

特集：次世代農業への挑戦—抵抗性機構の解明と環境調和型殺虫剤の開発—

カイコゲノム研究の現状とその利用

(独)農業生物資源研究所 ^{やまもと}山本 ^{きみこ}公子・^{みた}三田 ^{かずえい}和英

はじめに

カイコゲノム研究は、我が国をはじめ中国および他のアジア諸国、米国、欧州において展開されており、我が国では農業生物資源研究所が中心となって進行している。2004年には日本と中国においてそれぞれゲノム塩基配列解析の結果が公表され、さらに06年にSNP連鎖地図、08年に日本・中国の統合ゲノム解析情報が公開された。農業生物資源研究所では、これらのカイコゲノム研究の成果を統合し、全ゲノムの91%をカバーするカイコゲノム情報と、発現遺伝子情報や地図情報等の各種ゲノム情報をマージした統合化データベースKAIKObaseを2008年に公開した。カイコはチョウ目昆虫のモデル生物でもあり、KAIKObaseの公開とその利用により、今後、世界的規模で、カイコおよびチョウ目昆虫の研究が飛躍的に進むものと期待されている。

また、カイコゲノム情報を詳細に解析した結果、カイコのもつ特徴的生命現象、絹生産、桑に依存する食性、複雑な変態などを生み出すメカニズムが次第に明らかになってきた。本稿では、初めにカイコゲノム研究の成果を紹介し、次に、この中で植物(桑)との相互作用に関する特性について紹介する。

I カイコゲノム研究の紹介

1 カイコゲノム研究の進捗状況

(1) ゲノム塩基配列解析

我が国では、カイコゲノム研究は1994年から着手されていたが、2003年より規模を拡大して農業生物資源研究所を中核として推進している。前章に述べたように、2004年には、日本(MITA et al., 2004)と中国(XIA et al., 2004)の各々からの全ゲノムショットガン塩基配列が公開され、さらに、08年には、両国のデータを統合した8.48倍のシーケンスサイズデータおよび30万リードのfosmid-endシーケンスデータと15万リードのBAC-endシーケンスデータをあわせた再アセンブル(The International Silkworm Genome Consortium, 2008)

が行われた。その結果、カイコのゲノムサイズ(475 Mb)の91%に相当する432 Mbの高精度アセンブリデータが得られている。スキホルドのN50値(50%以上の塩基がその値以上の長さのスキホルドに含まれる値のことで、ゲノムの完成度を測る指標として使われる。1 Mb以上は必要)は3.7 Mbにもなっている。カイコゲノムの特徴としては、多くの転移因子(transposable element)を含んでおり、43.6%がリピート配列(OSANAI-FUTAHASHI et al., 2008)であることが挙げられる。

(2) 地図情報

BAC (Bacterial artificial chromosome) 物理地図およびSNP (Single nucleotide polymorphisms) 連鎖地図の構築を進めている。

BAC物理地図では、カイコBACライブラリー(81,024 クローン)の整備と両末端塩基配列解析(SUETSUGU et al., 2007)、フィンガープリント法による物理地図の構築、ミニマムタイリングBACの構築を行った。SNP連鎖地図では、これまでに約2,000個のBACマーカーが座乗した高密度一塩基多型(SNP)連鎖地図を構築(YAMAMOTO et al., 2006; 2008)し、28本の染色体に対してゲノムの87.4%に相当するアセンブリスキャフォールドをマップしている。

(3) 発現遺伝子解析

これまでに、様々な組織から36のEST (Expressed sequence tag: 発現遺伝子の配列断片)ライブラリーを整備し、35,000クローンの塩基配列決定(MITA et al., 2003)を行った。また、20の完全長cDNAライブラリーの整備および1万クローンの塩基配列決定を行い、カイコマイクロアレイ(44 K, 13,000遺伝子)の整備も進めている。

(4) データベース

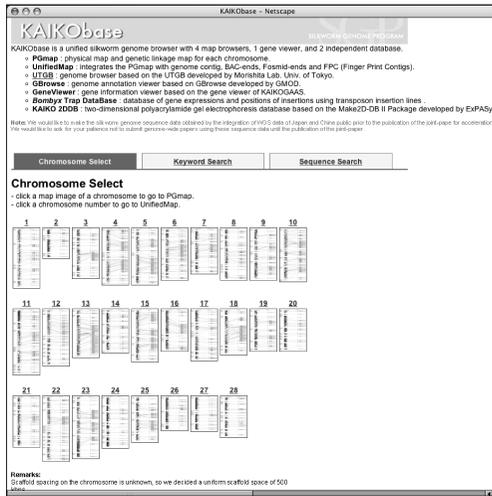
前述のように、カイコ統合化データベースKAIKObase(図-1)の整備・公開を行った。KAIKObaseの公開により、様々なカイコゲノムデータが複合的に利用可能になるため、今後のカイコおよびチョウ目昆虫のゲノム研究における多大な貢献が期待される。さらに、KAIKObaseとカイコ・プロテオームデータベースの統合およびカイコ・トラップデータベースの

Current Status of Silkworm Genome Research and its Application.

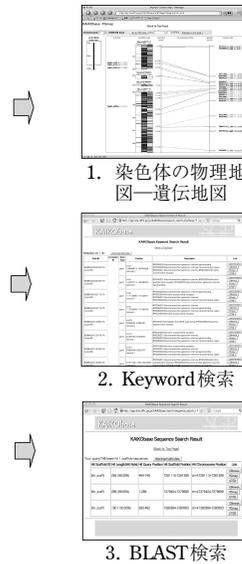
By Kimiko YAMAMOTO and Kazuei MITA

(キーワード: カイコ, ゲノム, 桑)

KAIKObase トップ画面



<http://sgp.dna.affrc.go.jp/KAIKObase/>



1. 染色体の物理地図—遺伝地図

2. Keyword検索

3. BLAST検索

図-1 KAIKObaseの画面例

構築 (UCHINO et al., 2008) と KAIKObase の統合を行い、カイコ完全長 cDNA によるカイコゲノムアノテーション (ゲノム情報に遺伝子とその機能を割り当てること) も開始している。

2 カイコゲノムの特徴

上記の様々な解析から得られたデータにより、以下のようなカイコゲノムに特徴的な情報が明らかになった。

まず、カイコは動物ではこれまで発見されていなかった β -フルクトフラノシダーゼを有し、桑に高濃度で含まれるアルカロイド系の糖代謝阻害物質を分解することができる (後述)。そのため桑を餌としても、糖代謝阻害を受けることなく糖の利用ができる。これは、カイコが水平移動によってこの遺伝子を細菌から獲得したためであると推定されている。

これ以外にも、絹の成分であるセリシンとフィブロインの合成にかかわる特定の tRNA 遺伝子がクラスターを形成していて大量の絹生産に適応したゲノム構造をとっていることが明らかとなり、また、他の昆虫に比べて味覚受容体の数がかかなり少なく、桑単食であり、人為的に桑を与えられるという家畜化に関係あるのではないかと推測されている。さらに、クチクラタンパク質遺伝子の構造解析から、遺伝子クラスターの存在や進化的に早い段階での構造上異なるクチクラ遺伝子の分岐などが示唆されるなど特徴的な情報が得られつつある。

3 カイコゲノム研究がもたらすもの

これまでのカイコゲノム研究から得られた成果・情報を利用することにより、今後、以下のような研究の展開が考えられる。

(1) ヒト型糖鎖構造をもつタンパク質の大量生産

カイコのもつ糖鎖遺伝子が網羅的に解析され、カイコタンパク質の糖鎖構造決定機構の解明が進行中であり、カイコでヒト型タンパク質生産への道が見えてきている。

(2) 各種突然変異遺伝子の同定

ゲノム情報を利用して、形質変異体の原因遺伝子 (黄体色 *lem* (MENG et al., 2009), 赤蟻 *ch* (FUTAHASHI et al., 2008 a), 油蚕 *ow* (ITO et al., 2009), 黄血 *Y* (SAKUDOH et al., 2007) 等) が同定された。また、カイコ膿核病ウイルスに対する抵抗性遺伝子 (ITO et al., 2008) をはじめ、重要な遺伝子のクローニングが進んでいる。これらの遺伝子機能の解明から、遺伝子組換えカイコを作出するための新しいベクターの作出や、ジーンターゲットングなどの遺伝子改変技術の開発、および殺虫剤抵抗性メカニズムの解明や昆虫特異的な性質の解明への手がかりが得られるものと期待される。

(3) 害虫防除への応用

カイコゲノム研究は、開始当初から目的の一つに大規模被害をもたらすチョウ目農業害虫のモデル研究として位置づけられており、カイコゲノムの成果をハスモンヨトウやコナガへ展開することで、新規農薬の開発や殺虫

剤抵抗性のメカニズム解明の促進が期待される。

(4) カイコゲノム研究の今後の課題

KAIKObaseの情報の利用により、カイコゲノム研究の一層の進展を図るほか、カイコゲノムシーケンスのアノテーションを進めること、完全長cDNAデータベースをさらに充実させることも重要である。また、国際コンソーシアムを組織して、カイコゲノム研究に取り組むことも必要となる。将来的には、RNAi、ジーンターゲットング等、より簡便な遺伝子機能解析手法の開発を行い、重要機能遺伝子の同定とその遺伝子機能解析に基づいた、農業の標的タンパク質の選定を進めることなどが可能になると想定されている。さらに、害虫防除への応用に関しては、KAIKObaseを軸に他のチョウ目昆虫ゲノム情報を取り込んだデータベースの構築を進める予定である。

II 桑との相互作用

1 なぜカイコは桑を食べることができるのか

ある種の植物は防御物質を生産することにより、昆虫による食害から逃れるメカニズムを進化させてきた。このことがほんの限られた昆虫しかそのような植物を餌とすることができないという結果をもたらしている。特に、植物乳液にはしばしばアルカロイドやプロテアーゼのような様々な毒性を有する物質が含まれ、これらは昆虫の食害に対する植物の防御機構に重要な役割を果たしている。

桑の乳液には、1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol (D-ABI), I-deoxynojirimycin (DNJ) や 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-ribitol のようなアルカロイド系の糖代謝阻害物質が高濃度で含まれている (KONNO et al., 2006)。これらのアルカロイド系物質はカイコには有毒ではなく、逆に幼虫は桑でしか飼育できない。しかし、これらの物質はカイコ以外の桑を食べないチョウやガの幼虫、例えば、エリサンやコナガなどには非常に有毒である。このことは、カイコがそのようなアルカロイド系物質の阻害効果を克服して桑の葉を食し、成長できるように未知のメカニズムを進化させてきたことを示している。

シクラーゼはα-グルコシル基を加水分解する消化酵素(α-グルコシダーゼ)あるいはβ-フルクトシル基を加水分解する消化酵素(β-フルクトフラノシダーゼ)である。D-ABIやDNJはα-グルコシダーゼの強力な阻害剤であるが、β-フルクトフラノシダーゼには阻害効果を全く示さない。α-グルコシダーゼはバクテリア、カビ、植物、動物に広く分布しているが、β-フルクトフラノシダーゼはこれまで動物には見つかっていなかった

表-1 カイコの2種類のシヨ糖分解酵素の特性

シヨ糖加水分解酵素	ゲノムに存在する生物	糖類似アルカロイドによる作用
α-グルコシダーゼ	バクテリア、カビ、植物、動物に存在	活性を阻害
β-フルクトフラノシダーゼ	バクテリアとカイコにしか見つかっていない	活性が阻害されない

た(表-1)。しかし、今回カイコゲノムシーケンスからバクテリアのβ-フルクトフラノシダーゼに強いホモロジーを示す2個の遺伝子(*BmSuc1*, *BmSuc2*)を見つけた(DAIMON et al. 2008)。これらは二つとも17番染色体上にあった。*BmSuc1*の転写物はESTデータベース内に見つかったが、*BmSuc2*は見つかっていない。両方の遺伝子ともイントロンはなかった。バクテリアβ-フルクトフラノシダーゼの活性サイトは*BmSuc1*では保存されているが、*BmSuc2*ではAsp→Hisとなっており、*BmSuc2*はβ-フルクトフラノシダーゼ活性をもっていないと推定される。したがって、*BmSuc1*は機能的にβ-フルクトフラノシダーゼをコードしているが、*BmSuc2*は偽遺伝子化しているのであろう。また、カイコp50T系統のゲノムDNAのサザンプロットから、両方の遺伝子はそれぞれシングルコピーとしてカイコゲノムに存在していることがわかった。*BmSuc1*, *BmSuc2*を含むβ-フルクトフラノシダーゼ遺伝子の進化を調べるために図-2に*BmSuc1*, *BmSuc2*とその他のβ-フルクトフラノシダーゼのアミノ酸配列の系統樹解析結果を示す。*BmSuc1*と*BmSuc2*は単一のcladeを形成し、祖先の昆虫の中で遺伝子重複によってできてきたことがわかる。面白いことに両者ともバクテリア系列の中に属しており、進化のある時点で、バクテリアからカイコの祖先への遺伝子の水平移動によって、カイコはこの遺伝子を獲得したことを示唆している。*BmSuc1*, *BmSuc2*ともイントロンをもたないことはこのことを支持している。

次に、DNJによる*BmSuc1*活性への阻害効果を図-3に示した。α-グルコシダーゼへの阻害効果も図で比較した。予想したように、DNJはα-グルコシダーゼを10μMでほとんど阻害するが、1.2mMの濃度でも*BmSuc1*の活性は阻害されなかった。

さらに、RT-PCRで*BmSuc1*遺伝子の発現プロファイルを調べた。*BmSuc1*は5齢3日目幼虫では中腸と面白いことに絹糸腺(セリシンの発現している中部絹糸腺)で発現していることがわかった。*BmSuc2*はどの組織で

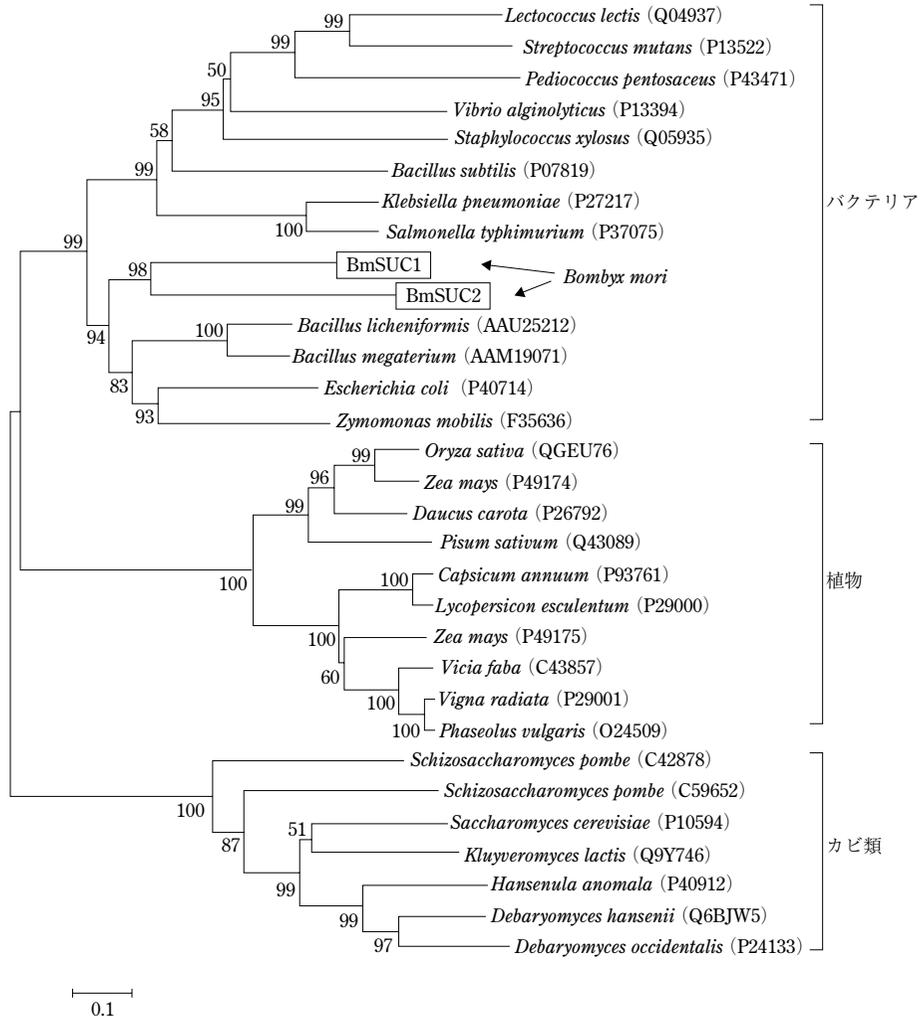


図-2 β -フルクトフラノシダーゼの系統樹解析

も発現していなかった。また、BmSuc1 タンパク質の抗体を用いた研究から、BmSuc1 タンパク質が中腸と絹糸腺（セリシン層）に局在していることがわかった。BmSuc1 タンパク質がなぜ中部絹糸腺で発現し、セリシン層に存在するのかは将来の興味ある課題である。以上のことから *BmSuc1* が糖の消化酵素として機能していることがわかった。このように、 β -フルクトフラノシダーゼの存在によって、なぜカイコが桑の生体防御システムをすり抜けることができるのかを明らかにすることができた。

2 産卵、摂食行動にかかわる 7 回膜貫通ヘリックス型受容体 (7TMPs)

様々な生体物質によって誘導されるシグナル伝達系の

通路として重要な役割を果たしている、7 回膜貫通ヘリックス型受容体 (7TMPs) 遺伝子をカイコゲノムシーケンスから Ono と Suwa が開発したプログラム (Ono et al., 2005) を用いて網羅した。このグループの大部分は G-protein coupled receptor (G タンパク質共役型受容体, GPCR) であり、化学感覚受容体 (嗅覚受容体 Olfactory receptor, OR と味覚受容体 Gustatory receptor, GR) も含まれる。特に化学感覚受容体は、求愛、摂食、産卵行動に決定的役割を果たし、昆虫制御法の開発には極めて有効なターゲットと考えられ、多くの昆虫で研究が進められている。

多くの昆虫では 200 以上の 7TMP 遺伝子が存在しているが、カイコはそれに比べてかなり少ないことがわか

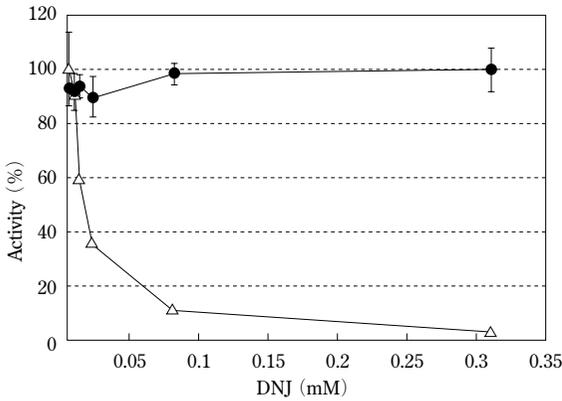


図-3 DNJのBmSuc1およびバクテリアα-グルコシダーゼに対する阻害効果
 △：α-グルコシダーゼ、●：BmSuc1 β-フルクトフラノシダーゼ。

表-2 カイコゲノム中の185個の7TMR遺伝子の分類

クラス	ファミリー	数
A (ロドプシン様)	生理活性アミン	20
	糖タンパク質ホルモン	2
	神経ペプチド	42
	プリン	1
	オプシン	6
B (セクレチン様)	神経ペプチド	2
	HE6様	2
	Latrophilin	2
	Methuselah-like	3
C (グルタミン酸代謝系)	グルタミン酸代謝	5
	GABA-B	3
D (非正型 7TMRs)	Frizzled/Smoothened	5
E (化学受容体 7TMRs)	嗅覚	64
	味覚	14
Orphan		9
未分類		5
	総数	185

った。ショウジョウバエ (257 遺伝子), ミツバチ (263 遺伝子), ハマダラカ (266 遺伝子) に比べて, カイコでは 185 遺伝子である。カイコ 7TMR 遺伝子の内訳は表-2 に示すように, クラス E が最大で 78 個の化学感覚受容体で, 次がクラス A (光感受性ロドプシン様) であり, さらにクラス B (セクレチン様), クラス C (グルタミン酸代謝系), クラス D (非正型 7TMR), そして

表-3 4種類の昆虫における嗅覚/味覚受容体遺伝子の数

遺伝子ファミリー	カイコ	キイロシヨウジョウバエ	ハマダラカ	ミツバチ
嗅覚受容体	64	62	79	170
味覚受容体	14	68	72	13
総数	78	130	151	183

その受容体が結合するリガンドが不明のオーファン GPCR に分類されている。クラス A, B, C, D ファミリーの数は上述の 4 種類の昆虫間ではほとんど同じであるが, 化学感覚受容体の数はカイコが最も少ない (表-3)。これはカイコでは嗅覚受容体に比べて味覚受容体が非常に少ないことによる。口絵①にカイコを含めた 4 種類の昆虫の化学感覚受容体の系統樹解析結果を示す。この解析から五つのカイコ特異的嗅覚受容体の clade が見いだされた (口絵①中の矢印)。他の昆虫に比べて化学感覚受容体の遺伝子数が少ないということはカイコが桑に特化していることによるのかもしれない。このことは系統樹解析でカイコ特異的嗅覚受容体の clade が見いだされていることから予想される。もしそうであれば, これらの化学感覚受容体はカイコゲノム中で, 少数の特定サイトでクラスター化していると予想される。そこでカイコの全化学感覚受容体遺伝子を 28 本染色体にマップしたところ, 予想に反して, カイコの化学感覚受容体遺伝子は多くの染色体上にバラバラに分布していた。一方, ショウジョウバエやハマダラカでは遺伝子重複によって形成された密なクラスターが存在する。また, 哺乳類の嗅覚遺伝子はさらに高密度のクラスターを形成することが知られている。また, クチクラタンパク質遺伝子のようなファミリー遺伝子 (FUTAHASHI et al., 2008 b) や, 大量の絹タンパク質合成のための特定 tRNA 遺伝子では, 遺伝子重複による密な遺伝子クラスターがカイコゲノム中で生じている (The International Silkworm Genome Consortium, 2008)。これらの事実は, カイコが桑に特化しているというよりは, カイコは自ら桑を求めて探しまわることなく完全に人の世話に依存していることや, 産卵場所を選ばずにどこでも産卵し, しかも 1 箇所すべての卵を産むという野生と異なる完全な家畜化の結果を表しているのかもしれない。

おわりに

本稿では, 植物との相互作用に議論をしほったが, その他の絹生産や複雑な変態等カイコの特徴的生物現象を生み出す巧妙なメカニズムもカイコゲノムから明らかに

なっている (The International Silkworm Genome Consortium, 2008)。このように、カイコゲノム解析を通じて、環境に適応するためにカイコがそのゲノムをいかに進化させ、特異的生命現象を生み出してきたかを明らかにすることが可能である。カイコの特異的生命現象が詳細に解明されることで、昆虫の環境適応戦略を逆手に取った新しい害虫防除法の研究が進むことを期待している。

引用文献

- 1) DAIMON, T. et al. (2008) : J. Biol. Chem. **283** : 15271 ~ 15278.
- 2) FUTAHASHI, R. et al. (2008 a) : Genetics **180** : 1995 ~ 2005.
- 3) ——— et al. (2008 b) : Insect Biochem. Mol. Biol. **38** : 1138 ~ 1146.
- 4) ITO, K. et al. (2008) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA **105** : 7523 ~ 7527.
- 5) ——— et al. (2009) : Insect Biochem. Mol. Biol. **39** : 287 ~ 293.
- 6) KONNO, K. et al. (2006) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA **103** : 1337 ~ 1341.
- 7) MENG, Y. et al. (2009) : J. Biol. Chem. **284** : 11698 ~ 11705.
- 8) MITA, K. et al. (2003) : Proc. Natl. Acad. Soc. USA **100** : 14121 ~ 14126.
- 9) ——— et al. (2004) : DNA Research **11** : 27 ~ 35.
- 10) ONO, Y. et al. (2005) : Gene **364** : 63 ~ 67.
- 11) OSANAI - FUTAHASHI, M. et al. (2008) : Insects Biochem. Mol. Biol. **38** : 1046 ~ 1057.
- 12) SARUDOH, T. et al. (2007) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA **104** : 8941 ~ 8946.
- 13) SUETSUGU, Y. et al. (2007) : BMC Genomics **8** : 314.
- 14) The International Silkworm Genome Consortium (2008) : Insect Biochem. Mol. Biol. **38** : 1036 ~ 1045.
- 15) UCHINO, K. et al. (2008) : Insect Biochem. Mol. Biol. **38** : 1165 ~ 1173.
- 16) YAMAMOTO, K. et al. (2006) : Genetics **173** : 151 ~ 161.
- 17) ——— et al. (2008) : Genome Biology **9** : R21.
- 18) XIA, Q. et al. (2004) : Science **306** : 1937 ~ 1940.

好評発売中

農薬取締法令・関連通達集

(社)日本植物防疫協会編 B5判 261ページ
 価格：1,050円(税込) 送料340円



<掲載内容>

農林水産省・環境省・厚生労働省関連の農薬に関する政令、省令、告示、関連通知、その他省令を網羅

- ・ 農薬取締法と関連の政・省令を見やすく2列に表示
- ・ 農薬関連の告示を取締法に関連付けてレイアウト
- ・ 関連する通知文およびその他関連法令(抄)も掲載

農業関係者必携の1冊です。