

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658048

研究課題名(和文)カイコの変異体を用いた動物の小胞輸送システムの解明と創薬モデルへの展開

研究課題名(英文)Studies on membrane traffic in metazoans using the silkworm mutants and the development of a new model organism for the drug discovery

研究代表者

嶋田 透 (Shimada, Toru)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：20202111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：ポジショナルクローニングにより、突然変異「ヴァル斑油」(ov) および「ヴァル斑油-p」(ovp) の原因遺伝子は、リソソーム関連オルガネラ(LRO)の形成に必要なタンパク質複合体BLOC-1のサブユニットであるディスピンディンをコードするBmdysbであることが判明した。これら油蚕では、Bmdysbの転写量が顕著に低下していた。また、別の油蚕変異体「B8斑油(obt)」および「t-斑油(otm)」の原因遺伝子も、BLOC1のサブユニットをコードしていた。BLOC-1の成分が不足すると尿酸顆粒の形成が不完全になり、油蚕形質が現れると考察される。

研究成果の概要(英文)：The gene responsible for ov (mottled translucent of Var) and ovp (ov of pinhead) was identified by positional cloning based on the genome information, and was revealed to be Bmdysb, encoding the Dysbindin, a subunit of BLOC-1, a protein complex required for formation of lysosome-related organelles (LROs). The transcription of Bmdysb was drastically reduced in ov and ovp. Other larval translucent mutants, obt and otm were also investigated. These mutants were caused by the genes encoding different subunits of BLOC-1, respectively. Therefore, it is concluded that the subunits of BLOC-1 play crucial roles in formation of urate granules in the cells of larval epidermis of the silkworm.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：油蚕 尿酸顆粒 トランスポーター BLOC複合体 リソソーム関連オルガネラ (LRO)

1. 研究開始当初の背景

小胞輸送(vesicular transport; membrane traffic)は、現代の細胞生物学で最も重要な研究領域のひとつである。細胞膜やゴルジ体、小胞体、リソソームなどのオルガネラは、膜から小胞(エンドソーム、)を作り出して送り出し、またそれを受け取ることを頻りに繰り返す、相互に物質を輸送している。タンパク質をはじめとして多くの物質が、小胞輸送によって胞内へ取り込まれたり、細胞内を移動したり、細胞外へ分泌されたりしている。

小胞輸送の経路を使って形成される構造のうち、よく研究されているのは哺乳類の皮膚細胞におけるメラニン顆粒(メラノソーム)の形成である。メラノソームは脂質膜で形成される小胞の内部にメラニン色素が蓄積したものである。ヒトでは小胞輸送の経路に異常を来す「ヘルマンスキー-パドラック症候群」(HPS)が知られており、この病気がきわめて多くの遺伝子によって引き起こされることが知られている。HPSはメラニン顆粒の欠損で白皮症になるだけでなく、多くの合併症を起こす。一方、しみ、そばかす、ほくろなど皮膚のメラニン沈着も、多くの人を悩ませており、有効な治療薬ないし化粧品の開発が待たれている。HPSやメラニン沈着症の研究には、マウスやラットなどのモデルが使われているが、十分ではなく、より優れたモデルが必要である。

申請者は、カイコで30以上知られている油蚕(あぶらこ)変異体のうち、主なもの約10種類について、原因遺伝子の解明に取り組んできた。油蚕は、真皮細胞の尿酸顆粒の形成が不完全になる変異体の総称である。申請者は、油蚕変異体のうち、*od*、*ow*、*ov*、*oal*、*oa*の少なくとも5個については、その原因遺伝子がヒトのHPS原因遺伝子とされるものに相当する可能性が高い。また、未解明の油蚕のなかにも、HPS関連遺伝子のホモログが含まれている可能性がある。この事実は、カイコの尿酸顆粒の形成が、ヒトのメラノソームの形成と同様の経路、すなわち小胞輸送のシステムを用いていることを明確に示している。すなわち、カイコの尿酸顆粒の形成は、変異体の多さもあって、非常に優れた小胞輸送系の研究モデルといえる。

2. 研究の目的

尿酸顆粒の形成に異常を示す「油蚕」(あぶらこ)変異体を用いて、動物の小胞輸送システムの普遍的な機構を解明する。哺乳動物では、メラニン顆粒の形成が典型的な小胞輸送経路に依存している。メラニン顆粒の形成については、マウスやラットの病態モデルが作られはじめているが、創薬には不十分である。油蚕変異体は30以上が知られており、その中には小胞輸送システムの異常と考えられる変異体が多く含まれている。これはメラノソームの変異の優れたモデルであるので、本研究はそれら形質変異の原因を究明するとともに、小胞輸送系に働く薬剤を使用し

て効果を確認し、小胞輸送を制御する薬剤の開発に使える創薬モデルとしての有用性を証明する。

3. 研究の方法

(1) 未解析のカイコ油蚕変異体の原因遺伝子の解析：油蚕は、一部について原因遺伝子が解明されているが、未解明のものも多い。*oa*、*oal*、*ov*については、未発表ではあるが、すでにHPS関連遺伝子のオースログであることを強く示唆する結果を得ているので、各遺伝子の変異の実体を解明する。*ok*および*Obs*についても、責任領域がしぼられているので、ポジショナルクローニングを進めて原因遺伝子を単離する。なお、*oal*斑油変異体の形質の発現には、*mu-oal*が条件遺伝子として必要であることが古くから知られている。第11染色体に存在する*mu-oal*をポジショナルクローニング法により単離することをめざす。

(2) 次世代シーケンサーによる油蚕変異体のトランスクリプトームの比較：油蚕変異体の真皮のトランスクリプトームを、Illumina社のシーケンサーを用いたRNA-seqにより解析する。得られる配列を既知のp50Tシステムのゲノム情報へアラインし、油蚕変異体どうしの比較もすることにより、油蚕の原因遺伝子のみならず油蚕性発現の機構を解明する。

(3) RNAi等による油蚕の原因遺伝子の検証：油蚕の原因遺伝子が推定できたものについて、候補の遺伝子を胚子期のsiRNAの注射によるRNAiでノックダウンする。また、原因が細胞膜に局在されると思われる遺伝子については、アフリカツメガエルの卵母細胞へ候補遺伝子の正常型mRNAを注射することで尿酸の取り込みが亢進することを確かめる実験を行う。なお、各種油蚕遺伝子と*mu-oal*について同様の解析を行う。

(4) 各種阻害剤を用いた薬理的解析：小胞輸送を攪乱する物質として、糸状菌由来の抗生物質であるブレフェルジンA(Brefeldin A)などが知られている。これら化合物を正常なカイコ個体あるいは、各種の油蚕遺伝子をもつ個体へ投与する実験を行い、薬効を判定する。

4. 研究成果

ポジショナルクローニングにより、突然変異「ヴァル斑油」の原因遺伝子は、ディスピンディンをコードする*Bmdysb*であることが判明した。これら油蚕では、*Bmdysb*の転写量が顕著に低下していた。ディスピンディンはリソソーム関連オルガネラ(Lysosome-related organelles; LRO)の生成に必要なタンパク質複合体"BLOC1"のサブユニットである。また、別の油蚕変異体「B8斑油(*obt*)」および「t-斑油(*otm*)」の原因遺伝子も、BLOC1のサブユニットをコードしていた。BLOC1のサブユニットが欠けていると尿酸顆粒の形成が不完全になり、油蚕形質が現

れると考察される。

一方、別の変異体「青熟油」(*oa*)の原因遺伝子は、LROの形成に必要な別のタンパク質複合体"BLOC-2"のサブユニットのひとつであるHPS-5のカイコホモログをコードしていることが判明した。ショウジョウバエではpinkという変異体の原因になっている遺伝子のオースログである。さらに、やはりLROの形成に關与するBLOC3やAP-3のサブユニットも、尿酸顆粒の形成に必要であることが分かった。なぜなら、それらのサブユニットのmRNAをRNAiでノックダウンすると、油蚕形質が現れたからである。

一方で、小胞輸送を標的にする化合物であるプレフェルディンAをカイコ幼虫に与える実験を行ったが、いまのところ明らかな形質の変化は観察されない。より多くの薬剤を試してみる必要がある。

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4件)

(1) Lingyan Wang, Takashi Kiuchi, Tsuguru Fujii, Takaaki Daimon, Muwang Li, Yutaka Banno, Shingo Kikuta, Takahiro Kikawada, Susumu Katsuma, and Toru Shimada (2013) Mutation of a novel ABC transporter gene is responsible for the failure to incorporate uric acid in the epidermis of ok mutants of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 43 (7): 562-571. [査読あり]
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.03.011>

(2) Tsuguru Fujii, Hiroaki Abe, Munetaka Kawamoto, Susumu Katsuma, Yutaka Banno, and Toru Shimada (2013) Albino (*al*) is a tetrahydrobiopterin (BH₄)-deficient mutant of the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 43 (7): 594-600. [査読あり]
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.03.009>

(3) Lingyan Wang, Takashi Kiuchi, Tsuguru Fujii, Takaaki Daimon, Muwang Li, Yutaka Banno, Susumu Katsuma, and Toru Shimada (2013) Reduced expression of the dysbindin-like gene in the *Bombyx mori* *ov* mutant exhibiting mottled translucency of the larval skin. *Genome* 56 (2): 101-108. [査読あり]
<http://dx.doi.org/10.1139/gen-2012-0127>

(4) Tsuguru Fujii, Yutaka Banno, Hiroaki Abe, Susumu Katsuma, and Toru Shimada (2012) A homolog of the human

Hermansky-Pudluc Syndrome-5 (HPS5) gene is responsible for the *oa* larval translucent mutants in the silkworm, *Bombyx mori*. *Genetica* 140 (10-12): 463-468. [査読あり]
<http://dx.doi.org/10.1007/s10709-012-9694-1>

[学会発表](計7件)

(1) 中島奈月・木内隆史・勝間進・嶋田透, Hermansky-Pudlak syndrome(HPS)関連遺伝子ホモログをカイコでノックダウンすると油蚕形質が現れる, 日本蚕糸学会第84回大会, 2014年3月11日, 藤沢

(2) 張昊堃・木内隆史・王凌燕・川本宗孝・鈴木穰・菅野純夫・勝間進・嶋田透, カイコ突然変異体 *t*-斑油(*otm*)の原因遺伝子の同定, 日本蚕糸学会第84回大会, 2014年3月11日, 藤沢

(3) 藤井告・阿部広明・嶋田透・伴野豊, 尿酸を合成できない尾崎油(*og^r*)のモザイク解析, 日本蚕糸学会第84回大会, 2014年3月11日, 藤沢

(4) 嶋田透, ヒト疾患と共通の遺伝子原因とするカイコの変異体 形質発現の分子機構と疾患モデルとしての可能性. 日本人類遺伝学会第57回大会(シンポジウム「疾患モデル動物とその応用」, 2012年10月26日, 新宿
<http://jglobal.jst.go.jp/public/2009042/2/201302235481326372>

(5) 木内隆史・王凌燕・伴野豊・勝間進・嶋田透, 尿酸代謝異常カイコ突然変異体の原因遺伝子の探索から同定された尿酸トランスポーター, 第57回日本応用動物昆虫学会大会(小集会 W07 「昆虫のトランスポーター」), 2013年3月28日, 藤沢
http://57.odokon.org/archives/workshop_shonan2013.pdf

(6) 湯浅 正志・木内 隆史・伴野 豊・勝間進・嶋田透, 油蚕遺伝子「B8 斑油」(*obt*)のポジショナルクローニング, 日本蚕糸学会第83回大会, 2013年3月18-19日, つくば

(7) Lingyan Wang, Takashi Kiuchi, Yutaka Banno, Muwang Li, Susumu Katsuma, Toru Shimada, The molecular genetics of the oily (translucent) mutants in the silkworm, *Bombyx mori*., XXIV International Congress of Entomology, 2012年8月19-24日, Daegu, Korea

[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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

嶋田 透 (SHIMADA, Toru)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：20202111

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし