

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450490

研究課題名(和文)カイコ緑繭の分子基盤ならびに生理・生化学的特性の解明と利用

研究課題名(英文)Study on molecular mechanism of green cocoon of the silkworm

研究代表者

平山 力(Hirayama, Chikara)

国立研究開発法人農業生物資源研究所・昆虫機能研究開発ユニット・主任研究員

研究者番号：90370676

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：緑繭品種大造の第6染色体を白繭品種日01号のものと置換したDH6系統は笹繭となる。笹繭化の原因遺伝子として第6染色体に座乗するBmP5CR1遺伝子が予測されたので、DH6系統のBmP5CR1をTalenによりノックアウトすると繭にprolinylflavonol類が含まれる緑繭となった。In vitroにおいてquercetinとP5Cを反応させるとprolinquercetin類が生成されるので、緑繭の原因物質であるprolinylflavonol類はBmP5CR1の欠損によりP5Cが蓄積することによって非酵素的に生じると結論された。

研究成果の概要(英文)：We found that the cocoon color changed from yellowish-green to pale-green due to a significant reduction of prolinylflavonols, if the chromosome 6 of Daizo was replaced by that of J01. We generated a knockout silkworm strain for BmP5CR1 using transcription activator-like effector nucleases (TALEN) technology. BmP5CR1 knockout silkworms exhibited yellowish-green cocoon, with the formation of prolinylflavonols. In addition, several complexes, which were considered to be prolinylflavonols, are formed between quercetin and P5C without catalysts in vitro. These results provide the first evidence that "Ryoku-ken" specific flavonoids were produced from accumulated P5C due to a deficiency of BmP5CR1.

研究分野：昆虫生理学

キーワード：フラボノイド カイコ 繭色素 代謝異常

1. 研究開始当初の背景

カイコの系統の中には飼料であるクワの葉からフラボノイドを取り込み、体内で代謝後、それを繭層に分泌するものがある。研究代表者らは、繭フラボノイドには有害な紫外線から繭中の個体を保護する機能があることを明らかにしている(Daimon et al., 2010)。フラボノイドを含有する繭には淡黄色を呈するものと濃黄緑色のものがあり、それぞれ**笹繭**、**緑繭**と呼ばれている。緑繭性は橋本(1941)によって、*Gc*という単純優性の遺伝子によって制御されていると報告されているが、藤本ら(1962)は緑繭(*Gc*)を抑圧する遺伝子 *Ign-1* を発見し、それが第6染色体の7.5に座位することを明らかにしている。最近、我々の研究グループは緑繭系統大造と白繭系統日01号とを用いて染色体置換系統(CSL)を作成する過程で、大造の第6染色体が日01号のものと置き換わると、緑繭から笹繭へと変わることを見いだした。この結果は、前述の藤本ら(1962)の報告と一致するものである。大造の第6染色体が日01号のものと置き換わったCSL系統(以下DH6系統)と大造の繭フラボノイドについて解析を行ったところ、DH6の繭にはflavonol配糖体のみが含まれていたが、大造の繭にはflavonol配糖体に加え、緑繭固有のprolinylflavonol類と推測される新規の化合物が多数含まれていた(平山ら, 2009)。また、prolinylflavonolの前駆物質と思われるpyrroline-5-carboxylic acid(以下P5C)を測定したところ、大造の絹糸腺組織に特異的にP5Cが蓄積していた。P5Cが蓄積する原因について調査した結果、P5Cをプロリンに変換する酵素pyrroline-5-carboxylate reductase(以下P5CR)の活性が顕著に減少していることを発見した。さらに、カイコゲノムデータベースで探索した結果、カイコ第6染色体にP5CR様遺伝子が座乗していることがわかった。このことから、カイコの緑繭はP5CR酵素遺伝子の変異が原因であると推測した。

一方、大造の第20染色体が日01号のものと置き換わったCSL系統(以下DH20系統)の繭フラボノイド量は元の大造に比べて顕著に減少してしまうことがわかった。しかし、人工飼料に添加するフラボノイドを配糖体ではないケルセチン(アグリコン)にした場合には、DH20と大造の繭フラボノイド量に違いは見られなかった。このことから第20染色体にはフラボノイド配糖体の分解に関わる新規遺伝子が座乗するものと予測された。

2. 研究の目的

本研究では、第6染色体に存在するカイコの緑繭の原因遺伝子を単離・同定するとともに緑繭特異フラボノイドであるprolinylflavonol類の合成メカニズムを解明する。また、第20染色体に存在するフラ

ボノイド配糖体の分解、吸収に関わる新規遺伝子の実態を明らかにするため、原因遺伝子の同定を進めるとともに、カイコ中腸組織からフラボノイド配糖体分解酵素の分離精製を試みる。

3. 研究の方法

カイコ第6染色体に座乗するP5CR様遺伝子(BmP5CR1)の配列についてシーケンスを行い、大造と日01号(DH6)の比較を行った。BmP5CR1の各組織における発現をRT-PCRおよびノザンプロット法により解析した。BmP5CR1の変異と緑繭性が関連していることを証明するために、BmP5CR1のイントロン領域のサイズ多型を利用して関連解析を行った。また、DH6系統のBmP5CR1をTalen法によりノックアウトし、繭フラボノイド形質への影響を調べた。P5CとQuercetin等のFlavonol類の反応メカニズムを明らかにするため、P5CとFlavonol類を種々の条件下で反応させ、Prolinylflavonolの生成について解析した。

カイコ第20染色体に存在するフラボノイドの吸収に関わる遺伝子の実態を明らかにするため、(大造×DH20)×DH20個体約1000個体を用いてマッピングを行った。また、大造中腸から各種クロマトグラフィー装置を用いてフラボノイド配糖体分解酵素の分離精製を試みた。

4. 研究成果

DH6(日01号)と大造のBmP5CR1遺伝子のゲノムを比較したところ、大造BmP5CR1の第一イントロンに約2kbの大きな挿入及び、短い欠失が見られた。RT-PCR及びノザンプロット法によりBmP5CR1の発現を比較したところ、大造絹糸腺においてBmP5CR1の発現の顕著な減少が見られた。(大造×DH6)にDH6を戻し交雑し、BmP5CR1のイントロン5領域のサイズ多型と繭色形質の関連を調べた結果、大造型のBmP5CR1と緑繭形質がリンクしていることが明らかとなり、本遺伝子の変異が緑繭形質の原因であることが示唆された。

BmP5CR1の変異が緑繭の原因であることを証明するため笹繭であるDH6系統のBmP5CR1をTalen法によりノックアウトし、後代を系統として確立した。このノックアウト系統の繭フラボノイドを解析したところ、繭色が笹色から緑色へ変化し、繭層に緑繭特異的なprolinylflavonol類が多量に含まれていた(図1)。また、各組織のP5CR活性を測定したところ、後部、中部、前部の絹糸腺各組織の活性が消失していることを確認した。一方、絹糸腺以外の脂肪体、筋肉などの組織のP5CR活性は保持されていた。カイコのもう一つのP5CR遺伝子であるBmP5CR2はこれらの組織では正常に発現していた。

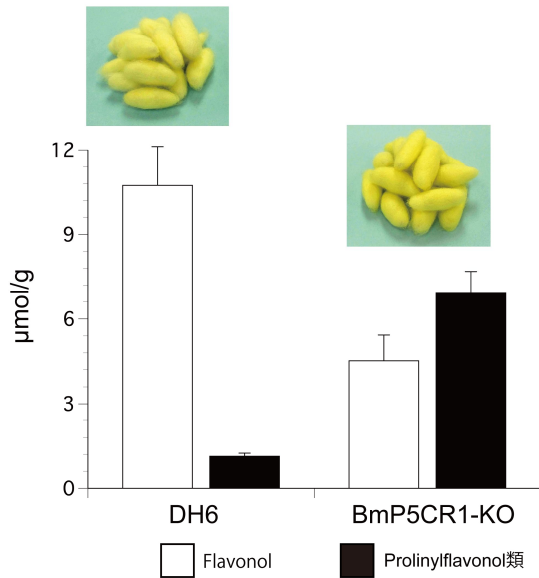


図 1. BmP5CR1 ノックアウトによる繭フラボノイド組成への影響

緑繭の原因物質である prolinylflavonol 類の生成メカニズムを明らかにするため、In vitro における生成条件を検討したところ 1mM 以上の比較的高濃度の P5C と quercetin を中性条件で反応させると、酵素などの触媒が全く存在しなくても結合反応が進行することが、LC/MS の解析により明らかになった。また、quercetin 以外のフラボノイドについても本反応により In vitro で P5C と反応させ、proline 残基を持ったフラボノイドを人工的に作成することが可能であることが期待された。

以上の結果から、絹糸腺で主に発現している BmP5CR1 の機能喪失により、P5C の proline への代謝が阻害され、本来の反応とは異なる P5C と flavonol 類との反応が促進されて prolinylflavonol 類が生成するために緑繭となることが証明された (図 2)

一方、大造に比べ、DH20 系統の繭フラボノイド量が顕著に少なくなってしまう原因を明らかにするため、この遺伝子 (仮称 Gd) のマッピングを行った。(大造 × DH20) に DH20 を戻し交雑し、約 1000 個体を用いて繭色とリンクする SNP マーカーを調べた。この結果、Gd の候補領域を 253kb まで絞りこむことができた (図 3)。この領域には、glycosyl hydrolase のクラスターが存在し、候補遺伝子がフラボノイド配糖体分解酵素であると示唆された。そこで、実際に大造中腸にはフラボノイド配糖体である rutin 分解活性が認められたが、DH20 には全くこの活性が見られなかった。そこで、この遺伝子の実態を明らかにするため大造中腸から rutin 分解酵素の部分精製を試みた。イオン交換、ハイドロキシアパタイト、ゲル濾過カラム等により精製

後、SDS-PAGE を行って各バンドを MS/MS による質量分析を行ったところ、Lactase phlorizin hydrolase と相同性が高いことがわかった。

以上のことから、rutin や isoquercitrin 等の桑葉フラボノイド配糖体を吸収する際に中腸の Lactase phlorizin hydrolase 様の酵素が重要な働きをしていることが強く示唆された。

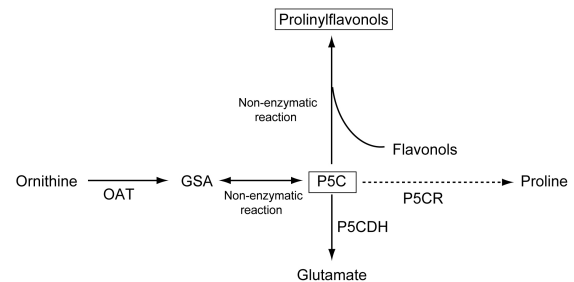


図 2 . 緑繭特異的フラボノイド (prolinylflavonol 類) の生成メカニズム

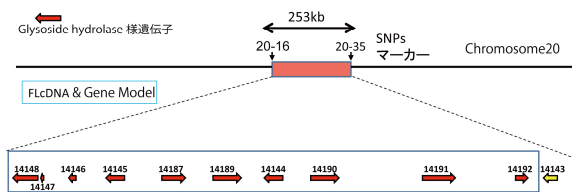


図 3. フラボノイド配糖体の吸収に関わる新規遺伝子 Gd の候補領域

< 引用文献 >

- Daimon, T. et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107, 2010, 11471-11476
- 橋本春雄、蚕糸試験場報告、10、1941、347-358
- 藤本直正、日本蚕糸学雑誌、31、1962、239-244
- 平山力、蚕糸・昆虫バイオテック、78、57-63

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平山 力 (HIRAYAMA, Chikara)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・新特性シルク開発ユニット・
上級研究員
研究者番号：90370676

(2) 研究分担者

山本公子 (YAMAMOTO, Kimiko)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・先進昆虫ゲノム改変ユニット・ユニット長
研究者番号：40370689

(3) 連携研究者

間瀬啓介 (MASE, Keisuke)
日本大学文理学部・物理生命システム科学科・教授
研究者番号：60414942