

第三章 *BmGC-I* の解析

緒言

第一章と第二章で述べた通り、カイコのかすり変異体の原因は、受容体型グアニル酸シクラーゼ遺伝子の異常であることが明らかになった。昆虫は複数の受容体型グアニル酸シクラーゼをもち、キイロショウジョウバエでは少なくとも7つの遺伝子、カイコでは8つの遺伝子が、それぞれのゲノム上に存在している。これら遺伝子の多くは種間で保存されており、それらが重要な働きをしていることが予想されるが、昆虫の受容体型グアニル酸シクラーゼの機能に関する情報は少ない。もっともよく特徴づけられているのはショウジョウバエの *Gyc76C* であり、この遺伝子は *semaphorin-1a-plexin A* を介した軸索誘導 (Ayoob et al., 2004; Chak and Kolodkin, 2014) や筋肉の発生 (Parel et al., 2012)、唾腺の発生 (Patel and Myat, 2013)、マルピーギ管における免疫応答やストレス応答 (Overend et al., 2012)、翅の横脈形成 (Schleede and Blair, 2015) など多様な現象へ関与することが知られている。また、ミカンコミバエ (*Bactrocera dorsalis*) の *BdmGC-1* は、インカ細胞において羽化ホルモン (Ecdysion hormone, EH) の受容体として機能し、Ecdysis triggering hormone (ETH) の放出に関与すること示されている (Chang et al., 2009)。カイコの *BmN* 細胞においては、ion transport peptide (ITP) や ITP-like (ITPL) の受容体を介して、*BmGyc76C* の cGMP 産生が活性化されることが示唆されている (Nagai et al., 2014)。また、タバコスズメガ *Manduca sexta* の触角において、受容体型グアニル酸シクラーゼの cGMP 産生能がフェロモン受容によって活性化されること (Stengl, 2010)、ならびに内因性の cGMP の増加によりフェロモンの感受性が変化することが報告されている (Flecke et al., 2006)。これらは受容体型グアニル酸シクラーゼ

が、昆虫の様々な生理現象で重要な働きをしていることを示している。一方、第一章と第二章により、*BmGC-I* が *q* の原因遺伝子であることが明らかになったが、*BmGC-I* がどのようにして *q* の形質に影響しているかは未解明である。そこで第三章では、*BmGC-I* の機能解明のためにいくつかの解析を行った。

方法

Total RNA の抽出および逆転写反応

逆転写反応のために、中腸、卵巣、精巣、絹糸腺、マルピーギ管、脳、脂肪体、各組織と2 齢2 日目から5 齢0 日目までの各ステージの皮膚から Total RNA の抽出を行った。方法は第一章と同様に行った。

定量的 RT-PCR

mRNA の発現量を測定するために、KAPA SYBR® FAST qPCR kit (Kapa Biosystems, Boston, MA, USA) と ABI StepOne™ Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems)を用いて、定量的 RT-PCR を行った。定量的 RT-PCR に使用したプライマーは Table 4 に示した。各 mRNA の発現量は *ribosomal protein 49 (rp49)*により、正規化を行った。それぞれの発現量は比較 Ct 法により計算をした。

RT-PCR

RT-PCR は TaKaRa Ex Taq を使って行った。RT-PCR は以下の条件で行った。変性を 94°C で2 分間した後、94°C で30 秒、アニーリングを 58°C で30 秒、伸長を 72°C で1 分というプロセスを 30-40 サイクル行った。RT-PCR に用いたプライマーは Table 5 に示した。

in vivo エレクトロポレーション

in vivo エレクトロポレーションは Ando and Fujiwara (2013)の報告を参考にして行った。ト

ランスポゼース *piggyBac* の認識配列をもち、カイコの構成的プロモーターである *Bombyx Actin 3 (BmA3)* プロモーター下にレポーター遺伝子である緑色蛍光タンパク質 *enhanced green fluorescent protein (EGFP)* および赤色蛍光タンパク質 (*DsRed2*) の遺伝子をもった pPIG-A3GFP::A3DsRed ベクターは東京大学 山口淳一博士のご好意によりいただいた。また、*BmA3* プロモーター下で *piggyBac* を発現させる pHA3PIG ベクターは農業生物資源研究所 瀬筒秀樹博士によりいただいた。*BmGC-I* 遺伝子を組込んだコンストラクトの構築のため、BmGC-I_F2+BamHI (5'-ACTAATTCAAGGATCCATCAGATAAAAATGTTAGTGGAGATCGTGC-3') と BmGC-I_R2+NotI (5'-TCTAGAGTCGCGGCCGCTTACACTATAGAATCATTAGGT-3') プライマーにより、PCR を行って *BmGC-I* の翻訳領域の増幅を行った。PCR は PrimeSTAR®Max DNA Polymerase (TaKaRa) を用いて、変性を 98°C で 10 秒、アニーリングを 55°C で 5 秒、伸長を 72°C で 4 分間のプロセスを 35 サイクルする反応条件で行った。pPIG-A3GFP::A3DsRed は BamHI (NEB) と NotI (NEB) で切断し線形化を行った。増幅した PCR 産物は In-Fusion® HD Cloning Kit (Clontech) を用いて、切断した pPIG-A3GFP::A3DsRed に組込んだ。*BmGC-I* 断片は *DsRed2* と置換する形でベクターに組み込んだ。作成したコンストラクトは pPIG-A3BmGC-I::A3GFP と名付けた。pPIG-A3BmGC-I::A3GFP と pHA3PIG はインジェクションバッファーに溶解し、それぞれ 500 ng/μl になるように混合させた。この混合液 2 μl を 2 齢 2 日目の幼虫の体液にインジェクションした。エレクトロポレーションには NEPA21 エレクトロポレーター (Nepa Gene

Co., Ltd. Chiba, Japan)を用いた。エレクトロポレーションの際には、電極と幼虫の皮膚の間にはリン酸バッファの液滴をたらし、電気刺激が間接的に幼虫の皮膚に適用できるようにした。エレクトロポレーションの条件は電圧を30Vにし、1回あたりの時間を380ミリ秒にしたパルスを用いた。

結果

q 系統ではメラニン、プテリジン、オモクローム色素合成に関わる遺伝子の発現が変動していることが先行研究により報告されている (Kato et al., 2006; Nie et al., 2014)。 *BmGC-I* が色素合成遺伝子に影響を与えているのかどうかを評価するために、 *BmGC-I^{KO}* カイコにおいて色素合成遺伝子の発現を調べた (Fig. 10)。発現量を調べる対象とした遺伝子には、 Nie et al. (2014)の報告に基づいて、メラニン、プテリジン、オモクローム、各色素合成経路などに関わる遺伝子また幼若ホルモン代謝に関わる遺伝子で特に発現の上昇が大きかったものを選んだ。 Nie et al. (2014)と同様に、色素合成が活発になる4眠期の皮膚で発現量の測定を行った。その結果、 *BmGC-I^{KO}* カイコでメラニン (*yellow-h2* と *yellow-f4-2*)、プテリジン (*GTP cyclohydrolase Ia*)合成に関わる遺伝子の有意な発現の上昇が確認できた (それぞれ 3.5 と 2.4、1.7 倍上昇)。一方で、オモクローム合成に関わる遺伝子 (*kymurenine formamidase* と *Bm-cardinal*)では有意な発現量の増加は確認できなかった。ただ、オモクロームに関しては前駆体の3-ヒドロキシキヌレニンの輸送に関わると考えられる *w-3* の9.2倍の発現の上昇が確認できた。また、幼若ホルモン代謝に関わると考えられる *BGIBMGA010392* も正常系統に比べて約3.3倍に上昇していることが確認できた。これらの結果は *BmGC-I* が少なくともいくつかの色素合成遺伝子の発現に影響を与えることを示していた。また、 *BmGC-I* は幼若ホルモン代謝などの色素合成以外の代謝経路に関わる遺伝子の発現にも影響を与えていることを示唆していた。

色素合成は幼虫の脱皮のたびに必要になり、特に脱皮期にかけて *ebony*、 *yellow* のような色素合成遺伝子の発現が上昇することが報告されている (Futahashi et al., 2008)。 *BmGC-I*

はこれと一致するように、脱皮期において、いくつかの色素合成に関わる遺伝子の発現に影響を示していた。一方で、*q* の形質は3 齢から初めて観察できるようになり、5 齢0 日で最も明瞭になる。そこで、次に、発育段階における *BmGC-I* の発現が色素合成遺伝子の発現パターンや *q* の表現型のパターンと関連しているのかどうかを調べることにした。そのために、定量 RT-PCR により正常系統の皮膚における *BmGC-I* の発現を継続的に調べた (Fig. 11)。*BmGC-I* の発現は2 齢2 日から4 齢1 日までは一定の発現を示した。大きなピークは4 齢2 日に検出でき、その発現量は2 齢2 日に比べ約7 倍に上昇していた。その後5 齢になるまで、2-3 倍の発現上昇が検出できた。4 齢2 日から5 齢までの発現は *q* の形質が5 齢0 日でもっとも明瞭に観察できるという事実とよく一致しており、これらの結果は4 齢中期からの *BmGC-I* の発現が色素合成の制御に関連しているかもしれないことを示唆していた。一方で、*BmGC-I* の発現は脱皮期ごとの色素合成の上昇パターンとは一致してないこともわかった。

次に、正常系統の皮膚で発現のピークが観察できた4 齢2 日で、*BmGC-I* 遺伝子の組織分布を、脳、中腸、卵巣、精巣、絹糸腺、脂肪体、マルピーグ管と皮膚において調べた。Fig. 12 に示したように、*BmGC-I* 遺伝子は様々な組織において発現が確認できた。脳、中腸、皮膚で強い発現が、卵巣と絹糸腺で中程度の発現が、精巣とマルピーグ管では弱い発現が検出できた。一方で、脂肪体では *BmGC-I* の発現が検出できなかった。これらの結果は様々な組織において *BmGC-I* が機能している可能性を示していた。しかしながら、現在までに、*q* 変異体で皮膚以外の組織に可視形質を生じるとの報告はなされていない。

組織別の発現の結果はまた、*BmGC-I* の変異による色彩パターンの異常が皮膚以外の他

の組織に由来する可能性を示していた。そこで、*BmGC-I* の皮膚における働きを調べるために、*in vivo* エレクトロポレーションによって *q* 系統の皮膚に *BmGC-I* 遺伝子を導入し、色彩パターンへの影響を観察した。そのために構成的発現を示すカイコの *Actin 3 (A3)* プロモーターの下流に *BmGC-I* を導入したプラスミドを構築した (Fig. 13A)。これを2齢2日の *q* 系統の幼虫にインジェクションを行い、エレクトロポレーションによって皮膚へと導入させた。その際、インジェクションする部位は腹部の第2体節を選んだ。この部位では *q* 特有の黒色の斑紋が現れるので、*BmGC-I* の強制発現の影響が観察しやすいと考えられた。構築したプラスミドには緑色蛍光タンパク質をコードする *EGFP* 遺伝子をレポーターとして導入してあるので、遺伝子導入ができた細胞は蛍光を示すことで識別できる (Fig. 13B, left panel)。丸で示したように、遺伝子導入できた左の半月紋の近くで黒色のパターンが消失していることが確認できた (Fig. 13B, center and right panels)。この結果は皮膚における *BmGC-I* の発現が、正常な色彩パターンの表出に必要であることを示していた。

BmGC-I のようなグアニル酸シクラーゼは一般的に cGMP 産生能がその機能に参与している。その際、cGMP は cGMP 依存プロテインキナーゼ (PKG あるいは cGK とも呼ばれる) を介して機能する。つまり、PKG は *BmGC-I* のエフェクターの候補となりうる。そこで、正常系統の皮膚におけるカイコの PKG 遺伝子の発現を調べることにした。まず、カイコのゲノムに存在する PKG 遺伝子を調べるために、キイロショウジョウバエの3つの PKG 遺伝子 (*forging*、*pkg21D*、*CG4839*) のアミノ酸配列をそれぞれクエリーに使い、カイコゲノムに対して protein BLAST を行った。その結果、カイコゲノムは2つの PKG 遺伝子、*BGIBMGA006881* と *BGIBMGA008856* をもつことがわかった。そこで、*BmGC-I* の高い発

現が発見された4歳2日の皮膚および脳で、2つのPKG遺伝子の発現を調べた。その結果はFig. 14に示したように、皮膚においては*BGIBMGA008856*のみが発現していることがわかった。この遺伝子の産物がBmGC-Iのエフェクターである可能性がある。

考察

*BmGC-I*による *q* 形質の制御機構を明らかにするために、*BmGC-I*の機能を推定するための実験をいくつか行った。*BmGC-I*^{KO} カイコの皮膚で、色素合成に関わる複数の遺伝子の発現が上昇していたことは、過去の *q* 変異体における遺伝子発現の解析結果 (Kato et al., 2006; Nie et al., 2014)とも一致しており、*BmGC-I*が色素合成遺伝子に影響を与えていることが確認された。一方で、必ずしも、*q* 系統で発現量が多い、あるいは少ない遺伝子のすべてが、*BmGC-I* の影響によるものではないこともわかった。オモクローム合成に関わる *kynurenine formamidase* は *q* 系統では 5 倍以上の発現上昇が報告されていたが (Nie et al., 2014)、*BmGC-I*^{KO} カイコでは有意な発現変動が検出できなかった。また、JH acid methyltransferase (JHAMT)と相同性の高い遺伝子をコードし、JH 代謝に関わると考えられる *BGIBMGA010392* は *q* 系統では 64 倍以上の発現上昇を示していたが、*BmGC-I*^{KO} カイコでは 3 倍程度の上昇であった。*q* の形質が遺伝的バックグラウンドにより影響を受けることは、第二章でも述べたが、*q* 系統と *BmGC-I*^{KO} 系統の間の遺伝子の発現量の違いも、バックグラウンドの違いを反映しているのかもしれない。*BmGC-I* の遺伝子発現における真の影響を評価するには *BmGC-I*^{KO} カイコを使ったトランスクリプトーム解析が必要であると考えられる。

一方で、*BmGC-I*の組織別発現解析の結果からは、*BmGC-I*が皮膚以外の他の組織においても機能していることが示された。しかしながら、これまで *q* 系統の形質は皮膚での色彩パターンの異常のみが報告されている。組織分布と観察される形質の矛盾への説明としては、2つの可能性が考えられる。1つは他のグアニル酸シクラーゼが、*BmGC-I*の機能を補

っている可能性である。カイコゲノムには少なくとも8つの受容体型グアニル酸シクラーゼが存在している。それらが冗長性をもち、皮膚以外の組織では*BmGC-I*に異常があってもcGMP生産を補うことができるため、表現型が観察されないのかもしれない。2つ目は、*BmGC-I*の異常により、実際には各組織で影響が出ているが、生育などの可視的形質には影響しないことが考えられる。*q*の形質は皮膚の色彩パターンの異常が目立つ一方で、他の組織の形質は詳細に調べられていない。ショウジョウバエの*Gyc76C*は様々な組織で異なる影響を及ぼすことが知られており、また、下流で働く分子も組織によって異なる(Ayoob et al., 2004; Overend et al., 2012; Patel et al., 2012; Patel and Myat, 2013; Schleede and Blair, 2015)。同様に、*BmGC-I*も組織ごとに異なる影響を及ぼしているのかもしれない。これらの可能性を検証し、*BmGC-I*の影響を評価するには、今後、様々な組織における詳細な観察と分析が必要である。

*BmGC-I*の発現が様々な組織で見られる一方で、*in vivo* エレクトロポレーションによる*BmGC-I*の強制発現は、正常な色彩パターンには皮膚での*BmGC-I*の発現が必要であることを示していた。つまり、*q*の皮膚における色彩パターンの異常では、他の組織からの影響は少ないと考えられた。この結果はまた、*BmGC-I*が細胞自律的に機能していることも示唆している。なぜなら、Fig. 13Bに示したように、*BmGC-I*の強制発現による形質の復帰は、遺伝子が導入された体の左半分でのみ観察できた。おそらく、*BmGC-I*は発現している細胞あるいはごく近接した細胞においてのみ、cGMPシグナル伝達経路を介した影響を及ぼすのだろう。

PKG 遺伝子の発現解析は皮膚における*BmGC-I*のcGMPシグナル伝達が、

BGIBMGA008856 のコードするキナーゼを介して行われている可能性を示している。キイロシヨウジョウバエでは 3 つの PKG (Foraging, Pkg21D, CG4839)のうち、Foraging と Pkg21D に関しては組織依存的に Gyc76C の cGMP シグナル伝達経路に関与すること (Overend et al., 2012; Patel et al., 2012; Patel and Myat, 2013; Schleede and Blair, 2015)、また、Foraging は行動制御に関わること (Kalderon and Rubin, 1989; Osborne et al., 1997)が知られているが、*BGIBMGA008856* のオーソログと考えられる CG4839 については、機能がほとんどわかっていない。Foraging に関しては転写因子である FoxO をリン酸化しうることがわかってるので (Kanao et al., 2012)、*BGIBMGA008856* も特定の転写因子のリン酸化を介して、色素関連の遺伝子の発現に影響を及ぼしているのかもしれない。

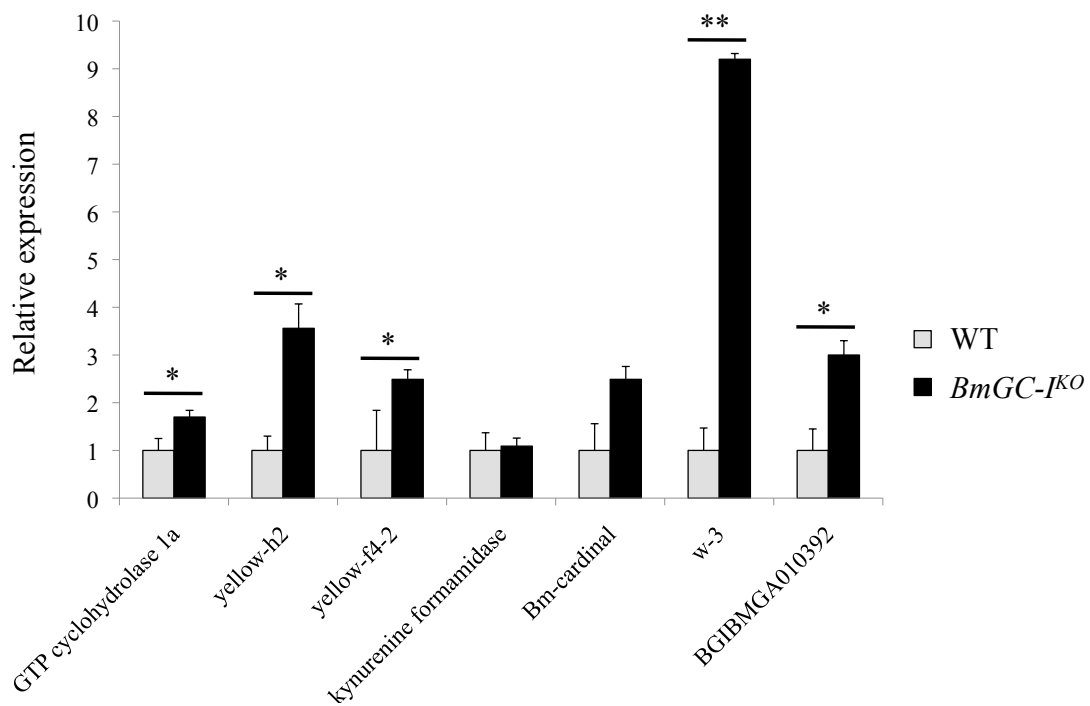


Fig. 10 *BmGC-I* ノックアウトによる遺伝子発現プロファイルへの影響。

皮膚におけるそれぞれの遺伝子の発現レベルは正常系統に対する相対値で示している。それぞれの値は平均値 ± SE (n=4) で示している。*p < 0.05; **p < 0.01, Student's t-test.

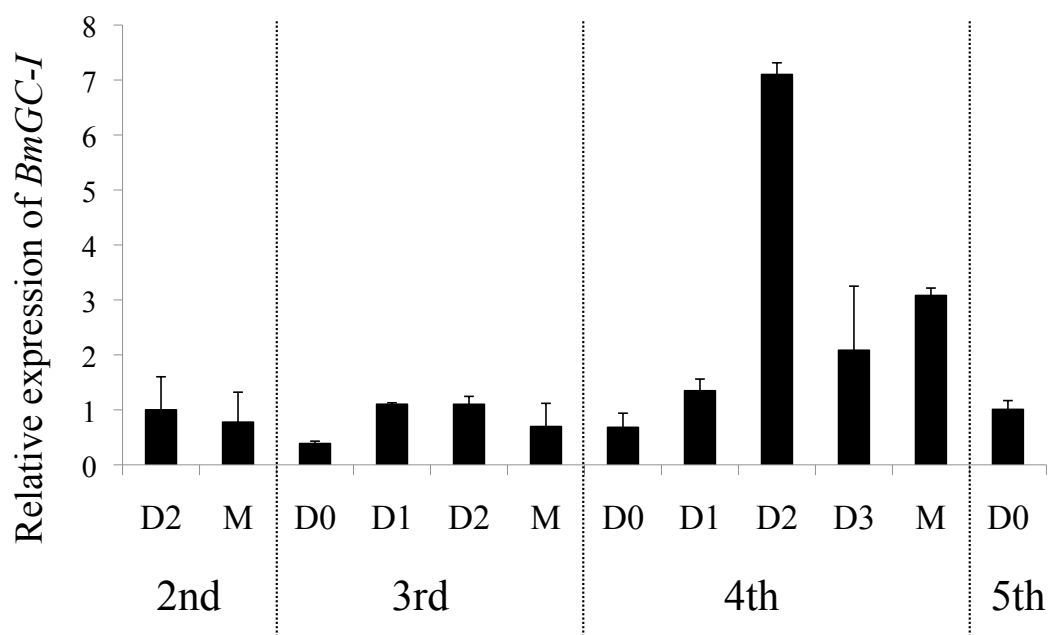


Fig. 11 正常系統における *BmGC-I* の継時的発現解析。

皮膚における *BmGC-I* の発現レベルは2齢2日に対する相対値で示している。それぞれの値は平均値 \pm SE (n=3)で示している。Mは脱皮期。

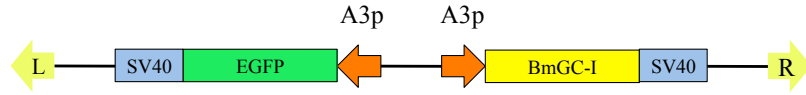


Fig. 12 4 齡 2 日における *BmGC-I* の組織発現分布。

Bm actin A3 (*BmA3*) が内部標準として使われた。

A

pPIG-A3BmGC-I::A3GFP



pHA3PIG



B

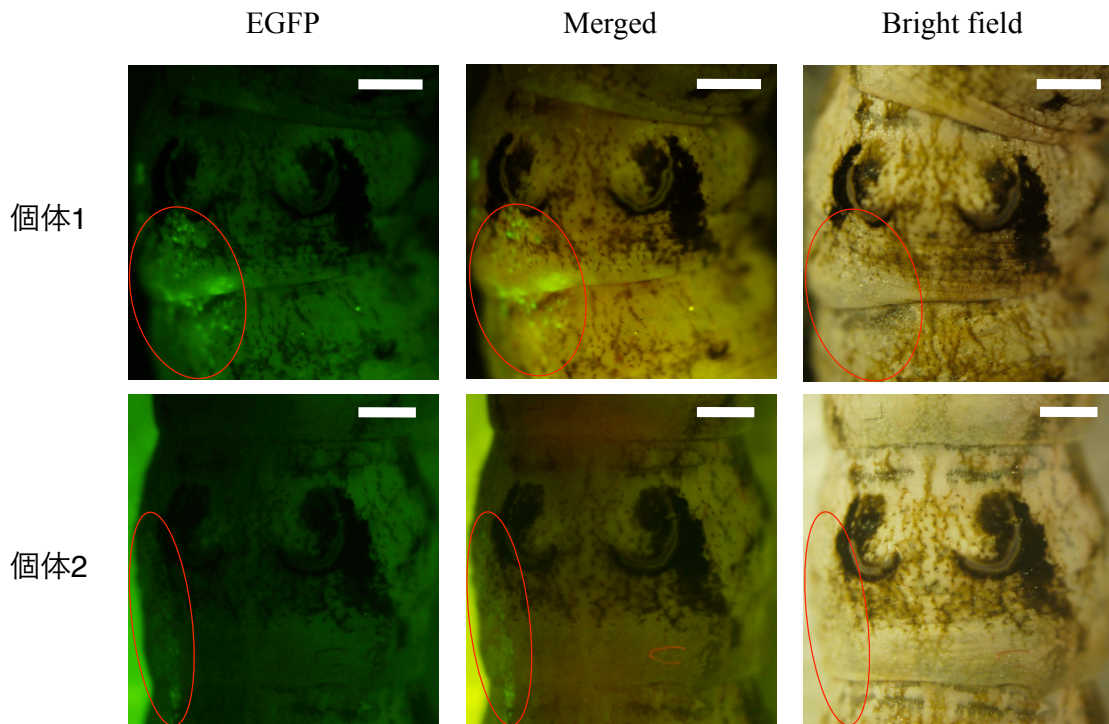


Fig. 13 *in vivo* エレクトロポレーションによる *q* の皮膚での *BmGC-I* の強制発現。

(A) 遺伝子導入コンストラクトの略図。*EGFP* と *BmGC-I* を含むコンストラクトが遺伝子導入に使われた。*A3p*, *BmA3* プロモーター; *SV40*, *SV40* ポリアデニル化シグナル配列; *L*, *piggBac* トランスポゼース認識配列左腕; *R*, *piggBac* トランスポゼース認識配列右腕。(B) 遺伝子導入された5齢0日のかすり系統幼虫。上のパネルと下のパネルは別個体の結果を示している。赤の円で示したように、左の半月紋近くに遺伝子導入による *EGFP* の緑色蛍光が観察できる。導入できた部位で、かすりで見られる黒色素のパターンの消失が観察された。Scale bar, 1 cm.

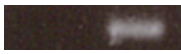

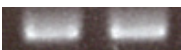

	Gene name	skin	brain	<i>Drosophila</i> homolog
cGMP-dependent protein kinase (PKG)	<i>BGIBMGA006881</i>			<i>pkg21D & for</i>
	<i>BGIBMGA008856</i>			<i>CG4839</i>

Fig. 14 カイコのプロテインキナーゼ G (PKG) 遺伝子の RT-PCR 解析。

正常系統の 4 齢 2 日の脳と皮膚におけるカイコの PKG の発現を調べた。

Table 4. Primers used for quantitative RT-PCR

Name	Sequence (5'-3' end)	Object
GC_qF	GGATCCAACCTGAAAGACCTGAC	qRT-PCR for BmGC-I
GC_qR	ATACGGGAAAAGCAGGTTGTCTA	
GTP-CH1a_qF1	ACCGGACATGGCTAACTCATAAC	qRT-PCR for GTP-CH1a
GTP-CH1a_qR1	CAAGCTTTGGTCGTATCCTTTC	
yellowh2_qF	GACTTCGAATTCCTTCAATCC	qRT-PCR for yellowh2
yellowh2_qR	CCATATTCTTGAACCCCATACC	
yellowf4-2_qF	CCTTAGAACCATCGCCATAGAC	qRT-PCR for yellowhf4-2
yellowf4-2_qR	AGCCTCTACGTCTCTCTTCCAA	
10392_RF1	AAAAACTTTCTGTGCGCCGACT	qRT-PCR for BGIBMGA010392
10392_RR1	TGAGTCCCCTAAACTTCTCCAA	
KFM_qF1	CCACATCTGGACAGAACTTGA	qRT-PCR for kinurenine formamidase
KFM_qR1	GAAAGTTCCTGCCAGTATCCAC	
Bm-cardinal_RF1	CACACCACTAAAGCCCTGTTTA	qRT-PCR for Bm-cardinal
Bm-cardinal_RR1	GGTGGACTGTCAACGCAGTAT	
w-3_qF1	GAGTCCAGATCGAGAGGAAGAA	qRT-PCR for w-3
w-3_qR1	CCGCTCCGTTTACATTTCTAAG	
rp49_F2	CAGGCGGTTCAAGGGTCAATAC	qRT-PCR for rp49
rp49_R2	TGCTGGGCTCTTTCCACGA	

Table 5. Primers used for RT-PCR

Name	Sequence (5'-3' end)	Object
BmGC-I_F6	GGAAACCATAGGTGATGCGTAC	RT-PCR for BmGC-I
BmGC-I_R8	CACTATAGAATCATTAGGTGTATCGGC	
6881_F1	ATAGTGGGAACGATGGGTGTAG	RT-PCR for BGIBMGA006881
6881_R1	GAGCATTAGATTTTCGGGTTTG	
8856_F1	AGAGTACCACTTCGAGCGTACC	RT-PCR for BGIBMGA008856
8856_R1	TACGCTTGCAGTTGTACAGGAT	

総合考察

本研究により、これまで明らかにされていなかったカイコの *q* 変異体の原因遺伝子、およびカイコ幼虫の色彩パターンの制御メカニズムに関して、新たな知見が得られた。カイコの色彩パターンに関わる変異体の解析は、色素の合成に直接関わる因子を同定し、各色素合成系に関する多くの知見を明らかにしてきた。一方で、色素合成経路の全体を、直接あるいは間接的に制御する機構に関しての報告は少なかった。本研究では、複数の色素の合成に影響を及ぼす変異体の解析を通して、*BmGC-I* という cGMP 経路に関わると考えられる遺伝子が、色素合成に関わることを示した点が新規である。

一般的に、cGMP は細胞内のセカンドメッセンジャーとして働き、筋肉の収縮、心臓血管の恒常性の維持、炎症、軸索誘導や記憶の形成など様々な生理現象と関連している (Carvajal et al., 2000; Goldberg and Haddox, 1977; Izquierdo and Medina, 1997; Nishiyama et al., 2003)。受容体型グアニル酸シクラーゼについては、哺乳類において利尿ペプチドの受容体である GC-A や GC-B が広く研究され、また線虫では嗅覚などの感覚受容に関わるグアニル酸シクラーゼが明らかになっているが、昆虫における報告は少ない。本研究は、昆虫の受容体型グアニル酸シクラーゼの新規な機能を明らかに出来た点でも意義がある。

BmGC-I は化学受容には必須ではない

一方で、*BmGC-I* が色彩パターンの形成に関与するという結果は予想外であった。なぜなら、*BmGC-I* は、もともと哺乳類の GC-A と相同な遺伝子としてカイコ雄成虫の触角から単離された遺伝子であり、免疫組織学的研究により *BmGC-I* タンパク質は雄の触角葉の

糸球体と感覚ニューロンに局在することが示されているため、その機能は性フェロモンなどの嗅覚の応答に関わると考えられていたからである (Tanoue et al., 2001)。受容体型グアニル酸シクラーゼ遺伝子については、タバコスズメガにおいても触角で単離同定がなされている (Morton and Nighorn, 2003; Nighorn et al., 2001)。また、カイコの触角では、性フェロモン (ボンビコール) による刺激が cGMP レベルの上昇を起こすこと (Ziegelberger et al., 1990)、および嗅覚神経で、cGMP アナログである dibutyryl-cGMP がボンビコールによる触角電位応答を阻害する (Redkozubov, 2000)。タバコスズメガにおいては、強いフェロモン刺激は cGMP レベルの上昇を起こし、cGMP シグナル伝達カスケードを活性化し、ホスホリパーゼ C β 依存カスケードを抑制する (Dolzer et al., 2008; Krannich and Stengl, 2008; Stengl, 1991; Stengl et al., 2001; Stengl, 2010; Zufall and Hatt, 1991; Zufall et al., 1991)。さらに、触角における内在性の cGMP レベルの上昇は日中の性フェロモン感受性の低下を起こすことがわかっていた (Flecke et al., 2006)。これらのことから、*BmGC-I* も嗅覚受容におけるシグナル伝達に関わると考えられていた。しかしながら、これまでに *q* 変異体において性行動の異常など、性フェロモン受容を含む異常な化学受容を示唆する報告は無く、本研究で作出した *BmGC-I*^{KO} カイコでも異常な表現型は観察されなかった。また、このことは本研究でも用いた No. 128 「只見蚕」のような *q* の形質をもつ品種が 20 世紀に日本で実用系統として広く用いられていたという事実とも一致する (平塚, 1969)。なぜなら、実用系統には幼虫期の強健性や成虫期の正常な生殖行動を必要とし、化学受容の異常のような深刻な表現型が認められれば、何らかの記載や報告がなされているはずだからである。これらの結果から、過去の仮説とは異なり、少なくともカイコの化学受容においては、*BmGC-I* が必須で

ないことがわかった。

BmGC-I の各色素のパターンへの影響

BmGC-I が色素合成に関わる遺伝子の発現へと影響することは、第三章における *BmGC-I*^{KO} を用いた解析によっても明らかになり、過去の報告 (Kato et al., 2006; Nie et al., 2014) と一致した結果が得られた。ほとんどの *q* の *BmGC-I* は完全な機能不全な遺伝子であることを考えると、正常系統の皮膚において、*BmGC-I* は色素合成系に対して負の制御を行っていることを示している。皮膚では下流エフェクターとして機能しうる PKG 遺伝子、*BGIBMGA008856* の発現が検出できたことから、この遺伝子の産物を介して *BmGC-I* へ伝わるような色彩パターンの制御メカニズムが想定される。

BmGC-I が複数の経路に関わる遺伝子に影響を与えていることを考えると、実際の *BmGC-I* による遺伝子発現の制御機構は複雑なものであることが予想される。そんな中で、プテリジンやメラニン合成に必要なテトラヒドロピオプテリン (BH4) の合成の律速酵素である *GTP-CH* の発現が *BmGC-I* によって影響を受けていることは、色素合成遺伝子の発現制御のメカニズムを考える上でのヒントになる。ヒト臍帯静脈内皮細胞において、*GTP-CH* の活性は cGMP の上昇により阻害を受ける (Shiraishi et al., 2003)。HepG2 へパトーマ細胞においては、*GTP-CH* は mitogen-activated protein (MAP) キナーゼ経路に関わる cAMP-response element binding protein (CREB) や activator protein-1 (AP-1) の制御を受ける (Al Sarraj et al., 2005)。加えて、*BmGC-I* と近縁な *GC-A* は哺乳類細胞において、リガンドである利尿ペプチドの刺激により、cGMP を産生し、MAP キナーゼや CREB、AP-1 の活性

を低下させる (Pandey et al., 2000; Prins et al., 1996; Sugimoto et al., 1993; Tripathi and Pandey, 2012)。これまでカイコにおいては *GTP-CH* と MAP キナーゼ経路の関連を示した報告はないけれども、これらの結果は *BmGC-I* が MAP キナーゼ経路を介して、*GTP-CH* を含むいくつかの遺伝子の発現制御を行っている可能性を示している。

これとは別に、受容体型グアニル酸シクラーゼがメラニン色素の前駆体であるカテコールアミンの放出や合成に影響を与えることが報告されている。ラット副腎髄質由来の PC12 細胞において、利尿ペプチドの ANP や CNP は受容体の NPR-C を活性化し、グアニル酸シクラーゼ活性とは独立にプロテインキナーゼ C や G プロテイン 0α を介して細胞の脱分極を抑制することでドーパミンの放出を抑制している (Chan et al., 2012; Trachte, 2005)。また、PC12 細胞において、利尿ペプチドにより受容体型グアニル酸シクラーゼの活性上昇によって、メラニン合成の律速酵素である *tyrosine hydroxylase* の発現が上昇することも知られている (Takekoshi et al., 2000)。これらは哺乳類と昆虫において、カテコールアミンの制御に関わる類似の機構が存在していることを意味しているのかもしれない。昆虫では、ドーパミンが真皮細胞で合成され、クチクラに放出されるとともに黒色のドーパミンメラニンに変換される。したがって、*q* における *BmGC-I* の異常も、真皮細胞においてドーパミンの過剰な放出をもたらし、結果として異常な色素パターンを形成している可能性が考えられる。

一方で、幼虫の皮膚でのオモクロームの増加に対しては、生合成に直接関わる遺伝子で発現の上昇は確認できていないが、前駆体の輸送に関わる遺伝子 (*w-3*) で発現の上昇が確認できた。オモクロームの量の制御メカニズムに関しては、カイコの幼虫の皮膚ではドク

チョウ属の翅の赤色紋様を制御する *optix* の発現は検出されていない (Nie et al. 2014)ので、少なくともカイコ幼虫ではオモクローム量の制御に *optix* は関連していないことが示唆される。考えられるメカニズムとしては、*BmGC-I*は *BGIBMGA010392* のような JH 代謝に関わると考えられる遺伝子の発現に影響することから、真皮細胞における JH のバランスの変化がオモクロームの合成に影響しているのかもしれない。あるいは *BmGC-I*はオモクロームの輸送・蓄積の過程の亢進においてのみ機能しているのかもしれない。

一方、*q* の形質における *BmGC-I* は、色素合成そのものの増加だけでなく、色彩パターンそのものにも影響しているが、新規の色彩パターンを作る理由については、不明なままである。ただ、*q* の形質が *plain (p)* 遺伝子座の影響を受けるという事実は、新規の色彩パターンの出現について、いくつかの考察を与える。*p* は幼虫の模様の制御に関わる複対立遺伝子で、転写因子である *apontic-like (apt-like)* をコードし、この遺伝子はメラニン合成に関わる *tyrosine hydroxylase* や *ebony* 遺伝子などの発現を誘導する (Futahashi et al., 2008; Yoda et al., 2014)。*q* の形質は、眼状紋、半月紋、星状紋をもつ^pバックグラウンド（「形蚕」形質）をもつ場合は、Fig. 2 のようなピンク色の体色、不規則な黒色パターンを示すが、一方で、紋様を持たない *p* バックグラウンド（「姫蚕」形質）をもつ場合は、*q* の形質が非常に弱くなる (Ohashi et al., 1983)。これは一見すると、*BmGC-I* が *apt-like* の機能を高めるように働いているように思えるが、*BmGC-I*^{KO} カイコと正常系統をよく観察すると *BmGC-I*^{KO} の背面後部では新規のパターンが現れる一方で、半月紋と星状紋ではその模様の面積の減少やぼやけたような黒色素のパターンが観察され、*BmGC-I* の *KO* が色彩パターンに正逆両方の働きをしていることを示している。*apt-like* は色彩パターンを規定する因子である *Wnt1*

によって正の遺伝子発現制御を受けるが、*p* ではその応答性が失われていることが報告されている (Yoda et al., 2014)。このことは *BmGC-I* が *apt-like* というよりむしろ、*Wnt1* のようなパターン形成因子に影響していることを暗示している。つまり、*BmGC-I* の異常は、パターン制御因子による正常な色彩パターンの形成を乱している。その結果、*p* バックグラウンド下では異常な *Wnt1* のパターンに *apt-like* が応答することで、*q* の表現型が強く発現する。それに対して、*p* バックグラウンド下では、*Wnt1* の応答性が失われているため、その異常な体色パターンの発現そのものが弱く抑えられているのかもしれない。一方で、Nie et al. (2014)の報告にある *q* で変動している遺伝子は、*Wnt1* と *apt-like* により制御を受ける遺伝子を含んでいないことから、*BmGC-I* は *Wnt1* と *apt-like* の発現量の調整を行っていないと考えられる。また、*Wnt1* と *apt-like* とは異なるメラニン合成に影響する経路を利用していることも考えられる。

BmGC-I の生物学的意味

BmGC-I の機能の全容が明らかになっている訳ではないので、正確な解釈をすることは難しいと承知しているが、ここで *BmGC-I* の生物学的意味を考察しておきたい。*BmGC-I* はヒトの GC-A の相同な遺伝子として同定された遺伝子であるが、これと一致して、系統的解析は、*BmGC-I* と GC-A を同一のクレードにグループ分けする (Fig. 15)。*BmGC-I* はチョウ目昆虫ではよく保存された遺伝子で、*Heliconius melpomene*、ナミアゲハ、オオカバマダラで *BmGC-I* のホモログが見つかる。加えて、チョウ目昆虫は同一クレード内に含まれるもう一つのグアニル酸シクラーゼ遺伝子をもっている。このクレード内には、ハエ

目のキイロシヨウジョウバエや甲虫目のコクヌストモドキ (*Tribolium castaneum*)の *BmGC-I* と配列の相同性が高い遺伝子も含まれている。しかし、キイロシヨウジョウバエでは *BmGC-I* により近縁な遺伝子が1つ、コクヌストモドキではチョウ目のもう一つのグアニル酸シクラーゼに近縁な遺伝子が1つだけ見つかる。チョウ目の *BmGC-I* ホモログはオーソログな遺伝子だと推察されるので、*BmGC-I* はチョウ目で独自の進化をして幼虫の色彩パターンに関連している可能性が考えられる。

チョウ目の幼虫は複数の色素の組合せにより、色彩パターンを作るので、*BmGC-I* ホモログは色彩パターンを正確な位置と色調で表すための、調節因子の一つとして機能しているのだろう。もちろん、家畜化されたカイコの事例を野生種に当てはめて考えるのは不適切かもしれない。*q* の新規の色彩パターンが *BmGC-I* の機能不全により生じることを考慮すると、野生での *BmGC-I* の本来の役割は別にある可能性は考えておかねばならない。つまり、真皮細胞における色彩パターン以外の未知の生理的機能に、*BmGC-I* とそれに伴う cGMP シグナル伝達経路が必要で、色彩パターンは副次的なものなのかもしれない。

ただ、*q* の表現型は昆虫の様々な環境への適応性の高さの一つの例証であるように考えられる。つまり、*BmGC-I* のような生存には影響を与えずに、色彩パターンを変化させるような遺伝子が昆虫には組込まれていることを示している。それらは環境が変動したときに対応できるシステムとして昆虫に備わっているのかもしれない。*q* のような黒色色素が飛散したようなパターンはチョウ目の幼虫や成虫に限らず、鳥の卵でも見られるようなありふれたものであるので、保護色のようなパターンとして役立つのかもしれない。このように、*BmGC-I* は環境適応のために備わっている昆虫の隠れた遺伝子ともいうべき例の一

つになるのではないだろうか。

カイコの幼虫の皮膚における *BmGC-I* の機能モデル

最後に本研究によって得られた知見に基づいた *q* 変異体における *BmGC-I* の機能のモデルを Fig. 16 に示した。正常系統では *BmGC-I* は神経ペプチドなどの外来のリガンドによって cGMP の産生が誘発され、PKG である *BGIBMGA008856* などのエフェクターを介して皮膚の色素合成を抑制し、適切なバランスを維持していると考えられる。*q* では *BmGC-I* の異常により cGMP 産生が停止し、この機構が破綻することで色素合成が亢進され、異常な色彩パターンを作り出していると考えられる。今後、エフェクター分子の解明やリガンド探索により、色彩パターン形成における *BmGC-I* の役割の詳細が明らかになることが期待される。

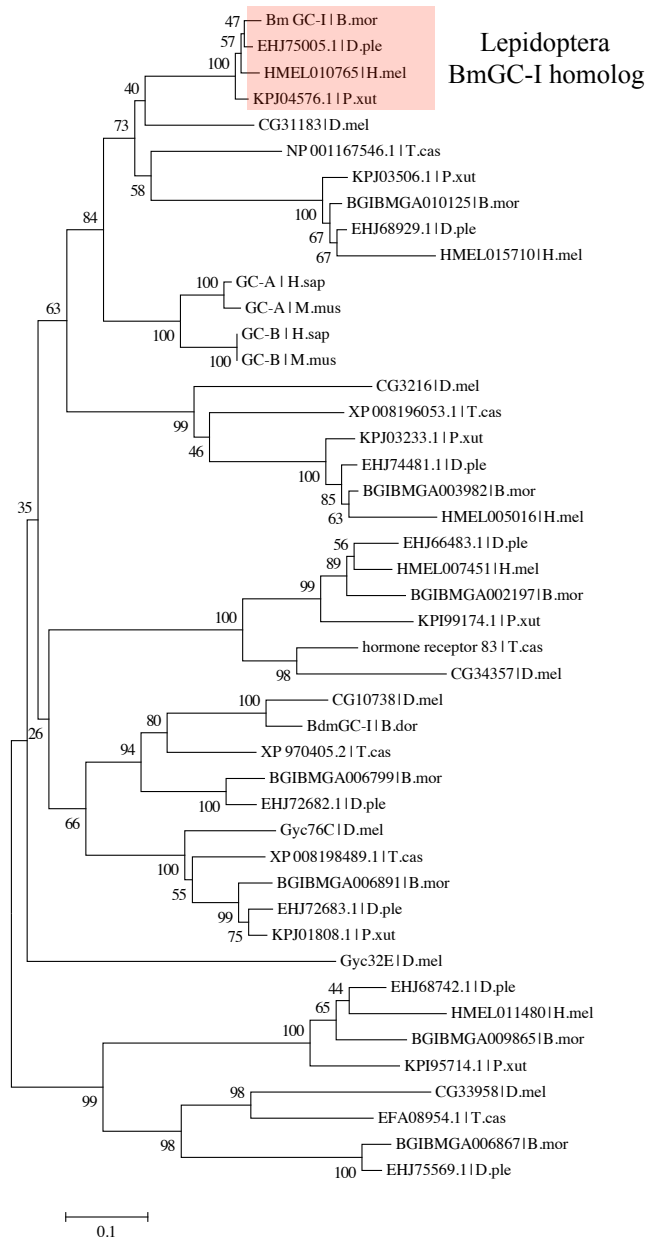


Fig. 15 *BmGC-I* の系統学的解析。

それぞれのグアニル酸シクラーゼ触媒ドメインの配列をMEGA6 (Tamura et al., 2013) を用いて、MUSCLEでアライメントを行い、近隣結合法により系統樹を作成した。ブートストラップ 1000 回。B. mor, *Bombyx mori*; D. ple, *Danaus plexippus*; H. mel, *Heliconius melpomene*; P. xut, *Papilio xuthus*; D. mel, *Drosophila melanogaster*; T. cas, *Tribolium castaneum*.

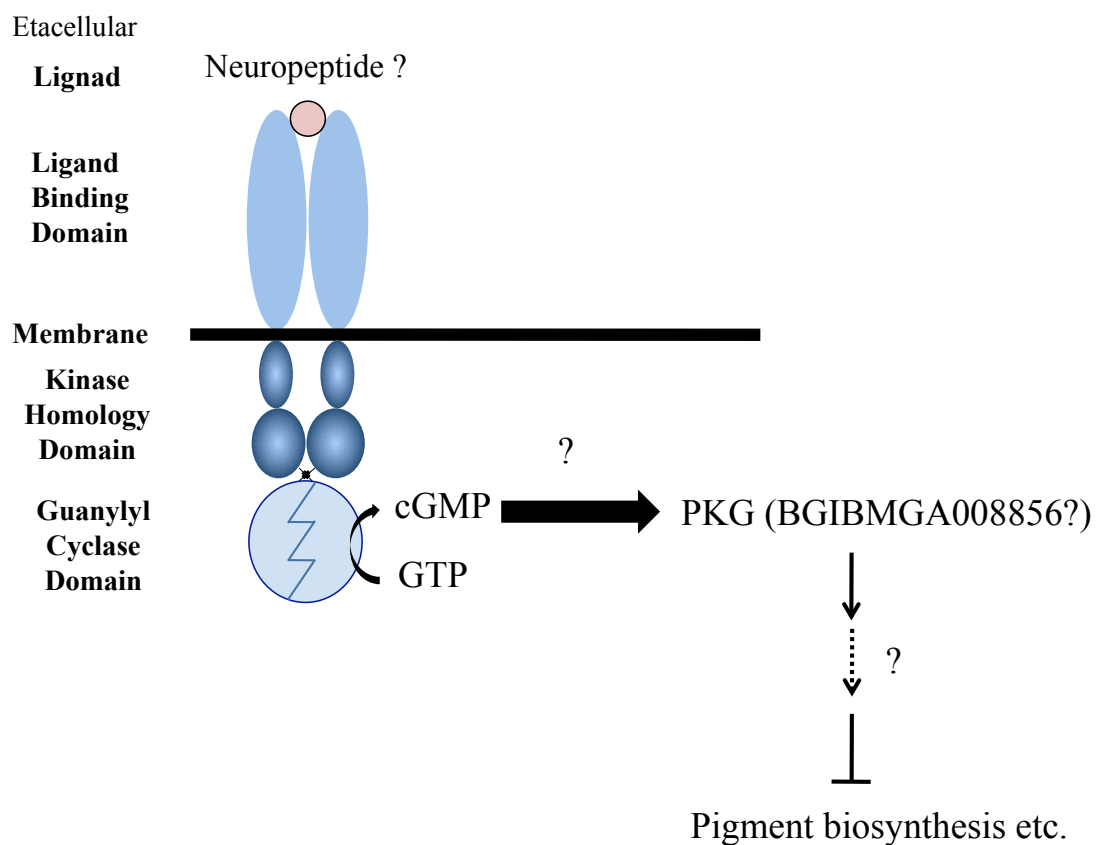


Fig. 16 カイコの皮膚における *BmGC-I* の役割に関するモデル。正常系統では *BmGC-I* はリガンドの結合により、グアニル酸シクラーゼ活性が上昇し、cGMP シグナル伝達カスケードが活性化し、色彩パターンを正常に保っている。

摘要

生物には多様な色彩パターンが存在する。それら色彩パターンはカモフラージュや警告色、擬態、同種の認識、配偶相手の選択、体温の調節、紫外線の防御などに役立ち、生物が生存する上で重要な働きをしている。昆虫は特に多様な色彩パターンを示し、その多様性は種間のみならず種内でも観察でき、また、発育段階に応じて色彩パターンが変化する種も少なくない。このような多様性は様々な環境に対する適応の結果であると考えられており、昆虫の色彩パターン形成のメカニズムを理解することは、適応進化の分子基盤を理解する上で重要な足がかりとなる。

昆虫の成虫における紋様形成はショウジョウバエやチョウ目昆虫において広く研究されている一方で、幼虫における紋様形成についてはあまり研究が進んでいない。1つの理由は、モデル生物であるキイロショウジョウバエでは幼虫がほとんど色彩紋様をもたないことである。チョウ目昆虫のモデルであるカイコは、幼虫の色彩パターン形成のメカニズムを理解する上で大きな利点をもっている。すなわち、色彩パターンに変異や異常をもつ品種および突然変異系統が多数保存されていること、および、ゲノム情報が利用できることなどである。カイコの色彩パターンはメラニン、プテリジン、オモクローム色素により構成されるが、この充実した遺伝資源を利用して、ショウジョウバエの翅形成に関わる *wingless* ファミリー遺伝子のカイコホモログである *Wnt1* の発現がカイコの黒色斑紋の形成に関与することが分かっている。また、*Wnt1* の下流で働くと考えられる転写因子の *Apt-like* の発現制御の変化によっても、多様な黒色の斑紋が形成されることが示唆されている。しかし、このようにメラニン色素による斑紋パターンを制御する遺伝子が明らかに

なっている一方で、プテリジンやオモクロームによる色彩を制御する因子についての情報がいまだほとんどない。

本研究では色素パターン変異体の一つである「かすり」変異体に着目して分子遺伝学的解析を行った。かすり (*quail*, *q*)は、発育、生殖には問題がないが、幼虫が特徴的な色彩パターンを示す変異体である。すなわち幼虫の皮膚が複数の色素合成経路に異常を示し、メラニン、プテリジン、オモクローム色素の増加により、幼虫体色がピンク色になるとともに、背面部に擦ったような不規則な黒色の紋様を表出する。このことから、特に、プテリジンやオモクロームを含む色彩パターンを制御する因子の同定を行うことができると期待された。かすりの形質はカイコの第7染色体の 0.0 cM に占座する単一の劣性遺伝子に支配されることが分かっているが、その原因遺伝子は明らかになっていない。

1. *q* 変異体のポジショナルクローニング

q/q の遺伝子型をもつ *c55* 系統と正常系統 *p50T* を交配し、ポジショナルクローニング法によって、かすりの原因遺伝子の同定を試みた。*q* 遺伝子の座乗している第7染色体上の PCR 多型マーカーを利用し、531 個体の戻し交配世代を用いてマッピングを行った。その結果、かすりの責任領域を約 1.1 Mb の範囲に絞り込んだ。この領域には 11 個のタンパク質コード遺伝子が予測されていたので、これらをかすりの候補遺伝子とした。次に、*p50T* とかすり系統 (*c55*) の皮膚における候補遺伝子の発現を RT-PCR によって調べ、発現が検出できた遺伝子の cDNA 配列の比較を行った。その結果、かすり系統は 2 つの候補遺伝子、すなわち膜受容体型のグアニル酸シクラーゼをコードする *BmGC-I* とグルタ

チオン・S・トランスフェラーゼをコードする *BmGSTe4* に変異をもつことが分かった。*BmGC-I*ではフレームシフトを起こす 16-bp の欠失が検出され、*BmGSTe4*ではエクソン 2 と 3 を欠如したエクソンスキッピングが起きていることが分かった。どちらの突然変異も遺伝子の機能を欠損させていることが予想されたが、2 つの遺伝子のどちらかがかすりの原因遺伝子であるかは分からなかった。しかし、かすり形質を有する 11 つの系統を比較した結果、10 系統で同じ 16-bp の欠失変異が見つかり、1 系統 (p54) では別のミスセンス変異が存在していた。一方、9 系統は *BmGSTe4* でエクソンスキッピングを起こしており、p54 でもミスセンス変異が存在したが、d33q においては *BmGSTe4* に変異は見つからなかった。かすり形質を持つすべての系統が *BmGC-I* に変異を有していたことから、*BmGC-I*がかすりの原因遺伝子であることが推測された。そこで c55 と d33q を掛合わせ *BmGC-I*にのみ変異をもつ F1 雑種を作出した結果、F1 雑種 (*BmGC-I*⁺; *BmGSTe4*⁺)のすべての個体がかすり形質を示したので、*BmGC-I*がかすりの原因遺伝子であることが示された。

2. CRSIPR/Cas9 システムによる *BmGC-I* のノックアウト

ポジショナルクローニングの結果からは *BmGC-I*がかすりの原因遺伝子であることが示されたが、この遺伝子単独でかすり形質を支配しているかどうかは慎重に検討する必要がある。そこで、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集を行うことで、*BmGC-I* および *BmGSTe4* の影響を評価することにした。*BmGC-I* の 2 つの標的配列に対して CRSIPR/Cas9 によってノックアウトを行い、複数のノックアウト系統を作出した。その結果、すべての

BmGC-I ノックアウトカイコでかすり様の形質、すなわちピンク色の皮膚と特有の黒色素のパターンを観察することができた。一方で、*BmGSt4* のノックアウトカイコでは、フレームシフトを起こす変異をもっているにもかかわらず、かすりの様な異常な色素パターンは観察されなかった。これらの結果はポジショナルクローニングの結果と一致し、*BmGC-I* のみがかすりの原因遺伝子であることを証明している。

3. *BmGC-I* 遺伝子の解析

BmGC-I の働きを調べるために、関連する遺伝子の解析を行った。まず、*BmGC-I* ノックアウト系統を用いて、色素合成遺伝子の発現が変化しているかどうかを調べた。その結果、プテリジン合成に関わる *GTP cyclohydrolase Ia* やメラニン合成に関わると考えられる *yellow-h2*、*yellow-f4-2* といった色素合成遺伝子の変動が検出され、*BmGC-I* が少なくともいくつかの色素合成遺伝子の発現に影響を与えることが明らかになった。また、皮膚における *BmGC-I* の経時的な発現変動についても調べた結果、*BmGC-I* mRNA の量は4齢幼虫2日目から4眠期にかけて上昇していることが分かった。この発現の上昇は、かすりの形質が5齢0日目から明瞭になることと一致しており、*BmGC-I* が4齢中期から後期にかけて色彩パターンの形成に関わっていることを示唆している。一方で、*BmGC-I* は皮膚以外にも様々な組織で発現しているため、皮膚以外の組織がかすりの形質へ影響を及ぼしている可能性が考えられた。しかし、*in vivo* エレクトロポレーション法によって *BmGC-I* を幼虫の皮膚に強制発現させると、かすり系統の色素パターンが消失した。これにより、真皮細胞自身における *BmGC-I* の発現が、色彩パターンを制御していると推定された。

本研究ではカイコの色彩パターン変異体であるかすりの解析を通して、膜受容体型のグアニル酸シクラーゼである *BmGC-I* が色彩パターン形成に関連していることを明らかにした。これは昆虫の色彩パターンとグアニル酸シクラーゼの関連を示した初めての報告である。*BmGC-I*は皮膚において重要な働きをしており、おそらく cGMP 経路を介して、パターンを規定する因子および色素の生合成に関わる遺伝子に影響を与えることが考えられた。本研究ではこれまでほとんど情報のなかったプテリジンやオモクローム色素による色彩パターンを制御する遺伝子の同定を行えたことも重要である。*BmGC-I*は、これまで知られていた *Wnt1*による斑紋形成の制御機構とは独立に幼虫の色彩パターンに作用していると考えられ、今後、*BmGC-I*の機能の詳細が明らかになれば、色彩パターン形成の新規な経路の理解につながると考えられる。

引用文献

- Al Sarraj, J., Vinson, C., Han, J., Thiel, G., 2005. Regulation of GTP cyclohydrolase I gene transcription by basic region leucine zipper transcription factors. *J. Cell Biochem.* 96, 1003–1020.
- Arnoult, L., Su, KF., Manoel, D., Minervino, C., Magriña, J., Gompel, N., Prud'homme, B., 2013. Emergence and diversification of fly pigmentation through evolution of a gene regulatory module. *Science.* 339, 1423–1426.
- Ando, T., Fujiwara, H., 2013. Electroporation-mediated somatic transgenesis for rapid functional analysis in insects. *Development.* 140, 454–458.
- Ayoob, JC., Yu, HH., Terman, JR., Kolodkin, AL., 2004. The *Drosophila* receptor guanylyl cyclase Gyc76C is required for semaphorin-1a-plexin A-mediated axonal repulsion. *J. Neurosci.* 24, 6639–6649.
- Bassett, AR., Tibbit, C., Ponting, CP., Liu, JL., 2013. Highly efficient targeted mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 system. *Cell Rep.* 4, 220–228.
- Carvajal, JA., Germain, AM., Huidobro-Toro, JP., Weiner, CP., 2000. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J. Cell. Physiol.* 184, 409–420.
- Chak, K., Kolodkin, AL., 2014. Function of the *Drosophila* receptor guanylyl cyclase Gyc76C in PlexA-mediated motor axon guidance. *Development.* 141, 136–147.
- Chan, NY., Seyedi, N., Takano, K., Levi, R., 2012. An unsuspected property of natriuretic peptides: promotion of calcium-dependent catecholamine release via protein kinase G-mediated

- phosphodiesterase type 3 inhibition. *Circulation*. 125, 298–307.
- Chang, JC., Yang, RB., Adams, ME., Lu, KH., 2009. Receptor guanylyl cyclases in Inka cells targeted by eclosion hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 13371–13376.
- Cong, L., Ran, FA., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, PD., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., Zhang, F., 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 339, 819–823.
- Dai, FY., Qiao, L., Tong, XL., Cao, C., Chen, P., Chen, J., Lu, C., Xiang, ZH., 2010. Mutations of an arylalkylamine-*N*-acetyltransferase, *Bm-iAANAT*, are responsible for silkworm melanism mutant. *J. Biol. Chem.* 285, 19553–19560.
- Daimon, T., Uchibori, M., Nakao, H., Sezutsu, H., Shinoda, T., 2015. Knockout silkworms reveal a dispensable role for juvenile hormones in holometabolous life cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E4226–4235.
- Dizhoor, AM., Lowe, DG., Olshevskaya, EV., Laura, RP., Hurley, JB., 1994. The human photoreceptor membrane guanylyl cyclase, RetGC, is present in outer segments and is regulated by calcium and a soluble activator. *Neuron*. 12, 1345–1352.
- Dizhoor, AM., Olshevskaya, EV., Henzel, WJ., Wong, SC., Stults, JT., Ankoudinova, I., Hurley, JB., 1995. Cloning, sequencing, and expression of a 24-kDa Ca²⁺-binding protein activating photoreceptor guanylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* 270, 25200–25206.
- 土井良宏., 1992. 家蚕遺伝子資源系統の特性情報. 九州大学遺伝子資源研究センター.

- Dolzer, J., Krannich, S., Stengl, M., 2008. Pharmacological investigation of protein kinase C- and cGMP-dependent ion channels in cultured olfactory receptor neurons of the hawkmoth *Manduca sexta*. *Chem. Senses*. 33, 809–813.
- Enya, S., Daimon, T., Igarashi, F., Kataoka, H., Uchibori, M., Sezutsu, H., Shinoda, T., Niwa, R., 2015. The silkworm glutathione S-transferase gene *noppera-bo* is required for ecdysteroidbiosynthesis and larval development. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 61, 1–7.
- Field, M., Graf, LH, Jr., Laird, WJ., Smith, PL., 1978. Heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: in vitro effects on guanylate cyclase activity, cyclic GMP concentration, and ion transport in small intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 2800–2804.
- Flecke, C., Dolzer, J., Krannich, S., Stengl, M., 2006. Perfusion with cGMP analogue adapts the action potential response of pheromone-sensitive sensilla trichoidea of the hawkmoth *Manduca sexta* in a daytime-dependent manner. *J. Exp. Biol.* 209, 3898–3912.
- Friedland, AE., Tzur, YB., Esvelt, KM., Colaiácovo, MP., Church, GM., Calarco, JA., 2013. Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system. *Nat. Methods.* 10, 741–743.
- Fujii, T., Abe, H., Kawamoto, M., Katsuma, S., Banno, Y., Shimada, T., 2013. Albino (*al*) is a tetrahydrobiopterin (BH4)-deficient mutant of the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 43, 594–600.
- Futahashi, R., Banno, Y., Fujiwara, H., 2010. Caterpillar color patterns are determined by a two-phase melanin gene pre patterning process: new evidence from *tan* and *laccase2*. *Evol. Dev.* 12, 157–167.

- Futahashi, R., Fujiwara, H., 2008. Juvenile hormone regulates butterfly larval pattern switches. *Science*. 319, 1061.
- Futahashi, R., Sato, J., Meng, Y., Okamoto, S., Daimon, T., Yamamoto, K., Suetsugu, Y., Narukawa, J., Takahashi, H., Banno, Y., Katsuma, S., Shimada, T., Mita, K., Fujiwara, H., 2008. *yellow* and *ebony* are the responsible genes for the larval color mutants of the silkworm *Bombyx mori*. *Genetics*. 180, 1995–2005.
- Gallant, JR., Imhoff, VE., Martin, A., Savage, WK., Chamberlain, NL., Pote, BL., Peterson, C., Smith, GE., Evans, B., Reed, RD., Kronforst, MR., Mullen, SP., 2014. Ancient homology underlies adaptive mimetic diversity across butterflies. *Nat. Commun.* 5, 4817.
- Gilles, AF., Schinko, JB., Averof, M., 2015. Efficient CRISPR-mediated gene targeting and transgene replacement in the beetle *Tribolium castaneum*. *Development*. 142, 2832–2839.
- Goldberg, ND., Haddox, MK., 1977. Cyclic GMP metabolism and involvement in biological regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 46, 823–896.
- Gorczyca, WA., Gray-Keller, MP., Detwiler, PB., Palczewski, K., 1994. Purification and physiological evaluation of a guanylate cyclase activating protein from retinal rods. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 4014–4018.
- Guo, D., Tan, YC., Wang, D., Madhusoodanan, KS., Zheng, Y., Maack, T., Zhang, JJ., Huang, XY., 2007. A Rac-cGMP signaling pathway. *Cell*. 128, 341–355.
- Hamra, FK., Forte, LR., Eber, SL., Pidhorodeckyj, NV., Krause, WJ., Freeman, RH., Chin, DT., Tompkins, JA., Fok, KF., Smith, CE., 1993. Uroguanylin: structure and activity of a second

- endogenous peptide that stimulates intestinal guanylate cyclase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90, 10464–10468.
- 橋本春生., 1934. 蚕におけるリンケージの研究 I 飛白と B8 斑油. 蚕試報 8, 465–472.
- 平塚英吉., 1969. 日本蚕品種実用系譜. 大日本蚕糸会蚕糸科学研究所.
- Hiruma, K., Matsumoto, S., Isogai, A., Suzuki, A., 1984. Control of ommochrome synthesis by both juvenile hormone and melanization hormone in the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae*. J. Comp. Physiol. B. 154, 13–21.
- Hiruma, K., Riddiford, LM., 2009. The molecular mechanisms of cuticular melanization: the ecdysone cascade leading to dopa decarboxylase expression in *Manduca sexta*. Insect Biochem. Mol. Biol. 39, 245–253.
- Hughes, JM., Murad, F., Chang, B., Guerrant, RL., 1978. Role of cyclic GMP in the action of heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. Nature. 271, 755–756.
- Hwang, WY., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, ML., Tsai, SQ., Sander, JD., Peterson, RT., Yeh, JR., Joung, JK., 2013. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. Nat. Biotechnol. 31, 227–229.
- Izquierdo, I., Medina, JH., 1997. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. Neurobiol. Learn. Mem. 68, 285–316.
- Kalderon, D., Rubin, GM., 1989. cGMP-dependent protein kinase genes in *Drosophila*. J. Biol. Chem. 264, 10738–10748.

- Kanao, T., Sawada, T., Davies, SA., Ichinose, H., Hasegawa, K., Takahashi, R., Hattori, N., Imai, Y., 2012. The nitric oxide-cyclic GMP pathway regulates FoxO and alters dopaminergic neuron survival in *Drosophila*. *PLoS One*. 7, e30958.
- Kato, T., Sawada, H., Yamamoto, T., Mase, K., Nakagoshi, M., 2006. Pigment pattern formation in the quail mutant of the silkworm, *Bombyx mori*: parallel increase of pteridine biosynthesis and pigmentation of melanin and ommochromes. *Pigment Cell. Res.* 19, 337–345.
- 川瀬茂実, 1955. 蚕の皮膚色素に関する研究 (I) 赤色色素並びに他の2,3の内皮色素について. *日蚕雑* 24, 69–75.
- 木口憲爾, 1973. 家蚕の幼虫斑紋および体色に関するホルモン支配 (II) 各種突然変異蚕における幼虫斑紋の着色および体色の発現と幼若ホルモン. *日蚕雑* 42, 293–299.
- Klaiber, M., Dankworth, B., Kruse, M., Hartmann, M., Nikolaev, VO., Yang, RB., Völker, K., Gassner, B., Oberwinkler, H., Feil, R., Freichel, M., Groschner, K., Skryabin, BV., Frantz, S., Birbaumer, L., Pongs, O., Kuhn, M., 2011. A cardiac pathway of cyclic GMP-independent signaling of guanylyl cyclase A, the receptor for atrial natriuretic peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 18500–18505.
- Koller, KJ., Lowe, DG., Bennett, GL., Minamino, N., Kangawa, K., Matsuo, H., Goeddel, DV., 1991. Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). *Science*. 252, 120–123.
- Koshikawa, S., Giorgianni, MW., Vaccaro, K., Kassner, VA., Yoder, JH., Werner, T., Carroll, SB., 2015. Gain of cis-regulatory activities underlies novel domains of wingless gene expression in

Drosophila. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 112, 7524–7529.

Krannich, S., Stengl, M., 2008. Cyclic Nucleotide-Activated Currents in Cultured Olfactory Receptor

Neurons of the Hawkmoth *Manduca sexta*. J. Neurophysiol. 100, 2866–2877.

Kronforst, MR., Young, LG., Kapan, DD., McNeely, C., O'Neill, RJ., Gilbert, LE., 2006. Linkage of

butterfly mate preference and wing color preference cue at the genomic location of *wingless*.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103, 6575–6580.

Ling, L., Ge, X., Li, Z., Zeng, B., Xu, J., Chen, X., Shang, P., James, AA., Huang, Y., Tan, A., 2015.

MiR-2 family targets *awd* and *fng* to regulate wing morphogenesis in *Bombyx mori*. RNA Biol.

12, 742–748.

Liu, C., Yamamoto, K., Cheng, TC., Kadono-Okuda, K., Narukawa, J., Liu, SP., Han, Y., Futahashi,

R., Kidokoro, K., Noda, H., Kobayashi, I., Tamura, T., Ohunuma, A., Banno, Y., Dai, FY.,

Xiang, ZH., Goldsmith, MR., Mita, K., Xia, QY., 2010. Repression of tyrosine hydroxylase is

responsible for the sex-linked chocolate mutation of the silkworm, *Bombyx mori*. Proc. Natl.

Acad. Sci. U. S. A. 107, 12980–12985.

Lucas, KA., Pitari, GM., Kazerounian, S., Ruiz-Stewart, I., Park, J., Schulz, S., Chepenik, KP.,

Waldman, SA., 2000. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. Pharmacol. Rev. 52,

375–414.

Ma, S., Chang, J., Wang, X., Liu, Y., Zhang, J., Lu, W., Gao, J., Shi, R., Zhao, P., Xia, Q., 2014.

CRISPR/Cas9 mediated multiplex genome editing and heritable mutagenesis of *BmKu70* in

Bombyx mori. Sci. Rep. 4, 4489.

- Ma, S., Zhang, S., Wang, F., Liu, Y., Liu, Y., Xu, H., Liu, C., Lin, Y., Zhao, P., Xia, Q., 2012. Highly efficient and specific genome editing in silkworm using custom TALENs. *PLoS One*. 7, e45035.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, KM., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, JE., Norville, JE., Church, GM., 2013. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. 339, 823–826.
- Martin, A., McCulloch, KJ., Patel, NH., Briscoe, AD., Gilbert, LE., Reed, RD., 2014. Multiple recent co-options of *Optix* associated with novel traits in adaptive butterfly wing radiations. *Evodevo*. 5, 7.[
- Martin A, Papa R, Nadeau NJ, Hill RI, Counterman BA, Halder G, Jiggins CD, Kronforst MR, Long AD, McMillan WO, Reed RD., 2012. Diversification of complex butterfly wing patterns by repeated regulatory evolution of a Wnt ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 12632–12637.
- Mazda, T., Tsusue, M., Sakate, S., 1980. Purification and identification of yellow pteridin characteristic of the larval colour of the kiuki mutant of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* 10, 357–362.
- Meng, Y., Katsuma, S., Daimon, T., Banno, Y., Uchino, K., Sezutsu, H., Tamura, T., Mita, K., Shimada., 2009a. The silkworm mutant *lemon* (*lemon lethal*) is a potential insect model for human sepiapterin reductase deficiency. *J. Biol. Chem.* 284, 11698–11705.
- Meng, Y., Katsuma, S., Mita, K., Shimada, T., 2009b. Abnormal red body coloration of the silkworm, *Bombyx mori*, is caused by a mutation in a novel kynureninase. *Genes Cells*. 14, 129–40.
- Monteiro, A., Chen, B., Ramos, DM., Oliver, JC., Tong, X., Guo, M., Wang, WK., Fazzino, L., Kamal, F., 2013. *Distal-less* regulates eyespot patterns and melanization in *Bicyclus* butterflies. *J.*

- Exp. Zool. B. Mol. Dev. Evol. 320, 321–331.
- Monteiro, A., Glaser, G., Stockslager, S., Glansdorp, N., Ramos, D., 2006. Comparative insights into questions of lepidopteran wing pattern homology. *BMC Dev. Biol.* 6, 52.
- Monteiro, A., 2015. Origin, development, and evolution of butterfly eyespots. *Annu. Rev. Entomol.* 60, 253–71.
- Morton, DB., Nighorn, A., 2003. MsGC-II, a receptor guanylyl cyclase isolated from the CNS of *Manduca sexta* that is inhibited by calcium. *J. Neurochem.* 84, 363–372.
- Nagai, C., Mabashi-Asazuma, H., Nagasawa, H., Nagata, S., 2014. Identification and characterization of receptors for ion transport peptide (ITP) and ITP-like (ITPL) in the silkworm *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.* 289, 31166–31177.
- Nie, H., Liu, C., Cheng, T., Li, Q., Wu, Y., Zhou, M., Zhang, Y., Xia, 2014. Transcriptome analysis of integument differentially expressed genes in the pigment mutant (*quail*) during molting of silkworm, *Bombyx mori*. *PLoS One.* 9, e94185.
- Nighorn, A., Simpson, PJ., Morton, DB., 2001. The novel guanylyl cyclase MsGC-I is strongly expressed in higher-order neuropils in the brain of *Manduca sexta*. *J. Exp. Biol.* 204, 305–314.
- Nishiyama, M., Hoshino, A., Tsai, L., Henley, JR., Goshima, Y., Tessier-Lavigne, M., Poo, MM., Hong, K., 2003. Cyclic AMP/GMP-dependent modulation of Ca²⁺ channels sets the polarity of nerve growth-cone turning. *Nature.* 423, 990–995.
- Ogura, N., 1975. Hormonal control of larval coloration in the armyworm, *Leucania separata*. *J. Insect Physiol.* 21, 559–576.

- Ohashi, M., Tsusue, M., Yoshitake, N., Sakate, S., Kiguchi, K., 1983. Epidermal pigments affecting the larval colouration of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Jpn. 52, 498–504.
- Osanai-Futahashi, M., Tatematsu, KI., Futahashi, R., Narukawa, J., Takasu, Y., Kayukawa, T., Shinoda, T., Ishige, T., Yajima, S., Tamura, T., Yamamoto, K., Sezutsu, H., 2015. Positional cloning of a *Bombyx pink-eyed white egg* locus reveals the major role of *cardinal* in ommochrome synthesis. Heredity (Edinb). doi: 10.1038/hdy.2015.74.
- Osborne, KA., Robichon, A., Burgess, E., Butland, S., Shaw, RA., Coulthard, A., Pereira, HS., Greenspan, RJ., Sokolowski, MB., 1997. Natural behavior polymorphism due to a cGMP-dependent protein kinase of *Drosophila*. 277, 834–836.
- Overend, G., Cabrero, P., Guo, AX., Sebastian, S., Cundall, M., Armstrong, H., Mertens, I., Schoofs, L., Dow, JA., Davies, SA., 2012. The receptor guanylate cyclase Gyc76C and a peptide ligand, NPLP1-VQQ, modulate the innate immune IMD pathway in response to salt stress. Peptide. 34, 209–218.
- Palczewski, K., Subbaraya, I., Gorczyca, WA., Helekar, BS., Ruiz, CC., Ohguro, H., Huang, J., Zhao, X., Crabb, JW., Johnson, RS., 1994. Molecular cloning and characterization of retinal photoreceptor guanylyl cyclase-activating protein. Neuron. 13, 395–404.
- Pandey, KN., Nguyen, HT., Li, M., Boyle, JW., 2000. Natriuretic peptide receptor-A negatively regulates mitogen-activated protein kinase and proliferation of mesangial cells: role of cGMP-dependent protein kinase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 271, 374–379.
- Patel, U., Davies, SA., Myat, MM., 2012. Receptor-type guanylyl cyclase Gyc76C is required for

- development of the *Drosophila* embryonic somatic muscle. *Biol. Open.* 1, 507–515.
- Patel, U., Myat, MM., 2013. Receptor guanylyl cyclase *Gyc76C* is required for invagination, collective migration and lumen shape in the *Drosophila* embryonic salivary gland. *Biol. Open.* 2, 711–717.
- Prins, BA., Weber, MJ., Hu, RM., Pedram, A., Daniels, M., Levin, ER., 1996. Atrial natriuretic peptide inhibits mitogen-activated protein kinase through the clearance receptor. Potential role in the inhibition of astrocyte proliferation. *J. Biol. Chem.* 271, 14156–14162.
- Redkozubov, A., 2000. Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate reduces the response of the moth's olfactory receptor neuron to pheromone. *Chem. Senses.* 25, 381–385.
- Reed, RD., McMillan, WO., Nagy, LM., 2008. Gene expression underlying adaptive variation in *Heliconius* wing patterns: non-modular regulation of overlapping *cinnabar* and *vermilion* prepatterns. *Proc. Biol. Sci.* 275, 37–45.
- Reed, RD., Papa, R., Martin, A., Hines, HM., Counterman, BA., Pardo-Diaz, C., Jiggins, CD., Chamberlain, NL., Kronforst, MR., Chen, R., Halder, G., Nijhout, HF., McMillan, WO., 2011. *optix* drives the repeated convergent evolution of butterfly wing pattern mimicry. *Science.* 333, 1137–1141.
- Reed, RD., Serfas, MS., 2004. Butterfly wing pattern evolution is associated with changes in a Notch/Distal-less temporal pattern formation process. *Curr. Biol.* 14, 1159–1166.
- Romoser, W., Stoffolano, J., 1994. *The Science of Entomology* (3rd ed). WCB McGraw-Hill, Boston, MA.

- Sawada, H., Iino, T., Tsusue, M., 1997. Properties of ommochrome-binding proteins from the pigment granules in epidermal cells of the silkworm *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.* 66, 393–402.
- Sawada, H., Tsusue, M., Yamamoto, T., Sakurai, S., 1990. Occurrence of xanthommatin containing pigment granules in the epidermal cells of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* 20, 785–792.
- Schleede, J., Blair, SS., 2015. The Gyc76C Receptor Guanylyl Cyclase and the Foraging cGMP-Dependent Kinase Regulate Extracellular Matrix Organization and BMP Signaling in the Developing Wing of *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet.* 11, e1005576.
- Shiraishi, H., Kato, T., Atsuta, K., Sumi-Ichinose, C., Ohtsuki, M., Itoh, M., Hishida, H., Tada, S., Udagawa, Y., Nagatsu, T., Hagino, Y., Ichinose, H., Nomura, T., 2003. cGMP inhibits GTP cyclohydrolase I activity and biosynthesis of tetrahydrobiopterin in human umbilical vein endothelial cells. *J. Pharmacol. Sci.* 93, 265–271.
- Shirataki, H., Futahashi, R., Fujiwara, H., 2010. Species-specific coordinated gene expression and trans-regulation of larval color pattern in three swallowtail butterflies. *Evol. Dev.* 12, 305–314.
- Shiomi, K., Takasu, Y., Kunii, M., Tsuchiya, R., Mukaida, M., Kobayashi, M., Sezutsu, H., Ichida, Takahama, M., Mizoguchi, A., 2015. Disruption of diapause induction by TALEN-based gene mutagenesis in relation to a unique neuropeptide signaling pathway in *Bombyx*. *Sci. Rep.* 5, 15566.

- Stengl, M., 1991. Inositol-trisphosphate-dependent calcium currents precede cation currents in insect olfactory receptor neurons in vitro. *J. Comp. Physiol. A.* 174, 187–194.
- Stengl, M., Zintl, R., De Vente, J., Nighorn, A., 2001. Localization of cGMP immunoreactivity and of soluble guanylyl cyclase in antennal sensilla of the hawkmoth *Manduca sexta*. *Cell Tissue Res.* 304, 409–412.
- Stengl, M., 2010. Pheromone transduction in moths. *Front. Cell. Neurosci.* 133.
- Stoehr, AM., Walker, JF., Monteiro, A., 2013. Spalt expression and the development of melanic color patterns in pierid butterflies. *Evodevo.* 4, 6.
- Suga, S., Nakao, K., Hosoda, K., Mukoyama, M., Ogawa, Y., Shirakami, G., Arai, H., Saito, Y., Kambayashi, Y., Inouye, K., 1992. Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide. *Endocrinology.* 130, 229–239.
- Sugimoto, T., Kikkawa, R., Haneda, M., Shigeta, Y., 1993. Atrial natriuretic peptide inhibits endothelin-1-induced activation of mitogen-activated protein kinase in cultured rat mesangial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195, 72–78.
- Takasu, Y., Sajwan, S., Daimon, T., Osanai-Futahashi, M., Uchino, K., Sezutsu, H., Tamura, T., Zurovec, M., 2013. Efficient TALEN construction for *Bombyx mori* gene targeting. *PLoS One.* 8, e73458.
- Takekoshi, K., Ishii, K., Isobe, K., Nomura, F., Nammoku, T., Nakai, T., 2000. Effects of natriuretic peptides (ANP, BNP, CNP) on catecholamine synthesis and TH mRNA levels in PC12 cells.

- Life Sci. 66, PL303–311.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729.
- Tanoue, S., Sumida, S., Suetsugu, T., Endo, Y., Nishioka, T., 2001 Identification of a receptor type guanylyl cyclase in the antennal lobe and antennal sensory neurons of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 971–979.
- Trachte, G., 2005. Neuronal regulation and function of natriuretic peptide receptor C. *Peptides*. 20, 1060–1067.
- Tripathi, S., Pandey, KN., 2012. Guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor-A signaling antagonizes the vascular endothelial growth factor-stimulated MAPKs and downstream effectors AP-1 and CREB in mouse mesangial cells. *Mol. Cell. Biochem.* 368, 47–59.
- True, JR., 2003. Insect melanism: the molecules matter. *Trends Ecol. Evol.* 18, 640–647.
- Truett, GE., Heeger, P., Mynatt, RL., Truett, AA., Walker, JA., Warman, ML., 2000. Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and Tris (HotSHOT). *BioTechniques*. 29, 52–54.
- Wang, H., Yang, H., Shivalila, CS., Dawlaty, MM., Cheng, AW., Zhang, F., Jaenisch, R., 2013a. One-Step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering. *Cell*. 153, 910–918.
- Wang, Y., Li, Z., Xu, J., Zeng, B., Ling, L., You, L., Chen, Y., Huang, Y., Tan, A., 2013b. The CRISPR/Cas system mediates efficient genome engineering in *Bombyx mori*. *Cell Res.* 23,

1414–1416.

Wei, W., Xin, H., Roy, B., Dai, J., Miao, Y., Gao, G., 2014. Heritable genome editing with CRISPR/Cas9 in the silkworm, *Bombyx mori*. PLoS One. 9, e101210.

Werner, T., Koshikawa, S., Williams, TM., Carroll, SB., 2010. Generation of a novel wing colour pattern by the Wingless morphogen. Nature. 464, 1143–1148.

Xu, J., Wang, Y., Li, Z., Ling, L., Zeng, B., James, AA., Tan, A., Huang, Y., 2014. Transcription activator-like effector nuclease (TALEN)-mediated female-specific sterility in the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Mol. Biol. 23, 800–807.

Yamaguchi, J., Banno, Y., Mita, K., Yamamoto, K., Ando, T., Fujiwara H., 2013. Periodic Wnt1 expression in response to ecdysteroid generates twin-spot markings on caterpillars. Nat. Commun. 4, 1857.

Yamamoto, K., Aso, Y., Yamada, N., 2013. Catalytic function of an Epsilon-class glutathione S-transferase of the silkworm. Insect Mol. Biol. 22, 523–531.

Yamamoto, K., Narukawa, J., Kadono-Okuda, K., Nohata, J., Sasanuma, M., Suetsugu, Y., Banno, Y., Fujii, H., Goldsmith, MR., Mita, K., 2006. Construction of a single nucleotide polymorphism linkage map for the silkworm, *Bombyx mori*, based on bacterial artificial chromosome end sequences. Genetics. 173, 151–161.

Yamamoto, K., Nohata, J., Kadono-Okuda, K., Narukawa, J., Sasanuma, M., Sasanuma, S., Minami, H., Shimomura, M., Suetsugu, Y., Banno, Y., Osoegawa, K., de Jong, PJ., Goldsmith, MR., Mita, K., 2008. A BAC-based integrated linkage map of the silkworm *Bombyx mori*. Genome

Biol. 9, R21.

Yoda, S., Yamaguchi, J., Mita, K., Yamamoto, K., Banno, Y., Ando, T., Daimon, T., Fujiwara, H.,
2014. The transcription factor Apontic-like controls diverse colouration pattern in caterpillars.
Nat. Commun. 5, 4936.

吉武成美, 有賀久雄, 渡邊兵一郎, 1951. 家蚕幼虫斑紋の色素に関する分光化学的研究.
日蚕雑 20, 439–443.

Yu, Q., Lu, C., Li, B., Fang, S., Zuo, W., Dai, F., Zhang, Z., Xiang, Z., 2008. Identification, genomic
organization and expression pattern of glutathione S-transferase in the silkworm, *Bombyx mori*.
Insect Biochem. Mol. Biol. 38, 1158–1164.

Zhan, S., Guo, Q., Li, M., Li, M., Li, J., Miao, X., Huang, Y., 2010. Disruption of an
N-acetyltransferase gene in the silkworm reveals a novel role in pigmentation. Development. 137,
4083–4090.

Zhan, S., Zhang, W., Niitepöld, K., Hsu, J., Haeger, JF., Zalucki, MP., Altizer, S., de Roode, JC.,
Reppert, SM., Kronforst, MR., 2014. The genetics of monarch butterfly migration and warning
colouration. Nature. 514, 317–321.

Zhang, Z., Aslam, AF., Liu, X., Li, M., Huang, Y., Tan, A., 2015. Functional analysis of *Bombyx*
Wnt1 during embryogenesis using the CRISPR/Cas9 system. J. Insect Physiol. 79, 73–79.

Ziegelberger, G., van den Berg, MJ., Kaissling, KE., Klumpp, S., Schultz, JE., 1990. Cyclic GMP
levels and guanylate cyclase activity in pheromone-sensitive antennae of the silkmoths
Antheraea polyphemus and *Bombyx mori*. J. Neurosci. 10, 1217–1225.

- Zufall, F., Hatt, H., 1991. Dual activation of a sex pheromone-dependent ion channel from insect olfactory dendrites by protein kinase C activators and cyclic GMP. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88, 8520–8524.
- Zufall, F., Stengl, M., Franke, C., Hildebrand, JG., Hatt, H., 1991. Ionic currents of cultured olfactory receptor neurons from antennae of male *Manduca sexta*. J. Neurosci. 11, 956–965.

謝辞

本研究の遂行に当たって御指導ならびに御校閲を賜った東京大学教授 嶋田透博士、東京大学准教授 勝間進博士、東京大学助教 木内隆史博士に謹んで感謝の意を表します。並びに、共同研究者として、御指導と御援助をいただいた九州大学准教授 伴野豊博士に厚くお礼申し上げます。また、東京大学昆虫遺伝研究室の室員のみなさまのご支援にも感謝いたします。最後に、この場をかりて、多大な支援をいただいた両親にも感謝の意を表します。