

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05672

研究課題名(和文)カイコの生育初期の致死に関わる遺伝子群の解析

研究課題名(英文) Positional cloning and functional analysis of the genes responsible for lethal mutation in the silkworm, *Bombyx mori*

研究代表者

伊藤 克彦 (Ito, Katsuhiko)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80725812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、カイコの生育初期における3つの異なる時期の致死に関わる突然変異遺伝子について、単離と機能解析を進めた。「卵致死」に関わるl-19遺伝子は、ポジショナルクローニングにより、候補領域をカイコ第12番染色体の200 kb内に限定することに成功し、さらにその領域内で1つの有力な候補遺伝子を発見した。「幼虫致死(孵化直後)」に関わるl-nl遺伝子は、すでに単離していた候補遺伝子が間違いなくl-nl遺伝子であることをゲノム編集により証明した。「幼虫致死(脱皮不全)」に関わるnm-d遺伝子は、ポジショナルクローニングにより、候補領域をカイコ第9番染色体の2.7 Mb内に限定することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、カイコを従来の養蚕業上重要な昆虫として位置づけるのではなく、作物の害虫であるチョウ目昆虫として考え、致死という表現型をペストコントロールに展開するという目的をもつ。研究成果の学術的意義は、得られる成果が昆虫の生死に関わる新たな重要な遺伝子の発見につながる点である。また、研究成果の社会的意義は、明らかにした生命現象をペストコントロールに応用することで作物保護につながる点である。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to identify the lethal genes that are expressed at three different growth stages, egg, hatching, and molting stages. In the l-19 gene responsible for egg lethal, we performed the positional cloning and successfully narrowed down the l-19 locus to a region approximately 200 kb long on chromosome 12. Moreover, we found one candidate gene for the l-19 gene. In the l-nl gene responsible for lethality immediately after hatching, we demonstrated that one best candidate gene is responsible for the l-nl phenotype through positional cloning and genome editing approaches. In the nm-d gene responsible for abnormal molting, we delimited the nm-d locus to an approximately 2.7 Mb region on chromosome 9.

研究分野：昆虫遺伝学

キーワード：カイコ 突然変異 致死 ポジショナルクローニング ゲノム編集

### 1. 研究開始当初の背景

チョウ目昆虫のモデル生物として位置づけられているカイコの特徴の一つは、突然変異体の豊富さが挙げられる。発育・成長、形態形成、生理形質、行動など、これまでに **500** を越える突然変異体が発見・作出されており、これらは長い養蚕の歴史のなかで生まれた優れた遺伝資源と言える (**Banno et al., 2005**)。さらに近年、カイコのゲノム解析が進んだことにより、これらの突然変異の原因遺伝子の単離が容易にできるようになった。それにより年々、様々な形質に関わる遺伝子とその機能が多数報告されている。しかしながら、明らかになった遺伝子は全体の一部にしか過ぎず、他の有用な変異形質に関わる遺伝子の解析はまだ多く残されているのが現状である。

このような背景のなか、我々は、カイコの致死に関わる突然変異の原因遺伝子にフォーカスし、その単離と機能解析に取り組んでいる。それは、**(1)** これまでに致死に関わる遺伝子の単離報告例が少なく、新たな知見が得られると考えたこと、**(2)** 致死という現象は昆虫にとっての「弱点」を示していることから、害虫防除の基礎研究につながる可能性があると考えたこと、さらに**(3)** これまでに単離された致死変異体には、哺乳類の遺伝病のモデルとして利用できる可能性を示すものがあつたこと (**Meng et al., 2009; Urano et al., 2010**)、が理由である。

本研究では、数あるカイコの致死突然変異のなかでも、**3** つの異なる時期の致死に関わる遺伝子について研究を進めた。具体的には、「卵致死」、「幼虫致死 (孵化直後)」および「幼虫致死 (脱皮不全)」について解析を進め (図 1)、カイコの特に生育初期における重要な遺伝子およびその遺伝子産物が関わる生体内での反応経路の特定を試みた。

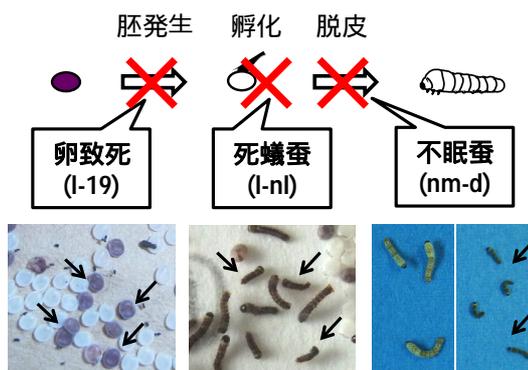


図1. 本研究で取り組むカイコの致死に関わる突然変異  
「卵致死」には、*l-19*遺伝子を、「幼虫致死 (孵化直後)」には死蟻蚕と呼ばれる *l-nl* 遺伝子を、「幼虫致死 (脱皮不全)」には不眠蚕と呼ばれる *nm-d* の遺伝子を明らかにする。上段がそれぞれの遺伝子の関わる時期を、下段がそれぞれの表現系の写真を示す。黒矢印が変異形質を示す個体である。

### 2. 研究の目的

カイコでは致死に関わる突然変異体が数多く報告されているが、原因遺伝子が明らかになった例は少ない。そこで本研究では、「卵致死」、「幼虫致死 (孵化直後)」および「幼虫致死 (脱皮不全)」の **3** つの異なる時期の致死に関わる遺伝子の単離に取り組み (図 1)、それぞれの時期で重要となる生命現象を明らかにすることを目的とする。この解析では、ポジショナルクローニング (突然変異遺伝子の単離手法) による各致死遺伝子の責任領域の絞り込みと、その中に存在する予測遺伝子の標準系統および変異系統間比較を行う。これらのアプローチにより、まずは候補遺伝子を特定する。さらに本研究では、**Crispr/cas9** システムを用いたゲノム編集技術の研究室への導入にも着手する。そして、この導入した技術を用いて、単離した候補遺伝子がそれぞれの表現型に関わっているかどうかを検証することも目的の一つとする。

### 3. 研究の方法

カイコゲノム情報を利用したポジショナルクローニングを進め、「卵致死」には *l-19* 遺伝子を、「幼虫致死 (孵化直後)」には死蟻蚕と呼ばれる *l-nl* 遺伝子を、そして「幼虫致死 (脱皮不全)」には不眠蚕と呼ばれる *nm-d* 遺伝子を単離し (図 1)、各遺伝子産物が生体内のどのような反応経路に関わっているのかを突き止める。また、近年カイコでも確立された **Crispr/cas9** システムを用いたゲノム編集により、単離した候補遺伝子が確実にその表現型に関わっていることを証明する。

### 4. 研究成果

#### (1) 「卵致死」に関わる *l-19* 遺伝子の解析

*l-19* 遺伝子に関しては、ポジショナルクローニングによりゲノム上の候補領域をカイコ第 **12** 番染色体の僅か **200 kb** 内に限定することに成功し、さらにその領域内で **1** つの有力な候補遺伝子の単離に成功した。*l-19* 突然変異系統由来の候補遺伝子産物には、標準系統由来の遺伝子産物に認められない、二次構造を変化させるアミノ酸置換が見つかった。また、候補遺伝子は表現型が観察される胚発生初期において高発現していることも明らかになった。さらに、ゲノム編集による候補遺伝子の機能証明を行なった結果、候補遺伝子をノックアウトしたカイコは、確かに「卵致死」の表現型を示すことがわかった。しかしながら、突然変異系統が反転期と呼ばれる卵内で器官が形成される時期 (胚発生初期) で致死するのに対し、ノックアウト系統は催青期と呼ばれる孵化直前の時期 (胚発生後期) で致死した。したがって両者で卵致死の時期が異なることから、

候補遺伝子が本当に目的の *l-19* 遺伝子であるのかは判断できなかった。

(2) 「幼虫致死 (孵化直後)」に関わる *l-nl* 遺伝子の解析

*l-nl* 遺伝子に関しては、**NRF6 protein** をコードする候補遺伝子をゲノム編集でノックアウトすることで、「幼虫致死 (孵化直後)」の表現型が生じることを突き止めた。また、*l-nl* 突然変異系統と候補遺伝子ノックアウト系統の相補性検定を行い、両者の対立関係を調査した結果、両系統の交配区で「幼虫致死 (孵化直後)」の表現型を示す個体が得られたため、候補遺伝子が間違いなく *l-nl* 遺伝子であることも証明した。

また、ゲノム編集により特定に成功した原因遺伝子の機能解析を進め、本遺伝子が脂肪体で高発現している膜タンパク質をコードしていることも突き止めた。昆虫の脂肪体は、エネルギーの貯蔵や供給に関わる重要な組織である。このことから、*l-nl* による「幼虫致死 (孵化直後)」の原因は、脂肪体におけるエネルギー代謝異常により生命活動を維持できなくなり致死している可能性があると考えた。

(3) 「幼虫致死 (脱皮不全)」に関わる *nm-d* 遺伝子の解析

*nm-d* 遺伝子に関しては、ポジショナルクローニングによりゲノム上の候補領域をカイコ第 9 番染色体の **2.7 Mb** 内に絞り込むことに成功したものの、その中に存在する予測遺伝子数が **100** を超え、候補遺伝子の特定が困難であった。しかしながらこの領域内の各遺伝子について遺伝子データベースを駆使した機能予測を行った結果、脱皮変態に関わる可能性が示唆される候補遺伝子が **1** つ見つかった。

引用文献

1. Banno, Y., Fujii, H., Kawaguchi, Y., Yamamoto, K., Nishikawa, K., Nishisaka, A., Tamura, K. and Eguchi, S. (2005) **A Guide to the Silkworm Mutants: 2005, Gene Name and Gene Symbol.** Kyusyu University, Fukuoka, Japan.
2. Meng, Y., Katsuma, S., Daimon, T., Banno, Y., Uchino, K., Sezutsu, H., Tamura, T., Mita, K. and Shimada, T. (2009) **The silkworm mutant *lemon (lemon lethal)* is a potential insect model for human sepiapterin reductase deficiency.** *J. Biol. Chem.*, **284**, 11698-11705.
3. Urano, K., Daimon, T., Banno, Y., Mita, K., Terada, T., Shimizu, K., Katsuma, S. and Shimada, T. (2010) **Molecular defect of isovaleryl-CoA dehydrogenase in the skunk mutant of silkworm, *Bombyx mori*.** *FEBS J.*, **277**, 4452-4463.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takemura Y, Matsumoto Y, Ohnuma A, Mochida Y, Yokoyama T, Ito K	4. 巻 89
2. 論文標題 Genetic studies on the novel lethal mutant, light orange lethal, in the silkworm, Bombyx mori	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Insect Biotechnol Sericol	6. 最初と最後の頁 31-37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤 克彦・安藤 俊哉・横山 岳・伴野 豊・佐原 健
2. 発表標題 ゲノム編集を用いたカイコ黒蛾突然変異の候補遺伝子（Bmcortex）の機能解析
3. 学会等名 日本蚕糸学会第90回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹村洋子・松本祐希名・大沼昭夫・持田裕司・横山岳・伊藤克彦
2. 発表標題 カイコ新規致死突然変異体light orange lethalについて
3. 学会等名 日本蚕糸学会第90回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤 克彦・横山 岳
2. 発表標題 死蟻蚕の原因遺伝子の単離
3. 学会等名 日本蚕糸学会第89回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本 祐希名・横山 岳・伊藤 克彦
2. 発表標題 カイコ19致死のポジショナルクローニング
3. 学会等名 日本蚕糸学会第89回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 津田 萌・横山 岳・伊藤 克彦
2. 発表標題 カイコの成虫寿命を決定する遺伝子sliの機能解析
3. 学会等名 日本蚕糸学会第89回大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------