

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：82112

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23688008

研究課題名(和文)カイコのフラボノイド繭の分子基盤とその生物学的意義の解明

研究課題名(英文)Molecular basis and biological significance of flavonoid cocoons of the silkworm, *Bombyx mori*

研究代表者

大門 高明(Daimon, Takaaki)

独立行政法人農業生物資源研究所・昆虫成長制御研究ユニット・主任研究員

研究者番号：70451846

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、多いカイコの笹繭(フラボノイド繭)形質の遺伝様式を明らかにし、さらにフラボノイド繭の生物学的な意義を明らかにすることを目的とした。本課題ではddRAD-seq解析を行い、カイコの新規笹繭遺伝子が第20番染色体に座乗することを見出すとともに、ほとんど不明であったカイコ近縁種(カイコガ亜科)の生態学的特性および繭フラボノイド成分の多様性を明らかにすることができた。さらに、フラボノイド繭形質の分子遺伝学的解析に必須となるゲノム編集法をカイコにおいて高度化することに成功し、フラボノイド繭の分子基盤およびその生物学的意義の解明に向けて大きく前進することができた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to reveal the molecular basis of flavonoid cocoons and their biological significances in the silkworm and its relative species. I performed a ddRAD-seq analysis in the silkworm and found that a novel locus that is involved in the flavonoid cocoon trait is located on the chromosome 20. I also revealed biological and ecological features of several species relative to the domesticated silkworm, and a great diversity in the flavonoid compounds contained in their cocoons. In addition, I established a highly efficient system for targeted mutagenesis in the silkworm, which can be a powerful tool for studying gene functions in a more sophisticated way.

研究分野：昆虫遺伝学

キーワード：カイコ フラボノイド 遺伝子 ゲノム 生態学 ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

カイコの繭色は様々であるが、その色素は桑葉に含まれるカロテノイドとフラボノイドによって決定される。カロテノイド・フラボノイドといった植物由来の生理活性物質は、ヒトや動物に様々な効果を与えるために大きな注目を集めているが、動物における代謝や輸送のメカニズムはほとんど分かっておらず、これらの物質の理解とその利用の推進を大きく妨げている。このような状況のもと、カイコの繭は動物におけるカロテノイド・フラボノイドの代謝・取り込み・輸送・排出のモデル系として期待されるようになってきている。

2. 研究の目的

本研究では、特に不明の点が多いカイコのフラボノイド繭に注目し、その分子基盤の解明を目指す。また、昆虫の繭に取り込まれた色素の機能を検証し、その生物学的意義を明らかにする。さらに、本研究の開始後にゲノム編集技術が開発されたことから、カイコにおいてこの技術を高度化することで、フラボノイド繭の遺伝子基盤の解明に向けた武器を開発することも目的とした。

3. 研究の方法

(1) カイコの笹繭関連遺伝子を同定するために、B8 斑油系統から分離する蛍光・非蛍光繭（それぞれフラボノイド有り・無し）の遺伝様式を解明し、ddRAD-seq によってマッピングを行う。

(2) フラボノイド繭の生物学的意義を解明するために、ほとんど不明のままであるカイコ近縁種の生態の解明、および飼育方法を確立し、それらの繭のフラボノイド成分を同定する。

(3) フラボノイド繭関連遺伝子の遺伝様式は極めて複雑であるため、通常の間交配による機能解析は極めて困難であると予想された。そこで、系統間交配に頼ることなく、ダイレクトに遺伝子機能解析実験を行うために、ゲノム編集技術をカイコに導入するための基盤研究を行う。具体的には、表現型が明確に表れる遺伝子をターゲットとすることで、実験系の高度化を図る。

4. 研究成果

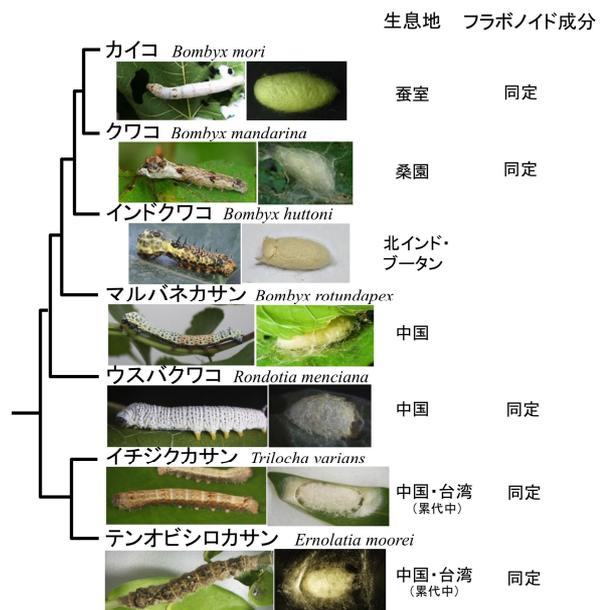
(1) フラボノイド繭（図1）の遺伝子基盤を解明するために、B8 斑油系統から分離する蛍光・非蛍光繭個体をそれぞれ同系交配し、遺伝的に固定された系統を樹立した。これらの系統の相互交配の結果から、B8 斑油系統の蛍光繭形質は、常染色体上の単一遺伝子座に支配されていることが示唆された。この座位をマッピングするために F2 集団約 90 個体を用いて ddRAD-seq 解析を行ったところ、第 20 番染色体に座乗することが明らかになった。この座位はこれまでの遺伝解析からは全く検出されていない新規のフラボノイド繭関連座位である。候補領域内にはある酵素の遺伝子ク

ラスターが存在しており、これらの1つまたは複数が蛍光繭形質を支配することが示唆された。



(図1) 様々な色のカイコの繭

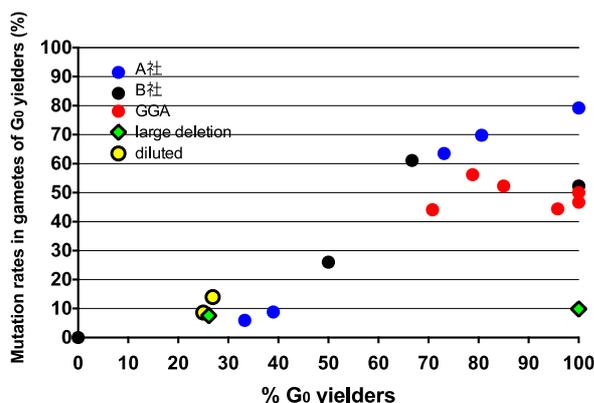
(2) カイコと同じカイコガ亜科に属するカイコ近縁種（クワコ・イチジクカサン・テンオビシロカサン・ウスバクワコ）の生態調査を行うとともに、性フェロモン分析を完了させ、さらに研究室での飼育・継代方法を樹立した。フラボノイド繭成分の分析の結果、例え同じ食草を食べ、似た色の繭であっても、そこに含まれるフラボノイド成分には驚くほどの多様性が存在することが明らかになり、種特異的なフラボノイド代謝・輸送経路が成立していることが示唆された（図2）。また、これらの種において次世代シーケンサーを用いてトランスクリプトーム解析を行い、ゲノム網羅的に発現遺伝子を捕捉した。



(図2) カイコとその近縁種の生態・繭フラボノイド成分

(3) カイコにおけるゲノム編集技術法確立するために、TALEN および CRISPR/Cas9 システムによる遺伝子ノックアウトの実験系を構築・高度化させた。カイコにおいてはTALENが非常に効果的であり、通常の間交配による遺伝子ノックアウトの効率は% GO yielder (少なくとも1匹の変異体を遺した GO 個体の割合) は 30-100% であり、これらの個体における germline mutation rate は 8-60% に達してい

た。ハイスループットのジェンタイピング法なども構築し、カイコにおけるノックアウト実験を完全に実用レベルに乗せることに成功した(図3)。また、2ペアのTALENを用いることで、これまでに35-kbまでのlarge-deletionに成功している。また、カイコにおける遺伝子ノックインの系も動き始



めている。

(図3) 各種のTALEN(受託・自作キット・濃度など)を用いたカイコの変異導入効率。丸点はノックアウトの効率を示し、菱形点は2ペアのTALENを使ったlarge-deletion誘発の効率を示す。

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 14 件)

1. Sora Enya, Takaaki Daimon, Fumihiko Igarashi, Hiroshi Kataoka, Miwa Uchibori, Hideki Sezutsu, Tetsuro Shinoda, and Ryusuke Niwa (2015) The silkworm glutathione S-transferase gene *noppera-bo* is required for ecdysteroid biosynthesis and larval development. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** (in press).

2. Shota Nakade, Takuya Tsubota, Yuto Sakane, Satoshi Kume, Naoaki Sakamoto, Masanobu Obara, Takaaki Daimon, Hideki Sezutsu, Takashi Yamamoto, Tetsushi Sakuma, Ken-ichi T. Suzuki (2014) MMEJ-mediated integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9. **Nature Communications** 5: 5560.

3. Yoda S, Yamaguchi J, Mita K, Yamamoto K, Banno Y, Ando T, Daimon T, Fujiwara H (2014) The transcription factor Apontic-like controls diverse colouration pattern in caterpillars. **Nature Communications** 5:4936.

4. Shigehiro Namiki, Takaaki Daimon, Chika

Iwatsuki, Toru Shimada, Ryohei Kanzaki (2014) Antennal lobe organization and pheromone usage in bombycid moths. **Biology Letters** 10(4):20140096.

5. Sonja Bisch-Knaden, Takaaki Daimon, Toru Shimada, Bill Hansson, and Slike Sachse. (2014) Anatomical and functional analysis of domestication effects on the olfactory system of the silkworm *Bombyx mori*. **Proceedings of the Royal Society B**. 281(1774):20132582.

6. Takaaki Daimon†, Takashi Kiuchi, and Yoko Takasu (2014) Recent progress in genome engineering techniques in the silkworm, *Bombyx mori*. **Development, Growth, and Differentiation** 56(1):14-25. († Corresponding author) (Review article)

7. 大門高明 (2014) カイコガ亜科のバイオロジーと性フェロモン 蚕糸・昆虫バイオテック 83(2):105-114.

8. Yoko Takasu, Suresh Sajwan, Takaaki Daimon, Mizuko Osanai-Futahashi, Keiro Uchino, Hideki Sezutsu, Toshiki Tamura, and Michal Zurovec (2013) Efficient TALEN construction for *Bombyx mori* gene targeting. **PLoS One** 8:e73458.

9. Suetsugu Y, Futahashi R, Kanamori H, Kadono-Okuda K, Sasanuma S, Narukawa J, Ajimura M, Jouraku A, Namiki N, Shimomura M, Sezutsu H, Osanai-Futahashi M, Suzuki M.G, Daimon T, Shinoda T, Taniai K, Asaoka K, Niwa R, Kawaoka S, Katsuma S, Tamura T, Noda H, Kasahara M, Sugano S, Suzuki Y, Fujiwara H, Kataoka H, Arunkumar K.P, Tomar A, Nagaraju J, Goldsmith M.R, Feng Q, Xia Q, Yamamoto K, Shimada T, Mita K (2013) Large scale full-length cDNA sequencing reveals a unique genomic landscape in a lepidopteran model insect, *Bombyx mori*. **G3: Genes, Genomes, Genetics** 3:1481-1492..

10. Chikara Hirayama, Hiroshi Ono, Yan Meng, Toru Shimada, and Takaaki Daimon (2013) Flavonoids from the cocoon of *Rondotia menciiana*. **Phytochemistry** 94: 108-112.

11. Takaaki Daimon†, Takeshi Fujii, Tsuguru Fujii, Takeshi Yokoyama, Susumu Katsuma, Tetsuro Shinoda, Toru Shimada, and Yukio Ishikawa (2012) Reinvestigation of the sex pheromone of the wild silkworm *Bombyx mandarina*: The effects of bombykal and bombykyl acetate. **Journal of Chemical**

Ecology 38: 1031-1035. († Corresponding author)

12. 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** 99: 207-215. (*equal contribution, † corresponding author).

13. 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*. **Journal of Insect Science** 12: 49. († Corresponding authors)

14. Takaaki Daimon, Toshinori Kozaki, Ryusuke Niwa, Isao Kobayashi, Kenjiro Furuta, Toshiki Namiki, Keiro Uchino, Yutaka Banno, Susumu Katsuma, Toshiki Tamura, Kazuei Mita, Hideki Sezutsu, Masayoshi Nakayama, Kyo Itoyama, Toru Shimada, and Tetsuro Shinoda (2012) Precocious metamorphosis in the juvenile hormone-deficient mutant of the silkworm, *Bombyx mori*. **PLoS Genetics** 8(3): e1002486.

〔学会発表〕(計 30 件)

1. Shinoda T, Daimon T (2011) Functional analysis of a juvenile hormone biosynthesis gene mod/CYP15C1 in *Bombyx mori* The 2nd International Symposium on Silkworm Functional Genomics and Modern Silk Road.

2. 大門高明, 古崎利紀, 丹羽隆介, 小林功, 古田健次郎, 並木俊樹, 内野恵郎, 伴野豊, 勝間進, 田村俊樹, 三田和英, 瀬筒秀樹, 中山真義, 糸山享, 嶋田透, 篠田徹郎 (2012) カイコの2眠変異体は幼若ホルモン生合成能の欠損によって早熟変態を起こす 平成24年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会

3. 加藤裕子, 木内隆史, 王華兵, 大門高明, 勝間進, 嶋田透 (2012) 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 平成24年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会.

4. 惣中祐季, 阿部広明, 普後一, 藤井告, 嶋田透, 大門高明 (2012) イチジクカサンのW染色体RAPDマーカーの探索 平成24年度蚕

糸・昆虫機能利用学術講演会

5. 王華兵, 木内隆史, 國生龍平, 大門高明, 勝間進, 嶋田透 (2012) Transcriptional regulation of β -fructofuranosidase gene in the silkworm, *Bombyx mori* 平成24年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会.

6. 大門高明, 嶋田透 (2012) カイコとその近縁種における性フェロモンシステムの進化 第56回日本応用動物昆虫学会大会.

7. 篠田徹郎, 粥川琢巳, 岡田千恵子, 田中良明, 大門高明, 末次克行, 山本公子, 野田博明 (2012) RNAiによるトビイロウンカの新規殺虫剤標的遺伝子の探索 第56回日本応用動物昆虫学会大会.

8. Suetsugu Y, Daimon T, Jouraku A, Kobayashi T, Nakamura Y, Kuwazaki S, Kayukawa T, Katayose Y, Kanamori H, Kurita K, Sanada-Morimura S, Matsumura M, Tanaka Y, Tanaka H, Shiotsuki T, Shinoda T, Yamamoto K, Noda H (2012) Progress in genome sequencing of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* 6th Annual Arthropod Genomics Symposium: Arthropod Genomics 2012: Taking Center Stage and i5k Community Workshop.

9. Daimon T, Shinoda T (2012) Precocious metamorphosis in the CYP15C1-null mutant of the silkworm, *Bombyx mori* 11th International Symposium on Cytochrome P450 Biodiversity and Biotechnology.

10. Daimon T, Shinoda T (2012) Molecular characterization of moltinism mutants of the silkworm, *Bombyx mori* XXIV International Congress of Entomology.

11. Kayukawa T, Okada C, Daimon T, Suetsugu Y, Yamamoto K, Noda H, Shinoda T (2012) RNAi target validation of juvenile hormone related genes for developing novel insect growth regulators in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* XXIV International Congress of Entomology.

12. Noda H, Nakamura Y, Kawai S, Koizumi Y, Suetsugu Y, Kozaki T, Daimon T, Shinoda T, Yamamoto K, Sanada S (2012) Imidacloprid resistance in the brown planthopper: Genes for nAChR subunits and P450 enzymes XXIV International Congress of Entomology.

13. Shimada T, Fujii T, Daimon T, Abe H, Hirayama C, Ohnuma A, Katsuma S (2012) Positional cloning of the genes responsible

for important traits in the silkworm XXIV International Congress of Entomology.

14. Suetsugu Y, Kobayashi T, Daimon T, Joraku A, Nakamura Y, Kuwazaki S, Kayukawa T, Katayose Y, Kanamori H, Kurita K (2012) Progress in genome sequencing of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* XXIV International Congress of Entomology.

15. Tanaka Y, Kayukawa T, Suetsugu Y, Daimon T, Okada C, Yamamoto K, Noda H, Shinoda T (2012) The brown planthopper, *Nilaparvata lugens* is a new tool for studying the diversity of neuropeptide-signaling in insects XXIV International Congress of Entomology.

16. 大門高明 (2013) TALEN のススメ：ノックアウト時代の到来 平成 25 年度蚕系・昆虫機能利用学術講演会-日本蚕系学会第 83 回大会.

17. 大門高明, Hsu Yu-Feng, 藤井毅, 藤井告, 中島裕美子, 石川幸男, 嶋田透 (2013) テンオビシロカサンのパイオロジーと性フェロモン 平成 25 年度蚕系・昆虫機能利用学術講演会-日本蚕系学会第 83 回大会.

18. 山野峻, 木内隆史, 王華兵, 鈴木穰, 菅野純夫, 大門高明, 門田幸二, 勝間進, 嶋田透 (2013) カイコ二糖分解酵素の糖類似アルカロイドに対する抵抗性 平成 25 年度蚕系・昆虫機能利用学術講演会.

19. 大門高明, 内野恵郎, 瀬筒秀樹, 篠田徹郎 (2013) ノックアウトカイコ作出による JH シグナリングの分子機構の解析 第 57 回日本応用動物昆虫学会大会.

20. Smykal V, Daimon T, Kayukawa T, Takaki K, Shinoda T, Jindra M (2013) Development of competence to undergo metamorphosis Insect Hormones (19th Ecdysone) International Workshop, 2013.

21. 内堀美和, 大門高明, 瀬筒秀樹, 篠田徹郎 (2014) 前胸腺刺激ホルモン遺伝子ノックアウトカイコの作出 平成 26 年度蚕系・昆虫機能利用学術講演会.

22. 篠田徹郎, 大門高明, 古田賢次郎, 粥川琢巳 (2014) 生物合理的殺虫剤の標的としての幼若ホルモン関連分子 日本農薬学会第 39 回大会.

23. 篠田徹郎, 大門高明, 末次克行 (2014) 次世代シークエンサーを利用した殺虫剤抵抗性メカニズムの解析 第 58 回日本応用動物昆虫学会大会.

24. 内堀美和, 大門高明, 瀬筒秀樹, 篠田徹郎 (2014) PTTH ノックアウトカイコにおける発育異常 第 58 回日本応用動物昆虫学会大会.

25. Daimon T, Uchibori M, Nakao H, Sezutsu H, Shinoda T (2014) Knockout studies on JH receptors and JH biosynthetic genes in the silkworm, *Bombyx mori* 10th International Conference on Juvenile Hormones.

26. Shinoda T, Kayukawa T, Furuta K, Daimon T (2014) JH signalling molecules as targets for developing new IGRs 10th International Conference on Juvenile Hormones.

27. Smykal V, Daimon T, Kayukawa T, Takaki K, Shinoda T, Jindra M (2014) Importance of JH signaling arises with competence of larvae to metamorphose 10th International Conference on Juvenile Hormones.

28. Uchibori M, Daimon T, Sezutsu H, Shinoda T (2014) PTTH is not essential for development, but regulates developmental timing in *Bombyx mori* 10th International Conference on Juvenile Hormones.

29. 内堀美和, 大門高明, 粥川琢巳, 瀬筒秀樹, 篠田徹郎 (2015) PTTH ノックアウトカイコにおけるエクジステロイド生合成能 第 59 回日本応用動物昆虫学会大会.

30. 大門高明 (2012) クワコの性フェロモンの再検討 第 1 回クワコ研究会.

〔図書〕(計 2 件)

1. **Takaaki Daimon** (2015) Highly efficient targeted gene disruption in the silkworm, *Bombyx mori*, using genome editing tools. In **Targeted genome editing using site-specific nucleases** (T. Yamamoto ed.) Springer. (Book Chapter). pp.81-96.

2. 大門高明 (2014) カイコにおける TALEN を用いた遺伝子改変. 実験医学別冊 最強のステップ UP シリーズ「今すぐ始めるゲノム編集」(山本卓 編)、羊土社、pp.140-148.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大門 高明 (DAIMON, Takaaki)

研究者番号: 70451846