

カイコゲノムの全貌

三田和英

2006年3月の日本-中国の「カイコゲノム塩基配列情報の統合と解析に関する研究合意書」によって、それぞれ独立に行ってきたカイコホールゲノムショットガン (WGS) データを統合してほぼ完全なカイコゲノムシーケンスを得ることができた。アセンブリーの結果、スキャホールドのN50サイズが3.7Mb以上で、その総サイズは432Mbとなり、28本の染色体にマップされたスキャホールドはゲノム全体の87%になった。ゲノム情報から絹生産、植食性や変態等カイコの特徴的生命現象を生み出すゲノムの適応が明らかとなった。得られた結果は、昆虫のゲノムシーケンスの中でもチャンピオンデータだと誇ることができると同時に、カイコだけでなく他の昆虫類の科学研究や産業利用において計り知れない大きなインパクトを与えることは明らかである。本稿では、カイコゲノムにおける日中共同研究によって得られた結果を紹介する (The International Silkworm Genome Consortium. (2008) *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38, 1036-1045. カイコゲノム特集号巻頭論文)。

1. 背景

カイコ *Bombyx mori* は5,000年前に中国黄河流域で野生種のクワコ *Bombyx mandarina* から家畜化された。現在、動物の中で最も家畜化が進んだ生物である。大量飼育のしやすさと繊維産業利用のために現在でも多くの発展途上国では経済的に重要な生物である。最近の遺伝子導入技術の確立によってカイコは組換えタンパク質生産工場として注目を集めている¹⁾。

カイコゲノムシーケンスとカイコの祖先で野生種のクワコのゲノム情報を比較すれば家畜化に至る人為選択の影響を解明でき、家畜化に関わる遺伝子を同定できる可能性がある。また、カイコの属する鱗翅目昆虫(チョウ・ガの類)は最大の農業害虫を含み、害虫に特異的に効果がありその他の生物種には影響のない環境に優しい殺虫剤開発が、世界の主要国の大きな研究課題である。しかし、カイコ以外

の鱗翅目昆虫のゲノム情報はほとんどなく、カイコのゲノム情報を利用してターゲット遺伝子を探索することを世界の研究者が期待している。つまり、カイコは鱗翅目昆虫の代表種として期待されている。

2004年に日本と中国でそれぞれ独立に雄のカイコのホールゲノムショットガン (WGS) シーケンシングプロジェクトが進められ、そのアセンブリー結果が発表された^{2,3)}。しかし、両者とも比較的浅いWGSで、長いシーケンスコンティグ(塩基配列断片のオーバーラップした部分をつなぎ合わせた塩基配列)やスキャホールド(シーケンスコンティグを長いブリッジクローンでつないだ塩基配列)が得られず、アノテーションや機能解析研究への実用的利用には大きな距離が残った。国内外の多くの研究グループから両方のデータの統合によるより完全なカイコゲノムシーケンスへの要望と期待が数多く寄せられた。幸いなことに、日中両方でWGSに使われたカイコは同じ系統(日本はp50T系統の雄、中国側はDazao系統の雄)で、結果の比較からも両者のデータをあわせることができることが分かった。2006年3月中国側とWGSデータ合作による高精度カイコゲノムシーケンスのための合意が実現した。

2. ゲノムアセンブリー

今回の新しいアセンブリーでは、日中の両方のWGS

農業生物資源研究所昆虫科学研究領域 (〒305-8634 茨城県つくば市大わし1-2)

The genome of a lepidopteran model insect, the silkworm *Bombyx mori*

Kazuei Mita (Division of Insect Sciences, National Institute of Agrobiological Sciences, Owashi 1-2, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan)

シーケンスデータの他に新しく fosmid エンドシーケンスと BAC エンドシーケンスデータを一緒に合わせ、合計で 8.48x シーケンスサイズデータとなった。また、fosmid と BAC のクローンのゲノム重複度はそれぞれ 12.6 倍、24.7 倍であった (表 1)。東京大学の森下真一博士の研究室で開発された RAMEN assembler を用いてアセンブリーが行われた。アセンブルされたゲノムサイズは 432Mb となり、カイコゲノムサイズは 475Mb なので、ゲノムの 91% が解読されたことになる。N50 コンティグサイズと N50 スキャホールドサイズはそれぞれ 15.5kb および 3.7Mb となった (表 2)⁴⁾。2004 年の日本、中国のそれぞれの WGS データアセンブリー結果に比べると極めて大きな改善がなされた。これは fosmid および BAC エンドデータが組み合わせられたことによる。

1,577 個のマーカが乗っている高密度一塩基多型 (SNP) 連鎖地図⁵⁾を用いて、ゲノムの 87.4% にあたるスキャホールドシーケンスを 28 本の染色体に貼付けることができた (表 3)。連鎖地図とアセンブリーの比較から、1,544 マーカーのうちの 1,531 個 (99.2%) はスキャホールドの中で矛盾のない順序で配置していることが分かった。このことはアセンブリーと遺伝地図の両方ともこの後の解析にとって信頼できるものであることを示している。さらに、アセンブリーが遺伝子領域をどのくらいカバーしているかを確かめるため、GenBank に登録されている 767 個の cDNA 配列をアセンブリーと比較したところ、96% 以上 (938 個) はエクソンの順序や方向が正しく、完全に一致した。16,425 個の Expressed Sequence Tag (EST) (発現している遺伝子の部分配列) クラスタをアラインしても同様だった。アセンブルしたシーケンスは、accession #: DF090316-DF092116 (スキャホールド); BABH01000001-BABH01088672

表 1 ショットガンシーケンスライブラリーのリスト
9 種類のライブラリーを用いた。系統は 2 種類、p50T (日本) と Dazao (中国)、で、それぞれ 5 齢幼虫の雄の後部絹糸腺細胞から DNA を抽出し、ライブラリーを作成した。

種類	系統	平均インサート長 (kb)	塩基被覆率 総塩基数/ ゲノム長	クローン被覆率 総クローン挿入 長/ゲノム長
プラスミド	dazao	1.7-3.5	3.37	8.78
プラスミド	dazao	N/A	0.02	N/A
プラスミド	p50T	2.25-2.9	2.74	8.15
プラスミド	dazao	3.2-3.8	0.02	0.12
プラスミド	dazao	6.4-7.8	1.15	10.73
プラスミド	p50T	6.3	0.18	1.94
プラスミド	p50T	9.8	0.56	7.68
fosmid	p50T	37-37.5	0.25	12.60
BAC	p50T	115-175	0.18	24.69
総計		1.7-175	8.48	74.68

(コンティグ) で GenBank に登録した。また、生物研のカイコゲノムデータベース KAIKObase の public data (<http://sgp.dna.affrc.go.jp/pubdata/index.html>) でダウンロードできる。

3. カイコゲノムの特徴

カイコゲノムは多数の transposable element (TE) を含んでいるが、これまではほんの少ししか同定されていなかった。そこで、ReAS プログラムを用いて⁶⁾、アセンブルしたシーケンスから新たにリピート配列ライブラリーを作成した。GenBank に既に登録されている 17 個の TE を含む 1,685 個のリピート配列を得た。これらのうち 827 個 (カイコゲノムの 35.1% に相当) はトランスポゾン配列であることを確認した。表 4 にその内訳を示す。TE の主要なものは LINE や SINE で、それぞれゲノムの 14.5% と 13.3% を占めている。リピート配列で未同定のものも含

表 2 スキャホールドおよびコンティグのサイズ分布
コンティグの総サイズは 431.8Mb となった。サイズの大きい順に足していき、その総計がゲノムサイズ 475 Mb の 50% 以上になった時のサイズを N50 とする。

	スキャホールド		コンティグ	
	サイズ (bp)	数	サイズ (bp)	数
最大	14,496,184	1	139,031	1
N10	7,612,736	5	41,915	785
N20	6,299,201	11	30,773	2,006
N30	5,377,136	18	24,330	3,590
N40	4,475,702	27	19,439	5,588
N50	3,716,872	37	15,506	8,077
N60	2,574,369	51	11,989	11,248
N70	1,776,626	72	8,792	15,441
N80	1,110,220	103	5,605	21,521
N90	43,109	282	1,934	33,670
計	431,756,343	43,622	431,756,343	88,842

表 3 スキャホールドのマッピング

1,577 個の SNP マーカーを使ってスキャホールドを 28 本染色体にマップした。染色体の 87.4% にスキャホールドが貼付いた。「方向決定」は、スキャホールドに複数のマーカーがあり、ヌクレオチドの方向を決めることができたもの。「方向未定」は、スキャホールド上に 1 個しかマーカーがなく、方向が未定のもの。

マップされたスキャホールドがカバーする塩基率	87.4%
方向決定	81.2%
方向未定	6.1%
マップされたスキャホールドでカバーされていない塩基率	12.6%

めると、なんとカイコゲノムの約43.6%がリピート配列だった。リピート配列の割合は昆虫間で非常にばらついている。ハマダラカ *Anopheles gambiae* では16%⁷⁾、ミツバチ *Apis mellifera* では1%⁸⁾、ショウジョウバエ *Drosophila* では2.7-25%⁹⁾である。しかし、リピート配列を差し引くと非リピート配列のサイズは、カイコ (244Mb)、ハマダラカ (235Mb)、ミツバチ (235Mb) となり、ほぼ同じサイズとなる。また、ショウジョウバエの系統間の比較でも

表4 カイコゲノム中のリピート配列の内訳

リピート配列探索プログラム ReAS を用いてアセンブリーから1,685個のリピート配列を抽出した。そのうちの827個のリピート配列がトランスポゾン由来の配列 (TE) であると同定した。

	クラス	ReAS リピート配列数	ゲノム中の総塩基数 (Mb)	ゲノムに占める割合 (%)
分類されたTE	LINEs	408	62.8	14.5
	SINEs	97	57.6	13.3
	LTRs	210	6.6	1.5
	Others	112	24.6	5.7
	Total	827	151.6	35.1
未同定		858	36.5	8.5
総数		1,685	188.1	43.6

同じサイズが得られ、カイコゲノムサイズが大きい (475 Mb) 原因はトランスポゾン由来の配列の挿入によるものと推定された。

カイコの遺伝子数の予測は、TE リピート配列をマスクしたカイコゲノム配列に対して遺伝子予測ソフト BGF¹⁰⁾ を用いて行い、16,329個の予測遺伝子を得た。遺伝子予測の評価は一般には転写開始点 (TSS) 情報を用いて行われるが、カイコではまだ完全長 cDNA 情報がほとんどなく、TSS 情報を有効に利用できない。そこで私たちは、5-end serial analysis of gene expression (5' SAGE) 解析¹¹⁾ と Illumina-Solexa シーケンサーを用いて大量の5'端 mRNA tag 15,744,044個を得、これをカイコゲノムシーケンスと配列比較した。これらの tag が予測遺伝子の開始コドンの上流 1kb 以内に存在する場合、これらの tag を TSS とした。この方法を使うと BGF 予測遺伝子の 84.9% に TSS が存在し、遺伝子予測が有効であることが示された。

4. カイコの特徴的生命現象を生み出すゲノムの進化・適応

(1) 大量絹生産

カイコゲノム解析から、この動物の特徴である絹生産を増大させるためにゲノムを進化・適応させてきた事実を明らかにすることができる。図1には絹糸腺での絹生産の概

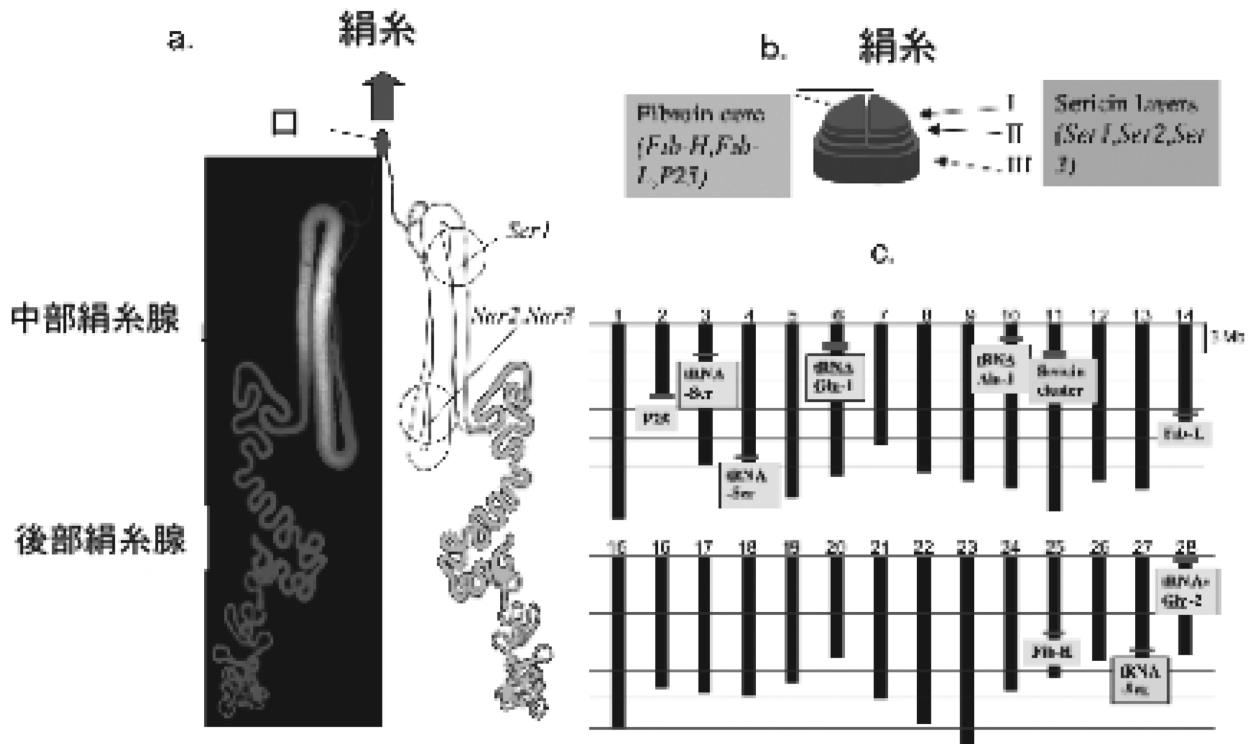


図1 絹糸腺における絹合成に関わる遺伝子のイラスト

a: 絹糸腺構造; b: Silk fiber 構造; c: 絹合成に関わる遺伝子の連鎖地図. (a)の写真は、フィブロイン H鎖-DsRed の融合遺伝子を持つ遺伝子組換えカイコからとった絹糸腺である。(c)の連鎖地図では、フィブロイン合成に関わる遺伝子とセリシン合成に関わる遺伝子を示す。

表5 カイコゲノム中の178個の7TMR遺伝子の分類

クラス	ファミリー	数
A (ロドプシン様)	生理活性アミン	20
	糖タンパク質ホルモン	2
	神経ペプチド	42
	プリン	1
	オブシン	6
B (セクレチン様)	神経ペプチド	2
	HE6 様	2
	Latrophilin	2
	Methuselah-like	3
C (グルタミン酸代謝系)	グルタミン酸代謝	5
	GABA-B	3
D (非正型 7TMRs)	Frizzled/Smoothened	5
E (化学受容体 7TMRs)	嗅覚	60
	味覚	11
Orphan		9
未分類		5
	総 数	178

略とこの過程に関わる遺伝子を示した。絹の主要成分はフィブロインとセリシタンパク質であり、それらは主要な4種類のアミノ酸 Gly, Ala, Ser, Tyr から成っている¹²⁾。カイコゲノムは、これら四つのアミノ酸合成に必要な tRNA 遺伝子セットを準備している。カイコゲノムシーケンスから 443 個の tRNA 遺伝子が確認され、そのうちの 130 個はクラスター化している。フィブロイン H-鎖合成に必要な tRNA-Gly1 遺伝子と tRNA-Gly2 遺伝子はそれぞれ 6 番と 28 番染色体にクラスターになっていた。また、H-鎖合成に必須の tRNA-Ser2 遺伝子は 3 番と 4 番にクラスターになっている。さらに、H-鎖の Ala のための tRNA-Ala1 は 10 番染色体に非常に密なクラスターを形成していた¹³⁾。一方、セリシタンパク質合成には AGY コドンに対応する 4 個の tRNA-Ser 遺伝子が 27 番染色体にクラスター化していた。興味深いことには、それぞれのクラスター内の tRNA 遺伝子のメンバーは同じプロモーター A-box と B-box シーケンスを持っていることが分かった。このことは、これらの tRNA 遺伝子が進化の過程で遺伝子重複によってコピー数を増やし、短期間に大量の絹タンパク質合成を可能にする特異的 tRNA 分布形成に絶妙に適応していることを示している。

既に報告されている三つのセリシン遺伝子 *Ser1*, *Ser2*, *Ser3* は 11 番染色体の 2Mb の領域に三つとも局在してい

た^{14,15)}。*Ser1* は中部絹糸腺 (MSG) の中央部と後部で発現し、絹の最も内側のセリシン層を形成している。一方、外側のセリシン層を形成する *Ser2*, *Ser3* は MSG の前の部分 (口に近い方) で発現している。吐糸口の最も外側に存在するセリシタンパク質は最も高い剪断応力をうけるので、そのタンパク質は低い結晶化度と高い流動性を持つべきである。*Ser3* は *Ser1* に比べてより親水性で、かつ流動性を持つことがアミノ酸構造から分かった¹⁵⁾。このように、セリシン遺伝子はその空間的遺伝子発現制御と構造特性において極めて効率的な絹生産に合理的に適応するように進化してきた。

(2) 桑に依存する食性

様々な生体物質によって誘導されるシグナル伝達系の通路としての重要な役割を果たす 7 回膜貫通型受容体 (7TMR) 遺伝子をカイコゲノムで網羅し、いくつかの昆虫との比較を行った。多くの昆虫では 200 以上の 7TMR 遺伝子を持つが、カイコはかなり少ないことが分かった: カイコ (178 遺伝子), キイロショウジョウバエ (254 遺伝子), ミツバチ (263 遺伝子), ハマダラカ (266 遺伝子)¹⁶⁾。表 5 にはカイコの 7TMR 遺伝子の分類を示す。クラス A, B, C, D 群の 7TMR 遺伝子の数は 4 種類の昆虫間ではほとんど同じであるが、化学感覚受容体の数は違った特徴を与えている (表 6)。カイコの総数は、他の昆虫よりかなり少ない。また、カイコとミツバチの味覚受容体 (GR) は嗅覚受容体 (OR) よりはるかに少ないが、キイロショウジョウバエやハマダラカの双翅目ではほぼ同じ数の分布を示す¹⁷⁾。カイコやミツバチで GR が少ないということは、カイコでは桑のみを餌にするという食性、ミツバチでは社会性という特性によるのかもしれない。図 2 にはカイコの OR/GR 遺伝子の染色体の分布を示す。哺乳類の OR 遺伝子は高密度のクラスターを形成することが知られているが、カイコではほとんどクラスター化は見られず、まばらに散在している。これらの事実は、カイコが桑に特化しているというよりは、カイコは自ら桑を求めて探しまわることなく人によって完全に飼育されるということや、産卵場所を選ばずにどこでも産卵する、しかも 1 箇所にて全ての卵を産むという野生と異なる完全な家畜化の結果を表しているのかもしれない。従って、野生種のクワコとの比較は、

表6 4種類の昆虫における嗅覚/味覚受容体遺伝子の数

遺伝子ファミリー	カイコ	キイロショウ ジョウバエ	ハマダ ラカ	ミツバチ
嗅覚受容体	60	62	79	170
味覚受容体	11	68	72	13
総 数	71	130	151	183

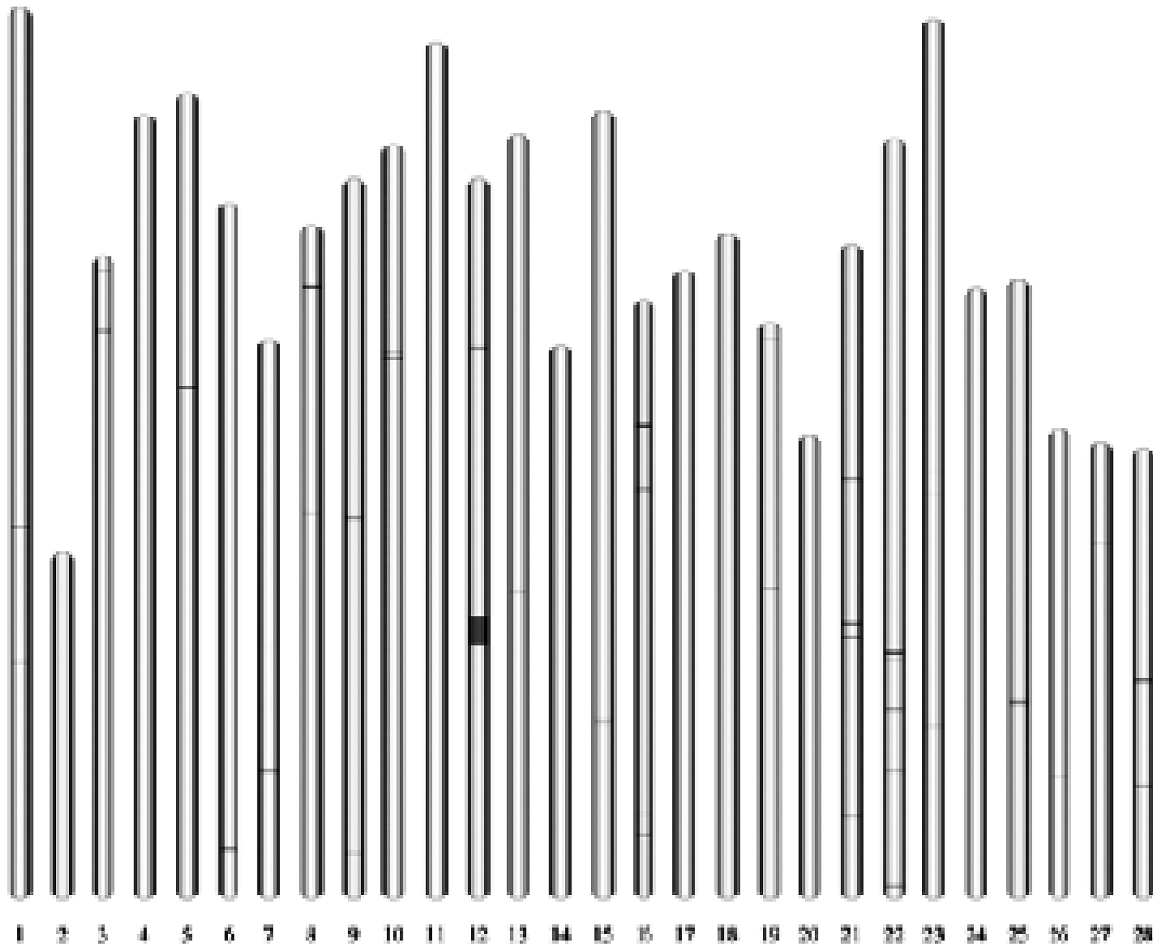


図2 カイコ嗅覚/味覚受容体遺伝子の染色体分布

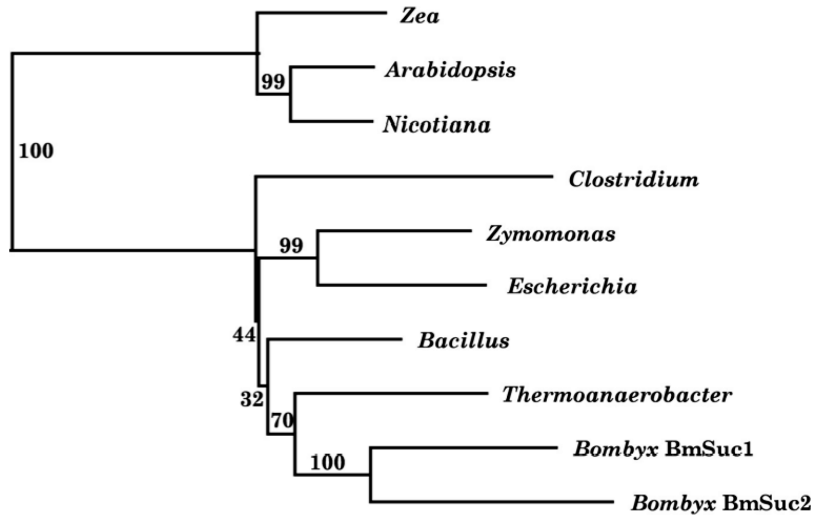
人間による完全飼育がどのように知覚受容体遺伝子の進化に影響を与えるのかを如実に明らかにするであろう。

カイコは桑のみを餌とするが、桑の葉の乳液には1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol (D-AB1), や1-deoxynojirimycin (DNJ) のようなアルカロイド系の糖代謝阻害物質が高濃度で含まれている。これらのアルカロイド系物質はカイコ以外のチョウやガの幼虫には有毒である。そのため、カイコはこれらの有毒物質を回避できるようなメカニズムを発達させてきた¹⁸⁾。D-AB1やDNJは α -グルコシダーゼを強く阻害するが、 β -フルクトフラノシダーゼの活性を阻害しない。 α -グルコシダーゼは、バクテリア、カビ類、植物、動物に広く存在しているが、 β -フルクトフラノシダーゼはこれまで動物には見つかっていなかった。しかし、今回カイコゲノムから2個の β -フルクトフラノシダーゼ遺伝子 (*BmSuc1*, *BmSuc2*) が見つかった。これらは二つとも17番染色体上にある。*BmSuc1* は機能的 β -フルクトフラノシダーゼをコードし、D-AB1やDNJによって酵素活性は阻害されない。*BmSuc2* は偽遺伝子のような。さらに、*BmSuc1* の転写物やタンパク質は中腸に局在していた。このように、 β -フルクトフラノシダーゼの存在によって、な

ぜカイコが桑の生体防御システムをすり抜けることができるのかを明らかにすることができた。図3に *BmSuc1*, *BmSuc2* の系統樹を示す。これは、*Bacillus* や *Thermoanaerobacter* のようなバクテリアの β -フルクトフラノシダーゼ遺伝子と非常に近く、進化のある時点でバクテリアからカイコへの遺伝子の水平移動によって、カイコはこの遺伝子を獲得したという可能性を示唆している。

(3) 変態

幼若ホルモン (JH) は、昆虫の変態、生殖、休眠やその他の生理現象の制御に重要な役割を果たしている。鱗翅目昆虫は、他の昆虫類には見られないエチル基が分岐したJHを産出するので、この特異的JH合成に関わる遺伝子を持っている必要がある。我々は、カイコゲノム中にエポキシダーゼ¹⁹⁾やO-メチルトランスフェラーゼ (JHAMT)²⁰⁾を含むJH合成に関わるほとんどの重要遺伝子を同定することができた (図4)。これらの遺伝子はキロショウジョウバエ、ハマダラカ、ミツバチでは単一遺伝子として存在しているが、カイコでは3コピーのファルネシルピロリン酸合成酵素遺伝子 (*FPPS1-3*) や6個のJHAMT様メチ



0.1
 図3 カイコβ-フルクトフラノシダーゼおよび関連タンパク質の系統樹解析

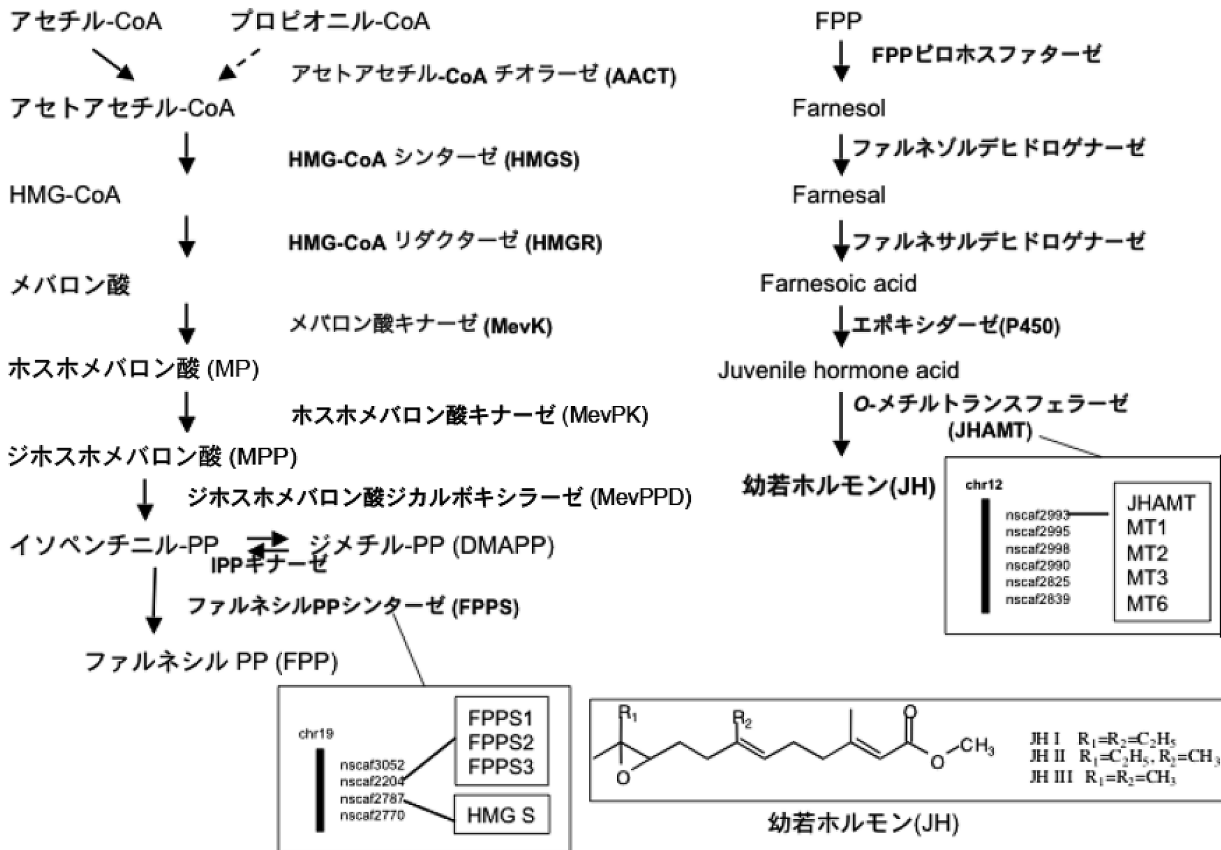


図4 幼若ホルモン合成経路および関連遺伝子
 ほとんどの昆虫類は単一の幼若ホルモン (JH) である JHIII を合成するが、鱗翅目昆虫はエチル基が分岐した特異的 JH を合成する。

ル転移酵素遺伝子が見つかった。従って、これらの遺伝子は、鱗翅目昆虫に特異的な JH 合成に適応するように鱗翅目昆虫の進化過程で、遺伝子重複によって獲得されてきたものと推定される。

多くの鱗翅目昆虫は野外でその幼虫期を過ごす。その危険な環境にうまく適応するには、捕食者から身を守るための体を覆う多数のクチクラタンパク質が必要であった。さらに、鱗翅目昆虫では、成虫の翅の鱗粉構造形成のための

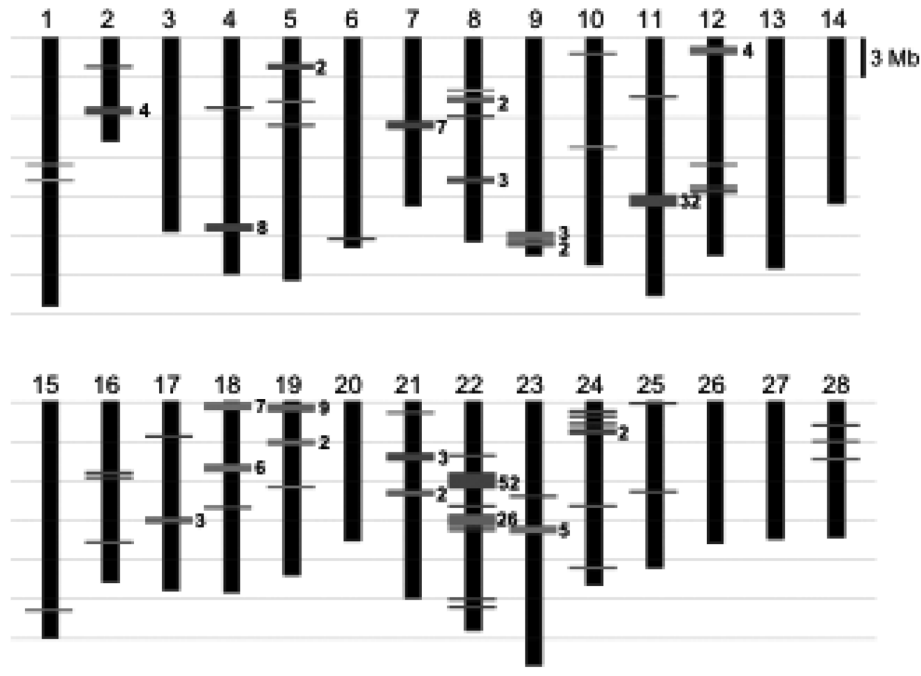


図5 カイコクチクラタンパク質遺伝子のクラスター化

カイコゲノムに220個のクチクラ遺伝子が予測された。そのうちの80%の遺伝子がクラスターを形成していた。各クラスター内のメンバー遺伝子は同じモチーフを持っている。クラスターの横の数字はクラスターを校正するクチクラタンパク質遺伝子数を示す。

特異的クチクラタンパク質も必要とされる。我々は、カイコゲノムシーケンスから220個のクチクラタンパク質遺伝子をリストアップした。図5に示すように、それらの遺伝子の80%以上は遺伝子クラスターとして存在していた。クチクラタンパク質には数種類の異なったモチーフ構造がある。最も多く見られるモチーフはキチン結合R&Rモチーフであり、RR1、RR2、RR3の三つのモチーフに分類されている²¹⁾。カイコゲノムは148個のRRタンパク質(56 RR1; 89 RR2; 3 RR3)をコードしている。これはキロショウジョウバエの101個のRR²²⁾、ミツバチの28個のRR遺伝子²³⁾よりはるかに多い。また、RR1とRR2遺伝子はそれぞれ独自のクラスターを形成しており、クチクラ遺伝子の進化の早い時期にRR1とRR2が分岐したと推定される。また、高グリシンクチクラタンパク質やその他のクチクラタンパク質をコードする遺伝子も、カイコゲノムでは遺伝子クラスターになっている²⁴⁾。例えば、18番染色体には7個と6個の高グリシンクチクラ遺伝子からなるクラスターが存在している。その他、現在未同定のクチクラ遺伝子も大きな遺伝子クラスターを形成していた(例えば、11番染色体の32個の遺伝子クラスター)。遺伝子クラスター内の共通のモチーフを持つクチクラ遺伝子メンバーは共通の遺伝子発現プロファイルを示すのかどうかを、カイコのEST解析²⁵⁾やRT-PCR解析で調べた。その結果、たとえ同じクラスター内の隣り合ったメンバーでも互いに

異なる遺伝子発現プロファイルを示すことが分かった。このことは、進化の過程で、クラスター内でリアレンジメントによって遺伝子の構造や遺伝子調節機構が変化してきたということを示している。

5. ま と め

今回の高精度のカイコゲノムアセンブリーによって、カイコゲノムのより正確な構造と機能のアノテーションが可能になった。完全長cDNA情報を用いて、カイコゲノムシーケンスのアノテーションが行われることを多くの研究者が期待している。得られた高精度カイコゲノムシーケンスは、鱗翅目昆虫、特にカイコにおける特徴的生命現象を生み出すメカニズムを構築する進化過程の理解に新しい知見、情報、証拠を与えた。今回のゲノムアセンブリー結果についての主論文およびその結果を用いたカイコゲノム構造、特異的生命現象の解析や遺伝子機能解析、カイコ遺伝子改変技術への利用に関する論文をまとめて“*Insect Biochemistry and Molecular Biology*”誌(Elsevier)のカイコゲノム特集号として出版されるので、是非参照されたい。

謝辞

カイコゲノム解析を目指して、亡くなられた前田進博士と東京大学 嶋田透博士と共に1997年にカイコESTデータベース構築からスタートした研究は、多くの人たちの協

力で世界に誇れるカイコゲノムシーケンスを得るといふばらしい成果に到達することができました。亡くなられた前田進先生の夢がようやく実現できたことを感慨深く思います。この壮大なプロジェクトを最初からともに遂行して下さった東京大学の嶋田透博士、研究室のメンバー、常に大きな支援をしていただいた生物資源研究所の田村俊樹博士、日本で初めてゲノムアセンブリーを行って下さった東京大学の森下真一博士、日中合作に御苦勞された吉川寛先生、その他多くの方の協力でカイコゲノム解析がここまで進展できたことに感謝致します。外国からも多くの人たちがカイコゲノム解析の進展に期待し、励ましてくださいました。Prof. Marian R. Goldsmith (Rhode Island University), Prof. Pierre Couble (University of Lyon I), Dr. Rene Feyereisen (INRA, France), Dr. Javaregowda Nagaraju (CDFD, India), Prof. Frantisek Sehnal (Entomol. Inst. Acad. Sci., Czech), Qingyou Xia 教授 (中国西南大学) に感謝致します。これから最後のゴール、アノテーションに向けて皆さんとともに頑張りたいと思います。

文 献

- 1) Tamura, T., Thibert, C., Royer, C., Kanda, T., Abraham, E., Kamba, M., Komoto, N., Thomas, J.L., Mauchamp, B., Chavancy, G., Shirk, P., Fraser, M., Prudhomme, J.C., & Couble, P. (2000) *Nat. Biotechnol.*, **18**, 81–84.
- 2) Mita, K., Kasahara, M., Sasaki, S., Nagayasu, Y., Yamada, T., Kanamori, H., Namiki, N., Kitagawa, M., Yamashita, H., Yasukochi, Y., Kadono-Okuda, K., Yamamoto, K., Ajimura, M., Ravikumar, G., Shimomura, M., Nagamura, Y., Shin-I, T., Abe, H., Shimada, T., Morishita, S., & Sasaki, T. (2004) *DNA Research*, **11**, 27–35.
- 3) Xia, Q., *et al.* (2004) *Science*, **306**, 1937–1940.
- 4) The International Silkworm Genome Consortium (2009) *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **38**, 1036–1045.
- 5) Yamamoto, K., Nohata, J., Kadono-Okuda, K., Narukawa, J., Sasanuma, M., Sasanuma, S., Minami, H., Shimomura, M., Suetetsugu, Y., Osoegawa, K., de Jong, P.J., Goldsmith, M.R., & Mita, K. (2008) *Genome Biol.*, **9**, R21.
- 6) Li, R., Ye, J., Li, S., Wang, J., Han, Y., Ye, C., Wang, J., Yang, H., Yu, J., Wong, G.K., & Wang, J. (2005) *PLoS Comput. Biol.*, **1**, e43.
- 7) Holt, R.A., *et al.* (2002) *Science*, **298**, 129–149.
- 8) The Honeybee Genome Sequencing Consortium (2006) *Nature*, **443**, 931–949.
- 9) *Drosophila* 12 Genomes Consortium (2007) *Nature*, **450**, 203–218.
- 10) Li, H., Liu, J., & Xu, Z. (2005) *J. Computer Sci. Tech.*, **20**, 446.
- 11) Hashimoto, S., Suzuki, Y., Kasai, Y., Morohoshi, K., Yamada, T., Sese, J., Morishita, S., Sugano, S., & Matsushima, K. (2004) *Nat. Biotechnol.*, **22**, 1146–1149.
- 12) Suzuki, Y., Tsujimoto, Y., Tsuda, M., & Ohshima, Y. (1981) in *Biochemistry of Cellular Regulation* (Buckingham, M.E. ed.), pp. 113–144, CRC Press.
- 13) Underwood, D.C., Knickerbocker, H., Gardner, G., Condliffe, D.P., & Sprague, K.U. (1988) *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 5504–5512.
- 14) Couble, P., Michaille, J.J., Garel, A., Couble, M.L., & Prudhomme, J.C. (1987) *Dev. Biol.*, **124**, 431–440.
- 15) Takasu, Y., Yamada, H., Tamura, T., Sezutsu, H., Mita, K., & Tsubouchi, K. (2007) *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **37**, 1234–1240.
- 16) Ono, Y., Fujibuchi, W., & Suwa, M. (2005) *Gene*, **364**, 63–73.
- 17) Robertson, H.M. & Wanner, K.M. (2006) *Genome Res.*, **16**, 1395–1403.
- 18) Konno, K., Ono, H., Nakamura, M., Tateishi, K., Hirayama, C., Tamura, Y., Hattori, M., Koyama, A., & Kohno, K. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **31**, 1337–1341.
- 19) Helvig, C., Koener, J.F., Unnithan, G.C., & Feyereisen, R. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 4024–4029.
- 20) Shinoda, T. & Itoyama, K. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 11986–11991.
- 21) Iconomidou, V.A., Willis, J.H., & Hamodrakas, S.J. (1999) *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **29**, 285–292.
- 22) Magkrioti, C.K., Spyropoulos, I.C., Iconomidou, V.A., Willis, J.H., & Hamodrakas, S.J. (2004) *BMC Bioinformatics*, **5**, 138.
- 23) Elsik, C.G., Mackey, A.J., Reese, J.T., Milshina, N.V., Roos, D.S., & Weinstock, G.M. (2007) *Genome Biol.*, **8**, R13.
- 24) Suzuki, Y., Matsuoka, T., Iimura, Y., & Fujiwara, H. (2002) *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **32**, 599–607.
- 25) Mita, K., Morimyo, M., Okano, K., Koike, Y., Nohata, J., Kawasaki, H., Kadono-Okuda, K., Yamamoto, K., Suzuki, M. G., Shimada, T., Goldsmith, M.R., & Maeda, S. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 14121–14126.