

令和 6 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H02997

研究課題名（和文）カイコを用いて昆虫の化性決定機構の分子基盤を明らかにする

研究課題名（英文）Elucidating the molecular basis of voltinism determination mechanisms in insects using the silkworm, *Bombyx mori*

研究代表者

木内 隆史 (Kiuchi, Takashi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・准教授

研究者番号：60622892

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：昆虫が1年間に何世代かを繰り返す性質を化性という。本研究では、時計遺伝子における変異が昆虫の化性決定に寄与することを、高度な遺伝子組換え技術と高精度かつ豊富なゲノム情報が利用できるカイコを用いて実証することを目的とした。ゲノム編集技術を用いて主要な時計遺伝子群を対象にノックアウト系統を樹立することで、日長に応じた休眠誘導には時計遺伝子群が構成する概日時計が重要な役割を担うことを示した。また、大規模な比較ゲノム解析を行うことで、化性の変化に影響をあたえる時計遺伝子とそのアミノ酸置換を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

夏にしか見かけない昆虫もいれば、春と秋に見かけるような昆虫もいる。昆虫が1年間に何世代かを繰り返す性質を化性というが、化性は昆虫ごとにその行動や形質、生育する環境とよく適合している。どのような機構が化性の変化を生み出しているのか？本研究では、カイコにおいて概日時計を構成する時計遺伝子を破壊すると、日の長さに応じた休眠誘導ができなくなることを示した。これは、昆虫の化性決定に時計遺伝子の変異が関与することを示唆する結果である。化性の変化を遺伝子レベルで理解することは、昆虫の発生を予測し、制御することにつながる。

研究成果の概要（英文）：Voltinism is the number of generations of an insect in a year. This study aims to demonstrate that mutations in clock genes contribute to the determination of insect voltinism using the silkworm, *Bombyx mori*, which benefits from advanced genome engineering techniques and abundant, high-quality genomic information. By establishing knockout strains targeting core clock genes through genome editing, it was shown that the circadian clock plays a crucial role in photoperiodic diapause induction. In addition, a large-scale comparative genomic analysis identified certain clock genes and their amino acid substitutions that potentially affect the determination of voltinism in *B. mori*.

研究分野：昆虫分子生物学

キーワード：カイコ 化性 休眠性 時計遺伝子 遺伝子組換え

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

休眠は昆虫に広く見られる季節適応能力であり、成長や行動を停止し、過酷な季節を乗り切るために重要なシステムである。休眠は生育に適した環境下ではむしろ不利益を被るため、適切な時期に発現する必要がある。昆虫はそれぞれの生育環境や固有の形質に合わせ、休眠するか否かが遺伝的に決められている。また、環境が季節変動する場合には環境情報を利用し、休眠を発動するシステムを備えている。例えば、熱帯あるいは亜熱帯などに生息する昆虫は休眠をしないもの（多化性）が多く、温帯に生息する昆虫は温暖な季節は休眠をせず世代を回し、冬を迎えるにあたり休眠を誘導するか（二化性）、あるいは一世代で終わる（一化性）ものが多い。同種でも生息地域により化性が異なる場合があり、昆虫は化性を環境に応じて変化させることで多様な環境に適応してきたと捉えることができる。しかし、化性が変化する機構は十分に理解されていない。

チョウ目昆虫のモデルであるカイコ (*Bombyx mori*) は 700 以上の系統が保存・維持されており、その中には化性が異なる品種が存在する。また、カイコは 5000~6000 年前に中国において野生種であるクワコ (*Bombyx mandarina*) から家畜化されたと考えられており、本来は一化性であったという説が提唱されている (吉武成美, 1968, 日本蚕糸学雑誌)。その後、世界各地に養蚕が広まる過程でそれぞれの地域の気候に適した地理的品種が育成された。欧州種では一化性が多く、東南アジアやインドなどで飼育される熱帯種は多化性が多い。中国種や日本種には、二化性と一化性がある。すなわち、カイコにおいては化性の変化が実際に起きている。しかし、化性を変えるに至った遺伝的な変異は突きとめられていない。

私たちは、カイコの日長に応じた休眠性に関わる遺伝子の順遺伝学的絞り込みを行い、それが概日時計に關与する時計遺伝子の一つであることを突き止めた (Kiuchi et al., in preparation)。また、二化性のカイコにおいてこの時計遺伝子をノックアウト (KO) すると多化性化することを発見した。さらに、多化性の系統においてこの時計遺伝子の発現量が低下していることを見出したことから、時計遺伝子の量的あるいは質的な変化が概日時計を変化させ、異なる化性を生み出したのではないかという仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

本研究ではまず、(1) 分子レベルでの解析において数多くの成果を挙げているカイコ培養細胞を用いて、チョウ目昆虫の概日リズムに関わる時計遺伝子の機能について詳細な解析を行い、それぞれの遺伝子の機能を再検討することで、カイコの概日時計システムを明らかにすることを目的とした。次に、(2) 遺伝子組換え技術に優れるカイコの特徴を活かし、時計遺伝子に人為的な改変を施すことで概日時計を操作し、休眠性への影響を評価することで上記の仮説の検証を行った。最後に、(3) 化性が異なる世界的品種が数多く保存されているカイコのメリットを活かして、化性の変化につながった時計遺伝子の発現や機能に影響する変異を大規模ゲノム情報解析から同定し、同じ変異を導入することで実際に化性の変化を再現し仮説の実証を行うことを目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) カイコの概日時計システムの解明

カイコ培養細胞 BmN4 において、*timeless* (*tim*) の転写調節領域にルシフェラーゼ遺伝子をつないだレポータープラスミドと、その転写因子をコードする *Clock* (*Clk*) と *cycle* (*cyc*) をそれぞれ導入した発現プラスミドをコトランスフェクションし、ルシフェラーゼの発光により CYC/CLK の転写誘導能力を評価する。さらにそこに、他の生物においては CLK/CYC による転写誘導を抑制する機能をもつ遺伝子 *cryptochrome 2* (*cry2*)、*period* (*per*)、*tim* を導入した発現プラスミドをそれぞれあるいは混合してトランスフェクションし、ルシフェラーゼ遺伝子の発現をどの程度抑制するかを評価する。加えて、CRY2/PER、CRY2/TIM、PER/TIM が実際にヘテロダイマーを形成しうるかを、EGFP あるいは FLAG との融合タンパク質や作製した抗体を用いた免疫沈降により検証する。

#### (2) 概日時計の操作による仮説「時計遺伝子の量的・質的变化が昆虫の化性決定に寄与する」ことの検証

CRISPR/Cas9 により、概日時計に關与する時計遺伝子 *Clk*、*cyc*、*cry2*、*per*、*tim*、*cry1* の各 KO 系統を、二化性カイコ系統 p50T をもとに樹立する。休眠性および概日リズムを調査する実験系を構築し、それぞれへの影響を調べる。

#### (3) カイコの化性の変化に寄与したゲノム変異の同定

多系統の全ゲノム情報を用いて、集団内および集団間の遺伝子配列およびアミノ酸配列の差を

評価する解析手法を考案した。この解析手法を用いて、2022年に公開されたカイコとクワコ約1000系統のゲノム情報 (Tong et al., 2022, *Nat Commun*) を利用し、大規模比較ゲノム解析を行うことで、化性の変化に影響をあたえうる遺伝子および変異を同定する。ゲノム編集技術を用いて同じ変異を導入し、化性の変化を実際に再現する。

#### 4. 研究成果

##### (1) カイコの概日時計システムの解明

転写・翻訳のフィードバックループを構成する主要な時計遺伝子 *Clk*, *cyc*, *cry2*, *per*, *tim*, *cry1* をクローニングし、それぞれ発現プラスミドに導入した。カイコ培養細胞 BmN4 において *Clk* と *cyc* を共発現すると、E-box を含む *tim* の転写調節領域につないだルシフェラーゼ遺伝子の発現が誘導された。すなわち、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) やチョウ目昆虫であるオオカバマダラ (*Danaus plexippus*) と同様、カイコにおいてもフィードバックループのうち CLK/CYC 複合体による *tim* の転写誘導が起こることがわかった。今後、CLK/CYC による転写誘導を抑制することが示唆される *cry2*, *per*, *tim* をさらに共発現することで、ルシフェラーゼ遺伝子の発現を抑制するかを調査する予定である。また、作製した CRY2, PER, TIM のペプチド抗体を用いて、CRY2/PER, CRY2/TIM, PER/TIM がヘテロダイマーを形成しうるかを検証し、カイコの概日時計システムの全貌解明を目指す。

##### (2) 概日時計の操作による仮説「時計遺伝子の量的・質的变化が昆虫の化性決定に寄与する」ことの検証

休眠性に影響を与える要因の一つである栄養条件を一定にするため、二化性カイコ p50T の休眠性を人工飼料育により評価する実験系を導入した。また、概日リズムを調査するために、全暗下で羽化を撮影できるシステムを構築した。これら実験系に CRISPR/Cas9 により作出した *Clk*, *cyc*, *per*, *tim*, *cry1* の各 KO 系統を供試し、休眠性および概日リズムへの影響を調べた。各 KO 系統はいずれも全暗下において周期性のある羽化リズムを失っており、他の昆虫と同様、カイコにおいても各時計遺伝子が概日リズムに重要な役割を担っていることが証明された。これら概日リズムを失った KO 系統のうち *Clk*, *cyc*, *per*, *tim* の KO 系統では胚子期および幼虫期において日長に応じた休眠誘導が失われた (Tobita and Kiuchi, 2022, *Insect Biochem Mol Biol*)。これらの結果から、カイコの日長に応じた休眠誘導において、時計遺伝子群が形成する転写・翻訳のフィードバックループ、すなわち概日時計が重要であると考えられた。一方、*cry1* の KO 系統では、日長よりも温度に依存した休眠誘導が観察され、さらに p50T 系統を全暗で飼育した場合と同様の休眠性を示した。加えて、*cry1/tim* のダブル KO 系統においては *tim* KO 系統と同様の休眠性を示したことから、CRY1 は TIM の上流で機能すると推測された。以上の結果から、CRY1 は光を受容し、その情報を TIM が構成する概日時計に伝える役割を担っていると考えられた (Tobita and Kiuchi, 2024, bioRxiv)。私たちは多化性系統である輪月を用いて順遺伝学的な解析を行い、日長に応じた休眠性に時計遺伝子の一つにおける変異が関わることを明らかにしている (Kiuchi et al., in preparation)。この結果に加え、時計遺伝子の KO により二化性系統である p50T は多化性系統と同様の休眠性を示すようになったことから、仮説「時計遺伝子の量的・質的变化が昆虫の化性決定に寄与する」は真であると考えられる。

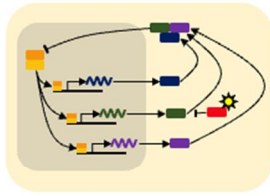
##### (3) カイコの化性の変化に寄与したゲノム変異の同定

カイコとその野生種であるクワコを合わせた約 1000 系統の全ゲノム情報が 2022 年に公開された (Tong et al., 2022, *Nat Commun*)。これらの配列情報を利用し、近縁な系統を集団としてまとめることで、カイコの全遺伝子について集団内および集団間の遺伝子配列およびアミノ酸配列の差を評価する解析手法を考案した。カイコはクワコの家畜化により生じたと考えられており、中国一化性がもっとも古い品種群で、そこから中国二化性の品種群が生じ、その後各地域に適した化性をもつ品種群が生じたと推測されている。そこでまず、クワコとカイコの各集団内において配列が保存されており、クワコとカイコの集団間において配列の違いが明確な遺伝子を同定してリスト化したところ、リストのなかにはいくつかの時計遺伝子が含まれていた。また、リストに含まれる時計遺伝子においてクワコとカイコの集団間において異なる配列を見出した。今後、クワコとカイコの集団間における配列の差をゲノム編集技術を用いて置き換えることにより、化性への影響を評価する予定である。現在、CRISPR/Cas9 を用いて数塩基の置換を導入する技術を確認しつつある。

## 本研究の概要

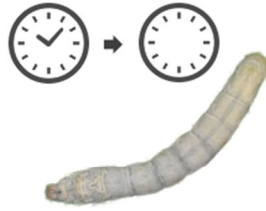
### 仮説「時計遺伝子の量的・質的变化が昆虫の化性決定に寄与する」ことの証明

(1) カイコの概日時計システムの解明



時計遺伝子の機能アッセイ系の構築

(2) 概日時計の操作による仮説の検証



時計遺伝子KOカイコの作出

(3) カイコの化性の変化に寄与した変異の同定



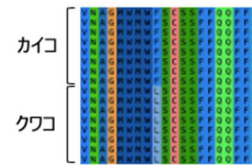
大規模ゲノム情報解析



転写・翻訳のフィードバックループの証明



時計遺伝子KOによる多化性化



時計遺伝子におけるアミノ酸置換の同定

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tobita Hisashi、Kiuchi Takashi	4. 巻 -
2. 論文標題 Knockout of cryptochrome 1 disrupts circadian rhythm and photoperiodic diapause induction in the silkworm, <i>Bombyx mori</i>	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2024.05.13.593801	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hisashi Tobita, Takashi Kiuchi	4. 巻 149
2. 論文標題 Knockouts of positive and negative elements of the circadian clock disrupt photoperiodic diapause induction in the silkworm, <i>Bombyx mori</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Insect Biochemistry and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 103842
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ibmb.2022.103842	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 -
1. 著者名 Kenta Tomihara, Peter Andolfatto, Takashi Kiuchi	4. 巻 31
2. 論文標題 Allele-specific knockouts reveal a role for apontic-like in the evolutionary loss of larval melanin pigmentation in the domesticated silkworm, <i>Bombyx mori</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Insect Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 701-710
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/imb.12797	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Kenta Tomihara, Katsuya Satta, Shohei Matsuzaki, Kazutoshi Yoshitake, Kimiko Yamamoto, Hironobu Uchiyama, Shunsuke Yajima, Ryo Futahashi, Susumu Katsuma, Mizuko Osanai-Futahashi, Takashi Kiuchi	4. 巻 137
2. 論文標題 Mutations in a -group of solute carrier gene are responsible for egg and eye coloration of the brown egg 4 (b-4) mutant in the silkworm, <i>Bombyx mori</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Insect Biochemistry and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 103624
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ibmb.2021.103624	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18件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 金出大和、大津高志、竹村洋子、持田裕司、木内隆史
2. 発表標題 蚕糸科学技術研究所で発見された油蚕変異体Sj油の原因遺伝子の探索
3. 学会等名 令和6年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会（日本蚕糸学会第94回大会）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Hisashi Tobita, Takashi Kiuchi
2. 発表標題 Involvement of cryptochrome genes in photoperiodism of the silkworm, <i>Bombyx mori</i>
3. 学会等名 XXVII International Congress of Entomology (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Kenta Tomihara, Ana Pinharanda, Peter Andolfatto, Takashi Kiuchi
2. 発表標題 The genetic architecture of the “low-locomotive” behavior of domesticated silkworm larvae
3. 学会等名 XXVII International Congress of Entomology (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 大津高志、濱崎甲資、岩田洋佳、木内隆史
2. 発表標題 カイコとクワコの集団間で差異のある遺伝子の網羅的探索手法
3. 学会等名 令和5年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会（日本蚕糸学会第93回大会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 飛田永、木内隆史
2. 発表標題 時計遺伝子cryptochrome1はカイコの光周性に関与するのか?
3. 学会等名 令和5年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会（日本蚕糸学会第93回大会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 成田航、高井嘉樹、勝間進、木内隆史
2. 発表標題 カイコの幼虫脱皮に関与する遺伝子の探索
3. 学会等名 令和5年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会（日本蚕糸学会第93回大会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 茂木真秀、竹村洋子、大沼昭夫、持田裕司、木内隆史
2. 発表標題 ピュアマイソールから生じたかすりの新規アレル
3. 学会等名 令和5年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会（日本蚕糸学会第93回大会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hisashi Tobita, Takashi Kiuchi
2. 発表標題 Knockout of clock gene cryptochrome2 affects photoperiodic diapause induction in the silkworm, Bombyx mori
3. 学会等名 第67回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hisashi Tobita, Susumu Katsuma, Takashi Kiuchi
2. 発表標題 Establishment of clock gene knockout strains and analysis of diapause phenotype in the silkworm, Bombyx mori
3. 学会等名 XXVI International Congress of Entomology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kenta Tomihara, Katsuya Satta, Shohei Matsuzaki, Kazutoshi Yoshitake, Kimiko Yamamoto, Hironobu Uchiyama, Shunsuke Yajima, Ryo Futahashi, Susumu Katsuma, Mizuko Osanai-Futahashi, Takashi Kiuchi
2. 発表標題 Identification of the gene responsible for the brown egg 4 (b-4) mutant in the silkworm, Bombyx mori
3. 学会等名 XXVI International Congress of Entomology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木内隆史、薩た克也、富原健太
2. 発表標題 カイコにおけるCRISPR/Cas9によるノックイン効率改善の試み
3. 学会等名 令和4年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 (日本蚕糸学会第92回大会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 富原健太、木内隆史
2. 発表標題 クワコにおけるCRISPR/Cas9によるゲノム編集
3. 学会等名 令和4年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 (日本蚕糸学会第92回大会)
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 茂木真秀、富原健太、勝間進、木内隆史
2. 発表標題 カイコ190系統における黒帯黒翅形質の責任遺伝子の探索
3. 学会等名 令和4年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会（日本蚕糸学会第92回大会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hisashi Tobita, Susumu Katsuma, Takashi Kiuchi
2. 発表標題 Clock genes are involved in photoperiodic diapause induction during embryonic and larval stages in the silkworm, Bombyx mori
3. 学会等名 第66回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 飛田永、勝間進、木内隆史
2. 発表標題 カイコにおける時計遺伝子のノックアウトと胚子・幼虫期の日長に応じた休眠誘導への影響
3. 学会等名 令和3年度第6回蚕糸・昆虫機能利用関東地区学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大津高志、勝間進、木内隆史
2. 発表標題 カイコとクワコにおけるProjectin遺伝子の差異
3. 学会等名 令和3年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会（日本蚕糸学会第91回大会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 飛田永、勝間進、木内隆史
2. 発表標題 カイコにおける時計遺伝子のノックアウトと日長に応じた休眠誘導への影響
3. 学会等名 令和3年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会（日本蚕糸学会第91回大会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小野樹、木内隆史
2. 発表標題 CRISPR-Cpf1によるカイコのゲノム編集
3. 学会等名 令和3年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会（日本蚕糸学会第91回大会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

昆虫遺伝研究室ホームページ <a href="https://sites.google.com/view/igblab-ut-aba/top?authuser=0">https://sites.google.com/view/igblab-ut-aba/top?authuser=0</a>
--

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
---------	---------