



チョウ目昆虫カイコの休眠制御関連遺伝子の探索

江木, 雄一

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2023-03-25

(Date of Publication)

2024-03-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8661号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100482409>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文

チョウ目昆虫カイコの休眠制御関連遺伝子の探索

2023 年 1 月

神戸大学大学院 農学研究科

生命機能科学専攻 農環境生物学講座

昆虫分子機能科学研究室

171A551A 江木雄一

本稿に含まれる出版論文の目録

第2章は次の論文からなる。

Egi Y., Akitomo S., Fujii T., Banno Y. and Sakamoto K. (2014) Silkworm strains that can be clearly destined towards either embryonic diapause or direct development by adjusting a single ambient parameter during the preceding generation. *Entomological Science*, 17, 396-399.

第3章は次の論文からなる。

Akitomo S.*, Egi Y.*, Nakamura Y., Suetsugu Y., Oishi K. and Sakamoto K. (2017) Genome-wide microarray screening for *Bombyx mori* genes related to transmitting the determination outcome of whether to produce diapause or nondiapause eggs. *Insect Science*, 24, 187-193. *Equal contribution.

第4章は次の論文からなる。

Egi Y. and Sakamoto K. (2022) Genome-wide screening of genes involved in programming diapause in the next generation in silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *European Journal of Entomology*, 119, 405-412.

目次

第1章	序論	1
第2章	休眠制御可能なカイコ系統の選別	11
	背景	11
	材料と方法	12
	結果	13
	考察	19
第3章	DNA マイクロアレイ解析を用いたカイコの休眠制御関連遺伝子の検索	22
	背景	22
	材料と方法	24
	結果	28
	考察	34
第4章	CAGE 解析を用いたカイコの休眠制御関連遺伝子の検索	37
	背景	37
	材料と方法	39
	結果	43
	考察	55
	図表（補足）	58
第5章	総合考察	68
	要旨	75
	謝辞	79
	参考文献	80

第1章

序論

昆虫の休眠について

昆虫の多くは、高温や乾燥、低温等にさらされる成長に不適切な季節を、休眠という代謝を極端に抑えた生理状態でやり過ごす。生存に不利な季節の到来を予測して、事前に能動的に発育を停止させることが休眠の特徴である。昆虫は休眠に入ると、エネルギー蓄積関連の代謝系や、老化や環境ストレスへの防御機能を活性化させることで苛酷な環境に対する耐性を向上させ、厳しい季節が続く間は休眠状態を維持する（Denlinger 2002）。体の小さい変温動物である昆虫は、休眠という仕組みを獲得することで、温帯および高緯度地方への分布域の拡大が可能となったと考えられる。

昆虫がどの発達段階で休眠に入るかは、種ごとに決まっている。卵、幼虫、蛹または成虫のいずれの場合もある（表 1-1）（Denlinger 2002, Mori et al. 1981, Miki et al. 2020, Saunders 1966, Tanaka 1966, Moribayashi 1950, 石黒ら 2015, Ikeno et al. 2010）。

表 1-1. 各昆虫の休眠ステージ

休眠ステージ	種
卵	カイコ (<i>Bombyx mori</i>)、ヒトスジシマカ (<i>Aedes albopictus</i>)
幼虫	タンボコオロギ (<i>Modicogryllus siamensis</i>)、キョウソヤドリコバチ (<i>Nasonia vitripennis</i>)
蛹	サクサン (<i>Antheraea pernyi</i>)、ニクバエ (<i>Boettcherisca peregrina</i>)
成虫	コガタルリハムシ (<i>Gastrophysa atrocyanea</i>)、ホソヘリカメムシ (<i>Riptortus pedestris</i>)

休眠を誘導する環境情報には、日長、気温、餌の組成等があることが知られているが、多くの昆虫では、季節変化を予測する指標として、気象条件に左右される気温よりも、周囲の環境からの影響を受けない日長が利用されることが多い (Denlinger et al. 2012)。例えば、蛹で休眠して越冬するタバコスズメガ (*Manduca sexta*) では、卵期と幼虫期に経験する短日が蛹休眠を誘導する (ソーンダース 1981)。昆虫では、複眼や単眼といった視覚系だけでなく、脳でも日長情報を受容する種が存在する (ソーンダース 1981, Numata et al. 1997)。サクサン (*Antheraea pernyi*)、カイコ (*Bombyx mori*)、アブラムシ (*Megoura viciae*) などは脳で、ホソヘリカメムシ (*Riptortus pedestris*) やタンボコオオロギ (*Modicogryllus siamensis*) などは複眼で日長情報を受容することが知られている (Williams and Adkisson 1964, Numata et al. 1997, Tomioka and Sakamoto 2007)。受容した環境情報を統合して休眠モードがプログラムされると、そのプログラムをもとに内分泌系が調節される。内分泌系に関しては、幼若ホルモン (JH)、エクダイソン、前胸腺刺激ホルモン (PTTH) を介した休眠誘導過程が明らかにされている (Denlinger et al. 2012)。休眠誘導に関与するホルモンとその働き方は、種によって異なっている。ニカメイチュウ (*Chilo suppressalis*) では JH の分泌によって幼虫休眠が誘導されるが (Yagi and Fukaya 1974)、ホソヘリカメムシでは JH の分泌抑制によって成虫休眠が誘導される (Ikeno et al. 2010)。一方、ニクバエ (*Sarcophaga argyrostoma*) の蛹休眠やマイマイガ (*Lymantria dispar*) の幼虫休眠は、エクダイソンの分泌抑制によって誘導される (Richard et al. 1987, Denlinger et al. 1997)。

以上のように、環境情報の受容系と内分泌系に関しては研究が進んでいる。一方、受容した環境情報を統合して休眠モードを決定する機構については、時計遺伝子の

RNA 干渉 (RNAi) による機能抑制が日長応答性を攪乱させることから、日長の測定に概日時計が関与することが示唆されている (Sakamoto et al. 2011, Ikeno et al. 2010)。また、最近の研究から、アカイエカ (*Culex pipiens*) ではインスリンシグナル伝達系が、タンボコオロギでは JH シグナル伝達系が日長依存的な休眠制御関与することが示唆されている (Sim and Denlinger 2009, Miki et al. 2020)。しかし、環境刺激に依存的な休眠制御機構は外因性休眠において最も重要な仕組みであるにも関わらず、その分子メカニズムに対する包括的な説明はまだなされていない。

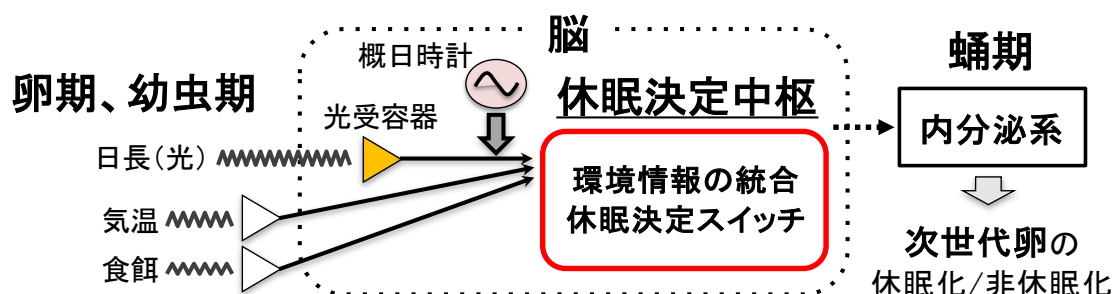
カイコの休眠について

カイコは、数千年前に家畜化され、有用な絹糸昆虫として利用されてきた。カイコは飼育が容易であり、発育が斉一な個体を大量に準備することができる。そして、大きな体サイズは解剖に向いており、バイオハザードの心配がないため、扱いが容易である。カイコは実験動物としての利点が多いので、遺伝学、生理学のモデル動物として古くから研究されており、遺伝情報や生理情報に関する知見が豊富である。また、カイコは、チョウ目農業害虫とのゲノム類似性が高いことから、チョウ目害虫のモデル動物とされている。最近では、薬物動態機構に哺乳類との共通性があることが分かり、創薬研究のモデルとして活用されることも期待されている (Panthee et al. 2017)。

カイコは卵で、つまり胚発生初期に細胞分裂が停止された状態で休眠する。カイコの卵休眠は、母性制御されている。外因性休眠を行う二化性の系統では、母蛾の卵期と幼虫期に受容した環境情報が統合されて次世代卵の休眠モードが決定される (Kogure 1933, Yamashita and Hasegawa 1966)。そして、決定された休眠モードをも

とに蛹期の内分泌系が調節され、休眠ホルモンの分泌の有無によって次世代卵が休眠化または非休眠化される（図 1-1）（Fukuda 1951, 1952）。

図 1-1. 母親による次世代卵の休眠制御モデル



卵休眠を誘導する刺激には、日長、気温、餌の組成等がある。母親の、卵期の高温条件や幼虫期の短日条件が次世代卵の休眠化を誘導し、卵期が低温条件の場合や幼虫期が長日条件の場合は非休眠卵となる傾向がある（Kogure 1933）。環境情報の受容系については、前述したように、幼虫期の日長情報が脳の光受容器によって受容される（Numata et al. 1997）。一方、卵期では、温度情報の受容に温度感受性 TRP チャンネルが関与することが示唆されている（Sato et al. 2014）。また、桑葉と人工飼料を用いた飼育実験から、餌の組成が次世代卵の休眠誘導に影響を与えることが報告されている（Tsuchida and Yoshitake 1979）。カイコでは、組織培養実験等から、休眠決定中枢が幼虫の脳に存在することが示されている（Hasegawa and Shimizu 1987）。

カイコは古くから休眠研究に用いられており、環境情報の入力系と内分泌系に関しては研究が進んでいる。しかし、休眠決定機構に関しては未だに不明な部分が多い。現在のところ、カイコでも日長の測定に概日時計が関与することが示唆されて

いるが (Ikeda et al. 2019)、他の昆虫において制御因子と考えられているインスリンシグナル伝達系や JH シグナル伝達系の関与は確認されていない。

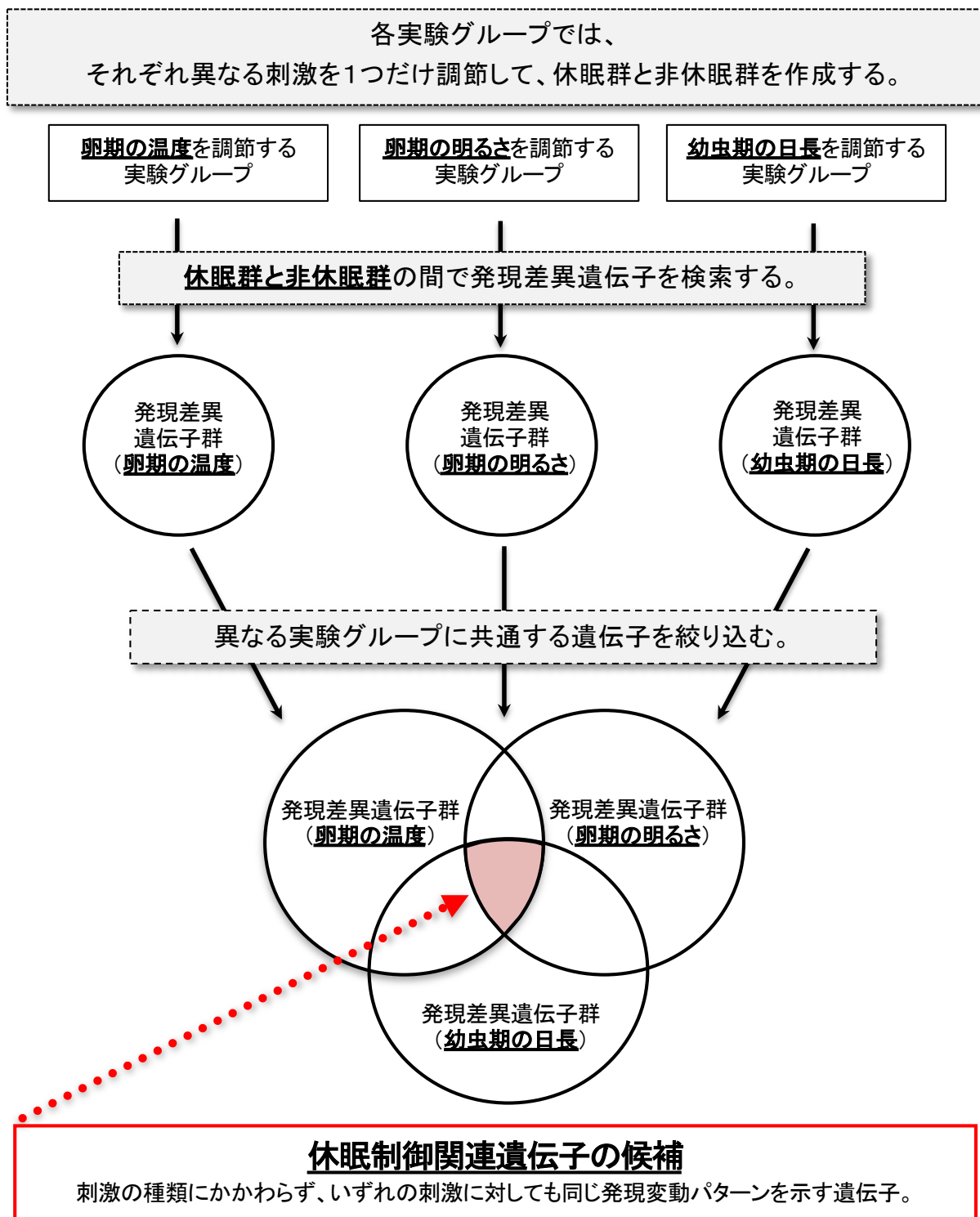
カイコの休眠研究から得られる成果は、昆虫の休眠制御メカニズムの解明に貢献するだけでなく、産業分野への応用も期待される。休眠制御メカニズムを作用点とする新たな害虫防除方法の開発や、カイコの飼育や保存等の管理事業の効率化に寄与できる。以上の理由から、カイコの休眠制御機構の分子メカニズムを解明することは重要であると考えられる。

研究の流れ

カイコの休眠制御機構の分子メカニズムを解明するために、本研究では、網羅的な遺伝子発現解析技術である DNA マイクロアレイ解析と CAGE 解析を用いて、休眠制御関連遺伝子のスクリーニングを試みた。

スクリーニングを行うにあたり、「休眠制御関連遺伝子は、休眠卵産下個体と非休眠卵産下個体の間で発現差異を示す」という仮説を立てた。そこでまず、休眠誘導刺激を調節して、休眠卵産下個体群（休眠群）と非休眠卵産下個体群（非休眠群）を作成する。次に、2つの実験群間で、休眠制御中枢が存在する幼虫脳内の遺伝子発現プロファイルを比較し、発現差異遺伝子を検索する。しかし、この方法では、休眠制御とは関係のない遺伝子も多く含まれる可能性があり、候補遺伝子の絞り込みが困難になる。例えば、温度を休眠誘導刺激として使用すると、休眠制御とは無関係な温度依存的に発現変動を示す遺伝子も応答してしまう。休眠制御に関与しないこうした遺伝子を除去するために、本研究では、次の方法でスクリーニングを行った（図 1-2）。実験グループごとに異なる刺激で休眠を誘導し、各実験グループ内で休眠群と非休眠群の間で、発現差異を示す遺伝子を検索する。次に、各実験グループから得られた発現差異遺伝子のうち、いずれの実験グループにも共通する遺伝子を絞り込む。つまり、ここでは「休眠制御関連遺伝子は、休眠誘導刺激の種類にかかわらず同じ発現変動パターン（増加または減少）を示す」という仮説を立てている。

図 1-2. スクリーニングの方法



本研究では最初に、スクリーニングに必要となる、休眠制御可能な系統の選別から着手した。二化性系統を対象として、卵期の温度、卵期の明るさ、および幼虫期の日長を調節して、休眠応答性を調べた。そして、3種類の刺激のいずれに対しても厳密な休眠制御が可能な系統を選別した。

スクリーニングでは、ゲノムワイドな遺伝子発現の解析に、DNA マイクロアレイ解析と CAGE 解析を使用した。実験に用いた休眠誘導刺激は、DNA マイクロアレイ解析を使用したスクリーニングでは、卵期の温度、または卵期の明るさの2種類、そして、CAGE 解析を使用したスクリーニングでは、卵期の温度、卵期の明るさ、または幼虫期の日長の3種類であった。CAGE 解析を用いたスクリーニングから得られた候補遺伝子に対しては RNAi 実験を行い、休眠制御に本質的に関与しているかどうかを検証した。

論文の構成

第2章では、スクリーニングに必要となるカイコ系統の選別と飼育条件の確立について述べる。二化性と考えられている10系統を対象とし、卵期の温度、卵期の明るさ、及び幼虫期の日長を調節して、休眠応答性を調べた。3種類の刺激のいずれに対しても厳密な休眠制御が可能な系統を選別した

第3章では、DNA マイクロアレイ解析を使用したスクリーニングについて述べる。休眠誘導刺激として、卵期の明るさ、または卵期の温度を用いた2つの実験グループを作成した。各実験グループ内で、幼虫脳内の遺伝子発現プロファイルを、休眠群と非休眠群間でDNA マイクロアレイ解析を使用して比較解析し、発現パターンが異なる遺伝子群を検索した。そして、休眠誘導刺激の異なる2つの実験グループで、同様な発現変動パターンを示す遺伝子を絞りこんだ。

第4章では、CAGE 解析を使用したスクリーニングについて述べる。休眠誘導刺激として、卵期の明るさ、卵期の温度、または幼虫期の日長を用いた3つの実験グループを作成した。各実験グループ内で、幼虫脳内の遺伝子発現プロファイルを、休眠群と非休眠群間でCAGE 解析を使用して比較解析し、発現パターンが異なる遺伝子群を検索した。そして、休眠誘導刺激の異なる3つの実験グループで、同様な発現変動パターンを示す遺伝子を絞りこんだ。得られた候補遺伝子に対しては、RNAi による機能解析を行った。

第5章では、第2-4章の内容をもとに、スクリーニングから得られた候補遺伝子についての総合的な考察を述べる。

第2章

休眠制御可能なカイコ系統の選別

背景

カイコは卵で休眠し、二化性系統では、母親が卵期と幼虫期に経験した環境刺激をもとに次世代卵の休眠モードが決定される（Kogure 1933, Yamashita and Hasegawa 1966）。第1章で述べたように、本研究では休眠制御関連遺伝子を検索するために、休眠卵産下群（休眠群）と非休眠卵産下群（非休眠群）の間で発現差異を示す遺伝子をスクリーニングする。実験群を作成するためには、厳密な休眠制御が可能な系統、つまり適当な刺激を与えることで次世代卵の休眠率を0%（非休眠）または100%（休眠）に制御できる系統が必要である。

本章では、スクリーニングに必要なカイコ系統を選別した過程とその結果について述べる。二化性の10系統に対して、母親の卵期および幼虫期の環境条件（卵期の温度と明るさ、および幼虫期の日長）を調節して次世代卵の休眠応答性を調べ、我々の実験室環境で厳密な休眠制御が行える系統を選別した。

材料と方法

対象としたカイコ系統

カイコ系統の保存や提供を行うナショナルバイオリソースプロジェクト (<http://www.shigen.nig.ac.jp/silkwormbase/index.jsp>、九州大学大学院 農学研究院) において二化性と報告されている 10 系統 (c10、g32、k06、n25、p21、p22、p24、p44、p50、および p63) の休眠卵を、同機関より取り寄せた (表 2-1)。

カイコの飼育条件

卵は、明るさについては恒明または恒暗で、そして、温度については 18°C、20°C、25°C、または 28°C で催青した。孵化した幼虫は、明期 8 時間：暗期 16 時間 (LD8:16)、LD12:12、または LD20:4 の日長条件で、成虫になるまで飼育し産卵させた。幼虫期の温度は 25°C とし、人工飼料の「シルクメイト PS」(日本農産工業株式会社、横浜市) を与えて自由摂食させた。なお、光源には白色蛍光灯 (照度 100-150 lux) を使用した。

休眠応答性の評価

各実験群において、産卵した全ての雌蛾に対する休眠卵産下個体の割合を休眠率 (%) とした。各個体が産下した卵に休眠卵と非休眠卵が混在する場合は、多い方の卵の休眠モードから、休眠卵産下個体か非休眠卵産下個体かを決定した。各卵の休眠・非休眠は、産卵後 25°C で 2 週間保護した際の孵化状況をもとに判定した。

結果

実験 I：卵期の温度と明るさが次世代卵の休眠率に与える影響

卵期の温度と明るさを調節して、各系統の次世代卵の休眠率を調べた。卵の催青は、20°C・恒明、20°C・恒暗、または 28°C・恒暗（p50 系統のみ 25°C）の 3 条件で行った。幼虫期の日長条件は、LD12:12 とした。

結果を表 2-1 に示す。卵期の明るさを恒暗に固定し、温度だけを 20°C または 28°C に調節した場合、28°C の実験群の方で休眠率が高くなる傾向にあった。20°C と 28°C の実験群間で休眠率を比較すると、その差が 70% 以上あった系統は、c10、n25、p22、および p50 であった。また、卵期の温度を 20°C に固定し、明るさだけを恒暗または恒明に調節した場合、恒明の実験群の方で休眠率が高くなる傾向にあった。恒暗と恒明の実験群間で比較をした場合も、休眠率に 70% 以上の差があった系統は、c10、n25、p22、および p50 であった。しかし今回の実験では、休眠率の差が 100% に達する実験条件は見つからなかった。

表 2-1. 実験 I : 卵期の温度と明るさが次世代卵の休眠率に与える影響

系統	起源	休眠率 (%) ^{*1}		
		20°C 恒明	20°C 恒暗	28°C 恒暗
c10	乞食：日本種・在来種	76.2	0.0	89.5
g32	紹興：中国種・在来種	100.0	100.0	100.0
k06	クワコ (<i>Bombyx mandarina</i>) との交雑種	100.0	84.2	100.0
n25	鐘音：日中交雑種	100.0	16.7	100.0
p21	千代鶴：日本種・在来種	100.0	100.0	100.0
p22	日本錦：日本種・在来種	70.4	0.0	92.9
p24	日 124 号：日本種・改良種	100.0	100.0	100.0
p44	九蚕支 101 号：中国種・改良種	89.5	40.7	90.6
p50	大造：中国種・在来種	87.9	14.3	100.0 ^{*2}
p63	支 131：中国種・改良種	95.8	66.7	100.0

幼虫期の日長条件は LD12:12 とした。*¹ 各実験群において、休眠卵産下蛾の割合を休眠率 (%) とした (各実験群 n = 10-33 頭)。*² p50 系統の卵は、28°C では孵化した幼虫はごくわずか (5% 未満) であった。そのため、p50 系統のみ、卵を 25°C で催青した (25°C ではほとんどの幼虫が正常に孵化した)。

実験Ⅱ：幼虫期の日長条件が次世代卵の休眠率に与える影響

次に、幼虫期の日長条件を調節して、各系統の次世代卵の休眠率を調べた。幼虫期の日長条件として、短日は LD8:16 を、長日は LD20:4 を用いた。

結果を表 2-2 に示す。短日条件の実験群の方で、長日条件の実験群よりも休眠率が高くなる傾向にあった。短日条件の場合、p63 以外の系統では休眠率が 100%であった。一方、長日条件で休眠率が 0%となった系統は、p44 と p50 だけであった。以上の結果から、日長条件を調節した実験群間の休眠率の差が 100%となった系統は、p44 と p50 であった。

本実験における各系統の卵期の環境条件は、卵期の温度と明るさを調節した実験Ⅰの結果をもとに決定した（表 2-1）。カイコでは一般に、母親の幼虫期を短日にする、と、長日にした場合よりも次世代卵の休眠率が高くなる傾向にあることが報告されている（Hasegawa and Shimizu 1987）。したがって、短日の LD8:16 と長日の LD20:4 の間で、休眠率の差を最大にするためには、短日の LD8:16 における休眠率を 100%にする必要がある。実験Ⅰは LD12:12 の短日下で行っているが、卵期の温度を上げると休眠率も高くなることが示唆されている。これらをふまえて、本実験の卵期の温度については、実験Ⅰにおいて 20°C・恒暗条件での休眠率が、50%以上の系統では 20°Cのままとし、50%未満の系統では温度を上げて 25°Cとした。卵期の明るさについては、恒暗とした。

表 2-2. 実験Ⅱ：幼虫期の日長条件が次世代卵の休眠率に与える影響

系統	卵期の温度	休眠率 (%) ^{*1}	
		LD8:16	LD20:4
c10	25°C	100.0	52.6
g32	20°C	100.0	27.3
k06	20°C	100.0	72.0
n25	25°C	100.0	57.9
p21	20°C	100.0	66.7
p22	25°C	100.0	40.0
p24	20°C	100.0	89.5
p44	25°C	100.0	0.0
p50	25°C	100.0	0.0
p63	20°C	63.6	40.0

卵期の明るさは恒暗とした。^{*1}各実験群において、休眠卵産下蛾の割合を休眠率 (%) とした (各実験群 n = 11-36 頭)。

実験Ⅲ：卵期の温度を 18℃とした場合の次世代卵の休眠率

実験Ⅰでは、実験群間の休眠率の差が大きかった系統は、c10、n25、p22、および p50 であったが、いずれの系統においても休眠率の差を 100%にする実験条件は見つからなかった（表 2-1）。そのため、休眠率の差を 100%に近づけるための実験条件を検討した。実験Ⅰから、これらの系統では、次世代卵の休眠率が母親の卵期の温度に大きく依存しており、卵期の温度が低いと休眠率が低くなることが示唆されている。そこで、本実験では、卵期の温度を 20℃からさらに下げて 18℃とした。卵期の明るさは、恒明または恒暗とした。卵期の温度を下げることで、恒暗条件下での休眠率が低下し、恒暗と恒明の実験群間で休眠率の差が広がるのではないかと期待した。幼虫期の日長条件としては、卵期が恒明の場合には短日として LD12:12 を、恒暗の場合には短日として LD12:12 および LD8:16 を用いた。

結果を表 2-3 に示す。卵期の明るさだけを恒明または恒暗に調節した場合、実験群間で休眠率の差が 100%となった系統は、p50 のみであった。また、実験Ⅰ、ⅡおよびⅢの結果から、卵期を恒暗、幼虫期を LD8:16 に固定し、卵期の温度だけを 25℃または 18℃に調節した場合、2つの実験群間の休眠率の差が 100%となる系統は、c10、p22、および p50 であった（25℃で 100%、18℃で 0%）。この条件で、p50 系統では、幼虫期の短日条件を LD8:16 の代わりに LD12:12 としても、25℃と 18℃の実験群間の休眠率の差が 100%となった。

表 2-3. 実験Ⅲ： 卵期の温度を 18℃とした場合の次世代卵の休眠率

系統	卵期の明るさ 幼虫期の日長条件	休眠率（%） ^{*1}		
		恒明 LD12:12	恒暗 LD12:12	恒暗 LD8:16
c10		42.1	0.0	0.0
n25		95.1	4.3	11.5
p22		66.7	0.0	0.0
p50		100.0	0.0	0.0

卵期の温度は 18℃とした。^{*1} 各実験群において、休眠卵産下蛾の割合を休眠率（%）とした（各実験群 n = 16-45 頭）。

考察

卵期の温度だけを調節することで休眠制御可能な系統は、c10、p22、および p50 であった。これらの系統では、他の条件を固定し、卵期の温度を 18°C（非休眠群）または 25°C（休眠群）にすると、次世代卵の休眠率を 0%または 100%にすることができた。一方、卵期の明るさだけを調節することで休眠制御可能な系統は、p50 のみであった。他の条件を固定し、卵期の明るさを恒暗（非休眠群）または恒明（休眠群）にすると、次世代卵の休眠率を 0%または 100%にすることができた。幼虫期の日長条件だけを調節することで休眠制御可能な系統は、p44 と p50 であった。これらの系統では、他の条件を固定し、幼虫期の日長条件を長日として LD20:4（非休眠群）または短日として LD8:16（休眠群）にすると、次世代卵の休眠率を 0%または 100%にすることができた。また、p50 系統では、短日として LD8:16 の代わりに LD12:12 を用いても、実験群間の休眠率の差を 100%にすることができた。

以上の結果から、卵期の温度と明るさ、および幼虫期の日長条件のいずれに対しても、1つの刺激条件だけを調節することで、次世代卵の休眠率を 0%または 100%に制御できる系統は、p50 だけであった。p50 の休眠モードを制御するために以下の刺激条件が利用できることがわかった：卵期の温度では 18°Cおよび 25°C、卵期の明るさでは恒暗および恒明、幼虫期の日長条件では長日として LD20:4 および短日として LD12:12（表 2-4）。ここで、幼虫期の日長条件を調節して休眠モードを制御する実験グループでは、短日として LD8:16 も利用できるが、LD12:12 を利用することで、卵期の温度または明るさで休眠誘導を行う実験グループと幼虫期の日長条件が同じになるため、実験条件の管理が容易になると考えた。

表 2-4. p50 系統における母親世代の卵期と幼虫期の刺激条件と次世代卵の休眠応答性

卵期と幼虫期の刺激条件			
卵期の温度	卵期の明るさ	幼虫期の日長条件	休眠率 (%)
18°C	恒暗	LD12:12	0.0
25°C	恒暗	LD12:12	100.0
18°C	恒暗	LD12:12	0.0
18°C	恒明	LD12:12	100.0
25°C	恒暗	LD20:4	0.0
25°C	恒暗	LD12:12^{*1}	100.0

幼虫期の温度は 25°C とした。^{*1} 日長条件によって休眠を誘導する場合には、短日として LD8:16 も用いることができる。

これまでの系統選別の結果を鑑み、本研究のスクリーニングでは p50 を研究対象とすることにした。p50 系統では、3 種類の異なる刺激（卵期の温度、卵期の明るさ、幼虫期の日長）を用いて、休眠モードを制御することが可能である。しかも、3 種類の刺激条件のいずれに対しても、1 つの条件だけを調節することで、休眠群と非休眠群を作成することができる。したがって p50 系統を使用すれば、異なる刺激条件を 1 つだけ調節した実験グループを 3 種類用意することができる。そして、各実験グループ内の休眠群と非休眠群の間で発現差異遺伝子の検索を行う。さらに、各実験グループ間から得られた発現差異遺伝子のうち、いずれの実験グループにも共通する遺伝子を絞り込む。そうすることによって、休眠誘導刺激に対しては応答するが、休眠制御とは関係のない遺伝子を除去することが可能となり、休眠制御に関連する遺伝子を効率的にスクリーニングすることができる。つまりここでは、

「睡眠制御に本質的に関わる遺伝子は、異なる種類の睡眠誘導刺激に対しても、同じ発現応答を示す」という仮説をたてている。

第3章

DNA マイクロアレイ解析を用いた カイコの休眠制御関連遺伝子の検索

背景

カイコは、母性制御された卵休眠を行う。二化性の系統では、母親が卵期と幼虫期に受容した気温や日長などの環境情報をもとに次世代卵の休眠モードが決定される (Kogure 1933, Watanabe 1924, Egi et al. 2014)。この休眠モードのプログラミングは蛹化以前に完了し、それに従って蛹期では内分泌系が調節されて産下される卵の休眠化または非休眠化が起こる (Fukuda 1951, 1952)。幼虫の脳を対象とした組織移植実験などから、休眠モードのプログラミングは母親の脳で行われ、そのプログラムが脳に記憶されることが報告されている (Hasegawa and Shimizu 1987)。しかし、環境情報から休眠モードをプログラミングするメカニズムについては、分子レベルでは明らかになっていない。そこで我々は、休眠モードのプログラミングに関与する遺伝子のスクリーニングを試みた。関連遺伝子の同定が、休眠制御の分子メカニズムを解明する糸口になると考えた。

スクリーニングでは、「休眠モードのプログラミングに関連する遺伝子は、休眠卵産下群（休眠群）と非休眠卵産下群（非休眠群）の間で発現差異を示す」という仮説を立て、休眠群と非休眠群の間で幼虫脳内において発現量が異なる遺伝子を検索した。その際、実験群間の遺伝子発現を比較する方法として、網羅的な遺伝子発

現解析技術である DNA マイクロアレイ解析を用いた。カイコはゲノム配列が分かっているモデル動物であるため、DNA マイクロアレイ解析を利用することができた。

本研究では、異なる休眠誘導刺激を用いた 2 つの実験グループを作成した。一方の実験グループでは、卵期の温度だけを調節し、それ以外の環境条件は一定にして休眠群と非休眠群を作成した。もう一方の実験グループでは、卵期の明るさだけを調節し、それ以外の環境条件は一定にして休眠群と非休眠群を作成した。そして、各実験グループにおいて、休眠群と非休眠群間で発現差異を示す遺伝子を DNA マイクロアレイ解析を用いて検索した。得られた遺伝子の中から、休眠誘導刺激の異なる 2 つの実験グループ間で共通するものを、休眠制御関連遺伝子の候補として絞り込んだ。

材料と方法

実験動物と飼育

第 2 章の系統選別実験から p50 系統を研究対象とした。p50 系統の休眠卵は、ナショナルバイオリソースプロジェクト

(<https://www.shigen.nig.ac.jp/silkwormbase/index.jp>、九州大学大学院 農学研究院) より取り寄せた。

本研究では、卵期に与える休眠誘導刺激が異なる 2 つの実験を行った。第 2 章での結果を参考にし (Egi et al. 2014)、各実験では、休眠誘導刺激となる 1 つの環境パラメータだけを調節し、それ以外の条件は一定にして実験群を作成した。実験 I では卵期の温度を調節し、高温 (25°C) とすることで休眠群を、低温 (18°C) とすることで非休眠群を作成した。なお、卵期の明るさはいずれも恒暗とした。実験 II では卵期の明るさを調節し、恒明とすることで休眠群を、恒暗とすることで非休眠群を作成した。なお、卵期の温度はいずれも 18°C とした。

幼虫期の飼育条件は、実験 I、II とともに、温度は 25°C とし、日長条件は明期 12 時間：暗期 12 時間 (明期 = 9:00-21:00) とした。そして、人工飼料のシルクメイト PS (日本農産工業株式会社、神奈川県) を与えて自由摂食させた。光源には白色蛍光灯 (照度 100-150 lux) を使用した。また各実験群では、一部の個体を成虫まで飼育して雌蛾が産んだ卵の休眠モードを観察し、卵休眠の誘導が厳密に制御されていることを確認した (各実験群 n = 34-45 頭、詳細については第 2 章参照)。

幼虫からの組織採取

5 齢の 1 日目（4 齢幼虫が脱皮した日の翌日）の雌幼虫から、明期の中点（15:00）において脳を摘出し、液体窒素で急速凍結して-80°Cで保存した。保存した脳から total RNA を精製し、DNA マイクロアレイ解析とリアルタイム定量 PCR 解析に用いた。

DNA マイクロアレイ解析

DNA マイクロアレイ解析には、新たに設計されたカイコ用の 4×44K のカスタムオリゴマイクロアレイスライドを使用した（Nakamura et al. 2011, Tabunoki et al. 2013）。アレイスライドには、完全長のカイコ cDNA（Suetsugu et al. 2013）や EST 配列などから構築された 25,324 個の遺伝子配列に対応した 60mer のオリゴヌクレオチドプローブが、43,864 個のスポットに配置されている（No.2545996、Agilent Technologies、カリフォルニア州、アメリカ合衆国）。

脳サンプルからの total RNA 精製には、RNeasy Plus Micro Kit（Qiagen、東京都）を用いた（各実験群、n = 4 として、それぞれ 25-35 頭分の幼虫脳を使用）。RNA から合成した二本鎖 cDNA をテンプレートとして、Quick Amp Labeling Kit / Two-color（Agilent Technologies）を用いて、蛍光標識した cRNA を合成した。標識の組み合わせは、休眠群を Cyanine 3-CTP（Cy3）および非休眠群を Cyanine 5-CTP（Cy5）、または休眠群を Cy5 および非休眠群を Cy3 のいずれかとした。標識された cRNA を、Gene Expression Hybridization Kit（Agilent Technologies）を用いて、アレイスライド上のプローブにハイブリダイズさせた。

アレイスライドのスキャンには、G3565BA Microarray Scanner (Agilent Technologies) を用いて、ハイブリダイズさせたプローブの蛍光シグナルを検出した。蛍光シグナルは、G2565AA Feature Extraction Software v. 9.5 (Agilent Technologies) を用いて数値化して解析した。そして、休眠群と非休眠群の間で、シグナル値が 1.5 倍以上の差のあるプローブに対応する遺伝子を、発現差異遺伝子として検索した。

リアルタイム定量 PCR 解析

脳サンプルからの total RNA 精製には、RNeasy Plus Micro Kit を用いた (各実験群、n = 4-5 として、それぞれ 25-35 頭分の幼虫脳を使用)。RNA からの cDNA 合成は、ReverTra Ace qPCR RT Kit (東洋紡、大阪府) を用いて行った。PCR 試薬には、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (東洋紡) を用いた。使用したプライマーは以下に示す。

表 3-1. リアルタイム PCR 解析に用いたプライマー配列

遺伝子名	配列
<i>Cytochrome P450 18a1</i> (GenBank Acc.: NM_001083609)	Forward: 5'-ATTGTTTCCTTTGGCAACCAC-3' Reverse: 5'-AGAGATTCGGATCCATGTGC-3'
<i>Krüppel homolog 1</i> (GenBank Acc.: AB642242)	Forward: 5'-GAAACAATTTCGTTCTTCAGGTGACG-3' Reverse: 5'-TCGTGCGTGTGCTGTAAGCG-3'
<i>rp49</i> (GenBank Acc.: AB048205)	Forward: 5'-TCAATCGGATCGCTATGACA-3' Reverse: 5'-ATGACGGGTCTTCTTGTGTTGG-3'

PCR 反応は、ABI 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems、カリフォルニア州、アメリカ合衆国) を用いて、95°C で 60 秒の熱処理を行った後、熱変性は 95°C で 15 秒、アニーリングおよび伸長はあわせて 60°C で 60 秒の条件で 40 サイクル行った。PCR 産物の特異性は、サーマルサイクラーに付属のソフトウェアから

作成した融解曲線、およびアガロースゲル電気泳動により確認した。各遺伝子の mRNA 量は、ハウスキーピング遺伝子である *rp49* をリファレンスとして相対化し、検量線法によって定量した。統計処理では Student's *t*-test を行い、 $p < 0.05$ を有意とした。

結果

DNA マイクロアレイ解析

5 齢幼虫の脳内における遺伝子発現プロファイルを、休眠群と非休眠群の間で比較し、発現に差のある遺伝子を検索した。

実験Ⅰ： 卵期の温度による休眠制御

本実験では、卵期の温度のみを調節して休眠を制御した。卵期の温度を高温（25℃）とすることで休眠群を、低温（18℃）とすることで非休眠群を作成した。

休眠群において、非休眠群よりも DNA マイクロアレイ解析のシグナル値が 1.5 倍以上大きかったのは、9 個のプローブスポットに対応する 4 つの遺伝子であった（検索した総遺伝子数の 0.016%）。非休眠群において、休眠群よりもシグナル値が 1.5 倍以上大きかったのは、11 個のプローブスポットに対応する 7 つの遺伝子であった（検索した総遺伝子数の 0.028%）。

実験Ⅱ： 卵期の明るさによる休眠制御

本実験では、卵期の明るさのみを調節して休眠を制御した。卵期の明るさを恒明とすることで休眠群を、恒暗とすることで非休眠群を作成した。

休眠群において、非休眠群よりもシグナル値が 1.5 倍以上大きかったのは、25 個のプローブスポットに対応する 14 個の遺伝子であった（検索した総遺伝子数の 0.055%）。非休眠群において、休眠群よりもシグナル値が 1.5 倍以上大きかったのは、7 個のプローブスポットに対応する 4 つの遺伝子であった（検索した総遺伝子数の 0.016%）。

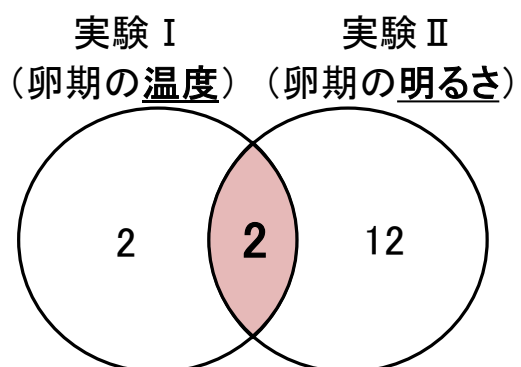
実験Ⅰと実験Ⅱの間で共通する発現差異遺伝子の絞り込み

卵期の温度または明るさを調節した2つの実験から得られた発現差異遺伝子を比較し、共通する遺伝子を絞り込んだ（図 3-1）。

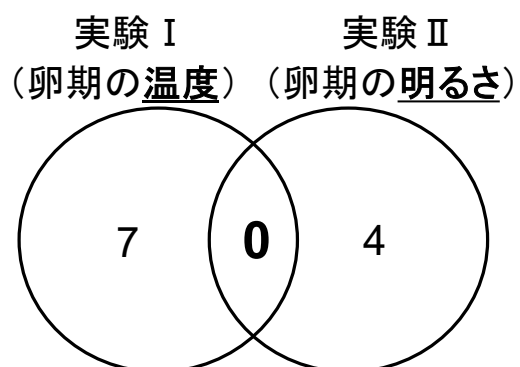
休眠群の方で発現量が多かった遺伝子のうち、実験間で共通するのは、*Cytochrome P450 18a1* (*Cyp18a1*) および *Krüppel homolog 1* (*Kr-h1*) の2つであった（表 3-1）。一方、非休眠群の方で発現量が多かった遺伝子の中には、実験間で共通するものは得られなかった（表 3-1）。

図 3-1. DNA マイクロアレイ解析で発現差異を示した遺伝子の数

休眠群で発現量が多い



非休眠群で発現量が多い



卵期の温度または明るさを調節して休眠を制御した時に、休眠群と非休眠群の間で DNA マイクロアレイ解析のシグナル値が 1.5 倍以上の差を示した遺伝子の数をベン図で示す。休眠群の方で発現量が多かったもののうち、2 つの遺伝子が実験 I と実験 II の間で共通していた。

表 3-1. DNA マイクロアレイ解析を用いて検索された発現差異遺伝子のシグナル比

遺伝子名	シグナル比（休眠群 / 非休眠群）	
	実験 I （卵期の温度を調節）	実験 II （卵期の明るさを調節）
<i>Cytochrome P450 18a1</i>	2.43	2.40
<i>Krüppel homolog 1</i>	1.62	1.53

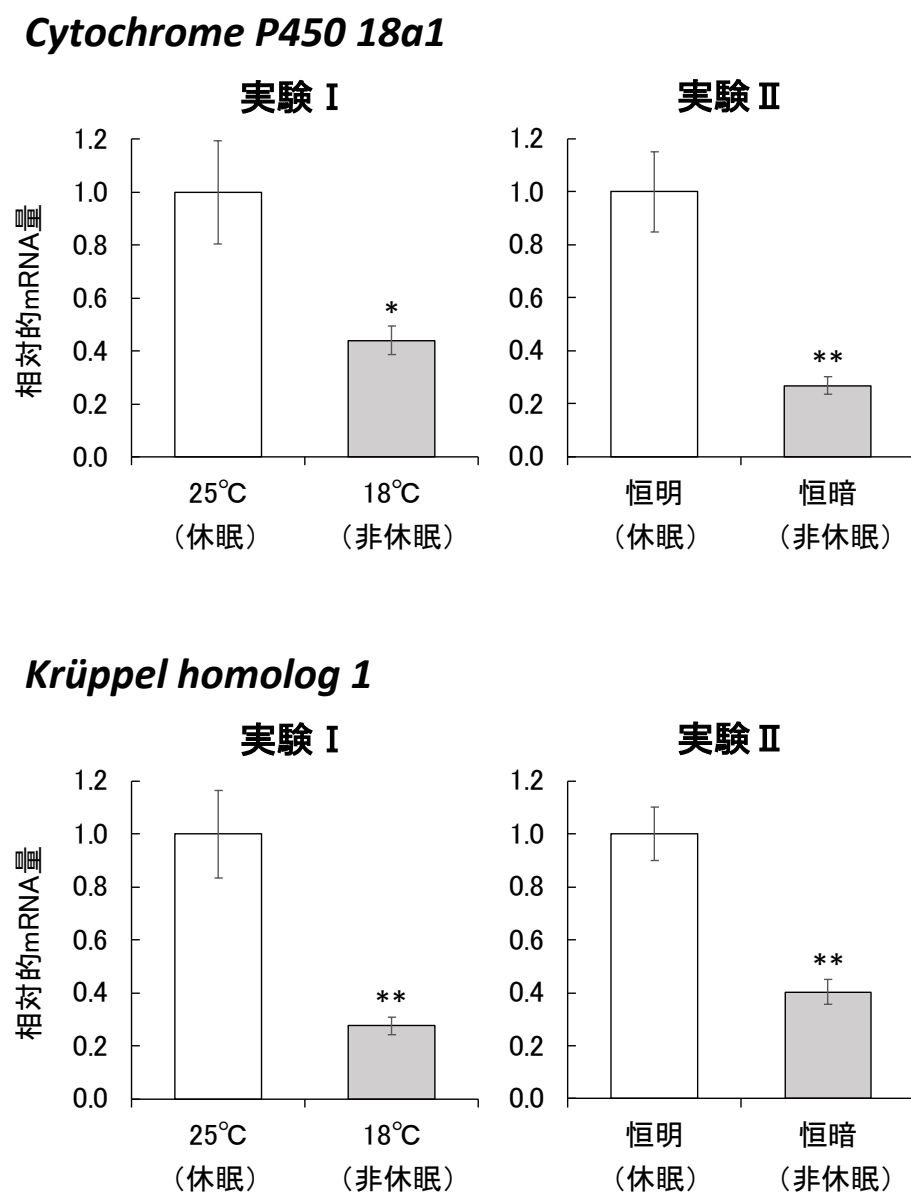
休眠群において、非休眠群よりも DNA マイクロアレイ解析のシグナル値が 1.5 倍以上大きかった遺伝子のうち、異なる実験間で共通していた 2 つの遺伝子。

リアルタイム定量 PCR 解析

DNA マイクロアレイ解析から、卵期の温度または明るさを調節した2つの実験間で共通する発現差異遺伝子として、*Cyp18a1* および *Kr-h1* が得られた。そこで、これらの遺伝子の発現パターンをリアルタイム定量 PCR 解析を用いて検証した。

DNA マイクロアレイ解析と同様の実験条件で休眠群と非休眠群を作成し、幼虫脳内における mRNA 量を比較した（図 3-2）。*Cyp18a1* の発現量は、卵期の温度または明るさを調節したいずれの実験でも、休眠群において非休眠群よりも多かった。*Kr-h1* の発現量も、いずれの実験でも、休眠群において多かった。以上の結果から、*Cyp18a1* と *Kr-h1* の発現量は、休眠誘導刺激の種類にかかわらず、休眠群において非休眠群よりも多いことが示された。

図 3-2. リアルタイム定量 PCR 解析による DNA マイクロアレイ解析の結果検証



実験 I では、卵期の温度を 25°C とすることで休眠群を、18°C とすることで非休眠群を作成した。実験 II では、卵期の明るさを恒明とすることで休眠群を、恒暗とすることで非休眠群を作成した。mRNA 量は平均値±標準誤差で表した (n = 4-5, Welch's t-test, *P < 0.05; **P < 0.01)。

考察

休眠群と非休眠群の間で発現差異を示した遺伝子のうち、異なる実験間で共通していたのは、*Cyp18a1* および *Kr-h1* であった。いずれの遺伝子も、休眠群の方で多く発現していた。各実験群の休眠モードは卵期の環境刺激に依存して決定されているので、幼虫期の脳で発現差があったこれらの遺伝子は、卵期から蛹期にかけての休眠モードのプログラミングに関与している可能性がある。

Cyp18a1 は、多くの昆虫に存在するシトクロム P450 遺伝子であり (Ai et al. 2011, Guittard et al. 2011)、変態に不可欠なステロイドホルモンのエクジステロイドを不活性化させる酵素をコードしている (Rewitz et al. 2010, Guittard et al. 2011)。

CYP18A1 タンパク質は、活性型エクジステロイドの 20-ヒドロキシエクダイソンの水酸化反応を触媒しており (Guittard et al. 2011)、この酵素活性はカイコの

CYP18A1 タンパク質にも保存されていることが示唆されている (Li et al. 2014)。

したがって、休眠群では、*Cyp18a1* の発現量が多かったことから、活性型エクジステロイドである 20-ヒドロキシエクダイソンの量が低レベルであった可能性が示唆される。

幼若ホルモン (Juvenile hormone: JH) の初期応答遺伝子である *Kr-h1* は、カイコを含む昆虫において JH による変態抑制に関与するジンクフィンガー型転写因子をコードしている (Minakuchi et al. 2009, Konopova et al. 2011, Lozano and Belles 2011, Kayukawa et al. 2014, Smykal et al. 2014)。JH はメトプレン抵抗性 JH 受容体 (Met) を介して、*Kr-h1* を活性化する (Wilson and Fabian 1986, Ashok et al. 1998, Miura et al. 2005, Charles et al. 2011)。JH が結合した Met はステロイド受容体活性化補助因子 (SRC) と複合体を形成し (Li et al. 2011, Zhang et al. 2011, Kayukawa et al. 2012)、

JH/Met/SRC の複合体が *Kr-h1* の JH 応答配列に結合することで、その発現が誘導される (Kayukawa et al. 2012, 2014)。したがって、休眠群における *Kr-h1* の高発現は、JH の量が高レベルにあり、JH シグナル伝達系が活性化している可能性を示唆している。

昆虫の変態を制御する主要なホルモンのエクジステロイドと JH は (Kozlova and Thummel 2003, Delanoue et al. 2010, Riddiford et al. 2010)、休眠の制御にも関与していると考えられている (Nijhout 1994, Denlinger 2012)。エクジステロイドは、マイマイガ (*Lymantria dispar*) の幼虫休眠の誘導と維持に関与する (Lee and Denlinger 1997, Lee et al. 1997)。対照的にカイコでは、20-ヒドロキシエクダイソンは、発生を誘導して卵休眠を阻害する (Gharib et al. 1981, Makka et al. 2002)。ニカメイチュウ (*Chilo suppressalis*) やサトウダイコンガ (*Loxostege sticticalis*) (Yagi and Fukaya 1974, Jiang et al. 2011) では、JH 濃度が高いことが幼虫休眠の誘導と維持に関係していると報告されている。したがって、カイコの休眠群の 5 齢幼虫における低レベルのエクジステロイド、および高レベルの JH と JH シグナル伝達系の活性化は、次世代卵の休眠誘導に関与している可能性が考えられる。

しかしこれまで、これらのホルモンの投与によって、休眠が制御されることは示されていない (Moroboshi et al. 1972, Moroboshi and Ishida 1975)。したがって、ホルモン制御系以外にも未知の重要な因子が存在し、関連因子が協同的に機能することで、休眠が制御されるのではないかと推測される。今回の DNA マイクロアレイ解析では検出できた発現差異遺伝子の総数が少なく、ホルモン制御に関連するものしか得られなかった。マイクロアレイの感度が十分でなかったために、他の重要な因子が検出できていない可能性がある。それゆえ、新規の関連因子を発見するために

は、遺伝子発現の検出感度が高いシステムを用いてスクリーニングを行う必要があると考えられる。

第4章

CAGE 解析を用いた カイコの休眠制御関連遺伝子の検索

背景

カイコは、母性制御された卵休眠を行う。二化性の系統では、母親が卵期と幼虫期に受容した気温や日長などの環境情報をもとに次世代卵の休眠モードが決定される (Kogure 1933, Watanabe 1924, Egi et al. 2014)。この休眠モードのプログラミングは蛹化以前に完了し、それに従って蛹期では内分泌系が調節され、産下される卵の休眠化または非休眠化が起こる (Fukuda 1951, 1952)。幼虫の脳を対象とした組織移植実験から、休眠モードのプログラミングは母親の脳で行われ、そのプログラムが脳に記憶されることが報告されている (Hasegawa and Shimizu 1987)。しかし、環境情報をもとに休眠モードをプログラミングするメカニズムについては、分子レベルでは明らかになっていない。そこで我々は、カイコの休眠モードのプログラミングに関与する遺伝子のスクリーニングを試みた。関連遺伝子の同定が、休眠制御の分子メカニズムを解明する糸口になると考えた。

スクリーニングでは、「休眠モードのプログラミングに関連する遺伝子は、休眠卵産下群（休眠群）と非休眠卵産下群（非休眠群）の間に発現差異を示す」という仮説を立て、休眠群と非休眠群の間に幼虫脳内における発現差異遺伝子を検索した。第3章で述べたように、DNA マイクロアレイ解析を用いたスクリーニングでは感度が低く、検出できた発現差異遺伝子の総数が少なかった。そこで、本研究のスクリーニングでは、検出感度の高い CAGE (Cap Analysis of Gene Expression) を用いた。

CAGE 解析では、Cap 構造をもつ転写産物の 5'末端の短いタグ配列を次世代シーケンサーにより決定し、タグ配列の頻度を数値化して遺伝子の発現量を定量する。ゲノムワイドな遺伝子発現解析方法である CAGE 解析は、低レベルで発現している転写産物の量も正確に定量でき、転写産物の長さによるバイアスが無いといった特長をもつ (Carninci et al. 1997, Kodzius et al. 2006, Kanamori-Katayama et al. 2011, Itoh et al. 2012, Forrest et al. 2014, Murata et al. 2014)。

本研究では、異なる休眠誘導刺激を用いた 3 つの実験グループを準備した。1 つ目の実験では、卵期の温度だけを調節し、それ以外の環境条件は一定にして休眠群と非休眠群を作成した。同様に、2 つ目の実験では卵期の明るさだけを、3 つ目の実験では幼虫期の日長だけを調節し、それ以外の環境条件は一定にして休眠群と非休眠群を作成した。各実験グループにおいて、休眠群と非休眠群の間で発現差異を示す遺伝子を CAGE 解析によって検索した。次に、これらの発現差異遺伝子の中から、休眠誘導刺激の異なる 3 つの実験グループに共通するものを絞り込んだ。そして、選ばれた発現差異遺伝子の発現をリアルタイム定量 PCR で解析し、CAGE 解析の結果と一致したものを、休眠制御関連遺伝子の候補とした。さらに、候補遺伝子に対して RNA 干渉 (RNAi) 法を用いたノックダウン実験を行い、休眠制御に本質的に関与しているかどうかを検証した。

材料と方法

実験動物と飼育

第2章の系統選別実験から p50 系統を研究対象とした。p50 系統の休眠卵は、ナショナルバイオリソースプロジェクト

(<https://www.shigen.nig.ac.jp/silkwormbase/index.jp>、九州大学大学院 農学研究院) より取り寄せた。

本研究では、卵期および幼虫期に与える休眠誘導刺激が異なる3つの実験を行った。第2章での結果を参考にし、各実験では、休眠誘導刺激となる1つの環境パラメータだけを調節し、それ以外の条件は一定にして実験群を作成した (Egi et al., 2014)。

実験Ⅰでは、卵期の温度を調節し、高温 (25°C) とすることで休眠群を、低温 (18°C) とすることで非休眠群を作成した。卵期の明るさはいずれも恒暗とした。幼虫期の飼育条件は、温度を 25°C とし、日長を明期 12 時間 : 暗期 12 時間 (LD12:12、L = 8:00-20:00) とした。

実験Ⅱでは、卵期の明るさを調節し、恒明とすることで休眠群を、恒暗とすることで非休眠群を作成した。卵期の温度はいずれも 18°C とした。幼虫期の飼育条件は、実験Ⅰと同様に、温度を 25°C とし、日長を明期 12 時間 : 暗期 12 時間 (LD12:12、L = 8:00-20:00) とした。

実験Ⅲでは、幼虫期の日長を調節し、短日 (LD12:12、L = 8:00-20:00) とすることで休眠群を、長日 (LD20:4、L = 4:00-24:00) とすることで非休眠群を作成した。幼虫期の温度は、いずれも 25°C とした。LD12:12 で飼育した休眠群は、5 齢の 0 日

目（4 齢幼虫が脱皮した日）から日長条件を非休眠群と同じ LD20:4 に移した。その理由は、同一の環境下で休眠群と非休眠群から組織を採取するためである。休眠群も非休眠群も卵期の環境条件は、温度は 25°C とし、明るさは恒暗とした。

幼虫には人工飼料のシルクメイト PS（日本農産工業株式会社、神奈川県）を与えて自由摂食させた。光源には白色蛍光灯（照度 100-150 lux）を使用した。

幼虫からの組織採取

5 齢の 2 日目の雌幼虫から、明期の中点（14:00）において脳を摘出し、液体窒素で急速凍結して -80°C で保存した。ただし、RNAi の効率を評価するためのリアルタイム定量 PCR 解析に用いた組織のみ、5 齢の 3 日目に採取した。

保存した脳から total RNA を精製し、CAGE 解析（各実験群、n = 1 として、50 頭分の幼虫脳を使用）とリアルタイム定量 PCR 解析（各実験群、n = 3-6 として、それぞれ 10-20 頭分の幼虫脳を使用）に用いた。脳サンプルからの total RNA 精製には、RNeasy Plus Micro Kit（Qiagen GmbH、ノルトライン＝ヴェストファーレン州、ドイツ連邦共和国）を使用した。

CAGE 解析

CAGE ライブラリーの調製、配列決定、マッピング、および遺伝子発現解析は、株式会社ダナフォーム（神奈川県）に委託した。Total RNA の品質を Bioanalyzer（Agilent、カリフォルニア州、アメリカ合衆国）で評価した後、Cap 構造をもつ RNA の 5'末端に一本鎖 cDNA を転写し、CAGE バーコードタグを付けた（Murata et al. 2014）。生成したライブラリーの配列決定には、Illumina HiSeq 2500 system

(Illumina Inc., カリフォルニア州、アメリカ合衆国) を用いた。配列を決定した CAGE タグは、リボソーム RNA など除去した後、Burrows-Wheeler Aligner (BWA) v. 0.5.9 を用いて、カイコゲノム上 (<https://sgp.dna.affrc.go.jp/KAIKObase/>) にマッピングした (Li and Durbin 2009)。データ解析には CAGEr を用いて、隣接する 2 つの転写開始点間の最大許容範囲を 20 塩基として、CAGE タグのクラスタリングを行った。各遺伝子に対応するタグのカウント数は、CPM 値 (counts per million) を用いた (Haberle et al. 2015)。各実験において、休眠群と非休眠群の間で発現差異が 1.5 倍以上かつ CPM > 1 の遺伝子を、発現差異遺伝子として検索した。

リアルタイム定量 PCR 解析

PCR 試薬には、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (東洋紡、大阪府) を用いた。使用したプライマーは表 3-2 に示す。PCR 反応は、Thermal Cycler Dice Real Time System TP800 (タカラバイオ株式会社、滋賀県) を用いて、95°C で 60 秒の熱処理をした後、熱変性は 95°C で 15 秒、アニーリングおよび伸長はあわせて 60°C で 60 秒の条件で 40 サイクル行った。PCR 産物の特異性は、サーマルサイクラーに付属のソフトウェアから作成した融解曲線により確認した。各遺伝子の mRNA 量は、ハウスキーピング遺伝子である *rp49* をリファレンスとして相対化した。統計処理では Welch's *t*-test を行い、 $p < 0.05$ を有意とした。

RNAi を用いた候補遺伝子の機能解析

カイコ遺伝子の二本鎖 RNA (dsRNA) の作成は、(Wang et al. 2013) により報告されている方法を参考にして、MEGAscript RNAi Kits (Applied Biosystems、カリフ

オルニア州、アメリカ合衆国）を用いて行った。T7 プロモーター配列を付加した遺伝子特異的なプライマー（表 3-3）を用いて PCR 断片を作成し、dsRNA 合成のための DNA テンプレートとした。ネガティブコントロールには *GFP* (*Enhanced green fluorescent protein*) 遺伝子の dsRNA を用いた (Tschuch et al. 2008)。

dsRNA と Metafectene PRO (Biontex GmbH、バイエルン州、ドイツ連邦共和国) を 1 : 1 (v/v) で混合し、ハミルトンシリンジを用いて、5 齢の 0 日目の幼虫の胸部に投与した (600 ng の dsRNA を含む 3 μ L)。RNAi の効率を評価するために、dsRNA の投与から 3 日目に幼虫の脳における標的遺伝子の発現をリアルタイム定量 PCR 解析を用いて測定した。

休眠群において、休眠制御関連遺伝子の候補に対するノックダウンが次世代卵の休眠率に及ぼす影響を調べた。休眠群の作成条件は、卵期は 25°C の恒暗、幼虫期は休眠化を誘導する 25°C の短日 (LD12:12) とした。5 齢の 0 日目に dsRNA を投与された幼虫は、直ちに短日 (LD12:12) から長日 (LD20:4) へ移された。これは、休眠誘導刺激がない長日下で RNAi の影響を評価するためである。dsRNA を投与した個体を成虫まで飼育し、雌蛾が産んだ卵の休眠モードを観察して、次世代卵の休眠率を測定した (各実験群 $n = 27-65$ 頭、休眠率の測定方法の詳細は第 2 章参照)。統計処理では、Fisher の正確確率検定を行い、多重比較の補正に Benjamini-Hochberg 法を用いて、 $p < 0.05$ を有意とした。

結果

CAGE 解析

5 齢幼虫の脳内における遺伝子発現プロファイルを、休眠群と非休眠群の間で比較し、発現に差のある遺伝子を検索した。配列が決定された 3300 万-7000 万個の CAGE タグをカイコゲノム上にマッピングして各遺伝子の転写開始点でタグ数をカウントした。幼虫の脳で発現する約 6,500 個の遺伝子が定量された。そして、各実験における休眠卵群と非休眠群の間で発現差が 1.5 倍以上かつ CPM > 1 となる遺伝子を検索した。

実験Ⅰ： 卵期の温度による休眠制御

卵期の温度のみを調節して休眠を制御した。卵期の温度を高温（25℃）とすることで休眠群を、低温（18℃）とすることで非休眠群を作成した。

休眠群において、非休眠群よりも発現量が多かった遺伝子は、190 個であった（検索された総遺伝子数の 2.96%）。非休眠群において、休眠群よりも発現量が多かった遺伝子は、272 個であった（検索された総遺伝子数の 4.23%）。

実験Ⅱ： 卵期の明るさによる休眠制御

卵期の明るさのみを調節して休眠を制御した。卵期の明るさを恒明とすることで休眠群を、恒暗とすることで非休眠群を作成した。

休眠群において、非休眠群よりも発現量が多かった遺伝子は、152 個であった（検索された総遺伝子数の 2.37%）。非休眠群において、休眠群よりも発現量が多かった遺伝子は、172 個であった（検索された総遺伝子数の 2.68%）。

実験Ⅲ：幼虫期の日長による休眠制御

幼虫期の日長のみを調節して休眠を制御した。幼虫期の日長を短日（LD12:12）とすることで休眠群を、長日（LD20:4）とすることで非休眠群を作成した。

休眠群において、非休眠群よりも発現量が多かった遺伝子は、222 個であった（検索された総遺伝子数の 3.46%）。非休眠群において、休眠群よりも発現量が多かった遺伝子は、114 個であった（検索された総遺伝子数の 1.77%）。

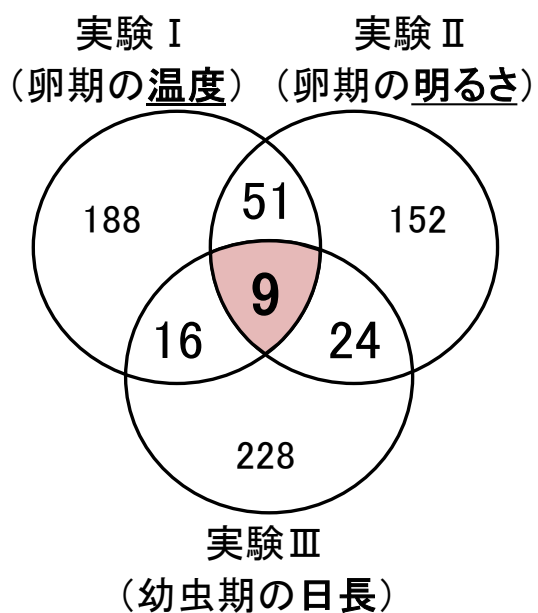
実験Ⅰ、実験Ⅱ、および実験Ⅲの間で共通する発現差異遺伝子の絞り込み

卵期の温度、卵期の明るさ、または幼虫期の日長を調節した 3 つの実験から得られた発現差異遺伝子の中から、共通する遺伝子を絞り込んだ（図 4-1）。

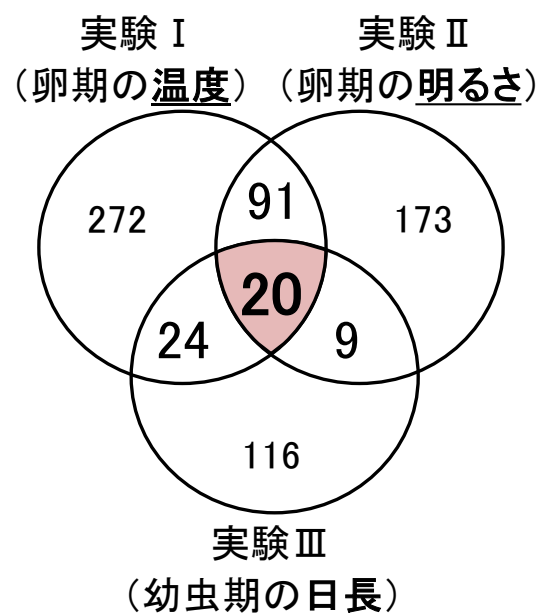
休眠群の方で発現量が多かった遺伝子のうち、実験グループ間で共通するものは、9 個あった（表 4-1A）。非休眠群の方で発現量が多かった遺伝子のうち、実験グループ間で共通するものは、20 個あった（表 4-1B）。

図 4-1. CAGE 解析で発現差異を示した遺伝子の数

休眠群で発現量が多い



非休眠群で発現量が多い



卵期の温度、卵期の明るさ、または幼虫期の日長のいずれかを調節して休眠を制御した実験で、休眠群と非休眠群の間で発現量が 1.5 倍以上の差を示した遺伝子の数をベン図で示す。休眠群の方で発現が多かったもののうち、9 個の遺伝子が全ての実験グループ間で共通していた。非休眠群の方で発現が多かったもののうち、20 個の遺伝子が全ての実験グループ間で共通していた。

表 4-1A. CAGE 解析を用いて検索された発現差異遺伝子（休眠群で、非休眠群よりも発現が多かったもの）

遺伝子名	GenBank Acc. No.	実験 I（卵期の温度を調節）				実験 II（卵期の明るさを調節）				実験 III（幼虫期の日長を調節）			
		25 °C (休眠)	18 °C (非休眠)	6.60	2.61	恒明 (休眠)	恒暗 (非休眠)	発現比 恒明 / 恒暗	LD12:12 (休眠)	LD20:4 (非休眠)	LD12:12 / LD20:4 発現比		
<i>Eukaryotic translation initiation factor 5B</i>	XM_004927891.4	17.25	6.60			14.47	6.60	2.19	33.03	12.00	2.75		
<i>Facilitated trehalose transporter Tret1</i>	XM_021350554.1	22.75	0.29		78.45	28.71	0.29	99.00	28.42	0.24	118.42		
<i>Juvenile hormone acid methyltransferase</i>	NM_001043436.1	2.73	0.72		3.79	4.34	0.72	6.03	1.53	0.24	6.38		
<i>Krüppel homolog 1</i>	NM_001177861.1	15.25	3.32		4.59	15.63	3.32	4.71	15.77	8.07	1.95		
<i>Mevalonate kinase</i>	NM_001099829.1	34.58	16.18		2.14	51.98	16.18	3.21	31.95	7.79	4.10		
<i>Proton-coupled folate transporter</i>	XM_004933326.3	2.73	1.40		1.95	3.88	1.40	2.77	3.45	0.80	4.31		
<i>THO complex subunit 1</i>	XM_021352392.2	5.85	1.73		3.38	4.57	1.73	2.64	23.28	14.29	1.63		
<i>Uncharacterized LOC101743046</i>	XM_012694982.3	2.90	1.54		1.88	3.07	1.54	1.99	2.73	1.28	2.13		
<i>Uncharacterized LOC110385080</i>	XM_021347590.2	2.90	0.87		3.33	4.11	0.87	4.72	1.81	0.56	3.23		

表 4-1B. CAGE 解析を用いて検索された発現差異遺伝子（非休眠群で、休眠群よりも発現が多かったもの）

遺伝子名	GenBank Acc. No.	実験 I（卵期の温度を調節）			実験 II（卵期の明るさを調節）			実験 III（幼虫期の日長を調節）		
		25 °C (休眠)	18 °C (非休眠)	発現比 18 °C / 25 °C	恒明 (休眠)	恒暗 (非休眠)	発現比 恒暗 / 恒明	LD12:12 (休眠)	LD20:4 (非休眠)	発現比 LD20:4 / LD12:12
<i>2-iminobutanolate/2-iminopropanoate deaminase</i>	XM_004931425.2	0.91	4.48	4.92	2.89	4.48	1.55	0.68	6.02	8.85
<i>Cuticular protein hypothetical 26</i>	NM_001173280.1	0.13	31.83	244.85	0.12	31.83	265.25	0.64	15.17	23.70
<i>Cuticular protein RR-2 motif 58</i>	NM_001173228.1	3.03	11.46	3.78	5.90	11.46	1.94	4.05	9.11	2.25
<i>Cuticular protein RR-2 motif 75</i>	NM_001173214.1	1.91	2.89	1.51	1.45	2.89	1.99	0.88	2.13	2.42
<i>F-box/SPRY domain-containing protein 1</i>	XM_004933671.3	0.43	2.36	5.49	0.00	2.36	NA	3.69	24.16	6.55
<i>Fungal protease inhibitor F-like</i>	XM_004924342.4	8.97	92.25	10.28	36.18	92.25	2.55	5.90	18.38	3.12
<i>Glucose-1-phosphatase</i>	XM_004930711.4	0.52	1.64	3.15	0.64	1.64	2.56	0.40	1.61	4.03
<i>Juvenile hormone epoxide hydrolase</i>	NM_001043736.2	0.91	1.93	2.12	1.27	1.93	1.52	1.12	1.81	1.62
<i>Low molecular lipoprotein 30K pBmHPC-6</i>	NM_001044021.2	28.43	222.78	7.84	65.06	222.78	3.42	20.59	119.86	5.82
<i>Low molecular lipoprotein 30K pBmHPC-12</i>	NM_001101726.1	53.73	245.02	4.56	126.30	245.02	1.94	30.91	221.17	7.16
<i>Low molecular lipoprotein 30K pBmHPC-19</i>	NM_001101727.1	18.89	118.83	6.29	33.57	118.83	3.54	8.63	47.44	5.50
<i>Low molecular lipoprotein 30K pBmHPC-23</i>	NM_001101728.2	4.03	8.71	2.16	4.57	8.71	1.91	2.65	13.29	5.02
<i>Low molecular mass 30 kDa lipoprotein 19G1-like</i>	NM_001279380.1	33.28	156.63	4.71	68.94	156.63	2.27	15.49	108.58	7.01
<i>MIF-like protein mif-2</i>	XM_004932734.3	0.82	1.30	1.59	0.75	1.30	1.73	0.48	2.93	6.10
<i>Ommochrome-binding protein (LOC101737984)</i>	XM_004923674.4	1.60	2.84	1.78	1.27	2.84	2.24	0.60	4.46	7.43
<i>Ommochrome-binding protein (LOC101745519)</i>	XM_021347804.1	1.82	5.59	3.07	3.70	5.59	1.51	1.28	9.55	7.46
<i>Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase</i>	NM_001047016.1	0.48	1.01	2.10	0.58	1.01	1.74	0.20	1.32	6.60
<i>Sex-specific storage-protein SPI</i>	NM_001113276.3	10.53	49.40	4.69	27.32	49.40	1.81	5.42	41.22	7.61
<i>Uncharacterized LOC101744235</i>	XM_004929359.4	0.48	1.06	2.21	0.41	1.06	2.59	0.12	1.28	10.67
<i>Uncharacterized LOC105843021</i>	XM_012697974.2	1.99	6.98	3.51	0.00	6.98	NA	0.00	6.42	NA

※NA は、分母となる遺伝子の発現量が 0 であったため、発現比が計算できなかったことを表している。

5 齢幼虫の脳における遺伝子発現を、休眠群と非休眠群の間に CAGE 解析を用いて比較した。休眠群と非休眠群の間に発現量が 1.5 倍以上の差を示した遺伝子のうち、卵期の温度、卵期の明るさ、または幼虫期の日長を調節した 3 つの実験に共通するものを表に示す。発現量は、各遺伝子の転写開始点でカウントされたタグ数 (CPM) で表されている。

(A) 休眠群で、非休眠群よりも発現量が多かった遺伝子。

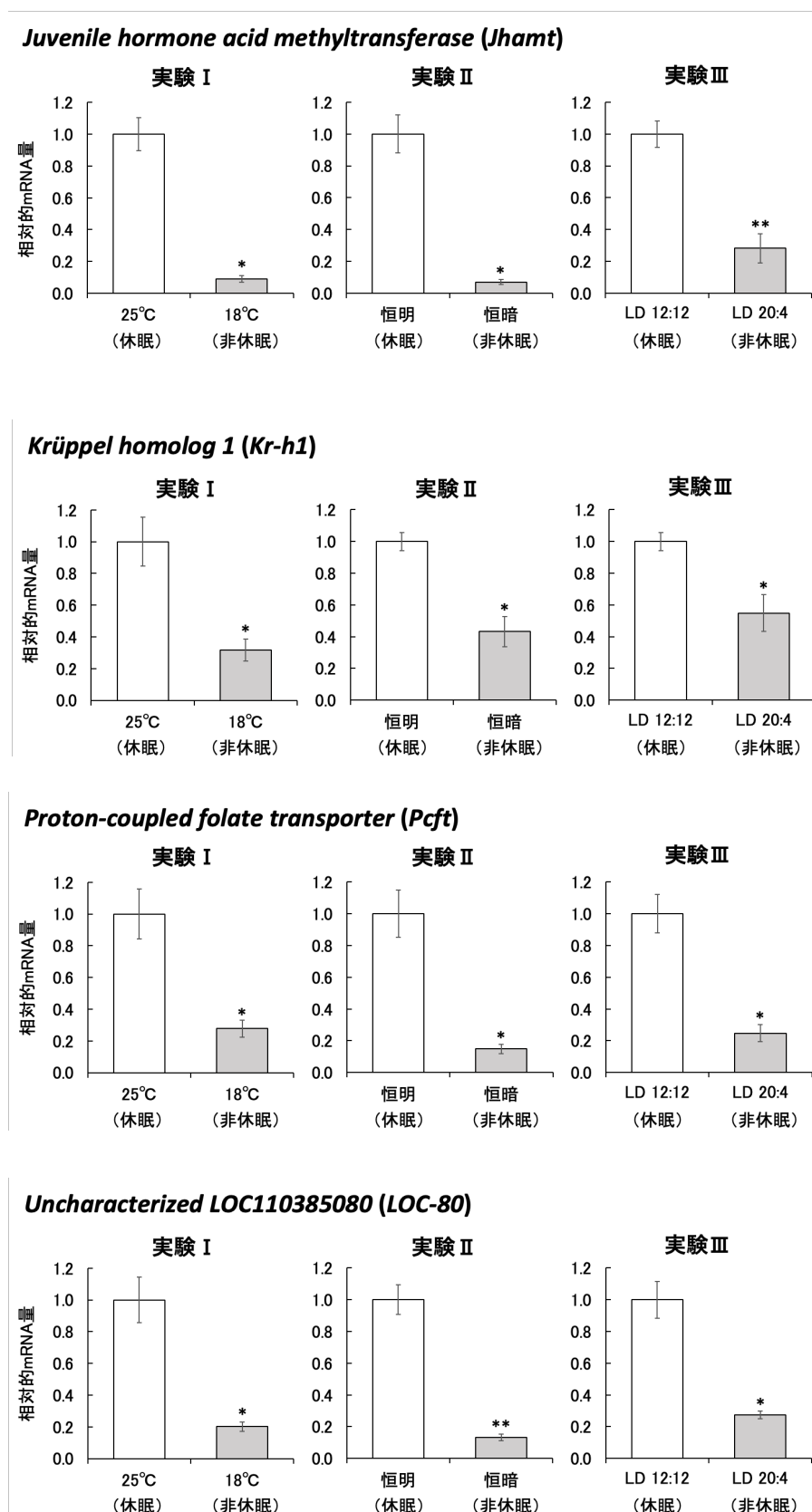
(B) 非休眠群で、休眠群よりも発現量が多かった遺伝子。

リアルタイム定量 PCR 解析

CAGE 解析により、3つの実験グループ間に共通する発現差異遺伝子として、休眠群の方で発現量が多かった9個と、非休眠群の方で発現量が多かった20個が得られた。そこで、これらの遺伝子の発現パターンをリアルタイム定量 PCR 解析を用いて検証した。

CAGE 解析を用いたスクリーニングと同様の実験条件で、休眠群と非休眠群を作成し、幼虫脳内における mRNA 量を比較した。その結果、CAGE 解析での発現パターンと一致した遺伝子は、*Juvenile hormone acid methyltransferase* (*Jhamt*)、*Krüppel homolog 1* (*Kr-h1*)、*Proton-coupled folate transporter* (*Pcft*)、および機能が未知な *Uncharacterized LOC110385080* (*LOC-80*) の4個であり、いずれの実験グループでも休眠群において発現量が多かった (図 4-2)。そこで、これらを休眠制御に関連する遺伝子の候補として、機能解析を進めた。他の遺伝子については、リアルタイム定量 PCR 解析の結果が CAGE 解析での発現パターンと一致しなかった (図 4-4)。

図 4-2. リアルタイム定量 PCR 解析による CAGE 解析の結果検証



実験Ⅰでは、卵期の温度を 25°Cとすることで休眠群を、18°Cとすることで非休眠群を作成した。実験Ⅱでは、卵期の明るさを恒明とすることで休眠群を、恒暗とすることで非休眠群を作成した。実験Ⅲでは、幼虫期の日長を短日 (LD12:12) とすることで休眠群を、長日 (LD20:4) とすることで非休眠群を作成した。mRNA 量は平均値±標準誤差で表した (n = 3-6, Welch's t-test, *P < 0.05; **P < 0.01)。

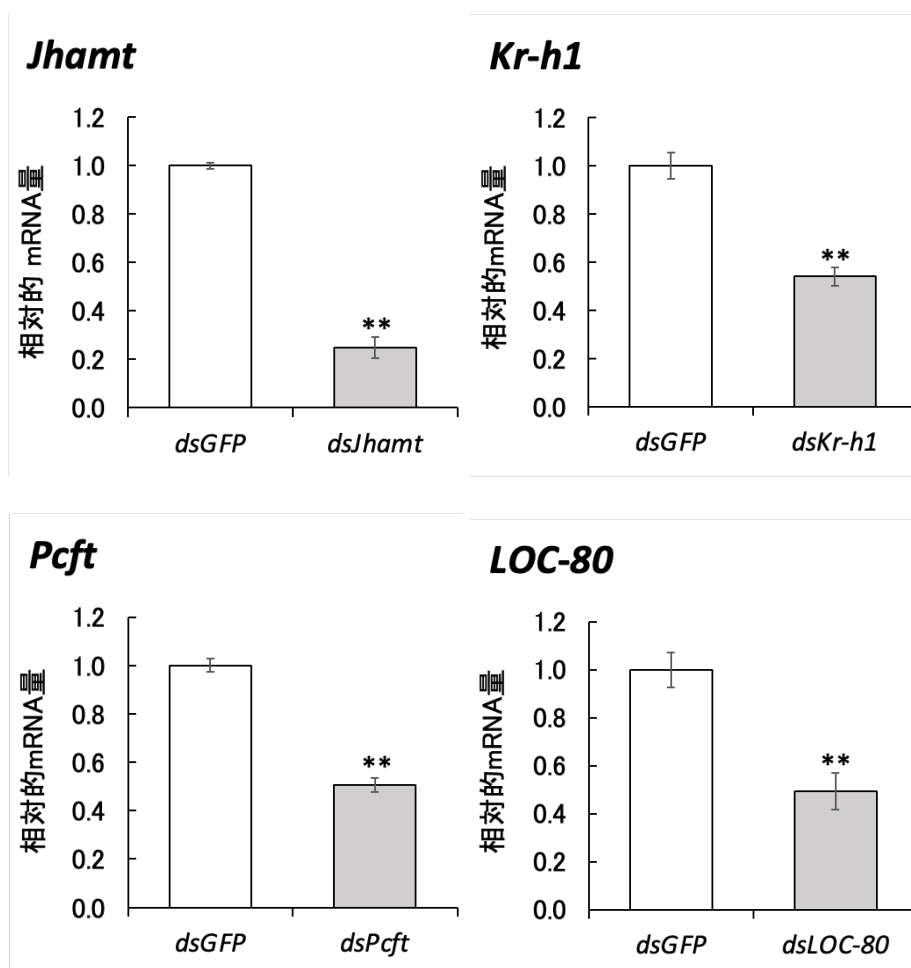
RNAi を用いた候補遺伝子の機能解析

リアルタイム定量 PCR 解析による検証から、休眠制御に関連する遺伝子の候補が得られた。そこで、これらの候補遺伝子が休眠制御に本質的に関与しているかどうかを RNAi を用いて調べた。

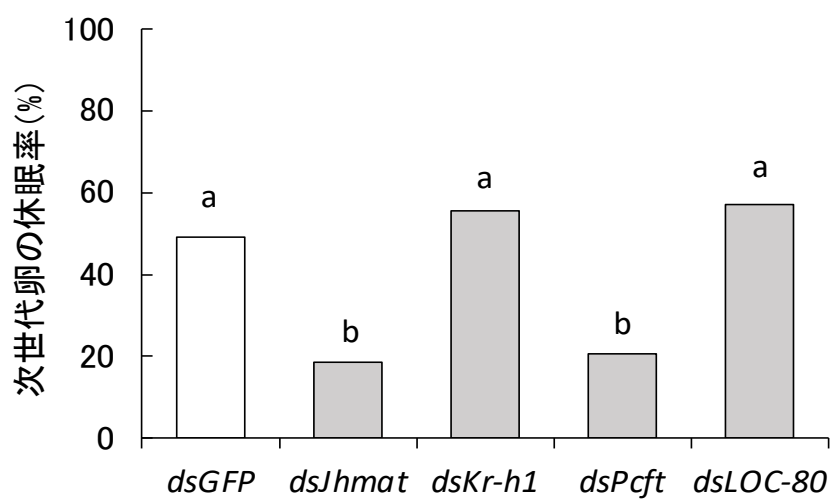
RNAi の効率を評価するために、dsRNA を投与した幼虫の脳における標的遺伝子の発現をリアルタイム定量 PCR 解析を用いて測定した（図 4-3A）。どの候補遺伝子の mRNA 量も、dsRNA の投与によって減少した。しかし、RNAi が次世代卵の休眠率に与える影響は、遺伝子によって異なっていた（図 4-3B）。*Jhamt* または *Pcft* をノックダウンすると次世代卵の休眠率が低下したが、*Kr-h1* または *LOC-80* をノックダウンしても休眠率に影響はみられなかった。

図 4-3. 候補遺伝子に対する RNAi が次世代卵の休眠モードへ与える影響

(A)



(B)



休眠群の幼虫に、*Jhamt* (*dsJhamt*)、*Kr-h1* (*dsKr-h1*)、*Pcft*

(*dsPcft*)、*LOC-80* (*dsLOC-80*) をノックダウンするための dsRNA を投与した。ネガティブコントロールには、*GFP* (*dsGFP*) を用いた。本実験では、休眠群の作成条件は、卵期は 25°C の恒暗条件、幼虫期は休眠化を誘導する 25°C の短日 (LD12:12) とした。5 齢の 0 日目に dsRNA を投与された幼虫は直後に、非休眠化を誘導する長日 (LD20:4) へ移された。

(A) RNAi の効率を評価するために、dsRNA の投与から 3 日後 (5 齢の 3 日目) の幼虫の脳内の *Jhamt*、*Kr-h1*、*Pcft*、*LOC-80* の mRNA 量を測定した。mRNA 量は平均値±標準誤差で表した (n = 3-6, Welch's t-test, *P < 0.05; **P < 0.01)。

(B) dsRNA を投与した個体を成虫まで飼育して、雌蛾が産んだ卵の休眠モードを観察し、次世代卵の休眠率を測定した。図中の異なるアルファベットは、実験群間で有意差があることを表している (n = 27-65, Fisher's exact test, P < 0.05)。

Jhamt : Juvenile hormone acid methyltransferase、*Kr-h1* : Krüppel homolog 1、

Pcft : Proton-coupled folate transporter、*LOC-80* : Uncharacterized

LOC110385080。

考察

卵期の温度、卵期の明るさ、または幼虫期の日長を調節した3つの実験のいずれにおいても、5 齢幼虫の脳では、*Jhamt* と *Pcft* が休眠群で非休眠群よりも多く発現していることが明らかになった。さらに、*Jhamt* または *Pcft* のいずれかを RNAi を用いてノックダウンすると、次世代卵の休眠率が減少することが分かった。RNAi 実験では、短日 (LD12:12) で飼育していた休眠群の幼虫を、dsRNA 投与後に長日 (LD20:4) に移して、休眠誘導刺激がない環境下で次世代卵の休眠モードへの影響を観察した。したがって、ここでみられた次世代卵の休眠率の低下は、休眠誘導刺激の入力系の阻害が原因ではないと考えられる。以上のことから、*Jhamt* と *Pcft* は、カイコの幼虫脳内における次世代卵の休眠モードのプログラミングに関与していることが示唆された。幼虫期にこれらの遺伝子が増加することが、休眠を誘導する情報となっている可能性がある。

本研究から、休眠群の幼虫の脳では、*Jhamt* と *Kr-h1* の発現が非休眠群よりも多いことが明らかになった。両遺伝子とも、幼若ホルモン (JH) に関連する遺伝子である。*Jhamt* は JH 合成の律速酵素をコードしており (Shinoda and Itoyama 2003)、*Kr-h1* は JH により発現が誘導される JH シグナル伝達系の初期応答遺伝子である (Minakuchi et al. 2008, 2009)。これらのことから、カイコの休眠群の幼虫では JH の合成が促進されていることが示唆された。JH は、様々な昆虫種における休眠の制御に関与していると考えられている。例えば、蚊の生殖休眠、および蛾やコオロギの幼虫休眠などがある (Yagi and Fukaya 1974, Nijhout 1994, Denlinger et al. 2012, Denlinger and Armbruster 2014)。特に、タンボコオロギの日長依存的な休眠制御では、短日条件によって *Jhamt* の発現が増加して、JH の量が増加することで、幼虫休

眠が誘導されることが示唆されている (Miki et al. 2020)。さらに最近では、キョウソヤドリコバチ (*Nasonia vitripennis*) の母性休眠において、短日条件によって母親の JH レベルが低下することで次世代の幼虫休眠が誘導されることが報告された (Mukai et al. 2022)。

カイコの次世代卵の休眠モードのプログラミングにも、JH シグナル伝達系が関与している可能性が考えられる。

しかし、*Kr-hl* のノックダウンは、次世代卵の休眠率に影響を与えなかった。*Kr-hl* は、JH による変態抑制に関与する転写因子をコードしている (Lozano and Belles 2011, Kayukawa et al. 2012, 2014, Smykal et al. 2014)。したがって、カイコでは、休眠と発生は異なる経路で制御されている可能性がある。実際に、これまでの我々の経験からは、幼虫の成長速度と成虫になって産卵する卵の休眠モードは関連性は見られなかった。卵期の温度または明るさを休眠誘導刺激とした場合は休眠群の方が非休眠群よりも幼虫期間が長かったが、幼虫期の日長を休眠誘導刺激とした場合は休眠群の方が非休眠群よりも幼虫期間が短かった。休眠制御に関与する JH シグナル伝達系は、カイコの脳内で局所的にしか機能していないのではないかと推測される。

Pcft は、哺乳類の腸管の物質輸送系において、食物から得られる葉酸を取り込む葉酸輸送体をコードしている (Zhao and Goldman 2013, Hou et al. 2022)。葉酸輸送体は、12 個の膜貫通ドメインからなるタンパク質であり、酸性条件で活性が高い。昆虫における機能は明らかにされていない部分が多いが、*Pcft* はカイコでも葉酸の取り込みや輸送に関与している可能性がある。RNAi を用いた *Pcft* のノックダウンにより次世代卵の休眠率が減少したことから、葉酸がカイコの休眠制御に関与して

いる可能性が考えられる。これまでの研究から、ハバチの1種 (*Acantholyda nemoralis*) では、葉酸の投与によって卵巣細胞の分裂活性と核酸合成を促進され、幼虫休眠が中断されることが示唆されている (Zielińska and Grzelakowska 1965a, 1965b)。さらに、タマネギバエ (*Delia antiqua*) の休眠蛹と非休眠蛹間で発現量の異なるタンパク質を比較解析した研究から、葉酸代謝に関わる酵素が休眠制御に関連することが示唆されている (You-Jin et al. 2014)。

本研究から、*Jhamt* と *Kr-h1* はカイコの次世代卵の休眠モードのプログラミングに関与していることが示唆された。さらに、JH シグナル伝達系と葉酸が、カイコの休眠制御に関与している可能性も示唆された。これらの発見は、昆虫の休眠制御機構を分子レベルで解明する糸口になると考えられる。

表 4-2. リアルタイム定量 PCR 解析に用いたプライマー配列

遺伝子名	Forward	Reverse
2-iminopropanoate deaminase	5'-ACAAAAGTTTCGCCCAAAATG-3'	5'-TGTCGCTAAAAATTGCTTGA-3'
Cuticular protein hypothetical 26	5'-TGTGAGACAAACAAAGACACA-3'	5'-AACTGGGGAGTAGCCGAAGT-3'
Cuticular protein RR-2 motif 58	5'-AAGATCAGCAATGGCAGCTAA-3'	5'-CGAGAAGCTGCTGTGTTTCAG-3'
Cuticular protein RR-2 motif 75	5'-TCCAAACAACATGGCAGCTAA-3'	5'-GATGTCCTCCGCTTTGTTGGT-3'
Eukaryotic translation initiation factor 5B	5'-CCGTACAAACAAGTCTCAAAAGA-3'	5'-GGGAGACGTATTCCTATTTCT-3'
F-box/SPRY domain-containing protein 1	5'-GGGGCTGGAATCTTGTTGAT-3'	5'-CAAAATGAGAGGGGTGACGA-3'
Facilitated trehalose transporter Trel 1	5'-TCCTAATGAGAGCGGACACC-3'	5'-GAGCCCATCGATACAGCAAT-3'
Fungal protease inhibitor F-like	5'-GGCCGCCAAACAATACTTTA-3'	5'-AGTCCAATGGGCATTTTCAG-3'
Glucose-1-phosphatase	5'-CCGCAITTCCTGACTGTAAT-3'	5'-GCATTTCTCTCGATTTCTTCG-3'
Juvenile hormone acid methyltransferase	5'-GAGCACGTCGATCGATTAT-3'	5'-CAACGTTTTGCATTTGCACIT-3'
Juvenile hormone epoxide hydrolase	5'-TACCAGCATCAAAACCCTTCG-3'	5'-ACCGTATTTGAAGCCAACA-3'
Kritippel homolog 1	5'-GAACAATTTCTGTTCTTCAGGTGACG-3'	5'-TCGTGCGTGTGCTGTAAAGCG-3'
Low molecular lipoprotein 30K pBmHPC-6	5'-CCACAACAAAATTGCATTTCG-3'	5'-TCGGTGGACATGATCTTGAA-3'
Low molecular lipoprotein 30K pBmHPC-12	5'-CACCGGTGACTACGACAGTG-3'	5'-CTCCATGGTGTTCGCTCTCT-3'
Low molecular lipoprotein 30K pBmHPC-19	5'-GATTACGACAGTGGGTTGA-3'	5'-CCCTGGAGCCAAAGTTGATA-3'
Low molecular lipoprotein 30K pBmHPC-23	5'-GGCTCCATCATCCAGAATGT-3'	5'-AACAAATTTCTGTCGTTGC-3'
Low molecular mass 30 kDa lipoprotein 19G1-like	5'-TCTCGCTTTGACGCTGAGTA-3'	5'-TGTTCCTCCACAGAGCAATG-3'
Mevalonate kinase	5'-GAGCAGCCAAAGATTTACGG-3'	5'-TAGCGCTTTCTTGAACGAT-3'
MIF-like protein mif-2	5'-AAGGCTGTGCAAAAATCACCC-3'	5'-CAGGTTACCAATCGATTCCAG-3'
Ommochrome-binding protein (LOC101737984)	5'-CCGCAACGGCAAGATAATAAT-3'	5'-CGATATAGACCGTCGCTTCC-3'
Ommochrome-binding protein (LOC101745519)	5'-TCGACTACCAAAACCAACACA-3'	5'-ATACCCGAATTGATGCCAGA-3'
Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase	5'-CACAGATCCAGGGCTTCTTC-3'	5'-GATTCGGGTCACTCTTTCA-3'
Proton-coupled folate transporter rp49	5'-GCTGATGGTTGGACCTCTGT-3'	5'-CCAAAAGACCCGACGACGATA-3'
Sex-specific storage-protein SPI	5'-TCAATCGGATCGCTATGACA-3'	5'-ATGACGGGTCTTCTTGTGG-3'
THO complex subunit 1	5'-AGCGATTAGTGGTGGCTACG-3'	5'-GTCGGCTGGAGGATATGGT-3'
Uncharacterized LOC101743046	5'-CGGTCGGCGATAATTGTTAAG-3'	5'-CTCCAACGAAGGCATGAAAT-3'
Uncharacterized LOC101744235	5'-GACCGCTGACAAAGTCACTA-3'	5'-AGGGCATGAAACCTCATACG-3'
Uncharacterized LOC105843021	5'-GATGTCGCAGCAGTCAGTGT-3'	5'-TTCGTCACGTTTGTGGATGT-3'
Uncharacterized LOC110385080	5'-GGCGTAAGGTGTGGAGTGAT-3'	5'-TCTGCA TGACCCCTTGTTC A-3'
	5'-TCCCGGCTACAAAGTTTGAGT-3'	5'-GACCCGGCAACAATAGAAAA-3'

表 4-3. dsRNA 合成のための DNA テンプレートの作成に用いたプライマー配列

遺伝子名	Forward	Reverse
GFP (Enhanced green fluorescent protein)	5'- <u>TAATACGACTCACTATAGGGAG</u> A CCTG AAGTTCATCTGCACCAC-3'	5'- <u>TAATACGACTCACTATAGGGAG</u> A ACGAACTCCAGCAGGACCAT -3'
Juvenile hormone acid methyltransferase	5'- <u>TAATACGACTCACTATAGGGAG</u> A CCTCGAGGAAACATGCGAATA -3'	5'- <u>TAATACGACTCACTATAGGGAG</u> A GTATGCCGAGAGTGTGCGGTA -3'
Krüppel homolog 1	5'- <u>TAATACGACTCACTATAGGGAG</u> A GCCATAAGACTTTTGTGTGC -3'	5'- <u>TAATACGACTCACTATAGGGAG</u> A TCTCCGTGTGACTACGAGA -3'
Proton-coupled folate transporter	5'- <u>TAATACGACTCACTATAGGGAG</u> A TACACTGCTCACCGGAACC -3'	5'- <u>TAATACGACTCACTATAGGGAG</u> A GCCGATGAAGGGAATACAA -3'
Uncharacterized LOC110385080	5'- <u>TAATACGACTCACTATAGGGAG</u> A TCTCATGTCTGGCGGTACT -3'	5'- <u>TAATACGACTCACTATAGGGAG</u> A CGAATCTATCGCCATAATAATCTTTT -3'

※下線部は、T7 プロモーター配列を示す。

図 4-4. リアルタイム定量 PCR 解析による CAGE 解析の結果検証

(A)

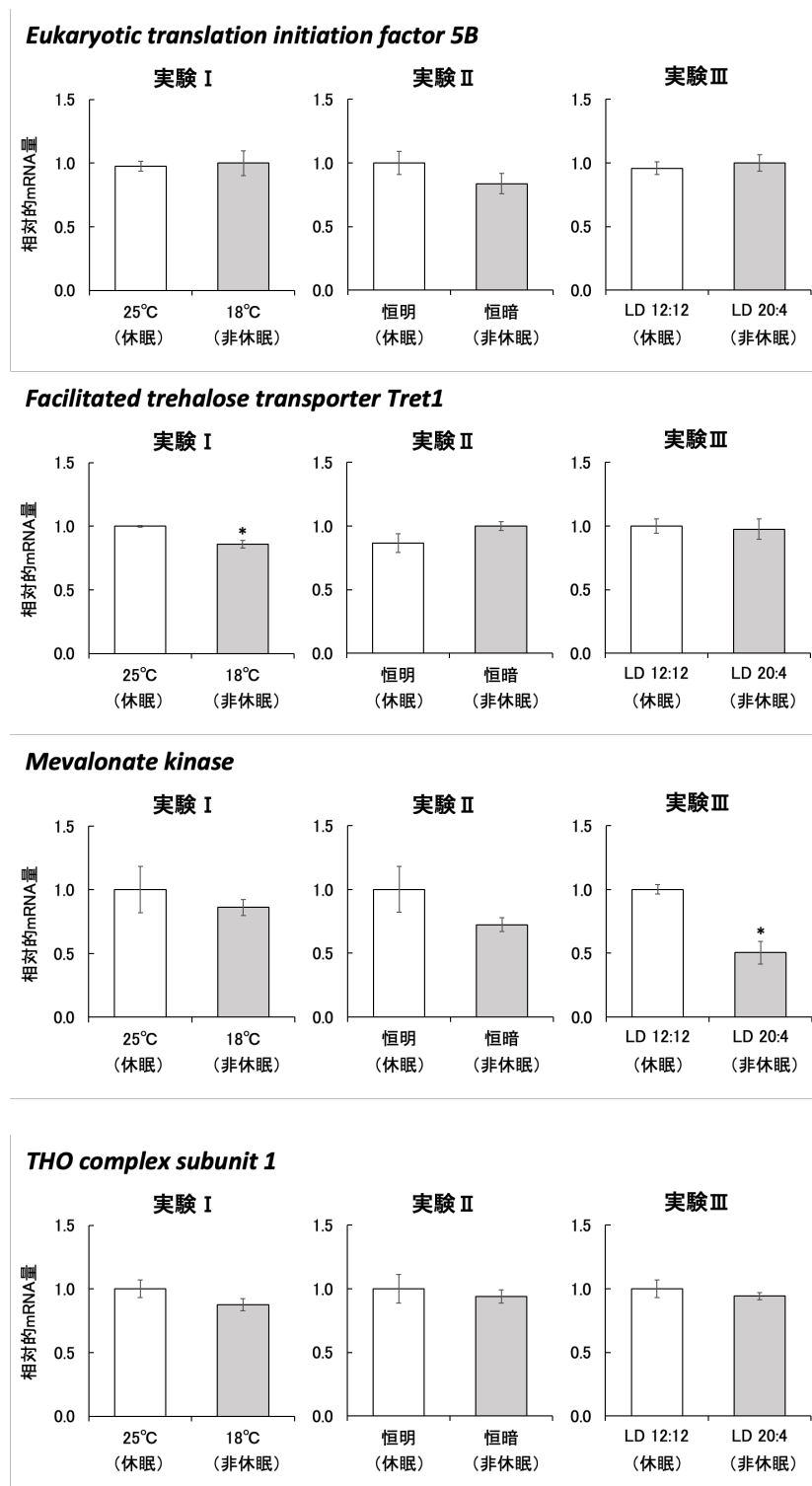


図 4-4. 続き

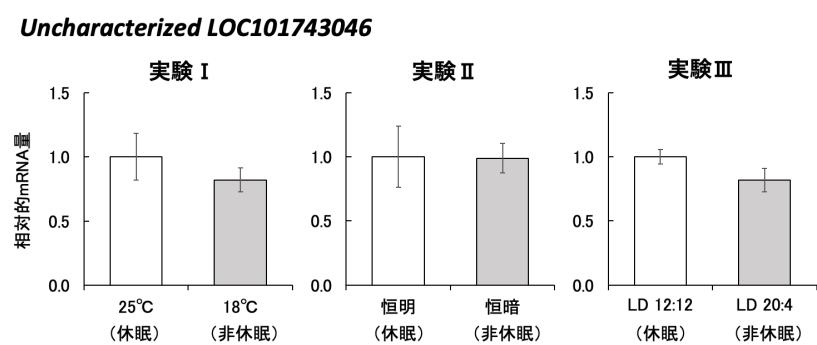


図 4-4. 続き

(B)

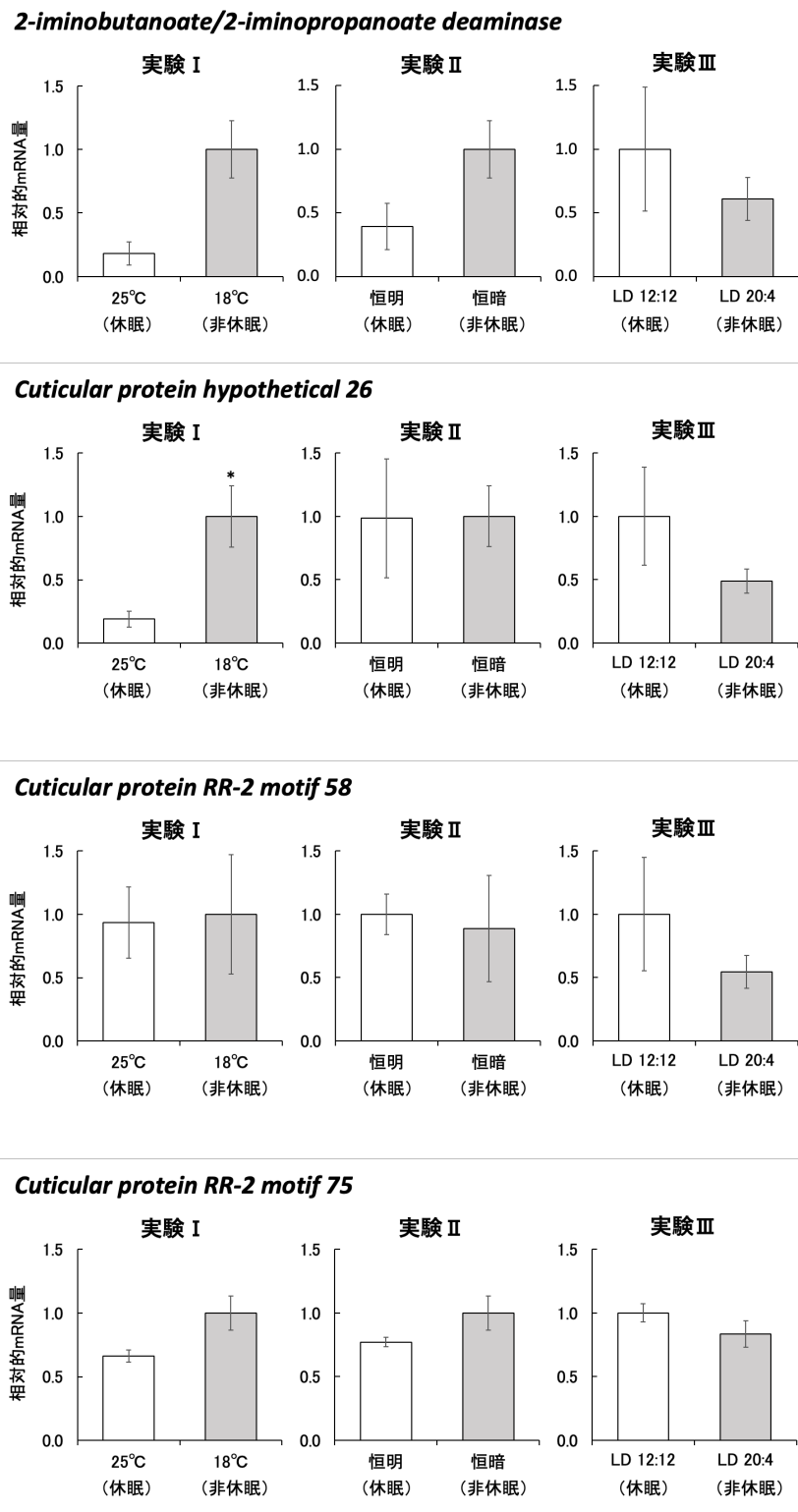


図 4-4. 続き

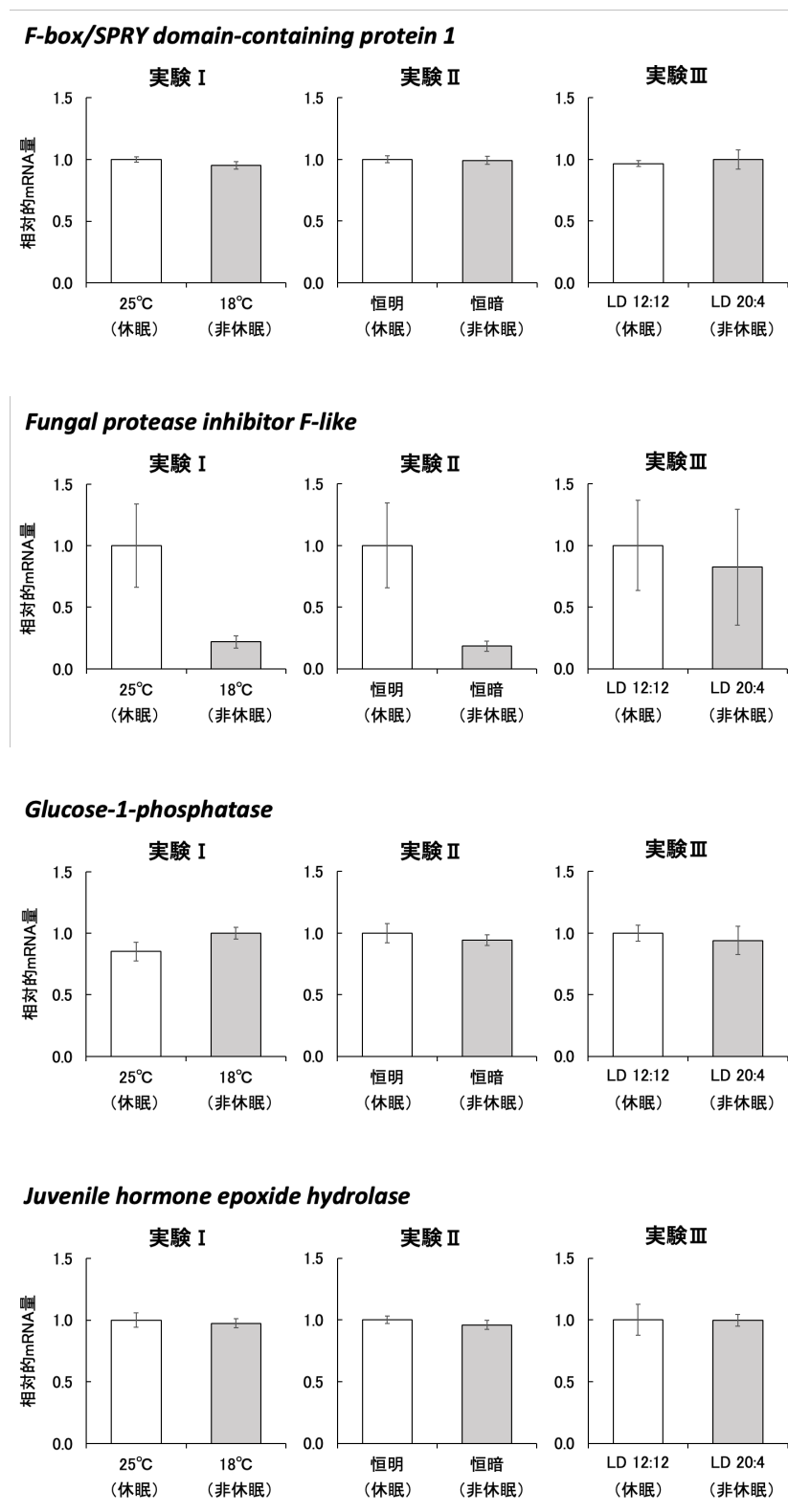


図 4-4. 続き

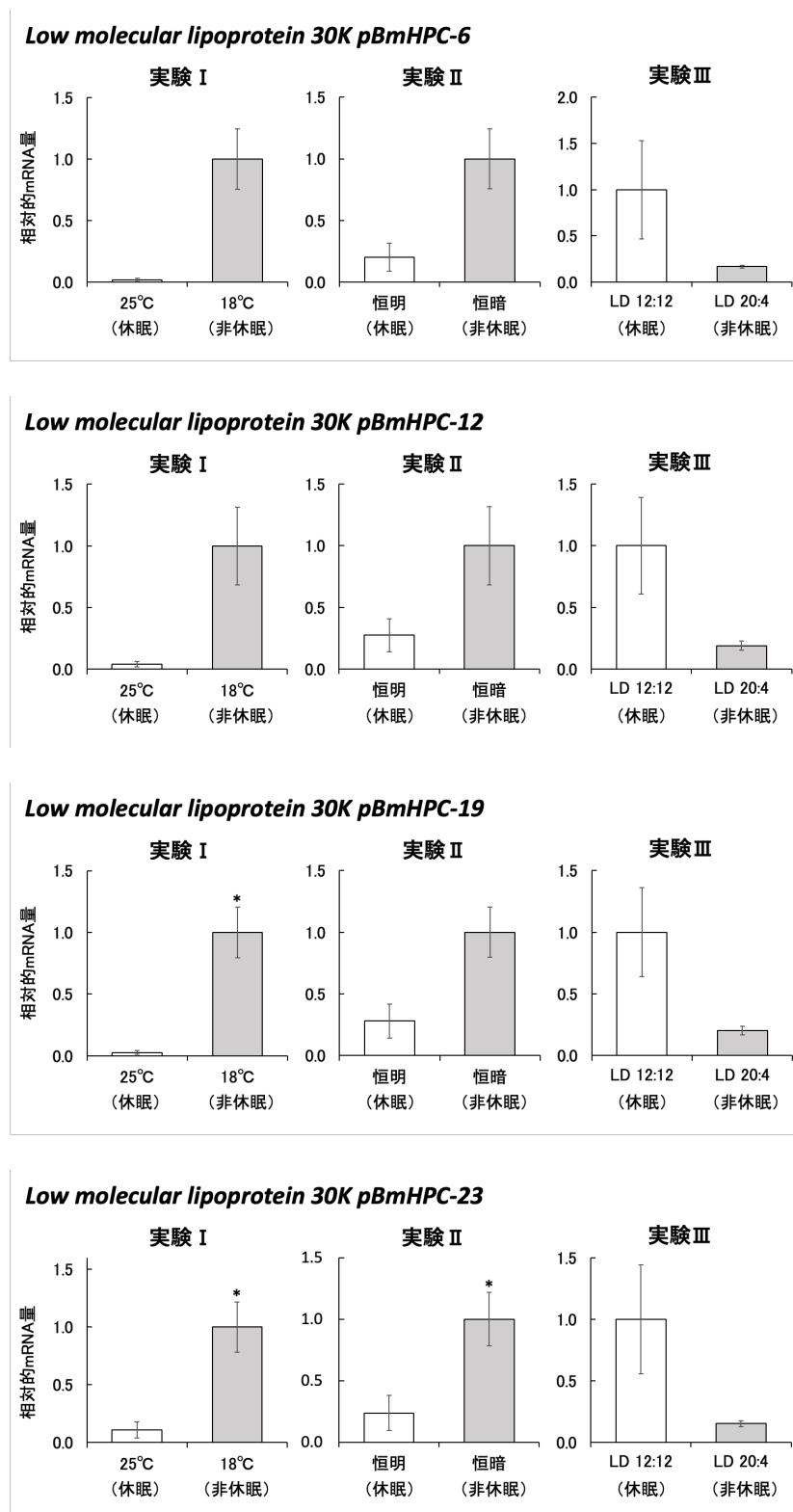


図 4-4. 続き

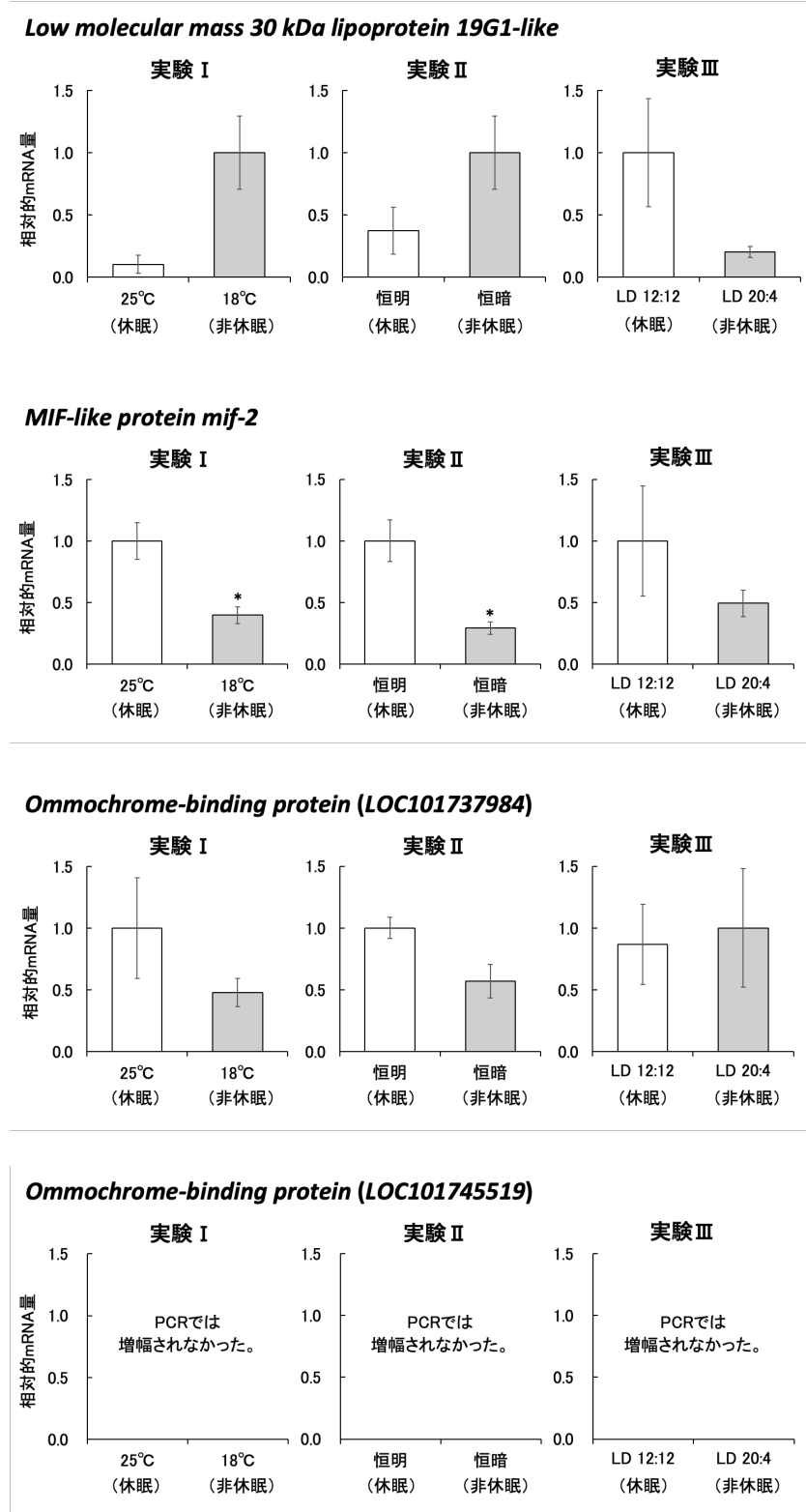
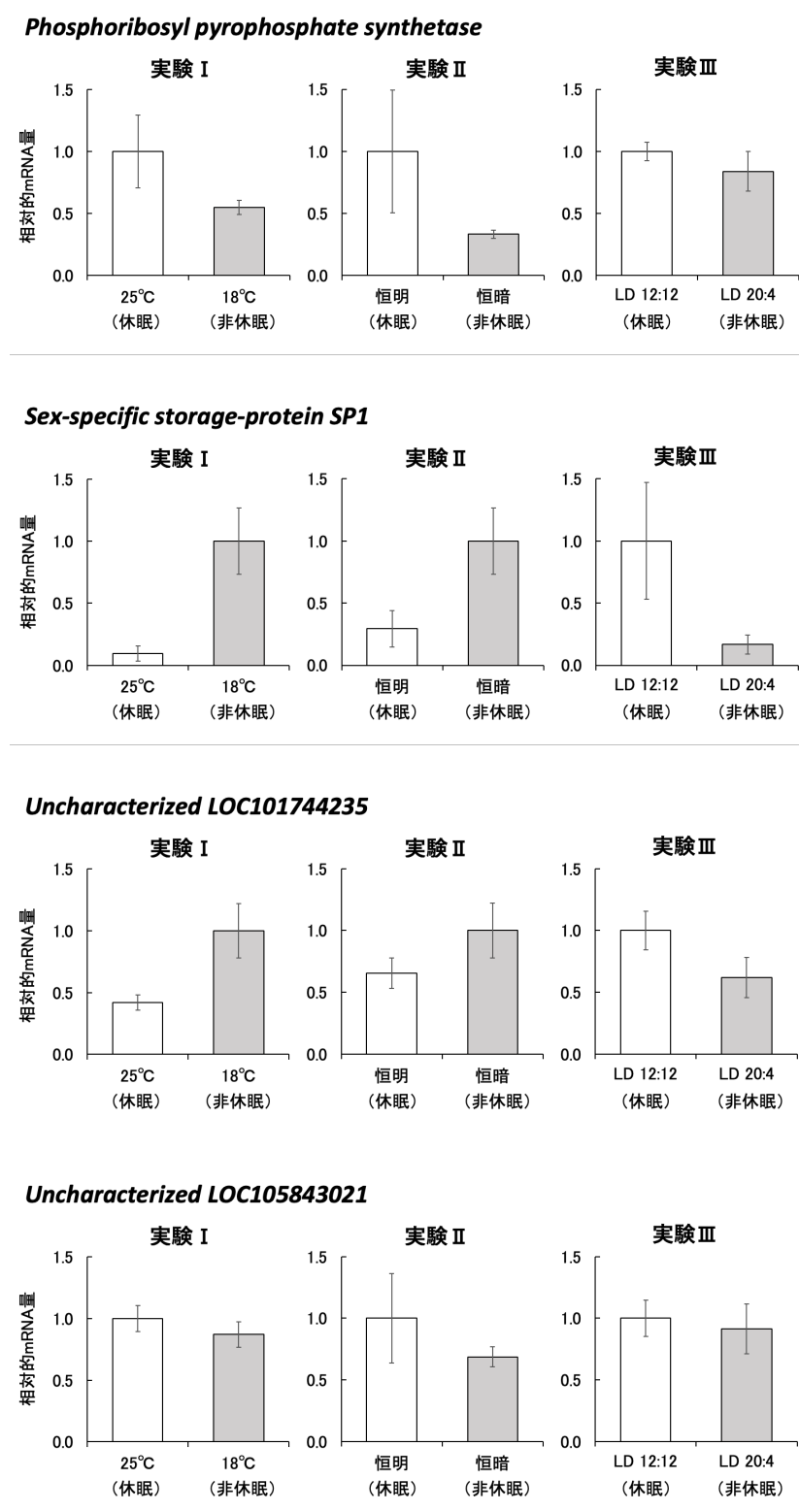


図 4-4. 続き



実験Ⅰでは、卵期の温度を 25°C とすることで休眠群を、18°C とすることで非休眠群を作成した。実験Ⅱでは、卵期の明るさを恒明とすることで休眠群を、恒暗とすることで非休眠群を作成した。実験Ⅲでは、幼虫期の日長を短日 (LD12:12) とすることで休眠群を、長日 (LD20:4) とすることで非休眠群を作成した。mRNA 量は平均値±標準誤差で表した (n = 3-6, Welch's t-test, *P < 0.05)。

(A) CAGE 解析で得られた発現差異遺伝子のうち、休眠群で非休眠群よりも発現が多かったもの (表 4-1A 参照、ただし、*Jhamt*、*Kr-h1*、*Pcft*、*LOC-80* の 4 つの遺伝子は除く)。

(B) CAGE 解析で得られた発現差異遺伝子のうち、非休眠群で休眠群よりも発現が多かったもの (表 4-1B 参照)。

Jhamt: Juvenile hormone acid methyltransferase、*Kr-h1*: Krüppel homolog 1、*Pcft*: Proton-coupled folate transporter、*LOC-80*: Uncharacterized *LOC110385080*。

第5章

総合考察

カイコは、母性制御された卵休眠を行う。二化性の系統では、母親が卵期と幼虫期に受容した気温や日長などの環境情報をもとに次世代卵の休眠モード（休眠・非休眠）が決定される（Kogure 1933, Watanabe 1924, Egi et al. 2014）。この休眠モードのプログラミングは蛹期よりも前に完了し、蛹期ではそのプログラムに従って内分泌系が調節されて卵の休眠化または非休眠化が起こる（Fukuda 1951, 1952）。幼虫の脳を対象とした移植実験から、休眠モードのプログラミングは脳で行われ、作成されたプログラムは脳に保存されることが報告されている（Hasegawa and Shimizu 1987）。しかし、環境情報をもとに休眠モードをプログラミングするメカニズムについては、分子レベルで明らかにされていない。そこで本研究では、網羅的な遺伝子発現解析技術である DNA マイクロアレイ解析と CAGE 解析を用いて、カイコの休眠制御に関連する遺伝子の検索を試みた。

本研究では、「休眠制御関連遺伝子は休眠卵産下群（休眠群）と非休眠卵産下群（非休眠群）の間で発現差異を示す」という仮説を立てた。そこで、休眠群と非休眠群の間で母親幼虫の脳内の発現差異遺伝子をスクリーニングした。しかしそれに先立って、実験に適したカイコ系統、つまり、適当な休眠誘導刺激を与えることで次世代卵の休眠率を 100%（休眠）または 0%（非休眠）に調節することができるカイコ系統の選別を行った（第2章）。二化性と考えられている 10 系統（c10、g32、k06、n25、p21、p22、p24、p44、p50、および p63）を対象として、休眠誘導刺激

（卵期の温度、卵期の明るさ、幼虫期の日長）を調節して休眠応答性を調べた。次世代卵の休眠率を 100%または 0%にすることができた系統は、卵期の温度だけを調節した場合は c10、p22、および p50 で、卵期の明るさだけを調節した場合は p50 系統のみであった。また、幼虫期の日長だけを調節した場合は、p44 と p50 系統であった。以上の結果から、3 種類の休眠誘導刺激のいずれに対しても、そのうちの 1 つだけを調節することで次世代卵の休眠率を 100%または 0%に制御可能な系統は p50 だけであった。したがって、本研究では p50 系統を研究対象とした。休眠制御関連遺伝子の検索においては、休眠誘導刺激である卵期の温度、卵期の明るさ、または幼虫期の日長のうちのいずれか 1 つだけを調節し、他の条件は一定にして休眠群と非休眠群を作成し、それぞれの実験グループで休眠群と非休眠群の間で発現差異遺伝子をスクリーニングした。次に、各実験グループから得られた発現差異遺伝子のうち、全ての実験グループに共通するものを休眠制御関連遺伝子の候補として絞り込んだ。これにより、休眠誘導刺激に対しては応答するが、休眠制御とは関係のない遺伝子を除去でき、休眠制御関連遺伝子だけを効率的にスクリーニングすることができる。つまりここでは、「休眠制御関連遺伝子は、休眠誘導刺激に対してその種類にかかわらず発現応答する」という仮説を立てている。

まず、DNA マイクロアレイ解析により休眠制御関連遺伝子を検索した（第 3 章）。休眠誘導刺激として、卵期の明るさまたは卵期の温度を調節した 2 つの実験グループを用意した。卵期の温度を調節した実験グループでは、高温（25℃）とすることで休眠群を、低温（18℃）とすることで非休眠群を作成した。卵期の明るさを調節した実験グループでは、恒明とすることで休眠群を、恒暗とすることで非休眠群を作成した。次に、各実験グループで休眠群と非休眠群の間で発現差異を示す

遺伝子をスクリーニングした。そして、2つの実験グループに共通する発現差異遺伝子を絞り込んだ結果、*Cytochrome P450 18a1* (*Cyp18a1*) および *Krüppel homolog 1* (*Kr-h1*) の2つの候補遺伝子が得られた。これらの遺伝子は、休眠群で非休眠群よりも発現が多かった。各実験群の休眠モードは卵期の環境刺激に依存して決定されているので、幼虫の脳で発現差があったこれらの遺伝子は、卵期に受容した環境情報に応答して休眠モードをプログラミングに参与している可能性があると考えられる。

Cyp18a1 は、昆虫の変態制御に不可欠なホルモンであるエクジステロイドを不活性化させる酵素をコードしている (Rewitz et al. 2010, Guittard et al. 2011)。一方、*Kr-h1* は幼若ホルモン (Juvenile hormone: JH) のシグナル伝達系の初期応答遺伝子である (Kayukawa et al. 2012, 2014)。また、他の昆虫種を用いたこれまでの研究から、変態に関与するホルモンであるエクジステロイドと JH は、休眠制御にも関与していると考えられている (Nijhout 1994, Denlinger 2012)。これらのことから、エクジステロイドと JH のシグナル伝達系がカイコの休眠プログラミングにも関与している可能性が考えられる。

しかしこれまで、カイコにおいてこれらのホルモンの投与によって休眠が制御されることは示されていない (Moroboshi et al. 1972, Moroboshi and Ishida 1975)。したがって、ホルモン制御系以外にも未知の重要な因子が存在し、関連因子が協同的に機能することで、休眠が制御されるのではないかと推測される。今回の DNA マイクロアレイ解析では、検出できた発現差異遺伝子の総数が少なく、ホルモン制御に関連するものしか得られなかった。DNA マイクロアレイの感度が低いために、他の重要な因子が検出できていない可能性がある。

DNA マイクロアレイ解析の結果を受けて、遺伝子発現の検出感度が高いシステムである CAGE 解析を用いてスクリーニングを行った（第4章）。休眠誘導刺激として、卵期の明るさ、卵期の温度、または幼虫期の日長を調節した3つの実験グループを用意した。卵期の温度または明るさを調節した実験グループについては、DNA マイクロアレイ解析の際と同一の実験条件とした。つまり、卵期の温度を調節した実験グループでは、高温（25°C）とすることで休眠群を、低温（18°C）とすることで非休眠群を作成し、卵期の明るさを調節した実験グループでは、恒明とすることで休眠群を、恒暗とすることで非休眠群を作成した。さらに、幼虫期の日長を調節した実験グループでは、短日（LD12:12）とすることで休眠群を、長日（LD20:4）とすることで非休眠群を作成した。次に、各実験グループで休眠群と非休眠群の間で発現差異を示す遺伝子をスクリーニングした。そして、それぞれの実験グループから得られた発現差異遺伝子のうち、3つの実験グループに共通するものを絞り込み、リアルタイム定量 PCR 解析で mRNA の発現パターンを検証した。その結果、候補遺伝子として、*Juvenile hormone acid methyltransferase*（*Jhamt*）、*Krüppel homolog 1*（*Kr-h1*）、*Proton-coupled folate transporter*（*Pcft*）、および機能が未知な *Uncharacterized LOC110385080*（*LOC-80*）の4つが得られた。これらの遺伝子は、休眠群で非休眠群よりも発現が多かった。ここでは、DNA マイクロアレイ解析を用いたスクリーニングで候補となった2つの遺伝子のうち、*Kr-h1* は得られたが、*Cyp18a1* は検出されなかった。DNA マイクロアレイ解析を用いたスクリーニングでは、休眠誘導刺激として卵期の環境刺激のみを調節した2つの実験グループで候補遺伝子を絞り込んだが、CAGE 解析を用いたスクリーニングでは、幼虫期の日長条件を調節した実験も加えて3つの実験グループで絞り込みを行った。したが

って、*Cyp18a1* は卵期に受容された環境刺激に特異的に応答し、その情報を幼虫期に伝達することに関与していると考えられる。

CAGE 解析を用いたスクリーニングから得られた 4 つの遺伝子に対して、RNAi による機能解析を行った。*Jhamt*、*Kr-h1*、*Pcft*、*LOC-80* の dsRNA を幼虫に投与して、各遺伝子の発現量の変化を確認した後、次世代卵の休眠率へ与える影響を評価した。dsRNA の投与によって、いずれの遺伝子でも発現低下がみられた。しかし、休眠率に与える影響は遺伝子によって異なっており、*Jhamt* または *Pcft* のいずれかをノックダウンした場合にのみ休眠率が低下した。一方、*Kr-h1* または *LOC-80* のノックダウンは休眠率に影響を与えなかった。なお、RNAi 実験では、dsRNA 投与後はカイコに休眠誘導刺激を与えなかった。したがって、ここでみられた次世代卵の休眠率の低下は、休眠誘導刺激の入力系の阻害が原因ではないと考えられる。以上のことから、*Jhamt* と *Pcft* が、カイコの幼虫脳内における次世代卵の休眠モードのプログラミングに関与していることが示唆された。幼虫期にこれらの遺伝子の発現が増加することが、次世代卵の休眠を誘導する情報となっていると考えられる。

Jhamt は JH 合成の律速酵素をコードしている遺伝子であり (Shinoda and Itoyama 2003)、*Kr-h1* は前述のように JH シグナル伝達系の初期応答遺伝子である。本研究では、休眠群の幼虫の脳では、これらの 2 つの遺伝子の発現が非休眠群よりも多いことが明らかになった。このことは、休眠群では、JH の生産が増加し、JH シグナル伝達系が活性化されていることを示唆する。JH は、様々な昆虫において休眠の制御に関与していると考えられている (Yagi and Fukaya 1974, Nijhout 1994, Denlinger et al. 2012, Denlinger and Armbruster 2014)。最近の報告によると、タンボコオロギ

(*Modicogryllus siamensis*) の日長依存的な休眠制御では、短日条件によって *Jhamt*

の発現が増加して、JH レベルが上昇することで、幼虫休眠が誘導されることが示唆されている (Miki et al. 2020)。さらに、キョウソヤドリコバチ (*Nasonia vitripennis*) では、母親の JH レベルが低下することによって次世代の幼虫休眠が誘導されることが報告されている (Mukai et al. 2020)。以上のことから、カイコの休眠プログラミングにも JH シグナル伝達系が関与していると考えられる。

しかし、RNAi を用いた *Kr-hl* のノックダウンは、次世代卵の休眠率に影響を与えなかった。昆虫の *Kr-hl* は、JH による変態抑制に関与する転写因子をコードしている (Minakuchi et al. 2009, Konopova et al. 2011, Lozano and Belles 2011, Kayukawa et al. 2014, Smykal et al. 2014)。したがって、カイコでは、休眠と発生はどちらも JH 依存的であるが、異なる経路で制御されている可能性がある。実際に、これまでの我々の経験からは、幼虫の成長速度と成虫になって産卵する卵の休眠モードには相関がみられなかった。休眠制御に関与する JH シグナル伝達系は、カイコの脳内で局所的に機能しているのではないかと推測される。

さらに、休眠群の幼虫の脳では、*Pcft* が非休眠群よりも多く発現していることが明らかになった。*Pcft* は、哺乳類の腸管の物質輸送系において、食物から得られる葉酸を取り込む葉酸輸送体をコードしている (Zhao and Goldman 2013, Hou et al. 2022)。昆虫における機能は明らかにされていない部分が多いが、*Pcft* はカイコでも葉酸の取り込みや輸送に関与している可能性がある。RNAi を用いた *Pcft* のノックダウンにより次世代卵の休眠率が減少したことから、葉酸がカイコの休眠制御に関与している可能性が考えられる。これまでの研究では、ハバチの 1 種

(*Acantholyda nemoralis*) では、葉酸の投与によって、卵巣細胞の分裂活性と核酸合成が促進され、幼虫休眠が中断されることが示唆されている (Zielińska and

Grzelakowska 1965a, 1965b)。さらに、タマネギバエ (*Delia antiqua*) の休眠蛹と非休眠蛹の間で発現量の異なるタンパク質を比較解析した研究から、葉酸代謝に関与する酵素が休眠制御に関連することが示唆されている (You-Jin et al. 2014)。他の昆虫でも、葉酸が休眠制御に関与する可能性がある。

本研究から、*Jhamt* と *Pcft* が、カイコの次世代卵の休眠モードのプログラミングに関与していることが示唆された。さらに、JH シグナル伝達系と葉酸が、カイコの休眠制御に関与している可能性も示唆された。これらの発見は、昆虫の休眠制御機構を分子レベルで解明する糸口になると考えられる。今後は、*Jhamt* と *Pcft* の発現がどのようなメカニズムで制御されているのかを調べる必要がある。さらに、他の昆虫で休眠制御に関係すると考えられているインスリンシグナル伝達系などの因子との相互作用も調べていきたい。

要旨

第1章 序論

カイコは、冬を越すために、卵（胚）で休眠する。カイコの卵休眠は母性制御されており、二化性系統では、母親が卵期と幼虫期に受容した環境情報をもとに次世代卵の休眠モード（休眠・非休眠）が決定される。休眠モードは蛹期よりも前に決定され、蛹期ではそれにしたがって内分泌系が調節されて、産下する卵の休眠化または非休眠化が起こる。この休眠モードのプログラミングは母親幼虫の脳で行われ、作成されたプログラムは脳に保存される。しかし、環境情報をもとに休眠モードをプログラミングするメカニズムについては、分子レベルで明らかにされていない。そこで本研究では、網羅的な遺伝子発現解析技術である DNA マイクロアレイ解析と CAGE 解析を用いて、カイコの休眠制御に関連する遺伝子の検索を試みた。

本研究では、「休眠制御関連遺伝子は休眠卵産下群（休眠群）と非休眠卵産下群（非休眠群）の間で発現差異を示す」という仮説を立て、休眠群と非休眠群の間で幼虫脳内の発現差異遺伝子をスクリーニングした。そして、得られた候補遺伝子に対して RNAi による機能解析を行い、休眠制御に本質的に関与しているかどうかを検証した。

第2章 休眠制御可能なカイコ系統の選別

適当な休眠誘導刺激を与えることにより次世代卵の休眠率を 100%（休眠）または 0%（非休眠）に調節することができる、休眠制御関連遺伝子のスクリーニングに適した系統を選別した。

二化性と考えられている 10 系統 (c10、g32、k06、n25、p21、p22、p24、p44、p50、および p63) を対象として、休眠誘導刺激である卵期の温度、卵期の明るさ、幼虫期の日長のうち、いずれか 1 つだけを調節し、他の条件は一定として休眠応答性を調べた。次世代卵の休眠率を 100% または 0% にすることができた系統は、卵期の温度だけを調節した場合は c10、p22、および p50 で、卵期の明るさだけを調節した場合は p50 系統のみであった。また、幼虫期の日長だけを調節した場合は、p44 と p50 系統であった。以上の結果から、3 種類の休眠誘導刺激のいずれに対しても、そのうちの 1 つだけを調節することで次世代卵の休眠率を 100% または 0% に制御可能な系統は p50 だけであった。したがって、本研究では p50 系統を研究対象とした。

第 3 章 DNA マイクロアレイ解析を用いたカイコの休眠制御関連遺伝子の検索

DNA マイクロアレイ解析を用いて休眠制御関連遺伝子を検索した。休眠誘導刺激として、卵期の明るさまたは卵期の温度を調節した 2 つの実験グループを用意した。そして、各実験グループにおいて、休眠群と非休眠の間で発現差異を示す遺伝子をスクリーニングした。次に、2 つの実験グループに共通する発現差異遺伝子を絞り込んだ。その結果、休眠制御関連遺伝子の候補として、*Cytochrome P450 18a1* (*Cyp18a1*) および *Krüppel homolog 1* (*Kr-h1*) の 2 つが得られた。これらの遺伝子は、休眠群で非休眠群よりも発現が多かった。*Cyp18a1* は、昆虫の変態制御に不可欠なホルモンであるエクジステロイドを不活性化させる酵素をコードしており、*Kr-h1* は幼若ホルモン (Juvenile hormone: JH) のシグナル伝達系の初期応答遺伝子である。これらのことから、エクダイソンレベルの低下、および JH シグナル伝達系の活性化が、カイコの休眠プログラミングに関与している可能性が示唆された。

第4章 CAGE 解析を用いたカイコの休眠制御関連遺伝子の検索

CAGE 解析を用いて休眠制御関連遺伝子を検索した。休眠誘導刺激として、卵期の明るさ、卵期の温度、または幼虫期の日長を調節した3つの実験グループを用意した。そして、各実験グループにおいて、休眠群と非休眠の間で発現差異を示す遺伝子をスクリーニングした。次に、3つの実験グループから得られた発現差異遺伝子のうち、全ての実験グループに共通するものを絞り込み、リアルタイム定量PCR解析で mRNA の発現パターンを検証した。その結果、休眠制御関連遺伝子の候補として、*Juvenile hormone acid methyltransferase* (*Jhamt*)、*Krüppel homolog 1* (*Kr-h1*)、*Proton-coupled folate transporter* (*Pcft*)、および機能が未知な *Uncharacterized LOC110385080* (*LOC-80*) の4つが得られた。いずれの遺伝子も、休眠群で非休眠群よりも発現が多かった。そこで、これらの遺伝子に対して RNAi を用いた発現抑制を行い、次世代卵の休眠率へ与える影響を評価した。その結果、*Jhamt* または *Pcft* のいずれかをノックダウンした場合は休眠率が低下したが、*Kr-h1* または *LOC-80* のノックダウンは休眠率に影響を与えなかった。これらのことから、*Jhamt* および *Pcft* がカイコの休眠プログラミングに関与していることが示唆された。*Jhamt* は JH 合成の律速酵素をコードしており、*Pcft* は哺乳類の腸管の物質輸送系において食物から得られる葉酸を取り込む葉酸輸送体をコードしている遺伝子である。したがって、JH シグナル伝達系と葉酸がカイコの休眠プログラミングに関与していると考えられる。

第5章 総合考察

本研究では、網羅的な遺伝子発現解析技術である DNA マイクロアレイ解析と CAGE 解析を用いて、カイコの休眠制御に関連する遺伝子の検索を試みた。その結果、*Jhamt* と *Pcft* が、カイコの休眠プログラミングに関与していることが示唆された。いずれも休眠群で非休眠群よりも発現が多いことから、幼虫の脳でこれらの遺伝子の発現が増加することが、休眠を誘導する情報になっていると考えられる。さらに、JH シグナル伝達系と葉酸が関与している可能性も示された。JH については、様々な昆虫種において休眠制御に関係することが示唆されてきた。しかし、葉酸については、休眠制御との関連を示唆した報告が過去に数件あるものの、近年は注目されていなかった。

本研究の成果は、休眠制御機構を分子レベルで解明するための新たな切り口になると考えられる。今後は、*Jhamt* と *Pcft* の発現を制御するメカニズムや、他の昆虫で休眠制御に関係すると考えられているインスリンシグナル伝達系などとの相互作用を調べていく必要がある。

謝辞

本研究の遂行、学会発表および論文の執筆にあたり、神戸大学大学院農学研究科の坂本克彦教授より終始丁寧なご指導を賜りました。坂本克彦教授には、学部生の時からお世話になり、社会人で入学した博士課程では研究活動と仕事の両立にご助力いただきました。ここに深謝の意を表します。また、数々のご助言とご指導を賜りました神戸大学大学院農学研究科の前藤薫教授と森直樹教授に深くお礼申し上げます。

本研究に用いた蚕種を提供いただきました九州大学大学院農学研究院遺伝子資源開発研究センター（ナショナルバイオリソースプロジェクト）様に御礼申し上げます。また、DNA マイクロアレイ解析のご支援をいただきました国立研究開発法人農業生物資源研究所様（当時）にも御礼申し上げます。

神戸大学大学農学部昆虫分子機能科学研究室の卒業生ならびに在学生の皆様には、研究活動を通して様々な面でお世話になりました。厚く御礼申し上げます。

最後に、これまで研究活動と私生活の両方を温かく見守りながら支えてくれた家族に感謝いたします。

※本研究は、JSPS 科研費（JP17K08151）の助成を受けたものである。

参考文献

- Ai J.W., Zhu Y., Duan J., Yu Q.Y., Zhang G.J., Wan F. and Xiang Z.H. (2011) Genome-wide analysis of cytochrome P450 monooxygenase genes in the silkworm, *Bombyx mori*. *Gene*, 480, 42-50.
- Ashok M., Turner C. and Wilson T.G. (1998) Insect juvenile hormone resistance gene homology with the bHLH-PAS family of transcriptional regulators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 2761-2766.
- Carninci P., Westover A., Nishiyama Y., Ohsumi T., Itoh M., Nagaoka S., Sasaki N., Okazaki Y., Muramatsu M., Schneider C. and Hayashizaki Y. (1997) High efficiency selection of full-length cDNA by improved biotinylated cap trapper. *DNA Research*, 4, 61-66.
- Charles J.P., Iwema T., Epa V.C., Takaki K., Rynes J. and Jindra M. (2011) Ligand-binding properties of a juvenile hormone receptor, Methoprene-tolerant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 21128-21133.
- Delanoue R., Slaidina M. and Leopold P. (2010) The steroid hormone ecdysone controls systemic growth by repressing dMyc function in *Drosophila* fat cells. *Developmental Cell*, 18, 1012-2021.
- Denlinger D.L. (2002) Regulation of diapause. *Annual Review of Entomology*, 47, 93-122.
- Denlinger D.L. and Armbruster P.A. (2014) Mosquito diapause. *Annual Review of Entomology*, 59, 73-93.
- Denlinger D.L., Valaitis A.P. and Lee K.Y. (1997) Further evidence that diapause in the gypsy moth, *Lymantria dispar*, is regulated by ecdysteroids: a comparison of diapause and nondiapause strains. *Journal of Insect Physiology*, 43, 897-903.

- Denlinger D.L., Yocum G.D. and Rinehart J.P. (2012) Hormonal control of diapause. *Insect Endocrinology* (ed. L.I. Gilbert), 430-463. Academic Press, London.
- Egi Y., Akitomo S., Fujii T., Banno Y. and Sakamoto K. (2014) Silkworm strains that can be clearly destined towards either embryonic diapause or direct development by adjusting a single ambient parameter during the preceding generation. *Entomological Science*, 17, 396-399.
- Forrest A.R.R., Kawaji H., Rehli M., Baillie J.K., de Hoon M.J.L., Harberle V. et al. (2014) A promoter-level mammalian expression atlas. *Nature*, 507, 462-470.
- Fukuda S. (1951) The production of the diapause eggs by transplanting the suboesophageal ganglion in the silkworm. *Proceedings of the Japan Academy*, 27, 672-677.
- Fukuda S. (1952) Function of the pupal brain and suboesophageal ganglion in the production of non-diapause eggs in the silkworm. *Annotationes Zoologicae Japonenses*, 25, 149-155.
- Gharib B., Legay J.M. and De Reggi M. (1981) Potentiation of developmental abilities of diapausing eggs of *Bombyx mori* by 20-hydroxyecdysone. *Journal of Insect Physiology*, 27, 711-713.
- Guittard E., Blais C., Maria A., Parvy J.P., Pasricha S., Lumb C., Lafont R., Daborn P.J. and Dauphin-Villennant C. (2011) *CYP18A1*, a key enzyme of *Drosophila* steroid hormone inactivation, is essential for metamorphosis. *Developmental Biology*, 349, 35-45.
- Haberle V., Forrest A.R.R., Hayashizaki Y., Carninci P. and Lenhard B. (2015) *CAGEr*: precise TSS data retrieval and high-resolution promoterome mining for integrative analyses. *Nucleic Acids Research*, 43, e51.
- Hasegawa K. and Shimizu I. (1987) In vivo and in vitro photoperiodic induction of diapause using isolated brain-suboesophageal ganglion complexes of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology*, 33, 959-966.

- Hou Z., Gangjee A. and Matherly L.H. (2022) The evolving biology of the proton-coupled folate transporter: New insights into regulation, structure, and mechanism. *The FASEB Journal*, 36, e22164.
- Ikeda K., Daimon T., Sezutsu H., Uda H. and Numata H. (2019) Involvement of the Clock Gene *period* in the Circadian Rhythm of the Silkworm *Bombyx mori*. *Journal of Biological Rhythms*, 34, 283-292.
- Ikeno T., Tanaka S., Numata H. and Goto S.G. (2010) Photoperiodic diapause under the control of circadian clock genes in an insect. *BMC Biology*, 8, 116.
- 石黒 慎一, 小島 信幸, 鈴木 幸一 (2015) コガタルリハムシの成虫休眠機構. 蚕糸・昆虫バイオテック, 84, 145-154.
- Itoh M., Kojima M., Nagao-Sato S., Saijo E., Lassmann T., Kanamori-Katayama M., Kaiho A., Lizio M., Kawaji H., Carninci P., Forest R.R.A. and Hayashizaki Y. (2012) Automated workflow for preparation of cDNA for cap analysis of gene expression on a single molecule sequencer. *PLoS One*, 7, e30809.
- Jiang X.F., Huang S.H. and Luo L.Z. (2011) Juvenile hormone changes associated with diapause induction, maintenance, and termination in the beet webworm, *Loxostege sticticalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 77, 134-144.
- Kanamori-Katayama M., Itoh M., Kawaji H., Lassmann T., Katayama S., Kojima M., Bertin N., Kaiho A., Ninomiya N., Daub C.O., Carninci P., Forest R.R.A. and Hayashizaki Y. (2011) Unamplified cap analysis of gene expression on a single-molecule sequencer. *Genome Research*, 21, 1150-1159.
- Kayukawa T., Minakuchi C., Namiki T., Togawa T., Yoshiyama M., Kamimura M., Mita K., Imanishi S., Kiuchi M., Ishikawa Y. and Shinoda T. (2012) Transcriptional regulation of juvenile hormone-mediated induction of *Krüppel homolog 1*, a repressor of insect

- metamorphosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 11729-11734.
- Kayukawa T., Murata M., Kobayashi I., Muramatsu D., Okada C., Uchino K., Sezutsu H., Kiuchi M., Tamura T., Hiruma K., Ishikawa Y. and Shinoda T. (2014) Hormonal regulation and developmental role of *Krüppel homolog 1*, a repressor of metamorphosis, in the silkworm *Bombyx mori*. *Developmental Biology*, 388, 48-56.
- Kodzius R., Kojima M., Nishiyori H., Nakamura M., Fukuda S., Tagami M., Sasaki D., Imamura K., Kai C., Harbers M., Hayashizaki Y. and Carninci P. (2006) CAGE: cap analysis of gene expression. *Nature Methods*, 3, 211-22.
- Kogure M. (1933) The influence of light and temperature on certain characters of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of the Department of Agriculture, Kyushu Imperial University*, 4, 1-93.
- Konopova B., Smykal V. and Jindra M. (2011) Common and distinct roles of juvenile hormone signaling genes in metamorphosis of holometabolous and hemimetabolous insects. *PLoS ONE*, 6, e28728.
- Kozlova T. and Thummel C.S. (2003) Essential roles for ecdysone signaling during *Drosophila* mid-embryonic development. *Science*, 301, 1911-1914.
- Lee K.Y. and Denlinger D.L. (1997) A role for ecdysteroids in the induction and maintenance of the pharate first instar diapause of the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Journal of Insect Physiology*, 43, 289-296.
- Li H. and Durbin R. (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25, 1754-1760.
- Li M., Mead E.A. and Zhu J.S. (2011) Heterodimer of two bHLH-PAS proteins mediates juvenile hormone-induced gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 638-643.

- Li Z.Q., Ge X., Ling L., Zeng B.S., Xu J., Aslam A.F.M., You L., Palli S.R., Huang Y.P. and Tan A.J. (2014) *CYP18A1* regulates tissue-specific steroid hormone inactivation in *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 54, 33-41.
- Lozano J. and Bells X. (2011) Conserved repressive function of *Krüppel homolog 1* on insect metamorphosis in hemimetabolous and holometabolous species. *Scientific Reports*, 1, 163.
- Makka T., Seino A., Tomita S., Fujiwara H. and Sonobe H. (2002) A possible role of 20-hydroxyecdysone in embryonic development of the silkworm *Bombyx mori*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 51, 111-120.
- Miki T., Shinohara T., Chafino S., Noji S. and Tomioka K. (2020) Photoperiod and temperature separately regulate nymphal development through JH and insulin/TOR signaling pathways in an insect. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117, 5525-5531.
- Minakuchi C., Namiki T. and Shinoda T. (2009) *Krüppel homolog 1*, an early juvenile hormone-response gene downstream of *Methoprene-tolerant*, mediates its anti-metamorphic action in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Developmental Biology*, 325, 341-350.
- Minakuchi C., Zhou X. and Riddiford L.M. (2008) *Krüppel homolog 1* (*Kr-h1*) mediates juvenile hormone action during metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *Mechanisms of Development*, 125, 91-105.
- Miura K., Oda M., Makita S. and Chinzei Y. (2005) Characterization of the *Drosophila* *Methoprene-tolerant* gene product. Juvenile hormone binding and ligand-dependent gene regulation. *The FEBS Journal*, 272, 1169-1178.
- Mori A., Oda T. and Wada Y. (1981) Studies on the Egg Diapause and Overwintering of *Aedes albopictus* in Nagasaki. *Tropical medicine*, 23, 79-90.

- Moribayashi A., Shudo C. and Kurahashi H. (2001) Latitudinal variation in the incidence of pupal diapause in Asian and Oceanian populations of the flesh fly, *Boettcherisca peregrina* (Diptera: *Sarcophagidae*). *Medical Entomology and Zoology*, 52, 263-268.
- Morohoshi S. and Ishida S. (1975) The control of growth and development in *Bombyx mori*. XXV. Induction of supernumerary larval ecdysis and non-diapause eggs by injection of the juvenile hormone. *Proceedings of the Japan Academy*, 51, 62-67.
- Morohoshi S., Ishida S. and Fugo H. (1972) The control of growth and development in *Bombyx mori*. XVIII. Production of non-diapause eggs by injection of the juvenile hormone. *Proceedings of the Japan Academy*, 48, 736-741.
- Murata M., Nishiyori-Sueki H., Kojima-Ishiyama M., Carninci P., Hayashizaki Y. and Itoh M. (2014) Detecting expressed genes using CAGE. *Methods in Molecular Biology*, 1164, 67-85.
- Mukai A., Mano G., Marteaux L.D., Shinada T. and Goto S.G. (2022) Juvenile hormone as a causal factor for maternal regulation of diapause in a wasp. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 144, 103758.
- Nakamura Y., Gotoh T., Imanishi S., Mita K., Kurtti T.J. and Noda H. (2011) Differentially expressed genes in silkworm cell cultures in response to infection by *Wolbachia* and *Cardinium* endosymbionts. *Insect Molecular Biology*, 20, 279-289.
- Nijhout H.F. (1994) Insect Hormones. *Princeton University Press*, New Jersey.
- Numata H., Shiga S. and Morita A. (1997) Photoperiodic receptors in arthropods. *Zoological Science*, 14, 187-197.
- Rewitz K.F., Yamanaka N. and O'Connor M.B. (2010) Steroid hormone inactivation is required during the juvenile-adult transition in *Drosophila*. *Developmental Cell*, 19, 895-902.

- Richard D.S., Warrent J.T., Saunders D.S. and Gilbert L.I. (1987) Haemolymph ecdysteroid titres in diapause- and non-diapause-destined larvae and pupae of *Sarcophaga argyrostoma*. *Journal of Insect Physiology*, 33, 115-122.
- Panthee S., Paudel A., Hamamoto H. and Sekimizu K. (2017) Advantages of the Silkworm As an Animal Model for Developing Novel Antimicrobial Agents. *Frontiers in Microbiology*, 8, 373.
- Riddiford L.M., Truman J.W., Mirth C.K. and Shen Y.C. (2010) A role for juvenile hormone in the prepupal development of *Drosophila melanogaster*. *Development*, 137, 1117-1126.
- Sakamoto T., Uryu O. and Tomioka K. (2011) The clock gene period plays an essential role in photoperiodic control of nymphal development in the cricket *Modicogryllus siamensis*. *Journal of Insect Physiology*, 57, 538-556.
- Saunders D.S. (1966) Larval diapause of maternal origin - II. The effect of photoperiod and temperature on *Nasonia vitripennis*. *Journal of Insect Physiology*, 12, 569-581.
- D.S. ソーンダース (1981) 昆虫時計 初版 正木進三訳, 339-349. サイエンス社, 東京.
- Shinoda T. and Itoyama K. (2003) Juvenile hormone acid methyltransferase: A key regulatory enzyme for insect metamorphosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 11986-11991
- Sim C. and Denlinger D.L. (2009) A shut-down in expression of an insulin-like peptide, ILP-1, halts ovarian maturation during the overwintering diapause of the mosquito *Culex pipiens*. *Insect Molecular Biology*, 18, 325-332.
- Smykal V., Daimon T., Kayukawa T., Takaki K., Shinoda T. and Jindra M. (2014) Importance of juvenile hormone signaling arises with competence of insect larvae to metamorphose. *Developmental Biology*, 390, 221-230.
- Suetsugu Y., Futahashi R., Kanamori H., Kadono-Okuda K., Sasanuma S., Narukawa J., Ajimura M., Jouraku A., Namiki N., Shimomura M., Sezutsu H., Osanai-Futahashi M.,

- Suzuki M.G., Daimon T., Shinoda T., Taniai K., Asaoka K., Niwa R., Kawaoka S., Katsuma S., Tamura T., Noda H., Kasahara M., Sugano S., Suzuki Y., Fujiwara H., Kataoka H., Arunkumar K.P., Tomar A., Nagaraju J., Goldsmith M.R., Feng Q.L., Xia Q.Y., Yamamoto K., Shimada T. and Mita K. (2013) Large scale full-length cDNA sequencing reveals a unique genomic landscape in a lepidopteran model insect, *Bombyx mori*. *G3* (Bethesda), 3, 1481-1492.
- Tabunoki H., Ono H., Ode H., Ishikawa K., Kawana N., Banno Y., Shimada T., Nakamura Y., Yamamoto K., Satoh J.I. and Bono H. (2013) Identification of key uric acid synthesis pathway in a unique mutant silkworm *Bombyx mori* model of Parkinson's disease. *PLoS ONE*, 7, e69130.
- Tanaka Y. (1950) Studies on hibernation with special reference to photoperiodicity and breeding of Chinese tussar-silkworm (II). *The Journal of Sericultural Science of Japan*, 19, 429-446.
- Tomioka K. and Sakamoto T. (2007) Effects of unilateral compound-eye removal on the photoperiodic responses of nymphal development in the cricket *Modicogryllus siamensis*. *Zoological Science*, 24, 604-610.
- Tschuch C., Schulz A., Pscherer A., Werft W., Benner A., Hotz-Wagenblatt A. Barrionuevo L.S., Litcher P. and Metens D. (2008) Off-target effects of siRNA specific for *GFP*. *BMC Molecular Biology*, 9, 60.
- Tsuchida K. and Yoshitake N. (1979) Effect of environmental condition on the voltinism of the silkworm, *Bombyx mori* reared on artificial diets. *The Japanese Society of Sericultural Science*, 48, 469-472.
- Wang Q., Mohamed A.A.M. and Takeda M. (2013) Serotonin receptor B may lock the gate of PTTH release/synthesis in the Chinese Silk Moth, *Antheraea pernyi*; A diapause initiation/maintenance mechanism? *PLoS One*, 8, e79381.

- Watanabe K. (1924) Studies on the voltinism of the silkworm, *Bombyx mori*. *Bulletin of the Sericultural Experiment Station*, 6, 411-455.
- Williams C.M. and Adkisson P.L. (1964) Photoperiodic Control of Pupal Diapause in the Silkworm, *Antheraea pernyi*. *Science*, 144, 569.
- Wilson T.G. and Fabian J. (1986) A *Drosophila melanogaster* mutant resistant to a chemical analog of juvenile hormone. *Developmental Biology*, 118, 190-201.
- Yagi S. and Fukaya M. (1974) Juvenile Hormone As a Key Factor Regulating Larval Diapause of the Rice Stem Borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Applied Entomology and Zoology*, 9, 247-255.
- Yamashita O. and Hasegawa K. (1966) Further studies on the mode of action of the diapause hormone in the silkworm, *Bombyx mori* L. *Journal of Insect Physiology*, 12, 957-962.
- You-Jin H., Wen-Xia H. and Bin C. (2014) Comparative analysis of proteins in non- and summer-diapausing pupae of the onion fly, *Delia antiqua* (Diptera: Anthomyiidae), using two-dimensional gel electrophoresis. *Acta Entomologica Sinica*, 57, 161-167.
- Zhang Z.L., Xu J.J., Sheng Z.T., Sui Y.P. and Palli S.R. (2011) Steroid receptor co-activator is required for juvenile hormone signal transduction through a bHLH-PAS transcription factor, methoprene tolerant. *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 8437-8447.
- Zhao R. and Goldman I.D. (2013) The proton-coupled folate transporter: physiological and pharmacological roles. *Current Opinion in Pharmacology*, 13, 875-880.
- Zielińska Z.M. and Grzelakowska B. (1965a) Folate derivatives in the metabolism of insects - I. Mitoses in cells of the follicular epithelium as evoked in *Acantholyda nemoralis* Thoms. by folate and its 4-aminoanalogue. *Journal of Insect Physiology*, 11, 405-411.
- Zielińska Z.M. and Grzelakowska B. (1965b) Folate derivatives in the metabolism of insects - II. Biosynthesis of nucleic acids in the polytrophic ovaries of the diapausing larvae of

Acantholyda nemoralis Thoms. as promoted by folic acid and its 4-aminoanalogue.

Journal of Insect Physiology, 11, 431-442.