

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658050

研究課題名(和文) 蛹休眠能力を有するカイコ基盤系統の創出

研究課題名(英文) Establishment of primary silkworm strain having the capability of pupal diapause

研究代表者

小林 淳 (KOBAYASHI, Jun)

山口大学・農学部・教授

研究者番号：70242930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：クワコの不均一な蛹期間の遺伝的メカニズムの解明ならびに蛹休眠カイコ系統の確立を目的として、クワコとカイコの雑種後代から蛹期間が長い個体を選抜したところ、蛹期間が不均一な雑種系統が得られた。この雑種系統と大造との正逆交雑F1および戻し交雑BC1における蛹期間の分離パターンから、不均一な蛹期間は雑種系統由来の性(Z)染色体上の遺伝子と常染色体上の劣性遺伝子(群)の相互作用により生じると判断された。また、雑種系統と大造の各染色体を識別可能なプライマー対を用いてBC1のゲノムDNAをPCR分析した結果から、蛹期間は多数の微動遺伝子が関与する量的形質であり、一部異なる遺伝子の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate genetic mechanisms of nonuniform pupal duration of *Bombyx mandarina* and establish a pupal diapause strain of *B. mori*, selection of individuals showing longer pupal durations from the progenies of hybrids between *B. mandarina* and *B. mori* has been conducted and resulted in a hybrid strain with nonuniform pupal duration. Segregation patterns of pupal period in reciprocal F1 and BC1 between the hybrid strain and the Daizo strain of *B. mori* have indicated that interactions of gene(s) on sex (Z) chromosome and recessive gene(s) on autosomes are involved in the nonuniform pupal duration. In addition, PCR analysis of BC1 genome DNA using primers designed for discrimination between chromosomes derived from the hybrid strain and those from the Daizo strain suggested that pupal duration is a quantitative trait determined by the cumulative result of many minor genes (polygenes), some of which are different between males and females.

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：Bombyx mandarina pupal duration polygene bet hedging

1. 研究開始当初の背景

カイコは胚子期に越冬休眠する昆虫であり、除脳やウイルス感染などによる内分泌系の異常が生じない限り蛹期に発育停止が生じることはない。一方、カイコと近縁で交雑可能な野生種クワコは、胚子期に越冬休眠する点はカイコと共通だが、蛹の期間が長く不斉一(20~60日)であり、光周期などの環境要因の影響により変化する。

そこで、カイコとクワコの雑種後代(F1およびF2)の蛹期間を解析したところ、Z染色体と常染色体に座乗する複数の遺伝子の相互作用による蛹期間の支配が推定された。最近、カイコのゲノムプロジェクトの進展によりさまざまな遺伝子を効率よく同定できる研究環境が整備され、また、過去6年間のカイコとクワコの交雑育種の結果、クワコよりも長い蛹期間(最長200日以上)の個体が発見される雑種系統の選抜に成功し、一部の個体は少なくとも3ヶ月の低温処理に耐性であることを明らかにした。

これらの状況により、蛹休眠基盤系統の確立ならびに蛹期間に関わる遺伝子群の実体とその機能解明を達成できる可能性が高まってきた。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、カイコとクワコの6年間の交雑育種により得られた長い蛹期間(最長200日以上)を有する雑種系統を出発材料として、世界初のカイコ休眠蛹基盤系統を確立するとともに、蛹期間の調節に関わる遺伝子群のゲノム上の位置と候補遺伝子配列を同定し、遺伝的メカニズムを解明することである。

また、DNAマーカーを用いて蛹休眠の実験室内進化のプロセスを追跡することにより、季節適応進化の分子遺伝学的メカニズムに関する具体的なモデルを構築することが可能になる。

さらに、本研究の成果により、カイコを利用した蛹休眠の分子メカニズムとその進化に関する基礎研究の推進や、休眠蛹を利用したトランスジェニックカイコの系統維持や安定同位体標識タンパク質生産などの実用的新技術開発が可能になると期待される。

3. 研究の方法

(1) 蛹休眠の実験室内選抜

カイコとクワコの雑種系統の中で、蛹期間の長い個体同士および短い個体同士の掛け合わせを繰り返し、選抜効果を評価する。

(2) 雑種系統と大造の交雑後代における蛹期間と染色体組成の解析

雑種系統とカイコ(大造)の正逆交雑F₁および戻し交雑BC₁における蛹期間の分離パターンを調査するとともに、BC₁についてはゲノムDNAをカイコとクワコを識

別可能な各染色体特異的PCRプライマー対を用いて分析し、染色体組成を明らかにする。

(3) 蛹期間調節に関する遺伝的モデルの構築

BC₁における蛹期間と染色体組成の相関性を統計的に解析し、蛹期間調節に関与する候補遺伝子群が座乗する染色体を推定し、遺伝的モデルを構築する。

4. 研究成果

(1) 蛹休眠の実験室内選抜

クワコとカイコの雑種第1代の蛹期間において正逆交雑による差異が認められるとともに、かなりのばらつきが見られた。さらに、蛹期間の長い個体同士の交配後代を飼育する選抜を9世代続けたところ、20日以内に羽化する個体は現われなくなったものの蛹期間は22日~83日とばらついた状態のままであった。

一方、選抜途中(4世代目)に蛹期間の短い個体の選抜に切り替えると、すみやかに20日前後の比較的均一な蛹期間を示すようになり、9世代目には30日を超える個体が現れなくなった。

これらの結果から、蛹期間を指標とした選抜だけで蛹休眠系統を確立するのは困難であり、蛹期間調節の遺伝学的メカニズムに基づく合理的な育種戦略を考案することが必要であると考察された。

(2) 雑種系統と大造の交雑後代における蛹期間と染色体組成の解析

雑種系統とカイコ(大造)の正逆交雑F₁および戻し交雑BC₁における蛹期間の分離パターンを調査したところ、F₁の蛹期間に正逆交雑による差異が認められた。すなわち、雑種系統♀×大造♂由来のF₁♀♂および大造♀×雑種系統♂由来のF₁♂の蛹期間は比較的短く均一であったが、後者由来のF₁♀は不均一で最長20日前後の蛹期間を示した。同様の現象がクワコとカイコのF₁でも見られることから、クワコと雑種系統における蛹期間調節に関与する遺伝子構成の共通性が示唆された。

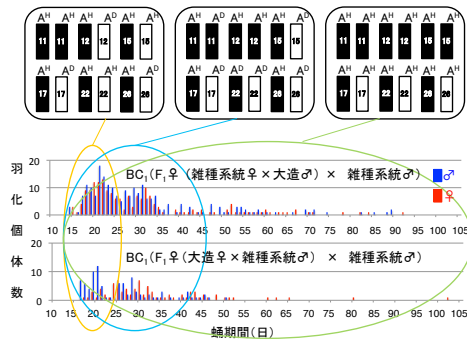
さらに、正逆交雑F₁♀それぞれに雑種系統♂を戻し交雑したところ、いずれのBC₁♀♂の蛹期間も著しく不揃いになり、最長100日前後の蛹期間を示す個体も現れた。

これらの結果から、不揃いな蛹期間は雑種系統由来の劣性遺伝子(群)のホモ接合により生じると判断された。

また、雑種系統と大造の各染色体を識別可能なプライマー対を設計し、BC₁(533個体中36個体)のゲノムDNAのPCR分析を行った結果、蛹期間の長短と連動する雑種系統由来染色体のホモ接合は見出せなかったことから、相加的効果を有する同義遺伝子群の関与が示唆された。

(3) 蛹期間調節の遺伝的モデルの構築

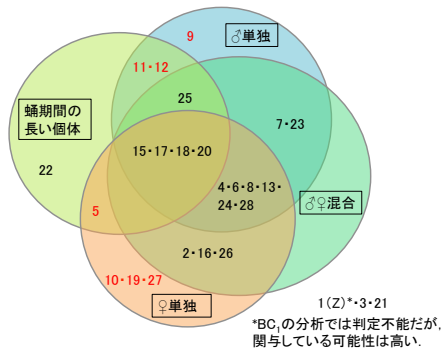
BC₁ (533 個体中 36 個体) における蛹期間と PCR 分析による染色体組成における雑種由来染色体ホモの関係を蛹期間が 30 日以上個体に注目して解析した結果、相加的効果を有する同義遺伝子が 6 染色体 (第 5, 11, 12, 15, 17, 22 染色体) に分散しており、その中の 3 染色体以上が雑種ホモ接合であるとき蛹期間が顕著にばらつくという遺伝的モデル (下図) を考案した。



ところが、BC₁ をさらに 34 個体分析したところ、モデルは成立しなくなり、少なくとも 3 染色体 (第 18, 20, 25 染色体) の追加が必要となった。

さらに、蛹期間が 30 日未満の個体も含めて遺伝的モデルの妥当性を検証したところ、蛹期間と雑種染色体ホモ率の相関性はあまり高くはないことが判明したことから、相関性を最大にするためのモデルの改良を行ったところ、さらに多くの遺伝子を追加する必要性と、蛹期間調節には♂♀で一部異なる遺伝子が関与していることが示唆された (下図)。

◆ 各モデルで蛹期間に関与する染色体の共通性



以上要するに、本研究課題の遂行により、クワコとカイコの雑種における不斉な蛹期間が、少数の主働遺伝子ではなく、多数の微動遺伝子すなわち QTL に支配される量的形質であるという遺伝学的メカニズムの全体像を明らかにすることができた。今後、関与する個々の遺伝子の同定と機能など、その詳細なメカニズム解明に取り組む、最終的には蛹休眠カイコ系統の確立を目指す。

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 6 件)

- ① 竹田津桜・河端洋二・谷村圭太・門野敬子・小林淳, クワコの不斉な蛹期間は主働遺伝子のない量的形質か?, 第58回日本応用動物昆虫学会大会, 2014年3月26日~28日, 高知大学朝倉キャンパス (高知)
- ② 竹田津桜・河端洋二・谷村圭太・門野敬子・小林淳, クワコとカイコの雑種における蛹期間調節機構の遺伝学的解析, 日本蚕糸学会第84回大会, 2014年3月10日~11日, 日本大学生物資源科学部 (藤沢)
- ③ 小林淳・竹田津桜・河端洋二・谷村圭太・門野敬子, クワコとカイコの雑種における蛹期間調節機構の遺伝学的解析 (第2報), 日本野蚕学会第19回大会, 2013年11月16日, 東京農工大学科学博物館 (小金井)
- ④ 河端洋二・谷村圭太・神松梨紗・門野敬子・小林淳, クワコとカイコの雑種系統における不揃いな蛹期間の遺伝学的解析, 第57回日本応用動物昆虫学会大会, 2013年3月27日~29日, 日本大学生物資源科学部 (藤沢)
- ⑤ 小林淳・門野敬子, クワコとカイコの雑種における蛹期間の遺伝学的解析, 第1回クワコ研究会, 2012年9月7日, 農業生物資源研究所 (つくば)
- ⑥ 谷村圭太・神松梨紗・門野敬子・小林淳, クワコの不揃いな蛹期間による生活史戦略の遺伝学的解析, 第56回日本応用動物昆虫学会大会, 2012年3月29日, 近畿大学 (奈良)

[図書] (計 0 件)

[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.yamaguchi-u.ac.jp/member/kobayashi/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 淳 (KOBAYASHI, Jun)
山口大学・農学部・教授
研究者番号：70242930

(2)研究分担者

門野敬子 (KADONO, Keiko)
独立行政法人農業生物資源研究所・昆虫科学
研究領域・ユニット長
研究者番号：40355722