

## 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4月1日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2009～2011

課題番号：21248006

研究課題名（和文） 鱗翅目昆虫と寄生植物の関係を決定する遺伝子群とその機能

研究課題名（英文） Identification and functional analysis of the genes controlling the relationship between lepidopteran insects and their host plants

研究代表者

嶋田 透 (SHIMADA Toru)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：20202111

研究成果の概要（和文）： 鱗翅目昆虫と寄主植物の間には特異的な関係がある。クワには有毒の糖類似アルカロイドが含まれており、クワ食の昆虫は、毒性を克服する必要がある。クワ食のカイコ・ウスバクワコ等と、近縁の非クワ食昆虫であるイチジクカサン等を対象にして、アルカロイドの標的となる中腸スクラーゼの機能を比較した。その結果、クワ植昆虫では耐性型スクラーゼの活性が他よりも高く、それは遺伝子の転写量が多いためであった。また、クワに含まれるフラボノイドの代謝に関与する重要な遺伝子を発見した。

研究成果の概要（英文）： The lepidopteran insects have specific relationships with their host plants. The mulberry contains toxic sugar-mimic alkaloids, and the insects fed on mulberry must overcome their toxicity. We compared the function of the midgut sucrases, which may play a crucial role in the tolerance to the alkaloids, between mulberry feeders such as *Bombyx mori* and *Rondotia menciiana* and closely-related non-mulberry feeders such as *Trilocha varians*. As the result, we found that mRNAs for alkaloid-resistant sucrases are more highly expressed in mulberry feeders than in non-mulberry ones. We also found a gene encoding an enzyme that plays an important role in the metabolism of quercetin, a component in mulberry.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	21,500,000	6,450,000	27,950,000
2010年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
2011年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
年度			
総計	34,300,000	10,290,000	44,590,000

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：植食性昆虫、カイコ、クワ、糖類似アルカロイド

## 1. 研究開始当初の背景

植食性昆虫と寄主植物の関係性・特異性については、古くから多くの生物学者の関心を惹いてきたテーマである。カイコはクワのみを摂食する単食性の昆虫であり、近

年ゲノムの精密配列が解明されたことを踏まえて、寄主植物の特異性を決定する遺伝子を探索するためのモデルであると考えた。クワの毒素である糖類似アルカロイドへのカイコの抵抗性の機構としては、申請者らがゲ

ノムから発見した $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ遺伝子 ( $\beta$ -FFase) の存在が候補の一つである。また、クワに含まれるフラボノイドをカイコは利用していることが知られており、これについては野生種にも共有されている「笹繭」遺伝子が関与する。これらカイコの遺伝子がクワへの適応に貢献していることを実証しようと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、鱗翅目昆虫と植物との相互作用のうち、植食者と寄主植物との生理的・化学的な攻防に着目し、植物の防御システムを鱗翅目昆虫がどのように打破するか、鱗翅目昆虫はどのように自らの寄主植物を決定するか、その分子機構を解明することを目的とする。植物の2次代謝物質への抵抗性機構：植物はアルカロイド、靑酸配糖体、プロテアーゼなどの2次代謝物質を生産し、昆虫による食害を防いでいる。鱗翅目昆虫はこれらの物質の毒性を何らかの方法で回避しなければならず、それぞれの食草に適合させた抵抗性機構を進化させている。この鱗翅目昆虫と植物との「化学戦争」に着目し、その分子基盤を解明する。具体的には、カイコとクワをモデルシステムとして、クワ乳液の糖類似アルカロイドへの対抗措置としてカイコが $\beta$ -フルクトフラノシダーゼの活性を増強させた、という仮説を検証するとともに、その活性増加の進化機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) カイコの桑アルカロイド耐性の分子機構の解明

桑の糖類似アルカロイドの毒性をカイコがどのように克服しているのか、そのメカニズムの解明を行う。平成21年度に耐性に関与すると考えられる $\beta$ -FFaseをキイロショウジョウバエに導入し、キイロショウジョウバエに桑乳液アルカロイドの耐性を付与できるか否かを検討する。また、クワのスペシャリストにおいて $\beta$ -FFaseがどのような機構で発現量を増加させたのか、シスエレメントやトランス因子の同定を行うためのアッセイ系の検討を行う。

平成22年度及び平成23年度に、カイコの $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ遺伝子の転写量が顕著に多い理由を解明する。具体的には、プロモーターの構造をBmSuc1とBmSuc2の間で比較するとともに、他の消化酵素の遺伝子と比較する。

### (2) カイコの桑由来フラボノイド代謝とその生物学的意義の解明

カイコの笹繭(ささまゆ)システムを用いて、

鱗翅目昆虫による植物フラボノイドの代謝機構・生物学的意義を解明する。カイコの笹繭系統ではフラボノイドの一種であるケルセチン(querletin)の代謝産物が繭に輸送・蓄積されていることが古くから知られている。この反応はGbと呼ばれる遺伝子座によって支配されており、Gbの実体はquerletinをquerletin-5-O-glucosideに変換する酵素である予想されている。平成21年度・22年度は、Gb遺伝子のポジショナルクローニングによる同定を第一の目標とする。予備実験の結果、Gb遺伝子は400 kbの範囲にマッピングされており、この領域には9つの構造遺伝子が予測されている。これらの遺伝子の構造を系統間で比較し、酵素学的性質を解析して、Gb遺伝子の単離と機能解析を行う。さらに、繭へのquerletinの蓄積がどのような生物学的意義を持つのか検証する

また、笹繭を支配する遺伝子は、他にもいくつか存在する。平成23年度は卵殻が黄緑色となるGreをZ染色体上にマッピングし、ポジショナルクローニングを試みる。

## 4. 研究成果

カイコ*Bombyx mori*は、桑葉のみを食餌とする単食性の昆虫である。桑葉にはデオキシノジリマイシンなどの糖類似アルカロイドが多量に含まれており、通常の動物には毒性を示す。カイコは、 $\beta$ -フルクトフラノシダーゼを中腸で大量発現することにより、桑葉を食餌として栄養を摂取できるようになった、という仮説を検証するため、クワではなくガジュマルなどイチジク属の植物に寄生する近縁種、イチジクカサン *Trilocha varians*(Tv) (カイコガ科)、テンオビシロカサン *Ernolatia moorei*(Em) (同)、エリサン *Samia cynthia ricini*(Sc) (ヤマモユガ科) などから $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ遺伝子を単離した。イチジクカサンではカイコに比べると中腸の $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ活性は非常に低く、 $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ mRNA の発現も低レベルであった。したがって、カイコガ科のなかでクワ食の昆虫が進化する際に、 $\beta$ -フルクトフラノシダーゼの転写量の増加が起きたと想像された。

また、Tv、Em、およびScのスクラーゼ遺伝子について解析を進めた。その結果、これらの $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ遺伝子はカイコと相同性が高いにもかかわらず、発現量が相対的に少ないことが判明した。カイコがクワ乳液中に含まれる糖類似アルカロイドの毒性を克服している理由は、 $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ遺伝子が高発現することにより、アルカロイド存在下でも糖を分解吸収することであると予想される。なお、 $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ遺伝子の転写調節領域の配列をカイコとTv/Emの間で比較すると種

間差異が存在したので、その差異が転写効率に関与している可能性がある。

カイコ *BmSuc1* 遺伝子をキイロシヨウジヨウバエの生殖細胞系列に導入してトランスジェニック系統を作出した。しかし、糖類似アルカロイドを添加した飼料に対する抵抗性が向上するような結果を得ることはできなかった。消化管での発現量をより高めるなどの工夫が必要であると考えられた。

一方、クワの葉には、フラボノイドの一種であるケルセチンが高濃度に含まれている。ケルセチンは様々な薬理作用をもつ物質である。カイコの *Gb* 系統は、桑葉中に含まれるフラボノイドの一種、ケルセチンから特殊な配糖体を合成している。ケルセチンを排泄するのではなく、むしろ繭に蓄積させることで有効に利用しているのである。本研究では、この *Gb* の原因遺伝子のポジショナルクローニングを行った結果、*Gb* 遺伝子は UDP-グルコース転移降素をコードしており、その酵素はケルセチンの5位をグルコシル化する珍しい活性を有していることを明らかにした。

また、カイコの笹繭系統は、桑葉中に含まれるフラボノイドの一種、ケルセチンの5位にグルコースが結合した特殊な配糖体を合成し、繭層に蓄積させて虫体を紫外線から防護する。カイコの桑フラボノイドの利用機構の解明へ向けて解析を進めるため、クローニングした *Gb* 遺伝子以外に、別の笹繭遺伝子 *Gre* についても、連鎖解析によってゲノム上の位置を絞り込んだ。

## 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6件)

- (1) Takaaki Daimon, Takeshi Fujii, Masaya Yago, Yu-Feng Hsu, Yumiko Nakajima, Tsuguru Fujii, Susumu Katsuma, Yukio Ishikawa, and Toru Shimada. (2012) 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、Vol. 99、No. 3、pp. 207-215.
- (2) Takaaki Daimon, Masaya Yago, Yu-Feng Hsu, Tsuguru Fujii, Yumiko Nakajima, Ryuhei Kokusho, Hiroaki Abe, Susumu Katsuma, and Toru Shimada. (2012) Molecular phylogeny, laboratory rearing, and karyotype of the bombycid moth, *Trilocho varians* (Lepidoptera:

Bombycidae: Bombycinae). *Journal of Insect Science*. 査読有、Vol. 12、No. 49. (<http://insectscience.org/12.49/>)

- (3) Tsuguru Fujii, Hiroaki Abe, Kimiko Yamamoto, Susumu Katsuma, and Toru Shimada. (2011) Interspecies linkage analysis of *mo*, a *Bombyx mori* locus associated with mosaicism and gynandromorphism. *Genetica*. 査読有、Vol. 139、No. 10、pp. 1323-1329
  - (4) Tsuguru Fujii, Takeshi Fujii, Shigehiro Namiki, Hiroaki Abe, Takeshi Sakurai, Akio Ohnuma, Ryohei Kanzaki, Susumu Katsuma, Yukio Ishikawa, and Toru Shimada. (2011) Sex-linked transcription factor involved in a shift of sex pheromone preference in the silkworm, *Bombyx mori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 査読有、Vol. 108、No. 44、pp. 18038-18043
  - (5) Kei Urano, Takaaki Daimon, Yutaka Banno, Kazuei Mita, Tohru Terada, Kentaro Shimizu, Susumu Katsuma, and Toru Shimada. (2010) Molecular defect of isovaleryl-CoA dehydrogenase in the skunk mutant of silkworm, *Bombyx mori*. *FEBS Journal*. 査読有、Vol. 277、No. 21、pp. 4452-4463
  - (6) Takaaki Daimon, Chikara Hirayama, Masatoshi Kanai, Yoshinao Ruike, Yan Meng, Eiichi Kosegawa, Masatoshi Nakamura, Gozoh Tsujimoto, Susumu Katsuma, and Toru Shimada (2010) The silkworm Green b locus encodes a quercetin 5-O-glucosyltransferase that produces green cocoons with UV-shielding properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 査読有、Vol. 107、No. 25、pp. 11471-11476
- [学会発表] (計23件)
- (1) 木内隆史・王華兵・加藤裕子・藤井告・大門高明・門田幸二・鈴木穰・菅野純夫・勝間進・嶋田透：カイコとその近縁種における寄主植物選択機構の進化、第56回日本応用動物昆虫学会大会（小集会「昆虫の適応形質進化へゲノム科学的アプローチ」）、2012年3月28日、近畿大学農学部・奈良キャンパス（奈良県奈良市）
  - (2) 嶋田透、藤井告、藤井毅、並木重宏、阿部広明、櫻井健志、大沼昭夫、神崎亮平、勝間進、石川幸男：カイコの変異体を用いた嗅覚・味覚の分子遺伝学的研究、第56回日本応用動物昆虫学会大会（学会主催シン

- ポジウム「昆虫における嗅覚受容と情報処理」)、2012年3月27日、奈良県新公会堂(奈良県奈良市)
- (3)加藤裕子・木内隆史・王華兵・大門高明・勝間進・嶋田透:カイコガ科のクワへの適応におけるクワ乳液成分に対する抵抗性獲得の重要性、日本蚕糸学会第82回大会(平成24年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会)、2012年3月18日~19日、九州大学箱崎キャンパス文系地区(福岡県福岡市東区箱崎)
- (4)藤井告・久保真紀・阿部広明・大沼昭夫・桑崎誠剛・山本公子・川本宗孝・勝間進・嶋田透:第11染色体を部分的に欠失したカイコの食性異常、日本蚕糸学会第82回大会(平成24年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会)、2012年3月18日~19日、九州大学箱崎キャンパス文系地区(福岡県福岡市東区箱崎)
- (5)王華兵・木内隆史・國生龍平・大門高明・勝間進・嶋田透:Transcriptional regulation of  $\beta$ -fructofuranosidase gene in the silkworm, *Bombyx mori*、日本蚕糸学会第82回大会(平成24年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会)、2012年3月18日~19日、九州大学箱崎キャンパス文系地区(福岡県福岡市東区箱崎)
- (6)Toru Shimada, Takaaki Daimon, Tsuguru Fujii, Yan Meng, Huabing Wang, Hiroaki Abe, Akio Onuma, Takashi Kiuchi, and Susumu Katsuma: Genetic and genomic studies on the food habit of the silkworm. IITG-DBT Biotech Hub Invited Lecture Series (Theme: Advances in Seri Biotechnology. 2012年2月28日, Seminar Hall, Department of Biotechnology, Indian Institute of Technology Guwahati, Guwahati Assam, India.
- (7)Toru Shimada, Takaaki Daimon, Tsuguru Fujii, Yan Meng, Huabing Wang, Hiroaki Abe, Akio Onuma, Takashi Kiuchi, and Susumu Katsuma: Genetic and genomic studies on the food habits of the silkworm. Special Lecture for the Silver Jubilee of the Department of Biotechnology (DBT), Ministry of Science & Technology, Indian Government. 2012年2月24日, CDFD Lecture Hall, 2nd Floor, Lab Building, Centre for DNA Fingerprinting and Diagnostics, Nampally, Hyderabad, India.
- (8)Toru Shimada, Takaaki Daimon, Tsuguru Fujii, Yan Meng, Huabing Wang, Hiroaki Abe Akio Onuma, Takashi Kiuchi, and Susumu Katsuma: Genomic studies on the relationship between the silkworm and its food plant, mulberry. Genome Research: Current Challenges and Future Directions (東京農業大学生物資源ゲノム解析センター主催国際シンポジウム) 2012年1月21日 KOKUYO HALL (東京都港区港南)
- (9)王華兵・木内隆史・國生龍平・大門高明・勝間進・嶋田透:鱗翅目昆虫における $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ遺伝子の転写調節、平成23年度日本蚕糸学会第66回東北支部・第62回関東支部・第77回関西支部・第67回九州支部 合同大会-蚕糸・昆虫機能利用学術講演会、2011年11月4日~6日、岩手大学農学部(岩手県盛岡市)
- (10)加藤裕子・王華兵・木内隆史・大門高明・矢後勝也・中島裕美子・前川秀彰・Yu-Feng Hsu・藤井告・勝間進・嶋田透:各種クワ科植物に対するカイコとイチジクカサンの摂食性、平成23年度日本蚕糸学会第66回東北支部・第62回関東支部・第77回関西支部・第67回九州支部 合同大会-蚕糸・昆虫機能利用学術講演会、2011年11月4日~6日、岩手大学農学部(岩手県盛岡市)
- (11)Toru Shimada, Takaaki Daimon, Tsuguru Fujii, Yan Meng, Yuko Kato, Huabing Wang, Hiroaki Abe, Akio Onuma, Takashi Kiuchi, and Susumu Katsuma: Genetic studies on the relationship between the silkworm, *Bombyx mori*, and its host plant, mulberry. The 2nd International Symposium on *Bombyx mori* Functional Genomics and Modern Silk Road (第二屆家蚕効能基因組和現代絲綢之路國際會議) 2011年10月22日~23日 中国・西南大学・蚕学与系統生物学研究所
- (12)嶋田透・孟艷・吉永武史・國生龍平・王華兵・加藤裕子・木内隆史・藤井告・勝間進・大門高明:ゲノム情報を用いたカイコの食性進化メカニズムの解明、第84回日本生化学会大会 シンポジウム「ゲノム時代の生化学」、2011年9月23日、国立京都国際会館
- (13)國生龍平・大門高明・平山力・矢後勝也・Yu-Feng Hsu・中島裕美子・勝間進・嶋田透:カイコガ科における $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ遺伝子の進化、日本蚕糸学会第80回記念大会(平成22年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会)、2010年4月3日(土)-4日(日)、信州大学繊維学部(長野県上田市常田3-15-1)
- (14)大門高明・平山力・勝間進・嶋田透:カイコの笹繭 b(Gb)の原因遺伝子の同定、日本蚕糸学会第80回記念大会(平成22年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会)、2010年4月3日(土)-4日(日)、信州大学繊維学部(長野県上田市常田

- 3-15-1)
- (15) Takaaki Daimon, Yan Meng, Susumu Katsuma, and Toru Shimada: Enzymatic adaptation of mulberry specialists to toxic sugar-mimic alkaloids in mulberry latex. 第32回日本分子生物学会年会 (ワークショップ 2W10 昆虫と関連生物の多様性と進化メカニズムをさぐる、2009年12月9日~12日、パシフィコ横浜)
- (16) 嶋田透: カイコはなぜクワを食うかーゲノムからのヒント、日本蚕糸学会関東支部第60回学術講演会公開シンポジウム「カイコゲノム情報の今後の展開」、2009年11月6日~7日、宇都宮大学大学会館多目的ホール
- (17) 國生龍平・大門高明・矢後勝也・Yu-Feng Hsu・中島裕美子・勝間進・嶋田透: カイコガ科における $\beta$ -フルクトフラノシダーゼ遺伝子の進化、日本蚕糸学会関東支部第60回学術講演会、2009年11月6日~7日、宇都宮大学大学会館多目的ホール
- (18) 久保真紀、藤井 告、大沼昭夫、勝間 進、嶋田 透: カイコ食性異常遺伝子 *Np* のポジショナルクローニングの試み、日本蚕糸学会関東支部第60回学術講演会、2009年11月6日~7日、宇都宮大学大学会館多目的ホール
- (19) Toru Shimada, Takaaki Daimon, Tsuguru Fujii, Yan Meng, Takeshi Yoshinaga, Akio Ohnuma, Chikara Hirayama, Susumu Katsuma, Hiroaki Abe, and Kazuei Mita: How did *Bombyx* adapt to mulberry? - A hypothesis in comparative genomics. International Symposium on Bombyx mori Functional Genomics and Modern Silk Road. October 21-23, 2009 海宇温泉大酒店、中国・重慶市北碚区双元大道198号
- (20) Toru Shimada, Takaaki Daimon, Tsuguru Fujii, Yan Meng, Takeshi Yoshinaga, Akio Ohnuma, Chikara Hirayama, Susumu Katsuma, Hiroaki Abe, and Kazuei Mita: Genetic mechanisms controlling the food habit of *Bombyx mori*, a monophagous insect depending on mulberry. THE 6TH Ais-Pacific Congress of Entomology (APCE 2009) - Symposium 6 (Genetics, Genomics, Transgenics & Evolutionary Biology) October 18-22, 2009、九華山庄 (中国・北京

- 市昌平区小湯山)
- (21) 藤井告・藤井毅・桑崎誠剛・山本公子・阿部広明・大沼昭夫・勝間進・三田和英・嶋田透: カイコの *spli* 変異体に認められる食性と性フェロモン応答性の異常、昆虫ポストゲノム研究会 (ミニシンポジウム「カイコ突然変異遺伝子のポジショナルクローニングによる機能解析」)、2009年9月9日~11日、北海道大学 遠遊学舎/農学部総合研究棟1F
- (22) Takaaki Daimon, Yan Meng, Takeshi Yoshinaga, Susumu Katsuma, and Toru Shimada: Enzymatic adaptation of mulberry specialists to toxic sugar-mimic alkaloids in mulberry latex. The 8th International Workshop on Molecular Biology and Genetics of the Lepidoptera, August 23-29, 2009、Orthodox Academy in Kolymari, Crete, Greece
- (23) Tsuguru Fujii, Takeshi Fujii, Hiroaki Abe, Akio Ohnuma, Susumu Katsuma, Toru Shimada: *acj6* mutants of the silkworm *Bombyx mori* cannot discriminate mulberry from beet leaves. The 8th International Workshop on Molecular Biology and Genetics of the Lepidoptera, August 23-29, 2009、Orthodox Academy in Kolymari, Crete, Greece

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

嶋田 透 (SHIMADA Toru)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授  
研究者番号: 20202111

### (2) 研究分担者

大門 高明 (DAIMON Takaaki)

農業生物資源研究所・昆虫制御研究ユニット・主任研究員

研究者番号: 70451846

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: