

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	白井 雄
論文題目	Development of a method for insect genome editing by adult injection (成虫注射による昆虫ゲノム編集法の開発)		
(論文内容の要旨)			
<p>昆虫は現在の地球上でもっとも種数の多い生物群であり、熱帯から極地にわたる多様な環境に進出している。これを可能にしたのは、昆虫が4億年をかけて進化させてきた特異かつ多彩な形態・生理・生態である。</p> <p>近年のゲノム編集技術の発展により、原理上、すべての昆虫においてゲノム編集が可能となっている。しかし、従来のゲノム編集法では、昆虫の初期胚(卵)にゲノム編集ツールをインジェクションする必要があり、種ごとの特別なセットアップ、高額な機器、高度な注射技術の習得等が要求される。そのため、昆虫においてゲノム編集を行うことができるのは、実験モデル化が進んだ一部の昆虫種と、それを扱うことができる一部の研究者にとどまっている。しかし近年開発されたReMOT法では、卵への注射ではなく、卵黄形成期のメスのネッタイシマカ(蚊)成虫にゲノム編集ツールCRISPR/Cas9を注射することによって、成虫体内で発育中の卵母細胞においてゲノム編集を行うことに成功している。</p> <p>本研究は、成虫注射によるゲノム編集法の可能性をさらに追求することにより、成虫注射によるアプローチを昆虫全般において適用可能な実験系へと拡張・発展させることを目的とするものである。本論文では新規の昆虫ゲノム編集法の開発とその最適化が行われており、以下のように要約される。</p> <p>第1章では、昆虫ゲノム編集法の技術開発の現状と問題点を整理した。昆虫の中には初期胚への注射が著しく困難なものが存在すること、このような種においては成虫注射によるゲノム編集法の開発が極めて重要となることを論じた。また、既報のReMOT法には様々な問題点が内包されており、より簡便で高効率なゲノム編集法の開発が急務であることを指摘した。</p> <p>第2章では、コウチュウ目のモデル昆虫であるコクヌストモドキを用いて、ReMOT法によるゲノム編集が試みられた。キイロショウジョウバエの卵黄タンパク質由来の卵移行リガンドP2Cを付加したCas9タンパク質を大腸菌で発現・精製し、眼色のマーカー遺伝子である<i>cardinal</i>を標的とするgRNAとともにコクヌストモドキのメス成虫に注射した。注射されたメスが産んだ子において表現型スクリーニングを行った結果、1匹のゲノム編集個体を得た。この結果は、成虫注射によるアプローチは蚊だけでなく甲虫においても有効であることを示唆する。しかし、そのゲノム編集効率(子世代の個体のうち、ゲノム編集アリルを持つ個体の割合)は極めて低く(0.38%)、実用レベルには程遠いものであったことから、ReMOT法を様々な分類群に広く展開していくことは現実的ではないと考えられた。</p> <p>第3章では、成虫注射による新たなゲノム編集法の開発とその最適化が行われた。まず、初期胚への注射が極めて困難であるチャバネゴキブリをモデルとして、市販のCas9タンパク質を眼色のマーカー遺伝子である<i>cinnabar</i>を標的とするgRNAとともにメス成虫に注射した。その結果、市販のCas9の成虫注射によって、ゴキブリのゲノム編集が可能であることが示された。既製の試薬をそのまま注射に用いることから、この方法はDirect Parental CRISPR (DIPA-CRISPR) 法と名付けられた。さらに、最適な実験条件を見出した結果、最適条件下ではゲノム編集効率が20%を超えることが示された。また、子世代に導入されたゲノム編集アリルが次世代に高確率で遺伝することを</p>			

示し、ゴキブリ目昆虫においてはじめての遺伝子ノックアウト系統の樹立に成功した。次に、コクヌストモドキにおいてもDIPA-CRISPR法による遺伝子ノックアウト実験を行い、ゲノム編集効率が最大で70%に達することを示した。さらに同種において、DIPA-CRISPR法による遺伝子ノックインを成功させた。本章の最後では、DIPA-CRISPR法の成否や効率を左右する重要なパラメータを示し、さらに、Cas9とgRNAの複合体（Cas9 RNP）が卵黄形成期の卵母細胞の中に取り込まれるメカニズムについて考察した。

第4章では、DIPA-CRISPR法によるネッタイシマカ（ハエ目、カ亜目）のゲノム編集実験を行った。卵黄形成期のメス成虫にCas9 RNPを注射することにより、ゲノム編集効率は最大で3.5%に達することが示された。昆虫の卵巣には大きく3つのタイプが存在するが、無栄養室型（チャバネゴキブリ）、端栄養室型（コクヌストモドキ）、多栄養室型（ネッタイシマカ）のすべてのタイプにおいてDIPA-CRISPR法による高効率なゲノム編集が可能であったことから、本法は広く昆虫全般において有効なアプローチであると結論した。

第5章では、本研究の総括を行うとともに、成虫注射によるゲノム編集法の現状を整理した。また、ゲノム編集効率を上昇させるための方策、遺伝子ノックアウト効率を上昇させるための方策、甲殻類など他の節足動物へと対象を拡張させるための方策など、今後の研究開発課題を提案した。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

昆虫科学は昆虫の特異な形態・生理・生態を理解することにより、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ある。ゲノム編集は、昆虫の諸形質を理解するための基礎研究、そして昆虫の驚異的な生物機能を利用するための応用研究を推進する上で必須となる遺伝学的手法である。本研究によって開発されたDIPA-CRISPR法は、ゲノム編集の対象種の範囲を大幅に拡張させる画期的な手法であり、多種多様な非モデル昆虫において簡便かつ高効率なゲノム編集を可能とする研究環境が構築された。本論文の評価すべき点は以下の通りである。

1. 既製のCas9 RNPをメス成虫に注射するという、極めて簡便な手法によって高効率な昆虫のゲノム編集が可能であることを示した。DIPA-CRISPR法を用いることで、これまで遺伝子改変がなされてこなかったチャバネゴキブリのゲノム編集をはじめて成功させた。これによって、初期胚への注射が困難な種であっても成虫注射という新たなアプローチによってゲノム編集が可能であることを示した。
2. DIPA-CRISPR法の実験条件を種ごとに最適化することによって、ゲノム編集の成否と効率がメス成虫のステージに大きく依存するという現象を見出した。本法の実施にあたって、種ごとの繁殖生理や産卵特性に応じた適切な実験条件の設定が重要となることを明らかにした。
3. コウチュウ目、ゴキブリ目、ハエ目という進化的に離れた3つのグループにおいてDIPA-CRISPR法が有効であることを示した。これらはそれぞれ端栄養室型・無栄養室型・多栄養室型という異なるタイプの卵巣をもつことから、DIPA-CRISPR法はほとんどの昆虫種において適用可能であることが示唆された。
4. Cas9 RNPとドナーDNAを同時に成虫に注射することによって、部位特異的な塩基置換を導入することができることを示した。これによって、DIPA-CRISPR法によって遺伝子ノックインも可能であることが明らかになった。

以上のように、本論文は成虫への注射による昆虫のゲノム編集法を確立し、昆虫ゲノム編集法に技術革新をもたらした。本論文は多種多様な昆虫において簡便かつ高効率にゲノム編集を行うことができる研究環境を実現させるものであり、昆虫遺伝学、昆虫発生学、進化発生学、応用昆虫学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和6年1月22日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）