

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 17 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22770138

研究課題名（和文）カイコ繭色遺伝子を利用した選択的脂質輸送機構の分子基盤の解明

研究課題名（英文）Molecular characterization of selective lipid transport using cocoon color genes 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・主任研究官

研究者番号：70455393

研究成果の概要（和文）：体液からベータカロテンを絹糸腺細胞へ移行させる *F* 遺伝子が CD36 ファミリーに属する膜タンパク質 SCRB15 をコードすることを示した。SCRB15 はルテインを絹糸腺細胞へ移行させる *C* 遺伝子がコードする膜タンパク質 Cameo2 の相同分子でもあった。これらの分子が輸送脂質の特異性を生み出している機構を追究することは、病原体の感染成立においても重要である CD36 ファミリーが支配する選択的脂質輸送機構の解明に向けた知見を生み出すであろう。

研究成果の概要（英文）：The *F* gene, which controls the transport of beta-carotene from insect hemolymph into the silk gland, encoded SCRB15, a transmembrane protein which belongs to the CD36 superfamily. SCRB15 is paralogous to Cameo2, which is encoded by the *C* gene, which controls the transport of lutein. Elucidation of the molecular mechanisms for the difference in carotenoid specificity between SCRB15 and Cameo2 will provide mechanistic insights for the selective lipid transport by the CD36 superfamily, which is also important for the transmission of infectious pathogens.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	0	1,200,000
2011年度	1,000,000	0	1,000,000
2012年度	1,000,000	0	1,000,000
総計	3,200,000	0	3,200,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：膜輸送と輸送タンパク質、選択的脂質輸送、カロテノイド、SR-BI、CD36、カイコ

1. 研究開始当初の背景

体液リポタンパク質から脂質のみが細胞へ移行することを選択的脂質輸送という。選択的脂質輸送には SR-BI という特定の膜タンパク質が関与することが哺乳類において明らかになっていた（Acton et al., Science, 1996）が、SR-BI がリポタンパク質から脂質のみを掻き出す分子機構はほとんど不明であった。研究代表者らは鱗翅目昆虫カイコに

おいてリポタンパク質からルテインというカロテノイドを選択的に細胞へ移行させる *C* 遺伝子を同定し、それが SR-BI の相同分子 Cameo2 をコードすることを明らかにしていた。また、リポタンパク質からベータカロテンというカロテノイドを選択的に細胞へ移行させる *F* 遺伝子も Cameo2 とは別の SR-BI 相同分子 SCRB15 をコードすることを示唆するデータを得ていた。これら *C* 遺伝子や *F* 遺伝子は繭の色に影響を与える遺伝子である

ことから、繭色遺伝子と呼称されている。

2. 研究の目的

C 遺伝子と *F* 遺伝子の機能差が生まれる原因を追究することで、選択的脂質輸送において輸送脂質の特異性が生まれる分子機構を明らかにすることを目的とした。具体的な目標としては、*Cameo2* と *SCRB15* を培養細胞で機能再構成し、その再構成系において *Cameo2* と *SCRB15* のキメラ分子の機能を解析することで、輸送脂質の特異性を担う部位を同定することを想定していた。

3. 研究の方法

(1) *F* 遺伝子が *SCRB15* をコードすることについての遺伝学的証明

遺伝子構造や遺伝子発現量の解析には PCR 等の常法を用いた。

トランスジェニックの作出にはつくば市にある農業生物資源研究所のリソースを用いた。強制発現には *GAL4/UAS* システムを用いた。

(2) *C* 遺伝子および *F* 遺伝子と協調的に働く因子の解明

多系統のカイコ個体および多個体のクワコのゲノム DNA は九州大学を中核機関とするカイコのナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) から主に提供された。

(3) *Cameo2* の培養細胞における機能再構成の試み

培養細胞にはショウジョウバエ S2 細胞を用いた。

リポホリンはカイコ N4 系統の体液から超遠心機を用いて精製されたものを用いた。

4. 研究成果

(1) *F* 遺伝子が *SCRB15* をコードすることについての遺伝学的証明

F 遺伝子が *SCRB15* をコードすることは、農業生物資源研究所と協同して行った SNP マーカーを用いたマッピングの結果と、変異型である $+^F$ 対立遺伝子をホモにもつカイコ系統では *SCRB15* の発現量が著しく低下していたことから示唆されていた。しかし、 $+^F$ 対立遺伝子をホモにもつカイコ系統の種類を増やして解析したところ、系統によっては最初に解析した系統で見られたほどには発現低下が起きていなかった。そこで、まず、*F* 遺伝子が本当に *SCRB15* をコードするかについて検証を行うこととした。*SCRB15* が座位するゲノム配列上のごく近傍には、*SCRB15* のパラログが 4 つ存在した。そこで、*SCRB15* を含めた 5

つの遺伝子について組織発現分布と発育段階を追った発現量変化を解析した。その結果、*SCRB15* を含めた 3 つの遺伝子が *F* 遺伝子の有力な候補と考えられたので、その 3 つの遺伝子について $+^F$ 対立遺伝子をホモにもつカイコ系統で遺伝子構造を解析したところ、*SCRB15* でのみエキソンのひとつに大きな挿入変異が起きていることが判明した。

$+^F$ 対立遺伝子をホモにもつカイコ系統の中部絹糸腺に *SCRB15* をトランスジェニックの手法で強制発現したところ、ベータカロテンの中部絹糸腺への取り込みが観察された。このことから、当初の推定どおり *F* 遺伝子は *SCRB15* をコードするものであると結論付けた。

なお、野生型の *F* 対立遺伝子を持つ系統では *SCRB15* は中部絹糸腺の後部に局在して発現し、ベータカロテンの取り込みも後部で起こる。トランスジェニックを用いた *SCRB15* の強制発現には、中部絹糸腺の中央部から *GAL4* の発現が始まり、次第に中部絹糸腺後部でも *GAL4* が発現をするようになる *Ser1-GAL4* システムを用いた。この強制発現の際、ベータカロテンによる着色は、中部絹糸腺の中央部から起きていた (図 1)。このことは、*SCRB15* がベータカロテンの取り込みを行う際に必要とする共因子は、中部絹糸腺の後部に限局して発現するものではないことを強く示唆している。

Ser1-GAL4, UAS-SCRB15

(トランスジェニックによる強制発現個体)

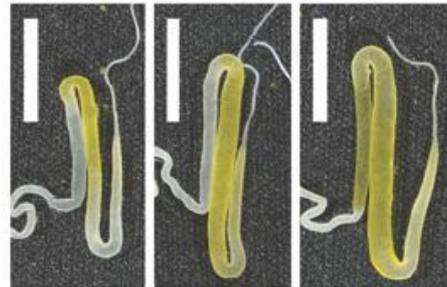


図 1 : 絹糸腺における着色部位の観察

Ser1-GAL4 システムを用いた *SCRB15* の強制発現によって、ベータカロテンによる着色はまず中部絹糸腺の中央部に見られた (一番左の図)。これは中部絹糸腺の後部からベータカロテンの取り込みが行われる野生型 *F* 対立遺伝子を持つ系統とは大きく異なる着色パターンである。時間が経過すると中部絹糸腺の後部にも着色が見られるようになった (一番右の図)。スケールバーは 1 cm。

(2) *C* 遺伝子および *F* 遺伝子と協調的に働く因子の解明

C 遺伝子および *F* 遺伝子は、*Y* 遺伝子とい

う遺伝子が存在するときのみカロテノイドの取り込みを行うことが知られていた。すなわち、*C* 遺伝子および *F* 遺伝子の機能再構成系を構築する際に *Y* 遺伝子は共発現させなければならない必須因子になる可能性があり、その同定は強く望まれるものであった。*Y* 遺伝子は細胞内のカロテノイド結合タンパク質 (Carotenoid-binding protein:CBP) をコードするであろうことを研究代表者らは過去に報告していた。しかし、*CBP* の遺伝子構造を解析したのは 4 系統に過ぎず、*Y* 遺伝子が *CBP* をコードすると結論付けるのには、より多くの系統を用いた解析が必要と思われた。

そこで、25 系統のカイコを用いて *CBP* の遺伝子構造と *Y* 遺伝子との関係を調べた。野生型の *Y* 対立遺伝子を持つ系統では、*CBP* 遺伝子のゲノム DNA 中のコピー数が系統によって 3~20 と大きく異なっていた。そのコピーの中には、*CBP* タンパク質を発現すると思われる遺伝子構造がそれぞれの系統につき 1 つは必ず含まれていた。一方、変異型の *Y* 対立遺伝子をホモに持つ系統では、ゲノム DNA 中の *CBP* 遺伝子のコピー数が系統によらず 1 であった。その遺伝子構造はいずれもエキソンにおいて大きな欠失が生じているものであり、*CBP* タンパク質を発現することが考えられないものであった。カイコの推定祖先野生種であるクワコにおける *CBP* 遺伝子のゲノム DNA 中のコピー数が個体によらず 1 であり、ほとんどの場合その遺伝子構造は *CBP* タンパク質を発現することが予測されるものであったことから、*CBP* の遺伝子構造はカイコの家畜化の過程で大きく変化したものと推測された。

以上の結果は、*C* 遺伝子および *F* 遺伝子の機能再構成系を構築する際に必要になることが想定される *Y* 遺伝子が *CBP* をコードすることについてのさらなる証拠となるものである。また、比較的短期間の進化現象である家畜化において、大きなゲノム構造の変化が起こり得ることを示してもいる。

Y 遺伝子以外にも、共因子として必要になることが想定され得るある遺伝子について同定に向けた解析を行った。

(3) Cameo2 の培養細胞における機能再構成の試み

ショウジョウバエの S2 細胞に Cameo2 と *CBP* を共発現させ、培養液にカイコの体液から精製したリポタンパク質 (リポホリン) を加えたところ、S2 細胞へのルテインの取り込みが観察された。Cameo2 のみの発現では取り込みは見られなかった。しかし、この取り込みが *CBP* のみで生じたものである可能性を現時点では否定できない。再構成系の確立のためには、さらなる追加実験が必要である。

本研究では、*SCRB15* の機能再構成についてはまだ成功していない。すなわち、当初の目標であった Cameo2 と *SCRB15* のキメラ分子の解析には到達していないが、その解析に向けて必要となり得る多くの知見を得ることができた。(1)については2013年にJournal of Lipid Research誌に、(2)については2011年にGenetics誌に論文報告した。(3)については論文発表は行っていないが、2012年に蚕糸・昆虫機能利用学術講演会で学会発表がなされた。

SR-BI や Cameo2 や *SCRB15* が属する CD36 ファミリーは、脂質輸送を支配する因子であると同時に、多くの病原体の感染成立において決定的な役割を担うことが報告されている因子でもある。CD36 ファミリーには他にも多様な機能が報告されている。CD36 ファミリーの分子作用機序を解明することは医学的にも重要である。本研究課題が解明しようとしていた謎 選択的脂質輸送において輸送脂質の特異性が生まれる分子機構 は、研究代表者が知る限り現時点でも解明の報告はなされていない。今後も追究すべきことであると考える。

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)

Sakudoh T, Nakashima T, Kuroki Y, Fujiyama A, Kohara Y, Honda N, Fujimoto H, Shimada T, Nakagaki M, Banno Y, Tsuchida K. Diversity in copy number and structure of a silkworm morphogenetic gene as a result of domestication. Genetics. 187(3), 965-76 (2011).
doi: 10.1534/genetics.110.124982.

Sakudoh T, Kuwazaki S, Iizuka T, Narukawa J, Yamamoto K, Uchino K, Sezutsu H, Banno Y, Tsuchida K. CD36 homolog divergence is responsible for the selectivity of carotenoid species migration to the silk gland of the silkworm *Bombyx mori*. Journal of Lipid Research. 54(2), 482-95 (2013).
doi: 10.1194/jlr.M032771.

[学会発表](計6件)

作道 隆, 中島 健陽, 嶋田 透, 伴野 豊, 中島 裕美子, 中垣 雅雄, 高田 直子, 藤本 浩文, 土田 耕三. 蘭色を支配するカロテノイド結合タンパク質の遺伝子構造は家畜化の過程で大きく多様化した.

第 80 回蚕糸・昆虫機能学術講演会。2010 年 4 月 3 日。長野 信州大学。

Sakudoh T. Molecular genetic analysis of carotenoid pigmentation in silkworm cocoons. Silkworm Genome Unofficial "KARAOKE" Meeting(有志によるカイコゲノム関連研究集会)。2010 年 11 月 10 日。茨城 デイズタウン。

Sakudoh T, Tsuchida K. Molecular dissection of carotenoid transport system using silkworm mutants defective in cocoon coloration. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会(BMB2010)。2010 年 12 月 07 日。兵庫 神戸国際展示場。

作道 隆, 飯塚 哲也, 内野 恵郎, 瀬筒 秀樹, 桑崎 誠剛, 生川 潤子, 山本 公子, 伴野 豊, 本田 尚子, 藤本 浩文, 土田 耕三. クラス B スカベンジャー受容体相同遺伝子の強制発現による繭の着色. 第 80 回蚕糸・昆虫機能利用学術講演会。2012 年 3 月 18 日。福岡 九州大学。

永山 春菜, 作道 隆, 湯浅 正志, 横山 洋, 本田 尚子, 藤本 浩文, 岩野 秀俊, 土田 耕三. Cameo2 と CBP 発現 S2 細胞によるルテインの取り込み. 第 80 回蚕糸・昆虫機能利用学術講演会。2012 年 3 月 18 日。福岡 九州大学。

作道 隆, 中島 健陽, 伴野 豊, 土田 耕三. 繭色遺伝子 CBP の家畜化による構造多様化. 新学術領域研究「複合適応形質進化の遺伝子基盤解明」平成 24 年度公開シンポジウム。2012 年 9 月 26 日。東京 東京大学。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

特になし

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・主任研究官

研究者番号：70455393

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし