

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¹⁾ ◆伴野 豊²⁾ ◇勝間 進¹⁾ ◇大門 高明¹⁾

1) 東京大学大学院農学生命科学研究科 2) 九州大学大学院農学研究院

<研究の目的と進め方>

カイコのゲノムの物理地図・転写地図を作成し、比較ゲノム・機能ゲノムの観点で研究を進める。特に以下の点を目的にする。

(1) 完全長 cDNA の解読を進めるとともに、鱗翅目昆虫特異的に存在する遺伝子を同定する。(2) SAGE 等によりカイコゲノムの転写地図を作製し、転写産物の発現プロファイルを明らかにする。(3) エリサンやクワコなどの近縁種のゲノム情報を獲得・整備することによって、カイコの遺伝子の機能予測ならびに進化的背景の解明をする。(4) 遺伝子トラップ系統などを活用して遺伝子の機能解明を進める。(5) 既存の形質突然変異のうち、比較ゲノム的な視点で重要と思われる遺伝子を、ポジショナルクローニングで単離する。

<2008 年度の研究の当初計画>

1. カイコの完全長 cDNA の解析：カイコの完全長 cDNA 数千個のクローンの塩基配列をゲノム塩基配列とアラインメントして遺伝子を同定する。
2. クワコとカイコの比較ゲノム解析：クワコ fosmid クローンの末端塩基配列をカイコゲノムと比較し、クワコで大きな挿入/欠失の存在する領域について、その配列を決定する。また、カイコの染色体を 1 本ずつクワコに置換した系統を作出し、その形質を調査する。
3. 遺伝子トラップ系統の探索：piggyBac を用いて GAL4 を無作為に挿入させた系統の中から、性決定、胚休眠、食性等の変異を探索し、原因遺伝子を同定する。
4. 既存突然変異とゲノム情報の対応付け：日本には 400 以上のカイコの変異形質が保存されている。それらの多くは、連鎖地図上の位置としては同定されていないが、構造が不明である。各染色体の上の形質突然変異の原因遺伝子を同定する。
5. 低分子 RNA の網羅的解読、比較解析、および機能解析：卵巣で多量に発現している低分子 RNA 以外に、精巣や培養細胞 BmN の低分子 RNA を解析する。
6. カイコゲノム特異的な遺伝子の解析：他の動物の代謝系には存在しないようなカイコ特有の酵素の遺伝子を解析する。

<2008 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 4,912 クローンの cDNA を鈴木稔、菅野、森下、笠原の各先生のご協力により、Solexa シークエンサーで解読し、好成績のアセンブリ結果を得た。
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。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。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。

また、カイコゲノムには、昆虫には存在しないはずのキヌレニナーゼ遺伝子が存在することを発見した。この遺伝子は、細菌の配列に高い相同性を持ち過去の水平移動で獲得されたものと想像される。また、変異形質として知られていた赤血 (rb) が、キヌレニナーゼ遺伝子の変異に伴う酵素活性の低下が原因であることを突き止めた。

3. 生殖巣に存在する piRNA 様 RNA の構造と機能

カイコの卵巣、精巣、初期胚、BmN 細胞の RNA をポリアクリルアミドゲルで電気泳動すると、いずれでも 29nt 程度のサイズの低分子 RNA が多量に存在する。Solexa などで配列決定したところ、その配列はトランスポゾンの一部に対応することが多いこと、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すること、などが明らかになった。現在、BmN 細胞を使った機能解析などを行っている。

4. クワコゲノムとカイコゲノムの比較

カイコの野生種であるクワコの fosmid の 5' および 3' 末端の塩基配列を、カイコのゲノムと比較すると、SNPs の頻度は、クワコ・カイコ間で 2.3% である。SNPs 以外にも、数 10 ~ 数万塩基の挿入/欠失が高頻度で見られる。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、これらの構造を比較した結果、カイコで喪失した遺伝子の存在を示唆する結果を得た。

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。そこで、クワコの染色体を置換したカイコの系統を作る作業を行った。すでに 2~3 本の染色体をクワコに置換した系統を多数作出し、ほぼ全ゲノムをカバーしてある。今後、クワコ型染色体をホモ接合にし、形質を調査する予定である。

5. 突然変異の原因遺伝子の解析

カイコの代謝異常を示す変異体「黄体色」(*lem*) 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 Z 染色体に起因する変異体「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 (「褐頭斑」*bts*、「赤蟻」*ch*、「煤蚕」*so* など) の解析を進めた。埼玉県産のクワコから発見された油蚕 "oz" やカイコの「ワクジー油」*ow* の原因遺伝子も解明した。

6. ジーントラップ法およびジーンサーチ法の確立

カイコの既存の形質突然変異は 400 種類ほどであり、カイコの遺伝子の一部にした対応しない。より網羅的な変異体を得るために、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た。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。今年度は中国のカイコゲノム WGS と日本のデータとの統合が完了したが、そのアノテーションでも本課題は中心的な貢献をした。

<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めどをつける必要がある。カイコの新コード RNA や small RNA は予想以上に複雑であるが、培養細胞系存在など他生物にない利点があるので、積極的に進める。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つつあるが、実際に遺伝子機能を解明する実績を出し、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てゆきたい。

<成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング (査読付きのものに限る)

1. 901181129 Ito, K., Katsuma, S., Yamamoto, K., Kadono-Okuda, K., Mita, K., and Shimada, T. (2009) A 25 bp-long insertional mutation in the BmVarp gene causes the waxy translucent skin of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* (in press) .
2. 901181119 Kawaoka, S., Katsuma, S., Meng, Y., Hayashi, N., Mita, K., and Shimada, T. (2009) Identification and characterization of globin genes from two lepidopteran insects, *Bombyx mori* and *Samia cynthia ricini*. *Gene* (in press) .
3. 901181123 Katsuma, S., Nakanishi, T., and Shimada, T. (2009) *Bombyx mori* nuCLEopolyhedrovirus FP25K is essential for maintaining a steady-state level of v-cath expression throughout the infection. *Virus Res.* (in press) .
4. 901181115 Meng, Y., Katsuma, S., Mita, K., and Shimada, T. (2009) Abnormal red body coloration of the silkworm, *Bombyx mori*, is caused by a mutation in a novel kynureninase. *Genes Cells* (accepted) .
5. 901180100 The International Silkworm Genome Consortium (2008) The genome of a lepidopteran model insect, the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* (in press) .
6. 901091838 Futahashi, R.*, Sato, J.*, Meng, Y.*, Okamoto, S., Daimon, T., Yamamoto, K., Suetsugu, Y., Narukawa, J., Takahashi, H., Banno, Y., Katsuma, S., Shimada, T., Mita, K., and Fujiwara, H. (2008) yellow and ebony are the responsible genes for the larval color mutants of the silkworm *Bombyx mori*. *Genetics* 180: 1995-2005 (* These authors contributed equally to this work)
7. 901181111 Katsuma, S., Nakanishi, T., Daimon, T., and Shimada, T. (2009) N-linked glycans located in the pro-region of *Bombyx mori* nuCLEopolyhedrovirus V-CATH are essential for the proper folding of V-CATH and V-CHIA. *J. Gen. Virol.* 90: 170-176.

8. 901180047 Katsuma, S., Fujii, T., Kawaoka, S., and Shimada, T. (2008) *Bombyx mori* nuCLEopolyhedrovirus SNF2 global transactivator homologue (Bm33) enhances viral pathogenicity in *B. mori* larvae. *J. Gen. Virol.* 89: 3039-3046.
9. 901180044 Arunkumar, K. P., Tomar, A., Daimon, T., Shimada, T., and Nagaraju, J. (2008) WildSilkbase: An EST database of wild silkmoths. *BMC Genomics* 9:338 (available online:<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/9/338/>) .
10. 806262249 Katsuma, S., Horie, S., and Shimada, T. (2008) The fibroblast growth factor homolog of *Bombyx mori* nuCLEopolyhedrovirus enhances systemic virus propagation in *B. mori* larvae. *Virus Res.* 137: 80-85.
11. 806262246 Katsuma, S., Kawaoka, S., Mita, K., and Shimada, T. (2008) Genome-wide survey for baculoviral host homologs using the *Bombyx* genome sequence. *Insect Biochem. Mol. Biol.* (in press) .
12. 806262236 Daimon, T., Taguchi, T., Meng, Y., Katsuma, S., Mita, K., and Shimada, T. (2008) Beta-fructofuranosidase genes of the silkworm, *Bombyx mori*: Insight into enzymatic adaptation of *B. mori* to toxic alkaloids in mulberry latex. *J. Biol. Chem.* 283: 15271-15279.
13. 806262231 Kawaoka, S., Hayashi, N., Katsuma, S., Kishino, H., Kohara, Y., Mita, K., and Shimada, T. (2008) *Bombyx* small RNAs: Genomic defense system against transposons in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* (in press) .
14. 806262225 Fujii, T., Abe, H., Katsuma, S., Mita, K., and Shimada, T. (2008) Mapping of sex-linked genes onto the genome sequence using various aberrations of the Z chromosome in *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* (accepted) .
15. 801300048 Kawaoka, S., Minami, K., Katsuma, S., Mita, K., and Shimada, T. (2008) Developmentally synchronized expression of two *Bombyx mori* Piwi subfamily genes, SIWI and BmAGO3 in germ-line cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 367: 755-760.
16. 801300052 Abe, H., Fujii, T., Tanaka, N., Yokoyama, T., Kakehashi, K., Ajimura, N., Mita, M., Banno, Y., Yasukochi, Y., Oshiki, T., Neno, M., Ishikawa, T., and Shimada, T. (2008) Identification of the female-determining region of the W chromosome in *Bombyx mori*. *Genetica* 133: 269-282.
17. 801300038 Suzuki, M. G., Imanishi, S., Dohmae, N., Nishimura, T., Shimada, T., and Matsumoto, S. (2008) Establishment of a novel in vivo sex-specific splicing assay system to identify a trans-acting factor that negatively regulates splicing of Bmdsx female exons. *Mol. Cell. Biol.* 28: 333-343.

2) データベース/ソフトウェア

1. 601301852 カイコ EST/ゲノム情報データベース [SilkBase] <http://morus.ab.a.u-tokyo.ac.jp/>