

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2013

課題番号：21380036

研究課題名(和文)ポストゲノム時代におけるカイコランダムミュータージェネシスとその基盤研究

研究課題名(英文)Chemical mutagenesis

研究代表者

伴野 豊 (Banno, Yutaka)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50192711

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円、(間接経費) 4,050,000円

研究成果の概要(和文)：ポストゲノム時代において有益なカイコのバイオリソースを開発する為に化学変異源：エチルニトロソウレアを用いたミュータージェネシスの可能性を追究した。その結果、ENUは有用な変異源であることが判明した。カイコの翅には鱗粉が形成されるが、その鱗粉が形成が劣る変異体、幼虫時代に体形が反り、行動が緩慢になる変異体、蛹の翅原基が膨張する変異を始め、卵形成が不完全になる一群の変異体等20種を上回る変異体を得た。また、凍結した精子の受精率を上げる上で有効な3倍体カイコを高率に得る方法を見出した。野外のクワコの変異(大型の卵を産む系統や黒蛹の存在)、既存の遺伝的変異体の連鎖解析も行い、リソースの充実をはかった。

研究成果の概要(英文)：To develop random mutagenesis system in the silkworm, the possibility of mutagenesis by ethyl nitrosourea (ENU) was investigated. ENU was proved to be a useful chemical source as a result. The fertilized eggs were immersed in ENU solution. The phenotypes of 798 individuals treated with ENU were evaluated at various stages. Abnormal characters were discovered in 212 individuals of them. To survey the mutant, we selected 40 pairs from sib-crossing of individuals having abnormal characters. In G2 or G3 generation, more than 20 mutants were discovered as mutant candidate. In addition, we developed one method to obtain triploid silkworm with high ratio by using CO2 gas. All of the sperm of triploid silkworm were apyrene sperm that can assist fertilization of eupyrene sperm. Moreover, we performed linkage analysis of mutants with SNPs information and marker gene. We also found new characteristics in wild silkworm, Bombyx mandarina: black pupa and big egg.

研究分野：6005

科研費の分科・細目：応用昆虫学

キーワード：カイコ ミュータージェネシス 突然変異 遺伝子資源

1. 研究開始当初の背景

ポストゲノム時代と言われる現在、ゲノム情報の解析レベルは益々高まり、生命の設計図とも言える塩基配列情報が各生物種で急速に得られている。それらの情報は解析の進んだ生物種での成果をレファレンスとして遺伝子の機能を推定することも可能で、ライフサイエンス研究を進展させる大きな原動力となっている。しかし、推定された遺伝子が実際の個々の生物体において、どのような機能を持って、当該生物種で作用しているかを証明することは難しい場合が少なくない。そのような場合、通常の形質とは変化した突然変異体(ミュータント)が存在すると、正常形質との比較研究がブレークスルーとなる。また、フェノタイプドリブンで得られたミュータントから、新たな研究展開が行われることも少なくない。すなわち、ポストゲノム時代となっても研究素材としてバイオリソースの開発が必要である。またリソースの増加に対しては効率的に保存する技術の開発が必要となると共にリソースの遺伝的背景を明確にしておくことが重要である。

2. 研究の目的

本研究ではゲノム解読が進み、これまでも日本が優位に研究を進めてきたカイコにおいて、バイオリソースとして有益な突然変異体を効率的に開発・保存・利用する基盤を構築し、応用昆虫学研究所の発展に広く寄与する目的で研究を行うことにした。具体的には、以下の3課題を中心に、カイコの祖先種であるクワコの自然界における変異についてもリソースとして収集した。

(1) ランダムミュータジェネシスによる突然変異体の誘発に関する研究

(2) 変異体の効率的保存に関する研究

(3) SNPs 解析による変異遺伝子の染色体上の位置決定

(4) クワコの変異形質の収集

3. 研究の方法

(1) ランダムミュータジェネシスによる突然変異体の誘発に関する研究：ランダムミュータジェネシスの誘発にはマウスやラットで有効であるケミカル変異源、エチルニトロソウレア(ENU)を用いた。受精卵に浸漬処理し、得られた孵化個体を桑葉で飼育し、幼虫期から成虫期の各時期に形質調査を実施した。表現形質に異常が検出された個体については無処理の正常形質を持つ個体と交配し、次世代のフェノタイプを詳細に調査した。遺伝性が確認されたミュータントは既存のミュータントとの相違を SNPs 解析や遺伝的交配実験により解析した。

(2) 変異体の効率的保存に関する研究：ランダムミュータジェネシスで得られたカイコ系統、並びに既存のカイコ系統を保存するには通常受精卵が用いられている。しかし、

受精卵は1年間の保存が限界で、カイコ研究の発展の障害となっている。これを改善する目的で、卵巣と精子を液体窒素中で保存する方法が開発されているが、回収できる個体が少ない問題点があり、実用的には用いられていない。そこで、これを解決するための改良と開発を行った。凍結卵巣を利用する方法では、宿主に移植した場合、卵は体内に形成されるが、産卵されずに体内に残留する。この卵を46~18分の温水中で処理し、単為発生させる。一方、凍結精子を融解して雌個体に人工授精させた場合には、系統によって受精率が低下する。この解決には無核精子を加えて運動性を付与することが有効であることが既存の研究で判明している。しかし、その無核精子を効率的に得る方法が既存の方法では低率であった。そこで、無核精子を効率的に得る目的で、未受精卵を炭酸水で処理し、4倍体雌を作成、得られた4倍体雌に正常な2倍体雄を交配し、3倍体雄を得た。3倍体雄は無核精子のみを産生するので長期保存に有効となる。

(3) SNPs 解析による変異遺伝子の染色体上の位置決定：変異体を効率的に保存する為に、SNPs マーカーを用いて変異体の染色体上へのマッピングを行った。

(4) クワコの変異形質の収集

野外に生息するクワコを収集し、形質特性を発育時期別に分析する。

4. 研究成果

(1) ランダムミュータジェネシスによる突然変異体の誘発に関する研究

九州大学大学院遺伝子資源開発研究センター保存の t32 系統に ENU 処理をした卵から孵化した幼虫個体 798 頭を 5 齢期に形質調査した。第 5 体節の半月紋が不完全となる個体、油蚕様の形質がマダラに見られる個体、腹脚が異常となる個体、第 6 体節が伸長する個体等の異常を認めた。異常個体は 212 個体であった。異常が認められた個体を中心に相互交配を行い、その中の 40 区(40 ペアに由来する)を以後の選抜対象とした。以下、現在までに得られた主な突然変異体は以下の通りである。尚、得られた変異体はいずれも劣性である。

・若齢致死油

1~2 齢期に幼虫皮膚が濃い油蚕状態となると共に発育が遅れ、孵化後 8 日頃までに大半が致死する油蚕。カイコでは 30 種類を超える油蚕が得られているが、若齢期に致死となる変異はこれまでに知られていない。後述するように第 11 連鎖群に所属する。

・過剰多星紋

第 9 体節に過剰な星状斑紋を発現する。浸

透度は完全ではない。ホモになると卵が褐色を呈して致死性を発現する。

・長節蚕

幼虫の第4、5体節が柔らかく伸びる特徴を持つ。既知の伴性遺伝である長節 *e* と類似するので対立性を交配実験により検定した結果、アレルであることが判明した。しかし、今回発見された変異個体は幼虫期の発育が劣ると共に蛹期に致死する新規な特性がある。

・不眠致死蚕

1-4 齢期に発育が遅延し、眠期を中心に斃死するいわゆる不眠形質を呈する。孵化直後の状態で発育することなく斃死するタイプ、2 齢起蚕時から3 齢程度の大きさまで成長して斃死するタイプ、4 齢幼虫の大きさで致死するタイプに分類される。相互の遺伝的な関係を含めた調査が必要である。

・眼紋赤

眼状紋が赤い。伴性遺伝をすることから既存の眼紋赤 *ro* の対立遺伝子である可能性が示唆された。遺伝学的交配実験から *ro* との対立性を認めた。複数の区において発見されたので *t32* 系統が保有していた可能性もあるので今後の検討が必要である。

・小形卵

卵サイズが小さいと共に不受精となる。これまでに類似の形質は *sm*, *sm-2*, *sm-3*, *eus* 等が知られているので対立性の検定が必要である。

・小卵（受精能力有）

卵サイズが小さいが受精能力を有し、胚子発育が可能。自力で孵化することが難しく、卵殻をピンセットで破る援助を行なうと孵化は可能となる。しかし、孵化させた個体は全て蟻蚕で斃死する。

・翅退化蛹

蛹の翅部位が退化する。蛹化前に半化蛹状態で致死する個体も分離する。蛹まで達する個体は雌が大半である。羽化する個体は少なく産卵数は少ないが、造卵数は正常個体と変わらない。

・反り蚕

幼虫体の行動が緩慢となると共に幼虫体の前部と後部が背側に反る。手を皮膚に触れると消化液を吐く場合も見られる。既存の縮み蚕 (*cot*) に類似するが、*cot* の対立遺伝子ではないことを既存の *cot* 系統と交配し、遺伝的に確認した。行動の緩慢性は4 齢幼虫期頃から現れる。成虫期の行動は正常である。

・鱗毛形成不全

成虫の蛾の鱗粉形成が少ない。既存の *n/w*

に極めて類似するので、同遺伝子との対立性を交配実験で確認したが対立性は無く、新規変異体であることを確認した。親の起源が異なる2 系統で独立に発見された。その2 系統間には対立性が認められた。写真の右側が新変異体。



・ざりがに蛹様変異

蛹期に前翅と後翅の部位が膨れ、ざりがにのハサミのような形態を示す（写真）。既知



の変異としてはざりがに蛹 (*cf*)、江口ざりがに蛹 (*cf-e*)、汐招き (*cl*) がある。これらとの対立性は未解析である。

(2) 変異体の効率的保存に関する研究：

< 単為発生による系統保存 >

カイコ体内から受精前の卵を取り出し、46、18 分の温水中で処理し、単為発生 of 効率を系統間で比較した。非休眠卵では単為発生による系統維持が可能であったが、休眠卵（カイコでは大半の系統は休眠性を有する）では孵化個体は得られなかった。液体窒素下で長期保存した卵巣を移植して宿主個体で発育させ、その卵を単為発生で個体を再生させ、継代する方法は特定の系統に限定され、一般化は困難であると判断した。

< 炭酸水処理による倍数体誘発 >

産下直後である卵齢 0~20 分の間に、炭酸水処理を 1~6 時間行うことで4 倍体雌を得ることが判明した。処理時間1 時間が最も高率で 11.5% であった。炭酸水の処理温度は 0 と 25 で比較した結果 25 が高率であった。4 倍体の雌が産卵する卵はサイズが大きくなると共に複眼を構成する小眼面が大型

化することで併発する2倍体、3倍体とは識別が可能であった。得られた4倍体雌に正常の2倍体雄を交配し、3倍体個体を得た。3倍体雄体内で形成された精子を顕微鏡観察した結果、全てが無核精子であった。無核精子は受精の際に有核精子の受精を助ける働きを行っている。凍結精子を用いた人工授精においては無核精子が少なく受精率が低下しており、無核精子を加えることで改善されることが報告されている。

(3) SNPs 解析による変異遺伝子の染色体上の位置決定

・ENUで誘発された若齢致死油が第11連鎖群に存在すること、既知の変異体で所属連鎖群が判明していなかった小卵形質遺伝子が第3連鎖群、蛹期に致死する2種の油蚕遺伝子が、第16連鎖群、第23連鎖群遺伝子にそれぞれ所属することが判明した。第3連鎖群に所属することが判明した小卵形質遺伝子は既存の *sm* に、また第16連鎖群に所属することが明らかとなった致死を伴った油蚕は *ohi* の対立遺伝子であることが明らかとなった。

(4) クワコの遺伝変異の収集

隠岐の島に生息するクワコは幼虫、繭並びに卵が他の地域のクワコに比べ大型であることが判明した。卵サイズの大型性について遺伝解析を行った結果、カイコのX染色体に座乗する *Ge* 遺伝子とは異なる支配を受けていることが示唆された。さらに、関東地方に生息するクワコには蛹形質において皮膚の黒化するタイプが分布する事が野外調査から判明した(通常は茶褐色)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Banno Y, Nagasaki K, Tsukada M, Minohara Y, Banno J, Nishikawa K, Yamamoto K, Tamura K, Fujii T. Development of a method for long-term preservation of Bombyx mori silkworm strains using frozen ovaries. *Cryobiology*. 66(3), 283-287. (2013) doi:10.1016/j.cryobiol.2013.03.004.

〔学会発表〕(計2件)

Yutaka Banno, Yufuko Minohara, Maiko Kurakake, Junko Banno, Kazuhiro Nishikawa, Kei Tamura, Kazunori Yamamoto: Development of methods for long term preservation of silkworm bioresources, The Third Asia-Pacific Congress of Sericulture and Insect Biotechnology (APSERI 2012), 2012年04月08日, Southwest University, China.

伴野 豊: 島根県島後島に生息するクワコの特異性, 日本蚕糸学会第82回大会, 2012年03月19日, 九州大学(福岡市)。

伊藤加津沙, 青木花織, 蜷木 理, 竹村洋

子, 横山 岳: 炭酸水処理による倍数体蚕の誘発, 日本蚕糸学会第83回大会, 2013年03月19日, 農林水産技術会議事務局筑波事務所(つくば市)。

藤井 告, 束田 万里野, 長崎 紀代美, 西川 和弘, 田村 圭, 山本 和典, 坪田 拓也, 内野 恵郎, 瀬筒 秀樹, 伴野 豊: カイコバイオリソースの長期保存に関する研究 生殖巣移植におけるホスト側組織とドナー側組織の結合部位に関する解析, 第69回日本蚕糸学会九州支部研究発表会 昆虫機能・利用学術講演会, 2013年10月8日, てだこホール(沖縄県浦添市)。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伴野 豊 (BANNO, Yutaka)
九州大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号: 50192711

(2) 研究分担者

山本公子 (YAMAMOTO, Kimiko)
独立行政法人農業生物資源研究所・ユニット長
研究者番号: 40370689

横山 岳 (YOKOYAMA, Takeshi)
東京農工大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号: 20210635