

機関番号：12601

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20688003

研究課題名 (和文) カイコの眠性変異体の分子遺伝学的解析

研究課題名 (英文) Molecular genetic studies on moltinism mutants of the silkworm, *Bombyx mori*

研究代表者

大門 高明 (DAIMON TAKAAKI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：70451846

研究成果の概要 (和文)：本課題では、カイコの眠性決定座位である *mod*, *rt*, *M* のポジショナルクローニングを行うことで、カイコの眠性決定の分子機構の解明を試みた。カイコの眠性変異体 *mod* については、その原因遺伝子の同定と機能解析が終了し、*mod* の原因が幼若ホルモンの生合成の異常によるものであることを明らかにした。*rt* については、約 400 kb まで絞り込んだが、有力な候補遺伝子の特定には至らなかった。*M* については、*M* 候補遺伝子の詳細な発現解析を行い、*M* 座がエクジソン生合成に関わる可能性を示唆する結果が得られた。この *M* の候補遺伝子は、生物のボディプランに関わる重要な遺伝子であるが、形態形成以外にも内分泌系への関与を通して生物の成長や発育タイミングを決定するという、これまで全く知られていなかった新規の役割を担う可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：To reveal the molecular mechanism of moltinism in the silkworm, positional cloning of *mod*, *rt*, *M* loci was performed in this study. A gene responsible for the *mod* was identified and its function was demonstrated: *mod* plays an essential role in JH biosynthesis. The genomic region corresponding to *rt* and *M* was narrowed to ~400 and ~40 kb, respectively. The results suggest that the *M* locus corresponds to a transcription factor that potentially involves in biosynthesis of ecdysteroids.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
21 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
22 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
年度			
総計	9,900,000	2,970,000	12,870,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用昆虫学

キーワード：カイコ・変態・眠性・ecdysteroid・juvenile hormone

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初は、カイコ全ゲノム情報が明らかになり、ポジショナルクローニングによるカイコ変異体の原因遺伝子の同定がようやく可能になった時期であった。

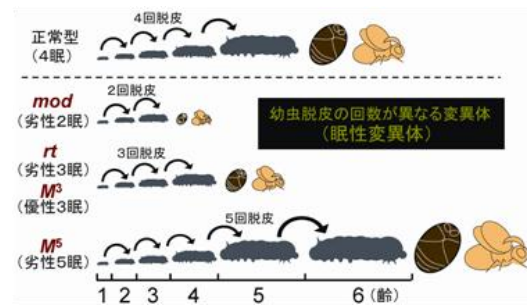
2. 研究の目的

カイコの眠性変異体である *mod*, *rt*, *M* についてポジショナルクローニングを行い、カイコの眠性決定機構の分子基盤を明らかにする。

3. 研究の方法

カイコ全ゲノム情報を利用して、*mod*, *rt*, *M* のポジショナルクローニングを行った。各変異体を正常系統を交配し、ゲノムの任意の位置に作成した PCR マーカーを用いてマッピングし、責任領域を絞り込んだ。候補遺伝子の発現パターンを解析し、候補遺伝子産物の生化学的性質を明らかにした。さらに、*mod* のついでには、トランスジェニックカイコを作成してレスキュー実験を行った。

4. 研究成果



(1) *mod* のポジショナルクローニング

mod のポジショナルクローニングを行って、その原因遺伝子を特定し、機能証明を行った。*mod* は JH 合成に関わる酸化還元酵素をコードしており、*mod* にはその遺伝子に null mutation が入っていた。トランスジェニック技術を用いて *mod* 系統に正常型 allele を発現させたところ、*mod* で見られる表現型（早熟変態）がレスキューされ、眠性が正常に回復した（図1）。

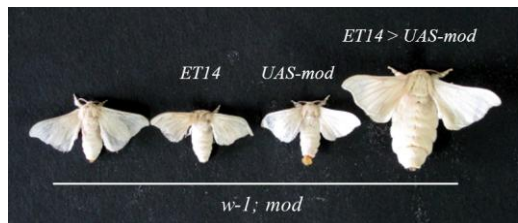


図1. *mod* のトランスジェニックレスキュー実験

mod では血液中の JH が全く検出されないため、*mod* 遺伝子は JH 合成に必須であることが遺伝学的に完全に証明された（図2）。

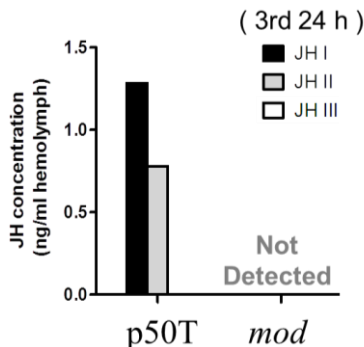


図2. 血液中の JH タイター

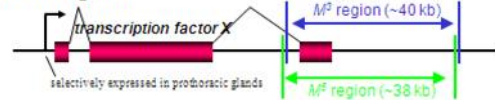
(2) *rt* のポジショナルクローニング

rt については、*rt* の浸透率が低く、早熟変態という表現型が極めて不安定であった。2,000 個体ほどの BC1 個体を用いてマッピングを行ったが、候補領域は 400 kb までしか絞り込むことができなかった。しかし、*rt* のマッピングの過程で、*rt* 近傍に座位する *Gb* 座の原因遺伝子の特定に成功した。

(3) *M* のポジショナルクローニング

M については、*M3*, *M5* をそれぞれ独立にマッピングし、約 40 kb まで絞り込むことができた。驚くべきことに、*M3* と *M5* の候補領域はほとんど重なっており、カイコの眠性はこのわずか 40 kb 領域によって主に決定されていることが判明した（図3）。

positional cloning of *M*:



カイコの幼虫脱皮回数は、ゲノム中のわずか 40-kb 領域で決定される

図3. *M* のポジショナルクローニングの結果。

この *M* の候補遺伝子 (*Pt* と仮称) は転写因子であり、脱皮ホルモンの生合成器官である前胸腺において特に強く発現する。興味深いことに、*Pt* の発現パターンは脱皮ホルモン生合成遺伝子群と同調して観察された。このことは、*Pt* 遺伝子が、直接あるいは間接的に脱皮ホルモン生合成遺伝子群を支配する可能性を示唆する。あるいは別の可能性として、*Pt* 遺伝子が前胸腺の成長を促進あるいは抑制することによってカイコの発育タイミングを支配していることも考えられる。いずれにせよ、*Pt* が転写因子である以上、*Pt* は下流のターゲット遺伝子の発現調節を行うことによってカイコの眠性を支配するものと考えられた。

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 13 件)

1. Ken-ichiro Tatematsu, Kimiko Yamamoto, Keiro Uchino, Junko Narukawa, Tetsuya Iizuka, Yutaka Banno, Susumu Katsuma, Toru Shimada, Toshiki Tamura, Hideki Sezutsu, and Takaaki Daimon (2011) Positional cloning of silkworm *white egg 2* (*w-2*) locus shows functional conservation and diversification of ABC transporters for pigmentation in insects. *Genes to Cells* (in press).

2. 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** 277(21): 4452-4463 .
3. 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** 107(25): 11471-11476. (* These authors contributed equally to this work)
4. Takaaki Daimon, Masao Mitsuhiro, Susumu Katsuma, Hiroaki Abe, Kazuei Mita, and Toru Shimada (2010) Recent transposition of yabusame, a novel piggyBac-like transposable element in the silkworm *Bombyx mori*. **Genome** 53(8): 585-593.
5. Tsuguru Fujii, Takaaki Daimon, Keiro Uchino, Yutaka Banno, Susumu Katsuma, Hideki Sezutsu, Toshiki Tamura, and Toru Shimada (2010) Transgenic analysis of the BmBLOS2 gene that governs the translucency of the larval integument of the silkworm, *Bombyx mori*. **Insect Molecular Biology** 19(5): 659-667.
6. Yan Meng, Susumu Katsuma, Takaaki Daimon, Yutaka Banno, Keiro Uchino, Hideki Sezutsu, Toshiki Tamura, Kazuei Mita, and Toru Shimada (2009) The silkworm mutant lemon (lemon lethal) is a potential insect model for human Sepiapterin reductase deficiency. **Journal of Biological Chemistry** 284(17): 11698 -11705.
7. Susumu Katsuma, Tadashi Nakanishi, Takaaki Daimon, and Toru Shimada (2009) N-linked glycans located in the pro-region of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus V-CATH are essential for the proper folding of V-CATH and V-CHIA. **Journal of General Virology** 90(1): 170-176.
8. The International Silkworm Genome Consortium - Chinese group: Qingyou Xia, Jun Wang, Zeyang Zhou, Ruiqiang Li, Wei Fan, Daojun Cheng, Tingcai Cheng, Junjie Qin, Jun Duan, Hanfu Xu, Qibin Li, Ning Li, Mingwei Wang, Fangyin Dai, Chun Liu, Ying Lin, Ping Zhao, Huijie Zhang, Shiping Liu, Xingfu Zha, Chunfeng Li, Aichun Zhao, Minhui Pan, Guoqing Pan, Yihong Shen, Zhihong Gao, Zilong Wang, Genhong Wang, Zhengli Wu, Yong Hou, Chunli Chai, Quanyou Yu, Ningjia He, Ze Zhang, Songgang Li, Huanming Yang, Cheng Lu, Jian Wang, and Zhonghuai Xiang, Japanese group : Kazuei Mita, Masahiro Kasahara, Yoichiro Nakatani, Kimiko Yamamoto, Hiroaki Abe, Brudrul Ahsan, Takaaki Daimon, Koichiro Doi, Tsuguru Fujii, Haruhiko Fujiwara, Asao Fujiyama, Ryo Futahashi, Shin-ichi Hashimoto, Jun Ishibashi, Masafumi Iwami, Keiko Kadono-Okuda, Hiroyuki Kanamori, Hiroshi Kataoka, Susumu Katsuma, Shinpei Kawaoka, Hideki Kawasaki, Yuji Kohara, Toshinori Kozaki, Reginaldo M. Kuroshu, Seigo Kuwazaki, Kouji Matsushima, Hiroshi Minami, Yukinobu Nagayasu, Takao Nakagawa, Junko Narukawa, Junko Nohata, Kazuko Ohishi, Yukiteru Ono, Mizuko Osanai-Futahashi, Katsuhisa Ozaki, Wei Qu, Ladislav Roller, Shin Sasaki, Takuji Sasaki, Atsushi Seino, Masaru Shimomura, Michihiko Shimomura, Tadasu Shin-I, Tetsuro Shinoda, Takahiro Shiotsuki, Yoshitaka Suetsugu, Sumio Sugano, Makiko Suwa, Yutaka Suzuki, Shigeharu Takiya, Toshiki Tamura, Hiromitsu Tanaka, Yoshiaki Tanaka, Kazushige Touhara, Tomoyuki Yamada, Minoru Yamakawa, Naoki Yamanaka, Hiroshi Yoshikawa, Yang-Sheng Zhong, Toru Shimada and Shinichi Morishita (2008) The genome of a lepidopteran model insect, the silkworm *Bombyx mori*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 38(12: Special Issue on the Silkworm Genome): 1036-1045.
9. Ryo Futahashi*, Jotaro Sato*, Yan Meng*, Shun Okamoto, Takaaki Daimon, Kimiko Yamamoto, Yoshitaka Suetsugu, Junko Narukawa, Hirokazu Takahashi, Yutaka Banno, Susumu Katsuma, Toru Shimada, Kazuei Mita, and Haruhiko Fujiwara (2008) yellow and ebony are the responsible genes for the larval color mutants of the silkworm *Bombyx mori*. **Genetics** 180(4): 1995-2005. (* These authors contributed equally to this work)
10. K P Arunkumar, Archana Tomar, Takaaki Daimon, Toru Shimada, and J Nagaraju

(2008) WildSilkbase: An EST database of wild silkmoths. **BMC Genomics** 9: 338 (available online: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/9/338/abstract>).

11. **Takaaki Daimon**, Tomohiro Taguchi, Yan Meng, Susumu Katsuma, Kazuei Mita, and Toru Shimada (2008) Beta-fructofuranosidase genes of the silkworm, *Bombyx mori*: Insight into enzymatic adaptation of *B. mori* to toxic alkaloids in mulberry latex. **Journal of Biological Chemistry** 283(22): 15271-15279.

12. Shinpei Kawaoka, Susumu Katsuma, **Takaaki Daimon**, Ryoko Isono, Naoko Omuro, Kazuei Mita, and Toru Shimada (2008) Functional analysis of four Gloverin-like genes in the silkworm, *Bombyx mori*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** 67(2): 87-96.

13. Yan Meng, Naoko Omuro, Shunsuke Funaguma, **Takaaki Daimon**, Shinpei Kawaoka, Susumu Katsuma and Toru Shimada (2008) Prominent down-regulation of storage protein genes after bacterial challenge in eri-silkworm, *Samia cynthia ricini*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** 67(1): 9-19.

[学会発表] (計 24 件)

1. **OT. Daimon**, T. Kozaki, K. Uchino, I. Kobayashi, K. Furuta, T. Namiki, M. Murata, H. Sezutsu, Y. Banno, S. Katsuma, K. Mita, T. Shimada, and T. Shinoda (2010) Positional cloning of genes which control the number of larval molting in the silkworm, *Bombyx mori*. 18th International Ecdysone Workshop. July 19-23, Biology Center ASCR, Ceske Budejovice, Czech Republic (poster presentation).

2. **○大門高明**、平山力、勝間進、嶋田透 (2010) カイコのフラボノイド糖の分子基盤. 第10回東京大学生命科学シンポジウム (Todai BIO 2010). 2010年5月1日 (土) 東京大学安田講堂 (ポスター発表)

3. **○大門高明**、平山力、勝間進、嶋田透 (2010) カイコの笹糖 b(Gb) 遺伝子の原因遺伝子の同定. 日本蚕糸学会第80回記念大会. 2010年4月3-4日 信州大学繊維学部 (口頭発表)

4. **T. Daimon**, Y. Meng, S. Katsuma, and T. Shimada (2010) 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 (Diversity and evolution of insects and related species)). 2009年12月9-12日、パシフィコ横浜. (oral presentation)

5. T. Shimada, **T. Daimon**, T. Fujii, Y. Meng, T. Yoshinaga, A. Ohnuma, C. Hirayama, S. Katsuma, H. Abe, and K. Mita. Genetic mechanisms controlling the food habit of *Bombyx mori*, a monophagous insect depending on mulberry. The 6th Asia-Pacific Congress of Entomology (APCE2009) Oct. 18-22, 2009, Beijing, China.

6. H. Sezutsu, K. Uchino, **T. Daimon**, J. Sato, M. Shimomura, H. Minami, Y. Miyashita, C. Sato, I. Kobayashi, K. I. Tatematsu, T. Iizuka, N. Yonemura, T. Shimada, K. Mita, T. Tamura. Development of transgenic silkworm *Bombyx mori* for functional genomics. The 6th Asia-Pacific Congress of Entomology (APCE2009) Oct. 18-22, 2009, Beijing, China.

7. **OT. Daimon**, Y. Meng, T. Yoshinaga, S. Katsuma, and T. Shimada (2009) Enzymatic adaptation of mulberry specialists to mulberry's toxic sugar-mimic alkaloids. The 5th Asia-Pacific Conference on Chemical Ecology. October 26-30, Honolulu, Hawaii, USA. (oral presentation).

8. **OT. Daimon**, Y. Meng, T. Yoshinaga, S. Katsuma, and T. Shimada (2009) 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, The Orthodox Academy in Kolympari, Crete, Greece (oral presentation).

9. Yan Meng, S. Katsuma, **T. Daimon**, Y. Banno, K. Uchino, H. Sezutsu, T. Tamura, K. Mita, and T. Shimada. The silkworm mutant lemon (lemon lethal) is a potential insect model for human Sepiapterin reductase deficiency. Aug. 23-29. 2009. Orthodox Academy of Crete, Crete, Greece. (Oral presentation).

10. H. Sezutsu, K. Uchino, **T. Daimon**, J. Sato, M. Shimomura, H. Minami, Y. Miyashita, C. Sato, I. Kobayashi, K. I. Tatematsu, T. Iizuka, N. Yonemura, T. Shimada, K. Mita, T. Tamura. Construction

of enhancer trap system and Bombyx Trap DataBase for the analysis of gene function in silkworm *Bombyx mori*. The 8th International Workshop on Molecular Biology and Genetics of the Lepidoptera. Aug. 23-29. 2009. Orthodox Academy of Crete, Crete, Greece. (Oral presentation).

11. 金井正敏、○**大門高明**、平山力、勝間進、嶋田透 (2009) カイコの笹繭 b (Gb) 遺伝子のポジショナルクローニング. 日本蚕糸学会第 79 回大会 (蚕糸・昆虫機能学術講演会) 2009 年 3 月 21-22 日, 東京農工大学農学部, 一般講演 (口頭発表).

12. ○佐藤丈太郎・**大門高明**・光廣政男 (東大農)・内野恵郎・瀬筒秀樹・小林功・田村俊樹 (生物研)・勝間進・嶋田透 (東大農) カイコのジーントラップ系統のベクター挿入部位の解析. 日本蚕糸学会第 79 回大会 (蚕糸・昆虫機能学術講演会) 2009 年 3 月 21-22 日 (日), 東京農工大学農学部, 一般講演 (口頭発表).

13. ○Y. Song, **T. Daimon**, Y. Meng, K. Yoshida, M. Nagata, S. Katsuma, and T. Shimada (2009) Cloning of the gene coding for an egg glue protein in *Bombyx mori* and its linkage to the Ng locus. 日本蚕糸学会第 79 回大会 (蚕糸・昆虫機能学術講演会) 2009 年 3 月 21-22 日, 東京農工大学農学部, 一般講演 (口頭発表).

14. ○浦野慶・**大門高明**・清水謙多郎・三田和英・伴野豊・勝間進・嶋田透 (2009) 臭蚕のイソバレリル CoA 脱水素酵素遺伝子における 1 アミノ酸置換の検討. 日本蚕糸学会第 79 回大会 (蚕糸・昆虫機能学術講演会) 2009 年 3 月 21-22 日, 東京農工大学農学部, 一般講演 (口頭発表).

15. ○**T. Daimon**, Y. Meng, T. Yoshinaga, S. Katsuma, and T. Shimada (2009) Why the silkworm can eat toxic mulberry leaves? Special Seminar in Anhui Agricultural University. April 29, Angui Agricultural University. Anhui, China. (oral presentation).

16. ○**大門高明**、内野恵郎、瀬筒秀樹、勝間進、田村俊樹、嶋田透 (2009) トランスポゾンを利用したカイコの遺伝学的ツールの開発. 第 53 回 日本応用動物昆虫学会大会 小集会 W11 「昆虫ゲノム研究から見えてきた新しい研究の方向性」2009 年 3 月 28-30 日, 北海道大学高等教育機能開発センター. (口頭発表)

17. ○**大門高明**、孟艶、勝間進、三田和英、嶋田透 (2009) カイコの β -フルクトフラノシダーゼの機能と糖類似アルカロイドへの抵抗性. 日本蚕糸学会第 79 回大会 (蚕糸・昆虫機能学術講演会) グループ研究会 G2 「分

子レベルで解明されるクワとカイコの特殊な関係」2009 年 3 月 21-22 日, 東京農工大学農学部.

18. ○**大門高明**、孟艶、吉永武史、勝間進、嶋田透 (2008) クワ乳液に含まれる殺虫性アルカロイドに対する鱗翅目昆虫の抵抗性機構. 東京大学生命科学研究ネットワークシンポジウム 2008. 2008 年 9 月 23 日, 東京大学 安田講堂 (ポスター発表)

15. ○**大門高明**、佐藤丈太郎、内野恵郎、瀬筒秀樹、勝間進、田村俊樹、嶋田透 (2008) カイコのジーントラップ法の開発. 農業生物資源研究所成果発表会 2008 年 10 月 21 日, つくば国際会議場. (ポスター発表)

19. ○**大門高明**、篠田徹郎、山本公子、三田和英、伴野豊、勝間進、嶋田透 (2008) カイコの眠性変異体の分子遺伝学的解析. 日本蚕糸学会第 78 回大会、2008 年 3 月 20-21 日, 名古屋大学大学院生命農学研究科. (口頭発表)

20. ○浦野慶、**大門高明**、三田和英、伴野豊、勝間進、嶋田透 (2008) 臭蚕におけるイソバレリル CoA 脱水素酵素遺伝子の変異. 日本蚕糸学会第 78 回大会 (蚕糸・昆虫機能学術講演会) 2008 年 3 月 20-21 日, 名古屋大学大学院生命農学研究科. 一般講演 (口頭発表).

21. ○吉永武史、孟艶、**大門高明**、平山力、勝間進、嶋田透 (2008) クワ食と非クワ食の鱗翅目昆虫における中腸 β -フルクトフラノシダーゼ活性の比較. 日本蚕糸学会第 78 回大会 (蚕糸・昆虫機能学術講演会) 2008 年 3 月 20-21 日, 名古屋大学大学院生命農学研究科. 一般講演 (口頭発表).

22. ○佐藤丈太郎、**大門高明**、光廣政男、内野恵郎、瀬筒秀樹、小林功、田村俊樹、勝間進、嶋田透 (2008) カイコのジーントラップシステムのスクリーニング. 日本蚕糸学会第 78 回大会 (蚕糸・昆虫機能学術講演会) 日本蚕糸学会第 78 回大会 (蚕糸・昆虫機能学術講演会) 2008 年 3 月 20-21 日, 名古屋大学大学院生命農学研究科. 一般講演 (口頭発表)

23. ○**大門高明**、佐藤丈太郎、内野啓郎、瀬筒秀樹、勝間進、田村俊樹、嶋田透 (2008) カイコのジーントラップ法の開発. 第 2 回昆虫ゲノム研究会 (特定ゲノム 4 領域・領域横断研究会) 2008 年 3 月 6-7 日, 東京大学弥生講堂. (口頭発表)

24. 佐藤丈太郎 (東大農)・**大門高明**・藤井告 (東大院農)・三田和英・田村俊樹 (生物研)・勝間進・○嶋田透 (東大院農) 稚蚕で判別できるトランスジェニックマーカーの開発. 日本蚕糸学会第 78 回大会 (蚕糸・昆虫機能学術講演会) 2008 年 3 月 20 日 (木)~21 日 (金), 名古屋大学大学院生命農学研究科, 一般講演 (口頭発表)

〔図書〕 (計 1 件)

1) 大門 高明(2009)比較ゲノム解析(1.3.4)、
「分子昆虫学」(神村 学、日本 典秀、葛
西 真治、竹内 秀明、畠山 正統、石橋 純
編)、共立出版、24-26 頁.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大門 高明 (DAIMON TAKAAKI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助
教 (当時)

現在： 独立行政法人農業生物資源研究
所・主任研究員

研究者番号：70451846