

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19580061
 研究課題名（和文）カイコガ純系系統 P50 を用いた RNAi の確立、及び鱗翅目昆虫全般への応用
 研究課題名（英文）Establishment of RNAi methodology to Bombyx mori strain P50 and application for lepidopteran insects
 研究代表者
 大西 敦（OHNISHI ATSUSHI）
 独立行政法人理化学研究所・松本分子昆虫学研究室・協力研究員
 研究者番号：50342762

研究成果の概要：

チョウ目（鱗翅目）昆虫での RNA 干渉（RNAi）法の確立を目指し、カイコガ純系系統 P50 を用いて RNAi 効果の検証を行った。その結果、性フェロモン産生器官であるフェロモン腺で発現する遺伝子に対して、RNAi は効果的に作用することが確認できた。カイコガ性フェロモン（ボンビコール）産生メカニズムに関与する機能分子の機能解析に RNAi を利用した結果、lipase、Perilipin、FATP を含む新規 8 遺伝子がボンビコール産生に関与することが示された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：昆虫生理学、応用昆虫学、生化学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：性フェロモン、ボンビコール、カイコガ、RNAi、フェロモン腺、
lipase perilipin、FATP

1. 研究開始当初の背景

RNA 干渉（RNAi）は、細胞に二本鎖 RNA（dsRNA）を導入した場合、相同配列をもつ遺伝子の発現抑制が生じる現象であり、哺乳類だけでなく、単細胞菌類、線虫、植物など広範囲にわたる生物種において普遍的に保存されているシステムである。RNAi は煩雑な操作が必要なく、標的遺伝子の塩基配列さえ分かれば dsRNA が合成でき、それを細胞へ導入することにより狙った遺伝子の働きだけを抑制し、その遺伝子の機能解析を行うことができる。現在、生命科学分野の研究におい

ては一般的手法になりつつあり、病気に関連する遺伝子を発現抑制すれば治療につながると期待されている。また 2006 年のノーベル医学生理学賞のテーマであり、非常に注目されている分野の 1 つである。

昆虫においても、キイロショウジョウバエ（ハエ目）、コクヌストモドキ（コウチュウ目）ではその手法が確立されており、RNAi を用いた機能抑制により表現形の違いが観察できる。さらに近年バッタ目、ゴキブリ目などにおいても広くその効果が実証され、発生、分

化のメカニズム解明に利用されている。しかしながら現在まで、チョウ目(鱗翅目)昆虫ではその成功例がほとんど報告されていなかった。

2. 研究の目的

脱皮、変態、さらには休眠といった昆虫特有の生理現象、それを制御するホルモンの解明には、多種のチョウ目昆虫が利用されており、そこから生理学的、生化学的、分子生物学的な知見が数多く得られている。その中でも特に、蚕糸業が盛んであった日本では古くからカイコガが用いられており、その知見や実験技法の蓄積から昆虫生理学においてはモデル生物としての地位を確立している。また近年はカイコガゲノムプロジェクトにより、その遺伝子情報が豊富に蓄積されており、カイコガ遺伝子情報データベース(KAIKObase、Silkbase、カイコガ完全長cDNAESTデータベースなど)から目的遺伝子の塩基配列を簡単に知ることができる。このように多種、多様なツールが揃っているカイコガへのRNAiの導入方法の確立は急務である。カイコガへのRNAi法の確立、さらにはチョウ目昆虫全般への応用を目的とし研究を進めた。

(1) カイコガ純系系統P50のフェロモン腺ではRNAiが効果的に作用することが分かっており、それを利用して5種類のフェロモン腺特異的遺伝子(*pgACBP*, *mgACBP*, *Bmpgdesat1*, *pgFAR*, *PBANR*)がボンビコール産生に関与することを我々は実証している(Ohnishi et al., 2006)。そこでボンビコール産生メカニズムに関与する新規機能分子を探索するために、RNAiをスクリーニング方法として利用し、ボンビコール産生メカニズムの解明を進めた。

(2) カイコガには多種多様な系統が存在し、

研究室によって使用する系統は異なるのが現状である。系統依存的に、大きさ、形など表現形は様々であることから、あらゆる遺伝子において系統間で塩基配列の差があると予想される。そこで、我々が既に純系系統P50のフェロモン腺において、その効果が実証済みである5種類のフェロモン腺特異的遺伝子(*pgACBP*, *mgACBP*, *Bmpgdesat1*, *pgFAR*, *PBANR*)を交雑系統(秋光×竜白)から獲得を試みた。各遺伝子の塩基配列決定後、交雑系統の塩基配列を基に作成した合成dsRNAが同系統の標的遺伝子に作用するか否か、さらにはP50、交雑系統間で標的遺伝子が相互応答するのかが確認し、塩基配列の違いが系統特異的なRNAi効果の違いに繋がるのか検討した。

3. 研究の方法

RNAiの誘導には2つの方法がある。1つは合成dsRNAを用いた導入、もう1つは発現プラスミドを用いる導入方法である。それぞれに利点があり、合成dsRNAを用いる導入方法は、標的遺伝子の塩基配列が既知であればPCR、RNA合成酵素の組み合わせにより簡単にdsRNAが作成でき、その効果も短期間で確認できるが一過性のサイレンシングである。一方、発現プラスミドを用いた導入方法では、プラスミドの構築に時間が掛かるが、継続的なサイレンシングが可能である。今回は、カイコガ純系系統P50において、組織、発生段階、遺伝子の種類による違いでのRNAi効果の確認が目的であるため、多検体のdsRNAの合成、導入が容易かつ短期間で結果が得られる合成dsRNAを用いたRNAi導入法を選択した。

(1) カイコガ遺伝子情報データベースにおいて、フェロモン腺での発現が他組織の発現よりも高いと予想されるクローンを選択し、

様々なカイコガ成虫の組織(フェロモン腺、脳、飛翔筋、卵、マルピーギ管、脂肪体、中腸)から調製した total RNA を用いて RT-PCR を行い、実際にフェロモン腺での発現量が他組織よりも高い、及びフェロモン腺で特異的に発現する 25 クローンに絞った。25 クローンについてそれぞれ dsRNA 注射による RNAi で発現抑制することにより、ボンビコール産生量に注目した。ボンビコール産生量が顕著に減少したクローンについてはさらに機能解析を行った。

(2) フェロモン腺で特異的に発現する遺伝子の中でも特に RNAi 効果が顕著に観察できた *Bmpgdesat1*、*pgFAR* を交雑系統(秋光×竜白)から獲得し全長塩基配列を決定し、P50 の塩基配列と比較した。各遺伝子の塩基配列決定後、交雑系統の塩基配列を基に作成した合成 dsRNA が交雑系統の標的遺伝子に作用するか否か、さらには P50、交雑系統の標的遺伝子が異系統間で相互応答するのかを確認し、塩基配列の違いが系統特異的な RNAi 効果の差に繋がるのか検討した。

4. 研究成果

(1) カイコガフェロモン腺で発現する遺伝子に対して RNAi 法は有効に利用でき、これまでにカイコガ性フェロモン(ボンビコール)産生に関与する不飽和化酵素(*Bmpgdesat1*)、還元酵素(*pgFAR*)などについて我々は機能解析を行ってきた。カイコガ性フェロモンであるボンビコールは神経ホルモン PBAN によってその産生が調節されている。フェロモン腺細胞内で *de novo* に生合成されたボンビコール前駆体は、フェロモン腺細胞内の脂肪滴にトリアシルグリセロールの形で蓄積され、PBAN のシグナルによりボンビコールの産生、体外への放出が開始する。今回ボンビコール産生に関与する新規機能

分子の探索に RNAi をスクリーニング方法として用いた結果、*lipase (Bmlipase3)*、*perilipin (Bmperilipin)*、*fatty acid transport protein (BmFATP)* を含む 8 遺伝子をそれぞれ発現抑制することによりボンビコール産生量の顕著な減少が確認できた。以上のことから、これら 8 遺伝子はボンビコール産生メカニズムへの関与が示される。さらに *Bmlipase3*、*Bmperilipin*、*BmFATP* については、RNAi による発現抑制からその機能解析を行った。その結果、*Bmlipase3* は PBAN シグナルによる脂肪滴内 TG からボンビコール前駆体の切り出しに、*Bmperilipin* は脂肪滴膜上に局在し自身のリン酸化を介した産生メカニズムの調節に、*BmFATP* は細胞外脂肪酸のフェロモン腺細胞内への取り込み、さらに脂肪酸のアシル CoA への変換に作用し、ボンビコール前駆体の貯蔵体である脂肪滴の形成を促進することにより、ボンビコール産生メカニズムに関与することが示唆された。以上の結果から、少なくともフェロモン腺で発現する遺伝子に関しては、RNAi が有効に利用できることが示された。

(2) P50 のフェロモン腺を用いた RNAi で効果的に機能抑制できた 5 種のフェロモン腺特異的遺伝子から最も顕著にボンビコール産生を抑制する *Bmpgdesat1*、*pgFAR* について交雑系統(秋光×竜白)からクローニングし、塩基配列を決定した。P50、交雑系統間で *Bmpgdesat1* は 95.7%、*pgFAR* では 98.7% の塩基配列の相同性を示し、アミノ酸配列ではそれぞれ 90.1%、97.7% の相同性を示した。さらに P50 の塩基配列を基に合成した dsRNA の注射は交雑系統では、標的遺伝子の発現抑制をしなかった。さらに交雑系統の塩基配列を基に合成した dsRNA の注射も P50 の標的遺伝子の発現抑制をしなかった。以上の結果から、同種のタンパク質をコードする遺伝子でも

カイコガの系統間で塩基配列が多少相違しており、この塩基配列の違いが RNAi 効果に大きく影響すると予想される。カイコガゲノム情報は、主にカイコガ純系系統 P50 から作成されているので、P50 を使用することによりカイコガでの RNAi 法が効果的に確立できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Takahashi, S., Hasumi, K., Ohnishi, A., Koshino, H., & Matsumoto, S. (2007) Synthesis and biological activities of analogs of D-glucosyl-L-tyrosine, a humoral factor that stimulates transcription of the acyl-CoA binding protein in the pheromone gland of the silkworm, *Bombyx mori*. *Bioorg. Med. Chem.* **15**, 97-103, 査読有り
- ② Fujii, T., Suzuki, G. M., Kawai, T., Tsuneizumi, K., Ohnishi, A., Kurihara, M., Matsumoto, S., & Ando, T. (2007) Determination of the pheromone producing region that has epoxidation activity in the abdominal tip of the Japanese giant looper, *Ascotis selenaria cretacea* (Lepidoptera: Geometridae). *J. Insect Physiol.* **53**, 312-318, 査読有り
- ③ Kawai, T., Ohnishi, A., Suzuki, G. M., Fujii, T., Matsuoka, K., Kato, I., Matsumoto, S., & Ando, T. (2007) Identification of a unique pheromonotropic neuropeptide including double FXPR motifs from a geometrid species, *Ascotis selenaria cretacea*, which produces an epoxyalkenyl sex

pheromone. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **37**, 330-337, 査読有り

- ④ Matsumoto, S., Hull, J. J., Ohnishi, A., Moto, K., & Fonagy, A. (2007) Molecular mechanisms underlying sex pheromone production in the silkworm, *Bombyx mori*: characterization of the molecular components involved in bombykol biosynthesis. *J. Insect Physiol.* **53**, 752-759, 査読有り
- ⑤ Ohnishi, A., Hashimoto, K., Imai, K., and Matsumoto, S. (2009) Functional characterization of the *Bombyx mori* fatty acid transport protein (BmFATP) within the silkworm pheromone gland. *J. Biol. Chem.* **284**, 5128-5136, 査読有り
- ⑥ Matsumoto, S., J. Joe Hull., & Ohnishi, A. (2009) Molecular mechanisms underlying PBAN signaling in the silkworm, *Bombyx mori*. *Ann. NY Acad. Sci.* 1163 464-468, 査読無し

[学会発表] (計 11 件)

(国際会議)

- ① Ohnishi, A., & Matsumoto, S. Isolation and characterization of intracellular proteins that are phosphorylated in response to PBAN stimulation. 4th Asia-Pacific Conference on Chemical Ecology, 2007, 9, Tsukuba.
- ② Kawai, T., Ohnishi, A., Matsumoto, S., & Ando, T. Determination of the PBAN receptor (PBANR) in the Japanese giant looper *Ascotis selenaria cretacea* which produces an epoxyalkenyl sex pheromone. 4th Asia-Pacific Conference on Chemical Ecology, 2007, 9, Tsukuba.

- ③ Matsumoto S., Hull J. J., and Ohnishi A.

Molecular mechanisms underlying PBAN signaling in the silkworm, *Bombyx mori*.
24th European Conference of European Comparative Endocrinologists, 2008, 9, Genoa, Italy.

(国内会議)

- ① 大西敦・松本正吾

PBAN 刺激によりリン酸化を受けるタンパク質の単離、同定
日本農芸化学会平成 19 年度大会、2007 年 3 月 25 日、東京

- ② 橋本佳奈・大西敦・本賢一・今井清博・松本正吾

カイコガフェロモン腺特異的遺伝子の検索と機能解析
日本農芸化学会平成 19 年度大会、2007 年 3 月 25 日、東京

- ③ 河合岳志・大西敦・藤井毅・鈴木雅京・松本正吾・安藤哲

シヤクガ科昆虫のフェロモン生合成活性化神経ペプチドに関する研究
日本農芸化学会平成 19 年度大会、2007 年 3 月 25 日、東京

- ④ 大西敦・松本正吾

RNAi 法を用いたカイコガフェロモン腺特異的遺伝子の機能解析
バイオアーキテクトシンポジウム 2007、2007 年 9 月 11 日、和光

- ⑤ 大西敦・橋本佳奈・今井清博・松本正吾
ボンビコール生合成経路に関するリパーゼの解析

日本農芸化学会平成 20 年度大会、2008 年 3 月 28 日、名古屋

- ⑥ 大西敦・橋本佳奈・今井清博・松本正吾

カイコガフェロモン腺で発現する脂肪酸輸送タンパク質 (FATP) の機能解析

日本農芸化学会平成 21 年度大会、2009 年 3 月 29 日、福岡

- ⑦ 加治美里・大西敦・松本正吾

カイコガフェロモン腺発現遺伝子が脂肪滴の形成・分解に与える影響
日本農芸化学会平成 21 年度大会、2009 年 3 月 29 日、福岡

- ⑧ 李載暎、J. Joe Hull、本賢一、大西敦、永田宏次、長澤寛道、松本正吾

カイコガ PBAN 受容体 (PBANR) アイソフォームの同定とその遺伝子発現解析
日本農芸化学会平成 21 年度大会、2009 年 3 月 29 日、福岡

[図書] (計 2 件)

- ① 松本正吾・大西敦・本賢一、J. Joe Hull

昆虫の配偶行動と性フェロモン産生
蛋白質核酸酵素増刊ケミカルバイオロジー 共立出版 Vol. 52 No. 13 1679-1684 (2007)

- ② 大西敦

第三章-昆虫は化学の力で恋をする
入門ケミカルバイオロジー オーム社 47-63 (2008)

6. 研究組織

- (1) 研究代表者

大西 敦 (OHNISHI ATSUSHI)
独立行政法人理化学研究所・松本分子昆虫学研究室・協力研究員
研究者番号：50342762

- (2) 研究協力者

松本 正吾 (MATSUMOTO SHOGO)
独立行政法人理化学研究所・松本分子昆虫学研究室・主任研究員
研究者番号：60134516
阿津澤 新二 (ATSUSAWA SHINJI)
独立行政法人理化学研究所・松本分子昆虫学研究室・前任技師

栗原 政明 (KURIHARA MASAOKI)

独立行政法人理化学研究所・松本分子昆虫
学研究室・前任技師

橋本 佳奈 (HASHIMOTO KANA)

法政大学・大学院工学研究科・物質化学専
攻・修士課程

加治 美里 (KAJI MISATO)

埼玉大学・大学院理工学研究科・生命科学
系専攻・博士前期課程