

昆虫ゲノム編集のあたらしい形

—成虫注射で「難敵」撃破—

概要

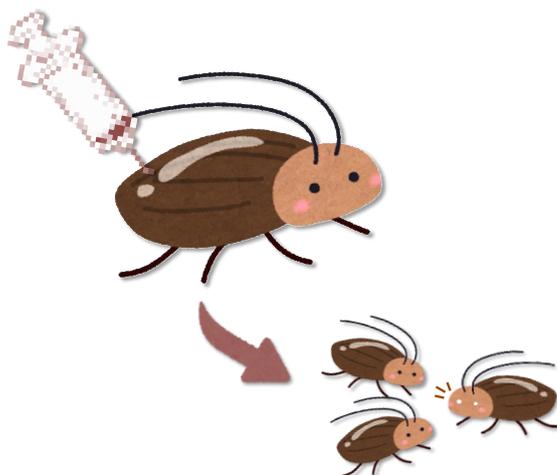
京都大学大学院農学研究科 大門高明教授、白井雄 同博士課程学生は、スペインの進化生物学研究所 (Institut de Biologia Evolutiva) の Xavier Belles 教授、Maria-Dolors Piulachs グループ長と国際共同研究で、従来の方法を大幅に簡略化させ、かつ、適用範囲を拡大させた、新規の昆虫ゲノム編集法を確立しました。

近年のゲノム編集ツールの開発によって、昆虫においてもゲノム編集が可能となりました。しかし、これまでの方法では受精直後の卵（初期胚）にゲノム編集ツール（CRISPR/Cas9 など）を注射する必要があり、そのために高価な実験機材や特別な実験技術の習得が必要でした。さらに、昆虫には卵への注射が原理上不可能な種や、技術上非常に困難な種が数多く存在しています。従来法にはこれらの問題点があり、それが多種多様な昆虫で自在にゲノム編集を行いたい研究者を悩ませてきました。

今回、研究グループは、新しいゲノム編集法の開発に取り組み、極めて簡便な昆虫ゲノム編集法（DIPA-CRISPR 法）を開発しました。DIPA-CRISPR 法は、卵ではなく成虫に注射することによって従来法の問題点を解決することができます。研究グループは、この方法によるゲノム編集効率が従来法に匹敵するほど高いこと、さらに、この方法を用いることで、従来法では事実上不可能であった「難敵」であるゴキブリにおいても高効率なゲノム編集が可能であることを明らかにしました。

DIPA-CRISPR 法は極めてシンプルです。注射は成虫に行えばよいので、高価な機材や技術的なトレーニングの必要がほとんどありません。注射するゲノム編集ツールは一般的な市販品をそのまま使えばよいので、特別な準備も必要ありません。世界のほとんどの研究室で簡単に実行可能であること、原理上、100 万種を超える昆虫種のほとんどに適用可能であることから、この方法は、昆虫科学の発展を基礎・応用の両面から強力に牽引していくものと期待されます。

本研究成果は、2022 年 5 月 16 日（現地時刻）に米国科学雑誌「Cell Reports Methods」にオンライン掲載されました。



DIPA-CRISPR のイメージ図。メス親（上）に CRISPR/Cas9 を注射することで、ゲノム編集された子（右下の白眼個体）を得ることができる。

発表のポイント

- 従来法の欠点を克服した、新しい昆虫ゲノム編集法を確立しました。
- 成虫に注射するだけで、高効率な昆虫のゲノム編集ができることを示しました。
- これまで不可能であった昆虫でもゲノム編集ができることを示しました。
- 誰でも、簡単に、昆虫のゲノム編集ができるようになりました。

1. 背景

近年のゲノム編集ツールの開発によって、昆虫においても[ゲノム編集¹](#)が可能となっています。しかし、従来の方法では昆虫の卵（初期胚）にゲノム編集ツール（[CRISPR/Cas9²](#)など）を注射する必要があります。これには高価な実験機材や技術的なトレーニング、そしてターゲットの種ごとに特別な実験系のセットアップが必要になります。また、従来法では原理上ゲノム編集できない、あるいは著しく困難な昆虫も存在しています（卵胎生、卵鞘、超小型、内部寄生者など）。従来法には以上のような限界があり、これが昆虫科学の基礎研究の発展とゲノム編集昆虫の産業応用を阻む障壁となってきました。

2018年、米国の研究グループが、蚊のメス成虫にCRISPR/Cas9を注射することによってゲノム編集を行うことができることを報告しました(Chaverra-Rodriguez et al. 2018 Nature Communications 9, 3008)。しかし、この方法には、改変型のCas9タンパク質を独自に作成する必要があること、ゲノム編集の効率が従来の卵注射にくらべてはるかに低いことなど、様々な問題点があり、昆虫全般に、あるいは他の研究者が気軽に使うことのできる方法へと一般化できるものではありませんでした。

そこで本研究では、成虫注射によるアプローチの大幅な簡略化と高効率化、そして対象種の拡大を目指し、世界の誰でも、すぐに、簡単に、ほとんどの昆虫種で使うことのできる昆虫ゲノム編集法の開発を試みました。

2. 研究手法・成果

研究グループはまず、チャバネゴキブリをモデルとして、成虫注射による昆虫ゲノム編集の実現可能性を検証しました。チャバネゴキブリの卵は卵鞘に覆われており、卵への注射が極めて困難です。しかし、成虫への注射ならば簡単に行うことができます（[図1A](#)）。

チャバネゴキブリのメス成虫にゲノム編集ツール（CRISPR/Cas9）を注射し、そのメスが産んだ卵から孵化した幼虫を調べたところ、低頻度（2%程度）ながらゲノム編集された個体を見出しました。そこで、条件検討を行うことによって、研究グループの新しいアプローチによるゲノム編集効率の最大化を試みました。その結果、注射したすべてのメス成虫がゲノム編集個体を産み、全体では生まれた子の20%ほどがゲノム編集個体となるほどの高効率化を達成しました。ゲノム編集された子同士を交配することにより、世界で初めての[遺伝子ノックアウト³](#)ゴキブリ系統を樹立することもできました（[図1B](#)）。ゴキブリは卵への注射ができない「難敵」でしたが、成虫への注射によって簡単にゲノム編集できる「御しやすい」グループに変化したこととなります。

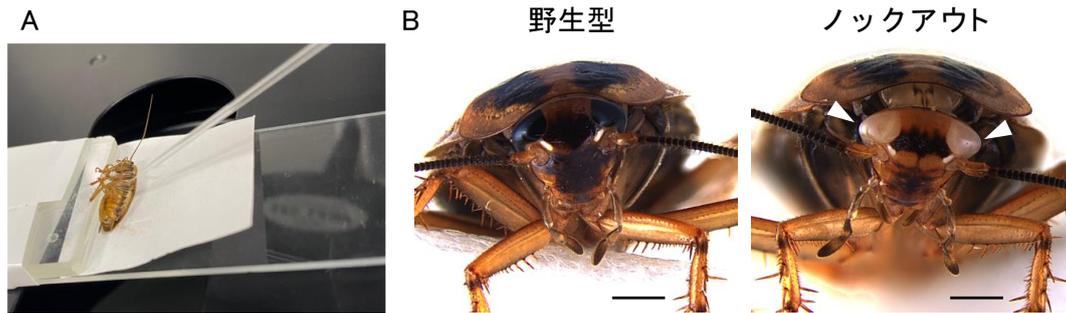


図1. チャバネゴキブリのゲノム編集

(A) メス成虫に注射する様子。(B) ゲノム編集によって白眼になったノックアウトゴキブリ(右)。

次に研究グループは、この方法が他の昆虫へと広く適用できるのか、その可能性について検証しました。ゴキブリとは系統的に遠く離れた甲虫の1種であるコクヌストモドキで実験を行ったところ、この種においても高効率なゲノム編集が可能であることがわかりました(図2)。最適条件下におけるゲノム編集効率は50%を超えており(つまり、生まれた子の半数以上がゲノム編集個体となる)、当初の期待をはるかに超える高効率化を達成しました。さらに、より高度なゲノム編集である[遺伝子ノックイン](#)³にもDIPA-CRISPRを用いることができることもわかりました。

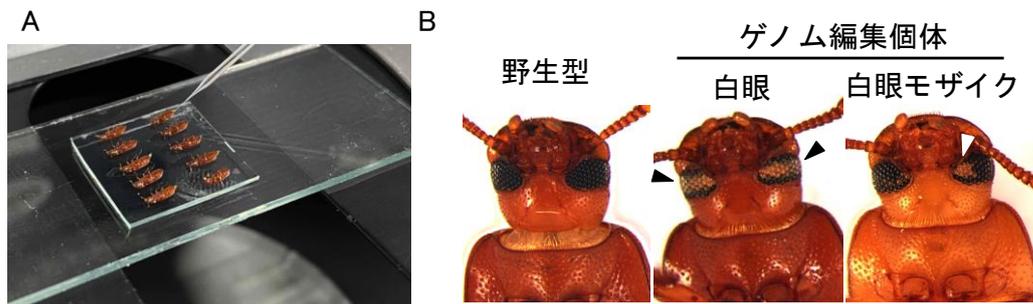


図2. コクヌストモドキのゲノム編集

(A) メス成虫に注射する様子。(B) 注射したメスが産んだ子。ゲノム編集によって両眼が白色に(中)、または眼の一部が白色に(右)になった子が得られた。

さらに、研究グループは注射する試薬の種類についても検討し、この方法にはわずか2種類の試薬を用いるだけでよいことを見出しました(Cas9タンパク質とガイドRNA)。Cas9は一般的な市販品をそのまま使えばよく、ガイドRNAも多くの企業が受託合成サービスを提供しています。したがって、この方法には特別な準備が必要ないこととなります。市販品をそのまま(ダイレクトに)親に注射する、という意味を込めて、この方法をDirect Parental CRISPR(DIPA-CRISPR)と名付けました。

DIPA-CRISPRでは、[卵黄形成期](#)⁴のメス成虫の体腔内にCas9とガイドRNAの複合体(Cas9 RNP)を注射し、そのメスにゲノム編集された子世代を産ませます。昆虫は[開放血管系](#)⁵をもつため、注射されたCas9 RNPは体液に乗って全身を循環します。一方、卵黄形成期の卵母細胞は、卵黄タンパクを体液から[エンドサイトーシス](#)⁶で大量に取り込み、細胞内に蓄積させていきます。これらの性質を利用することによって、メス成虫が抱える卵母細胞にCas9 RNPを取り込ませることができ、そこでゲノム編集を行うことができます(図

3)。

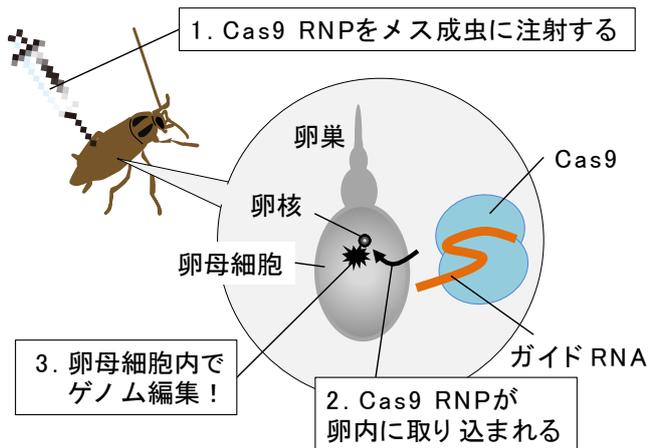


図3. DIPA-CRISPRのしくみ

卵黄形成期のメス成虫にCas9とガイドRNAの複合体(Cas9 RNP)を注射すると、その一部が卵母細胞内に取り込まれる。取り込まれたCas9 RNPは卵母細胞の核(卵核)へ移行し、そこで標的のゲノムDNAを切断、ゲノム編集が行われる。

DIPA-CRISPRは、メス成虫に注射することで昆虫のゲノム編集を可能とする画期的な方法です。高価な機材や技術的な熟練は不要であり、特別な試薬も必要ありません。また、原理上、100万種を超える昆虫のほとんどに適用可能であると考えられます。

3. 波及効果、今後の予定

昆虫科学は昆虫の特異な形態・生理・生態等を理解することで将来にわたる人類の生存を保証しようとする学問分野です。DIPA-CRISPRの開発によって、誰でも、すぐに、簡単に、自由なアイデアで昆虫のゲノム編集ができる時代が大きく近づきました。今後、DIPA-CRISPRのさらなる高効率化、多用途化を図ることにより、新たな昆虫資源の開発や、農業害虫・衛生害虫の新たな管理法の開発につながるものと期待されます。

4. 研究プロジェクトについて

本研究は、日本学術振興会(JSPS)科学研究費助成事業(20H02999、20K21311)、JSPS二国間交流事業(JPJSBP120209917)、JSPS特別研究員奨励費(21J20658)および内閣府ムーンショット型農林水産研究開発事業(JPJ009237)の助成を受けて実施されました。

<用語解説>

- 1. ゲノム編集** 部位特異的にDNAを切断することができるヌクレアーゼ(核酸分解酵素)を用いて、ゲノム上の狙った位置に変異を導入する技術。ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9などが開発されている。
- 2. CRISPR/Cas9** 現在最も広く用いられているゲノム編集ツール。Cas9というヌクレアーゼと、Cas9を標的配列へと導くガイドRNAを組み合わせて用いる。
- 3. 遺伝子ノックアウト、ノックイン** ある遺伝子の機能を知るために、その遺伝子に機能喪失型の変異を導入する(遺伝子ノックアウト)、あるいは外来の任意の配列を挿入する(遺伝子ノックイン)ための遺伝学的手法。ゲノム編集技術の開発により飛躍的に容易となった。
- 4. 昆虫の卵黄形成** 昆虫の卵母細胞は、前卵黄形成期、卵黄形成期、卵殻形成期を経て完成卵となる。このうち卵黄形成期では、卵母細胞内への卵黄タンパク質(ビテロジェニン)の蓄積が大量に行われる。ビテロジェニンは前駆体の形で体液中に存在、循環しており、卵母細胞はこれをエンドサイトーシスによって大量に取り込んでいく。このとき、ビテロジェニン以外の物質も非選択的に卵母細胞内に取り込まれることが知られて

おり、DIPA-CRISPRはこの性質を利用して Cas9 RNP を卵母細胞内にデリバリーする。

5. **開放血管系** 節足動物にみられる循環系。動脈と静脈をつなぐ毛細血管が存在せず、動脈から流れ出た血液（血リンパともよばれる）は組織の間を流れて静脈に戻る。

6. **エンドサイトーシス** 細胞が、細胞膜を通り抜けることができない細胞外の物質を取り込む過程の1つ。細胞膜の一部が陥入し、小胞を形成することによって細胞内に取り込まれる。

<研究者のコメント>

私たちが開発したこのゲノム編集法は、本当に驚くほど簡単です（虫たちの方が驚いているかもしれません）。これまで技術的なハードルがあった昆虫たちに広く利用され、昆虫科学が大きく発展していくことを願っています。（白井）

学生時代、「農学の真の成果は人類が改変した生物そのものにある」と教わりました。今回の成果は、この教えに対する私なりの答えであるように感じています。（大門）

<論文タイトルと著者>

タイトル： DIPA-CRISPR is a simple and accessible method for insect gene editing.
(DIPA-CRISPR はシンプルかつアクセシブルな昆虫遺伝子編集法である)

著者： Yu Shirai, Maria-Dolors Piulachs, Xavier Belles, Takaaki Daimon

掲載誌： Cell Reports Methods

DOI： <http://dx.doi.org/10.1016/j.crmeth.2022.100215>