子領域の塩基配列を調べると, PAM 配列の上流に 1 ~ 27 塩基の欠失と, ごくまれに修復時に生じたと考えられる数塩基の挿入が検出され, これら全ての場合で遺伝子産物には機能がなないと推測されている。キョウソヤドリコバチの場合は, 体細胞モザイクの G0 雌から単為発生によって生じた G1 半数体雄は, 非常に高い確率で変異が導入されていることから, 体細胞モザイクの G0 雌のいずれの相同染色体にも変異が導入されていた可能性が高い。Li et al. (2017) は全 G0 個体のうち *cn* 遺伝子がノックアウトされた子孫を残せた個体の割合については言及していないが, ほぼ全ての体細胞モザイク個体 (全 G0 個体の約 20%) から *cn* 遺伝子ノックアウト個体が生じたと考えられ, その割合は全 G0 個体のおよそ 20% と推定される。キョウソヤドリコバチにおいても, CRISPR/Cas9 は効率的に遺伝子ノックアウト変異を導入できるシステムであることがわかる。

このように, ハチ目昆虫の「準モデル種」では, TALEN や CRISPR/Cas9 のゲノム編集ツールにより効率的に遺伝子ノックアウトによる変異を導入できることが明らかになってきた。社会性や寄生性など特殊な生活環をもっている卵 (初期胚) の採取, 顕微注入と注入後の飼育ができれば, 種を問わずゲノム編集の敷居は高くないと思われる。いまのところ, カイコ, ハマダラカ, コクヌストモドキ, あるいはフタホシコオロギといった他の昆虫目の準モデル種のように遺伝子ノックインによる変異の導入はできていないが, 近い将来, 相同組換え型修復機構を利用した任意の遺伝子の導入はできそうである。また, ゲノム編集の成否を確認するために, まずは

可視的に変異を検出できるマーカー遺伝子が標的に利用されているが, 本来標的とする遺伝子の変異が必ずしも表現型で検出できるとは限らず, むしろ検出できない場合の方が多いと思われる。標的とする遺伝子に応じて, 変異個体の選抜をより簡便にするような標的配列の検討などが必要であろう。

3. コウチュウ目のゲノム編集の現状

コウチュウ目の形態的な特徴は, 前翅が硬化した鞘翅に変化していることであり, 約 38 万種 (全動物種の約 25%) が記載された種数にも多様性にも富む昆虫目である (Brusca et al., 2016)。コウチュウ目は始原亜目 (Archostemata), 食肉亜目 (Adephaga), 粘食亜目 (Myxophaga), 多食亜目 (Polyphaga) の 4 亜目から構成される。最大グループである多食亜目には, コウチュウ目のモデル種であるコクヌストモドキ (*Tribolium castaneum*, ゴミムシダマシ上科ゴミムシダマシ科) やカブトムシ (*Trypoxylus dichotomus*, コガネムシ上科コガネムシ科), ナミテントウ (*Harmonia axyridis*, ヒラタムシ上科テントウムシ科) などが含まれる。コクヌストモドキでは全ゲノム配列が解読されており (*Tribolium* Genome Sequencing Consortium, 2008), カブトムシとナミテントウについてはゲノム配列のほぼ全てが解読されている (新美ら, 未発表)。また, コクヌストモドキとナミテントウでは RNAi や遺伝子組換えなどの遺伝子機能解析ツールの開発が進んでいる (表 1) (Berghammer et al., 1999; Bucher et al., 2002; Lorenzen et al., 2003; Tomoyasu and Denell, 2004; Pavlopoulos et al., 2004; Niimi et al., 2005; 新美ら, 2006; Kuwayama et al., 2006, 2014; Trauner et al., 2009)。コウチュウ目では, 一般に, 初期胚, 幼虫, 蛹, あるいは成虫への二本鎖 RNA の注射による RNAi が極めて有効であるが, 遺伝子機能の阻害 (loss-of-function) による解析に限定される。ここでは, さらに遺伝子解析ツールの開発が進められ, ゲノム編集技術を利用した変異導入による遺伝子改変が可能になったコクヌストモドキとナミテントウについて解説する。

コクヌストモドキは世界的に分布する貯穀害虫で, 一世代が約 40 日と短く大量飼育が容易なため, キイロショウジョウバエに次ぐモデル昆虫のひとつとして研究が進んでいる。コクヌストモドキでは CRISPR/Cas9 システムを用いて, 遺伝子組換え系統の *EGFP* 遺伝子や内在性の遺伝子を標的にしたノックアウトやノックイン, さらに, 標的ゲノム領域の広範囲にわたる欠失の誘発と外来遺伝子の挿入に成功している (Gilles et al., 2015) (図 4)。まず, CRISPR/Cas9 システムの有効性を検証するために,

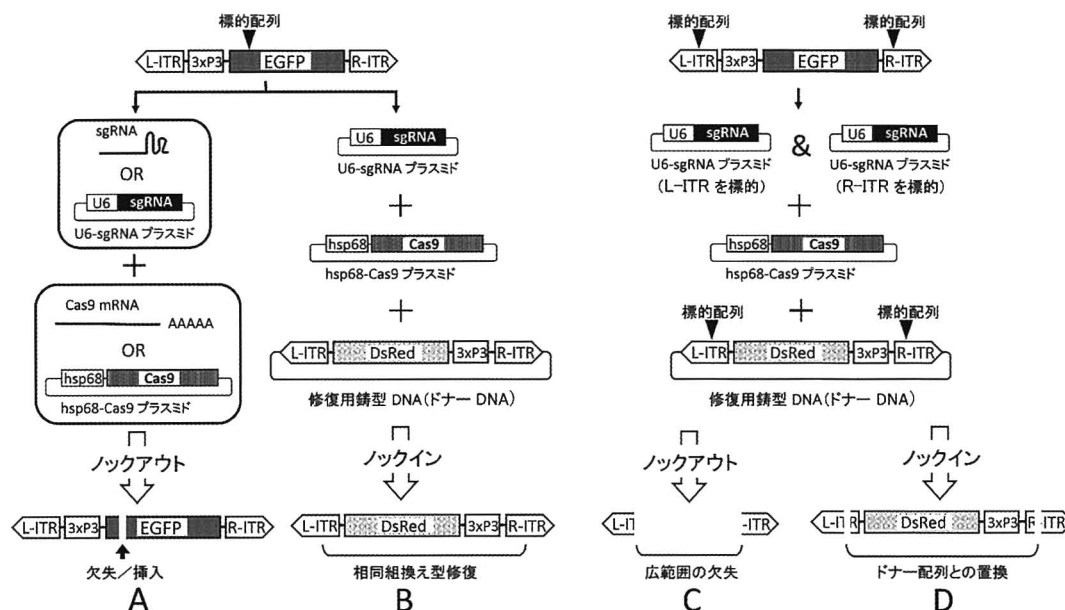


図 4. コクヌストモドキの CRISPR/Cas9 システムを利用したノックアウトおよびノックイン

(A) *in vitro* で転写した sgRNA あるいは *U6* プロモーターにより発現制御した sgRNA (*U6*-sgRNA プラスミド) と、*Cas9* mRNA あるいは *hsp68* 遺伝子プロモーターで発現制御した *Cas9* 遺伝子 (*hsp68*-*Cas9* プラスミド) を顕微注入に用いると、切断された標的配列の修復の際に欠失や挿入が生じて遺伝子が破壊される (ノックアウト)。(B) *U6*-sgRNA プラスミド、*hsp68*-*Cas9* プラスミドおよび修復用の鋳型 DNA (ドナー DNA) を同時に用いると、相同組換え型修復機構によりドナー DNA が挿入される (ノックイン)。組換え遺伝子の両端にある逆位反復配列 (L-ITR, R-ITR) の二カ所を標的にした *U6*-sgRNA プラスミドと *hsp68*-*Cas9* プラスミド、およびドナー DNA を用いると、標的配列間の広範囲にわたる欠失が誘発されたり (C)、ドナー DNA が欠失領域に挿入され、結果として標的領域の遺伝子を置換することができる (D)。

筋肉で強力に *EGFP* 遺伝子を発現する遺伝子組換え系統 (Lorenzen et al., 2003) を用いて、*EGFP* 遺伝子の 5' 末端付近の配列を標的に sgRNA を設計し、*Cas9* mRNA とともに多核性胞胚に顕微注入した。G0 個体の 70～80% は、筋肉での *EGFP* が部分的に検出されない体細胞モザイク個体で、これらの G0 個体を交配して後代を得ると、子孫を残せた個体の 71% から標的 *EGFP* 遺伝子配列に欠失をもつノックアウト G1 世代が得られている (表 2)。つぎに、sgRNA や *Cas9* の発現を制御できるコンストラクトをいくつか作製し、その組み合わせによるノックアウト効率 (ノックアウト G1 を生じる G0 個体の割合) を比較した。コクヌストモドキに内在する *U6 snRNA* 遺伝子のプロモーター (*U6*) で *EGFP* sgRNA の転写を制御するコンストラクトをもつプラスミド (*U6*-sgRNA プラスミド) と *Cas9* mRNA の組み合わせ (*U6*-sgRNA/*Cas9* mRNA) と、*U6*-sgRNA プラスミドとコクヌストモドキの *heat shock protein 68* (*hsp68*) 遺伝子のコアプロモーターで *Cas9* の発現を制御するコンストラクトをもつプラスミド (*hsp68*-*Cas9*) の組み合わせ (*U6*-sgRNA/*hsp68*-*Cas9*) をそれぞれ多核性胞胚に顕微注入した。その結果、*U6*-sgRNA/*Cas9* mRNA の組み合わせでは G0 での体細胞モザイク出現率は約 78% で、G1 世代のノックアウト効率は 90% 以上となった。*U6*-sgRNA/*hsp68*-*Cas9* の組み

合わせでは G0 での体細胞モザイク出現率は 62% で、ノックアウト効率は 83% となった (表 2)。また、内在性の *E-cadherin* 遺伝子と *twist* 遺伝子を標的にして、それぞれの sgRNA を *U6* プロモーターで制御するコンストラクトと *hsp68*-*Cas9* の組み合わせを用いてノックアウト変異を誘発すると、いずれの遺伝子を標的にした場合にも、遺伝子機能を失ったと推測される表現型をもつ G0 個体が出現した。これらの G0 個体は、胚発生途中で致死となるので、後代を得られないが、標的にした配列には欠失や挿入が生じていることが確認された。このように、コクヌストモドキでは、sgRNA や *Cas9* の導入法にかかわらず、CRISPR/*Cas9* システムはノックアウト変異の導入に有効である。さらに、*U6*-sgRNA/*hsp68*-*Cas9* の組み合わせでノックアウト変異を誘発する際に、標的配列近傍の上流および下流と相同性の高い配列をもった修復用の鋳型 DNA (ドナー DNA) を同時に注入することで、遺伝子ノックインにも成功している (図 4B)。この一連の実験に用いられた遺伝子組換え系統は、*piggyBac* ベクターを利用して *EGFP* 遺伝子を導入しているので、*EGFP* 遺伝子の両端には逆位反復配列がある。そこで、逆位反復配列と相同な配列を両末端にもつ赤色蛍光タンパク質 (*DsRed*) 遺伝子をドナー DNA に用いた。その結果、G0 個体の 55% は *EGFP* が検出されないモザ

イク個体で、14%はDsRedが検出されるモザイク個体となった。子孫検定の結果、G0個体の73%からEGFP遺伝子がノックアウトされたG1世代が、6%からDsRed遺伝子がノックインされたG1世代が生じている。DsRed遺伝子ノックインG1個体の標的領域では、逆位反復配列を含むDsRed遺伝子の配列が継ぎ目なく挿入されており、Cas9により切断されたEGFP遺伝子の修復過程で、相同組換え型修復機構によりドナーのDsRed遺伝子が挿入されたことが確認されている。このように、CRISPR/Cas9システムを利用し、相同組換え型修復機構による遺伝子ノックインができることから、広範囲のゲノム領域に欠失を誘導し、そこに外来遺伝子を挿入することも可能になっている(図4C, D)。EGFP遺伝子両端の逆位反復配列をそれぞれ標的にしたsgRNAとhsp68-Cas9によってゲノム領域の2カ所を切断してEGFP遺伝子全体を取り除き、ドナーDNAとして加えた両端に逆位反復配列をもつDsRed遺伝子を相同組換え型の修復によって挿入するのである。このようなコンストラクトを注入されたG0個体の22%からEGFP遺伝子がDsRed遺伝子に置き換わったG1世代が得られている。このように、コクヌストモドキでは、CRISPR/Cas9システムを用いて狙い通りのゲノム操作ができるようになったことから、飛躍的に遺伝子機能の解析が進展すると期待される。

ナミテントウはコクヌストモドキと同じ多食害虫に属するが、天敵農薬としても用いられる有用種である。ナミテントウの大きな特徴は、200種類以上の斑紋型が存在することで(Komai, 1956)、これらの斑紋型は単一遺伝子座の複対立遺伝子による支配を受けることが明らかにされている(新美ら, 2006)。また、一世代が約1ヶ月と短く、人工飼料が開発され、飼育が容易であることから、研究材料としての利点にも富む準モデル昆虫である(新美ら, 2006)。ナミテントウでは、カブラハバチと同様に、EGFP遺伝子を標的にしたTALENによる遺伝子ノックアウトの有効性が確認されている(Hatakeyama et al., 2016)。ノックアウト個体を可視的に容易に選別するために、眼や中枢神経系で発現する3xP3プロモーターによって制御されるEGFP遺伝子とキイロショウジョウバエのheat shock protein 70(hsp70)遺伝子のプロモーターで制御されるarylalkylamine-N-acetyl transferase (NAT)遺伝子を同時にもつ遺伝子組換え系統(Osanai-Futahashi et al., 2012)が利用された。ナミテントウでは熱ショックを与えなくてもhsp70プロモーターの活性が高いため(Kuwayama et al., 2014)、この遺伝子組換え系統は室温でもNATが発現して幼虫の体色が薄くなる。したがって、EGFPが検出されず、体色が薄い個体を選別すれば、

標的領域の塩基配列の確認をしなくても、EGFP遺伝子に変異が生じた個体を選別できる。カブラハバチと同じTALEN mRNAを多核性胞胚の前端部、あるいは後端部に顕微注入すると、G0世代では中枢神経系の一部でEGFPがモザイク状に検出される個体が出現した(図2B)。実験に用いた遺伝子組換え系統は眼色が野生型(黒色)なので、眼でEGFPモザイクを検出するのが難しく、中枢神経系でのEGFPの検出のためには解剖して観察する必要がある。したがって、G0世代での体細胞モザイク個体出現率は明らかになっていない。そこで、体色が薄いG0成虫はすべて交配し、得られたG1世代の孵化幼虫の体色とEGFPを調べたところ、前端部への注入では子孫を残せたG0個体の8.3%、後端部への注入では子孫を残せたG0個体の25%からEGFP遺伝子がノックアウトされた個体を得られた。生殖細胞が形成される後端部への注入でノックアウト効率が高いという予想通りの結果である。EGFP遺伝子ノックアウト個体の標的領域にはいくつかのパターンの塩基欠失がみられ、最も頻度が高いのはカブラハバチのノックアウトの場合と同じくマイクロホモロジー依存型の修復により生じたものであることが確認されている。ナミテントウでのpiggy-Bacベクターによる遺伝子組換え効率は4%程度であるため(Kuwayama et al., 2006, 2014)、TALENによるノックアウト効率は高く、有効な変異導入法である(表2)。

現在、ナミテントウでは標的配列の設計が容易なCRISPR/Cas9の有効性を検討している。さらに、今後増加する遺伝子を改変した個体を容易でかつ安定的に保存するため、カイコで確立された方法(持田ら, 2014)を参考に卵巣や精子の凍結保存を試みている。以上のようにナミテントウではモデル生物化に向けた基盤整備を進めている。

4. 今後の展望

ハチ目およびコウチュウ目の昆虫でのゲノム編集は、コウチュウ目のコクヌストモドキを除いては「準モデル昆虫」といっても、遺伝子ノックアウトによる変異導入が可能になったのが現在の状況である。コクヌストモドキなど遺伝子ノックインに成功している昆虫にならって、ドナーDNAをTALENやCRISPR/Cas9といったゲノム編集ツールとともに導入すれば、相同組換え型修復による標的遺伝子座への特定の変異や外来遺伝子の導入は可能であろう。また、カブラハバチやナミテントウでは誘発した二本鎖DNAの切断がマイクロホモロジー依存型の非相同性末端結合によって修復されていることから、この機構を利用して開発された汎用性の高いprecise

integration into target chromosome (PITCh) システム (Nakade et al., 2014) も遺伝子ノックインに利用できる。

ハチ目とコウチュウ目には有用種も有害種も属しており、ゲノム編集技術を駆使した遺伝子機能の解析だけでなく、これらの昆虫の機能の改変、すなわち有用種の機能強化や有害種の無害化が期待される。ゲノム編集技術を使えば、狙った領域に特定の変異を導入できるので、従来の化学物質や放射線照射などによる突然変異誘発法とは比較にならないほど精巧に遺伝子を改変できる。したがって、作出された変異体は極めて正体の明らかなものである。しかし、これらの「ゲノム編集生物」については、現時点では国内でも国際的にもその取扱いについて統一された基準がない (河本, 2017)。ゲノム編集は、革新的で実用可能な、理論的には安全な技術だからこそ、社会的に受容されるように正確な情報を提供して正しく理解してもらうことが重要である。

謝 辞

本特集に執筆の機会をくださった、国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 (農研機構) の坪田拓也博士に感謝します。

引用文献

- Amdam, G.V., Simões, Z.L., Guidugli, K.R., Norberg, K. and Omholt, S.W. (2003) Disruption of vitellogenin gene function in adult honeybees by intra-abdominal injection of double-stranded RNA. *BMC Biotechnology*, **3**, 1.
- Berghammer, A.J., Klingler, M. and Wimmer, E.A. (1999) A universal marker for transgenic insects. *Nature*, **402**, 370-371.
- Beye, M., Hartel, S., Hagen, A., Hasselmann, M. and Omholt, S.W. (2002) Specific developmental gene silencing in the honey bee using a homeobox motif. *Insect Molecular Biology*, **11**, 527-532.
- Boettcher, M. and McManus, M. T. (2015) Choosing the right tool for the job: RNAi, TALEN or CRISPR. *Molecular Cell*, **58**, 575-585.
- Brusca, R.C., Moore, W. and Shuster, S.M. (2016) *Invertebrates third edition*. Sunderland: Sinauer Associates. Inc.
- Bucher, G., Scholten, J. and Klingler, M. (2002) Parental RNAi in *Tribolium* (Coleoptera). *Current Biology*, **12**, R85-R86.
- Chen, L., Tang, L., Xang, H., Jin, L., Li, Q., Dong, Y., Wang, W. and Zhang, G. (2014) Advances in genome editing technology and its promising application in evolutionary and ecological studies. *GigaScience*, **3**, 24.
- Crozier, R.H. (1977) Evolutionary genetics of the Hymenoptera. *Annual Reviews of Entomology*, **22**, 263-288.
- Doench, J.G. (2016) Special issue: CRISPR/Cas9 gene editing. *FEBS Journal*, **284**, 3157-3260.
- Drapeau, M.D., Albert, S., Kucharski, R., Prusko, C. and Maleszka, R. (2006) Evolution of the Yellow/Major Royal Jelly Protein family and the emergence of social behavior in honey bees. *Genome Research*, **16**, 1385-1394.
- Evans, J.D., Schwartz, R.S., Chen, Y.P., Budge, G., Cornman, R.S. et al. (2013) Standard methodologies for molecular research in *Apis mellifera*. In *The COLOSS BEEBOOK, Volume I: standard methods for Apis mellifera research* (Dietemann, V., Ellis, J. D. and Neumann, P., eds.). *Journal of Apicultural Research*, **52**, <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.11>
- Gilles, A.F., Schinko, J.B. and Averof, M. (2015) Efficient CRISPR-mediated gene targeting and transgene replacement in the beetle *Tribolium castaneum*. *Development*, **142**, 2832-2839.
- Hatakeyama, M. and Sumitani, M. (2016) Gene knockout in Hymenoptera: a case of the sawfly, *Athalia rosae*. *The 87th meeting of Zoological Society of Japan*, (Abstract), 245.
- 畠山正統・炭谷めぐみ・山本大介・李載暎・岡和希 (2006) カブラハバチの遺伝子組換えの現状と今後の展望 — 遺伝子機能解析ツールとしての利用 —. *蚕糸・昆虫バイオテック*, **75**, 167-173.
- Hatakeyama, M., Sumitani, M., Yamamoto, D.S., Lee, J.M. and Oka, K. (2009) The sawfly, *Athalia rosae ruficornis* (Hymenoptera) as a model insect for developmental and reproductive biology: what has been done and what should be done? *Proceedings of the Arthropodan Embryological Society of Japan*, **44**, 1-12.
- Hatakeyama, M., Yatomi, J., Sumitani, M., Takasu, Y., Sekine, K., Niimi, T. and Sezutsu, H. (2016) Knockout of a transgene by transcription activator-like effector nucleases (TALENs) in the sawfly, *Athalia rosae* (Hymenoptera) and the ladybird beetle, *Harmonia axyridis* (Coleoptera). *Insect Molecular Biology*, **25**, 24-31.
- Jarosch A. and Moritz, R.F.A. (2011) Systemic RNA-interference in the honeybee *Apis mellifera*: Tissue dependent uptake of fluorescent siRNA after intra-abdominal application observed by laser-scanning microscopy. *Journal of Insect Physiology*, **57**, 851-857.
- Kohno, H., Suenami, S., Takeuchi, H., Sasaki, T. and Kubo, T. (2016) Production of knockout mutants by CRISPR/Cas9 in the European honeybee, *Apis mellifera* L. *Zoological Science*, **33**, 505-512.
- Komai, T. (1956) Genetics of ladybeetles. *Advances in Genetics*, **8**, 155-188.
- 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.
- Kubo, T. (2012) Neuroanatomical dissection of the honeybee brain based on temporal and regional gene expression patterns. In *Honeybee neurobiology and Behavior. A Tribute to Randolph Menzel* (Galizia, C.G., Eisenhardt, D. and Giulfa, M., eds.), pp. 341-357. Springer, Netherlands.
- Kuwayama, H., Yaginuma, T., Yamashita, O. and Niimi, T. (2006) Germ-line transformation and RNAi of the ladybird beetle, *Harmonia axyridis*. *Insect Molecular Biology*, **15**, 507-512.
- Kuwayama, H., Gotoh, H., Konishi, Y., Nishikawa, H., Yaginuma, T. and Niimi, T. (2014) Establishment of transgenic lines for jumpstarter method using a composite transposon vector in the ladybird beetle, *Harmonia axyridis*. *PloS One*, **9**, e100804.
- Li, M., Au, L.Y.C., Doughlah, D., Chong, A., White, B.J., Ferree, P.M. and Akbari, O.S. (2017) Generation of heritable germline mutations in the jewel wasp *Nasonia vitripennis* using CRISPR/Cas9. *Scientific Reports*, **7**, 901.
- Lorenzen, M.D., Berghammer, A.J., Brown, S.J., Denell, R.E.,

- Klingler, M. and Beeman, R.W. (2003) *piggyBac*-mediated germline transformation in the beetle *Tribolium castaneum*. *Insect Molecular Biology*, **12**, 433-440.
- Lynch, J.A. (2015) The expanding genetic toolbox of the wasp *Nasonia vitripennis* and its relatives. *Genetics*, **199**, 897-904.
- Lynch, J.A. and Desplan, C. (2006) A method for parental RNA interference in the wasp *Nasonia vitripennis*. *Nature Protocols*, **1**, 486-494.
- Misof, B., Liu, S., Meusemann, K., Peters, R. S., Donath, A. et al. (2014) Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science*, **346**, 763-767.
- 持田裕司・竹村洋子・新保博・伴野豊 (2014) カイコの生殖細胞の凍結保存法マニュアル (Ver. 2014). 蚕糸・昆虫バイオテック, **83**, 255-272.
- Nakade, S., Tsubota, T., Sakane, Y., Kume, S., Sakamoto, N., Obara, M., Daimon, T., Sezutsu, H., Yamamoto, T., Sakuma, T. and Suzuki, K.T. (2014) Microhomology-mediated end-joining dependent integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9. *Nature Communications*, **5**, 5560.
- Nakao, H., Hatakeyama, M., Lee, J.M., Shimoda, M. and Kanda, T. (2006) Expression pattern of *Bombyx vasa*-like (BmVLG) protein and its implication in germ cell development. *Development, Genes and Evolution*, **216**, 94-99.
- Niimi, T., Kuwayama, H. and Yaginuma, T. (2005) Larval RNAi applied to the analysis of postembryonic development in the ladybird beetle, *Harmonia axyridis*. *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, **74**, 95-102.
- 新美輝幸・桑山久史・原喜実子・柳沼利信 (2006) ナミテントウの遺伝子機能解析技術の現状と将来. 蚕糸・昆虫バイオテック, **75**, 175-182.
- Osanai-Futahashi, M., Ohde, T., Hirata, J., Uchino, K., Futahashi, R., Tamura, T., Niimi, T. and Sezutsu, H. (2012) A visible dominant marker for insect transgenesis. *Nature communications*, **3**, 1295.
- Pavlopoulos, A., Berghammer, A.J., Averof, M. and Klingler, M. (2004) Efficient transformation of the beetle *Tribolium castaneum* using the Minos transposable element: quantitative and qualitative analysis of genomic integration events. *Genetics*, **167**, 737-746.
- Schulte, C., Theilenberg, E., Müller-Borg, M., Gempe T. and Beye, M. (2014) Highly efficient integration and expression of *piggyBac*-derived cassettes in the honeybee (*Apis mellifera*). *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **111**, 9003-9008.
- Sumitani, M., Yamamoto, D.S., Oishi, K., Lee, J.M. and Hatakeyama, M. (2003) Germline transformation of the sawfly, *Athalia rosae* (Hymenoptera: Symphyta), mediated by a *piggyBac*-derived vector. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **33**, 449-458.
- Sumitani, M., Yamamoto, D.S., Lee, J.M. and Hatakeyama, M. (2005) Isolation of *white* gene orthologue of the sawfly, *Athalia rosae* (Hymenoptera) and its functional analysis using RNA interference. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **35**, 231-240.
- Taning, C. N. T., Van Eynde, B., Yu, N., Sanyuan Ma, S. and Smagghe, G. (2017) CRISPR/Cas9 in insects: Applications, best practices and biosafety concerns. *Journal of Insect Physiology*, **98**, 245-257.
- The Honeybee Genome Sequencing Consortium (2006) Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, **443**, 931-949.
- Tomoyasu, Y. and Denell, R.E. (2004) Larval RNAi in *Tribolium* (Coleoptera) for analyzing adult development. *Development Genes and Evolution*, **214**, 575-578.
- Trauner, J., Schinko, J., Lorenzen, M.D., Shippy, T.D., Wimmer, E.A., Beeman, R.W., Kingler, M., Bucher, G. and Brown, S.J. (2009) Large-scale insertional mutagenesis of a coleopteran stored grain pest, the red flour beetle *Tribolium castaneum*, identifies embryonic lethal mutations and enhancer traps. *BMC Biology*, **7**, 73.
- Tribolium* Genome Sequencing Consortium (2008) The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature*, **452**, 949-955.
- Werren, J.H. and Loehlin, D.W. (2009) The parasitoid wasp *Nasonia*: an emerging model system with haploid male genetics. Cold Spring Harbor Protocols, 2009, pdb.emo134.
- Werren, J.H., Loehlin, D.W. and Giebel, J.D. (2009) Larval RNAi in *Nasonia* (parasitoid wasp). Cold Spring Harbor Protocols, 2009, db.prot5311.
- Werren, J.H., Richards, S., Desjardins, C.A., Niehuis, O., Gadau, J. et al. (2010) Functional and evolutionary insights from the genomes of three parasitoid *Nasonia* species. *Science*, **327**, 343-348.
- Yamamoto, T. (2015) *Targeted Genome Editing Using Site-Specific Nucleases. ZFN, TALENs, and the CRISPR/Cas9 System*. p205., Springer, Tokyo.
- Yoshiyama, N., Tojo, K. and Hatakeyama, M. (2013) A survey of the effectiveness of non-cell autonomous RNAi throughout development in the sawfly, *Athalia rosae* (Hymenoptera). *Journal of Insect Physiology*, **59**, 400-407.