一般財団法人大日本蚕糸会 貞明皇后研究助成

研究成果報告書

【申請者氏名】

木内 隆史

【所属機関】

東京大学大学院農学生命科学研究科

【研究題目】

広食性蚕品種の短期間育成を実現する DNA マーカーの開発 2

【研究目的】

本研究では、<u>カイコの広食性系統「沢 J」の広食性に関与する複数の遺伝子を同定し、その情報を利用することで、実用品種に広食性を短期間で付与するための技術開発を行うことを目的とした。</u>

沢」はキャベツへの摂食性を指標に10世代以上をかけて選抜された広食性系統であり、ク ワ以外の植物やリンゴなどの果実に対し、高い摂食性を示す(横山、1975)。沢Jの広食性は、 3 番染色体に座乗する劣性の主働遺伝子 pph (polyphagous) と**いくつかの修飾遺伝子**により 支配されることが示されている (神田ら、1988; Iizuka et al., 2007)。放射線を用いた変 異誘発により作出された Np (Non-preference) 変異体などの原因遺伝子も広食性に関与する が、これらは劣性の致死性を伴うため実用に向かない。一方、沢 J の高い広食性を担う pph やいくつかの修飾遺伝子は致死性を伴わないため、より実用的だと考えられるが、劣性の遺 伝子であることに加え原因遺伝子が未知であることから、実用品種への導入に困難を要する。 1970 年頃から 1990 年頃にかけて、繭の低コスト生産を目的として、組成中に畜産用飼料 素材を含み桑葉粉末含量が少ない低コスト人工飼料が開発されている(新村、1973;堀江ら、 1980; 柳川ら、1988、1991)。さらに近年、有用物質生産を遺伝子組換えカイコを用いて行う 産業が活発化しているなか、有用物質の単価を抑えるために低コスト人工飼料の利用が再び 注目されている。一方、低コスト人工飼料に適合するような広食性品種「はばたき」や「ひ たちさんし」などが育成され、細繊度・広食性品種「ほのぼの」のように実用品種に広食性 を付与する育成も行われてきた。しかし、これら広食性品種の育成には多大な労力と月日を 要する。そのため、実用品種に広食性を短期間で付与する育成法を提案できれば、今後の蚕 糸業の発展に大きく貢献しうる。

平成 29 年度の本助成により、pph が味覚受容体遺伝子 Gr66 であることを突き止め、その領域に分子マーカーを設計することに成功した。しかし、標準系統である p50T 系統において Gr66 遺伝子をゲノム編集技術によりノックアウトしたところ、確かに広食性を向上させることはできたが、沢 J のような極端な広食性を付与するまでには至らなかった。おそらく、沢

Jのような極端な広食性を実用品種に付与するためには、pph 以外の広食性に関わる修飾遺伝子も同時に導入する必要があると考えられる。このような背景のもと、本研究では<u>沢 J の広食性に関わる pph 以外の遺伝子座の同定とその分子マーカーの設計を目指した</u>。さらに、ゲノム編集技術を用いて実際に実用品種に広食性を付与できるかどうかを検証した。

【研究内容及び成果】

以下の2つの課題に取り組むことで、本申請の目的達成を目指した。

課題 1. 沢 J の広食性に関わる pph 以外の遺伝子座を順遺伝学的なアプローチにより同定し、 その分子マーカーを設計する。

1)沢 J には pph 遺伝子以外に広食性に関与する遺伝子がいくつあるか、またそれぞれの遺伝子の広食性への寄与がどの程度なのかは不明である。そこで、平成 29 年度の本助成研究において pph 遺伝子の絞り込みにも使用した、食性が正常な系統である C108T と沢 J を交配し、その雑種第二代 (F_2) を用いて QTL マッピングを行った。雑種第一代 (F_1) の雄の配偶子では相同染色体間の組換えが起こるため、 F_2 においては様々な染色体構成をもつ個体が混在している。これら F_2 個体のうち、広食性を示す個体と示さない個体のゲノム配列を染色体全域に渡って比較することで、広食性に関与するゲノム領域を特定することができる。

 F_2 の 400 頭に桑葉無配合の人工飼料(蚕業技術研究所から分譲を受けた)を与えて摂食性試験を行い、人工飼料を積極的に食べた個体を 80 頭(摂食個体群)、全く食べなかった個体を 80 頭(非摂食個体群)回収した。各群からそれぞれゲノム DNA を抽出し、次世代シークエンサーを用いてゲノムのカバレッジが個体あたり約 $4 \times$ になるように $4 \times 460 \text{ Mb} \times 80$ 個体 =約 150 Gb の配列データを取得した。データ量が膨大なため、まずはこれらの配列データの一部を用いて解析を行った。配列データをカイコゲノムの参照配列(p50T 系統)にマッピングし、バリアントコールを行うことで一塩基多型(SNPs)情報を得た。この情報をもとに QTL 解析を行った結果、3 番染色体上にあるすでに同定済みのpph 遺伝子領域近傍とともに、25 番染色体上の特定の遺伝子座が広食性に関与すると推定された(図 1)。本研究室では、沢 J に加えて 20 系統以上のゲノム情報を保有しているため、新たに発見された 25 番染色体上の遺伝子座に沢 J 特異的な分子マーカーを設計することができる。

2)標準系統である p50T 系統において pph の原因遺伝である Gr66 遺伝子をゲノム編集技術によりノックアウトすると広食性は向上するが、沢 J ほどの摂食性を付与することはできない。一方、p50T において Gr66をノックアウトした系統 (Gr66⁴) と沢 J (Gr66 が欠失)を交配して得られた F₁ は桑葉無配合の人工飼料を沢 J と比較してほとんど遜色なく摂食した。この結果は pph 以外に沢 J の染色体に優性 (不完全優性の可能性も残す)に作用する広食性遺伝子 (修飾遺伝子)が存在することを示唆する。そこで、F₁ の雄にさらに Gr66⁴の雌を戻し交雑しながら桑葉無配合の人工飼料への高い摂食性を残すものを維持することで、摂食性に関与するゲノム領域以外を p50T 型に置き換えるような交配を続けた。戻し交雑個体において維持されている沢 J 由来のゲノム領域を調査すること

で、広食性に関与する遺伝子座が特定できると期待される。

戻し交雑を続けることで得られた BC6 の 2 系統を用いて人工飼料摂食性試験を行い、各系統においてよく摂食した個体 16 頭ずつからゲノム DNA を抽出した。次世代シークエンス解析により、2 系統から得られたそれぞれのゲノム DNA から $4\times460~\text{Mb}\times16~\text{個体}=約30~\text{Gb}$ の配列データを取得した。得られた配列データを p50T ゲノムにマッピングしたのち、バリアントコールを行った。この情報を用いて、ヘテロとカウントされた SNPs の数を算出することで沢 J 型の染色体領域を調査したところ、2 系統で共通して維持されており 広食性に関わると推定されるのは 18 番染色体の半分程度の領域であることが判明した(図 2)。

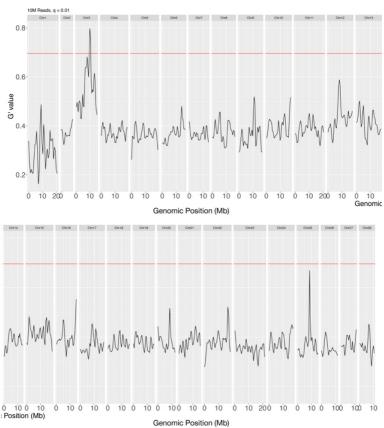


図1. F₂個体を用いたQTL解析の結果

横線はFDR (q) = 0.01を示す. *Gr66*遺伝子が座乗する3番染色体の他に25番染色体上にも広食性への関与を示唆する遺伝子座が確認された.

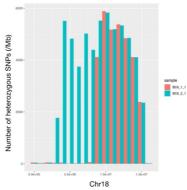


図2. BC₆の2系統が共通して保有する沢J型の染色体領域

1 Mb毎にヘテロなSNPsの数をカウントしている。各色のバーがそれぞれの系統に維持されている沢J型の染色体領域を示す。

課題 2. 実用品種に広食性を付与する。

平成 29 年度の本助成により、pph が味覚受容体遺伝子 Gr66 であることを突き止めた。標準系統にゲノム編集を行い、Gr66 をノックアウトすることで広食性を付与することにも成功したが、実用品種においても同様に広食性を付与できるかどうかはわからない。遺伝的背景が異なることで、Gr66 遺伝子単独のゲノム編集では実用に十分な広食性を付与できない可能性もある。実用品種「いろどり」の原種として用いられている中国種 2 系統は、人工飼料を与えたときの毛振い率が好ましくないという問題を抱えている。そこで、これら中国種原種 2 系統に対し Gr66 遺伝子のゲノム編集を行うことで、広食性系統作出技術の実用性を評価した。

Gr66 を標的とするガイド RNA を 2 種類設計し、合成を委託した。ゲノム編集を行うためには非休眠卵にマイクロインジェクションを行う必要がある。 蚕業技術研究所から上記中国種原種 2 系統の分譲を受け、卵を低温暗催青することで非休眠卵を得ようとした。ほとんどの蛾は休眠卵を産下したが、一部の蛾が非休眠卵を産んだため、合成した 2 種類のガイド RNA を混合し、Cas9 タンパク質とともに卵にマイクロインジェクションした。いずれの系統においても孵化幼虫が得られたが、片方の系統でのみインジェクションをしていない個体との交配により次世代 (G_1) を得ることに成功した。 G_1 の一部の卵から抽出した DNAを用いて調べたところ、 Gr66 遺伝子への高効率な変異導入が確認されたため、蛾まで育てて変異をヘテロにもつ個体同士を交配して G_2 の卵を得た。この G_2 の卵から孵化した幼虫を用いて、 桑葉無配合の人工飼料への摂食性を評価したところ、もとの系統ではこの人工飼料をほとんど摂食しないが、 人工飼料をよく摂食する個体が確認された (図 3)。 桑葉無配合の人工飼料をよく摂食した幼虫は Gr66 遺伝子における変異をホモにもつと推定される。現在、「いろどり」中国種原種の Gr66 ノックアウト系統を樹立するために、飼育と交配を続けている。

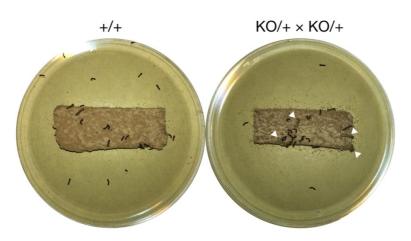


図3. 実用品種におけるGr66遺伝子のノックアウト

実用品種「いろどり」の中国種原種において*Gr66*遺伝子をノックアウトした結果. +/+では桑葉無配合の人工飼料を食べる個体はほとんどいないが, KO/+×KO/+から得られた次世代ではよく摂食する個体(矢頭)が確認される.

【今後の課題】

課題 1 における F_2 個体を用いた食性試験とゲノム情報解析により、3 番染色体上に座乗する pph 遺伝子 (Gr66) に加え、25 番染色体上にも広食性に関与する遺伝子座が存在することが示唆された(図 1)。データ量が膨大なため、本助成期間内では一部のデータを用いた解析しか行うことができなかったが、今後、すべての配列データを用いて再解析を行うことで、さらに候補領域を絞り込み、原因遺伝子を同定することができると予想する。一方、 BC_6 個体を用いた食性試験とゲノム情報解析からは、18 番染色体上に広食性に関与する遺伝子座が存在することを示唆する結果が得られた(図 2)。 F_2 個体を用いた QTL 解析では、18 番染色体上に広食性への関与を示すピークは認められないため、遺伝的背景によって広食性に関与する遺伝子が異なる可能性がある。いずれにしても、現在も食性試験を行いながら戻し交雑を続けている系統を用いて、さらなる候補領域の絞り込みと原因遺伝子の同定を目指す予定である。

課題2では、*Gr66*遺伝子のノックアウトにより実用品種「いろどり」の中国種原種に広食性を付与できることを示唆する結果が得られた。今後、ノックアウト系統を樹立することで、どの程度の広食性が付与されているかをしっかりと評価する必要がある。中国種は人工飼料摂食性が乏しいことが知られているため、*Gr66*遺伝子単独のゲノム編集で広食性を付与することができれば、実用品種に短期間で広食性を付与できる技術として期待できる。

【発表論文等】

未発表