

〈特集：カイコによるタンパク質生産と産業化〉

カイコの生理・遺伝学的研究における 遺伝子組換え技術の利用

嶋田 透

The application of transgenic techniques for physiological and genetical studies in the silkworm, *Bombyx mori*

Toru Shimada

Summary Since Toshiki Tamura and his colleagues established the piggyBac-based transgenic technique in the silkworm, *Bombyx mori*, fifteen years have passed. This technique has been applied not only for the practical purposes, but also for basic studies of the silkworm, including physiology, genetics, and developmental biology. Transgenesis is a powerful tool to understand the function of the genes in combination with genomic analysis, especially positional cloning of the genes controlling various biological phenomena. In this review, I introduce several examples of utilization of transgenic techniques in the silkworm for elucidation of the genes responsible for the mutants in uric acid accumulation, ommochrome pigmentation, virus resistance, and larval-pupal transformation.

Key words: Transgenic silkworm, Oily mutants, Ommochrome, Moltinism, Virus resistance

I. はじめに

田村俊樹博士によって、piggyBacを用いたカイコの生殖細胞系列への外来遺伝子の導入法が確立してから、すでに15年が経とうとしている¹⁾。この間、カイコの遺伝子組換え技術は、新規な絹糸の生産や、医薬などの有用物質生産へ応用される方向だけでなく、基礎生物学的な研究にも大きな貢献をしてきた。本稿では、カイコの突然変異の原因遺伝子の解明への遺伝子組

み換え技術の寄与と、その解明によって開拓された新たな研究領域について述べたい。

II. ゲノム研究の展開と遺伝子組換え技術

1990年代の後半から2000年前後にかけて、多くのモデル生物のゲノム解析が急速に進展した。DNAシーケンサーの能力が向上して効率的に配列決定が進むようになったことと、いわゆる全ゲノムショットガン法が普及して、シークエ

東京大学大学院農学生命科学研究科
昆虫遺伝研究室
〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

Laboratory of Insect Genetics and Bioscience
Graduate School of Agricultural and Life Sciences
The University of Tokyo
1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

ンサーから得られる塩基配列を計算機上で自動的につなぎあわせる作業（アセンブリー）が高速化したことが背景にある。線虫*C. elegans*の全ゲノムが1999年、キイロショウジョウバエの全ゲノムが2000年に解読され、2001年には、ついにヒトゲノムの概要配列が公表されるに至った。カイコのゲノムについても、1990年代後半から解読が始まり、2004年には最初の概要配列が三田和英博士を中心とする研究グループによって公表された。追って解読を進めた中国の研究グループともデータの交換を進め、両国の合同チームによって、2008年に精密なカイコゲノム配列が公表された²⁾。

一方で、カイコゲノムへ外来の遺伝子を導入する技術についても、1980年代から研究が進められてきたが、最終的にイラクサキンウワバ由来の転移因子piggyBacをベクターに利用し、かつオワンクラゲの緑色蛍光タンパク質をマーカーに使うことで、田村俊樹博士らによって遺伝子組換え技術が確立したのが、2000年であった¹⁾。遺伝子組換え技術は、ゲノム研究、とくに遺伝子機能の解明にとって、不可欠な技術である。カイコのゲノムDNAは $n=28$ の染色体を合わせて約 5×10^8 塩基対のサイズがあり、そこには約17,000のタンパク質コード遺伝子の存在が予測されている。これら遺伝子の機能は、たとえばショウジョウバエの遺伝子との配列上の相同性などによって、機能の推定はできるかもしれない。しかし、カイコの個体において、当該遺伝子が果たす役割は、遺伝子の過剰発現・異所的発現や、ノックアウト・ノックダウンをして、その結果現れる表現型を観察してはじめて明らかになる。これらの遺伝子操作は、いずれも遺伝子組換え技術を用いてはじめて可能になるものである。それらの意味で、ゲノム解析と遺伝子組換え技術は、カイコの基礎研究において、車の両輪のように不可分、不可欠のテクノロジーである。

実際に、ゲノム研究や遺伝子機能研究で、どのように遺伝子組換え技術が活用されてきたか、私自身が関わった研究を中心にして、実例をいくつか紹介したい。

Ⅲ. 油蚕遺伝子の研究における 遺伝子組換え技術の利用と展開

カイコには、遺伝子記号の割り当てられているものだけで、約590の突然変異体が発見されている。カイコの変異体は、卵、幼虫、蛹・繭、成虫の4段階のすべてにわたっているが、数では幼虫の変異体が多い。幼虫形質で最も多いのが、皮膚の斑紋や色の変異であり、中でも、本来白色であるべき幼虫の皮膚が透明に変わっている「油蚕」の形質を示す変異体が、30以上も知られている。これほど多くの遺伝子がほぼ同一の形質を支配する例は、カイコでは他になく、特異なものである。

カイコ幼虫の真皮細胞の細胞質には、尿酸が結晶化し、「尿酸顆粒」を形成している。カイコでは、主として脂肪体において、窒素の最終代謝産物として、キサンチンから尿酸が合成され、その一部はマルピーギ管から排泄される。一方、脂肪体で合成された尿酸の一部は、血液を介して真皮細胞に運ばれ、細胞質に取り込まれて尿酸顆粒を形成する。油蚕変異体は、尿酸の合成、輸送、または顆粒形成のいずれかに異常があるために、尿酸顆粒を形成することができない。変異体のひとつ「d油」(*od*)は、尿酸顆粒の形成過程に異常がある変異体であり、皮膚が高度に透明になる。*od*は形質判別が容易である上にZ染色体に座乗するため、Z染色体のマーカーとして、あるいは伴性遺伝子のマッピングのために活用されてきた。

Fujiiら (2008) は、*od*変異体の原因遺伝子が、哺乳類の細胞におけるリソソーム関連オルガネラ (Lysosome-related organelles) の形成に使われるタンパク質複合体BLOC-1のサブユニットの一つであるBLOS2に相同なタンパク質をコードしているとする証拠を示した³⁾。たしかに、その*BmBLOS2*遺伝子は機能を欠損しているが、しかし、それだけではこれが原因遺伝子であるとはいえない。そのため、Fujiiらの次報 (2010) では、トランスジェニック技術を用いて*BmBLOS2*遺伝子をカイコの生殖系列へ導入し、実際に*od*変異体の油蚕形質をレスキュー (回復) させることができることを証明した⁴⁾。すなわち、転写因子GAL4の応答配列であるUASをプロモーターとし、そこに*BmBLOS2*遺伝子を連結したベクターをpiggyBac法により、カイコへ導入した。このトランスジェニック系統と、真

皮での強い発現があることが知られているアクチン3遺伝子 (A3) のプロモーターにGAL4を連結したドライバー系統 (農業生物資源研究所により開発) の交配し、その一代雑種 (F1) を得た。このF1の雌に*od/od*雄個体を交配し、次代でA3-GAL4/+; UAS-BmBLOS2/+; *od/W*の雌個体を選抜した。

その結果、DsRedをマーカーとして検出されるA3-GAL4遺伝子と、EGFPをマーカーとして検出されるUAS-BmBLOS2遺伝子を同時に有する個体では、それが雌個体 (*od/W*) であっても、斑 (まだら) 状に白い皮膚が現れ、*od*の形質がレスキューされることが判明した (図1)。このトランスジェニック実験によって、BmBLOS2遺伝子の機能欠損が*od*形質の原因であることが、最終的に証明された⁴⁾。

このあと、*od*変異体とBmBLOS2遺伝子は、遺伝子ノックアウト実験のモデルとして活用されるようになった。すなわち、*od*遺伝子座がZ染色体上に占座していることから、もしもBmBLOS2遺伝子のノックアウトに成功すれば、すぐ次代において、機能欠損型のBmBLOS2遺

伝子の機能を容易に検出できると期待されたのである。実際に、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) を用いてカイコ初期胚への微量注射によって、カイコBmBLOS2遺伝子のノックアウト個体が作出され、当代 (G0) において油蚕のモザイク形質が現れるとともに、次代 (G1) において*od*と同一の表現型である完全な油蚕が得られている⁵⁾。

また、transcription activator-like effector nuclease (TALEN) を用いた遺伝子ノックアウトの作出にも、まず、最初にBmBLOS2遺伝子が用いられた。ZFNの場合と同様に、注射当代において油蚕のモザイク個体が得られ、次代には容易に*od*の表現型 (油蚕) を持つ個体が現れることが分かった⁶⁾。さらに、clustered regularly interspaced palindromic repeats/CRISPR-associated (CRISPR/Cas) システムも、カイコで有効に機能することが、BmBLOS2遺伝子を対象にした実験で確かめられた⁷⁾。ZFN、TALEN、およびCRISPR/Casがカイコで利用できることは、今後、カイコが、いわゆるゲノム編集技術を駆使して遺伝子機能、遺伝子ネットワークを解析することのできる優れ

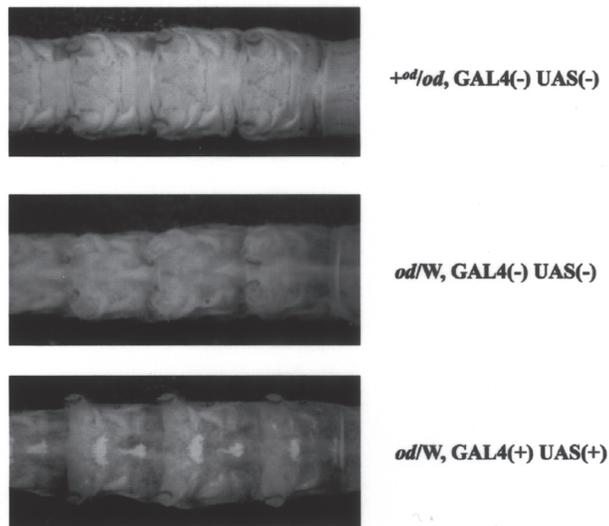


図1 BmBLOS2遺伝子の強制発現によるd油 (*od*) 形質の部分的なレスキュー. 酵母の転写因子GAL4にตอบสนองするシス配列UASに、BmBLOS2遺伝子をつないだコンストラクトをpiggyBacベクターによりカイコに導入し、*od*遺伝子の背景の中でGAL4を用いてBmBLOS2を強制発現させた。下段にあるように、*od*の形質である透明な皮膚のなかに部分的に白い正常な皮膚が現れ、レスキューに成功していることが分かる。(藤井ら、原図)

たモデルシステムとなる可能性を示している。また、これらゲノム編集技術は、有用な形質をもつカイコを開発する上でも、きわめて強力な道具になってゆくと予想される⁷⁾。

IV. 眼色・卵色の研究における 遺伝子組換え技術の利用と展開

カイコの眼色と卵色は、主としてオモクローム系の色素によって作られている。眼色と卵色には、多様な遺伝的変異があり、古くから遺伝学的研究が蓄積されてきた。近年、ゲノム情報を用いたポジショナルクローニングや候補遺伝子の解析から、変異形質の遺伝子が次々と明らかになっている。また、胚期に性が判別できる限性黒卵や、遺伝子組換えカイコの原因系統として利用される第1白卵のように、実用上の有用形質となっているものも少なくない。第1白卵(*w-1*)の原因遺伝子がキヌレニン酸化酵素遺伝子(*BmKMO*)であること、第2白卵(*w-2*)と第3白卵の原因遺伝子が*Bm-w-2*と*Bmwh3*と名付けられたABCトランスポーターをコードする遺伝子であることが、いずれもトランスジェニック実験によって証明された^{8),9),10)}。これらの遺伝子は、形質の判別が容易であるばかりでなく、当代の卵色すなわち胚子期から早くも見分けられることから、組換えの際の形質転換マーカーとして有用であると考えられる。実際にこれらの遺伝子をマーカーとして利用するための研究も行われている。

白卵遺伝子のうち、*w-1*はオモクロームの合成に関わる酵素(*BmKMO*)をコードしているが、*w-2*と*w-3*は、互いに構造の似たABCトランスポーターをコードしている。*w-2*と*w-3*は、それぞれショウジョウバエの*scarlet*遺伝子(*st*)と*white*遺伝子(*w*)のオースログであり、ショウジョウバエでも、それらの遺伝子は複眼の色素顆粒へのオモクローム前駆体の取り込みを支配している。カイコでも*w-2*と*w-3*は卵の漿膜細胞や複眼の色素顆粒へのオモクローム前駆体の取り込みに必要であると考えられ、ショウジョウバエとカイコで機能がよく保存されている^{9),11)}。ABCトランスポーターは、大きなファミリーであるが、*white*サブファミリーに属するトランスポーターは、ショウジョウバエでは*white*、

scarlet、*brown*の3つだけである。カイコでは、*Bmwh3*と*Bm-w-2*以外の遺伝子が2つあり、ショウジョウバエよりも複雑である¹²⁾。これら機能未知の遺伝子の解析には、やはり遺伝子組換え技術が役に立つと思われる。

V. ウイルス抵抗性遺伝子の研究における 遺伝子組換え技術の利用と展開

カイコに感染するウイルスには多様なものがあるが、顕著な病徴を示すウイルスは、核多角体病ウイルス、細胞質多核体病ウイルス、濃核病ウイルス1型、同2型、伝染性軟化病ウイルス、の5種類である。いずれのウイルスでも宿主であるカイコの側の感受性には、品種間差異があることが知られており、それは遺伝子の作用による。特に品種間でのウイルス感受性に大きな変異が認められるのは、濃核病ウイルス1型(*BmDNV-1*)と濃核病ウイルス2型(*BmDNV-2*)である。これらのウイルスはパルボウイルス科に属する1本鎖DNAウイルスであり、いずれもカイコ幼虫中腸の円筒細胞の核内で増殖する特徴をもつ。*BmDNV-1*に対するカイコの感受性は、*nsd-1*(第21染色体)と*Nid*(第17染色体)の2遺伝子座に支配されるのに対し、*BmDNV-2*に対する感受性は、*nsd-2*(第17染色体)と*nsd-Z*(第15染色体)に支配されることが知られている。Itoら(2008)は、ポジショナルクローニング法で*nsd-2*遺伝子座を単離することに成功し、これがアミノ酸トランスポーター様の膜タンパク質をコードすることを明らかにした¹²⁾。実際に、原因遺伝子の野生型の対立遺伝子を、*piggyBac*ベクターを用いて*nsd-2/nsd-2*の非感受性個体に導入した結果、幼虫の中腸が、本来は感染しないはずの*BmDNV-2*ウイルスに感染することが判明し、ポジショナルクローニングで見いだした候補遺伝子が確かに原因遺伝子であることを証明した。昆虫のみならず、動物でもウイルス抵抗性の原因が単一遺伝子で決定される例は珍しく、まして遺伝子が単離、特定された例はほとんどない。ゲノム情報を利用したポジショナルクローニングと、遺伝子組換え技術を用いた遺伝子の機能証明を組み合わせることで目的が達成されたモデルケースであるといえる。

VI. 眠性変異体の研究における 遺伝子組換え技術の利用と展開

典型的なカイコ幼虫は4回の脱皮を経て最終齢となり、吐糸、営繭して蛹に変態する。しかし、品種や系統によっては、脱皮回数が4回でなく、2回、3回、5回、6回と変異することが知られている。また、同一の品種でも、温度や日長、餌条件などの影響で、脱皮回数が増えることがある。養蚕では脱皮期を「眠」と呼ぶので、幼虫の脱皮回数を「眠性」と称する。上記の眠性変異体のうち、2眠の形質を支配する遺伝子*mod*について、遺伝子組換え技術を用いた解析が行われているので紹介する。*mod*ホモ接合体は、3齢または4齢が最終齢となり、決して5齢になることなく蛹化する。Daimonら(2012)は、ゲノム情報を用いたポジショナルクローニングで、*mod*の原因遺伝子を特定することに成功した¹³⁾。*mod*がコードするタンパク質は、チトクロームP450ファミリーのメンバーであるCYP15C1をコードしていた。*in vitro*の実験の結果から、CYP15C1はファルネセン酸をエポキシ化する酵素であり、幼虫のアラタ体において幼若ホルモンが合成される際の重要な段階を触媒するものであることが明らかになった。piggyBacベクターによって、このCYP15C1遺伝子を*mod/mod*へ導入したところ、幼虫が4眠蚕となり、5齢まで成長してから蛹化した。この実験では、CYP15C1遺伝子をアラタ体で発現させるために、特殊なドライバー系統が用いられた。すなわち、アラタ体で酵母の転写因子GAL4を発現するような系統を用い、CYP15C1遺伝子の5'上流にGAL4に結合するシス配列であるUASをつないだ系統との間で、交配を行った。その結果、CYP15C1遺伝子が本来の正常なカイコと同様にアラタ体で特異的に発現し、*mod*の形質をレスキューすることができたのである¹³⁾。

ショウジョウバエや他のモデル昆虫では、脱皮回数の変異は、あまり存在せず、眠性はカイコ特有の形質であるといえる。何齢が最終齢になるか、言い換えれば変態のタイミングがいつになるか、どのような機構で決まっているのだろうか。この問題は、昆虫生理学で古くから研究されてきているが、未だに解決していない。

眠性遺伝子の解明は、昆虫の変態機構を知る上で重要な手がかりを与えてくれる。たとえば、*mod*のケースでは、実は*mod/mod*個体では幼若ホルモンがほとんど合成されておらず、これら個体では一生幼若ホルモン無しで成長、生殖をすることが分かった。従来、幼若ホルモンは脱皮ホルモン(エクジステロイド)と同じぐらい重要なホルモンであると考えられ、幼虫の間はその存在が必須なのであろうと考えられてきた。しかし、実際には幼若ホルモンが欠乏しても胚発生から幼虫の間の発生は、ほとんど問題なく進んでいたのである。もちろん、脱皮の回数が省略されてしまって小さな個体になるわけであるが、一定量の幼若ホルモンが発生や生存に必須ではないことは新発見である。そのような重要な発見が、ゲノム情報と遺伝子組換え技術の両者を活用することによってもたらされた。

VII. おわりに

カイコは、すでにゲノムの塩基配列が高精度で解読されており、また、長い遺伝学の歴史のなかで多くの突然変異体が発見され、モデル生物としての地位を築いている。同じ昆虫のキロシヨウジョウバエに比べると、得られている変異体の形質に特徴があり、本稿で述べたような眠性や耐病性のようなカイコ特有の形質もある。一方で、中国で約6000年、日本で約2000年の養蚕の歴史があり、今もなおカイコは重要な農業生物、経済昆虫でもある。本稿で述べたとおり、遺伝子の塩基配列と形質をつなぐには、遺伝子組換え技術やゲノム編集技術は不可欠の手法である。

表1に、今までにカイコでポジショナルクローニングなどの方法で単離された形質遺伝子をリストアップしてみた。そのうち、トランスジェニック技術によって遺伝子機能が検証されたものは、必ずしも多くない。しかし、今後の遺伝子研究ではトランスジェニック技術のみならず、TALENやCRISPRなどを用いたゲノム編集が当たり前のように使われることになるだろうと想像される。また、これらの技術を用いれば、従来のように変異体が得られていなくても、遺伝子と形質の関係を解明できるようになるので、研究戦略を大きく変えることになるだろう。カ

生物試料分析

表1 カイコのゲノム情報からポジショナルクローニングまたは候補遺伝子のクローニングを経て単離された変異体の原因遺伝子（主要なもの）

遺伝子	染色体	形質	原著論文	遺伝子組換えによる証明
<i>os</i>	1	伴性油	Kiuchi et al. (2011) Insect Biochem Mol Biol.	
<i>sch</i>	1	伴性赤蟻	Liu et al. (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. USA.	
<i>od</i>	1	d油	Fujii et al. (2008) Insect Biochem. Mol. Biol.	○
<i>Md</i>	1	飛翔筋不全	Fujii et al. (2007) Genetica	
<i>Vg</i>	1	痕跡翅	Fujii et al. (2008) Insect Biochem. Mol. Biol.	
<i>spli</i>	1	エスプリ	Fujii et al. (2011) Proc. Natl. Acad. Sci. USA.	
<i>Y</i>	2	黄血	Tsuchida et al. (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. USA.	
<i>lem</i>	3	黄体色	Meng et al. (2009) J. Biol. Chem.	
<i>L</i>	4	褐円	Yamaguchi et al. (2013) Nat Commun.	
<i>al</i>	5	アルビノ	Fujii et al. (2013) Insect Biochem. Mol. Biol.	
<i>ok</i>	5	金鶏竜油	Wang et al. (2013) Insect Biochem. Mol. Biol.	
<i>re</i>	5	赤卵	Osanai-Futahashi et al. (2013) J. Biol. Chem.	○
<i>E</i>	6	過剰肢	Ueno et al. (1992) Development	
<i>Nc</i>	6	無半月紋	Nagata et al. (1996) Genes Cells	
<i>Gb</i>	7	緑繭-b	Daimon et al. (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. USA.	
<i>fl</i>	10	無翅	Sato et al. (2008) Genetics	
<i>w-1</i>	10	第1白卵	Quan et al. (2007) Insect Sci.	○
<i>w-2</i>	10	第2白卵	Tatematsu et al. (2012) Genes Cells Abraham et al. (2000) Mol Gen Genet	○
<i>w-3</i>	10	第3白卵	Kobayashi et al. (2010) J. Insect Biotech. Sericol.	○
<i>mod</i>	11	2眠	Daimon et al. (2012) PLoS Genet.	○
<i>C</i>	12	外層黄繭	Sakudoh et al. (2013) J.Lipid Res.	○
<i>oq</i>	12	q油	Komoto (2002) Insect Biochem. Mol. Biol.	
<i>ch</i>	13	赤蟻	Futahashi et al. (2008) Genetics	
<i>oa</i>	14	青熟油	Fujii et al. (2013) Genetica	
<i>cts</i>	16	頬尾斑 スクラーゼ アイソザイム	Ito et al. (2012) Genome	
<i>Suc-1</i>	17	ワクジー油	Daimon et al. (2008) J. Biol. Chem.	
<i>ow</i>	17	褐頭尾斑	Ito et al. (2009) Insect Biochem. Mol. Biol.	
<i>bts</i>	17	濃核病2型	Ito et al. (2010) J. Biol. Chem.	
<i>nsd-2</i>	17	非罹患性	Ito et al. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. USA.	○
<i>nm-g</i>	17	光沢不眠蚕	Niwa et al. (2010) Development	
<i>mln</i>	18	暗化型	Dai et al. (2010) J. Biol. Chem.	
<i>vit</i>	20	白妙卵	Lin et al. (2013) J. Biol. Chem.	
<i>ov</i>	20	ヴァル斑油	Wang et al. (2013) Genome	
<i>rb</i>	21	赤血	Meng et al. (2008) Genes Cells	
<i>sku</i>	21	臭蚕	Urano et al. (2010) FEBS J.	
<i>so</i>	26	煤蚕 ジアロアス	Futahashi et al. (2008) Genetics	
<i>og</i>	9	コリ油	Komoto et al. (2003) Insect Biochem. Mol. Biol.	

イコの研究の歴史のなかで積み重ねられた知識と、新たな技術が融合し、カイコの新しい生物学を開拓するとともに、その基礎研究の成果が、カイコを用いた有用物質生産や、新たな繊維・新素材の開発などの応用研究につながることを願っている。

文献

- 1) Tamura T, Thibert C, Royer C, Kanda T, Abraham E, Kamba M, Komoto N, Thomas JL, Mauchamp B, Chavancy G, Shirk P, Fraser M, Prudhomme JC, Couble P: Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a piggyBac transposon-derived vector. *Nat Biotechnol*, 18: 81-84, 2000.
- 2) International Silkworm Genome Consortium: The genome of a lepidopteran model insect, the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol*, 38: 1036-1045, 2008.
- 3) Fujii T, Abe H, Katsuma S, Mita K, and Shimada T: Mapping of sex-linked genes onto the genome sequence using various aberrations of the Z chromosome in *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol*, 38: 1072-1079, 2008.
- 4) Fujii T, Daimon T, Uchino K, Banno Y, Katsuma S, Sezutsu H, Tamura T, and Shimada T: Transgenic analysis of the *BmBLOS2* gene that governs the translucency of the larval integument of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Mol Biol*, 19: 659-667, 2010.
- 5) Takasu Y, Kobayashi I, Beumer K, Uchino K, Sezutsu H, Sajwan S, Carroll D, Tamura T, Zurovec M: Targeted mutagenesis in the silkworm *Bombyx mori* using zinc finger nuclease mRNA injection. *Insect Biochem Mol Biol*, 40: 759-765, 2010.
- 6) Takasu Y, Sajwan S, Daimon T, Osanai-Futahashi M, Uchino K, Sezutsu H, Tamura T, and Zurovec M: Efficient TALEN construction for *Bombyx mori* gene targeting. *PLoS One*. 8: e73458, 2013.
- 7) Daimon T, Kiuchi T, and Takasu Y: Recent progress in genome engineering techniques in the silkworm, *Bombyx mori*. *Dev Growth Differ*, 56: 14-25, 2014.
- 8) Quan G-X, Kobayashi I, Kojima K, Uchino K, Kanda T, Sezutsu H, Shimada T, and Tamura T: Rescue of *white egg 1* mutant by introduction of the wild-type *Bombyx* kynurenine 3-monooxygenase gene. *Insect Sci*, 14: 85-92, 2007.
- 9) Tatematsu K, Yamamoto K, Uchino K, Narukawa J, Iizuka T, Banno Y, Katsuma S, Shimada T, Tamura T, Sezutsu H, and Daimon T: Positional cloning of silkworm white egg 2 (*w-2*) locus reveals functional conservation and diversification of ABC transporters for pigmentation in insects. *Genes Cells*, 16: 331-342, 2011.
- 10) Kobayashi I, Uchino K, Iizuka T, Tatematsu KI, Yonemura N, Sezutsu H, and Tamura T: Rescue of the Aojuku white-egg translucent (*w-3^h*) *Bombyx mori* mutant by transgenic expression of the wild-type *Bmwh3* gene. *J. Insect Biotechnol. Sericol*, 79: 111-116, 2010.
- 11) Abraham EG, Sezutsu H, Kanda T, Sugasaki T, Shimada T, and Tamura T: Identification and characterisation of a silkworm ABC transporter gene homologous to *Drosophila white*. *Mol Gen Genet*, 264: 11-19, 2000.
- 12) Wang L, Kiuchi T, Fujii T, Daimon T, Li M, Banno Y, Kikuta S, Kikawada T, Katsuma S, and Shimada T: Mutation of a novel ABC transporter gene is responsible for the failure to incorporate uric acid in the epidermis of *ok* mutants of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 43: 562-571. 2013.
- 13) Ito K, Kidokoro K, Sezutsu H, Nohata N, Yamamoto K, Kobayashi I, Uchino K, Kalyebi A, Eguchi R, Hara W, Tamura T, Katsuma S, Shimada T, Mita K, and Kadono-Okuda K: Deletion of a gene encoding an amino acid transporter in the midgut membrane causes resistance to a *Bombyx* parvo-like virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 7523-7527, 2008.
- 14) Daimon T, Kozaki T, Niwa R, Kobayashi I, Furuta K, Namiki T, Uchino K, Banno Y, Katsuma S, Tamura T, Mita K, Sezutsu H, Nakayama M, Itoyama K, Shimada T, and Shinoda T: Precocious metamorphosis in the juvenile hormone-deficient mutant of the silkworm, *Bombyx mori*. *PLoS Genet*, 8: e1002486, 2012.