

NIAS シンポジウム

「ポストゲノム時代の害虫防除研究のあり方」
第3回 -カイコから害虫ゲノムへの展開-

講演要旨集

平成 22 年 9 月 10 日(金)

秋葉原コンベンションホール 5B 会議室

主催：(独) 農業生物資源研究所

はじめに

カイコは産業上の重要な昆虫であるとともに、大きな被害をもたらす鱗翅目農業害虫のモデル生物でもあります。農業生物資源研究所では、カイコゲノム研究を推進し、全ゲノム塩基配列情報、連鎖地図、BAC 物理地図、発現遺伝子情報等が統合されたデータベースの整備を進めて、データの利用が可能になっています。また、国外においてはアブラムシや寄生蜂など農業上重要な昆虫種のゲノム解読も行われています。以上のような状況を背景にして、カイコおよび他種昆虫のゲノム情報の活用による、環境負荷の低い新しい害虫防除手法の実現の可能性が急速に高まっています。

そこで、独法、大学、県、民間に所属する研究者が、それぞれの立場で情報の提供と収集を行い、害虫防除に関わる農業現場のニーズ、社会的ニーズ、技術的ニーズ及びシーズを相互に把握し、ゲノム情報から害虫防除の実現に至る研究開発の道筋を検討することを目的に、昨年に引き続き、今回3回目のシンポジウムを開催致します。

プログラム・目次

- 10 : 00 - 10 : 10 開会挨拶
- 10 : 10 - 10 : 45 「中国における昆虫ゲノム研究の現状」
農業生物資源研究所 塩月 孝博 …… 1
- 10 : 45 - 11 : 30 「比較ゲノムから見えてきた昆虫の神経ペプチド関連遺伝子群の
特徴と害虫防除への利用展望」
農業生物資源研究所 田中 良明 …… 7
- 11 : 30 - 13 : 00 昼 食
- 13 : 00 - 13 : 45 「共生微生物を利用した害虫制御：概念、実践、展望について」
産業技術総合研究所 深津 武馬 …… 13
- 13 : 45 - 14 : 30 「昆虫脱皮ホルモン生合成酵素の昆虫制御剤ターゲットとしての
可能性」
筑波大学 丹羽 隆介 …… 15
- 14 : 30 - 14 : 50 休 憩
- 14 : 50 - 15 : 35 「チョウ目害虫とカイコのゲノム構造の類似性」
農業生物資源研究所 瀬筒 秀樹 …… 21
- 15 : 35 - 16 : 20 「カイコゲノム情報統合データベース KAIKObase
ー 完全長 cDNA 配列に基づくゲノムアノテーション ー」
農業生物資源研究所 末次 克行 …… 27
- 16 : 20 - 17 : 00 総合討論
- 17 : 00 - 17 : 10 閉会挨拶
- 18 : 00 - 20 : 00 交流会

中国における昆虫ゲノム研究の現状

(独) 農業生物資源研究所 制御剤標的遺伝子研究ユニット

塩月 孝博

はじめに

昆虫のゲノム解読は、キイロショウジョウバエに始まり、ハエ目のネッタイシマカ、ガンビエハマダラカ、ハチ目のセイヨウミツバチ、甲虫目のコクヌストモドキで、チョウ目の中ではカイコのゲノムが日本と中国の共力によって解読されデータベースが整備された¹⁾。さらに2010年になり、ハチ目のキョウソヤドリコバチ、カメムシ目のエンドウヒゲナガアブラムシのゲノム解読完了が発表されている。その中でカイコは、以前から非常に高いタンパク質生産能を持つことを利用した有用物質の生産が試みられてきており、遺伝子組換え技術の確立によって、さらにそのカイコゲノム情報に基づいた物質生産への応用が進められている。また、チョウ目害虫防除のためにもカイコゲノム情報は有用である。このようにカイコゲノム解読は極めて波及効果の大きな業績であるものの、さらなる発展を見据えた研究が必要となってきた。

その状況から、日中農業科学技術交流グループ会議に基づく「カイコおよび他の昆虫におけるポストゲノム研究のあり方についての調査」が企画され、当研究所の梶原英之博士とともに平成22年1月5日から13日に、考察団の一員として派遣された。今後のポストゲノム研究、あるいはゲノム情報を利用した研究がいかに中国で行われつつあるか、また、日本との国際共同研究は可能か、などの諸問題について視察し、意見交換することを目的とした。その視察調査の概要について報告する。

昆虫ゲノム研究

中国において最も重要なカイコゲノムの研究拠点は、重慶にある西南大学のXia教授のグループである。日中共同でカイコの全ゲノム構造決定を発表した際の中国側の主体である。その際に使用した品種はp50の一系統であったが、すぐさま40にも及ぶ品種のゲノム構造を追って決定し、*Science* 誌に論文発表した²⁾。これには中国科学院深圳華大基因研究院が関係している。詳しいデータはまだ解析中だと思われるが、品種の成り立ちなど、バイオインフォマティクスの見地からもその重要性が伺われる。Xia教授の研究グループは約20人を越える正規スタッフとポストドクがおり、さらに驚くべきことに、180人を越すマスターコースおよびドクターコースの院生を抱えているとのことだった。この規模は日本では小さな学部の

学生数よりも多い。彼らが毎日実験を行うのを賄う研究費を十分に確保していることも驚きである。

さて中国におけるゲノム研究に多大な貢献をしているのは、中国科学院深圳華大基因研究院である。深圳市は約30年前に経済特区として製造業を中心に発達し、現在ではIT産業や証券取引においても発展している都市である。華大基因研究院も工業団地の中にあった。12階建てのビルに職員は約800人で、支所を含めると1000人程度の所員を抱え、現在もさらに増員中ということであった。何より、この平均年齢は26才と、若く活気がある印象を受けた。研究所長は海外を飛び回っているため会うことはできず、説明を受けた副部長は30才前後であった。800人の職員のうち、生物学研究者は1/3程度しかおらず、あとの1/3はバイオインフォマティクス、そして残りの1/3は全く生物とは関係ないコンピュータ科学者であった。このように各分野のエキスパートを擁して、高度に効率化かつ組織化され運営されていた。ゲノム解析の部署では、次世代型シーケンサ30台が稼働中で、新たに70台導入され100台規模になる計画で、世界最大級であることは間違いない。40品種にのぼるカイコゲノム再解析の際、Xia教授の研究室とともに、この設備を使って約8ヶ月で完了していた。この研究院では、ゲノムの配列決定のみに特化しており、cDNAのシーケンスすら行っていないとのことであった。マウスやヒトのゲノムは国際コンソーシアムとして組織的に解読されたが、その後はシーケンサの発達により、実際には莫大な研究費を注ぎ込める中国の独擅場となっており、欧米においても論文数も少なくなっているのが現状である。この研究院において解読の対象としているのは、作物・家畜など産業関係が主で、カイコやミツバチは、ウシ、ブタなどと並び「経済動物」として位置づけられていた。また中国らしく、ジャイアントパンダや牡蠣のゲノム配列の解析なども完了しており、現在はコムギを解析中であるとのことだった。壁には完了した生物種のリストに加え、今後の計画として1000生物種解読という壮大な目標が掲示され、所員全員がその目標に向かって一日に約14時間は働いているとのことだった。医学分野では、アジア系を中心とする世界1000民族のヒトゲノム解析例や、ヒトの遺伝病、あるいは出生前診断への応用研究も紹介されていた。この研究院におけるゲノム解析を行う次の昆虫のターゲットを尋ねたところ、孤独相／集団相などの個体の表現型が異なる相変異を持つバッタが予定されていると聞いた。

プロテオーム研究

昆虫分野でのプロテオーム研究では、中国では第一人者である浙江大学のZhong教授を、今回の視察調査で最初に訪問した。彼らのグループにおけるプロテオーム解析では、一般的な二次元電気泳動後のスポットのプロテアーゼ消化に

よる内部アミノ酸配列の解析に加えて、ショットガン法による配列解析を行っている例を紹介していた³⁾。この方法により実際に各種組織のタンパク質の分析が可能であった。本法の特徴としては、従来の二次元電気泳動で分けられたスポットを分析するよりも、非常に能率良く分析を行うことができる点に特徴がある。実際、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動によって泳動されたものをそのまま6等分し、色々なタンパク質が混じったままトリプシン処理を行っていた。質量分析には、大学内のナノテク研究センターに設置の最新装置であるナノフロー高速液体クロマトグラフィーとオンラインで接続されたナノスプレータイプをインターフェイスとするイオントラップ・フーリエ変換型質量分析装置(LTQ-orbital)を使って分析していた。従来の機種よりも100倍以上の感度と質量精度を持つため、蛍光染色でしか検出できないものも分析することができる。高性能のため、学内からの分析依頼が絶えず、常に順番待ちとのことであった。このナノテク研究センターには、分析機器が集められ、集中管理するとともに、専門のオペレーターが置かれ、常に良好な状態で稼働できる状態に維持されることで他の研究者の効率性・利便性を向上させていた。

遺伝子機能研究

広州市の華南師範大学では、昆虫の遺伝子機能解析を行っているFeng教授を訪ねた。この研究室ではチョウ目の森林害虫と農業害虫を対象とし、主に昆虫の中腸の研究を行っている。2008年には当大学で昆虫の中腸研究に関する国際シンポジウムを開催している。害虫だけでなく、チョウ目昆虫のモデルとしてカイコも用いており西南大学Xia教授とも共同研究を行っている。カナダの森林科学研究所に在籍していた頃からの研究の延長として、中腸で特異的に発現している遺伝子の機能と発現制御について精緻な解析を行っていた。特にタバコガ中腸を由来とする4600ESTクローンを作製し、成果を上げていた⁴⁾。

一方、上海近郊の鎮江市にある中国農業科学院蚕業研究所では、所員研究者が行ったRNAi法による機能解析の紹介があった。一般に、チョウ目昆虫の幼虫期のRNAiは、これまでにはほとんど成功例がないため、ここで実際に形態的变化まで誘導できた素晴らしい結果で、論文発表されていた⁵⁾。ターゲットにした遺伝子はアポトーシスに関与することが知られているプロテアーゼの一種のカテプシンDである。RNAi法によってその遺伝子の発現を抑制したところ、蛹へ変態せず、幼虫に近い形態のまま保っている様子が観察された。実験方法は、約2ngの二重鎖RNAを毎日、幼虫腹部への反復注射していた。注入量としては少ないが、毎日、連続して注射することによって持続的なRNAiの効果を発揮できたのではないかと推察される。

上海植物生理生態研究所には、その中に大きな昆虫研究グループがあり、脂肪体の研究や昆虫ホルモン研究者が、カイコゲノム情報を利用して遺伝子機能研究を行っていた。

蚕糸研究

杭州市郊外にある浙江理工大学生命科学院は、元来、蚕糸研究を行う機関が6年前に浙江理工大学の内部組織となり、本地に移転したとのことであった。ここで行われていた中で特筆すべき研究は、カイコを使った有用物質の生産である。数々の有用物質の生産を試みており、それらについてリストとして紹介していた。その内いくつかについてはもう臨床検査に向かう段階のものもあった。日本とは医薬品についての許認可制度が異なるためとはいえ、中国ではこれほどスムーズに早いスピードで臨床試験に進み医薬品の実用審査に向かっている現状は注目すべきことである。その中でも興味深かったのは、カイコを用いた新型インフルエンザ(H5N1)ワクチンの生産の試みである⁶⁾。周知の通り、インフルエンザワクチンは抗原となるウイルスの変異が激しく、一度作製したワクチンでも次の年には効果を示さないことがある。実際に臨床に使用できるところまで達成するかどうかは別として、この試みは非常にタイムリーであった。さらにこの研究では単純にウイルス表面タンパク質を発現させるのではなく、**fake-virus**としてそのまま使用する方法も模索していた。さらに、これらの有用物質を生産するための基本的なベクターについても開発していた。それらのベクターに対象遺伝子さえ載せれば、比較的スムーズに物資生産までたどりつけるシステムが確立されているようであった。加えて、ベンチャー企業との連携による実用化のための技術移転のプロセスが整っている印象があった。

前述の鎮江市にある中国農業科学院蚕業研究所は、国直轄の唯一の蚕糸関係の研究機関である。そのため独立した研究所を想定していたが、江蘇科学技術大学に組み込まれた組織となっていた。この研究所では、カイコの遺伝資源保存を重要な業務としており、国内で飼育されている主要なカイコ、および桑の品種の大部分はこの研究所で育成されたものである。敷地内には大きな飼育施設や広大な桑園を有し、夏季の3ヶ月には180人規模で雇用して一気に飼育を行っているとのことだった。中国においてもカイコ精子の凍結保存などは、まだ実用可能な状況に至っていない。地方(省)などには、それぞれ蚕糸関係の研究機関があるが、より現場に近い実際的な研究あるいは指導を行うのに対し、この研究所では各大学と連携して、基礎的な研究を行っている。

杭州市にある華南農業大学ではカイコの形質転換技術の確立を目指しており、その研究は端緒に着いたばかりであっても、その技術開発が開始されたことは確

かである。華南という言葉が示す通り、中国の南部であり、亜熱帯に属することもあり、バングラデシュなどから留学生を受け入れて国際研究協力も行っていった。

農業害虫研究

今回の視察調査はポストゲノム研究関連で訪問先を設定していたため、農業害虫関連の研究室訪問を予定していなかった。しかし、華南農業大学において、急遽、学内の害虫研究者を訪問する機会が与えられた。広州市は中国南部であり、水稲とバナナその他の亜熱帯性の作物を栽培しており、水稲ではコナガ、ニカメイガ、トビイロウンカが重要害虫ということだった。これまでの昆虫の分類を主要な研究とした研究から、現在は害虫の生物防除や昆虫免疫学研究へとシフトしていた。

研究環境

今回の視察で第一に感じたことは、総じて中国の研究者が若く元気なことであった。その要因は二つあり、中国の人口構成中に若年層が多いことと、研究費が莫大かつ重点配分されていることにあると思われた。若年層が多いということは学生数も多く、若い研究者も多いことにつながっている。また、社会構成の中で若者が多いため、それが経済活動を支え、景気の好循環につながっており、さらにそれが、国家予算の増大と大きな研究費配分額の確保へと至っている。加えて国家戦略として科学技術に投資する政策が取られ、いくつかの研究基金制度があり、その総額は毎年20~25%増加し、それに比例して研究者数も増加している。また海外で学位を取得しポスドク経験を積んだ研究者が戻ってきて、**Key Laboratory**として重点的に予算が割り当てられ、大きな成果を上げている。海外、特に欧米で訓練され、成果を上げているため、しっかりした計画と緻密な実験を行い、深い考察を伴う論文文化まで、欧米研究者に引けを取らない国際的に高いレベルの研究へ至っている。そうした研究者に潤沢な予算と施設が与えられ、学生・院生が集まっているので、同じ土俵で勝負しようにもなかなか太刀打ちできない。大学院終了後の若い研究者も海外でのポスドクが一般的になり、渡航先は欧米に集中し、日本は見向きされなくなっている。

昆虫ゲノム研究関連では、産業としての蚕糸業の基盤があるので、ゲノム情報や分子生物学の手法を取り入れた大きな勢いで研究が進んでいる。バキュロウイルスによるインフルエンザワクチンなどの物質生産や、トランスジェニックカイコによる新機能シルクなど、新展開に弾みがついている。その状況において、中国との共同研究や健全な競争をどう行うか、今後の大きな課題である。そのためにも、研究者レベルでの地道な交流継続の必要性を強く感じた。

<参考文献>

- 1) The genome of a lepidopteran model insect, the silkworm *Bombyx mori*, The International Silkworm Genome Consortium, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **38**, 1036-1045 (2008).
- 2) Complete resequencing of 40 genomes reveals domestication events and genes in silkworm (*Bombyx*), Xia Q, Guo Y, Zhang Z, Li D, Xuan Z, Li Z, Dai F, Li Y, Cheng D, Li R, Cheng T, Jiang T, Becquet C, Xu X, Liu C, Zha X, Fan W, Lin Y, Shen Y, Jiang L, Jensen J, Hellmann I, Tang S, Zhao P, Xu H, Yu C, Zhang G, Li J, Cao J, Liu S, He N, Zhou Y, Liu H, Zhao J, Ye C, Du Z, Pan G, Zhao A, Shao H, Zeng W, Wu P, Li C, Pan M, Li J, Yin X, Li D, Wang J, Zheng H, Wang W, Zhang X, Li S, Yang H, Lu C, Nielsen R, Zhou Z, Wang J, Xiang Z, and Wang J., *Science*, **326**, 433-436 (2009).
- 3) Shotgun proteomic analysis on the embryos of silkworm *Bombyx mori* at the end of organogenesis, Li JY, Moghaddam SH, Chen JE, Chen M, and Zhong BX, *Insect Biochem. Mol Biol.*, **40**, 293-302 (2010).
- 4) Protein profiles of the midgut of *Spodoptera litura* larvae at the sixth instar feeding stage by shotgun ESI-MS approach, Liu J, Zheng S, Liu L, Li L, and Feng Q, *J. Proteome Res.*, **7**, 2117-47 (2010).
- 5) Functional role of aspartic proteinase cathepsin D in insect metamorphosis. Gui ZZ, Lee KS, Kim BY, Choi YS, Wei YD, Choo YM, Kang PD, Yoon HJ, Kim I, Je YH, Seo SJ, Lee SM, Guo X, Sohn HD, and Jin BR, *BMC Dev Biol.* **6**, 49 (2006).
- 6) Safety and Immunogenicity of H5N1 Influenza Vaccine Based on Baculovirus Surface Display System of *Bombyx mori*, Jin R, Lv Z, Chen Q, Quan Y, Zhang H, Li S, Chen G, Zheng Q, Jin L, Wu X, Chen J, and Zhang Y., *PLoS One*, **3**, e3933 (2008).

比較ゲノムから見えてきた昆虫の神経ペプチド関連遺伝子群の特徴と 害虫防除への利用展望

(独) 農業生物資源研究所制御剤標的遺伝子研究ユニット

田中 良明

はじめに

神経ペプチドは、発育や生殖、行動など昆虫の様々な生理現象に関与する重要な制御因子である。近年は、様々な昆虫種においてゲノム情報を利用した神経ペプチドや受容体遺伝子の網羅的解析が行われるようになり、短期間でその昆虫が持っている神経ペプチドのほぼ全種類がわかるようになってきた。また、ゲノム解読以前は非常に困難であった受容体遺伝子の単離やリガンドの同定が飛躍的に進み、受容体レベルで神経ペプチドの機能を解明することが可能になった。このように、昆虫の神経ペプチド研究はゲノム解読により近年めざましい進展をみせている。しかし、ペプチドは体内で速やかに分解されてしまうことや経口・経皮投与では効かないなどの問題があるため、現在まで農薬として実用化したものはない。本講演では、ゲノム解読から明らかになった各昆虫種における神経ペプチドシグナルネットワークの特徴について紹介するとともに、神経ペプチド研究の成果を今後害虫防除に応用できる可能性について考察する。

ゲノム情報から明らかになった昆虫神経ペプチド関連遺伝子の特徴

昆虫の神経ペプチド関連遺伝子の一般的な特徴としては、①脊椎動物の神経ペプチドとの相同性が低い昆虫独自のペプチドがある、②脊椎動物ではインシュリン遺伝子は通常ゲノム当たり1コピーの単一遺伝子族であるが、昆虫では複数、特にカイコでは30数コピー以上のボンビキシン遺伝子がクラスターを形成する多重遺伝子族である(岩見、1998)、③脊椎動物の神経ペプチド受容体である G protein coupled-receptor (GPCR) 遺伝子はイントロンがないが、昆虫ではほとんどの GPCR 遺伝子にイントロンがある、④甲殻類で種類が豊富な CHH 族ペプチドは昆虫では1種類しかないが、甲殻類には存在しない PTH や利尿ペプチド (ヒト副腎皮質刺激ホルモン放出因子タイプ) がある、などである。

現時点で全ゲノムが解読された昆虫種全てに共通して存在する神経ペプチドは約半数以下で、残りの神経ペプチドは存在しない昆虫種がある。特に、同じ目であっても存在する神経ペプチドの種類は異なっている。以下に神経ペプチド関連遺伝子が網羅的に解析されている昆虫について特徴を述べる。

(1) ハエ目

a) ショウジョウバエ

キイロショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)では昆虫で初めてゲノムが解読され、神経ペプチド関連遺伝子の網羅的な解析がなされた (Hewes and Taghert, 2001)。特に、受容体の網羅的な解析およびリガンドの同定に関する一連の研究は、その後の様々な昆虫種における神経ペプチド研究のリファレンスとなっている。ショウジョウバエでは、幼若ホルモンの合成を促進する作用をもつアラトトロピンや、カやバッタで卵巣の発達を制御する作用を示すニューロパルシンが存在しない。その逆に学習などに関わるAmnesiacや、メスの性行動を制御する性ペプチドはショウジョウバエにしか存在しない。

b) カ

カではハマダラカ(*Anopheles gambiae*, Riehle *et al.*, 2002)およびアカイエカ(*Aedes aegypti*, Predel *et al.*, 2010)で網羅的解析がなされている。同じ双翅目のショウジョウバエとは異なり、ニューロパルシンやアラトトロピンが存在する。

(2) 甲虫目

甲虫目のコクヌストモドキ(*Tribolium castaneum*)では、他の昆虫種に共通して存在する色素拡散ホルモン (Pigment dispersing factor, PDF) やコラゾニン、アラトスタチンのAタイプ、キニン、ニューロペプチドF (Neuropeptide F, NPF) およびその受容体遺伝子が存在しない(Li *et al.*, 2008; Hauser *et al.*, 2008)。特に、コラゾニンは以前から免疫組織化学により甲虫目には存在しないことが推測されていたが、ゲノム情報からそれが裏付けられた。また、昆虫で初めてバソプレッシン様ペプチドであるイノトシン (insect oxytocin/vasopressin-like peptide, inotocin) およびその受容体遺伝子が単離された(Stafflinger *et al.*, 2008)。ただし、イノトシン受容体は頭部で発現し、水分調節に関わるマルピーギ管や後腸ではほとんど発現しない。したがって、脊椎動物と昆虫ではバソプレッシン様ペプチドの生理機能は異なるようである。

(3) ハチ目

ハチ目ではセイヨウミツバチ(*Apis mellifera*, Hummon *et al.*, 2006; Hauser *et al.*, 2006)およびキョウソヤドリコバチ(*Nasonia vitripennis*, Hauser *et al.*, 2010)で網羅的解析がなされている。これらの昆虫で最大の特徴は、前胸腺抑制ペプチド (Prothoracicostatic peptide, PTSP) およびその受容体が存在しないことである。ミツバチでは他にもプロクトリン、グリコプロテインホルモン、PTTHが見つからない。

ヤドリバチで最も大きな発見は、RY アミドペプチドの発見である。このペプチドはその後多くの昆虫に普遍的に存在することが明らかになった。また、システイン架橋が一部欠落した羽化ホルモンや PTH の配列が見つまっている。

(4) カメムシ目

a) アブラムシ

エンドウヒゲナガアブラムシ (*Acyrtosiphon pisum*) の神経ペプチド遺伝子が網羅的に解析されている (Huybrechts et al., 2010)。アブラムシのゲノムからは、コラゾニンや PDF、スルファキニン、PTH、イノトシンがまだ見つからない。

b) ウンカ

イネの害虫であるトビイロウンカ (*Nilaparvata lugens*) も最近になって全ゲノムが解読されている。アブラムシとは異なり、イノトシンやスルファキニン、PDF、PTH をコードすると推測される配列が見つまっている (田中, 私信)。アブラムシと同様にコラゾニンをコードする配列は見つからないが、コラゾニン受容体をコードすると推測される配列は見つまっている。

(5) チョウ目

カイコ (*Bombyx mori*) で神経ペプチドおよび受容体の網羅的解析がなされている (Roller et al., 2008; Yamanaka et al., 2008)。カイコ神経ペプチドの最大の特徴は、ゲノム上に 30 コピー以上のボンビキシン遺伝子が存在することであるが、それ以外にも SIFa のパラログである IMF アミドや CCH アミドが昆虫で初めて見つかるなど、他の昆虫種に比較してペプチドの種類が多い。また、アラトトロピン受容体が昆虫で初めて同定されている。

昆虫種間での神経ペプチド関連遺伝子の比較から、神経ペプチドと受容体の共進化の過程が垣間見えてくる。例えば、PTSP/性ペプチド受容体 (PTSPR/SPR) のリガンドは二つあり、ショウジョウバエでは性ペプチド (Yapici et al., 2007)、カイコでは PTSP が同定された (Yamanaka et al., 2010)。性ペプチドはハエ目のショウジョウバエ属にしか存在しないが、PTSP と PTSPR/SPR はハチ目以外の昆虫に存在することから、PTSPR/SPR の本来のリガンドは PTSP であり、ショウジョウバエでのみ進化の過程で PTSPR/SPR の新たなリガンドとして性ペプチドを利用するようになったと考えられる (Kim et al., 2010)。今後各神経ペプチドの機能解明を進めることで、神経ペプチド-受容体の共進化と各昆虫種固有の生理現象の関連が明らかになると期待される。

創農薬のターゲットとしての神経ペプチドシグナルの利用

神経ペプチドやその受容体は種によって少しずつ構造が異なることから、特定の昆虫種に選択性の高い農薬の開発に結びつくことが期待される。今までは、ペプチド自体をリード化合物として主にデリバリーの問題を克服するための構造改変が試みられてきた。また、例は少ないが非ペプチド性の類縁体も開発されている (Scherkenbeck and Zdobinsky, 2009)。特に、ミオサプレッシンの非ペプチド性類縁体であるベンゾニウムクロロイドは、ミオサプレッシン受容体に作用することが確認されている。ただし、非ペプチド性化合物は天然型のペプチドと比較すると活性が弱く、農薬として実用化されるまでには至っていない。

ゲノム情報を利用して受容体遺伝子の同定が容易になった現在は、培養細胞などで受容体を発現させた機能解析系を利用して受容体に作用する化合物を探索し、それをリード化合物として神経ペプチド受容体を標的とした新規農薬の開発が可能である。そのために、まずどの受容体の機能を阻害すれば害虫の発育阻害に有効であるかを RNAi などを用いて探索する研究が RNAi が有効な昆虫で進んでいる。例えば、脱皮行動を誘導する Ecdysis triggering hormone (ETH) や CCAP の受容体、脱皮後のクチクラの着色・硬化を誘導する bursicon 受容体を RNAi によりノックダウンすると、脱皮の際に致死することがコクヌストモドキで明らかになっている (Arakane et al., 2008 ; Bai and Palli, 2010)。一方、脱皮・変態を制御する最上位の因子と考えられてきた前胸腺刺激ホルモン (PTTH) やその受容体である *torso* をノックアウトしたショウジョウバエの変異体は、正常に成虫まで成長するため、PTTH のシグナル経路は農薬のターゲットとしては有効でないことが示唆されている (Rewitz et al., 2009)。当研究所でも、トビイロウンカを対象として RNAi 法を用いた遺伝子機能の解析を効率的に行うシステムの構築が進んでおり、今後このシステムを利用して害虫防除に有効な神経ペプチド受容体遺伝子の同定を進める予定である。

農薬分野だけでなく、医薬分野でも日本の生理活性ペプチド研究は世界最高水準にありながら、海外とは対照的に日本発で治療や診断に使用されているペプチド関連薬品は非常に少ない。これは国内では”ペプチドは医薬品には適さない”という考え方が根強いためであった。私達はまずこの先入観を捨て、様々な分野の研究者が関心を持って昆虫神経ペプチド研究に参入できる土壌を作ることが第一に必要である。

引用文献

- 1) Bai, H. and Palli, S.R. (2010) *Dev. Biol.* 344: 248-258.
- 2) Hauser, F. et al. (2006) *Prog. Neurobiol.* 80: 1-19.
- 3) Hauser, F. et al. (2008) *Front. Neuroendocrinol.* 29: 142-165.
- 4) Hauser, F. et al. (2010) *J. Proteome Res.* (in press).
- 5) Hewes, R.S. and Taghert, P.H. (2001) *Genome Res.* 11: 1126-1142.
- 6) Hummon, A.B. et al. (2006) *Science.* 314:647-649.
- 7) Huybrechts, J. et al. (2010) *Insect Mol. Biol.* 19 Suppl 2: 87-95.
- 8) 岩見雅史 (1998) 無脊椎動物のホルモン, pp37-70, 学会出版センター.
- 9) Kim, Y.J. et al. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107: 6520-6525.
- 10) Li, B. et al. (2008) *Genome Res.* 18: 113-122.
- 11) Predel, R. et al. (2010) *J. Proteome Res.* 9: 2006-2015.
- 12) Rewitz, K.F. et al. (2009) *Science* 326: 1403-1405.
- 13) Riehle, M.A. et al. (2002) *Science* 298: 172-175.
- 14) Roller, L. et al. (2008) *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38:1147-1157.
- 15) Scherkenbeck, J. and Zdobinsky, T. (2009) *Bioorg. Med. Chem.* 17: 4071-4084.
- 16) Stafflinger, E. et al. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105: 3262-3267.
- 17) Yamanaka, N. et al. (2008) *PLoS ONE* 3:e3048.
- 18) Yamanaka, N. et al. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107: 2060-2065.
- 19) Yapici, N. et al. (2007) *Nature* 451: 33-37.

共生微生物を利用した害虫制御:概念、実践、展望について

産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門

深津 武馬

非常に多くの生物が、恒常的もしくは半恒常的に共生微生物を体内に保有している。このような現象を「内部共生」というが、これ以上でない空間的近接性で成立する共生関係のため、きわめて高度な相互作用や依存関係がみられる。このような関係からは、しばしば新しい生物機能が創出される。共生微生物と宿主生物がほとんど一体化して、あたかも1つの生物のような複合体を構築する場合も少なくない。

昆虫類は陸上生態系における生物多様性の中核をなす生物群であるが、例えばその100万以上といわれる総種数の70%以上がボルバキアという共生細菌に感染していると推定される。他にもさまざまな共生微生物が、多くの農業害虫、衛生害虫を含む昆虫類にひろく存在し、宿主の生存や生態や性質にさまざまな影響を与えている。

近年、共生微生物を利用した、従来にない害虫制御のアプローチの可能性が提案され、その一部については実践にむけた取り組みもおこなわれている。主なアプローチとしては以下のようなものがある。

- (1) 宿主の生存に必須な共生微生物を標的として、害虫の制御をおこなう。
- (2) 共生微生物による細胞質不和合性を利用して、害虫集団の不妊化をおこなう。
- (3) 共生微生物による細胞質不和合性を利用して、害虫集団中に人間にとって望ましい遺伝子型や性質を広める。

今回は、昆虫類における共生微生物の多様性と意義について概説するとともに、単に害虫を殺すばかりでなく、不妊化させたり、野外集団の性質を改変したりといった、共生微生物を利用した害虫制御への取り組みの国際的な現状について紹介する。

昆虫脱皮ホルモン生合成酵素の 昆虫制御剤ターゲットとしての可能性

筑波大学大学院 生命環境科学研究科
次代を担う若手大学人育成イニシアティブ
丹羽 隆介

脱皮は、動物が進化の過程で獲得した極めて普遍的な発生イベントである。現在までの分子系統学的解析によれば、昆虫類を含む節足動物や線虫類などが、脱皮現象を基本的な共通指標とする「脱皮動物群 (Ecdysozoa)」としてグループされる。中でも、昆虫類は、その成長戦略として脱皮と共に変態をも獲得し、生活史を劇的に変更できる環境適応能を身につけた。昆虫の脱皮と変態の過程は、その変化の激しさゆえに古くから多くの人々を魅了してきた。そして、膨大な研究によって、「脱皮ホルモン」として知られるエクジステロイドの適切な生合成調節が、脱皮と変態を制御する上での鍵であることが明らかにされてきた。

エクジステロイドの生合成は、節足動物および一部の線形動物に限定されており、脊椎動物を含むその他の動物種においては認められない。また、エクジステロイドを人工的に投与しても、エクジステロイドを持たない生物種に対しては致死的な効果はほぼない。よって、エクジステロイドの機能を攪乱する作用のある薬剤は、選択性の高い昆虫発育制御剤 (IGR) になると考えられてきた。実際に、最も脱皮ホルモン活性の高いエクジステロイドである 20-ヒドロキシエクジソン (20E) が直接作用する核内受容体 EcR/USP は、過去30年近くに渡って IGR ターゲットとして着目され、多くの研究がなされてきた。その1つであるジベンゾイルヒドラジン類は、すでに実用化されて農薬として用いられている。しかしながら、その殺虫効果はごく一部の鱗翅目昆虫に限定されており、それ以外の害虫に対して有効な IGR とは言えない。また、EcR/USP をターゲットとした研究は世界的に現在も進行中ではあるものの、既存薬を上回る薬剤の発見には至っていない。こうした状況から、エクジステロイドに着目した新しい IGR 開発のためには、EcR/USP に着目するだけではない、別の開発戦略が求められている。

講演者はこれまでに、昆虫のエクジステロイド生合成を担う酵素群の解明に焦点を当て、幾つかの酵素の同定と機能解析に従事してきた。そして現在では、新しい IGR のターゲットとして、エクジステロイドを作り出すこれらの生合成酵素に着目する可能性を考えている。本講演では主として、ここ最近10年間で一気に解明されたエクジステロイド生合成酵素群の同定の歴史を整理しながら、

個々の分子の機能的特徴および進化的特徴について概説する。そして、講演者らが開始しつつある新規薬剤スクリーニングの計画について、やや妄想に近いアイデアを含めながら議論したい。

本要旨の以下の紙面においては、エクジステロイド生合成経路と関連酵素について、概略を整理しておく。

【エクジステロイドの生合成経路】

エクジステロイドは、幼虫期において前胸腺（prothoracic gland）と呼ばれる特殊な内分泌器官において、また成虫期には雌卵巣において生合成されることが古典的に知られている。エクジステロイドの構造が決定された 1965 年以降、エクジステロイドが前胸腺や卵巣でどのような中間段階を経て生合成されるのかが盛んに研究された。それには、放射線ラベルをした中間基質を利用し、どのようなラベル体がエクジステロイドに取り込まれるのかを検討する精緻なトレーサー実験に依るところが大きい。詳細については、桜井 (1995) や Gilbert et al. (2002) を参照されたい。

前胸腺あるいは卵巣におけるエクジステロイドの産生の出発材料は、コレステロールである。昆虫はアセチルCoAなど低分子化合物からステロイド骨格を合成することができないため、他の動物からコレステロールを摂取するか、植物由来のステロールを消化管でコレステロールに変換する。コレステロールは、脂質運搬に関わるリポフォリントパク質と結合し、これが前胸腺や卵巣などのエクジステロイド産生器官に運ばれる。

現在までに明らかにされているエクジステロイド生合成過程を図 1 に示す。前胸腺あるいは卵巣に運ばれたコレステロールは、まず脱水素化され、7-デヒドロコレステロールに変換される。次いで、7-デドロコレステロールは、A/B環のシス型への立体構造の変化、C6のケト化、C14の水酸化を経て5 β -ケトジオールと呼ばれる中間産物になる。7-デドロコレステロールから5 β -ケトジオールへと至る過程に存在するはずの中間産物については、その構造が不安定のために正確な同定がなされておらず、「ブラックボックス」と呼称されている。5 β -ケトジオールからエクジソンへと至る過程は3段階の変換ステップで構成されており、C25、C22、C2が段階的に水酸化されることでエクジソンとなる。エクジソンはその後に20Eに変換されるが、この反応だけは前胸腺ではなく、脂肪体や筋肉などの末梢組織で起こる。この20Eが主に体液中を循環して様々な組織に働きかけることで、脱皮および変態が誘導される。

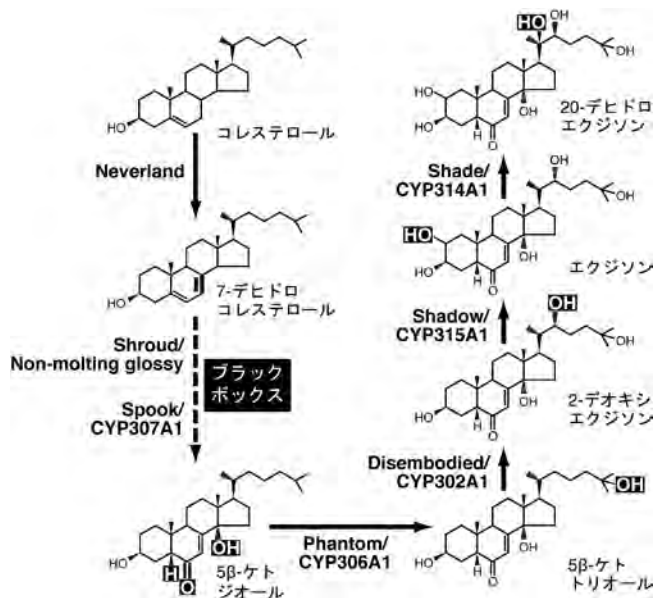


図1 エクジソン生合成経路と関与する酵素

エクジソンおよび20Eの生合成過程それぞれのステップで生じる触媒反応の部位を、太線あるいは白黒反転文字で示す。

Shroud, Spook, Phantom, Disembodied, Shadow, そして Shade の5つはハロウィーン突然変異株として分類される。これら5つのハロウィーン突然変異株の責任遺伝子のうち、Shroudを除く4つはシトクロムP450をコードしている。これらの遺伝子については、「CYP」から始まるP450遺伝子命名規約に従った名称も併

【エクジステロイドの生合成酵素の実体】

1960～1990年代までに、エクジステロイド生合成過程の中間産物およびその生化学的変換ステップについては多くのことがすでに解明されていたが、それぞれの変換ステップにどのような酵素が関わるのか、その分子の実体は長らく不明のままであった。しかしながら、キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* およびカイコガ *Bombyx mori* を利用した分子遺伝学的手法と網羅的遺伝子発現解析によって、この10年間で一気に解明が進んだ。コレステロールから20Eに至るまでの中間体の変換に関わる酵素として、現在までに7種類の酵素が判明しており、以下に詳述するように、遺伝子ファミリーとしては3タイプに分類される。以下の記載順は、歴史的な同定順に準ずる。

(1) シトクロムP450モノオキシゲナーゼ：

- Disembodied (Dib)/CYP302A1 (Chávez et al., 2000; Warren et al., 2002)
- Shadow (Sad)/CYP315A1 (Warren et al., 2002)
- Shade (Shd)/CYP314A1 (Petryk et al., 2003)
- Phantom (Phm)/CYP306A1 (Niwa et al., 2004; Warren et al., 2004)
- Spook (Spo)/CYP307A1 (Namiki et al., 2005; Ono et al., 2006)

これらの5つの酵素は、いずれもシトクロムP450モノオキシゲナーゼ（以下、「P450」）に分類される。P450は、微生物から植物、動物まで生物界に広く分布する一群のヘムタンパク質であり、基質に一つの酸素分子を付加する活性を持つ（大村、2009）。図1に挙げるように、エクジステロイド生合成過程には、水酸基の生成など酸素分子の付加によって担われる反応が存在し、P450

の関与は古くから予想されていた。これらの P 4 5 0 の同定には、「ハロウィーン突然変異株群」と呼ばれる一連のキイロショウジョウバエの胚性致死変異株の発見が鍵となった。この突然変異株群では、胚期のエクジステロイド量が野生型に比べて著しく減少しており、また胚のクチクラ構造に共通した特徴的な形成不全が見られる。これらの突然変異株に付けられた *spook* 等の名称はいずれも「幽霊」「亡霊」の意味であることから、最初の発見者である Michael B. O'Connor 博士はこの一連の突然変異株群に「ハロウィーン（お化けの集まり）」の名を付けた (Chávez et al., 2000; Warren et al., 2002)。酵素名としては、キイロショウジョウバエの突然変異株名に基づく名称と共に、P 4 5 0 国際命名規約に則った「CYP」で始まる名称も用いられる。

現在までに、Phm/CYP306A1、Dib/CYP302A1、Sad/CYP315A1 および Shd/CYP314A1 については、生化学的実験によって内在性基質が決定されており、図 1 に示すような特異的な変換ステップにそれぞれ必須の役割を果たしている。この 5 つの P 4 5 0 をコードするそれぞれのオーソログは、エクジステロイドを生合成する節足動物内で高度に保存されていると考えられている (Rewitz and Gilbert, 2008)。

Spo/CYP307A1 については、「ブラックボックス」内で機能することが明らかにされているのみで、基質の特定には至っていない。なお、多くの昆虫のゲノム中には Spo/CYP307A1 パラログが存在している。これらのパラログは Spookier/CYP307A2 および Spookiest/CYP307B1 と命名され、Spook/CYP307A1 と同様の触媒機能を担うと考えられている (Ono et al., 2006)。

(2) Rieske 型酸化酵素：

- Neverland (Nvd) (Yoshiyama et al., 2006)

Nvd は、講演者らのグループによって、カイコのマイクロアレイ解析に基づく研究から同定された酵素である。Nvd は、Rieske ドメインと呼ばれる電子伝達系酵素に特徴的なモチーフを持つ。中間体を利用した摂食レスキュー実験から、Nvd はコレステロールから 7-デヒドロコレステロール (7dC) の変換を担う酵素であることが強く示唆されている (図 1)。講演者のグループは現在までに、Nvd の酵素活性をアッセイする *ex vivo* 実験系の確立に成功し、Nvd にコレステロール 7,8-デヒドロゲナーゼ活性を持つ事を強く示唆するデータを得ている (吉柳川ら、未発表)。また、ハロウィーン P 4 5 0 および Nm-g/Sro (後述) のオーソログが節足動物ゲノムにしか見出されないのに対して、Nvd オーソログは線虫 *Caenorhabditis elegans* や後口動物などのエクジステロイドを生合成しない動物種にも強く保存されている。実際、線虫や後口動物由来の Nvd も、コレステロ

ール 7,8-デヒドロゲナーゼ活性を有することを確認している（塩谷ら、未発表）。

（3）短鎖型脱水素・還元酵素（Short-chain dehydrogenase/reductase）：

- Non-molting glossy/Shroud (Nm-g/Sro) (Niwa et al., 2010)

Nm-g/Sro は、篠田徹郎博士、嶋田透博士、勝間進博士、および講演者のグループによる共同研究によって明らかにされた酵素であり、P450とは構造的に異なる酵素ファミリーに属する。この酵素は、脱皮異常および体内エクジステロイド量の減少を示すカイコガの突然変異株 *nm-g* の原因遺伝子クローニングによって見出された。さらに我々は、*nm-g* 遺伝子のキイロショウジョウバエオースログ *sro* がキイロショウジョウバエの個体発生においてもエクジステロイド合成に必須の役割を果たすこと突き止めた。カイコガとキイロショウジョウバエを併用した詳細な分子遺伝学的解析から、Nm-g/Sro も「ブラックボックス」内で必須の役割を果たす酵素であることが明らかとなっているが、基質は特定されていない。

【新しい IGR ターゲットとしてのエクジステロイド合成酵素】

上述したエクジステロイド合成酵素は、従来の IGR 開発ターゲットであった核内受容体 EcR/USP とは当然のことながら構造的に大きく異なる。よって、エクジステロイド合成酵素の活性に影響を与える化合物を同定することが出来るならば、従来の研究から同定された化合物とはまったく違ったタイプの新規 IGR 発見に繋がると可能性がある。

【引用文献】

- Chávez, V. M., Marques, G., Delbecque, J. P., Kobayashi, K., Hollingsworth, M., Burr, J., Natzle, J. E. and O'Connor, M. B. (2000). The *Drosophila disembodied* gene controls late embryonic morphogenesis and codes for a cytochrome P450 enzyme that regulates embryonic ecdysone levels. *Development* 127: 4115-4126.
- Gilbert, L. I., Rybczynski, R. and Warren, J. T. (2002). Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway. *Annu. Rev. Entomol.* 47: 883-916.
- Namiki, T., Niwa, R., Sakudoh, T., Shirai, K., Takeuchi, H. and Kataoka, H. (2005). Cytochrome P450 CYP307A1/Spook: a regulator for ecdysone synthesis in insects. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 337: 367-374.
- Niwa, R., Matsuda, T., Yoshiyama, T., Namiki, T., Mita, K., Fujimoto, Y. and Kataoka, H. (2004). CYP306A1, a cytochrome P450 enzyme, is essential for ecdysteroid biosynthesis in the prothoracic glands of *Bombyx* and *Drosophila*. *J. Biol. Chem.*

279: 35942-35949.

- Niwa, R., Namiki, T., Ito, K., Shimada-Niwa, Y., Kiuchi, M., Kawaoka, S., Kayukawa, T., Banno, Y., Fujimoto, Y., Shigenobu, S. et al. (2010). *Non-molting glossy/shroud* encodes a short-chain dehydrogenase/reductase that functions in the 'Black Box' of the ecdysteroid biosynthesis pathway. *Development* 137: 1991-1999.
- Ono, H., Rewitz, K. F., Shinoda, T., Itoyama, K., Petryk, A., Rybczynski, R., Jarcho, M., Warren, J. T., Marques, G., Shimell, M. J. et al. (2006). *Spook* and *Spookier* code for stage-specific components of the ecdysone biosynthetic pathway in Diptera. *Dev. Biol.* 298: 555-570.
- 大村恒雄 (2009) シトクロム P 4 5 0 概説. In P 4 5 0 の分子生物学 第 2 版 (大村恒雄・石村巽・藤井義明編)、pp. 1-14、講談社.
- Petryk, A., Warren, J. T., Marques, G., Jarcho, M. P., Gilbert, L. I., Kahler, J., Parvy, J. P., Li, Y., Dauphin-Villemant, C. and O'Connor, M. B. (2003). Shade is the *Drosophila* P450 enzyme that mediates the hydroxylation of ecdysone to the steroid insect molting hormone 20-hydroxyecdysone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 13773-8.
- Rewitz, K. F. and Gilbert, L. I. (2008). *Daphnia* Halloween genes that encode cytochrome P450s mediating the synthesis of the arthropod molting hormone: evolutionary implications. *BMC Evol. Biol.* 8: 60.
- 桜井勝 (1995) 前胸腺におけるエクジソン合成系と分泌調節. In 昆虫の生化学・分子生物学 (大西英爾・園部治之・高橋進編)、pp. 93-115、名古屋大学出版会.
- Warren, J. T., Petryk, A., Marques, G., Jarcho, M., Parvy, J. P., Dauphin-Villemant, C., O'Connor, M. B. and Gilbert, L. I. (2002). Molecular and biochemical characterization of two P450 enzymes in the ecdysteroidogenic pathway of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 11043-11048.
- Warren, J. T., Petryk, A., Marques, G., Parvy, J. P., Shinoda, T., Itoyama, K., Kobayashi, J., Jarcho, M., Li, Y., O'Connor, M. B. et al. (2004). *Phantom* encodes the 25-hydroxylase of *Drosophila melanogaster* and *Bombyx mori*: a P450 enzyme critical in ecdysone biosynthesis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34: 991-1010.
- Yoshiyama, T., Namiki, T., Mita, K., Kataoka, H. and Niwa, R. (2006). Neverland is an evolutionally conserved Rieske-domain protein that is essential for ecdysone synthesis and insect growth. *Development* 133: 2565-2574.

チョウ目害虫とカイコのゲノム構造の類似性

(独) 農業生物資源研究所 遺伝子組換えカイコ研究センター

瀬筒 秀樹

はじめに

昆虫は命名されているものだけで93万種以上いると言われており、チョウやガの仲間(チョウ目または鱗翅目)は、カブトムシやカミキリムシの仲間(コウチュウ目または鞘翅目)に次いで種数が多く、16万種以上が知られている(Grimaldi and Engel, 2005)。種類が多だけでなく、その色や形、生態は実に様々である。昆虫は4億年以上前に出現したが、化石のデータ等から、チョウ目は比較的最近の4,000万年~6,000万年前に急激に種の数が増えたと考えられている。

チョウ目は、そのほとんどが食植性であり、農作物や森林に多大な被害をもたらす害虫が多く含まれる。植物は様々な防御物質によって、昆虫などに食べられないように身を守っているが、その防御物質を解毒する機能を獲得して適応した種も多い。また殺虫剤抵抗性を獲得しやすい害虫も含まれるため、チョウ目に効果的な選択性の高い殺虫剤の開発が求められている。

これまでに、農業生物資源研究所と中国の研究グループが中心となり、チョウ目としては最初にカイコのゲノムがほぼ完全に解読された(Consortium, 2008)。カイコは、絹糸を生産する農業生物としてだけでなく、遺伝学・生理学等の研究材料としても扱いが容易で優れており、他のチョウ目害虫のモデル生物となることが期待されている。ところが、カイコは家畜化されて野生を失っていることや、ゲノム中の反復配列の割合がとても多いため、反復配列によるゲノムの大きな再編成が起きやすいと考えられ、カイコと害虫ではゲノムがかなり異っていることも想像されることから、カイコは害虫のモデルとして適さないのではないかという声もあった。

そこで我々は、チョウ目の害虫2種に着目し、フランス国立農学研究所(INRA)などとともにもゲノムの一部を解読してカイコゲノムと比較を行った。その結果、チョウ目害虫とカイコの遺伝子の並び方はほぼ同じであることがわかり、カイコのゲノム情報がチョウ目害虫の遺伝子同定に有用であることを明らかにした。

オオタバコガ、ツマジロクサヨトウ、カイコのゲノム比較

ヨトウムシ(ヨトウガの幼虫)などのチョウ目害虫は、殺虫剤抵抗性を獲得しやすく農業上大きな問題となっている。そこで、農作物の世界的な大害虫であるオオタバコガ²⁾(図1中)およびツマジロクサヨトウ³⁾(図1右)という2種のガのBAC⁴⁾ライブラリを作成し、様々な遺伝子を含む領域に対応した15のBACを

選び、塩基配列を解読した。特に、植物防御物質の代謝や殺虫剤抵抗性に関与していると考えられる遺伝子領域を中心に解読した。そして、カイコゲノムとの比較を行い、チョウ目昆虫のゲノムの類似性や特殊な進化を明らかにした (d'Alençon *et al.*, 2010)。

カイコはゲノム中の反復配列の割合が 43.6%とこれまでゲノムが解読された昆虫の中で一番多いため、反復配列によるゲノムの大きな再編成が起きやすいと考えられていた。ところが、遺伝子の並び方の相同性 (シンテニー⁵⁾) は 3 種間で非常によく保存されていた (図 2)。シンテニーの高度な保存性は、カイコのゲノム情報を用いることによって、多くの害虫を含むチョウ目昆虫全般の遺伝子同定が容易であることを示している。

その一方、チョウ目害虫で殺虫抵抗性に関わる遺伝子は増幅されて数 (コピー数) が増えているなど、部分的なゲノムの再編成が高い頻度で生じていた。例えば、植物防御物質や殺虫剤等の解毒作用をもつ酵素の P450⁶⁾ 遺伝子などでは急速にコピー数が増えており、そのことによって解毒作用が高くなっていることが示唆された (図 2) (Brun-Barale *et al.*, 2010)。増幅した遺伝子の各コピーは DNA 配列が変化することによって、元の遺伝子とは違う独自の機能を獲得することがある。それによって、チョウ目は様々な環境に適応してきたのかも知れない。部分的なゲノムの再編成の頻度は、これまでに知られている昆虫・動物の中で最も高いものであり、その再編成には反復配列が影響していることが示唆された。

チョウ目の染色体は細胞分裂時に、ヒトなどのように動原体微小管 (紡錘糸) が染色体の一カ所に結合するのではなく全体に多数結合するという特徴があり、ホロセントリック染色体⁷⁾ (図 3) と呼ばれる。シンテニーが保存されつつも、各遺伝子は急速に進化しているという一見矛盾する特徴は、ホロセントリック染色体との関連性が強く示唆された。すなわち、細胞分裂時に染色体が小断片化されても、各断片に付着した動原体によって染色体は 2 つの細胞に無事に分配されるが、その後、切断した染色体が修復され再構成される際に局所的な染色体の組換え頻度が高くなり、遺伝子重複などが起きやすいと推測される。このことが、比較的最近に種の数が増えたにもかかわらず、昆虫の中で 2 番目に種類が多いというチョウ目の多様性を生み出す原因となっていると考えられた。

おわりに

今後、カイコで得られたゲノム情報やカイコの遺伝子組換え技術を用いることによって、チョウ目害虫の農薬抵抗性に関わる遺伝子を解明し、害虫防除に有効な新規の農薬開発などに役立つ知見を提供していきたい。また、ホロセントリック染色体の分子的な実体はまだわかっていないため、分子的な解析が進むことに

よってチョウ目昆虫の進化メカニズムの解明につながることを期待される。

言葉の解説

1) カイコ (*Bombyx mori*)

チョウ目カイコガ科(Bombycidae)のガ(図1左)。クワの葉以外は食べない。カイコが作り出す絹糸は古来より人間に利用され、およそ5,000年の間に野生種のクワコ(*Bombyx mandarina*)から家畜化されたと考えられている。遺伝学・生理学の研究材料として扱いやすく、フェロモンやホルモンなどの研究に用いられてきた。2008年にはゲノムがほぼ完全解読され、ますます重要なモデル生物となっている。また、2000年に遺伝子組換え技術が確立され、遺伝子機能解析が進むとともに、遺伝子組換えカイコによる医薬品などの有用タンパク質生産や蛍光絹糸などの新素材開発が期待されている。

2) オオタバコガ (*Helicoverpa armigera*)

チョウ目ヤガ科(Noctuidae)のガ(図1中)。非常に広食性で、トウモロコシ、ワタ、ヒマワリ、タバコ、ダイズ、トマト、ピーマン、ナス、レタス、キャベツ等の農作物の大害虫として知られている。日本にも分布し、植物中に食入するため防除が困難な害虫であると同時に、殺虫剤抵抗性も問題となっている。

3) ツマジロクサヨトウ (*Spodoptera frugiperda*)

チョウ目ヤガ科(Noctuidae)のガ(図1右)。非常に広食性で、イネ、トウモロコシ、ソルガム、ワタ、タバコ等80種以上の植物を食べ、作物に被害をもたらす。日本でも近縁のハスモンヨトウ(*Spodoptera litura*)による農作物への被害が大きく、オオタバコガと同様に、殺虫剤抵抗性を獲得しやすいことが問題となっている。

4) BAC (Bacterial Artificial Chromosome)

人工染色体の一種。100~200kbの大きさのDNAを組み込み、大腸菌で増やすことができる。

5) シンテニー (Synteny)

複数の生物のゲノム(ある生物のもつ全ての遺伝情報)間での染色体上の遺伝子の並び方の相同性、または遺伝子の並び方が相同である状態。シンテニーが保存されていれば、既知のゲノム情報を利用することによって、別の生物の遺伝子の位置を推定することが可能となる。また、シンテニー解析によってゲノム再編

成（配列の転座・欠失・重複など）を理解することは、種分化や遺伝子機能の解明に有用である。染色体の観察（FISH法）によれば染色体のマクロなレベルではチョウ目昆虫間でシンテニーが保存されていることが示唆されており（Sahara *et al.*, 2007）、ゲノム配列レベルでの解析が必要とされていた。

6) P450 遺伝子 (Cytochrome P450)

シトクローム P450 (P450 または CYP と呼ばれる) は、幅広い生物種に存在するヘムタンパク質で、酸素 1 原子を化合物に導入するモノオキシゲナーゼ活性をもつ。還元型で一酸化炭素と結合して 450nm に極大をもつ吸収スペクトルを示す色素としての特徴から、ピグメント (色素) 450 という意味で日本の大村と佐藤によって名付けられた。P450 はひとつの共通祖先遺伝子から進化して多様化した遺伝子ファミリーであり、様々な基質の反応を触媒し、生体内で解毒などの様々な役割を持つ。昆虫は、約 40 から 160 種の P450 遺伝子を持っている。ゲノムが解読された昆虫では、セイヨウミツバチには約 46 種、キイロショウジョウバエには約 86 種、カイコには約 87 種、ハマダラカには約 105 種、キョウソハドリコバチには約 106 種、コクヌストモドキには約 134 種、ネッタインマカには約 160 種の P450 遺伝子があるといわれている (分類が難しいため、種類数は諸説ある)。昆虫の P450 遺伝子は、植物がもつ防御物質や殺虫剤を解毒・代謝し、殺虫剤抵抗性の発達にも関与しているだけでなく、脱皮ホルモンや幼若ホルモンなどの合成や代謝、昆虫の種特異的なフェロモンや防御物質の合成や分解にも関与している (篠田, 2009)。

7) ホロセントリック染色体 (Holocentric chromosome)

細胞分裂時に染色体全体に紡錘糸が多数結合する染色体 (図 3)。チョウ目やアブラムシやサシガメなどの昆虫の一部や、センチュウ、イグサ科やカヤツリグサ科の植物の一部など、少数の生物種に見られる。細胞分裂 (有糸分裂) 時には、DNA が折りたたまれた染色体の動原体と呼ばれる部分に動原体微小管 (紡錘糸) が結合し、染色体が移動する。染色体上に動原体がないと正常に細胞分裂を行うことができない。ヒトなどの脊椎動物や、キイロショウジョウバエなどの多くの昆虫では、染色体に 1 カ所の局在型動原体をもつモノセントリック染色体をもつが、ホロセントリック染色体では、動原体機能が染色体全体に分散する散在型動原体をもつ。したがって、ホロセントリック染色体では染色体が断片化しても各断片は動原体をもつため細胞分裂を行うことができ、染色体はその後に修復・再編される。そのため、染色体の組換え頻度が高くなり、様々な異なった環境に適応するのを加速し、多様性を生み出す原因となると考えられる。



図1 カイコ、オオタバコガ、ツマジロクサヨトウの幼虫と成虫

左:カイコ、中:オオタバコガ、右:ツマジロクサヨトウ、いずれも上段が幼虫、下段が成虫
 左下は遺伝子組換えカイコの成虫で、眼で赤色または緑色蛍光タンパク質を発現している。(写真提供:
 オオタバコガはオーストラリア CSIRO, R. Mahon 氏より、ツマジロクサヨトウはフランス INRA, B. Provost 氏
 より)

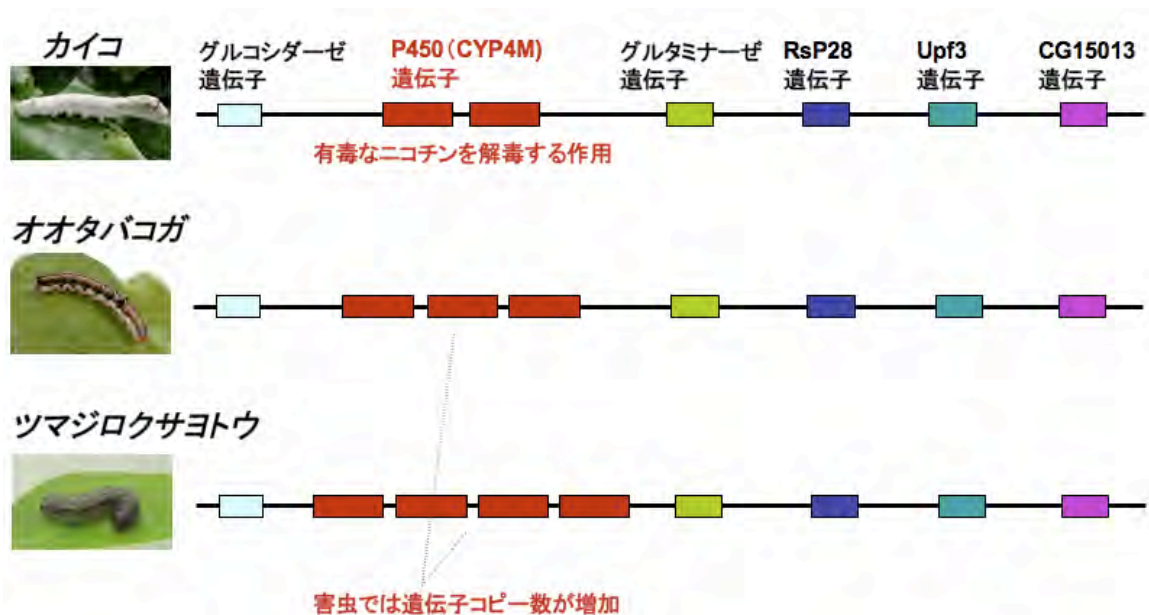


図2 チョウ目3種における遺伝子の並び方:P450(CYP4M)遺伝子領域の例
 基本的に遺伝子の並び方は3種間で非常に相同性が高い。しかし、ニコチン(タバコに含まれ殺虫性のある植物防御物質)などに対して解毒作用をもつ酵素のP450(CYP4M)遺伝子は、害虫のオオタバコガやツマジロクサヨトウでは遺伝子が増幅してコピー数が増え、解毒作用が強力になっている。

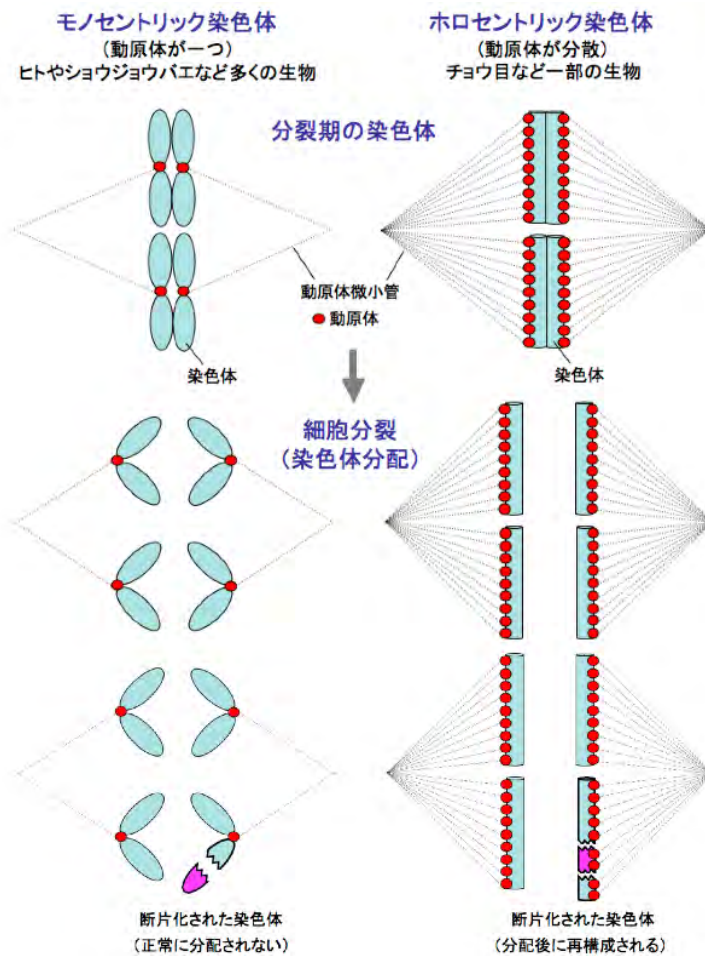


図3 モノセントリック染色体とホロセントリック染色体の違い

チョウ目のホロセントリック染色体では、細胞分裂時に染色体が断片化されても各断片の動原体によって染色体が2つの細胞に分配されて、その後に切断部位が修復されて染色体が再構成される際に組換え頻度が高くなると考えられる。モノセントリック染色体の生物では、染色体が断片化されると断片には動原体がないため染色体がうまく分配されない。

文献

- Grimaldi D, Engel MS (2005) *Evolution of the Insects*. Cambridge University Press. 755.
- The International Silkworm Genome Consortium (2008) The genome of a lepidopteran model insect, the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol* 38: 1036-1045.
- d'Alençon E*, Sezutsu H*, Legeai F, Permal E, Bernard-Samain S, Gimenez S, Gagneur C, Cousserans F, Shimomura M, Brun-Barale A, Flutre T, Couloux A, East P, Gordon K, Mita K, Quesneville H, Fournier P, Feyereisen R (2010) Extensive synteny conservation of holocentric chromosomes in Lepidoptera despite high rates of local genome rearrangement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(17):7680-7685.
- Sahara K, Yoshido A, Marec F, Fuková I, Zhang HB, Wu CC, Goldsmith MR, Yasukochi Y (2007) Conserved synteny of genes between chromosome 15 of *Bombyx mori* and a chromosome of *Manduca sexta* shown by five-color BAC-FISH. *Genome* 50: 1061-1065.
- Brun-Barale A, Héma O, Martin T, Suraporn S, Audant P, Sezutsu H, Feyereisen R (2010) Multiple P450 gene overexpressed in deltamethrin-resistant strains of *Helicoverpa armigera*. *Pest Management Science* 66(8):900-909.
- 篠田徹郎 (2009) 昆虫の P450 酵素系. 『P450 の分子生物学第2版』講談社 208-216.

カイコゲノム情報データベース KAIKObase ー完全長 cDNA 配列に基づくゲノムアノテーションー

(独)農業生物資源研究所 昆虫ゲノム研究・情報解析ユニット
末次克行

はじめに

コナガ(*Plutella xylostella*)やハスモンヨトウ(*Spodoptera litura*)などが属する鱗翅目昆虫は農業害虫の中で最も重要なグループである。カイコ(*Bombyx mori*)は鱗翅目昆虫のモデル生物であり、鱗翅目昆虫を標的とした殺虫剤などの新規害虫防除技術開発にはゲノム情報が必要であることからカイコのゲノム解析がこれまで進められてきた。カイコゲノム解析の近年の大きな成果の一つとしては、2008年[1]に日本と中国のWGSシーケンスの統合によるゲノムシーケンスが公開されたことが挙げられる。ゲノムサイズ(475Mb)のおよそ91%に相当する432Mbのアセンブリデータとアセンブリの評価指標の一つであるN50は3.7Mbと、カイコにおいても高精度なゲノムシーケンスが利用可能となった。このように、カイコゲノム解析もポストゲノムの時代を迎えたが、ポストゲノム研究における重要なタスクの一つがゲノムアノテーションである。ゲノムアノテーションはゲノム配列に生物学的な注釈(ゲノムの構造・機能など)を付与することである。カイコゲノムアノテーションは本年11月より開始する予定で、現在我々の研究グループを中心としてカイコゲノムアノテーションの準備を進めている。コンピュータによる自動アノテーションは高速であり、既知の配列と非常に高い相同性を持つ配列、もしくは全く一致しない配列を抽出する場合には非常に有効な手段である。しかしそれ以外の場合には、各分野の専門家の手によるキュレーションが必要となってくる。カイコゲノムアノテーションによりカイコ遺伝子機能の解明が進むことで、他の昆虫ゲノムとの詳細な比較解析が可能となり、チョウ目昆虫のモデル、または、農業害虫ゲノムのモデルとしてのカイコゲノムの位置が明らかとなると思われる。

本講演では、現在シーケンスを進めているカイコ完全長cDNAと11月から開始されるカイコゲノムアノテーションの概要と、カイコゲノム情報統合データベースKAIKObaseの今後について述べる。

カイコ完全長 cDNA の概要

ゲノムアノテーションを進めて行く上で重要な役割を果たすのが完全長cDNAである。完全長cDNAはmRNAの全長を反映したcDNAであり、断片cDNAと

異なりタンパク質を合成するための設計情報をすべて有している。当研究グループでは完全長 cDNA のシーケンスを進めてきており、これまで解読を行った完全長 cDNA は 2010 年 7 月 20 日現在で 1 万クローンを超えている。これら解読された完全長 cDNA の 90% 以上について、ゲノムシーケンス上での位置取りがシーケンスアラインメントをベースとしたコンピュータプログラムにより予測されている。これらのゲノム上へマップされた完全長 cDNA 配列について既存の予測遺伝子モデルと比較したのが図 1 である。どちらの予測遺伝子ともマップされた位置がオーバーラップしない完全長 cDNA は約 10% ほどであり、コンピュータによる予測ではカバー出来ていない転写物が完全長 cDNA により得られていることを示している。また、BLAST 検索により、完全長 cDNA 配列の約 9% が既知タンパク質配列と相同性を持っていないこともわかっている。

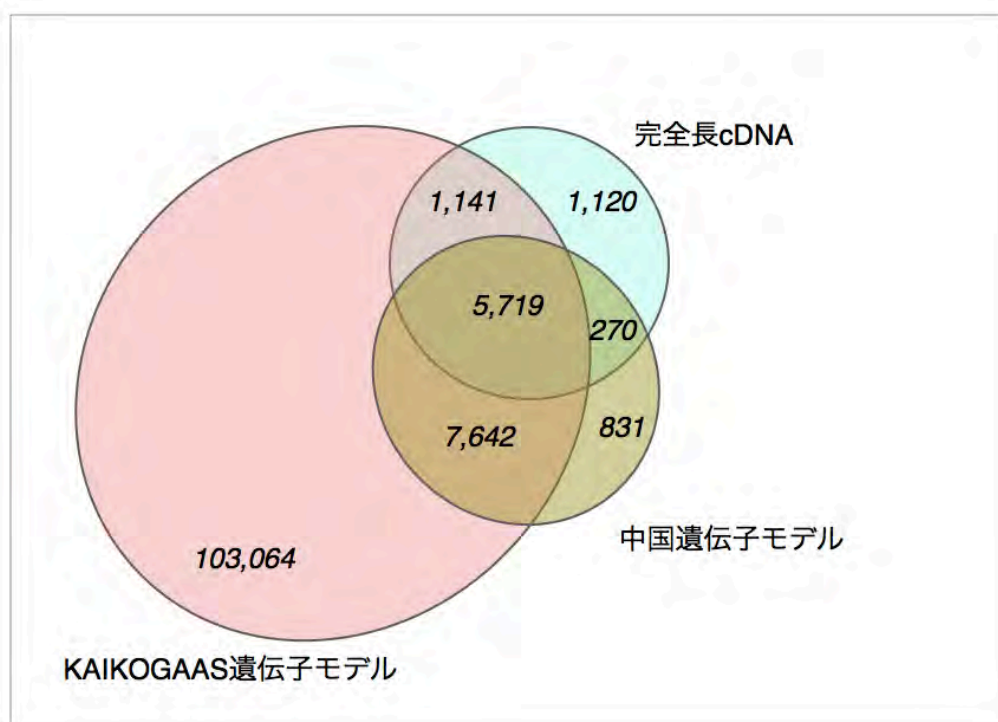


図 1 完全長 cDNA と予測遺伝子との比較 1

マップされた位置を互いに比較し、互いのオーバーラップを検出した。どちらの遺伝子モデルでも予測出来ない転写物を完全長 cDNA は含んでいる。

KAIKOGAAS 遺伝子モデル: KAIKOGAAS による遺伝子モデル

(<http://kaikogaas.dna.affrc.go.jp/>)、中国遺伝子モデル: GLEAN[2]により予測された遺伝子のセット

カイコゲノムアノテーションと専用ソフトウェア

本年度 11 月より、ポストゲノムにおける重要なタスクの一つであるゲノムアノテーションが開始される予定である。ゲノムアノテーションは、アノテーション・ジャンボリー(annotation jamboree)を開いて進められていく場合が多い。アノテーション・ジャンボリーでは世界中の研究者が集まって一定期間集中的に解析が行われる。しかし、カイコゲノムアノテーションは、世界中の研究者が自分の研究室に居ながらネットワーク越しを使ってアノテーションを行う形式(genome annotation by laboratories distributed over the world)で進められる。アノテーション・ジャンボリー形式によるゲノムアノテーションでも言うまでもないが、ゲノムアノテーションを効率的に進める上で重要なのが、アノテーション作業を支援する優れたソフトウェア環境の整備である。既に優れたアノテーションソフトウェアが開発・公開されており、多くのゲノムプロジェクトにおいて使われている。しかしそれらは非常に多機能である反面、導入がやや難しかったりする点などがあり、実験系研究者が大多数を占めるカイコのゲノムアノテーション作業には向かない点があった。そこで我々の研究グループでは、効率的なマニュアルゲノムアノテーションを支援するための専用ソフトウェア(アノテーション情報エディタ)を新たに開発中である(図 2)。本ソフトウェアは Web ブラウザを介して利用可能な Web アプリケーションとして開発が進められており、導入に必要な物は Web ブラウザのみとなっている。また、フロントエンド側はシンプルで直感的なユーザーインターフェース(UI)とすることで、実験系研究者にとって予備的知識を必要とせず「すぐに使うことの出来る」ソフトウェアとなるように設計されている。バックエンド側にはこれまで多くのモデル生物のデータベース開発に使用されてきている GMOD プロジェクトの Chado リレーショナルデータベーススキーマ (<http://gmod.org/wiki/Chado>) を利用している。このデータベーススキーマは、配列、配列比較、形質、遺伝子型、オントロジー、文献など、生物情報データベースを構成する多種多様なデータを一括して格納出来ることが特長である。

カイコゲノムアノテーションでは Locus を単位としてアノテーション情報を付加していく。Locus とはこれまでに蓄積されてきた各種の配列情報(完全長 cDNA、EST、公的データベースに登録済み mRNA 配列、予測遺伝子)をグループ化して作成されたものである。今回アノテーション対象となるのは少なくとも EST をメンバー配列としてもつ Locus であり、その数は約 17,000 である。今回のカイコゲノムアノテーション(silkworm genome annotation version 1)では、これらの Locus 全てに専用ソフトウェアを使って機能をアサインしていく予定である。

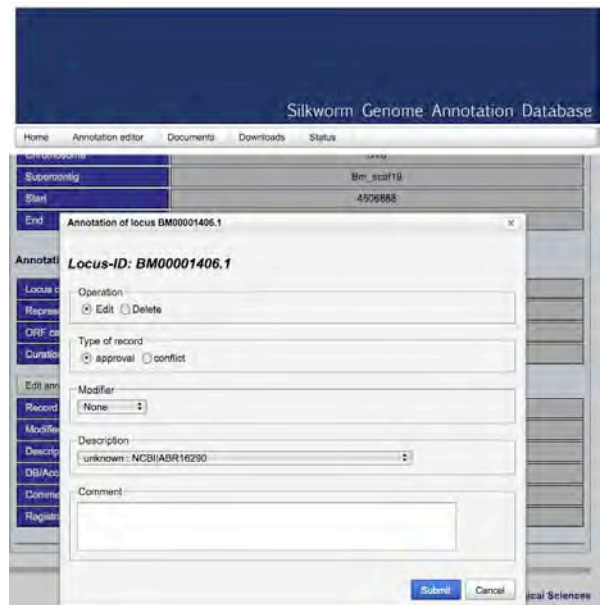
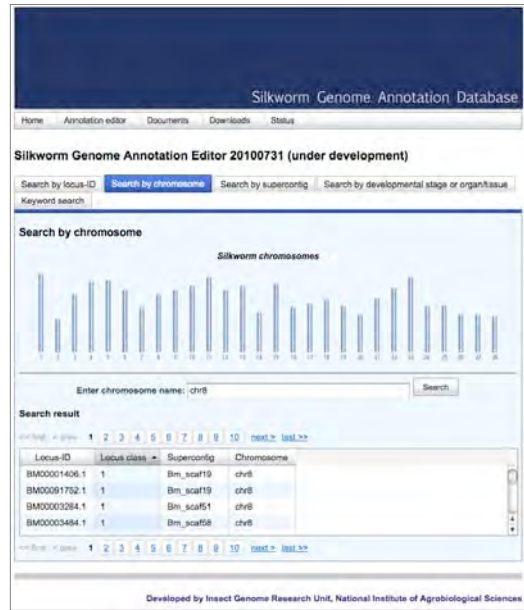


図 2. 開発中のカイコゲノムアノテーション情報エディタ
 (左上) トップページ。(右上) 検索結果の表示。指定した染色体番号上にマップ
 されている Locus がテーブル上に表示されている。(左下) Locus メンバー配列の
 詳細情報。Locus を構成する各配列のマップ位置、機能アノテーション情報、配
 列情報等を閲覧できる。(右下) アノテーション情報編集画面。

KAIKObase Version 3 の公開

また一方、当研究グループでは、カイコゲノム情報統合データベース KAIKObase[3]を開発・公開しており年々機能拡充を進めてきているが、今回のカイコゲノムアノテーションに合わせて KAIKObase version 3 を公開する予定である。開発中のカイコゲノムアノテーションエディタは、キュレーションを行う上で必要となる様々な情報へアクセス出来るように外部データベース(UniProtKB, NCBI 等)へのリンクが張られているが、その一つとして KAIKObase 上のゲノムブラウザ(GBrowse)や GeneViewer へも直接アクセス出来るように作成されている。また、今後公開される KAIKObase version3 では、アノテーションエディタの仕様に合わせて、完全長 cDNA 情報や Locus へアクセス出来るようにトラックの追加などが行われる。さらに、カイコゲノムアノテーションが完了した後は、高品質なアノテーション情報を順次 KAIKObase 側に反映していく予定である。カイコゲノムアノテーション・バージョン 1 の KAIKObase への反映はおよそ 1 年後を予定している。

おわりに

最後に、KAIKObase の今後の方向性について触れたい。図 3 は、公的データベース上に登録されている昆虫の EST の数をまとめたものである。これまでに公的データベースに蓄積されてきた昆虫のゲノム情報は膨大な量となっている。今後次世代型 DNA シークエンサーのオミックス解析などへの利用拡大により、蓄積量は急速に増加すると思われる。KAIKObase を害虫防除技術開発にとって有効なツールとして発展させていくためには、高品質なアノテーション情報の付加されたカイコゲノム情報を基本としつつ、これら公的データベース上の昆虫ゲノム情報を最大限に活用していくことが大事であると考え。今後の KAIKObase の課題は、種間比較解析結果等をいかに視覚化、データベース化してユーザーに提供できるか？ということであると考えている。その実現には、シーケンシングの超ハイスループット化に対応出来る、高速・低コストな計算機リソースを整備する必要があり、これまで以上に情報工学の重要性が増すと感じている。

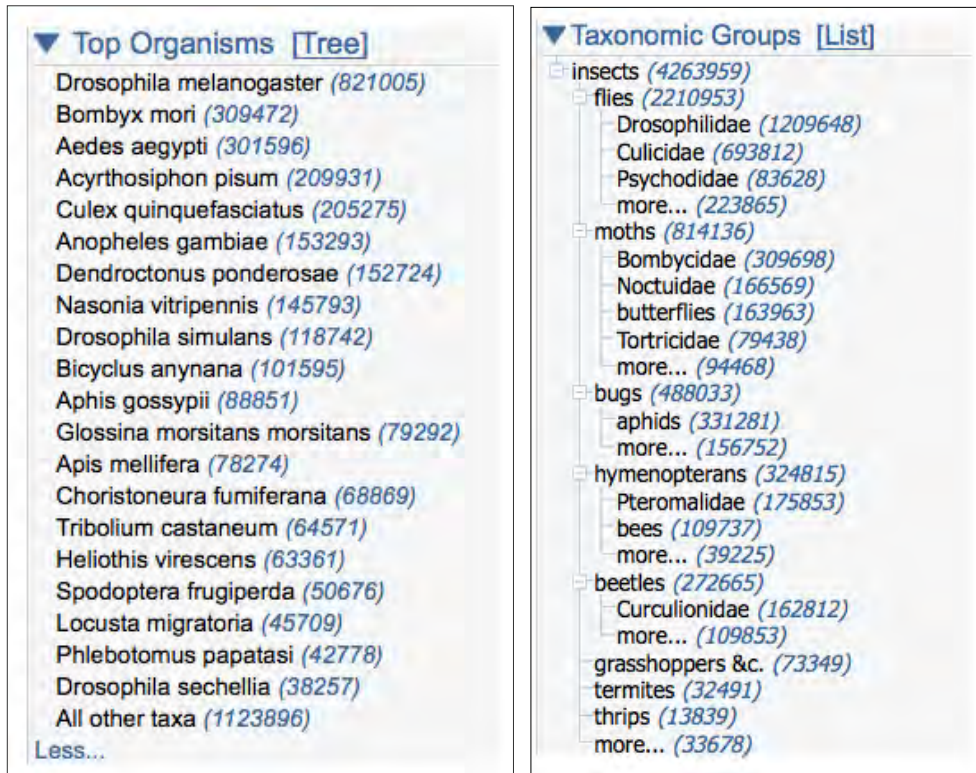


図3 公的データベース(NCBI)に登録されている昆虫ゲノム情報 (EST)
(2010/08/07 現在)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest> より引用

文献

[1] The International Silkworm Genome Consortium (2008) *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38: 1036-1045

[2] GLEAN

<http://www.webcitation.org/query.php?url=http://sourceforge.net/projects/glean-gene&efdoi=10.1186/gb-2007-8-1-r13>

[3] Shimomura *et al.* (2009) *BMC Genomics*. 10:486

NIAS シンポジウム「ポストゲノム時代の害虫防除研究のあり方」事務局
独立行政法人農業生物資源研究所 篠田徹郎、山本公子、塩月孝博
E-mail : insectgenome@nias.affrc.go.jp
FAX:029-838-6028