

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450464

研究課題名(和文) 鱗翅目昆虫のW染色体の分子生物学的解析

研究課題名(英文) Molecular biological analysis of W chromosome of lepidopteran insects

研究代表者

阿部 広明 (Abe, Hiroaki)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：80222660

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：カイコの性染色体型は、雌がZW(XY)で雄がZZ(XX)である。カイコはW染色体が1本存在すればZ染色体の数にかかわらず、雌になる。カイコのW染色体には形態的な形質に関する遺伝子が存在しない。W染色体は分子生物学的に解析すると、LTRとよばれる長い繰り返し配列を両端に持つレトロトランスポゾン、また繰り返し配列を持たないレトロトランスポゾン、レトロポゾン、DNA型トランスポゾンなどが、入れ子状になり形成されている。その中でも特筆すべきは、Bm1とよばれる短い配列を持つ、新規の転移因子である。

パーキンソン病の動きのモデルになるカイコが報告されていたが、これは単なるリアクションであった。

研究成果の概要(英文)：Sex chromosomes of the silkworm, *Bombyx mori*, are designated as ZW (XY) for females and ZZ (XX) for males. The female mode of development is determined by the presence of a single W chromosome. No genes for morphological traits have been mapped to the W chromosome. Many long terminal repeat (LTR) and non-LTR retrotransposons, retroposons, DNA transposons, and their derivatives, had accumulated as strata on the W chromosome. It is notable that some of these transposable elements contained the *Bombyx* short interspersed element (Bm1) sequences in the elements.

A mutant strain (op mutant) of the silkworm, *Bombyx mori*, was proposed as a model for Parkinson's disease. A previously reported study movie documenting occasional unique actions of op/op larvae was considered; it revealed that these actions were simply reactions to the touch of other larvae. Moreover, xanthine oxidase injection did not rescue the phenotype of op mutant larvae.

研究分野：昆虫遺伝学

キーワード：カイコ 性染色体 転移因子 トランスポゾン レトロトランスポゾン *Bombyx mori* W染色体

1. 研究開始当初の背景

(1) カイコの性染色体型は、今から約1世紀も前に伴性遺伝する油蚕(あぶらこ *os*)が発見されたことによって、雄がZZ型で、雌がZW型であることが示されていた。その後、倍数体を用いた研究から、W染色体上に雌を決定する因子である雌決定遺伝子が存在することが強く示唆された。しかしカイコの場合、染色体そのものが極めて見にくく、光学顕微鏡下で個々の染色体を識別することは不可能であった。そのため、核内に見える多数の染色体のうち、どれがW染色体であるのか判別はできなかった。それに加え、カイコでは多くの変異体が発見され、その原因遺伝子が常染色体上の座位が決定しているにもかかわらず、W染色体上には、いわゆる目で見える形質の遺伝子が発見されてこなかった。W染色体は「存在するはず」と思われていたが、その実体は不明であった。しかしカイコの一代雑種の利用が広まり、その一代雑種を作るための種親は、あらかじめ雌雄を分けておく必要が生じた。その時代までに飼育されていたカイコは、幼虫時代に雌雄を見分ける方法としては腹面尾部の石渡腺とヘロルド腺に頼っていたので、雌雄鑑別は困難であり熟練を要した。そのため雌雄を目で見ただけで簡単に見分けられる「目印」が望まれていた。そしてついに、故・田島弥太郎博士らによって一連の「W転座系統」が作出された(田島 1941, 1944; 田島ら 1951)。これらは、放射線照射によって目で見える形質の遺伝子を含む染色体断片が、W染色体に転座したものである。これが本研究のW染色体変異系統である。このW染色体変異系統によって幼虫の体色や卵の色を見るだけで、雌雄を見分けることが可能となった。これにより「存在するはず」と思われていたW染色体は「存在する」ことが明確となった。

生物学の研究が分子生物学的手法を取り入れ始めると、カイコでもいろいろな遺伝子が具体的なDNA塩基配列情報として明らかにされてきた。しかしW染色体には形質マーカーは発見されなかった。この「何も遺伝子がない染色体」には、いったい何があるのか? その答えを見つけるために、カイコのW染色体の分子生物学的解析が始められた。

(2) これまでW染色体には形質マーカーは発見されなかった。当然、DNA塩基配列に関する情報も全く出てこなかった。しかし分子生物学的手法を駆使することにより、W染色体のDNAマーカーが得られ、そこを起点とする解析が行われてきた(阿部ら, 2012)。またW染色体解析の過程で多くの動く遺伝子である「転移因子」が発見され、その中にはこれまでの転移因子にはない全く新規のものも存在した(Abe et al., 2010)。

(3) カイコには放射線照射によりW染色体の変異体が発見されている。W染色体のDNA

マーカーが発見されたことにより、これらのW染色体は、切断されて短くなっているものが多いことが判明していた(阿部ら, 2012)。またカイコのW染色体には、多くの転移因子(レトロトランスポゾン、DNA型トランスポゾン、レトロポゾンなどの動く遺伝子の総称)が蓄積されている。その様子は、ある転移因子が別の転移因子に入り込み、入り込まれた転移因子は、実はすでに別の転移因子に入り込んでいたという、いわゆる「入れ子」状態であることが明らかになってきた(Abe et al., 2005)。

2. 研究の目的

(1) ゲノム解析が完了したといわれているが、そのほとんどの場合、WやYといった「性染色体」は分子生物学的解析そのものが困難なため、避けられていたのが実情である。本研究の目的はカイコ以外の鱗翅目昆虫(イチジクカサン(*Trilocha varians*)など)でも、手つかずとなっているW染色体の構造解析を進めることである。

(2) また得られたDNAマーカーでカイコのW染色体の各種変異体の再調査を行った。これによりマーカー並び順を再検討する。

(3) カイコには転移因子が関係していると思われる変異体が多く存在している。W染色体上には多くの転移因子が存在しているので、そのどれかが原因となっている突然変異体も予想される。そこで現在、注目されている変異体に関する調査も行う。

3. 研究の方法

(1) まずカイコの絹糸腺とイチジクカサンの成虫胸部より、それぞれ個体別にDNAを抽出し、それを鋳型に用い10-merの任意プライマー(10000種類をすでに作製済み)との組み合わせでPCRを行う。これにより雌のみで増幅するバンドを探索した。そして得られた雌特異的増幅産物のDNA塩基配列を決定する。それぞれの塩基配列が明確なレトロトランスポゾンの特徴を示さない配列であっても、その左右の配列をウォーキングキットを用いてクローニングする。

イチジクカサンは石垣島より採集されたもので雄1頭、雌1頭のワンペア由来の集団を安定的に維持しているものである。これにより本研究に用いたイチジクカサンのW染色体は、どの雌も同一であると考えられる。

(2) カイコW染色体の各種変異体よりDNAを抽出した。その変異体のW染色体特異的マーカーの保有状況を調査し、その染色体上での並び順を考察した。

(3) ヒトのパーキンソン病のモデルになるといわれている油蚕の *op* という変異体(Tabunoki et al 2013)を入手し、その原因

遺伝子といわれる染色体の解析を行おうとしたが、その前に、その変異体の幼虫に頭を振る特異的な動きがあるということで、その様子を観察した。さらに *op* カイコにミルク由来のキサンチンオキシダーゼを注射し、油蚕の形質が消えるかどうか調査した。

4. 研究成果

(1) カイコのW染色体を解析する過程で、新たに新規の転移因子を同定した(未発表)。この転移因子は他の生物では報告されていないタイプのものであった。カイコには転移因子が新たに別の転移因子を生み出す機構の存在が示唆された。レトロポゾンと呼ばれる転移因子が、その左右の配列を伴って新しい転移因子の単位となり、新たに転移するようである。ただし、そのレトロポゾンは単に挿入することにより新たな単位を生じるといった単純な機構ではないと考えられた。同じレトロポゾン同士が組み換えを起こし、その結果、レトロポゾンを介して離れたところにあった配列が近づき、新しい転移因子が形成されると考えられた。今後、詳細な解析を行い、ゲノム進化という観点からも新規転移因子の形成過程を明らかにする予定である。

このような転移因子が、他の生物では報告されていないことは特筆すべきことである。カイコの品種育成は約5000年に渡って行われてきたのであるが、その間に多くの変異体が得られた。本研究で得られた新たな転移因子からも、カイコはもともと変異しやすい生物であるといえるのかもしれない。

(2) イチジクカサンのW染色体マーカーを探索したところ、数多くのマーカーが得られた(未発表)。カイコのマーカーを探索していた時に比較し、大変、高い率でマーカーが発見された。現在までにDNA塩基配列決定を終了しているマーカーには、転移因子の特徴は見られないが、それはイチジクカサンのゲノム解析そのものが進んでいないためと考えられる。今後はさらに解析を進めていく予定である。

(3) カイコのW染色体の各種変異体のW特異的マーカー保有状況を調査することにより、その並び順を考察した。これまでに得られていた染色体地図と新たに加えたW染色体の変異体のマーカー保有状況を比較した結果、これまでのW特異的マーカーの地図上での並び順を、若干、修正する必要が生じた(Fujii et al., 2016)。これにより、従来のW特異的マーカーの並び順が、より詳細になり、今後のW染色体の分子生物学的解析に大いに役立つことが期待された。

(4) カイコには油蚕と呼ばれる、皮膚が透明に近い形質を示す系統が存在する。油蚕には10種類以上の系統が存在し、それらの皮膚の透明度にも差がある。正常のカイコの皮膚

の細胞には尿酸の結晶が蓄積されており、それにより「不透明」になる。しかし油蚕の場合は、皮膚の細胞に尿酸が蓄積しないか、蓄積が少ないため、皮膚が「透明」になる。この過程には尿酸合成の最後の段階のキサンチンオキシダーゼが関与している場合が多い。キサンチンオキシダーゼの遺伝子に変異しているか、あるいは発現を抑制されている場合がある。しかしカイコでは、このキサンチンオキシダーゼを体外から注射で補うことにより、油蚕の形質が治ることが示されている。パーキンソン病のモデルになるとされている *op* カイコは、原因遺伝子は特定されていないにもかかわらず、キサンチンオキシダーゼの発現が抑制されていると言われていた。そこで *op* カイコにキサンチンオキシダーゼを補うために、ミルク由来のキサンチンオキシダーゼを注射した。もし *op* の原因がキサンチンオキシダーゼであるならば、油蚕の形質は回復するはずである。しかし結果は、全く回復することはなかった。また *op* が示す特異的首振り行動も、よく観察した結果、ただ単に、他の個体が触れた時に通常のリアクションを示しているだけであることが判明した(Abe 2016)。

<引用文献>

阿部広明・藤井 告・三田和英・嶋田 透 (2012) カイコW染色体研究の歴史と最近の分子生物学的研究。蚕糸・昆虫バイオテック第81巻 第3号、187-199。
http://doi.org/10.11416/konchubiotec.81.3_187

Abe, H., Fujii, T., Shimada, T. and Mita, K. (2010) Novel non-autonomous transposable elements on W chromosome of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Genetics* Vol. 89, 375-387. doi:10.1007/s12041-010-0049-3

Tabunoki, H., Ono, H., Ode, H., Ishikawa, K., Kawana, N., Banno, Y., Shimada, T., Nakamura, Y., Yamamoto, K., Satoh, J-I., and Bono, H. (2013) Identification of key uric acid synthesis pathway in a unique mutant silkworm *Bombyx mori* *modei* of Parkinson's disease. *PLoS One*, 8(7), e69130. doi:10.1371/journal.pone.0069130.

Abe, H., Mita, K., Yasukochi, Y., Oshiki, T. and Shimada, T. (2005) Retrotransposable elements on the W chromosome of the silkworm, *Bombyx mori*. *Cytogenet. Genome Res.* 110. 144-151.

田島弥太郎・原田忠次・太田 登 (1951) 蚕卵の色による雌雄を鑑別する方法の研究 I. X線による転座染色体の形成. 育種学雑誌 1, 47-50.

田島弥太郎 (1944) 蚕の染色体突然変異

に関する研究. 蚕糸試験場報告 12, 110-173.

田島弥太郎 (1941) 蚕児の斑紋利用による簡易なる雌雄鑑別法. 日本蚕糸学雑誌 12, 184-188.

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3件)

Hiroaki Abe (2016) Reconsideration of the abnormal larval behaviors used to characterize a strain of the silkworm *Bombyx mori* as a model of Parkinson's disease. Trends in Entomology, Vol. 12, 81-90. 査読有

Tsuguru Fujii, Akio Ohnuma, Yutaka Banno and Hiroaki Abe (2016) Structural analysis of spontaneous Z-W translocations in the silkworm, *Bombyx mori*. Journal of Insect Biotechnology and Sericology, Vol. 85, 79-85. http://doi.org/10.11416/jibs.85.3_079 査読有

Fujii, T., Abe, H., Kawamoto, M., Banno, Y., Shimada, T. (2015) Positional cloning of the sex-linked giant egg (*Ge*) locus in the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Molecular Biology Vol. 24(2) 213-221. DOI: 10.1111/imb.12150 査読有

[学会発表](計1件)

阿部広明 ヒトのパーキンソン病のモデルとされるカイコの動きを再考した。第61回 日本応用動物昆虫学会大会 東京農工大学小金井キャンパス・東京都・小金井市。2017年3月28日。

[図書](計1件)

Hiroaki Abe, Tsuguru Fujii and Raman Chandrasekar (2014) The recent progress of the W and Z chromosome studies of the silkworm *Bombyx mori*. Short Views on Insect Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 1, (369 p)291-316.

[産業財産権]

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

阿部 広明 (ABE, Hiroaki)
東京農工大学・大学院農学研究科院・助教
研究者番号：80222660

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()