

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：32606

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03949

研究課題名(和文)カイコおよび近縁の絹糸昆虫における食性決定の分子機構とその進化・家畜化過程の解明

研究課題名(英文) Studies on molecular mechanism controlling food preference in *Bombyx mori* and the related silkmths and the process of their evolution and domestication of their food

研究代表者

嶋田 透 (Shimada, Toru)

学習院大学・理学部・教授

研究者番号：20202111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,600,000円

研究成果の概要(和文)：カイコは通常クワ単食性であるが、クワ以外の餌を摂食する広食性変異体が存在する。エリサンはヒマ食性であるが、シンジュサンはヒマでは成長できない。カイコ変異体の遺伝学的解析およびエリサン・シンジュサンの種間交雑を行った結果、カイコでは責任遺伝子をほぼ特定し、エリサンでもゲノム上の候補領域を絞り込むことができた。シンジュサンがヒマで成長できない理由は、葉に含まれる毒素リシニンであると推定された。RNA-seq解析でヒマ育のエリサン中腸で特異的に発現する遺伝子を探索した結果、チトクロームP-450やニトリラーゼなどの遺伝子の転写物が増加していた。それらがヒマへの耐性に関与していることが示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植食性昆虫の多くは単食性または狭食性であり、限られた寄主植物のみを食害する。この昆虫・植物間の関係の特異性は、生態系の成り立ちを理解するために重要なテーマであるとともに、害虫防除や養蚕分野の問題解決に必要な課題でもある。本研究は、植物が食害への防御のために作り出す化合物(毒素)に対して、昆虫がどのような遺伝子を進化させて、それらに対抗してきたか、そのメカニズムの一端を明らかにした。特に、エリサンでは家畜化に伴って食性が大きく変化し、新しい餌であるヒマへの適応を果たしたことを示すとともに、その適応の分子機構の一部を解明した。

研究成果の概要(英文)：Although the silkworm, *Bombyx mori*, is monophagous to mulberry (*Morus* spp.), there are polyphagous mutants that can feed on non-mulberry diets. The eri silkworm, *Samia ricini*, mainly feeds on leaves of castor (*Ricinus communis*) while the wild species *Samia cynthia* does on leaves of *Ailanthus* spp. Genetic studies of the *B. mori* revealed a responsible gene for the polyphagous trait, and inter-specific hybridization experiments between *S. ricini* and *S. cynthia* elucidated that a genomic region potentially controls the resistance to toxicity of castor leaves. Our physio-biochemical analyses indicated that ricinine (a pyridone alkaloid) contained in castor inhibits the larval growth of *S. cynthia*. RNA-seq analysis revealed that several genes encoding cytochrome P-450, nitrilase, etc. are specifically unregulated in midgut of the larvae fed on castor leaves, suggesting that their gene products contribute to the resistance of *S. ricini*.

研究分野：昆虫遺伝学

キーワード：食性 カイコ エリサン 感覚神経 植物毒素

1. 研究開始当初の背景

植食性昆虫の多くは単食性または狭食性であり、限られた寄主植物のみを食害する。この昆虫・植物間の関係の特異性は生態系の成り立ちを理解するために重要なテーマであるとともに、害虫防除や養蚕分野の問題解決に必要な課題でもある。昆虫は植物の最大の捕食者であるため、植物は進化の過程で昆虫に対する防御機構を発達させており、特に二次代謝産物を毒素として用いて耐虫性を発揮している。一方で、昆虫も種々の方法で植物の毒性・耐虫性を回避することに成功し、生き延びて多様化してきた。このような両者の関係は、共進化 (co-evolution) の好例として紹介される。しかし、どのようなメカニズムで昆虫が植物の毒性を克服したか、具体的に解明された例はほとんどない。

カイコおよび近縁の絹糸昆虫は、種ごとに異なる植物を食餌としており、その特異性は明確である。カイコガ科には、カイコのようにほぼクワ単食性の種と、イチジクカサンのように、クワを寄主とせずにイチジク属 (*Ficus*) の植物に寄生する種とがあり、進化の過程で食草転換が起きたと考えられる。なぜカイコがクワ以外の植物を摂食せず、なぜイチジクカサンがイチジク属植物しか摂食しないのか、その理由は解明されていない。また、ヤママユガ科の昆虫においても寄主植物の多様性があり、近縁種でも食性が異なることが多いが、種特異的な食性の機構は不明である。

2. 研究の目的

植食性昆虫の寄主植物は、雌成虫の産卵場所の選好性と、幼虫の探索・摂食行動の選択性によって決定される。カイコはクワ単食性の昆虫であるが、広食性の変異が存在する。また、ヤママユガ科のエリサンは、主にヒマの葉で飼育される家畜絹糸昆虫であるが、その近縁野生種のシンジュサンは、シンジュなどを寄主とする狭食性の種であり、ヒマでは育たない。さらにエリサンはクワを摂食するが致死する一方で、広食性カイコはヒマを摂食すると致死することから、それぞれの植物に耐虫性毒素が存在することがわかる。本研究では、遺伝学的、比較ゲノム科学的、生化学的な手法で食性を支配する分子・遺伝子を探索するとともに、家畜化によって生じた広食性変異の原因遺伝子を特定し、食性決定機構を解明しようとした。

3. 研究の方法

カイコ・クワコ (クワ食)、イチジクカサン (ガジュマル食)、エリサン (ヒマ食)、シンジュサン (シンジュ食) を材料にし、分子生物学的、遺伝学的および生化学的な手法を用いて研究した。クワ乳液に含まれる糖類似アルカロイドへのカイコ・クワコの耐性には、スクラーゼやトレハラーゼの糖類似アルカロイド抵抗性が寄与することが知られているため、それら遺伝子の分子進化を解析した。また、カイコに存在する複数の広食性変異体を用いて、交配実験による広食性形質の責任遺伝子のポジショナルクローニングを行った。エリサンとシンジュサンの交雑により、ヒマ食性の形質のポジショナルクローニングを行った。一方、エリサンとシンジュサンの食性の差異のメカニズムの解明のために、ヒマ葉に含まれるピリドンアルカロイドの一種リシニン (ricinine) に注目した化学分析も行った。

4. 研究成果

(1) クワの糖類似アルカロイドへの抵抗性を持つスクラーゼの進化

カイコ・クワコの糖類似アルカロイドへの耐性に関するスクラーゼは、Suc1 と呼ばれる -フルクトフラノシダーゼであることが知られている。昆虫における Suc1 に相同な遺伝子を広く探索した結果、チョウ目の進化の比較的初期に起きた遺伝子水平転移とその後の遺伝子重複により、チョウ目の多様な Suc1 ホモログの存在を説明できることが明らかになった。

(2) 食性の変異を利用した遺伝学的解析

カイコの系統「沢 J」は、キャベツへの摂食性で選抜された広食性系統であり、その広食性形質の主働遺伝子は第 3 染色体の *pph* である。正常食性を示す C108T と沢 J の戻し交雑後代のうち、桑葉粉末を含まない人工飼料を摂食した個体のみを用いてポジショナルクローニングを行った結果、*pph* の責任領域を約 450 kbp へ絞り込んだ。さらに、沢 J のゲノムリシーケンシングを行い、参照配列と比較した結果、沢 J では *pph* の候補領域内に約 24kbp の欠失が存在していた。この欠失領域内には 1 遺伝子のみが予測された。p50T 系統を用いて CRISPR/Cas9 法で当該遺伝子を破壊してノックアウトカイコを作成したところ、幼虫の人工飼料摂食性が向上した。したがって、当該遺伝子が *pph* の責任遺伝子であると考えられた。

エリサン(Sr と略す)の幼虫は、ヒマ葉を給餌すると成長速度が最大となり、シンジュ葉を与えると成長速度や最大体重が小さくなる。一方、シンジュサン (*Samia cynthia*; Sc と略す)の幼虫は、ヒマではほとんど発育できないが、シンジュならば良好に発育する。これら 2 種は交雑可能で雑種の妊性もある。(Sc x Sr)F1 x Sc の次代をヒマで飼育して生き残り、かつ幼虫期間が短い個体には、エリサン由来の第 10 染色体を保有するケースが多かった。また Sc x (Sc x Sr)F1 の次代をヒマで飼育し、早期に営糞する個体からゲノム DNA を調製して Bulked segregant 解析(BSA)を行った結果、第 10 染色体の一部に SNP インデックスのピークが観測された。ここにヒマ食性を司る主働遺伝子が存在すると予想される。

(3) エリサンのヒマ毒素への抵抗性に関する遺伝子の探索

エリサンの主な食餌植物はヒマであるが、エリサンの野生種である *Samia canningi* や近縁種シンジュサンは、シンジュなど *Ailanthus* 属の植物を主な寄主植物としている。前述したとおり、これら野生種はヒマに寄生することはなく、ヒマ葉を与えても成長できずに死亡するので、エリサンは、家畜化の過程で *Ailanthus* 属からヒマへの食草転換を起こしたと推定される。そこで、エリサンのヒマ食性の獲得に関わる遺伝子機構を解明する目的で、比較トランスクリプトーム解析によって、ヒマ葉が含有するリシニン(ricinine)への耐性に関わる遺伝子を探索した。その結果、ヒマを与えたエリサン幼虫の体組織にリシニンの蓄積が見られなかったため、リシニンの分解が消化管内で起こっていることが推定された。また、ヒマ、シンジュ、人工飼料のそれぞれで飼育したエリサン 5 齢幼虫の中腸を、RNA-seq に供し、ヒマ育のエリサンにおいて高発現している転写物を探したところ、約 10 個の遺伝子を発見した。すなわち、グルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST)、チトクローム P450、およびニトリラーゼをコードする遺伝子の転写物が増加していた。これらの遺伝子がリシニンへの耐性に関与している可能性がある。

(4) エリサン幼虫体内でのリシニンの分解機構

ヒマ葉の毒素リシニンに対して、エリサンがなぜ中毒を起こさないか、その耐性機構について生理生化学的な解析を行った。ヒマ葉とシンジュ葉が含有するリシニン量を HPLC で比較した結果、ヒマ葉は乾物重で約 1900ppm のリシニンを含有していたのに対して、シンジュ葉には検出限

界以下の量しか存在しなかった。この顕著な差異から、エリサンは何らかの機構でリシニンへの耐性を獲得していることが分かる。そこで、ヒマ育のエリサン 5 齢幼虫の糞に含まれるリシニンを HPLC で定量したところ、ヒマ葉のリシニン含量の約 20%にまで低下していた。この差分に相当するリシニンが、エリサン幼虫の組織に蓄積しているかどうかを調べたところ、血液や各内臓組織のリシニン含量は、いずれもヒマ葉のその 100 分の 1 未満だった。したがって、エリサンはリシニンを体内、特に消化管において分解している可能性が高い。前述した RNA-seq の結果と合わせて考察すると、ヒマ育のエリサンの中腸で特異的に発現上昇する遺伝子の産物がリシニンの解毒に関与していることが推定される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Zhou Y, Li X, Katsuma S, Xu Y, Shi L, Shimada T, Wang H.	4. 巻 28(24)
2. 論文標題 Duplication and diversification of trehalase confers evolutionary advantages on lepidopteran insects.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Ecol.	6. 最初と最後の頁 5282-5298
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/mec.15291	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Dai X, Kiuchi T, Zhou Y, Jia S, Xu Y, Katsuma S, Shimada T, Wang H.	4. 巻 38(7)
2. 論文標題 Horizontal gene transfer and gene duplication of -fructofuranosidase confer lepidopteran insects metabolic benefits.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Biol Evol.	6. 最初と最後の頁 2897-2914
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1755-0998.13259	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Lee J, Nishiyama T, Shigenobu S, Yamaguchi K, Suzuki Y, Shimada T, Katsuma S, Kiuchi T.	4. 巻 21(1)
2. 論文標題 The genome sequence of <i>Samia ricini</i> , a new model species of lepidopteran insect.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol Ecol Resour.	6. 最初と最後の頁 327-339
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1755-0998.13259	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 嶋田透	4. 巻 90(3)
2. 論文標題 チョウ目昆虫のゲノム情報の整備状況と野蚕ゲノム解析。(特集 野蚕のバイオリソースとゲノム情報).	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 蚕糸・昆虫バイオテック	6. 最初と最後の頁 165-177
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 J. Lee, T. Kiuchi, S. Katsuma and T. Shimada
2. 発表標題 Forward and reverse genetics of wild silkmths.
3. 学会等名 The 10th International Workshop on the Molecular Biology and Genetics of the Lepidoptera August 19-25, 2018 (the Orthodox Academy in Kolympari, Crete, Greece) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菊地玄太・木内隆史・李允求・川本宗孝・竹村洋子・大沼昭夫・新保博・勝間進・嶋田透
2. 発表標題 カイコ広食性系統汎Jの主働遺伝子pphの同定.
3. 学会等名 平成31年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会（日本蚕糸学会第79回大会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 李允求・木内隆史・豊田敦・嶋田透
2. 発表標題 エリサンとシンジュサンのゲノム解析
3. 学会等名 第63回日本応用動物昆虫学会大会・小集会（カイコと近縁蛾類のバイオリソースとゲノム-NBRPプロジェクトの取組み-）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡本真奈・嶋田透・李允求
2. 発表標題 エリサン(ヤママユガ科)の家畜化に伴う食草転換の分子機構.
3. 学会等名 第66回日本応用動物昆虫学会大会. 2022年3月20-22日.(明治大学、オンライン)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Toru Shimada	4. 発行年 2018年
2. 出版社 CRC Press	5. 総ページ数 308
3. 書名 Basic and Applied Genetics of Silkworms (Chapter 1). In "Silkworm Biofactory: Silkroad to Bioroad", pp. 1-14, Edited by Katsumi Maenaka and Enoch Park.	

1. 著者名 嶋田 透 (共編著者)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 カイコの科学 2.1.カイコの遺伝研究の歴史 (31-34ページ) 日本蚕糸学会編.	5. 総ページ数 224
3. 書名 朝倉書店	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	永田 晋治 (Nagata Shinji) (40345179)	東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------