

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19880039

研究課題名（和文） カイコの繭色を支配する遺伝子の同定

研究課題名（英文） Molecular cloning of cocoon color gene in the silkworm

研究代表者

作道 隆 (SAKUDOH, Takashi)

国立感染症研究所・放射能管理室・研究官

研究者番号：70455393

研究成果の概要：動物の体内カロテノイド輸送機構を明らかにすることを目的とし、カイコにおいて体液から絹産生器官細胞へのカロテノイドの移行を支配する遺伝子のひとつである黄繭遺伝子を同定することを試みた。その結果、黄繭遺伝子は細胞膜貫通タンパク質 Cameo2 をコードしていることが分かった。Cameo2 は哺乳類において高密度リポタンパク質の受容体であり、C 型肝炎ウイルスなどの病原体の認識にも関与している SR-BI の相同分子であった。黄繭遺伝子が機能するためには細胞内カロテノイド結合タンパク質 (CBP) の発現が必要である。すなわち、体液リポタンパク質から Cameo2 を介して CBP にカロテノイドが受け渡されることによってカロテノイドが細胞に取り込まれると推測される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,370,000	0	1,370,000
2008年度	1,350,000	0	1,350,000
総計	2,720,000	0	2,720,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用昆虫学

キーワード：脂質輸送・カロテノイド・カイコ・繭色・スカベンジャー受容体 SR-BI ・CD36・ninaD・ポジショナルクローニング

## 1. 研究開始当初の背景

(1)カイコが作る繭の色は一般的には白色が知られているが、系統によっては黄、赤、緑といった着色繭を作る。これらの色は餌の桑葉に含まれる脂溶性カロテノイド色素（黄・赤系色素）や水溶性フラボノイド色素（緑系色素）が腸管で吸収され、体液を介して絹を作る絹糸腺という器官まで輸送されることによって生じている。これらの色素は、ヒトの食餌にも多く含まれており、視覚の維持などの生理機能にとって重要な栄養素でもある。

20世紀初頭より、古典的な遺伝学的交配に

よって繭の色を支配する遺伝子（遺伝子座）が多数同定されてきた。これらの繭色遺伝子の多くは、それぞれ体内色素輸送機構の一部を支配するものである。繭色は表現型も明確であることから（図1）、繭色遺伝子は動物の



図1 カイコの黄繭と白繭の外観

体内色素輸送機構を解明する上での優れた遺伝学的材料になることが期待された。しかし、繭色遺伝子がコードする分子の実体についてはいずれも明らかにされていなかった。

本研究の開始直前に、研究代表者らは、繭色遺伝子のひとつ黄血遺伝子 (*Yellow blood: Y*) が細胞内カロテノイド結合タンパク質 CBP (Tabunoki et al., 2002, JBC) をコードすることを明らかにした (毎日新聞 2007年5月8日、朝日新聞 2007年5月21日、Sakudoh et al., 2007, PNAS)。CBPは、動植物に広く見られる START という脂質結合ドメインを有していた。

(2) カイコではゲノム配列の解読が日中共同チームによって完了しつつあった (読売新聞 2009年2月12日、毎日新聞 2009年2月15日、The International Silkworm Genome Consortium, 2008, Insect Biochemistry and Molecular Biology)。また、SNP マーカーという染色体上の物理的位置情報となる分子生物学的ツールの整備も進んでいた (Yamamoto et al., 2006, Genetics; Yamamoto et al., 2008, Genome biology)。これらの分子生物学的情報の充実によって、これまでは非現実的であったポジショナルクローニングという手法を用いて、カイコの遺伝子の分子実体を明らかにすることが可能になった。

## 2. 研究の目的

動物の体内カロテノイド輸送機構を明らかにすることを目的とした。輸送機構を明らかにするためには、その輸送機構を担う分子を同定することが必要である。そこで、*Y* に続き、繭色遺伝子のひとつであり、体液から中部絹糸腺細胞へのカロテノイドの輸送を支配する黄繭遺伝子 (*Yellow cocoon: C*) がコードする分子の実体をポジショナルクローニングによって同定することを目標とした。

## 3. 研究の方法

(1) *C* が座位する染色体上の物理的領域の絞り込み

*C* の対立遺伝子が優性の *C* の場合、黄繭となり、劣性の  $+^c$  がホモの場合、白繭となる。そこで、黄繭系統 (*C/C*) と白繭系統 ( $+^c/+^c$ ) を交配することで F1 個体 ( $C/+^c$ ) を作製し、その F1 個体の雄を白繭系統 ( $+^c/+^c$ ) に戻し交配することで BF1 個体を作出した。この BF1 個体を用いて、SNP マーカーと表現型の連関を調べ、*C* が座位する範囲を絞り込んだ。

(2) 遺伝子のクローニングと発現解析

BF1 個体を用いて絞り込んだ範囲に存在し

た *C* の候補遺伝子を RACE 法の常法に従いクローニングした。遺伝子発現解析にはラジオアイソトープでラベルした核酸プローブを用いたノーザンブロットングおよび定量的 PCR 法を用いた。

(3) 白繭系統への *C* 候補遺伝子の強制発現

田村らのトランスジェニックカイコ作出法 (Tamura et al., 2000, Nature biotechnology) と GAL4/UAS システムによる強制発現法 (Imamura et al., 2003, Genetics) を用いた。

## 4. 研究成果

(1) *C* が座位する染色体領域の同定

約 1800 頭の BF1 個体を用いて *C* が座位する染色体上の物理的領域を 1 つの scaffold 上の 375 kb の範囲に絞り込んだ。その範囲内には 13 個の遺伝子が予測された。

(2) *C* 候補遺伝子のクローニング

候補となる 13 個の遺伝子の中には、哺乳類において高密度リポタンパク質の受容体であり、細胞内への脂質の取り込みに関与する膜貫通型スカベンジャー受容体 SR-BI の相同遺伝子が 2 つ存在した。また、その 2 つの相同遺伝子は、ショウジョウバエにおいてカロテノイドの輸送に関与することが示唆されている *ninaD* 遺伝子とも相同性を有していた。そこでその 2 つの遺伝子を有力な *C* の候補遺伝子と考え、ゲノム配列上で転写される向きの 5' 側に位置する方から順番に *Cameo1* (*C* locus associated membrane protein 1)、*Cameo2* と命名した。

(3) *Cameo2* は白繭系統 ( $+^c/+^c$ ) で発現が抑制されている

*C* との関係を調べるため、黄繭系統 (*C/C*) と白繭系統 ( $+^c/+^c$ ) において *Cameo1* と *Cameo2* の mRNA 配列を決定し、比較したが、重要な違いは見いだせなかった。そこで、発現量の違いを調べたところ、白繭系統 ( $+^c/+^c$ ) の中部絹糸腺において *Cameo2* の発現が有意に抑制されていることを見出した (図 2)。*Cameo2*

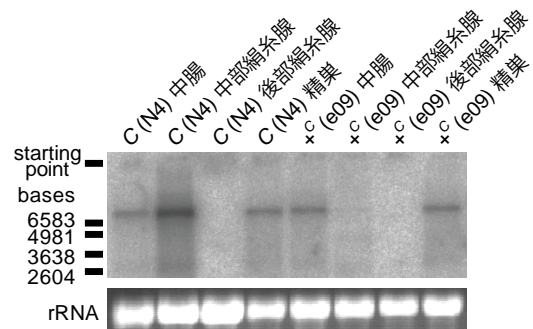


図 2 *Cameo2* のノーザンブロットング

の抗体を作成し、中部絹糸腺の膜画分におけるタンパク質をウェスタンブロッティングで検出したところ、タンパク質発現も白繭系統 (+<sup>c</sup>/+<sup>c</sup>) において抑制されていることを確認した。

*Cameo1* の発現量は黄繭系統 (*C/C*) と白繭系統 (+<sup>c</sup>/+<sup>c</sup>) において有意な差を見いだせなかった。

(4) *Cameo2* の発現量とカロテノイドによる組織の着色の度合いは相関している

精巢においては白繭系統 (+<sup>c</sup>/+<sup>c</sup>) における *Cameo2* の発現抑制は見られなかったため(図2)、黄繭系統 (*C/C*) と白繭系統 (+<sup>c</sup>/+<sup>c</sup>) においてカロテノイドによる精巢の着色の度合いを比較したところ、精巢は白繭系統 (+<sup>c</sup>/+<sup>c</sup>) においても着色していることが分かった(図3)。また、発育段階を追って中部絹糸腺での *Cameo2* の発現量の変化を調べたところ、中部絹糸腺が着色する吐糸期に、着色の度合いと相関して発現量が上昇していることが分かった。すなわち、組織のカロテノイドの取り込み量と *Cameo2* の発現量との間には有意な正の相関があった。

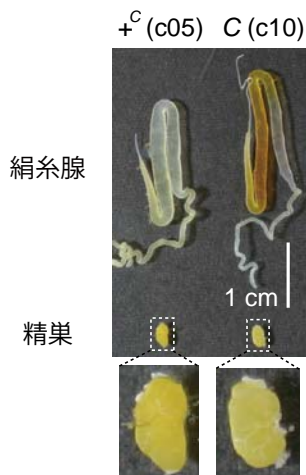


図3 黄繭系統 (*C/C*) と白繭系統 (+<sup>c</sup>/+<sup>c</sup>) での組織の着色の違い

(5) 白繭系統 (+<sup>c</sup>/+<sup>c</sup>) の中部絹糸腺における *Cameo2* の発現抑制は *Cameo2* のシス領域に原因がある

黄繭系統 (*C/C*) と白繭系統 (+<sup>c</sup>/+<sup>c</sup>) の F1 個体 (黄繭) で *Cameo2* mRNA の SNP 解析を行ったところ、中部絹糸腺においては黄繭系統 (*C/C*) 由来の mRNA がほとんどであった。このことから、白繭系統 (+<sup>c</sup>/+<sup>c</sup>) の中部絹糸腺における *Cameo2* の発現抑制は *Cameo2* のシス領域に原因があると推測された。

(6) 白繭系統 (+<sup>c</sup>/+<sup>c</sup>) の中部絹糸腺への *Cameo2* の強制発現によって、表現型が黄繭に復帰する

*Cameo2* を *piggyBac* システムを用いたトランスジェニック作出法によって白繭系統 (+<sup>c</sup>/+<sup>c</sup>) の中部絹糸腺へ強制発現したところ、予備的なデータではあるが、表現型が黄繭に復帰したことを確認した。

(6) 本研究の意義と今後の展望

本研究の結果から、*C* は *Cameo2* をコードしていると考えられることができる。*C* は CBP の発現を条件として機能することが分かっているので、カイコの体内では、図4のモデル図に示すように、体液リポタンパク質から *Cameo2* を介した CBP へのカロテノイドの受け渡しが行われ、その結果、組織へのカロテノイドの着色と繭の着色が起きていると予想される。

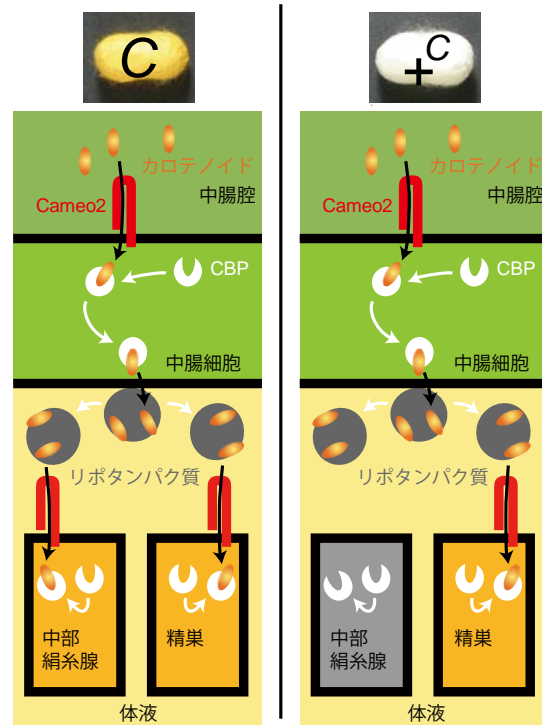


図4 黄繭系統 (*C/C*) と白繭系統 (+<sup>c</sup>/+<sup>c</sup>) の体内におけるカロテノイドの輸送経路のモデル

*Cameo2* の相同分子 SR-BI においても脂溶性物質を細胞外のリポタンパク質から細胞内に取り込むことは知られていたが、SR-BI が細胞内の脂質輸送因子とどのように協同的に働くかについては未だほとんど知見はない。生物において、どのように複数の因子が協調してひとつの脂質を終着点の組織まで運ぶのかについて、今後 *Cameo2* や CBP について生化学的・組織化学的解析を行い、そしてまだ未同定の他の繭色遺伝子を同定し、解析を行うことで詳細に明らかにしていくこ

とができると思われる。

また、*C* は桑葉に含まれるカロテノイドの中でも主にルテインという特定のカロテノイドの輸送のみに関与することが知られているが、その輸送するカロテノイドの選択性がどのようにして実現されているのかについては明らかではない。SR-BI などの相同遺伝子についても輸送脂質の選択性が生じる機構はほとんどわかっていない。体液から中部絹糸腺へのカロテノイドの移行に関与する繭色遺伝子には、カロテノイドの中でもβカロテンの輸送のみに関与する *F* という遺伝子も知られていることから、*F* を同様の手法で同定し、*C* と比較することでその厳密な選択性が生じる分子機構を明らかにできれば、ヒトの体内における SR-BI などの輸送脂質の選択性についても有力な知見となることが考えられる。特に、SR-BI やその相同分子は、C 型肝炎ウイルスなどの様々な特定の病原体の認識と感染成立に関与することが近年報告されていることから、それらの知見は生体の病原体認識機構へも示唆を与え得ると期待される。

#### (7) その他

本研究に関する原著論文については現在投稿準備中である。本研究の背景等に関する和文総説 2 つと英文総説 1 つを本研究の実施期間内に執筆した。

本科学研究費の補助を受けた研究は国立感染症研究所の放射能管理室（省令室長：土田耕三）において行われたものである。ウェスタンブロッティングによる Cameo2 の発現解析は土田の協力を得た。BF1 個体の SNP 解析については農業生物資源研究所の山本・生川らと、BF1 個体とトランスジェニック個体の作出については農業生物資源研究所の飯塚・田村らとの協力のもと協同的に行った。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 2 件）

- ① 作道隆、土田耕三．繭の色はどのようにして彩られるのか．生化学（査読なし）．81（1）、27-31（2009）．
- ② 作道隆、土田耕三．体色素カロテノイドの選択的輸送を担う蛋白質．蛋白質核酸 酵素（査読なし）．53、125-131（2008）．

〔学会発表〕（計 3 件）

- ① 作道隆、飯塚哲也、生川潤子、瀬筒秀樹、桑崎誠剛、伴野豊、高田直子、藤本浩文、門野敬子、三田和英、田村俊樹、山本公

子、土田耕三．黄繭遺伝子（*C*）の分子遺伝学的解析．日本蚕糸学会第 79 回学術講演会．2009 年 3 月 22 日．東京 東京農工大学．

- ② Takashi Sakudoh、Tetsuya Iizuka, Junko Narukawa, Hideki Sezutsu, Seigo Kuwazaki, Yutaka Banno, Naoko Takada, Hirofumi Fujimoto, Keiko Kadono-Okuda, Kazuei Mita, Toshiki Tamura, Kimiko Yamamoto, Kozo Tsuchida. Positional cloning of the *Yellow cocoon (C)* gene responsible for membrane transport of carotenoids in the silkworm. 第 3 回昆虫ゲノム研究会．2009 年 3 月 11 日．神戸 理化学研究所．
- ③ 作道隆、飯塚哲也、生川潤子、瀬筒秀樹、桑崎誠剛、伴野豊、高田直子、藤本浩文、門野敬子、三田和英、田村俊樹、山本公子、土田耕三．生体色素カロテノイドの膜輸送に関与するカイコ黄繭遺伝子の分子遺伝学的解析．BMB2008（日本分子生物学会・日本生化学会 合同年会）．2008 年 12 月 12 日．神戸 ポートピアホテル．

〔図書〕（計 1 件）

- ① Takashi Sakudoh、Kozo Tsuchida. CRC Press. Transport of carotenoids by a carotenoid-binding protein in the silkworm. In: Carotenoids: Physical, Chemical, and Biological Functions and Properties, in press.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

作道隆 (SAKUDOH, Takashi)

国立感染症研究所・放射能管理室・研究官  
研究者番号：70455393

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし

##### (4) 研究協力者

土田 耕三 (TSUCHIDA, Kozo)

国立感染症研究所・放射能管理室・省令室長

研究者番号：40231435

山本 公子 (YAMAMOTO, Kimiko)

独立行政法人農業生物資源研究所・昆虫ゲノム・ユニット長

研究者番号：40370689

飯塚 哲也 (IIZUKA, Tetsuya)  
独立行政法人農業生物資源研究所・遺伝子  
組換えカイコ研究センター・主任研究官  
研究者番号：80414879