

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月14日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22380040

研究課題名（和文）

アワノメイガ属嗅覚受容体遺伝子群の分子進化と性フェロモン受容機構との関連性の解明

研究課題名（英文）

Evolution of odorant receptor genes in *Ostrinia* moths and its involvement in male response to sex pheromone.

研究代表者

安河内 祐二（YASUKOCHI YUJI）

独立行政法人農業生物資源研究所・昆虫ゲノム研究ユニット・主任研究員

研究者番号：50355723

研究成果の概要（和文）：

鱗翅目昆虫では種特異的な性フェロモンが配偶行動に不可欠な役割を果たしているが、種分化に際して関連する遺伝子にどのような変化が起きるのかは明らかではない。そこで、交雑可能な種間でも性フェロモン成分が異なるアワノメイガ属を対象として、性フェロモン合成・受容系に関わる遺伝子群の種間比較を行った。まず、任意の遺伝子の種間比較を可能にする研究基盤として、アワノメイガとウスジロキノメイガのフォスミドライブラリーを作製し、PCRによるスクリーニング系を整備した。そして、両ライブラリーから性フェロモン受容体、性フェロモン結合タンパク質、性フェロモン不飽和化酵素遺伝子を含むフォスミドクローンを単離し、ショットガンシーケンシング等によりアワノメイガ約330kb、ウスジロキノメイガ約265kbのゲノム塩基配列を決定した。

研究成果の概要（英文）：

Sex pheromone plays a critical role in species-specific mating behaviors, however, little is known about what changes occur in genes responsible for the behaviors. Thus, we performed a comparative analysis of genes associated with sex pheromone response and synthesis between *Ostrinia furnacalis* and *Ostrinia latipennis*. We constructed genomic fosmid libraries of the species, and generated PCR-based screening system for them. Then, we isolated clones that contain genes encoding receptors, binding proteins and desaturase of sex pheromone, and determined genomic sequences (330kb for *O. furnacalis* and 265kb for *O. latipennis*).

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2011年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2012年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用昆虫学

キーワード：性フェロモン、アワノメイガ、嗅覚受容体、遺伝子重複、BAC、フォスミド

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、チョウ目の染色体比較の一環として、ヨーロッパアワノメイガの BAC ライブラリーから任意のクローンを単離できる系を構築した。そこで、この系を活用して研究分担者が研究を進めてきた性フェロモンに関連する遺伝子群のゲノム構造を効率的に解明して、性フェロモン成分の異なる種間で遺伝子にどのような違いがあるかを解明することを企図するに至った。

2. 研究の目的

アワノメイガ属で性フェロモン成分の異なるアワノメイガ、ヨーロッパアワノメイガ、ウスジロキノメイガの性フェロモン受容体遺伝子、性フェロモン結合タンパク質遺伝子、性フェロモン不飽和化酵素 ($\Delta 11$ -desaturase、 $\Delta 14$ -desaturase) 遺伝子のゲノム構造を解明する。

3. 研究の方法

(1) ヨーロッパアワノメイガの BAC ライブラリー(米クレムソン大より分譲)から、PCR スクリーニングにより、性フェロモン受容体、性フェロモン結合タンパク質および性フェロモン不飽和化酵素遺伝子を含むクローンを単離した。これらのクローンのショットガンライブラリーを作製し、遺伝子とその近傍の領域の塩基配列を決定した。

(2) 前項で単離したクローンをプローブとした FISH 解析を行った。また、ヨーロッパアワノメイガとアズキノメイガの F1 メスにアズキノメイガのオスを戻し交雑した集団から個体別に DNA を調製した。

(3) アワノメイガとウスジロキノメイガのオスの蛹からそれぞれフォスミドライブラリーを作製し、PCR スクリーニング系を構築した。さらに、これらのライブラリーから性フェロモン受容体、性フェロモン結合タンパク質および性フェロモン不飽和化酵素遺伝子を含むクローンを単離した。

(4) 単離したフォスミドクローンからショットガンライブラリーを作製して、適宜プライマーウォーキングも組み合わせ、挿入断片の塩基配列を決定した。

4. 研究成果

(1) ヨーロッパアワノメイガの性フェロモン受容体サブファミリーに属する嗅覚受容体遺伝子を含む BAC クローンを単離した結果、Z 染色体と常染色体の 2 か所にクラスタリングしていることが判明した。このうち、性フェロモンへのオスの反応性を決定する

遺伝子が座乗するとされる Z 染色体上のクラスターについて、約 90kb の詳細な塩基配列を決定したところ、少なくとも 8 個の遺伝子がタンデムに並んだクラスターを見出した。このうち 4 個の遺伝子には、第 7 エクソンと第 7 イントロンにまたがる 181bp の反復配列が存在し、遺伝子重複への関与の可能性が示唆された。また、カイコの第 23 染色体と相同な常染色体上にも 2 個の遺伝子がタンデムに位置していた。

(2) アワノメイガとウスジロキノメイガの性フェロモン受容体遺伝子クラスターについても、同様の手法によりフォスミドクローンの塩基配列決定を行った。その結果、ウスジロキノメイガの Z 染色体上のクラスターについては全構造をほぼ決定し、遺伝子重複により生じたと思われる、タンデムに位置した遺伝子群を見いだした。また、遺伝子の配列順序はヨーロッパアワノメイガと基本的に一致した。アワノメイガについては、一部クローニングできていない領域が残ったので、さらに解析を継続して、全面的な比較を可能にする必要がある。

(3) 性フェロモン結合タンパク質遺伝子については、アワノメイガとウスジロキノメイガでゲノム構造を決定し、それぞれ 3 個と 2 個の遺伝子がタンデムに並ぶクラスターが背向的に位置する構造が保存されていることを明らかにした。

(4) 性フェロモン不飽和化酵素遺伝子のうち $\Delta 11$ -desaturase について、アズキノメイガとウスジロキノメイガでは異なる遺伝子が発現していて、アワノメイガでは発現していないことが知られていた (Sakai et al. *IBMB* 39 62-67; Fujii et al. *PNAS* 108 7102-7108)。本研究でアワノメイガとウスジロキノメイガの $\Delta 11$ -desaturase 周辺のゲノム構造を決定した結果、両種とも遺伝子自体は 3 コピーずつ、偽遺伝子化することなく存在していることが明らかとなり、遺伝子発現の違いは転写制御によることが示唆された。その他に $\Delta 14$ -desaturase についても、アワノメイガのゲノム構造を決定したほか、ウスジロキノメイガについても一部を決定した。

(5) 本研究により、性フェロモン受容体遺伝子は遺伝子重複により配列の似た遺伝子が近接して存在することが明確になったので、どの遺伝子が責任遺伝子であるかを連鎖解析で明

らかにすると、各コピーがどの程度転写されているかを量的PCR等の手法で定量するのは困難と考えられ、RNA-seqのデータを今回得られたゲノム塩基配列にマッピングするといった手法が必要である。予備実験ではRNA-seqにより性特異的な遺伝子発現が明瞭な遺伝子がいくつか見出されたので、今後の本格的な解析により有望な結果が期待できる。

逆に、RNA-seqのデータから未知遺伝子の関与が判明することも考えられるが、遺伝子配列のわずかな違いが同一遺伝子の種内多型なのか、重複した別コピーの遺伝子なのかは判別しがたい。非コード領域も含めた広汎な領域のゲノム塩基配列を精度よく決定できる系がアワノメイガ属の3種で確立できたことにより、近縁種間でごく最近起きた性フェロモン成分変化の原因となった受容体遺伝子の変化を見出しうるものと考えられる。今後、次世代シーケンサーを用いて概要ゲノム配列を決定するといったwhole genome的手法と組み合わせ、種分化に伴う遺伝子の変化をゲノムワイドでかつ高感度に検出できる系を確立することで、性フェロモン成分変化に伴う種分化の機構が明らかになることが期待できる。

(6) 性フェロモン結合タンパク質遺伝子については、ヨーロッパアワノメイガにおいて既報(Allen & Wanner IBMB 41 141-149)の5遺伝子がゲノム上の1箇所にクラスターを成している事を初めて明らかにした。性フェロモン受容体遺伝子と同様に、RNA-seqのデータとの対応付けが重要と考えられるので、今後さらに解析を進めていく予定である。

(7) 性フェロモン不飽和化酵素遺伝子の発現が性フェロモン成分の異なる種間で大きく異なることが知られているが、今回の解析の結果からは、発現が認められない遺伝子にもフレームシフトや転移因子の挿入、ナンセンス変異といった明白に機能を失わせると考えられる変異は見出されなかった。今後、今回決定したゲノム塩基配列、特にシス配列を含むと考えられる遺伝子上流域配列の種間の違いをレポーター解析などによりさらに分析して、遺伝子発現の違いの原因を明らかにする必要がある。

(8) さまざまな性フェロモン成分を用いる野外集団の個体の性フェロモン関連遺伝子の遺伝子型と表現型を網羅的に解析する際にも、今回得られたデータはリファレンスゲノム配列として、重要な役割を果たすことが期待できる。

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2件)

① Yasukochi Y, Miura N, Nakano R, Sahara K, Ishikawa Y Sex-linked pheromone receptor genes of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*, are in tandem arrays. PLoS ONE 6, 2011, e18843、査読あり DOI:10.1371/journal.pone.0018843

② Yasukochi Y, Tanaka-Okuyama M, Kamimura M, Nakano R, Naito Y, Ishikawa Y, Sahara K Isolation of BAC clones containing conserved genes from libraries of three distantly related moths: A useful resource for comparative genomics of Lepidoptera. Journal of Biomedicine and Biotechnology 2011, 2011, 165894、査読あり DOI:10.1155/2011/165894

[学会発表] (計5件)

① 藤井毅・安河内祐二・戒煜・中野亮・石川幸男、アワノメイガ類の性フェロモン生合成に関与する不飽和化酵素遺伝子の種間比較、第57回日本応用動物昆虫学会大会、平成25年3月28日、藤沢市

② 安河内祐二・松尾隆嗣・石川幸男、アワノメイガとウスジロキノメイガの性フェロモン受容体遺伝子クラスターの構造解明、日本蚕糸学会第83回大会、平成25年3月19日、つくば市

③ 安河内祐二・三浦奈美・藤井毅・松尾隆嗣・石川幸男、アワノメイガとウスジロキノメイガのフォスミドライブラリーの作製と性フェロモン関連遺伝子のゲノム塩基配列決定、日本蚕糸学会第82回大会、平成24年3月19日、九州大学

④ 安河内祐二・三浦奈美・佐原健・石川幸男、ヨーロッパアワノメイガのオス触角特異的に発現する嗅覚受容体遺伝子の重複、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、平成22年12月7日、神戸市

⑤ 安河内祐二・三浦奈美・石川幸男・佐原健、ヨーロッパアワノメイガの触角でオス特異的に発現する嗅覚受容体遺伝子の重複、日本蚕糸学会第80回大会、平成22年4月3日、上田市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安河内 祐二 (YASUKOCHI YUJI)

農業生物資源研究所・昆虫ゲノム研究ユニット・主任研究員

研究者番号：50355723

(2) 研究分担者

石川 幸男 (ISHIKAWA YUKIO)

東京大学大学院・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：60125987

佐原 健 (SAHARA KEN)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：30241368

(3) 連携研究者

なし