

研究成果報告書

【申請者氏名】

滝沢 俊介

【所属機関】

群馬県蚕糸技術センター

【研究題目】

ゲノム編集を活用した実用蚕品種に対する広食性形質の付与

【研究目的】

蚕用人工飼料は開発されて数十年経過し、現在の蚕糸業には必要不可欠になっている。養蚕農家で飼育される蚕のほとんどは稚蚕共同飼育所で人工飼料により飼育されている。また、多くの企業や大学、研究機関では、人工飼料によって蚕を全齢飼育している。しかし、全齢を人工飼料で飼育するには人工飼料摂食性と人工飼料コストが高い等の課題が挙げられることが多い。人工飼料に対する摂食性が悪いと、食下量に個体差が生じてしまい、発育が不斉一になる。発育が不斉一になると、作業効率の低下や蚕病発生の一因となり、収量の減少につながる。また、人工飼料育は桑葉育と比較して、飼料コストが高いため、繭生産コストも自然と高くなる。

蚕は桑のみを摂食する単食性の昆虫であるが、突然変異個体の中に桑葉以外も摂食する広食性の食性異常蚕が確認されている。広食性の蚕は桑粉末入りの人工飼料の摂食性が良いことや、人工飼料で飼育した場合、食性正常蚕（桑のみを食べる蚕）と比較して発育の斉一性もよく、各齢期の飼育経過が短くなることが報告されている。しかし、従来の育種法を用いて、広食性の形質を持った新たな蚕品種を育成するには多大な時間と労力がかかり、近年の多様なニーズに応えることが非常に困難である。もし、現在までに育成してきた蚕品種に広食性の形質だけを付与することができれば、品種育成の時間と労力が大幅に短縮でき、多様なニーズにも応えやすくなる。

最近、味覚に関する GR66 遺伝子をゲノム編集によってノックアウトすると広食性の形質が発現することが報告された (Zhang et al. 2019)。しかし、報告では遺伝子ノックアウトが繭の形質や産卵性などに影響を及ぼすか調べたデータがないため、データを採取し実用化が可能か判断する必要がある。

広食性の形質のみを従来の実用蚕品種に付与することで、全齢人工飼料育による実用的な繭生産における作業効率の向上、収量の増加、コストの削減の実現につながる。ゲノム編集による遺伝子ノックアウトはわずかな変異であればカルタヘナ法の対象外であり、遺伝子組換えカイコのような厳重な対応の必要がなく、社会実装はしやすいと思われる。

【研究内容及び成果】

【研究内容概要】

供試品種である「大造(蚕技セ系統)」に対して、GR66 遺伝子をターゲットに遺伝子ノックアウトするゲノム編集を実施し、G1 世代（インジェクションした次代）まで作出できた。摂食性スクリーニング用の人工飼料を作製し、G1 世代に対する人工飼料の摂食性評価試験結果から、GR66 遺伝子がカイコの食性を左右することが示唆された。また、新たに複数のターゲット配列を示し、広食性付与系統作出における実験系の基盤となるデータを得ることができた。

【研究内容詳細】

1. 人工飼料摂食性の評価方法の確立

1-1 市販の人工飼料を活用した摂食性評価試験

市販の人工飼料を用いて、蚕幼虫の飼料に対する摂食性が評価可能か検討した。数種の人工飼料を用いて、品種毎の摂食性を調査した。また、GR66 遺伝子ノックアウト後のスクリーニング方法として利用可能か検討した。対照区として、広食性品種である「日604」を用いた。「日604」が全ての飼料を摂食し、かつ、他の系統に食べない人工飼料があれば、スクリーニング手法として使用が可能となる。

供試品種：「大造」（ゲノム編集用）、「200」、「明」（中国種）

「ぐんま」、「小石丸」、「榛」、「日本錦」、「日604」（広食性）（日本種）

試験区：シルクメイト2S（原種用）、くわのはな1 齢用

シルクメイトL4M（広食性品種用）

試験方法：蚕種を25°C、湿度70±10%、18L6Dで催青し、ふ化した幼虫に人工飼料を給餌した。5日後に2 齢幼虫になった個体数を計測し、2 齢到達割合を算出した。

表1 ふ化後5日後の2 齢到達割合（中国種）

試験区	大造	200	明
シルクメイト2S	71.7 ± 3.4	82.5 ± 4.3	74.0 ± 3.0
くわのはな1 齢用	56.1 ± 5.2	77.9 ± 3.0	53.7 ± 4.6
シルクメイトL4M	11.7 ± 1.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

(平均±S.E. 計算式：2 齢幼虫/孵化幼虫数×100=2 齢到達割合(%)、n=3)

表2 ふ化後5日後の2 齢到達割合（日本種）

試験区	ぐんま	小石丸	榛	日本錦	日604
シルクメイト2S	85.1 ± 2.4	84.7 ± 4.2	84.6 ± 3.0	65.0 ± 1.2	74.3 ± 3.0
くわのはな1 齢用	90.4 ± 3.0	78.3 ± 5.2	93.0 ± 2.9	46.7 ± 2.0	83.7 ± 2.3
シルクメイトL4M	8.7 ± 5.9	0.0 ± 0.0	9.3 ± 1.1	6.3 ± 0.7	17.7 ± 1.5

(平均±S.E. 計算式：2 齢幼虫/孵化幼虫数=2 齢到達割合(%)、n=3)

[結果]

シルクメイト L4M は広食性品種用の人工飼料だが、広食性品種以外も摂食して成長する品種がいることが明らかになった。「大造」は全ての人工飼料を摂食したので、人工飼料摂食性が変化した際のスクリーニング手法として活用することが困難であり、別の方法を考える必要がある。

1-2 摂食性スクリーニング用人工飼料の作製

1-1 の試験より、市販の飼料を使用して食性の変化を測定することが困難であることがわかったので、新たに人工飼料を作製し試験を実施した (表 3)。

桑粉末は入れず、畜産原料としてトウモロコシ粉末、脱脂米ぬか、こんにやく飛粉を用いて作製した。市販の人工飼料より、摂食性が劣ることが予想される。「日 6 0 4」のみが 2 齢に到達し、「大造」が 2 齢に到達しなければスクリーニング手法として使用可能である。試験方法は 1-1 と同様である。

[結果]

「日 6 0 4」は飼料を摂食し成長したが、他品種では成育の遅れや未摂食、餓死個体が確認された (表 4)。今回作製した人工飼料を用いれば摂食性のスクリーニングが可能だと思われる。

表 3 スクリーニング用人工飼料組成

原材料名	配合量 (g)
脱脂大豆	365
デンプン	100
畜産原料* ¹	401
造形剤	62
防腐剤	5
その他* ²	67
合計	1000
水分量	2700

*¹ トウモロコシ粉末、脱脂米ぬか、こんにやく飛粉で構成されている。

*² ビタミン B 群、シヨ糖など微量成分が入っている。

表 4 ふ化後 5 日後の 2 齢到達割合

試験区	日604	大造	日本錦	ぐんま	200
スクリーニング用飼料	56.0 ± 5.9	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

(平均±S.E. 計算式: 2 齢幼虫/孵化幼虫数×100= 2 齢到達割合 (%), n=4)

2. sgRNA の生成及び、切断活性調査

2-1 ターゲット位置の決定

まずは、先行研究の Zhang et al. (2019) で報告されている 2 か所(T1, T2)をターゲットとし、新たにターゲット部位を決定するために CHOPCHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no/>) と Zou et al.(2021)を参考に新規のターゲット配列を決定した (表 5)。新たなターゲットとして 3 カ所追加し、それぞれを T3,T4,T5 とする。合計 5 カ所をターゲットとした。

表 5 ターゲット配列 (赤字は PAM 配列)

名称	ターゲット配列 (5'→3')
T1	GATTGTTTGGTGACTGATCTGGG
T2	CCGCGATTTGTCATTCTCGCTGC
T3	ATCGCTTGTGGTAGTTAATGAGG
T4	GCGGGATAAGTAAATTGAGAAGG
T5	GGATAAGTAAATTGAGAAGGTGG

2-2 sgRNA の生成及び、CRISPR/Cas9 の調整/ *in vitro* における切断活性調査

T1T2 は Kistler et al. (2015)の方法で sgRNA を生成し、T3T4T5 は Guide-it™ sgRNA In Vitro Transcription and Screening System (takara 社) を用いて生成した。

Guide-it™ sgRNA In Vitro Transcription and Screening System のプロトコルに従い、大造のゲノムを用いて、sgRNA と Cas9 タンパク質の切断活性を調査した。Cas9 タンパク質は Alt-R® S.p. HiFi Cas9 Nuclease V3 (InteGRated DNA Technologies 株式会社) を使用した。以下、Cas9 タンパク質と sgRNA の混合物を RNP (Ribonucleoprotein) と呼ぶ。

使用したプライマーリストは報告書の最後に記載した。

[結果]

T1~T5 の全ての区で切断活性があることが確認できた(図1)ので、蚕卵に対するインジェクションに使用できると判断した。

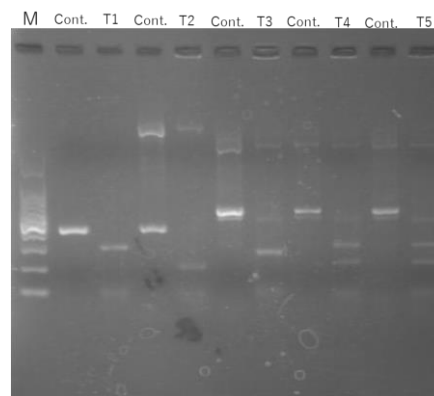


図1 切断活性調査結果

3.GR66 遺伝子ノックアウト系統の作出 (G1 世代のスクリーニングまで)

3-1 初期胚へのマイクロインジェクション

「大造」の蚕種を 25°C で催青し、非休眠化させるため土田ら(1979)の方法を参考に、孵化してきた幼虫を 25°C、20L4D の長日条件で飼育した。羽化した個体を 3 時間交尾させ割愛後の雌成虫を 4°C に 40~72 時間保護した。インジェクション当日に室温 25°C の暗室に移動し、産卵させ蚕種を得た。産下後 6 時間以内の蚕種に表 6 の RNP をインジェクションした。インジェクション後、孵化した幼虫を飼育し、インジェクション個体 (G0 世代) と野生型の個体を掛けあわせて G1 世代 (ヘテロ) を採種した。

余剰の T1T2 のインジェクション個体 (G0 世代) 同士を掛け合わせて、G1 世代 (ホモ) を採種した。

表 6 インジェクションに使用した RNP 組成

T1T2		T3~T5		T1~T5(全混合)	
Cas9	1 μ l	Cas9	1 μ l	Cas9	1 μ l
T1	750 ng			T1	300 ng
T2	750 ng			T2	300 ng
		T3	500 ng	T3	300 ng
		T4	500 ng	T4	300 ng
		T5	500 ng	T5	300 ng
10×PBS	2 μ l	10×PBS	2 μ l	10×PBS	2 μ l

注射用蒸留水で 20 μ l にメスアップ

[結果]

インジェクションした区すべてで幼虫が孵化した (表 7) が、T1~T5(全混合)は飼育途中で全頭死亡した。T1T2 は 10 個体、T3~T5 は 14 個体が成虫まで成長した。T1T2 (ヘテロ) を 5 蛾区、T3~T5 (ヘテロ) を 14 蛾区、T1T2 (ホモ) を 1 蛾区得ることができた。

表 7 インジェクション後の孵化率

注射物	ふ化率 (%)
T1T2	7.7
T3~T5	10.2
T1~T5	3.1

3-2 G1世代のスクリーニング

3-1で得たG1世代の蚕種を浸酸処理により休眠打破し25°Cで催青した。孵化した幼虫を用いて、1-2で作製した摂食性スクリーニング用飼料での摂食性の試験を実施した。

[結果]

蛾区によって2齢到達率が大きく異なることから、2齢到達率が高い蛾区において、GR66遺伝子がノックアウトされた可能性がある。T1T2ヘテロはA,C,D,Eの4蛾区、T3~T5はA,B,C,D,E,F,H,Nの8蛾区においてノックアウトが起きた可能性が示唆された。

T1T2ホモは全ての個体が2齢に到達した(2齢到達率100%)。

表8 5日後の2齢到達率(%) (スクリーニング用飼料)

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
T1T2ヘテロ	42.6	21.7	41.7	76.2	52.6	—	—	—	—	—	—	—	—	—
T3~T5ヘテロ	50.0	94.4	93.8	78.4	65.6	60.3	14.3	72.1	23.8	0.0	0.0	0.0	0.0	59.1

【考察】

G1世代の幼虫のスクリーニング用人工飼料(桑粉末0%)に対する人工飼料摂食性が向上していることから、GR66遺伝子ノックアウトが人工飼料摂食性向上に有効であることが示唆された。今後、ゲノムシーケンスにより、ノックアウトが実際に生じているかどうか確認が必要である。T1T2よりもT3~T5はインジェクションした卵数に対する孵化割合が高く、成虫まで到達した個体数が多い。また、ノックアウトが生じた可能性が高い蛾区が多いことから、T1T2と比較してT3~T5はインジェクション効率が良いと予想された。一方、T1からT5まで混合すると、孵化割合が低く、飼育中に死亡してしまうことから、一度に多くのターゲットを狙うと負の影響を与えることが考えられた。

【今後の課題】

G1世代の同系交配後成虫からDNAを抽出し、変異アレルが生じたか調査する。変異が見られた蛾区のゲノムをジェノタイプングし、ノックアウトが生じたか評価する。その後、ノックアウト系統を確立し、GR66遺伝子が真にカイコの食性を決定するのかどうかエビデンスを確保する。また繭の計量形質や産卵性などへの影響を調査する。

他系統にも同様の試験を実施し、再現性があるか確認する。

本実験で使用したプライマーリスト（実験2-2）

プライマー名	プライマー配列	備考
GR66-T1_F (sgRNA)	GAAATTAATACGACTCACTATAGGATTGTTTG GTGACTGATCTGTTTTAGAGCTAGAAATAGC	T1 の sgRNA 調整
GR66-T2_F (sgRNA)	GAAATTAATACGACTCACTATAGGCAGCGAG AATGCAAATCGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC	T2 の sgRNA 調整
GR66-T1.T2_R (sgRNA)	AAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAG TTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCT ATTTCTAGCTCTAAAAC	T1・T2 の sgRNA 調整
GR66-T3 (sgRNA)	CCTCTAATACGACTCACTATAGGATCGCTTGT GGTAGTTAATGGTTTAAGAGCTATGC	T3 の sgRNA 調整
GR66-T4 (sgRNA)	CCTCTAATACGACTCACTATAGCGGGATAAG TAAATTGAGAGTTTAAGAGCTATGC	T4 の sgRNA 調整
GR66-T5 (sgRNA)	CCTCTAATACGACTCACTATAGGATAAGTAA ATTGAGAAGGGTTTAAGAGCTATGC	T5 の sgRNA 調整
GR66T1_F (assay)	AGCGTTATGATACATTTCTGGGC	T1 切断活性調査
GR66T1_R (assay)	TGTCAACTGCATGTCTTAGAGG	T 切断活性調査
GR66T2_F (assay)	AAATGTGTTGAACGCAGCT	T2 切断活性調査
GR66T2_R (assay)	CAGTTTCTGTGACTTCGTTACCA	T2 切断活性調査
GR66T3-5_F (assay)	TGATTCGGACTCACAAGACG	T3-5 切断活性調査
GR66T3-5_R (assay)	GGAAGAGAATGCGCCTGTAT	T3-5 切断活性調査

【参考文献】

Kathryn et al (2015). Cell Reports 11, 51–60.

土田耕三、吉武成美. (1979) 日蚕雑,48(6),469～472.

山本 卓 (2014) . 今すぐ始めるゲノム編集,羊土社.

Zhang et al. (2019). PLoS Biol 17(2).

Zou et al. (2021). BMC Biotechnol (2021) 21:54