

平成30年6月20日現在

機関番号：12101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26850220

研究課題名(和文) カイコ卵色変異系体の解析による昆虫の新規色素合成経路の解明

研究課題名(英文) Investigation for novel ommochrome pigmentation genes based on silkworm egg and eye color mutants

研究代表者

二橋 美瑞子(長内美瑞子)(Futahashi, Mizuko)

茨城大学・理学部・准教授

研究者番号：00422402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：オモクローム色素は、様々な昆虫で赤・紫・茶などの体色を生み出し、複眼の遮蔽色素としても広く分布している、昆虫の主要な色素である。本研究では、オモクローム色素の生合成経路の後半のブラックボックスの解明のため、カイコの卵色変異体を解析した。その結果、淡赤眼白卵変異体*pe*については原因遺伝子*cardinal*の同定に成功し、色素の解析から、*cardinal*遺伝子はこれまでの想定以上に多様な種類のオモクローム色素の合成に関与していることが示された。褐卵変異体*b-2*(第二褐卵)、*b-4*(第四褐卵)、*b-t*(辻田褐卵)については、ゲノム上の責任領域を絞り込み、*b-4*と*b-t*については新たな形質を見出した。

研究成果の概要(英文)：Ommochromes are major group of insect pigments which contribute to red, purple, brown body coloration and also known as screening pigments of ommatidia. However, molecular mechanisms of the synthesis of these pigments have not been fully understood. We found that *Bombyx mori* *cardinal* gene encoding a haem peroxidase was responsible for the pink-eyed white egg mutation, *pe*. Eggs and eyes of *pe* mutant have a very small amount of pigments, due to defect in converting the precursor 3-hydroxykynurenine into various ommochrome pigments, suggesting the function of *cardinal* as a key synthesis enzyme for multiple ommochrome pigments. We also conducted linkage analyses for three egg color mutants; brown egg 2 (*b-2*), brown egg 4 (*b-4*), and maternal brown of tsujita (*b-t*) by ddRADseq, and found novel characteristics for *b-4* and *b-t* mutants.

研究分野：昆虫分子生物学

キーワード：昆虫 色素 オモクローム カイコ

1. 研究開始当初の背景

オモクローム系色素は、ほとんどの昆虫の赤、茶、紫の体色に関わっており、擬態や婚姻色、さらには眼の遮蔽色素など多彩な生物機能に関与している。オモクローム系色素の合成や輸送に関わる遺伝子は主にショウジョウバエの複眼の色の変異体を用いて研究が進められてきたが、合成経路の後半に関わる遺伝子はほとんど同定されていなかった。その一因が、ショウジョウバエの複眼に存在するオモクローム色素の構成が他の昆虫よりも単純で、ショウジョウバエの複眼に存在しない色素が他の昆虫で利用されていることにあることが考えられた。例えば、カイコの卵色眼色変異体「赤卵 (red egg, *re*)」の原因遺伝子は、ショウジョウバエには存在しない新規なトランスポーター遺伝子で、ショウジョウバエ以外のほぼすべての昆虫に存在するオモクローム系の紫色の色素オミンの合成に必須であることが研究代表者の二橋らにより明らかになっていった (Osanai-Futahashi et al., 2012 JBC)。カイコでは、*re* 変異体のように、オモクローム系色素の合成の後半に関わると考えられる変異体が複数存在する。そのため、これらの未解明のカイコの卵色変異体の原因遺伝子の解明により、昆虫の主要な色素であるオモクロームの生合成経路後半のブラックボックスを明らかにできることが期待された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、昆虫の3大色素の1つであり、体色や紋様に大きく寄与するオモクローム系色素の合成について新たなパラダイムを構築するため、原因遺伝子が未解明のカイコの卵色変異体のうち、オモクローム色素の合成経路の後半に異常があると予想される、*b-2* (*brown egg 2*、第二褐卵)、*b-4* (*brown egg 4*、第四褐卵)、*b-t* (*maternal brown of tsujita*、辻田褐卵)、*l-br* (*lethal brown*)、*pe* (*pink-eyed white egg*、淡赤眼白卵)の原因遺伝子の同定を目指す。また、明らかにした原因遺伝子について、コクヌストモドキなどほかの昆虫を用いたホモログの解析を行うことにより、オモクローム合成経路の昆虫種間の相違について洞察を得る。

3. 研究の方法

カイコの卵色変異体 *b-2*、*b-4*、*b-t* については、古典的な連鎖地図があるのみであった。そこで、ゲノム上の責任領域を絞り込むため、次世代シーケンサーを利用した ddRADseq 法により、連鎖解析を行った。また、ゲノムの責任領域内から候補遺伝子を絞り込むために *pe*、*b-2*、*b-4*、*b-t* について、着色時期の卵および5齢幼虫の卵巣で RNAseq 解析を行った。RNAseq データを参考に、*pe* と、本研究によりゲノムの責任領域を 715 kb に絞り込むことが出来た *b-4* については、責任領域内の候補遺伝子について TALEN による遺伝子

ノックアウト解析を行った。*pe* については、TALEN によるノックアウト解析で変異体の表現型が再現された遺伝子について、コクヌストモドキでオースログ遺伝子の RNAi によるノックダウン実験を行った。また、野生型、*pe* 変異体、ノックアウト個体の複眼の色素組成を解析し、比較するために、薄層クロマトグラフィーと LC-MS 解析を行った。

4. 研究成果

(1) カイコ淡赤眼白卵 (*pe*) 変異体の原因遺伝子の同定:

連鎖解析により、*pe* の責任領域は 5 番染色体の 257 kb に絞り込まれていたが、遺伝子機能解析を行う候補遺伝子を絞り込むために、野生型系統で卵が着色するステージにおいて、野生型 (*p50T*, *C108*) と *pe* (*e20* 系統) を用いて、RNAseq 解析を行った。その結果、連鎖解析の絞り込み領域内に *pe* 特異的なアミノ酸置換を持つ遺伝子 (*Bm-cardinal*) の存在が判明した。そこで、この *Bm-cardinal* について、embryonic RNAi によるノックダウン実験および産下 4-8 時間後の卵への TALEN mRNA の注入によるノックアウト実験を行ったところ、*pe* と同様の卵色・眼色が再現された。成虫複眼における局所的 RNAi 実験でも *pe* 変異体の複眼色が再現された (図 1)。さらに、遺伝学的解析や、幼虫皮膚における局所的な RNAi でも、*pe* 変異体もしくは *Bm-cardinal* の抑制で黒縞系統の幼虫の赤い斑紋が生じなくなることが明らかとなった。最終的には、*Bm-cardinal* のノックアウト個体と既存の *pe* 変異体との相補性試験により、*Bm-cardinal* が *pe* の原因遺伝子であることが証明された。これまで *cardinal* 遺伝子は、キイロショウジョウバエの変異体の表現型から 3 ヒドロキシキヌレンニンからキサントマチンの合成で働く酵素であると考えられてきたが、キサントマチンの他にオミンなど複数のオモクローム色素が含まれるカイコの複眼や卵において、変異体や *Bm-cardinal* のノックアウト個体において、全般的に色素合成が抑制されることから、*cardinal* がキサントマチン以外の多様な色素の合成に関与していることが示唆された。



図 1 TALEN による *Bm-cardinal* 遺伝子のノックアウト処理を行った G0 世代のカイコ。*Bm-cardinal* がホモ接合型でノックアウトされた細胞が赤くなっている。

(2) 甲虫コクヌストモドキにおける *pe* 遺伝子オースログの機能の解明:

昆虫全般における *cardinal* 遺伝子の機能を調べるために、甲虫コクヌストモドキにお

いてオーソログ遺伝子の RNAi によるノックダウン実験を行ったところ、野生型では複眼が黒く着色している蛹 4 日目において、RNAi 個体では複眼は着色していなかった。また、羽化直後の RNAi 個体は、複眼の色が大変薄い、1 日後には羽化直後のカイコと同様に複眼が赤くなった。このことから、*cardinal* 遺伝子は、コクヌストモドキにおいてもカイコと同様に複眼のオモクローム色素合成に必要であり、機能抑制により複眼が赤くなることが判明した。また、コクヌストモドキでは成虫の複眼色素の合成がカイコよりも羽化のタイミングに近いこと、*Tc-cardinal* RNAi 個体では羽化後自然酸化により少量の色素が合成されている可能性が示唆された。

(3) 野生型カイコと *pe* の複眼色素成分の解析：

野生型と *pe* の複眼色素組成の解明と比較のため、複眼色素抽出物の薄層クロマトグラフィおよび LC-MS 解析を行った。*pe* ではオミン様物質、キサントマチン、脱炭酸型キサントマチン等、色素全般が著しく減少していることが判明し、*cardinal* 遺伝子はキロシヨウジョウバエの変異体から想定された以上に多くの種類の色素の合成に関与していることが裏付けられた。以上の一連の成果については 2017 年の *Heredity* 誌で報告するとともに、総説や招待講演等で紹介した。

(4) *b-2* (*brown egg 2*、第二褐卵)、*b-4* (*brown egg 4*、第四褐卵)、*b-t* (*maternal brown of tsujita*、辻田褐卵) 変異体の ddRADseq を用いたゲノム上の責任領域の絞り込み：

3 種類の独立な褐卵変異体 *b-2*(第二褐卵)、*b-4*(第四褐卵)、*b-t*(辻田褐卵)のゲノム上の責任領域を絞り込むために、交配により BF1 (戻し交配第一世代) 個体を作成し、各 96 個体のゲノムを用いて、次世代シーケンサーを利用した連鎖解析 ddRAD-seq を行った。その結果、*b-2* は 6 番染色体の約 1.7 Mb、*b-4* は 20 番染色体の 715 kb、*b-t* は 13 番染色体の 2.5 Mb に責任領域が絞り込まれた。また、着色時期の卵と卵巣について RNAseq によるトランスクリプトーム解析を行った。

b-4、*b-t* については、ddRAD-seq の絞り込み領域内に検出された変異体特異的な非同義置換を持つ遺伝子のうち、3 つの遺伝子について TALEN による遺伝子ノックアウト個体の作出を行ったが、変異体と同じ表現型は得られなかったため、原因遺伝子は他に存在することが示唆された。

一方で、*b-4* 変異体の特徴の確認のため、表現型の観察と色素の解析を行ったところ、予想外に、データベースの情報とは異なり複眼では野生型との間で色および色素に差を見出すことはできなかったが、神経節においては、顕著に着色が抑制され、色素量も少ないという特徴があることが判明した。*b-t* に

ついても神経節の色が野生型よりも薄く、複眼抽出物の吸光スペクトルが野生型よりも低いという結果が得られた。

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 4 件)

Enomoto R et al., (Futahashi M は著者 21 人中 19 番目) (2017)

A novel partial agonist of GPBA reduces blood glucose level in a murine glucose tolerance test.

European Journal of Pharmacology 814: 130-137 DOI:10.1016/j.ejphar.2017.08.017 (査読あり)

二橋美瑞子・二橋亮 (2016)

RNAseq から明らかになった昆虫の色素合成と色覚の新知見。

化学と生物 第 54 巻・第 6 号・631 号: 422-428. https://www.jstage.jst.go.jp/article/kagakutoseibutsu/54/6/54_422/_article/-char/ja/ (査読あり)

*Osanai-Futahashi M, Tatematsu K, Futahashi R, Narukawa J, Takasu Y, Kayukawa T, Shinoda T, Ishige T, Yajima S, Tamura T, Yamamoto K, *Sezutsu H. (2016) Positional cloning of *Bombyx* pink eyed white egg locus reveals the major role of *cardinal* in ommochrome synthesis. *Heredity* 116:135-145. DOI:10.1038/hdy.2015.74 (査読あり)

Mun S, Noh MY, Osanai-Futahashi M, Muthukrishnan S, Kramer KJ, Arakane Y. (2014) A Major Facilitator Superfamily protein encoded by *TcMuck* gene is not required for cuticle pigmentation, growth and development in *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 49:43-48 DOI:10.1016/j.ibmb.2014.03.007 (査読あり)

[学会発表](計 7 件)

二橋美瑞子 (2018) カイコ変異体を用いた昆虫の新規体色関連遺伝子の探索. 第 62 回日本応用動物昆虫学会鹿児島大会、平成 30 年 3 月 27 日、鹿児島大学(招待講演)

坂寄和哉・二橋亮・坪田拓也・飯塚哲也・山本公子・瀬筒秀樹・二橋美瑞子 (2018) カイコ変異体優性赤蟻 *la* における濃色メラニンの着色抑制メカニズム. 平成 30 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会、平成 30 年 3 月 20 日、名古屋大学

二橋美瑞子、坂寄和哉、二橋亮、坪田拓也、
瀬筒秀樹、飯塚哲也、内山博允、矢嶋俊介
(2017)カイコの優性変異体 *1a* における濃
色メラニンの着色抑制メカニズム . 日本動物
学会第 88 回富山大会、平成 29 年 9 月 21 日、
富山県民会館

二橋美瑞子・松崎将平・立松謙一郎・二橋
亮・高須陽子・粥川琢巳・石毛太一郎・内山
博允・矢嶋俊介・内野恵郎・田村俊樹・篠田
徹郎・山本公子・瀬筒秀樹 (2017) カイコの
オモクローム変異体淡赤眼白卵 (*pe*) と第四
褐卵 (b-4) の解析 . 平成 29 年度蚕糸・昆虫機
能利用学術講演会、平成 29 年 3 月 21 日、つ
くば

Mizuko Osanai-Futahashi, Shohei
Matsuzaki, Ken-ichiro Tatematsu, Ryo
Futahashi, Yoko Takasu, Taichiro Ishige,
Hironobu Uchiyama, Shunsuke Yajima,
Hideki Sezutsu (2016) Investigation for
novel ommochrome pigmentation genes based
on silkworm egg and eye color mutants. The
87th meeting of Zoological Society of Japan

二橋美瑞子、立松謙一郎、二橋亮、高須陽
子、粥川琢巳、山本公子、田村俊樹、篠田
徹郎、山本公子、瀬筒秀樹 (2015) カイコ着
色変異体から得られたオモクローム色素合
成の新知見 . 日本動物学会第 86 回新潟大会

二橋美瑞子、立松謙一郎、二橋亮、高須陽
子、粥川琢巳、石毛太一郎、矢嶋俊介、田村
俊樹、山本公子、瀬筒秀樹 (2014) TALEN を
用いたゲノム編集によるオモクローム系色
素合成経路の解明 . 第 37 回日本分子生物学
会年会、2014 年 11 月 25 日

〔図書〕(計 1 件)

二橋美瑞子、二橋亮 (2015)
昆虫の体色・模様の形成に関わる分子機構 .
「色素細胞」第 2 版 (慶應義塾大学出版会)
pp.172-191 (分担執筆)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

二橋 美瑞子 (FUTAHASHI MIZUKO)

茨城大学・理学部・准教授

研究者番号 : 00422402