

# カイコゲノムの物理地図と転写地図の整備ならびに機能解析システムの確立

●嶋田 透 ◆勝間 進

東京大学大学院農学生命科学研究科

## <研究の目的と進め方>

2004年に日本と中国の両グループが全ゲノムショットガン解析を実施し、その結果を公開したが、コンティグが断片化しており、効率的な遺伝子探索には不十分であった。2006年に両国のショットガン配列の再アセンブリーが行われ、約16,000個のタンパク質コード遺伝子が予測された。しかし、その予測精度はなお不十分であり、多くの未同定の遺伝子が残っている。本課題では、完全長cDNA、SAGEタグ、低分子RNAなどの情報を網羅的に取得し、遺伝子を体系的に発見する。また、それら転写地図とトランスポゾンによる変異作出とを組み合わせ、休眠・性分化・生殖・免疫など、カイコに特徴的な生物現象を支配する遺伝子を同定する。一方、カイコの祖先種と考えられるクワコや近縁の蛾であるエリサンのゲノム情報を解読し、鱗翅目昆虫のゲノムの共通点と種間差異を明らかにする。

## <2007年度の研究の当初計画>

### 1. カイコ完全長cDNA データベースの構築：

胚子・翅原基等の組織のRNAからオリゴキャップ法またはGキャッピング法で構築した完全長cDNAのうち、各ライブラリーに特異的に存在するもの（約2000クローン）について完全長の塩基配列を決定する。農業生物資源研の完全長cDNAプロジェクトとも連携し、全ゲノムの遺伝子アノテーションへ協力する。

### 2. SAGEおよびMPSS解析による転写産物の網羅的探索：

SAGEおよびMPSSタグを用いて、卵形成や胚発生における転写産物の網羅的な解析を行う。また、DNAメチル化やsmall RNAと転写制御との関わりを解析する。

### 3. 低分子RNAの解析：

カイコ卵巣に多量の多様な低分子RNAが存在することを昨年度までに明らかにした。今年度は、そのRNAをゲノム情報と対応づけるとともに、タンパク質との相互作用など機能の面を明らかにする。

### 4. クワコのFosmidライブラリーを用いたカイコ-クワコ間の比較ゲノム解析：

昨年度までに、支援班および国立遺伝学研究所小原博士の協力によりクワコfosmidの末端塩基配列を解析していただいたので、今年度はそれをカイコゲノムと比較することで、カイコの進化に伴う転座・欠失・重複・逆位などをゲノムワイドに探索する。

### 5. エリサンのcDNAデータベースの構築と比較ゲノム解析：

鱗翅目昆虫には、多くの固有の遺伝子が存在することがすでに分かっているが、それらがコードするタンパク質の機能ドメインなどを検出するには、クワコよりも遠縁の種を比較する必要がある。エリサンはカイコと5000万年ほど離れている。エリサンEST解析により特有の遺伝子を見出し、その機能を解析する。

### 6. 突然変異系統を用いた遺伝学的解析：

カイコには豊富な自然突然変異があり、また放射線やトランスポゾンで誘発した変異系統が作成されている。本研究では、それ

らの原因になる遺伝子の塩基配列の変異を特定し、形質発現の機構の解明を試みる。

## <2007年度の成果>

### 1. 完全長cDNAの解析

すでに種々の組織や細胞の完全長cDNAライブラリーから、計約42,000クローンの末端配列(EST)を解読している。今年度は、それらのうち数百クローンについて従来法で内部配列を決定するとともに、Solexaシーケンサーによる解読に向けて5000クローンのcDNAを準備した。

### 2. 鱗翅目昆虫が水平転移で微生物から獲得した遺伝子の解析

スクラーゼをコードする*BmSuc1*は動物界には相同遺伝子が無く、細菌のβ-フルクトフラノシダーゼ遺伝子に相同性を示す。*BmSuc1*の組換えタンパク質は、ショ糖などβ-フルクトフラノシドを加水分解した。桑の葉にはDNJなどαグルコシダーゼを阻害するアルカロイドが多量に含まれているが、*BmSuc1*のスクラーゼ活性はDNJに阻害されない。今年度は、エリサン・柞蚕・クワノメイガなどの鱗翅目昆虫における*BmSuc1*相同遺伝子をクローニングし、そのmRNA量を比較したところ、クワを寄主とする昆虫は他の昆虫に比べて遺伝子発現が顕著に多かった。さらにクワを食害するカミキリムシ3種からも*BmSuc1*相同遺伝子をクローニングすることができ、いずれもかなり多いmRNAの発現を示した。クワ食の昆虫では*BmSuc1*相同遺伝子がアルカロイドに対して適応進化しているのかもしれない。

### 3. 鱗翅目昆虫のみに存在する遺伝子の機能解析

鱗翅目昆虫の遺伝子には他生物に相同配列が存在しないものがあり、特に生体防御系の遺伝子にそういう例が多い。その一つとして、カイコゲノムから4個のグロベリン遺伝子を同定し、それがコードするタンパク質に確かに抗菌活性があることを証明した。

### 4. カイコゲノムと新口動物ゲノムの網羅的比較

カイコゲノムを新口動物4種、ショウジョウバエ、イソギンチャク、菌類、植物、細菌の各ゲノムと比較して、相同遺伝子の有無を検討した。その結果、カイコにあってヒトに無い遺伝子のうち、イソギンチャクに保存されているものが少なくとも64個あり、それら遺伝子は新口動物の種々の段階で消失したことが明らかになった。

### 5. 卵巣に存在する低分子RNAの構造と機能

蛹期の卵巣のRNAをポリアクリルアミドゲルで電気泳動すると、29nt程度のサイズの低分子RNAが多量に存在していた。NBRPおよび遺伝研の協力も得て、67,700本(38,494種類)の低分子RNAの塩基配列を解読した。それらをゲノムの塩基配列へ照合すると、染色体あたり数カ所以上の特定の領域に集中してヒットした。また、それら低分子RNAと相互作用する分子の候補としてSIWIおよびBmAGO3の遺伝子をクローニングし、生殖巣特異的な発現を明らかにした。

## 6. クワコゲノムとカイコゲノムの比較

すでに藤山代表および黒木陽子博士（理研）と共同でカイコの野生種クワコの fosmid ライブラリーを作製し、うち 76,608 クローンの 5' および 3' 末端の塩基配列を支援班（遺伝研・小原研究室）の協力で決定した。この末端配列をカイコのゲノムと比較した結果、SNPs の頻度は、クワコ・カイコ間で 2.3% である。支援班の森下真一教授（東大）の協力を得て、クワコにおける大きな挿入のある fosmid を 100 数十クローン拾い出した。

また、カイコの家畜化の過程を解明するために、クワコ特有の形質（飛翔・擬態・夏眠・体表斑紋・幼虫徘徊・分散型産卵・繭形など）をマッピングすることが有効と思われるので、クワコの染色体を置換したカイコの系統を作る作業を開始した。

## 7. 突然変異の原因遺伝子の解析

数百におよぶ既存の変異体カイコ系統を活用して原因遺伝子を探索した。カイコの代謝異常を示す変異体「赤血」(*rb*) および「臭蚕」(*sku*) の原因遺伝子をほぼ確定させた。また、カイコの種々の眠性変異体（脱皮回数の変異）および不眠蚕（脱皮ができない）の解析を進めた。また、カイコの Z 染色体に起因する変異体「羽ばたき不能」(*Md*)、「痕跡翅」(*Vg*)、「d 油」(*od*)、「エスプリ」(*spli*)、ならびに「伴性食性異常」(*Bt*) の原因を遺伝子レベルで解析した。また、皮膚色に関する変異体（「黒蛾」*Bm*、「褐頭尾斑」*bts*、「赤蟻」*ch* など）の解析を進めた。埼玉県産のクワコから尾崎らによって発見された油蚕 "oz" やカイコの「ワクジー油」*ow* の原因遺伝子を絞り込んだ。

## 8. カイコにおけるジーントラップ法およびジーンサーチ法の確立

カイコにおける新たなジーントラップシステムを確立し、ジャンプスターター系統との交配によって中規模のスクリーニングを行った。ジーンサーチ法についても試みている。

### <国内外での成果の位置づけ>

農林水産省の「アグリゲノム研究」でもカイコのゲノム研究が支援されている。特に、全ゲノムの物理地図は農水省のプロジェクトに依存しているので、本課題はむしろトランスクリプトームと転写地図、そしてゲノム機能研究に力点を置いている。中国のカイコゲノム WGS と日本のデータとの統合が進みつつあり、そのアノテーションでも本課題は協力している。

### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

特になし。

### <今後の課題>

完全長 cDNA の解析については、農業生物資源研との連携しつつ、重点的に資金を投入して早期に進める必要がある。生殖細胞のトランスクリプトームや small RNA の解析については、今後エピジェネティクスの視点での展開が必要である。piggyBac ベクターを用いた網羅的な遺伝子機能解析については、当課題でジーンターゲットシステムのシステムが構築できたことにより、より大規模な解析に早期に移行し、実際に遺伝子機能を解析する実績を出すことで有用性を証明することが必要である。クワコは、高度に家畜化された生物としての特殊性をゲノムから解読できる興味深い対象であるので、支援班の協力を得て、より体系的な比較解析を進めるべきである。

### <成果公表リスト>

#### 1. 論文/プロシーディング

- (1) 0702140014 Tsuguru Fujii, Takeshi Yokoyama, Osamu Ninagi, Kowa Kakehashi, Yoshiaki Obara, Mitsuru Neno, Takahiro Ishikawa, Kazuei Mita, Toru Shimada, and Hiroaki Abe (2007) Isolation and characterization of sex chromosome

rearrangements generating male muscle dystrophy and female abnormal oogenesis in the silkworm, *Bombyx mori*. *Genetica* 130(3): 267-280.

- (2) 0707221314 Takaaki Daimon, Susumu Katsuma, WonKyung Kang, and Toru Shimada (2007) Functional characterization of chitinase from *Cydia pomonella* granulovirus. *Archives of Virology* 152(9): 1655-1664.
- (3) 0801300043 Susumu Katsuma, Kazuei Mita, and Toru Shimada (2007) ERK- and JNK-dependent signaling pathways contribute to *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus infection. *Journal of Virology* 81(24): 13700-13709.
- (4) 0801300048 Shinpei Kawaoka, Kosuke Minami, Susumu Katsuma, Kazuei Mita, and Toru Shimada (2008) Developmentally synchronized expression of two *Bombyx mori* Piwi subfamily genes, SIWI and BmAGO3 in germ-line cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (in press).
- (5) 0801300052 Hiroaki Abe, Tsuguru Fujii, Nobuhiko Tanaka, Takeshi Yokoyama, Kazuhiro Kakehashi, Masahiro Ajimura, Kazuei Mita, Yutaka Banno, Yuji Yasukochi, Toshikazu Oshiki, Mitsuru Neno, Takahiro Ishikawa, and Toru Shimada (2008) Identification of the female-determining region of the W chromosome in *Bombyx mori*. *Genetica* (in press).
- (6) 0801300017 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.
- (7) 0707221321 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.

## 2. 著書

- (1) 0801300056 嶋田 透・勝間 進 (2007) 昆虫の比較ゲノム—カイコゲノムから見た多様性と特異性、「ゲノムから読み解く生命システム—比較ゲノムからのアプローチ」第 10 章、細胞工学分冊、秀潤社、pp. 111-117
- (2) 0801300058 嶋田透 (2007) ゲノムと遺伝子 (第 1 章)、「昆虫生理生態学」(河野義明・田付貞洋編、総 277 ページ)、pp.1-14、朝倉書店。

## 3. データベース/ソフトウェア

- (1) 601301852 カイコ EST データベース [SilkBase]  
<http://morus.ab.a.u-tokyo.ac.jp/>

## 4. その他 (総説)

- (1) 0707221330 Tsuguru Fujii and Toru Shimada (2007) Sex determination in the silkworm, *Bombyx mori*: a female determinant on the W chromosome and the sex-determining gene cascade. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 18: 379-388.