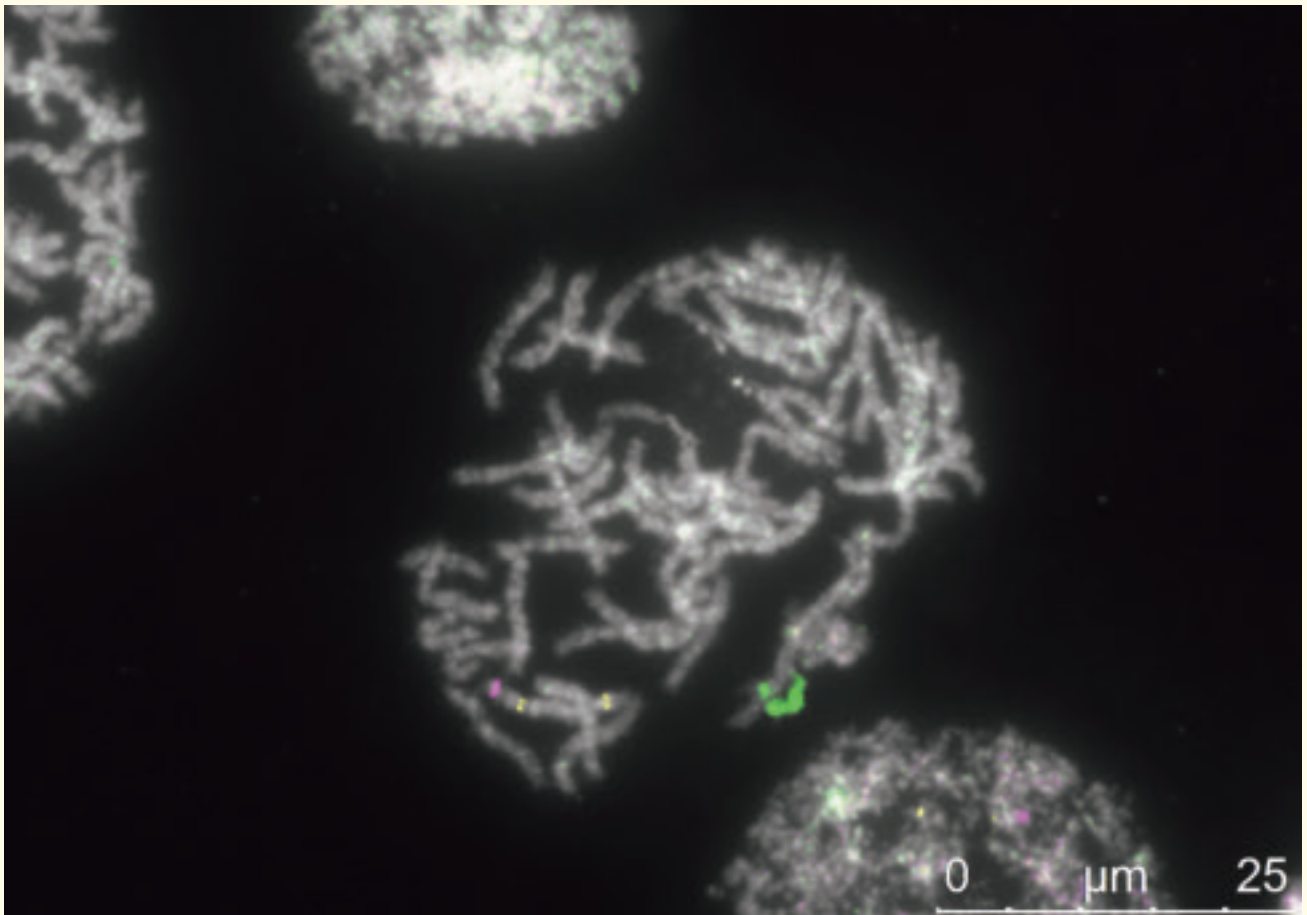


NBRP カイコニュースレター

おかいこさま

No.56

National Bio-Resource Project “Silkworm”
ナショナルバイオリソースプロジェクト「カイコ」情報誌
令和6年11月13日発行
<https://silkworm.nbrp.jp/index.html>



4倍体系統H14雌（ZZWO）のパキテン期染色体観察

グリーンで標識された染色体がW染色体
紫と黄色で標識された染色体がZ染色体対

写真提供 九州大学農学研究院 藤本

[NBRP 基盤技術整備プログラムの採択]

2023年3月に、農研機構廣川昌彦博士より、7系統のカイコの4倍体系統が寄託されました（表1、詳細はおかいこさま53号参照）。それらをユーザーの皆様へ実際に提供するにあたり、4倍体系統の染色体構成などの遺伝的な特徴を明らかにする必要があるとあり、2024年度のNBRP基盤技術整備プログラムに申請しました。結果、4倍体系統の分譲に必要な技術整備を行う計画が採択に至り、整備を進めております。

カイコの性染色体構成は雌ヘテロ型

で、雌がZW、雄がZZで、W染色体に雌性決定遺伝子が存在します。カイコでは、産下直後卵に人為的な処理を施すことで倍数体を作成できますが（Tazima and Ohnuma, 1967）、3倍体は雌雄ともに不妊であり、4倍体は雄の妊性が非常に低いため、両性生殖する倍数体系統の確立は困難であると考えられていました。廣川博士が確立した4倍体系統の雌は、従来知られているZZWW型の4倍体と同様に大型卵を産卵します。この系統は、2倍体との交雑後代は不妊であることから、4倍体であると考えられます。また、雄は従来知られていたZZZZ型の4倍体雄とは異なり、妊性を有します。

私たちは、4倍体系統の中でも、転座Wを有しているために、雌雄を幼虫斑紋で識別できるH14系統を主に利用して、交配実験や染色体構成の解析を行いました。その結果、以下に示す結果からH14系統の性染色体構成は雌がZZWO型4倍体、雄がZZZO型4倍体であると推定しました。①染色体数は2倍体のおよそ倍の112本であった。②H14系統と2倍体との性逆交配を行うと、H14が雌の場合、次代の雌は、従来から知られているZZW型3倍体と同様に正常な形と不整形な卵を混合して産卵するのに対して、H14系統が雄の場合、次代の雌は、正常な形と不整形な卵を混合して産卵する雌（ZZW型）の他に、大型卵のみを産卵する雌が生じた（図1）。③H14雌にZ染色体に連鎖する伴性赤蟻変異体（*sch/sch*）を交配しても赤蟻個体が生じなかったことから、H14雌は2個以上のZ染色体を有する。④W染色体の凝集体である性クロマチンの観察や、W染色体に由来するBACクローンをプローブとした染色体の観察から、W染色体の個数は1個だった（表紙写真、図2）。⑤4倍体雄においてDNA-seqを行い、得られたリードを参照配列にマッピングした際の深度の平均値を常染色体とZ染色体で比較すると、4倍体では、Z染色体の深度が、常染色体よりも低かった（図3）。

H14（4倍体）の交配において、雌雄の親（ZZWO型&ZZZO型）の染色体構成とは異なるZZZWやZZOO個体は、発生の途中で淘汰されているのではないかと考えています（表2）。このモデルに基づくと、ZW型2倍体雌とZZZO型4倍体雄の次代に生じるZWO型3倍体雌が大型卵を産卵すると考えることができます。H14系統の性染色体構成の推定を立証して、H14系統の分譲を開始するために、H14系統の雌雄の性染色体を観察すると同時に、定量リアルタイムPCRでZ染色体の個数を個体ごとに推定する技術の整備を行っています。2024年度中には、技術整備を終え、4倍体系統の分譲を開始予定です。

表1 寄託系統抜粋

寄託系統番号	系統名	備考	寄託系統番号	系統名	備考
H09	<i>Isx</i> (I) × male	間性	H15	$4n, T(W;3)Ze \times 4n p \text{ sib}$	4倍体
H10	$T(W;3)Isx-3, Ze$ (I) × male	間性	H16	$4n, T(W;5)+^{pe} \times 4n, pe \text{ sib}$	4倍体
H11	<i>Isx-4</i> (I) × male	間性	H17	$\{Sa4n \rightarrow p \text{形}(0)\} \times 4n \text{ sib}$	4倍体
H12	<i>Isx-2</i> (I) × male	間性	H21	$4n \times 4n (pe) \text{ sib}$	4倍体
H13	<i>Isx-5</i> (I) × male	間性	H22	(乖離Sa · Ze) 4n sib	4倍体
H14	$4n, T(W;2)p^{Sa} \times 4n p \text{ sib}$	4倍体	H23	$4n p \times 4n p \text{ sib}$	4倍体

4倍体系統、雌が雄化する間性系統（廣川, 1995）、ホメオティック遺伝子の変異体など、合計で47系統が寄託されました（おかいこさま53号）

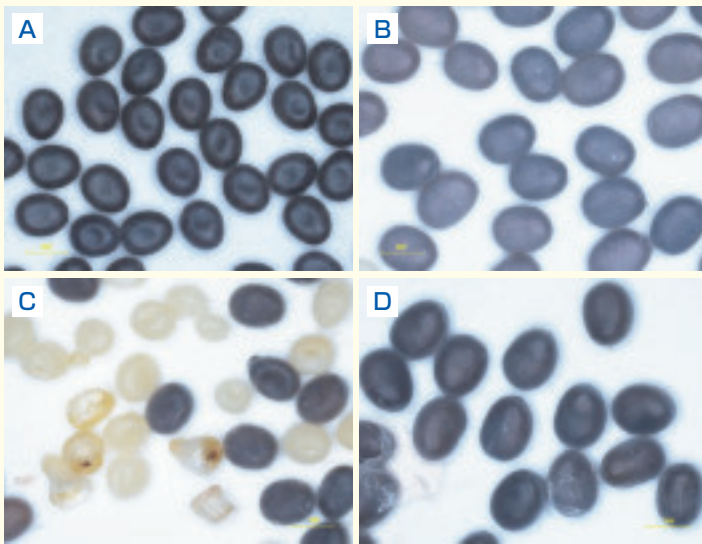


図1 2倍体と倍数体系統の卵サイズ
A 2倍体 B 4倍体 C・D 2倍体×4倍体の次代3倍体



図2 4倍体系統雌における性クロマチンの観察
W染色体を示す性クロマチンが1つしか確認されない。

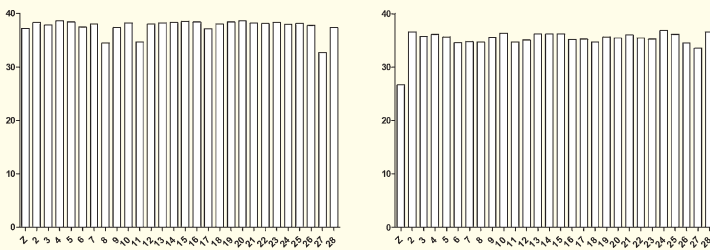


図3 2倍体雄（左）と4倍体雄（右）のDNA-seq解析
リードを参照配列にマッピングして、平均深度を染色体ごと
に示した。一番左側の棒グラフがZ染色体の深度を示す。

表2 4倍体系統の性染色体構成の推定

推測される 配偶子構成		ZZZO型4倍体雄	
		ZZ	ZO
ZZWO型 4倍体雌	ZW	ZZZW 淘汰	ZZWO 生存
	ZO	ZZZO 生存	ZZOO 淘汰

4倍体系統の使用例として、4倍体を利用した3倍体の作出を挙げることができます。カイコでは精子の凍結保存が可能です。カイコの精子には、有核精子の他に、遺伝情報を有さない無核精子が存在します。無核精子は、有核精子が妊性を有するために必須ですが、無核精子は有核精子に比べて凍結耐性が劣るため、凍結精子の妊性が低下します。この問題を解決するために、有核精子を持たず不妊である3倍体の無核精子を凍結精子に混合することで、凍結精子の受精能力を高めることが可能です (Takemura et al., 2006)。この3倍体の作出に4倍体が使用できます。

H14系統の次代3倍体 (H914) の精子の性質の検証を行いました。この検証には遺伝的に無核精子を有さないために雄が不妊となるSx1In3系統 (Sakai et al., 2020) を利用しました。非休眠系統の雌にH914雄 (n=15) やSx1In3雄 (n=8) を単独で交配した場合、産下卵数が少なく孵化率は1%以下でしたが、非休眠系統の雌15頭にH914雄を交配した後、Sx1In3系統の雄を再交配したところ、産下卵総数3251粒に対して、孵化率は86.4%でした (図4)。この結果から、H14系統の次代3倍体雄は、無核精子の供給源として利用可能であることが示唆されました。

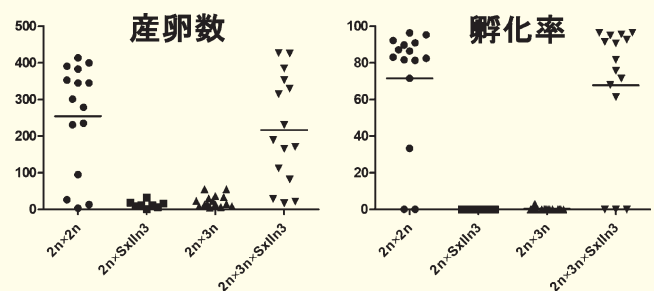


図4 3倍体雄の妊性の確認と二重交尾によるSx1In3系統の妊性のレスキュー実験。雌は非休眠系統。

4倍体系統は、倍数性の変化が遺伝子発現や形質発現に与える影響を解析する実験にも利用可能です。廣川博士は、遺伝的に性分化に異常を有する間性系統を3倍体化すると、性分化異常が顕在化することを報告されました（廣川, 1999）。私たちは、廣川博士の間性系統とは別に性分化に異常を有する系統を持っており、その系統の雌にH15系統（H14とは異なる4倍体系統）を交配しました。蛹期に雌雄鑑別を行ったところ、雌29、雄225で、雌雄比が雄に偏りました。蛾の時点で改めて雌雄鑑別を行ったところ、雄と判定された個体の中に、腹部に卵を持ち、交尾器が雄化した雌が多数混在していました（図5）。これらの雌の卵は、正常な形と、不整形な形が混在する、ZZW型3倍体に特有の卵でした。一方で、外部形態がほぼ正常な雌も分離しました。それらに産卵させたところ、すべての個体が大型卵を産卵しました。これらの現象は、性分化異常の原因がW染色体に有り、大型卵を造卵するZWO個体は雌に近くなり、正常な形と不整形な形の卵を造卵するZZW個体で雄化が顕在化すると考えると説明可能です。カイコの性決定では、Z染色体に連鎖する*Masc*遺伝子の働きをW染色体の*Fem*が抑制することで雌性が決定され、*Masc*遺伝子の働きが抑制されないと、雄性が決定されることが知られています（Kiuchi et al., 2014）。性分化異常系統のW染色体上の*Fem*に何らかの異常があるため、ZZW型の3倍体では、2コピー存在する*Masc*遺伝子の働きを完全に抑制できない可能性が考えられます。

このように、廣川博士が作出された4倍体系統は、それ自体が遺伝学的研究を行うための材料として貴重であるだけでなく、3倍体の作出や、通常の2倍体では行えないような実験を行う際にも利用可能です。4倍体系統の性染色体構成の確定には、まだ実験データが不足していますが、カイコ4倍体リソースの整備状況をお知らせしたく、ご報告させていただきました。NBRPカイコとして4倍体系統を分譲可能になりましたら、ぜひご利用をご検討下さい。



図5 性分化異常系統2倍体雌×4倍体系統雄の次代蚕
A 2倍体雌。雄化の程度は低い。B・C 3倍体世代の雌。雄の把握器が形成されるなど、顕著に雄化した。

参考文献

- 廣川昌彦, 1995. 家蚕における性の制御に関する研究. 福島蚕試研報告, 28, 1-104.
- Tazima and Ohnuma, 1967. Experimental induction of androgenesis, gynogenesis, and polyploidy in *Bombyx mori* by treatment with CO₂ gas. The Journal of Sericultural Science of Japan 36, 286-292.
- Takemura et al., 2006. Apyrene sperm from the triploid donors restore fecundity of cryopreserved semen in *Bombyx mori*. J. Insect Physiol. 52, 1021-1026.
- Sakai et al. 2020. Double-copulated introduction of ejaculate with dominant larval phenotype to maintain *Bombyx mori* mutant with dysfunctional apyrene sperm. J. Insect Biotechnol. Sericology. 89, 39-43.
- 廣川昌彦, 1999 蚕の性制御技術開発試験 (1) 間性蚕を利用した性制御法の開発 ②C間性系統の3倍体における高度雄性化現象 平成10年度福島県蚕業試験場年報
- Kiuchi et al., 2014. A single female-specific piRNA is the primary determiner of sex in the silkworm. Nature. 509, 633-636.

【炭酸水処理による4倍体の作出】

従来、凍結精子の妊性向上のために3倍体雄の精子を混合する際、3倍体雄の作出には、東京農工大学蚕学研究室の横山教授が開発された方法を利用していました（横山、2013）。産下直後の卵を炭酸水に1時間浸漬するだけで、産下卵の半数程度が倍数体になります。2倍体と倍数体を区別するためには、卵色の突然変異を利用します。淡赤眼白卵（*pe*）と赤卵（*re*）は第五染色体上に連鎖する突然変異です。*pe*ホモ、*re*ホモはそれぞれ白卵、赤卵となります。重要なのは、*pe re*の二重劣性個体は、白卵となる点です。これは、漿液膜における色素形成において、*pe*座が*re*座の上位で機能しているために起こる遺伝現象です。*pe*+^{*re*}/^{*pe*}*re*雌に*pe re*雄を交配すると、カイコの雌では減数分裂時に組換えが生じませんので、次代には白卵と赤卵のみが生じます（図6）。一方、産下直後の卵を炭酸水に浸漬した場合、減数分裂の異常により、卵核と、卵核とは遺伝的に異なる極体が融合し、2n卵核や3n卵核が生じます。それらの倍数性の卵核の遺伝子型が+^{*pe*}+^{*re*}となるため、次世代の正常着色卵（黒卵）から孵化した個体が3倍体か4倍体となります（図6）。

カイコの性染色体構成は雌がZW、雄がZZで、W染色体を1本でも持っている、雌となります。黒卵は、卵核と、それとは遺伝的に異なる極体が融合した結果生じるので、かならずW染色体を1つ以上保有しているため、黒卵から孵化した個体は雌となります。可視形質では3倍体と4倍体を識別できませんが、2倍体の雄と交配することで区別できます。3倍体の雌（ZZW）は正常な形と、形が不揃いな卵を造卵します。また、2倍体との交雑で生じる次代は、染色体の異数性が原因で胚発生の初期で致死します。一方で、ZZWW型4倍体やZZZW型4倍体に2倍体の雄を交配すると、次世代の3倍体は正常に孵化します。ZZWW型4倍体は、ZW型2倍体やZZZW型4倍体よりも大型卵を産卵します。そのため、産下卵の大きさでも、倍数性を判定することが可能です。なお、原理的には、ZZZW個体も生じますが、ZZZW個体は虚弱なため、飼育の過程で淘汰されてしまうようです。

黒卵から孵化した個体のおよそ9割がZZW型3倍体、1割がZZWW型4倍体です。そして、ZZWW型4倍体とZZ型2倍体との交配を行うと、次世代のおよそ1/6が雄となります。このように、*pe*系統と*re*系統とを交配して*pe*+^{*re*}/^{*pe*}*re*雌を作出することから始まり、炭酸水処理後に黒卵から孵化個体を得て、それらと2倍体とを交配して、選抜を行うことで、ようやく3倍体の雄を得ることができます。なお、本実験を行うための材料として、*pe*系統としてe20、*re*系統としてxe28、*pe re*系統としてD30がNBRPカイコより分譲可能です。

参考文献

横山 岳 炭酸水浸漬処理による倍数体蚕の誘発 東京農工大学科学技術展2013.

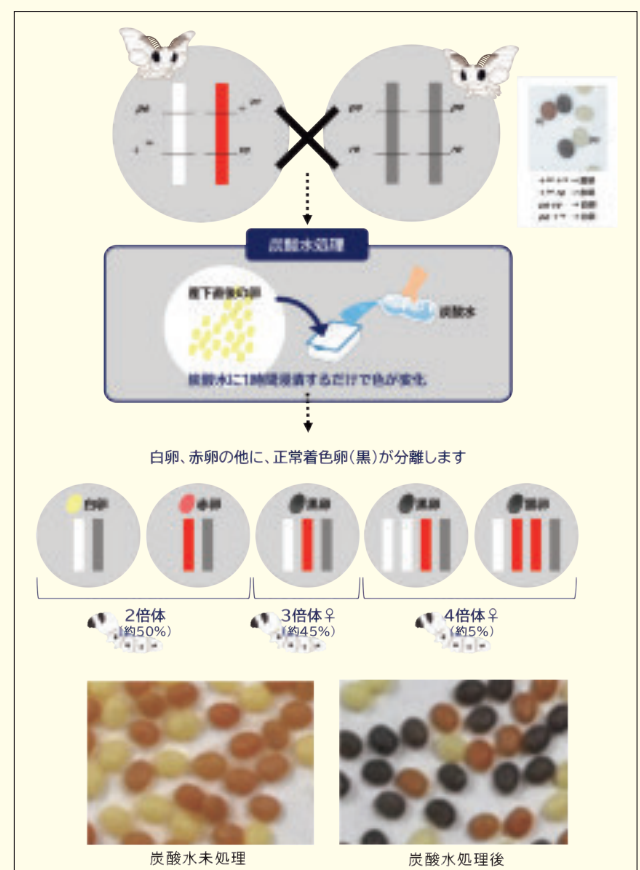


図6 2倍体、3倍体を作成する炭酸水処理実験

分譲可能なリソースの紹介

●九州大学（代表機関）

2024年度の飼育スケジュール

表を目安に連絡を頂ければ分譲します。時期が合わない場合には中核機関九州大学までご連絡下さい。

時期	孵化日	幼虫時期	蛹時期
1期	5月10日	5月10日～6月1日	6月2日～10日
2期	7月2日	7月2日～24日	7月25日～8月2日
3期	8月20日	8月20日～9月11日	9月12日～20日
4期	10月4日	10月4日～26日	10月27日～11月4日
5期	11月22日	11月22日～12月14日	12月15日～23日
6期	1月9日	1月9日～31日	2月1日～9日

カイコ並びにクワコのDNAを分譲しています。

突然変異系統（約500系統）並びに、クワコ（北海道から鹿児島まで全国40数地点）のDNAレポジトリーを整備しました。飼育が困難、変異体の情報が欲しいなどの場合に便利です。個別別に作成していますので遺伝多型を調べる実験にも利用できます。

●信州大学（分担機関）（野蚕関係）

日本のヤママユガ科ガ類を保存しています。ホームページをご覧ください。

<https://www.shigen.nig.ac.jp/wildmoth/index.jsp>
管理、質の向上に一層の努力を重ねていきます。

種名	ステージ	時期	提供
ヤママユガ	卵（休眠）	9月～翌年6月	～100粒
	幼虫	6月～9月	～50頭
	蛹	7月～10月	～50頭
	成虫	8月～10月	～10頭
サクサン	卵（非休眠）	4月～8月	～100粒
	幼虫	6月～9月	～50頭
	蛹（休眠）	9月～翌年5月	～50頭
	成虫	5月～10月	～10頭
エリサン	卵（非休眠）	通年	～1000粒
	幼虫	通年	～100頭
	蛹（休眠）	通年	～100頭
	成虫	通年	～10頭

他にウスタビガ、オオミズアオ、オナガミズアオ、ヒメヤママユ、シンジュサン、エゾヨツメなどを扱っています。不明な点は下記にお問い合わせ下さい。

〈問い合わせ先〉 梶浦善太 zkajiur★shinshu-u.ac.jp

★を@に置きかえて送信ください。



2024年10月11日に、伊都キャンパスの桑の葉上で、ハスモンヨトウの幼虫を見つけました。桑の葉の乳液には毒性があるため、昆虫は、特別な消化機構を有していないと、桑を摂食することができないと考えられています。海外では、ハスモンヨトウは桑の害虫としても知られていますので、日本でも注意が必要になるかもしれません。

ニュースレター“おかいこさま”について

蚕は我が国の重要な農業生物でした。農家で大切に飼育される蚕は家のお座敷で養われる程で、「おかいこさま」「お蚕（こ）様」と呼ばれ今日に至っています。カイコは日本人にとって特別な昆虫です。皇居内のご養蚕所では皇后様が毎年、「おかいこさま」を養われています。

「おかいこさま」は世界の何処にもない日本独自のバイオリソースです。日本発のライフサイエンス素材からオリジナルな研究を展開する情報誌の名前として用いています。

ニュースレター“おかいこさま”編集・発行

☎819-0395

福岡市西区元岡744 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内

ナショナルバイオリソースプロジェクト

「カイコ」課題代表 藤井 告

TEL 092-802-4821

fujii.tsuguru.233★m.kyushu-u.ac.jp

★を@に置きかえて送信ください。

