

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 24 年 6 月 18 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21380045

研究課題名（和文）カイコの繭を彩るカロテノイドの搬送システムの分子機構解明と応用

研究課題名（英文）Molecular Mechanism of selective transport for carotenoid in the silkworm, *Bombyx mori*.

研究代表者

土田耕三 (TSUCHIDA KOZO)

国立感染症研究所・放射能管理室・室長

研究者番号：40231435

研究成果の概要（和文）：血液リポタンパク質から特定の脂質のみを受け取る、組織の選択的取り込みのメカニズムを明らかにした。カイコには、中部絹糸腺にルテインまたはベータカロテンのみを取り込む選択性を示す突然変異体があり、これらは繭の色に明確な表現型を示す。前者は黄色の繭、後者は肉色の繭を作る。これらの遺伝子の分子実体をトランスジェニック法等により明らかにした。その結果、カロテノイド選択的取り込みはリポホリンレセプターである SR-BI に属するパラログによって支配され、リポホリンからルテインとβ-カロテンを識別して取り込みを行うメカニズムを明らかにした。本研究は、同一ファミリーに属するタンパク質のパラログによって異なるカロテノイドを認識することを明らかにした最初の研究となった。

研究成果の概要（英文）：

The silkworm, *Bombyx mori* provides very clear examples of tissue-specific delivery for certain carotenoid species from the midgut lumen to the silk gland via hemolymph lipoprotein, lipophorin. Lipophorin contains lutein and beta-carotene as a complex mixture of lipids in the hydrophobic core. The yellow (*C*) or flesh color cocoon (*F*) mutants accumulate lutein or beta-carotene in the middle silk gland from lipophorin, respectively. We have reported that the *C* gene encodes *Cameo2*, a member of CD36 gene family which has been known to function as a lutein specific transporter and transmembrane non-internalizing lipophorin receptor in the middle silk gland. The nature of the *F* gene was defined by positional cloning and transgenic rescue experiments with the binary GAL4-UAS expression system. The *F* gene encodes *SCRB15*, a paralog of *Cameo2* with 26% amino acid identity. *SCRB15* may be responsible for beta-carotene specific non-internalizing lipophorin receptor. In the *F* mutant, *SCRB15* is not expressed because the mRNA structure of *SCRB15* is severely disrupted due to a 1.4 kb insertion in a coding exon. This finding that both *C* and *F* genes encode CD36 homologs raises questions how CD36-homolog proteins recognize the difference of carotenoid species which permits to uptake the middle silk gland from lipophorin.

We believe the molecular machineries are for delivery of specific lipids from lipophorin to target tissues. Furthermore, functional coordination of transmembrane lipoprotein receptors and intracellular lipid-binding proteins has been proposed to achieve the selective cellular transport from HDL for general lipids, such as cholesteryl ester and fatty acids. Thus, our data also provide genetic evidence for this general mechanism in lipid biology.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	7,900,000	600,000	8,500,000
2010 年度	3,600,000	450,000	4,050,000
2011 年度	3,600,000	300,000	3,900,000
総計	15,100,000	1,350,000	16,450,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用昆虫学

キーワード：カロテノイド、脂質の選択的輸送、CD36, SR-BI, リポホリン、カイコ

1. 研究開始当初の背景

前置研究として、我々は、カロテノイドの搬送に関与する因子の一つとしてカロテノイド結合タンパク質 (Carotenoid-binding protein: CBP) を世界に先駆けて発見し、このタンパク質は、カロテノイドの細胞内搬送に機能することを明らかにした。この研究の中で、昆虫の細胞がカロテノイドを取り込む際、ルテインを取り込む細胞、 β -カロテンを取り込む細胞等、取り込みにカロテノイドの種類を限定する選択性のあることを見出していた。カロテノイドによる体色は天敵による攻撃をかわす役割を持つことから、カロテノイドを的確に皮膚に搬送することは、昆虫の生存戦略にとって重要な因子であるといえる。

生命現象の分子機構の解明には、適切なモデル生物の選択と、その生命現象に関わる突然変異体の取得が重要である。カイコには、カロテノイドの中腸での吸収や、中腸細胞の透過、体液を介して絹糸腺という絹を作る器官まで搬送するなかで、その一部や複数個所に現れる突然変異体があり、それらの遺伝子座が多数同定されている。我々が発見したCBPは、それらの遺伝子座の一つである黄血遺伝子 (*Yellow blood: Y*) と相同であり、CBP は中腸細胞質と中部絹糸腺細胞質のカロテノイド搬送を担うことがわかった。しかしながら、特定のカロテノイドが、体液リポタンパク質から選択的に取り込まれるメカニズムは明らかではなかった。

2. 研究の目的

カイコにおいては、黄血や黄繭、肉繭を決定する遺伝子が突然変異体として残っている。これらの遺伝子はカロテノイドの搬送に機能し、カロテノイド細胞取り込みにおける選択性や取り込み

量等を規制するマシナリーの一部を形成していると考えられる。我々は、これまで知られているカイコの繭色を支配する遺伝子座を包括的に同定し、生体内カロテノイド搬送を支配する分子機構の解明を大きく進め、中部絹糸腺細胞へカロテノイドの1種であるルテインの取り込みにかかわる黄色繭遺伝子 (*Yellow Cocoon, C*)、 β カロテンの選択的取り込みに関与する肉色繭遺伝子 (*Flesh: F*)、また、これらの遺伝子を培養細胞に発現させ、機能の再構成系を構築する。

3. 研究の方法

(1) ポジショナルクローニングによる繭色遺伝子の同定

SNP マーカーを用いたポジショナルクローニングによって *C*, *F* の座位する領域を絞り込む。この範囲に存在する候補遺伝子を検索し、対立遺伝子による発現差や遺伝子配列の違いがあるかどうか調べる。これによって絞り込んだ候補遺伝子をトランスジェニックの手法でカイコに導入し、表現型の復帰が起こるかどうか検討する。

(2) 同定した遺伝子の培養細胞への導入

同定した遺伝子を培養細胞に遺伝子導入し、機能的な再構成系の構築を試みる。

4. 研究成果

(1) 黄繭遺伝子 (*Yellow cocoon, C* 遺伝子) の分子実体

C 遺伝子は、SNP マーカーを用いたポジショナルクローニング法によって遺伝子実体の候補を探索した結果、第12番染色体の375kbの範囲まで絞り込み、その範囲には12個の遺伝子が予測された。12個の遺伝子の中で、細胞膜貫通タンパク質をコードする遺伝子に絞ったと

ころ、二回膜貫通型タンパク質が存在した。この遺伝子は、ノーザン解析の結果が示すように、ルテインを中部絹糸腺にほとんど取り込まない^C系統の中部絹糸腺では発現量が著しく抑えられていた。この遺伝子が、*C* 遺伝子の有力な候補遺伝子と考え機能解析を行った。*C* 遺伝子の対立遺伝子(劣性)^cをホモに持つ個体に、この遺伝子を強制発現させたトランスジェニックカイコは、白繭から黄繭に復帰した。すなわち、この遺伝子が、*C* 遺伝子の表現型を復帰させたことから、生理機能の面からも *C* 遺伝子の分子実体であることが証明できた。トランスジェニック個体も中部絹糸腺と繭を観察したところ、カロテノイドを取り込まない元系統に比べて、*Cameo2* を強制発現させた *Ser1-Gal4*、*UAS-Cameo2* を共に持つ個体では、カロテノイドの取り込みにより、中部絹糸腺と繭が着色しているのが明瞭に観察された。中部絹糸腺と繭からカロテノイドを抽出し、分析したところ、*Cameo2* を強制発現させた場合は、*C* 遺伝子を持つ場合と同様にルテインが選択的に取り込まれていることが分かった。遺伝子の塩基配列解析の結果、哺乳類の高密度リポタンパク質 (High-Density Lipoprotein, HDL) のレセプターであるスカベンジャーレセプタークラス B タイプ I (SR-BI) と相同のタンパク質で、2 回膜を貫通し細胞外にループを作る構造をとることが考えられた。

以上のことから、この遺伝子産物であるタンパク質は、中部絹糸腺細胞膜上の存在しリポホリンレセプターとして機能し、体液リポホリンからルテインの細胞内に取り込みにも貢献すると考えられる。*C* 遺伝子の対立遺伝子、劣性^cがホモの場合、中部絹糸腺における *Cameo2* mRNA の発現が抑制されており、このため中部絹糸腺でルテインの取り込みがなく、繭層は白くなる。*C* 遺伝子の分子実体を、*Cameo2*(*C* locus associated membrane protein homologous to

amammalian HDL receptor-2)と命名した。

(2) 肉繭遺伝子 (*Flesh color cocoon*, *F* 遺伝子)

F 遺伝子についても、ポジショナルクローニングを行い、第6番染色体の499kbの範囲まで絞り込み、その範囲には26個の遺伝子が予測された。その中で、*Cameo2* のパラログである Scavenger receptor class B member 15 (SCRIB15) が存在した。SCRIB15 は、βカロテンを絹糸腺にほとんど取り込まない^F系統の遺伝子構造において、エキソンの1つに1.4 kbの挿入が見られ、この結果、このエキソンを含まない形の mRNA と挿入を含む形での mRNA が^Fでは作られ、*F*と同じ mRNA は作られなくなっていた。このことから、SCRIB15 は、*F* 遺伝子の有力な候補遺伝子と考えられた。*F* 遺伝子が、SCRIB15 をコードしていることを機能的に実証することを目的とし、中部絹糸腺に SCRIB15 をトランスジェニックの手法で強制発現させ、中部絹糸腺へのカロテノイドの取り込み量の変化を観察した。の交配の結果生まれた個体を解析した。

絹糸腺を観察したところ、カロテノイドを取り込まない元系統に比べて、SCRIB15 を強制発現させた個体では、カロテノイドの取り込みにより絹糸腺が着色しているのが観察された。このカイコの中中部絹糸腺からカロテノイドを抽出し、逆相カラムを用いた HPLC で分析したところ、SCRIB15 を強制発現させた場合は *F* 遺伝子を持つ場合と同様に βカロテンが中部絹糸腺に選択的に取り込まれていることが分かった。続いてトランスジェニック個体が作った繭を観察したところ、カロテノイドを取り込まない元系統に比べて、SCRIB15 を強制発現させた個体では、カロテノイドの取り込みにより繭が着色しているのが明瞭に観察された。繭からカロテノイドを抽出し、分析したところ、中部絹糸腺の場合と

同様に、SCRB15を強制発現させた場合は*F*遺伝子を持つ場合と同様にβカロテンが選択的に取り込まれていることが分った。

(3) *C*遺伝子、*Cameo2*と*F*遺伝子、SCRB15の機能解析法の開発

カイコ *Cameo2*とSCRB15は、カロテノイドの選択輸送を担うタンパク質であり、しかも、これらタンパク質はSR-BIと相同であることから、タンパク質構造を比較することや相互タンパク質の部位を組み合わせたキメラタンパク質を作製してカロテノイドの取り込みを調べることで、ルテインまたはβ-カロテンを認識するタンパク質構造の解明に結びつく可能性がある。

Cameo2、SCRB15をショウジョウバエS2細胞に導入し、それぞれのタンパク質を合成する細胞を作製し、これを用いて、細胞内発現したタンパク質によるカロテノイドの選択的取り込みを調べることができる実験系を構築することにした。*Cameo2*、CBPを共発現したS2細胞は、培地中に添加したリポホリンからルテインを取り込むことが確認された。この結果は、*Cameo2*、リポホリン、CBP等がカロテノイドの輸送に必須であることを示唆していた。

また、カイコ *Cameo2*とSCRB15の点突然変異や2つの遺伝子からの一部分を組み合わせたキメラ遺伝子を作製し、S2細胞で発現させることによりルテインまたはβ-カロテンを認識し、選択的取り込みに貢献するタンパク質の部位を明らかにできると考えられる。

(4) アスタキサンチン添加飼料による赤繭の作成

アスタキサンチンは、藻類や、多くの海産物、鮭の筋肉、エビやカニの甲羅に含まれ、鮮やかな赤い色を呈する。本研究では、富士化学工業株式会社のヘマトコッカス藻カロテノイド粗抽出物であるアスタリールおよびヘマトコッカス藻の

乾燥粉末を人工試料に添加し、カイコに食べさせ、体液、中部絹糸腺や繭の色を観察し、カロテノイドを定性、定量を行った。

人工飼料にアスタリールを添加した人工飼料で5齢幼虫を飼育した。幼虫体色、リポホリン、体液、絹糸腺、繭の色を観察したところ、アスタリール添加区では赤くなり、無添加区では黄色くなった。リポホリンのカロテノイドを抽出しHPLCで分析を行うと、無添加区のリポホリンには、ルテインが多量に含まれていることが分かり、アスタリール添加区ではアスタキサンチンがルテインとほぼ同量が見つかった。繭のカロテノイドを抽出、HPLC分析を行うと、無添加区ではルテインの集積がみられ、アスタリールを添加区では、アスタキサンチンが集積していた。

以上の結果は、CBP、*Cameo2*やSCRB15がルテインやβカロテンばかりでなく、桑葉には存在しないアスタキサンチンも搬送できる能力を持ち、赤い繭を作ることが分った。

(5) まとめ

カイコ突然変異体を利用し、カロテノイドの輸送に関わる分子を明らかにした。カロテノイド結合タンパク質(CBP)は、細胞内にある可溶性のタンパク質であり、カロテノイドの細胞質内搬送に機能するタンパク質であることを明らかにし、黄血遺伝子(*Y*)の分子実体であることがわかった。*C*遺伝子は、*Cameo2*をコードし、リポホリンからルテインを細胞内に取り込むため、黄色い繭を作り、ヒトスカベンジャー受容体クラスBタイプI(SR-BI)と相同であった。

*F*遺伝子は、肉色(Flesh)の繭を作り、絹糸にはβ-カロテンが多く含まれている。この*F*遺伝子の分子実体は、*C*遺伝子と同じリポタンパク質レセプターSR-BIの相同タンパク質であった。*C*と*F*遺伝子のコードするレセプターは、部分的にアミノ酸の配列が異なり、この違いのある部分が、細胞内に取り込むカロテノイドを選別し、

ルテインあるいはβ-カロテンかを決めているものと考えられる。C 遺伝子と F 遺伝子は、細胞膜に存在するリポホリンレセプターとして機能し、体液からカロテノイドを選択して細胞内に取り込み、Y 遺伝子は、細胞内に入ってきたカロテノイドを結合して細胞質内を搬送するタンパク質である。これらは、連携してカロテノイドの搬送に寄与していることがわかった。

カイコのカロテノイド搬送の突然変異体群は蚕糸業の長い継代の歴史の中で見出されたものであり、絹王国と呼ばれた日本ならではの遺伝子資源である。本研究は、カイコのカロテノイドの搬送系に異常が生じた突然変異体の原因遺伝子を分子生物学的方法でつきとめることで、その搬送システムに関わる分子を同定する手法を採用してきた。カロテノイドの生体内搬送システムの研究は、他にほとんどなく、本研究は、カロテノイド搬送研究の基盤を構築し研究を先導するものである。さらに、加齢黄斑変性症で注目される黄斑には、カロテノイドが集積する機構を持っていると考えられ、これらの解明は申請者の研究を参考に行われている。医学上からも、本研究は注目を集め、蚕糸業上からも、本研究はカイコが吐く絹の色を自在に変える技術の開発にも繋がり、新たな繊維産業を生み出す可能性を持った研究といえる。

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 14 件)

- ① Tsuchida K. (著者 12, 12 番) 査読有
Possible overestimation of the effect of acetylation on the lysine residue employing the KQ mutant analysis. *J. Computational Chem.* **33**: 239–246, 2012. DOI:10.1128/AEM.00142-12
- ② Tsuchida K. (著者 9, 8 番) 査読有
Molecular Evolution of mariner-like elements in the genus *Drosophila*: The *obscura* species group. *J. Insect Biotech. Sericol.* In Press.

- ③ Sezutsu H. (著者 8, 5 番) 査読有
SID-1 protein of *Caenorhabditis elegans* mediates uptake of dsRNA into *Bombyx mori* cell. *Insect Biochem Mol Biol*, **42**, 148–154, 2012.
- ④ Tsuchida K. (著者 12, 12 番) 査読有
Diversity in copy number and structure of a silkworm morphogenetic gene as result of domestication, *Genetics*, **187**, 965–976, 2011.
- ⑤ Sezutsu H. (著者 12, 4 番) 査読有: An Efficient Binary System for Gene Expression in the Silkworm, *Bombyx mori*, Using GAL4 Variants. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **76**, 195–210, 2011.
- ⑥ Tsuchida K. (著者 15, 15 番) 査読有
A CD36-related transmembrane protein is coordinated with an intercellular lipid-binding protein in selective carotenoid transport for cocoon coloration. *J. Biol. Chem.* **285**, 7739–7751, 2010.
- ⑦ Sezutsu H. (著者 12, 2 番) 査読有
Extensive synteny conservation of holocentric chromosomes in Lepidoptera despite high rates of local genome rearrangement. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 7680–7685, 2010.
- ⑧ Tsuchida K. (著者 11, 1 番) 査読有
Apolipoprotein III expression and low density lipoprotein formation during embryonic development of the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol.* **155**, 363–370, 2010.
- ⑨ Sezutsu H. (著者 7, 4 番) 査読有
Construction of a binary transgenic gene expression system for recombinant protein production in the middle silk gland of the silkworm *Bombyx mori*. *Transgenic Res.* **19**, 473–487, 2010.
- ⑩ Tsuchida K. (著者 9, 9 番) 査読有
Purification and expression analysis of imaginal disc growth factor in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* **55**, 1065–1071, 2009.
- ⑪ Tsuchida K., Bernstein P. (著者 7, 6 番) 査読有: Purification and characterization of a human retinal lutein-binding protein from human retina. *Biochem.* **48**, 4798–4807, 2009.
- ⑫ Sezutsu H. (著者 15, 10 番) 査読有
KAIKObase: An integrated silkworm genome database and data mining tool. *BMC Genomics* **10**, 486, 2009.
- ⑬ 山本公子, 三田和英 査読有、カイコゲノム研究の現状とその利用 *植物防疫* **63**, 1–6, 2009.

- ⑭山本公子 査読有：カイコゲノム研究の現状と今後の展開 蚕糸・昆虫バイオテック 78, 99-102, 2009.

[学会発表](計 36 件)

- ①横山洋. カイコ Lipid transfer particle の分子性質, アポタンパク質 mRNA 発現の発育変動. 日本蚕糸学会, 3/2012 福岡.
- ②湯浅正志. カイコ黄繭遺伝子 *Cameo2* の転写を制御する *Cameo2* 上流域の探索. 日本蚕糸学会, 3/2012, 福岡.
- ③永山春菜. *Cameo2* と CBP 発現 S2 細胞によるルテインの取り込み. 日本蚕糸学会, 3/2012, 福岡.
- ④作道隆. 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. 日本蚕糸学会, 3/2012, 福岡.
- ⑤Tsuchida K. Molecular machinery for the tissue specific uptake of specific carotenoid in the silkworm. *Macular carotenoids and AMD*, 5/2011, Cambridge.
- ⑥Sezutsu H. Development of transgenic silkworm *Bombyx mori* for functional genomics. *6th Int. Symp. Molec. Insect Sci.* 7/2011, Amsterdam.
- ⑦Sezutsu H. Development of transgenic silkworms for functional genomics in *Bombyx mori* as a lepidopteran model insect. *Arthropod Genomics* 8/2011. Manhattan.
- ⑧作道隆. SR-BI ファミリータンパク質が血液リポタンパク質から細胞へ移行するカロテノイドを識別する. カロテノイド研究会, 10/2011, つくば.
- ⑨横山洋. カイコ Lipid Transfer Particle は成虫期に高い発現を示す. 日本蚕糸学会合同支部大会, 11/2011, 盛岡.
- ⑩湯浅 正志, 作道 隆, 藤本 浩文, 本田 尚子, 普後 一, 土田 耕三. カイコ黄繭遺伝子の組織特異的発現を制御するシス領域の解析. 日本蚕糸学会合同支部大会, 11/2011, 盛岡.

[図書](計 3 件)

- ①Sezutsu H. The Silkworm-An Attractive BioResource Supplied by Japan. *Exp Anim.* 59, 139-46, 2011.
- ②瀬筒秀樹. 遺伝子組換え技術. 分子昆虫学「ポストゲノムの昆虫研究」, 共立出版, 36-45, 2009.
- ③Sakudoh T, Tsuchida K. Transport of carotenoids by a carotenoid-binding protein in the silkworm. In: *Carotenoids: Physical, Chemical, and Biological*

Functions and Properties. CRC Press, 511-523. (2009)

[産業財産権]

○出願状況(計 1 件)

名称:キサントフィル含有赤色繭及び赤色絹糸
発明者: 土田耕三
権利者: 土田耕三、富士化学工業株式会社
種類:特願
番号:2009-158341
出願年月日:2009年7月3日
国内外の別:国内

[その他]

化学工業新聞報道

6. 研究組織

(1)研究代表者

土田 耕三 (TSUCHIDA KOZO)
国立感染症研究所・放射能管理室・室長
研究者番号: 40231435

(2)研究分担者

山本 公子 (YAMAMOTO KIMIKO)
独立行政法人農業生物資源研究所・昆虫ゲノム報解析ユニット・ユニット長
研究者番号: 40370689
瀬筒 秀樹 (SEZUTSU HIDEKI)
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・センター長
研究者番号: 70342805

