

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ~ 2012

課題番号：23658045

研究課題名（和文）カイコの化性遺伝子から休眠の進化を考える

研究課題名（英文）Cloning and characterization of the *Voltinism* gene controlling biosynthesis and release of *Bombyx mori* diapause hormone

研究代表者

柳沼 利信 (YAGINUMA TOSHINOBU)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授

研究者番号：60135332

研究成果の概要（和文）：カイコ胚休眠の誘導因子である休眠ホルモンの合成・分泌を上位で調節すると考えられる化性遺伝子を単離し、その遺伝子構造の比較・解析からカイコ胚休眠の進化を考えることを目指した。ポジショナルクローニング、候補遺伝子の発現解析および候補遺伝子の推定アミノ酸配列比較・解析から、候補遺伝子として 5 遺伝子まで絞り込んだ。その後、それぞれの遺伝子の構造解析を進めている。

研究成果の概要（英文）：We aimed to clone and characterize the *Voltinism* gene that is conceived to control the biosynthesis and release of diapause hormone, an inducer of *Bombyx mori* embryonic diapause. By positional cloning and analyses of the gene expressions and the deduced amino-acid sequences, we had five candidate genes. Now, we are analyzing such gene structures.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

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：カイコ、胚休眠、化性遺伝子、ポジショナルクローニング、休眠進化

## 1. 研究開始当初の背景

(1) カイコは胚発生初期(中胚葉分節化直後)において胚細胞分裂をG2期で停止させ、休眠(発育停止)に入る昆虫である。カイコにおける活発な卵巣発育は蛹から成虫への発育期間に進行する。従って、羽化した♀蛾はただちに♂蛾と交尾し、その後産卵を開始する。

(2) この胚休眠を誘導する因子として、休眠ホルモンが1957年に長谷川金作によって同定された。精製の長い試みの末、1991年に今井邦雄・山下興亜らがこのホルモンの単離に成功した。このホルモンは神経ペプチド・ホルモンであり、24個のアミノ酸残基から構成され、C末端側はアミド化されていることが

明らかにされた。C 末端側が特徴的な配列を有することから、現在は FXPRL アミド・ペプチド族 (アミノ酸残基は 1 文字表記; X は置換可能なアミノ酸残基を示す) に分類される。

(3) 休眠ホルモンは食道下神経節の神経分泌細胞で合成され、軸索を経て側心体・アラタ体連合に運ばれ、そこから血液 (体液) 中に放出される。血液を介して発育卵巣に作用し、発育卵母細胞に休眠ホルモン・シグナルを伝達する。休眠ホルモン受容体は卵母細胞の細胞膜上に発現し、典型的な G-タンパク質共役型/7 回膜貫通型であることが 2006 年に柳沼利信らによって示された。休眠ホルモン・シグナルを受容した卵のみが、産卵・受精後に休眠を開始する。

(4) カイコは、遺伝的に 1 化性 (強制休眠)、2 化性 (随意休眠) および多化性 (非休眠) の 3 系統に大別される。化性とは 1 年間に出現する世代数を示す。

① 1 化性または多化性系統は、環境条件に依存せず、それぞれに休眠卵または非休眠卵を生む。

② 2 化性系統では、母親の胚期を 15°C・短日 (春季条件) または 25°C・長日 (夏季条件) という環境条件に設定すると、長じた母蛾はそれぞれに非休眠卵または休眠卵のみを生む。この休眠性の環境による可塑性について木暮槇太が 1933 年に纏め、発表した。

③ 卵巣は♀のみが有するので、カイコ卵の休眠性は母親の血液中に休眠ホルモンが存在するかどうかによって決定されることになる。この点に関しては何ら関与しない。

(5) 胚休眠性を調節する遺伝子の同定を目指して、休眠卵産生を指標に休眠系統と非休眠系統の交配実験を行い、渡辺勘次が 1924 年に単一の優性遺伝子であることを示し、この遺伝子は化性 (voltine) を支配するという意味から化性遺伝子 (*Volitinism*) と命名された。

(6) その後、諸星静次郎らが遺伝学的な連関解析を進め、1957 年に化性遺伝子 (休眠性主遺伝子) は第 6 連関群 (染色体) の 21.5 に座上するとした。さらに 1997 年に伴野豊らが第 6 染色体の 42.6 に位置すると修正した。

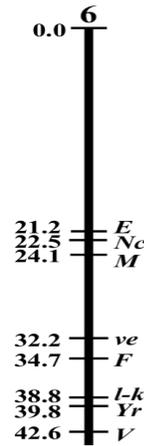


図1の説明:カイコの第6連関群 (染色体) の遺伝子マップ図.

(7) 休眠ホルモン遺伝子は第11染色体に座上することから、化性遺伝子の翻訳産物は休眠ホルモンではなく、むしろ休眠ホルモンの合成・放出を支配する上位に位置する休眠性決定遺伝子と考えられる。

(8) カイコは現中国の中央部が原産地と考えられている。非休眠系統のカイコはタイやカンボジアなどに見られる。中国で休眠系統が最初に生じ、その後、南下して非休眠化したとされている。カイコの休眠進化を考える基盤は、化性遺伝子を単離し、その遺伝子構造の変化の解析から始められると考えられた。

## 2. 研究の目的

(1) カイコの胚休眠は、卵母細胞が休眠ホルモン・シグナルを受容したかどうかで決定される。このことは、卵巣が発育する時期に、血液中に有意な濃度で休眠ホルモンが存在するかどうか依存する。

(2) 従って、休眠ホルモンの血液中への放出を調節する過程が重要であることを示す。

(3) 現在一番考えられる可能性は、化性遺伝子の翻訳産物が、休眠ホルモン放出を調節していると仮定することである。

(4) そこで、本研究では、化性遺伝子 (V) をポジショナルクローニング法により単離することをまず目指した。

(5) 次に、この遺伝子がどのように変化したことによって休眠系統または非休眠系統が成立した

かという休眠の進化を考察することを目指すこととした。

### 3. 研究の方法

(1) ポジショナルクローニングによる *V* 遺伝子の絞り込みを行う。

(2) 候補遺伝子の発現解析を休眠系統と非休眠系統の脳・食道下神経節で比較する。

(3) 候補遺伝子の推定アミノ酸配列を比較・解析し、神経ペプチド・ホルモンの分泌に関わる機能かどうかを検証する。

(4) 候補遺伝子構造の解析と比較を進める。

### 4. 研究成果

(1) ポジショナルクローニングによる *V* 遺伝子の絞り込み

① 非休眠系統として名古屋大学で継代している N4 を、休眠系統として農業生物資源研究所の小淵沢継代の小石丸を用いた。

② 図 2 に従って、まず、親世代の♀に非休眠型 (N4) を用い、♂に休眠型 (小石丸) を用いた。生じた F1 は期待通り、非休眠卵となった。

③ 次に、F1♂に非休眠型 (N4) ♀を戻し交配した。Back Cross 1 (BC1) では非休眠卵が生じるが、♂由来の染色体では組換えが生じる。PCR を用いて *V* 遺伝子座のマッピングを進めた。

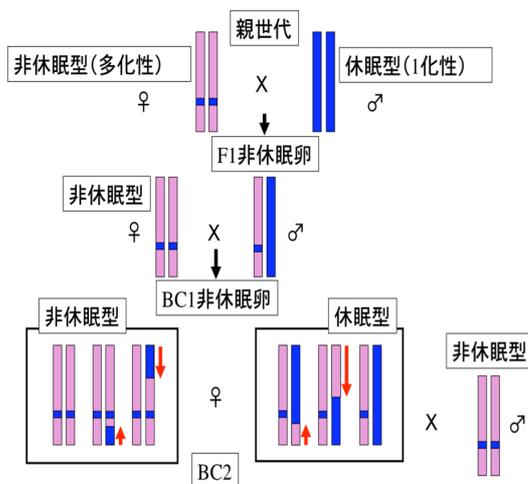


図 2 の説明：ポジショナルクローニングの手順

④次に BC1♀に、非休眠型♂ (N4) を交配し、BC2 でさらに PCR 解析を進めた。

⑤PCR解析と BC 卵が休眠卵になるかどうかを組み合わせ、この過程 (back cross) を繰り返すことで、*V* 遺伝子が座上する場所を暫時縮めていった。

⑥この領域と、既に明らかになっているカイコ遺伝子の第 6 染色体上での配置と比較し、*V* 遺伝子座上付近の遺伝子を選び出した。

⑦候補遺伝子として 15 遺伝子まで絞った。

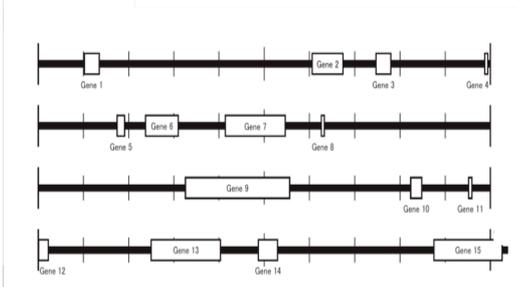


図 3 の説明：15 候補遺伝子の位置の概略

(2) 15 候補遺伝子の発現解析

①定量的リアルタイム PCR 法を用いて、非休眠系統 (N4) と休眠系統 [小石丸と 0081w1 (National Bioresource Project カイコ拠点・九州大学から譲渡)] の♀蛹の脳・食道下神経節から準備した cDNA を鋳型として、それぞれの mRNA の発現量を比較した。

(3) 15 候補遺伝子の推定されるアミノ酸配列の比較解析

①休眠ホルモンの合成・分泌に関わる機能を考慮し検索、さらに、(2) ①の発現解析の結果と合わせて、15 候補遺伝子から、さらに 5 遺伝子に絞り込んだ。

(4) 5 候補遺伝子の構造解析を進めている。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

Yaginuma, T., Niimi, T., Kidokoro, K.,

Kadono-Okuda, K. and Yamashita, O.  
Molecular mechanisms of *Bombyx mori*  
embryonic diapause. 第 24 回国際昆虫学会  
議, 2012 年 8 月 21 日, 韓国.

〔図書〕 (計 1 件)

柳沼利信・新美輝幸・塩見邦博, 東海大学出版  
会, 休眠ホルモンによるカイコガ胚休眠の調  
節. 脱皮と変態の生物学 (園部治之・長澤寛道  
編著), 2011, pp.269-291.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~yousan/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

柳沼 利信 (YAGINUMA TOSHINOBU)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授  
研究者番号 : 60135332

### (2) 研究分担者 該当者無し

( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者 該当者無し

( )

研究者番号 :

