

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21380042

研究課題名（和文）メス特異的性染色体Wの進化をカイコとクワコの比較ゲノムから明らかにする

研究課題名（英文）Evolution of W, female-specific sex chromosome through the comparative genomics between *Bombyx mori* and *B. mandarina*

研究代表者

門野 敬子 (KADONO-OKUDA KEIKO)

独立行政法人農業生物資源研究所・昆虫ゲノム研究ユニット・上級研究員

研究者番号：40355722

研究成果の概要（和文）：カイコ、クワコと近縁種のW染色体構造を解析した。クワコは約1400万年前にインドクワコ *Bombyx huttoni* と分岐し、約700万年前に *zinc-finger* 遺伝子2つがWに転座して新規W祖先型(*z1-z20*)が誕生、約30万年前に重複を起こした新規W型が急激に広まったが、約10万年前に大陸から分離した日本への侵入はなかった。現在カイコと日本以外のクワコWは(*z1-z20*)が4コピーである。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the W-chromosome construction in *B. mori*, *B. mandarina* and other related species. *B. mandarina* and *B. huttoni* was branched 14 million years ago(MYA). In *B. mandarina* one copy set of two genes was translocated from an autosome to W-chromosome (*z1-z20*) in 7 MYA, and *z1-z20* was duplicated on W-chromosome 0.3 MYA. Such a new type of *B. mandarina* containing duplicated *z1-z20* on W-chromosome had spread drastically. But, since Japan islands have been isolated from the continent 0.1 MYA, the new type did not invade in Japan. In present, there are 4 copies of *z1-z20* in all *B. mori*, and *B. mandarina* except for Japan.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,500,000円	2,250,000円	9,750,000円
2010年度	6,700,000円	2,010,000円	8,710,000円
2011年度	700,000円	210,000円	910,000円
年度			
年度			
総計	14,900,000円	4,470,000円	19,370,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：養蚕・蚕糸

## 1. 研究開始当初の背景

近年、W染色体を除くカイコゲノム情報が整備され、ゲノム改変による生物工場やゲノム創薬などの研究も進んでいる。一方、ゲノム解析の次の段階として、野生種であるクワコとの比較ゲノム解析も進んでいる。以上のことから、クワコからカイコへの家畜化の過程がゲノムレベルで解明されれば、カイコという貴重な遺伝子資源にとって多くの有益

な情報が得られる。特に、カイコではW染色体は組み換えを起こさないことが知られており、進化の過程での様々な変異が蓄積されるので、進化を追跡する上で非常によいターゲットである。そこで、カイコW染色体の概要構造解明を開始し、性決定因子と思われる2つの遺伝子を発見した。この過程で作製したマーカーを用いて、カイコに最も近縁な野生種であるクワコのW染色体を調べたとこ

る、アジア各地でWの構造が異なっているらしいことがわかってきた。過去数百万年の間に、アジアにおいてクワコのW構造にダイナミックな変遷があったことが推察される。

## 2. 研究の目的

クワコの起源と分散という時空間の流れをW染色体の進化から系統解析することで、アジア地域での昆虫の進化・分散のモデルケースとなるだけでなく、その成果は、この地域のこれまでの地殻変動や気候変動の解明、および遺伝子資源の保護にも貢献すると思われる。そこで、クワコの起源とアジアでの分散、カイコへの家畜化の過程を、アジア各地に生息するクワコのW染色体のゲノム構造を解析することにより明らかにする。

## 3. 研究の方法

アジア各地のクワコまたはそのDNAを収集し、W染色体の構造解析を行いW集団の分布図を作る。クワコWの進化・分布、クワコの原産地、カイコの起源地等のモデルを作成し考察する。比較としてミトコンドリアDNA上の遺伝子、常染色体上の遺伝子の塩基配列解析を行い、分岐年代などを推定する。

(1) 構造決定は、カイコ祖先型のWに関してはPCRによって簡易的に行う。

(2) 日本クワコのW染色体上のマーカーを作製し、性決定遺伝子を単離する。それをもとに新たな構造検出システムを構築する。

(3) Wおよび常染色体、ミトコンドリアDNA上の特定遺伝子の塩基配列を決定し系統分類を行う。

## 4. 研究成果

### (1) W染色体上の遺伝子解析

カイコW染色体において性決定遺伝子の候補となる、2つのzinc-finger遺伝子(*z1*, *z20*)を単離・解析した。しかし、これらの遺伝子は日本クワコのWにはなく、さらに、日本クワコWと中国・韓国クワコWの構造が全く異なることを発見した。そこで、インド2、中国6、台湾2、韓国2、日本11地域のクワコのW染色体、参照として、ミトコンドリアDNA、および常染色体上の遺伝子をPCRにより解析した。アジア広域におけるクワコWの分散地図を作成し、また、系統解析により、どのようにして2つの異なるWが誕生したかを推定した。

Wの構造から次の3グループに分類された。

【カイコW型】日本以外の全ての東アジア大陸のクワコサンプルがここに入る、【日本クワコW型】全ての日本クワコのサンプル、【その他】全てのインドクワコサンプル。現在マーカーなし。インドのクワコは、クワコとして分譲を受けたが、クワコに近い別種である可能性が高いと判断したが、後に、インド北部へ行き、採集した*B. huttoni*のDNAがまさに先のものと同じ遺伝子型を示したことから、分譲を受けたDNAサンプルはクワコで

はなく、インドクワコと言われる別種であったことがわかった。また、Wマーカーの変異速度は常染色体のものに比べて3~10倍遅いことが分かった(平均値はミトコンドリア:常染色体:W染色体 = 1:0.63:0.12)。推論として、クワコは約1400万年前にインド方面から東アジア方面に拡散し、約700万前に大陸の一地域でzinc-finger遺伝子が常染色体からWに転座することによって新規Wの祖先型が誕生したが、この新規Wは中立的で小規模集団でしかなかった。W上のzinc-finger遺伝子は重複によってコピー数を増やした(30万年前)。この時期に新規Wは性決定に有利な変異を獲得し大陸内で急激に広まった。現在大陸に存在するカイコ型Wは全てzinc-finger遺伝子が4コピーのものである。日本列島は約10万年前に大陸から地理的隔離して新規Wの侵入はなかったと考えられた。このようにして異なるWの分布が生じたと考えられる。性決定遺伝子の進化は速く、同一種においても集団によって多様性を示す場合がある。そのため大陸クワコと日本クワコは異なる性決定遺伝子を持つ可能性がある。なお、インド北東部、シベリアなど、サンプルの得られていない地域があり、推論を裏付けるためにもこれらの地域のサンプル収集が必要である。

また、アジア各地から採集したクワコ近縁種のゲノムおよびW染色体構造を比較し、進化を解析することを目的に、インド北部UttarakashiとSikkim、タイChiangmai、ベトナム北部TamDaoでクワコ近縁種を採集した。これらのゲノムDNAをW特異的マーカーや雌決定遺伝子*Fem*候補の*z1*, *z20*、およびミトコンドリア*COI*, *CO3*について調べ、これまでに入手しているデータとともに系統樹解析を行った。インドクワコ*B. huttoni*もクワコ*B. mandarina*と1400万年前に分岐し、*B. huttoni*は熱帯、亜熱帯の暖かい地域に進出し、クワコはアジアの寒い地域、温帯や亜寒帯に分布したと推測された。

### (2) ミトコンドリア*COI*遺伝子の解析

雌ではWと連鎖して伝わるミトコンドリアDNAの多様性を、フェロモントラップにより広域かつ大量に雄成虫を採集し検討した。国内の25集団1506個体に対して*COI*(Cytochrome Oxidase Subunit I)遺伝子の塩基多型を指標に評価を実施したところ、74の異なるハプロタイプが確認された。個々のハプロタイプ間の塩基の違いは最大7、平均3.05であった。集団間のハプロタイプの分布には異質性が見られた。これは、W染色体においても大きくはないものの地域間変異が存在することを示唆した。

### (3) 常染色体上のリピート配列の解析

各野蚕種の系統・分岐年代はミトコンドリア等のマーカーのシーケンスで解析可能で

ある。しかし、実際のゲノムのダイナミックな変遷を知るために、ゲノム中に存在する SINE (短鎖散在反復配列: short interspersed nuclear element) に注目した。SINE は染色体の再編成・遺伝子の発現調節等に関与し、ゲノムに最もインパクトを与えると予想される。そこでカイコ類縁野蚕ゲノムで *Bm1* の解析を行った。*Bm1* およびその類似型 SINE は多くのカイコガ上科のゲノムにも存在することが分かった。*Bm1* 構造の比較解析から、*Bm1* の駆動部の起源は転写因子 *Kendo* で、約 5400 万年前に分離したこと、および *Bm1* は発現部と駆動部が機能的に独立しており、相互に交換することにより進化したことがわかった。さらに、*Bm1* は現在も数百の活性型を持ち活発に増殖していること、*Bm1* の系統特異的な変異を分類することで年代測定の標識として利用可能であることを明らかにした。いっぽう、転移因子 mariner-like element (MLE) は多くの生物のゲノムに存在していることから水平伝播によって広がったと考えられている。カイコにも MLE は 6 タイプ報告されており、タイプごとにコピー数が異なっている。その中で唯一ゲノム上に 1 コピーしか存在しない第 6 番染色体上の *BmTMM1* 座位 (MLE に L1Bm と BMC1 が入れ子に挿入されたユニット) について、これら 3 つの転移因子のこの座位への挿入時期と順位を、クワコで明らかにした。3 つの転移因子とホストゲノムの置換速度はほぼ同じで、MLE はカイコとクワコの共通祖先のゲノムに挿入した古い MLE であること、*BmamaT1* は一部のクワコ集団ゲノムに最近挿入され、また抜け出たことが確認された。*BmamaT1* はクワコにおいて現在も活性を持っている可能性が示唆された。

#### (4) 常染色体上の *nsd-1*, *-2* 遺伝子の解析

常染色体上で国内各地のクワコや多数の国内外カイコ品種の多型解析を進めているカイコ濃核病ウイルス抵抗性遺伝子 *nsd-1*, *-2* について、海外から分譲を受けたその他のカイコガ科についても多型解析を行い、ウイルスとその抵抗性遺伝子からカイコガ科の進化を推定した。カイコ濃核病ウイルスは、諸性質の違いから 1 型と 2 型の 2 種類が存在する。それぞれのウイルスに対して抵抗性を示すカイコ品種や系統の存在から、3 つの独立した抵抗性遺伝子 (*nsd-1*, *Nid-1*, *nsd-2*) が明らかにされている。*nsd-2* の同定を終了し、現在、*nsd-1* 候補遺伝子の単離、証明もほぼ完了している。これらの相同遺伝子を、クワコからも単離し、その抵抗性あるいは感受性の遺伝子型とウイルス接種による反応が一致した。そこで、生物研北柱に保存されている日本、中国、欧州、熱帯種と呼ばれる多くのカイコ品種と、日本各地と中国、韓国、台湾の数地域で採集されたクワコおよびイ

ンドクワコについて、抵抗性/感受性遺伝子型をもとに分類を行った結果、*nsd-1*, *nsd-2* 両方の遺伝子型ともに、カイコの日本品種の抵抗性/感受性の割合がクワコの示す傾向ともっとも離れていることがわかった。すなわち、クワコはすべて 1 型抵抗性、2 型感受性であり、カイコでは、1 型感受性または 2 型抵抗性を示す品種が多かった。以上のことから、1 型ウイルスの本来の宿主はカイコガ科ではなかったのではないかと、日本における育種の過程で、1 型感受性、2 型抵抗性の変異が生じ、その後の交配、海外との蚕種の分譲、交換などによってこの突然変異型が拡散したと考えられた。また、濃核病ウイルスは宿主特異性の高いウイルスであるが、2 型は今回調べた限り、カイコガ科に広く感染可能であることが示唆され、ウイルスと宿主の共進化の点からも非常に興味深い。1 型は、カイコの祖先種や近縁種でも抵抗性であり、今のところ感受性を示すのは一部のカイコ系統のみであることから、本来の宿主の解明が必要である。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① Daimon T, Fujii T, Yago M, Hsu Y-F, Nakajima Y, Fujii T, Katsuma S, Ishikawa Y, and Shimada T. Female sex pheromone and male behavioral responses of the bombycid moth *Trilocho varians*: comparison with those of the domesticated silkworm *Bombyx mori*. *Naturwissenschaften*, 査読有り、99 (2012) 207-15
- ② Daimon T, Yago M, Hsu Y-F., Fujii T, Nakajima Y, Kokusho R, Abe H, Katsuma S, Shimada T. Molecular phylogeny, laboratory rearing, and karyotype of the bombycid moth, *Trilocho varians*. *Journal of Insect Science*, 査読有り、12 (2012) Published: 10 April 2012 online
- ③ Kawaoka S, Kadota K, Arai Y, Suzuki Y, Fujii T, Abe H, Yasukochi Y, Mita K, Sugano S, Shimizu K, Tomari Y, Shimada T, Katsuma Shimada, T., The silkworm W chromosome is a source of female-enriched piRNAs, RNA, 査読有り、17 (2012) 2144-51
- ④ 山田香織, 川西祐一, 奥間政一郎, 岩崎華子, 山田明德, 佐々木健志, 中島裕美子, 前川秀彰, 南西諸島に棲息する昆虫・クモ類における転移因子マリナー様配列 (MLE: mariner-like element) の比較系統解析、*Entomotech*, 査読有り、35 (2011) 13-39
- ⑤ 川西祐一, 前川秀彰, 中島裕美子, 分子系統解析によるクワコの進化と日本列島の地理的変動との関係 -カイコのゲノム情報とクワコの多型から-, 蚕糸・昆虫バイオテック, 査読なし、79 (2010) 109-117

⑥Abe H, Fujii T, Shimada T, Mita K., Novel non-autonomous transposable elements on W chromosome of the silkworm, *Bombyx mori*., Journal of Genetics、査読有り、89(2010)375-87

⑦Fujii T, Abe H, Shimada T., Molecular analysis of sex chromosome-linked mutants in the silkworm *Bombyx mori*., Journal of Genetics, 査読有り、53(2010)585-93

⑧Daimon T, Mitsuhiro M, Katsuma S, Abe H, Mita K, Shimada T., Recent transposition of yabusame, a novel piggyBac-like transposable element in the genome of the silkworm, *Bombyx mori*., Genome, 査読有り、53(2010)585-93

⑨ Liu C, Yamamoto K, Cheng TC, Kadono-Okuda K, Narukawa J, Liu SP, Han Y, Futahashi R, Kidokoro K, Noda H, Kobayashi I, Tamura T, Ohnuma A, Banno Y, Dai FY, Xiang ZH, Goldsmith MR, Mita K, Xia QY., Repression of tyrosine hydroxylase is responsible for the sex-linked chocolate mutation of the silkworm, *Bombyx mori*., Proc Natl Acad Sci U S A. 査読有り、107(2010)12980-5

⑩奥間政一郎, 川西祐一, 佐々木健志, 日高道雄, 前川秀彰, 中島裕美子, 亜熱帯に生息する昆虫・クモ類に見出される転移因子マリーナー様配列の水平伝播機構の解析、Entomotech、査読有り、34, 2010, 47-52  
<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/sanshi-kyushu/entomotech34.html>

⑪Fujii T, Kuwazaki S, Yamamoto K, Abe H, Ohnuma A, Katsuma S, Mita K, Shimada T., Identification and molecular characterization of a sex chromosome rearrangement causing a soft and pliable (*spli*) larval body phenotype in the silkworm, *Bombyx mori*., Genome, 査読有り、53, 2010, 45-54

⑫ Sivaramakurup Sreekumar, Keiko Kadono-Okuda, Ken-ichi Nagayasu and Wajiro Hara, Identification of 2nd chromosome region translocated onto the W chromosome by RFLP with EST-cDNA clones in the Gensei-kouken strains of the mulberry silkworm, *Bombyx mori* L., Genetics and Molecular Biology, 査読有り、33, 2010, 27-35

[学会発表] (計7件他19件)

①K. Kadono-Okuda, D. O. Ogoyi, H. Masui, K. Kidokoro, M. Ajimura, K. Ito, K. Yukuhiro, E. Kosegawa, Y. Banno, H. Maekawa, Y. Nakajima, K. Morimoto, M. Ichida, T. Adachi, K. Yamamoto, K. Mita, Molecular genetics of the densovirus resistance genes in *Bombyx* silkworms.,

22nd Congress of the International Sericultural Commission, 2011年12月14日-17日 Chiangmai (タイ)

②K. Mita (パステール賞受賞講演) Silk Genome Opens New Silk Road for Insect Sciences and Its Applications 同上

③Nakagome, S., Mano, S., Nakajima, Y., Ancient Mariner Transposon Targeted by Other Transposable Elements in the Genome of *Bombyx mori* and *B. mandarina*, Annual Meeting of the Society for Molecular Biology and Evolution, 2011年7月 京都大学

④味村正博, 三田和英他, カイコおよび近縁野蚕ゲノムにおける *BmI* について、クワコ談話会、2012年3月5,6日、琉球大学

⑤門野敬子, 味村正博, 三田和英, 中島裕美子, 前川秀彰, 行弘研司, 阿部広明他, カイコ濃核病ウイルスと抵抗性突然変異の起源、クワコ談話会、2012年3月5,6日、琉球大学

⑥行弘研司他, 日本産クワコの系統地理学、クワコ談話会、2012年3月5,6日、琉球大学

⑦中島裕美子他, カイコとクワコの *BmTNML* 座位における、転移因子の動向、クワコ談話会、2012年3月5,6日、琉球大学

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

門野 敬子 (KADONO-OKUDA KEIKO)

(独) 農業生物資源研究所・昆虫ゲノム研究ユニット・上級研究員

研究者番号: 40355722

### (2) 研究分担者

三田 和英 (MITA KAZUEI)

(独) 農業生物資源研究所・昆虫科学研究領域・特任上級研究員

研究者番号: 30159165

阿部 広明 (ABE HIROAKI)

東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・助教

研究者番号: 80222660

前川秀彰 (MAEKAWA HIDEAKI)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・教授

研究者番号: 60100096

中島裕美子 (NAKAJIMA YUMIKO)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・准教授

研究者番号: 70244340

行弘 研司 (YUKUHIRO KENJI)

(独) 農業生物資源研究所・遺伝子組換え

カイコ研究開発ユニット・主任研究員

研究者番号: 50343992

### (3) 連携研究者

嶋田 透 (SHIMADA TORU)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号: 20202111