

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 20 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14898

研究課題名(和文) 逆遺伝学的アプローチによる不均一な蛹期間による両賭け戦略のメカニズム検証

研究課題名(英文) An reverse genetic approach to verify the mechanisms of a bet hedging strategy which consists of variable pupal periods

研究代表者

小林 淳 (Kobayashi, Jun)

山口大学・大学院創成科学研究科・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

研究成果の概要(和文)：クワコ *Bombyx mandarina* の不均一な蛹期間(両賭け戦略)を支配する劣性遺伝子群の同定を目的として、カイコ *B. mori* の相同染色体1対をクワコの相同染色体に置換したコンソミック系統を作製し、さらに2対および3対の相同染色体置換を試みた結果、1対および2対の相同染色体置換では蛹期間が平均1日程度延長し、3対の相同染色体置換(作製途中)では一部の個体の蛹期間が4日程度延長したことから、原因遺伝子の座乗する染色体の一部が明らかとなった。また、原因遺伝子の染色体上の位置を決定するための ddRAD-Seq 解析技術も開発できた。

研究成果の概要(英文)：To identify recessive genes responsible for the variable pupal period (bet-hedging strategy) of the wild mulberry silkworm *Bombyx mandarina*, several consomic strains in which one pair of homologous chromosome of the domesticated mulberry silkworm *B. mori* are replaced with the corresponding homologous chromosomes of *B. mandarina* were constructed and further two pairs and three pairs substitutions of homologous chromosomes were tried to make. The one pair and two pairs substitutions resulted in about one day extension of average pupal period, and the three pairs substitution (in the make) gave rise to some pupa showing 4 days extension, revealing a part of responsible genes localizing chromosomes. In addition, the ddRAD-Seq analysis protocol to determine the chromosomal positions of the responsible genes has been successfully developed.

研究分野：農学

キーワード：生活史戦略 季節適応 昆虫 遺伝子 進化

1. 研究開始当初の背景

微生物から動植物まで幅広い生物種において、発育停止（休眠など）の誘導あるいは停止期間を集団内で不均一化させる両賭け戦略により、集団内の一部の個体が予測不能な環境変動に遭遇しても生き延びることができるが、個体差をランダムに生じさせるメカニズムは明らかにされていない。カイコの野生種クワコでも蛹期間を不均一化させる両賭け戦略が見られるが、カイコはこの能力をおそらく家畜化の過程で喪失しており、蛹期間は均一である。カイコとクワコは交雑可能であり、妊性を有する後代が得られることから、両者の雑種は、両賭け戦略の分子遺伝学的メカニズム解明に絶好の材料といえる。

これまでに研究代表者小林は、カイコとクワコの交雑後代における蛹期間と染色体組成の関係を統計解析し、ポリジーン系支配を示唆する結果を得るとともに、原因遺伝子が座乗する16対の候補染色体を推定した。さらに、研究分担者の伴野が、クワコ単一染色体ヘテロ保持カイコ（大造）系統を作製したことにより、ポリジーン系支配モデルの検証と原因遺伝子群の同定への逆遺伝学的アプローチが可能となった。

2. 研究の目的

多種多様な生物集団で見られる不均一な発育停止（休眠など）は、予測不能な環境変動において一部の個体が生き延びるための両賭け戦略であるが、その確率的な発育調節メカニズムは未解明である。カイコの野生種クワコの不均一な蛹期間も両賭け戦略として機能しており、カイコは家畜化の過程で不均一化に関与する原因遺伝子（群）の機能を喪失したと考えられている。本研究課題では、これまでの研究から示唆されたポリジーン系支配モデルに基づいて、ゲノム解読されたカイコ（大造）の染色体の一部を原因遺伝子の座乗が予想されるクワコ由来の候補染色体（少なくとも3対）と置換した系統を作製し、蛹期間不均一化の再現と原因遺伝子（群）の同定を試みるという画期的な逆遺伝学的アプローチにより両賭け戦略のメカニズム解明をめざす。

3. 研究の方法

(1) ポリジーン系支配モデルで予想される染色体組成の再現と蛹期間の検証

クワコ単一染色体ヘテロ保持カイコ（大造）系統を計画的かつ段階的に交雑し、蛹期間不均一化の原因遺伝子群の座乗が予想される16対の候補染色体の少なくとも3対がクワコ由来の染色体（あるいはその一部）のホモ接合となる系統を作製し、染色体組成と蛹期間の関係を検証する。

(2) 蛹期間調節に関与する遺伝子群の同定と機能解析

前項で蛹期間の不均一化が再現された系統において、まず全個体の候補染色体の大まかな組換え位置を推定するためのddRAD-Seq法を開発し、さらに一連の部位特異的PCRおよびSNP解析で精査し、組換え位置と蛹期間の関係から原因遺伝子の位置を特定し、さらに、その配列と遺伝子発現を解析して原因遺伝子の同定と機能解明を試み、両賭け戦略のメカニズムを推察する。

4. 研究成果

(1) ポリジーン系支配モデルで予想される染色体組成の再現と蛹期間の検証

クワコ単一染色体ヘテロ保持カイコ（大造）系統シリーズの補完と維持：九州大学遺伝子資源開発研究センターにおいて作製されたクワコ（坂戸産）由来の単一染色体ヘテロ保持大造系統シリーズを継代維持するとともに、欠落していた第19染色体ヘテロ保持系統の作出に成功し、さらにこれまでのクワコ由来のW染色体を有するシリーズに加え、新たにカイコ由来のW染色体を有するシリーズも作出できた。

クワコ染色体ホモ接合系統の作製と蛹期間の調査：蛹期間調節に関与する候補遺伝子の座乗が示唆される第4, 8, 11, 15, 18染色体ヘテロ系統のsib交配後代をジェノタイピングにより選抜し、クワコ第8, 11, 15, 18各染色体ホモ接合系統（コンソミック系統）を作製できたが、クワコ第4染色体に関しては新規胚致死劣性遺伝子の存在が明らかとなったので、その近傍のみカイコとクワコがヘテロ状態の不完全コンソミック系統を作製した。また、クワコ第18染色体コンソミック系統とクワコ第8, 11, 15染色体コンソミック系統のいずれかの交配後代を選抜し、二種染色体ホモ接合系統（第8+18, 11+18, 15+18）を作製し、さらに、三種染色体ホモ接合系統（第8+11+18, 8+15+18, 11+15+18染色体）の作製を実施した。

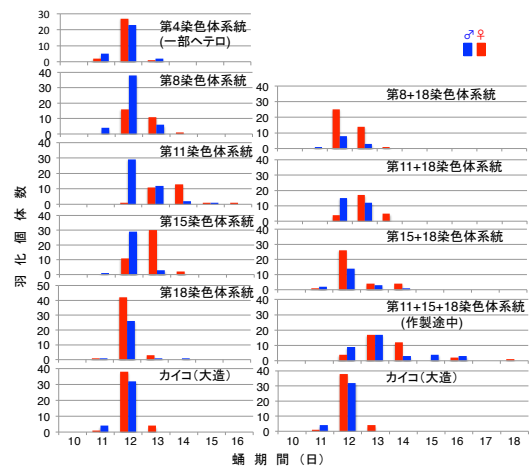


図1. 各種クワコ相同染色体ホモ接合カイコ系統における蛹期間

作製あるいは作製途中の各種クワコ相同染色体ホモ接合系統の蛹期間を調査したところ、いずれのコンソミック系統および二種染色体ホモ接合系統においても、大造と比べて蛹期間が平均1日程度延長する弱い効果が認められ、作製途中の三種染色体ホモ接合系統では、一部の個体の蛹期間が4日程度延長し、ポリゾン系支配を裏付ける結果が得られた。

(2) 蛹期間調節に関与する遺伝子群の同定と機能解析

DNA解析による原因遺伝子マッピング：原因遺伝子のマッピングへのddRAD-Seq分析の応用を目的として、第18染色体上に座乗するクワコ成虫体色の暗色化を支配する新規遺伝子の位置決定の実施し、約450kbpの領域内に限局できた(図2)。その中には二つのarylalkylamine N-acetyltransferase遺伝子が含まれていたが、それらの翻訳配列にはクワコとカイコで酵素活性に影響するような差異が見られず、調節領域あるいは他の遺伝子の関与が示唆された。

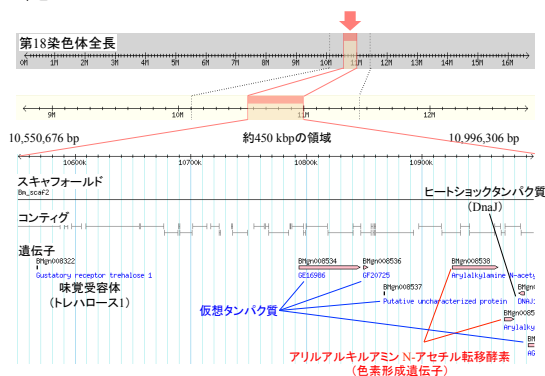


図2. ddRAD-Seqによって限局された第18染色体上の隠蔽原因遺伝子存在領域

原因遺伝子群の同定と機能解析：三種染色体ホモ接合系統の完成に至らなかったため、ddRAD-Seq法を用いた原因遺伝子の同定と機能解析は今後の課題として残された。

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3件)

- ① Yutaka Banno, Tsuguru Fujii, Hisayoshi Fukumori, Kimiko Yamamoto, Jun Kobayashi, Genetic studies on two egg mutants, “small size egg” and “lethal non-diapausing egg” in the silkworm, *Bombyx mori*, *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, 査読有, 86, 2017, 123-126
DOI: 10.11416/jibs.86.3_123

- ② Tsuguru Fujii, Yutaka Banno, Unique phenotype of the metamorphosis-defective mutant Ishigameyoh (gap): Establishment of a PCR-based marker for efficacious mutant maintenance in *Bombyx mori*, *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, 査読有, 86, 2017, 95-103
DOI: 10.11416/jibs.86.3_095
- ③ Hisayoshi Fukumori, Jung Lee, Tsuguru Fujii, Zenta Kajiura, Yutaka Banno, Long-term preservation of eri and ailanthus silkworms using frozen gonads, *Cryobiology*, 査読有, 77, 2017, 71-74
DOI: 10.1016/j.cryobiol.2017.05.003

[学会発表] (計9件)

- ① 浜川智樹・門野敬子・富田秀一郎・藤井告・伴野豊・小林淳, クワコとカイコの染色体置換系統の作製と表現型解析, 第62回日本応用動物昆虫学会大会, 2018年3月25日~27日, 鹿児島大学郡元キャンパス (鹿児島)
- ② 浜川智樹・田中さおり・門野敬子・小林徹也・富田秀一郎・藤井告・伴野豊・小林淳, 染色体置換系統の利用によるカイコの家畜化過程で生じた変異形質の解析, 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017), 2017年12月6日~9日, 神戸ポートアイランド (神戸)
- ③ 田中さおり・門野敬子・小林徹也・富田秀一郎・藤井告・伴野豊・小林淳, クワコとカイコのコンソミック系統の表現型解析, 第61回日本応用動物昆虫学会大会, 2017年3月27日~29日, 東京農工大学小金井キャンパス (小金井)
- ④ 田中さおり・門野敬子・小林徹也・富田秀一郎・藤井告・伴野豊・小林淳, コンソミック系統を用いたカイコの遺伝的背景におけるクワコ染色体の機能解析, 第39回日本分子生物学会年会, 2016年11月30日~12月2日, パシフィコ横浜 (横浜)
- ⑤ 竹田津桜・門野敬子・小林徹也・富田秀一郎・藤井告・伴野豊・小林淳, クワコ染色体置換系統を用いたクワコ蛹期間の遺伝学的解析, 日本昆虫学会第76回大会・第60回日本応用動物昆虫学会大会・合同大会, 2016年3月26日~29日, 大阪府立大学中百舌鳥キャンパス (堺)
- ⑥ 竹田津桜・内梨菜摘・門野敬子・伴野豊・小林淳, クワコとカイコの染色体置換による家畜化の過程で生じた量的形質の再現と遺伝的メカニズム解析, 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会・合同大会, 2015年12月1日~12月4日, 神戸ポートアイランド (神戸)
- ⑦ 小林淳, クワコの蛹期間はどこまで遺伝的に決まっているのか?, クワコ研究会, 2015年9月27日, 北海道大学農学部 (札幌)

- ⑧ 竹田津桜・門野敬子・伴野豊・小林淳, クワコの蛹期間調節遺伝子同定を目的とした染色体置換カイコ系統の作製, 日本蚕糸学会第85回大会, 2015年9月26日~27日, 北海道大学農学部 (札幌)
- ⑨ Sakura Takedazu, Keiko Kadono-Okuda, Yutaka Banno, Jun Kobayashi, Genetic analysis of variable pupal period (bet-hedging strategy) in the wild silkworm *Bombyx mandarina*, The 4th Asia-Pacific Congress of Sericulture and Insect Biotechnology, April 23-25, Hueundae Grand Hotel, (Busan, Korea)

[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・大学院創成科学研究科・教授
研究者番号: 7 0 2 4 2 9 3 0

(2)研究分担者

伴野 豊 (BANNO YUTAKA)
九州大学・農学研究院・教授
研究者番号: 5 0 1 9 2 7 1 1

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

門野敬子 (KADONO KEIKO)

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合
研究機構・生物機能利用研究部門 新産業開
拓研究領域・領域長
研究者番号: 4 0 3 5 7 2 2