

たモデルシステムとなる可能性を示している。また、これらゲノム編集技術は、有用な形質をもつカイコを開発する上でも、きわめて強力な道具になってゆくと予想される⁷⁾。

IV. 眼色・卵色の研究における 遺伝子組換え技術の利用と展開

カイコの眼色と卵色は、主としてオモクローム系の色素によって作られている。眼色と卵色には、多様な遺伝的変異があり、古くから遺伝学的研究が蓄積されてきた。近年、ゲノム情報を用いたポジショナルクローニングや候補遺伝子の解析から、変異形質の遺伝子が次々と明らかになっている。また、胚期に性が判別できる限性黒卵や、遺伝子組換えカイコの原因系統として利用される第1白卵のように、実用上の有用形質となっているものも少なくない。第1白卵(*w-1*)の原因遺伝子がキヌレニン酸化酵素遺伝子(*BmKMO*)であること、第2白卵(*w-2*)と第3白卵の原因遺伝子が*Bm-w-2*と*Bmwh3*と名付けられたABCトランスポーターをコードする遺伝子であることが、いずれもトランスジェニック実験によって証明された^{8),9),10)}。これらの遺伝子は、形質の判別が容易であるばかりでなく、当代の卵色すなわち胚子期から早くも見分けられることから、組換えの際の形質転換マーカーとして有用であると考えられる。実際にこれらの遺伝子をマーカーとして利用するための研究も行われている。

白卵遺伝子のうち、*w-1*はオモクロームの合成に関わる酵素(*BmKMO*)をコードしているが、*w-2*と*w-3*は、互いに構造の似たABCトランスポーターをコードしている。*w-2*と*w-3*は、それぞれショウジョウバエの*scarlet*遺伝子(*st*)と*white*遺伝子(*w*)のオースログであり、ショウジョウバエでも、それらの遺伝子は複眼の色素顆粒へのオモクローム前駆体の取り込みを支配している。カイコでも*w-2*と*w-3*は卵の漿膜細胞や複眼の色素顆粒へのオモクローム前駆体の取り込みに必要であると考えられ、ショウジョウバエとカイコで機能がよく保存されている^{9),11)}。ABCトランスポーターは、大きなファミリーであるが、*white*サブファミリーに属するトランスポーターは、ショウジョウバエでは*white*、

scarlet、*brown*の3つだけである。カイコでは、*Bmwh3*と*Bm-w-2*以外の遺伝子が2つあり、ショウジョウバエよりも複雑である¹²⁾。これら機能未知の遺伝子の解析には、やはり遺伝子組換え技術が役に立つと思われる。

V. ウイルス抵抗性遺伝子の研究における 遺伝子組換え技術の利用と展開

カイコに感染するウイルスには多様なものがあるが、顕著な病徴を示すウイルスは、核多角体病ウイルス、細胞質多核体病ウイルス、濃核病ウイルス1型、同2型、伝染性軟化病ウイルス、の5種類である。いずれのウイルスでも宿主であるカイコの側の感受性には、品種間差異があることが知られており、それは遺伝子の作用による。特に品種間でのウイルス感受性に大きな変異が認められるのは、濃核病ウイルス1型(*BmDNV-1*)と濃核病ウイルス2型(*BmDNV-2*)である。これらのウイルスはパルボウイルス科に属する1本鎖DNAウイルスであり、いずれもカイコ幼虫中腸の円筒細胞の核内で増殖する特徴をもつ。*BmDNV-1*に対するカイコの感受性は、*nsd-1*(第21染色体)と*Nid*(第17染色体)の2遺伝子座に支配されるのに対し、*BmDNV-2*に対する感受性は、*nsd-2*(第17染色体)と*nsd-Z*(第15染色体)に支配されることが知られている。Itoら(2008)は、ポジショナルクローニング法で*nsd-2*遺伝子座を単離することに成功し、これがアミノ酸トランスポーター様の膜タンパク質をコードすることを明らかにした¹²⁾。実際に、原因遺伝子の野生型の対立遺伝子を、*piggyBac*ベクターを用いて*nsd-2/nsd-2*の非感受性個体に導入した結果、幼虫の中腸が、本来は感染しないはずの*BmDNV-2*ウイルスに感染することが判明し、ポジショナルクローニングで見いだした候補遺伝子が確かに原因遺伝子であることを証明した。昆虫のみならず、動物でもウイルス抵抗性の原因が単一遺伝子で決定される例は珍しく、まして遺伝子が単離、特定された例はほとんどない。ゲノム情報を利用したポジショナルクローニングと、遺伝子組換え技術を用いた遺伝子の機能証明を組み合わせることで目的が達成されたモデルケースであるといえる。

VI. 眠性変異体の研究における 遺伝子組換え技術の利用と展開

典型的なカイコ幼虫は4回の脱皮を経て最終齢となり、吐糸、営繭して蛹に変態する。しかし、品種や系統によっては、脱皮回数が4回でなく、2回、3回、5回、6回と変異することが知られている。また、同一の品種でも、温度や日長、餌条件などの影響で、脱皮回数が増えることがある。養蚕では脱皮期を「眠」と呼ぶので、幼虫の脱皮回数を「眠性」と称する。上記の眠性変異体のうち、2眠の形質を支配する遺伝子*mod*について、遺伝子組換え技術を用いた解析が行われているので紹介する。*mod*ホモ接合体は、3齢または4齢が最終齢となり、決して5齢になることなく蛹化する。Daimonら(2012)は、ゲノム情報を用いたポジショナルクローニングで、*mod*の原因遺伝子を特定することに成功した¹³⁾。*mod*がコードするタンパク質は、チトクロームP450ファミリーのメンバーであるCYP15C1をコードしていた。*in vitro*の実験の結果から、CYP15C1はファルネセン酸をエポキシ化する酵素であり、幼虫のアラタ体において幼若ホルモンが合成される際の重要な段階を触媒するものであることが明らかになった。piggyBacベクターによって、このCYP15C1遺伝子を*mod/mod*へ導入したところ、幼虫が4眠蚕となり、5齢まで成長してから蛹化した。この実験では、CYP15C1遺伝子をアラタ体で発現させるために、特殊なドライバー系統が用いられた。すなわち、アラタ体で酵母の転写因子GAL4を発現するような系統を用い、CYP15C1遺伝子の5'上流にGAL4に結合するシス配列であるUASをつないだ系統との間で、交配を行った。その結果、CYP15C1遺伝子が本来の正常なカイコと同様にアラタ体で特異的に発現し、*mod*の形質をレスキューすることができたのである¹³⁾。

ショウジョウバエや他のモデル昆虫では、脱皮回数の変異は、あまり存在せず、眠性はカイコ特有の形質であるといえる。何齢が最終齢になるか、言い換えれば変態のタイミングがいつになるか、どのような機構で決まっているのだろうか。この問題は、昆虫生理学で古くから研究されてきているが、未だに解決していない。

眠性遺伝子の解明は、昆虫の変態機構を知る上で重要な手がかりを与えてくれる。たとえば、*mod*のケースでは、実は*mod/mod*個体では幼若ホルモンがほとんど合成されておらず、これら個体では一生幼若ホルモン無しで成長、生殖をすることが分かった。従来、幼若ホルモンは脱皮ホルモン(エクジステロイド)と同じぐらい重要なホルモンであると考えられ、幼虫の間はその存在が必須なのであろうと考えられてきた。しかし、実際には幼若ホルモンが欠乏しても胚発生から幼虫の間の発生は、ほとんど問題なく進んでいたのである。もちろん、脱皮の回数が省略されてしまって小さな個体になるわけであるが、一定量の幼若ホルモンが発生や生存に必須ではないことは新発見である。そのような重要な発見が、ゲノム情報と遺伝子組換え技術の両者を活用することによってもたらされた。

VII. おわりに

カイコは、すでにゲノムの塩基配列が高精度で解読されており、また、長い遺伝学の歴史のなかで多くの突然変異体が発見され、モデル生物としての地位を築いている。同じ昆虫のキロショウジョウバエに比べると、得られている変異体の形質に特徴があり、本稿で述べたような眠性や耐病性のようなカイコ特有の形質もある。一方で、中国で約6000年、日本で約2000年の養蚕の歴史があり、今もなおカイコは重要な農業生物、経済昆虫でもある。本稿で述べたとおり、遺伝子の塩基配列と形質をつなぐには、遺伝子組換え技術やゲノム編集技術は不可欠の手法である。

表1に、今までにカイコでポジショナルクローニングなどの方法で単離された形質遺伝子をリストアップしてみた。そのうち、トランスジェニック技術によって遺伝子機能が検証されたものは、必ずしも多くない。しかし、今後の遺伝子研究ではトランスジェニック技術のみならず、TALENやCRISPRなどを用いたゲノム編集が当たり前のように使われることになるだろうと想像される。また、これらの技術を用いれば、従来のように変異体が得られていなくても、遺伝子と形質の関係を解明できるようになるので、研究戦略を大きく変えることになるだろう。カ

生物試料分析

表1 カイコのゲノム情報からポジショナルクローニングまたは候補遺伝子のクローニングを経て単離された変異体の原因遺伝子（主要なもの）

遺伝子	染色体	形質	原著論文	遺伝子組換えによる証明
<i>os</i>	1	伴性油	Kiuchi et al. (2011) Insect Biochem Mol Biol.	
<i>sch</i>	1	伴性赤蟻	Liu et al. (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. USA.	
<i>od</i>	1	d油	Fujii et al. (2008) Insect Biochem. Mol. Biol.	○
<i>Md</i>	1	飛翔筋不全	Fujii et al. (2007) Genetica	
<i>Vg</i>	1	痕跡翅	Fujii et al. (2008) Insect Biochem. Mol. Biol.	
<i>spli</i>	1	エスプリ	Fujii et al. (2011) Proc. Natl. Acad. Sci. USA.	
<i>Y</i>	2	黄血	Tsuchida et al. (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. USA.	
<i>lem</i>	3	黄体色	Meng et al. (2009) J. Biol. Chem.	
<i>L</i>	4	褐円	Yamaguchi et al. (2013) Nat Commun.	
<i>al</i>	5	アルビノ	Fujii et al. (2013) Insect Biochem. Mol. Biol.	
<i>ok</i>	5	金鶏竜油	Wang et al. (2013) Insect Biochem. Mol. Biol.	
<i>re</i>	5	赤卵	Osanai-Futahashi et al. (2013) J. Biol. Chem.	○
<i>E</i>	6	過剰肢	Ueno et al. (1992) Development	
<i>Nc</i>	6	無半月紋	Nagata et al. (1996) Genes Cells	
<i>Gb</i>	7	緑繭-b	Daimon et al. (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. USA.	
<i>fl</i>	10	無翅	Sato et al. (2008) Genetics	
<i>w-1</i>	10	第1白卵	Quan et al. (2007) Insect Sci.	○
<i>w-2</i>	10	第2白卵	Tatematsu et al. (2012) Genes Cells Abraham et al. (2000) Mol Gen Genet	○
<i>w-3</i>	10	第3白卵	Kobayashi et al. (2010) J. Insect Biotech. Sericol.	○
<i>mod</i>	11	2眠	Daimon et al. (2012) PLoS Genet.	○
<i>C</i>	12	外層黄繭	Sakudoh et al. (2013) J.Lipid Res.	○
<i>oq</i>	12	q油	Komoto (2002) Insect Biochem. Mol. Biol.	
<i>ch</i>	13	赤蟻	Futahashi et al. (2008) Genetics	
<i>oa</i>	14	青熟油	Fujii et al. (2013) Genetica	
<i>cts</i>	16	頬尾斑 スクラーゼ アイソザイム	Ito et al. (2012) Genome	
<i>Suc-1</i>	17	ワクジー油	Daimon et al. (2008) J. Biol. Chem.	
<i>ow</i>	17	褐頭尾斑	Ito et al. (2009) Insect Biochem. Mol. Biol.	
<i>bts</i>	17	濃核病2型	Ito et al. (2010) J. Biol. Chem.	
<i>nsd-2</i>	17	非罹患性	Ito et al. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. USA.	○
<i>nm-g</i>	17	光沢不眠蚕	Niwa et al. (2010) Development	
<i>mln</i>	18	暗化型	Dai et al. (2010) J. Biol. Chem.	
<i>vit</i>	20	白妙卵	Lin et al. (2013) J. Biol. Chem.	
<i>ov</i>	20	ヴァル斑油	Wang et al. (2013) Genome	
<i>rb</i>	21	赤血	Meng et al. (2008) Genes Cells	
<i>sku</i>	21	臭蚕	Urano et al. (2010) FEBS J.	
<i>so</i>	26	煤蚕 ジアロアス	Futahashi et al. (2008) Genetics	
<i>og</i>	9	コリ油	Komoto et al. (2003) Insect Biochem. Mol. Biol.	

イコの研究の歴史のなかで積み重ねられた知識と、新たな技術が融合し、カイコの新しい生物学を開拓するとともに、その基礎研究の成果が、カイコを用いた有用物質生産や、新たな繊維・新素材の開発などの応用研究につながることを願っている。

文献

- 1) Tamura T, Thibert C, Royer C, Kanda T, Abraham E, Kamba M, Komoto N, Thomas JL, Mauchamp B, Chavancy G, Shirk P, Fraser M, Prudhomme JC, Couble P: Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a piggyBac transposon-derived vector. *Nat Biotechnol*, 18: 81-84, 2000.
- 2) International Silkworm Genome Consortium: The genome of a lepidopteran model insect, the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol*, 38: 1036-1045, 2008.
- 3) Fujii T, Abe H, Katsuma S, Mita K, and Shimada T: Mapping of sex-linked genes onto the genome sequence using various aberrations of the Z chromosome in *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol*, 38: 1072-1079, 2008.
- 4) Fujii T, Daimon T, Uchino K, Banno Y, Katsuma S, Sezutsu H, Tamura T, and Shimada T: Transgenic analysis of the *BmBLOS2* gene that governs the translucency of the larval integument of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Mol Biol*, 19: 659-667, 2010.
- 5) Takasu Y, Kobayashi I, Beumer K, Uchino K, Sezutsu H, Sajwan S, Carroll D, Tamura T, Zurovec M: Targeted mutagenesis in the silkworm *Bombyx mori* using zinc finger nuclease mRNA injection. *Insect Biochem Mol Biol*, 40: 759-765, 2010.
- 6) Takasu Y, Sajwan S, Daimon T, Osanai-Futahashi M, Uchino K, Sezutsu H, Tamura T, and Zurovec M: Efficient TALEN construction for *Bombyx mori* gene targeting. *PLoS One*. 8: e73458, 2013.
- 7) Daimon T, Kiuchi T, and Takasu Y: Recent progress in genome engineering techniques in the silkworm, *Bombyx mori*. *Dev Growth Differ*, 56: 14-25, 2014.
- 8) Quan G-X, Kobayashi I, Kojima K, Uchino K, Kanda T, Sezutsu H, Shimada T, and Tamura T: Rescue of *white egg 1* mutant by introduction of the wild-type *Bombyx* kynurenine 3-monooxygenase gene. *Insect Sci*, 14: 85-92, 2007.
- 9) Tatematsu K, Yamamoto K, Uchino K, Narukawa J, Iizuka T, Banno Y, Katsuma S, Shimada T, Tamura T, Sezutsu H, and Daimon T: Positional cloning of silkworm white egg 2 (*w-2*) locus reveals functional conservation and diversification of ABC transporters for pigmentation in insects. *Genes Cells*, 16: 331-342, 2011.
- 10) Kobayashi I, Uchino K, Iizuka T, Tatematsu KI, Yonemura N, Sezutsu H, and Tamura T: Rescue of the Aojuku white-egg translucent (*w-3^h*) *Bombyx mori* mutant by transgenic expression of the wild-type *Bmwh3* gene. *J. Insect Biotechnol. Sericol*, 79: 111-116, 2010.
- 11) Abraham EG, Sezutsu H, Kanda T, Sugasaki T, Shimada T, and Tamura T: Identification and characterisation of a silkworm ABC transporter gene homologous to *Drosophila white*. *Mol Gen Genet*, 264: 11-19, 2000.
- 12) Wang L, Kiuchi T, Fujii T, Daimon T, Li M, Banno Y, Kikuta S, Kikawada T, Katsuma S, and Shimada T: Mutation of a novel ABC transporter gene is responsible for the failure to incorporate uric acid in the epidermis of *ok* mutants of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 43: 562-571. 2013.
- 13) Ito K, Kidokoro K, Sezutsu H, Nohata N, Yamamoto K, Kobayashi I, Uchino K, Kalyebi A, Eguchi R, Hara W, Tamura T, Katsuma S, Shimada T, Mita K, and Kadono-Okuda K: Deletion of a gene encoding an amino acid transporter in the midgut membrane causes resistance to a *Bombyx* parvo-like virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 7523-7527, 2008.
- 14) Daimon T, Kozaki T, Niwa R, Kobayashi I, Furuta K, Namiki T, Uchino K, Banno Y, Katsuma S, Tamura T, Mita K, Sezutsu H, Nakayama M, Itoyama K, Shimada T, and Shinoda T: Precocious metamorphosis in the juvenile hormone-deficient mutant of the silkworm, *Bombyx mori*. *PLoS Genet*, 8: e1002486, 2012.