

# 論文内容の要旨

## 論文題目 カロテノイド輸送および繭色を支配する黄血遺伝子の構造と機能に関する研究

氏名 作道 隆

### 【背景】

カイコのカロテノイド結合タンパク質 (CBP) は、絹タンパクを作る器官である絹糸腺から同定された細胞内タンパク質である。CBP のアミノ酸配列は、哺乳類の Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) と相同性を有している。StAR は、コレステロールと結合し、ステロイドホルモン合成の律速段階であるミトコンドリア内膜へのコレステロール輸送を担う分子である。すなわち、この一次構造の相同性は、CBP が昆虫の脱皮と変態を支配するエクジステロイド合成の律速段階を担っていることを示唆していた。一方、CBP は、絹糸腺において、黄血遺伝子 (*Yellow blood*) という遺伝子座が優性 (*Y*) の場合は発現し、劣性 (*+Y*) の場合は発現しない。*Y* の場合、食餌の桑の葉に含まれるカロテノイドが中腸で吸収され、絹糸腺に体液を介して輸送されるため、体液と繭がカロテノイド由来の黄色を呈する。*+Y* の場合、カロテノイドの取り込みが起こらず、体液と繭は無色 (白色) になる。すなわち、この発現解析の知見は、CBP が黄血遺伝子の支配するカロテノイド輸送機構・繭色決定機構の一端を担っていることを示唆していた。

本研究は、CBP の機能を明らかにすることを目的とし、エクジステロイド合成機構およびカロテノイド輸送機構への CBP の関与を検証した。

### 【実験と結果】

#### 1. CBP のスプライシングアイソフォーム BmStart1 の同定

##### (1) BmStart1 の同定

CBP のエクジステロイド合成機構への関与を検証するため、エクジステロイド合成器官である前胸腺における CBP の発現を解析した。CBP の ORF5' 末端と 3' 末端、および ORF 中央部にプライマーを設計し、白繭品種の綿秋×鐘和での発現を RT-PCR で調べた。ORF 中央部と ORF3' 末端のプライマーの組み合わせでは予想される長さの DNA の増幅が見られたが、ORF5' 末端と ORF3' 末端のプライマーの組み合わせでは増幅は見られなかった。そこで、増幅された CBP 部分配列をもとに 5' および 3' RACE を行ったところ、3' 末端側は CBP と一致するが、5' 末端側は CBP と異なり、膜貫通部位と思われる疎水性アミノ酸領域を 4 ヶ所コードする cDNA 全長が得られた (図 1 A)。4 ヶ所の予想膜貫通部位の存在は、哺乳類の StAR と最も相同性の高いパラロ

グであり、StAR と同様のコレステロール輸送能を有することが示唆されている MLN64 と同様の  
特徴であった。この新しく得た CBP のアイソフォームを BmStart1 と呼ぶことにした。

## (2) BmStart1/CBP の発現解析

脱皮と変態は昆虫に普遍的な現象であるため、エクジステロイド合成に関わる遺伝子は、いず  
れの品種においても発現していると考えられた。そこで、綿秋×鐘和と黄繭品種の N4 を用いて、  
*BmStart1* と *CBP* の組織発現分布を調べた (図 1 B)。*BmStart1* は綿秋×鐘和と N4 の両方の  
品種で発現しており、エクジステロイド産生器官である前胸腺、卵巢、精巢のいずれの組織にお  
いても発現が見られた。一方、*CBP* の発現は、綿秋×鐘和ではいずれの組織でも見られなかった。  
発現が黄繭品種に限定される *CBP* ではなく、白繭品種にも発現している *BmStart1* が、StAR と  
同様のコレステロール輸送能を有し、ステロイドホルモン合成の律速段階をカイクにおいて担う  
候補遺伝子であると考えられる。

## (3) BmStart1/CBP のゲノム構造の解析

綿秋×鐘和において、*BmStart1* が発現し、*CBP* が発現しない原因を探るため、*BmStart1* と  
*CBP* のゲノム配列を綿秋×鐘和で決定した (図 1 C)。*BmStart1* と *CBP* は 35 kbp に及ぶ同一  
の遺伝子上に存在し、alternative splicing によって 1 つの遺伝子から 2 つのアイソフォームとし  
て作られていることが分かった。*CBP* 特異的なエクソンの exon B2 は、*CBP* の ORF を含む 3'  
側の配列が一部欠失しており、その欠失した部分には non-LTR タイプのレトロトランスポゾン  
の部分配列が存在した。綿秋×鐘和において *CBP* が発現しない原因は、*CBP* 特異的なゲノム領  
域へのレトロトランスポゾンの挿入であると考えられた。

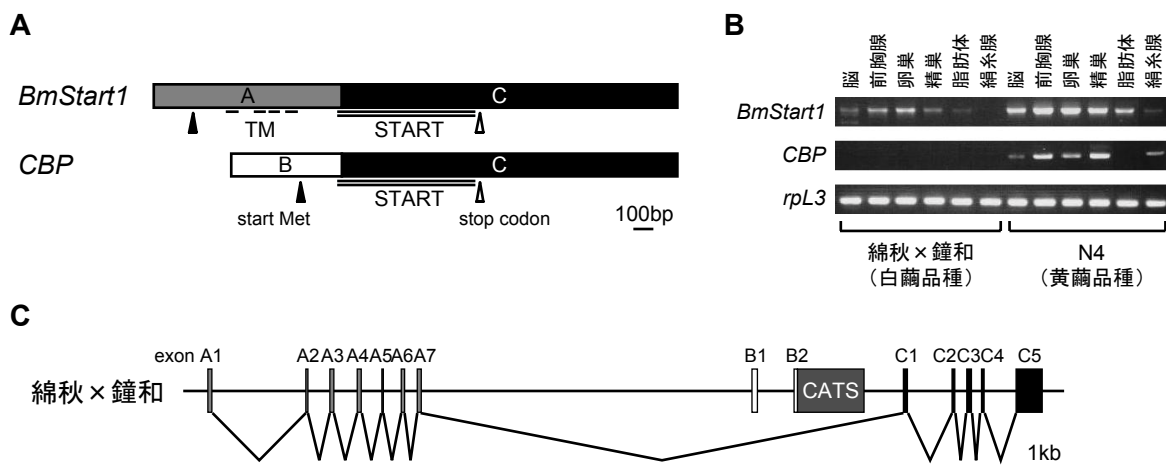


図1: BmStart1/CBP 遺伝子の構造と発現分布。(A) cDNA 構造。BmStart1 特異的な配列を A、CBP 特  
異的な配列を B、両方に共通する配列を C で表した。膜貫通領域(TM)と脂質結合ドメインの START ド  
メインを下線と二重下線でそれぞれ示した。(B) RT-PCR による組織発現分布解析。*rpl3* は内部標準と  
して用いた。(C) 綿秋×鐘和の BmStart1/CBP 遺伝子のゲノム構造。BmStart1 の cDNA 構造を折れ線  
で繋いである。CATS はレトロトランスポゾン。

## 2. CBP が黄血遺伝子の実体であることの検証

白繭品種における *CBP* ゲノム配列の欠失は、*CBP* が黄血遺伝子そのものであることを示唆し  
ていた。そこで、*CBP* が黄血遺伝子の実体であるかどうかを検証した。

### (1) Y と +Y のゲノム構造

*CBP* のゲノム構造を、複数の Y および +Y の品種で決定した (図 2 A)。Y では、*CBP* はゲノ  
ム中に少なくとも 2 コピー以上存在し、それらはレトロトランスポゾンが挿入されていない配列

(図 2 A、Ya) と、レトロトランスポゾンが挿入されているがエクソンの欠失は起こっていない配列 (図 2 A、Yb) の 2 つに分類されることが分かった。一方、+Y では、綿秋×鐘と同様に、exon B2 の 3' 側が欠失し、レトロトランスポゾンの部分配列を含む配列が 1 コピー存在した。+Y の配列は、Yb の配列から、exon B2 の 3' 側配列とレトロトランスポゾンの 5' 側配列を含む約 4.5 kb の領域が欠失したものと考えられる。このゲノム構造解析の結果から、黄血遺伝子の実体が CBP であり、+Y の白繭ではなく Y の黄繭がカイコの祖先型であることが強く示唆された。

### (2) Y と +Y のゲノム構造の変化が CBP タンパク質の発現の違いを引き起こした分子機構

Y と +Y のゲノム構造の変化が、どのように CBP タンパク質の発現の違いを生み出したのか明らかにするため、Y と +Y で、CBP mRNA の発現とその構造をノーザンブロットと RT-PCR で調べた。その結果、+Y では、exon B1 と exon C1 が連結しており、exon B2 が抜け落ちた mRNA が作られていることが分かった。すなわち、+Y では、ゲノム構造の変化によって CBP の正常なスプライシングが出来なくなり、翻訳開始メチオニンを含む exon B2 がスプライスアウトされることで mRNA が機能を果たさなくなり、CBP のタンパク発現が失われたと考えられる (図 2 B)。

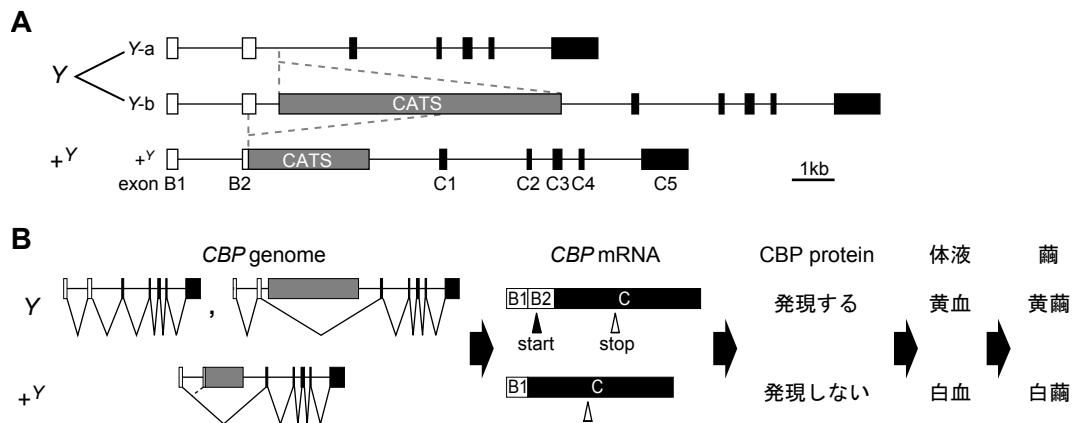


図 2: Y と +Y の CBP 遺伝子の構造。(A) ゲノム構造。Y と +Y でコピー数が違うことに注意。(B) +Y で CBP タンパク質の発現が失われ、白血・白繭が作られる分子機構。exon B2 がスプライスアウトされることにより、本来の翻訳開始点を持たない mRNA が作られる。

### (3) CBP の強制発現による +Y 品種の黄血・黄繭への復帰

CBP が黄血遺伝子の実体であることを機能的に証明するため、CBP をトランスジェニックの手法で強制発現させることで +Y の表現形が黄血・黄繭へと復帰するかどうかを調べた。

強制発現には酵母の UAS/GAL4 系を利用した。UAS 配列の下に CBP を組み込んだベクター (図 3 A) を作成し、そのベクターの配列を +Y 品種のゲノムに導入した。作出した UAS-CBP 系統を GAL4 系統と掛けあわせ、CBP を中腸に発現させることができた。その結果、体液の黄血への復帰が観察された (図 3 B)。体液のカロテノイド成分を分析したところ、主にルテインが含まれていた (図 3 C)。これは Y 品種で得られていた結果と一致する。

中腸と同時に絹糸腺に CBP を発現させた個体は黄繭を形成した (図 3 D)。これは、遺伝子組換えによって実用繊維に天然色素を輸送し着色を実現した初めての例である。

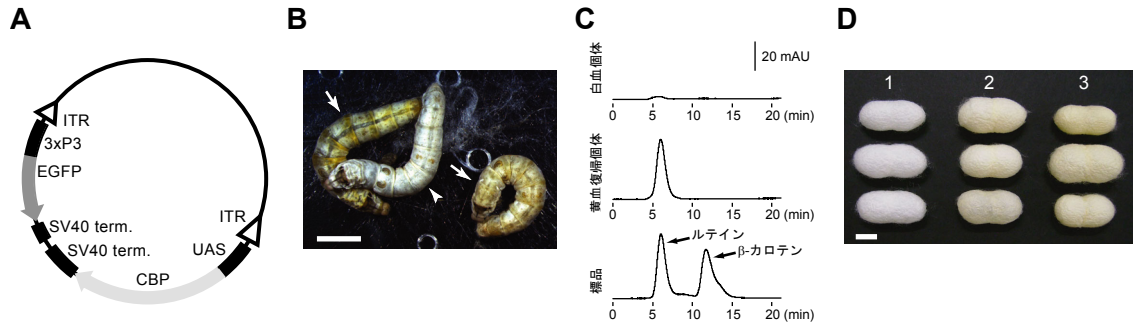


図3: CBP の強制発現による $+^Y$ 品種の黄血・黄繭への復帰。(A) CBP を強制発現させるために作成したベクターの構造。EGFP はマーカー遺伝子として用いた。ITR: トランスポゾン piggyBac の inverted terminal repeats、3xP3: 眼特異的なプロモーター。(B) 白血幼虫(矢頭)と CBP の強制発現によって黄血に復帰した幼虫(矢印)。(C) 黄血復帰個体の体液カロテノイド組成の分析。逆相カラムを用いた HPLC 解析。測定波長は 443 nm。(D) CBP の強制発現によって着色した繭。Lane 1:  $+^Y$ 品種が作る白繭、Lane 2: CBP を強制発現した幼虫の作った繭、Lane 3: Lane 2 の個体の兄妹交配から得られた繭。Lane 2 より色合いが濃くなった。スケールバーは 1 cm。

### 【結論と展望】

本研究では、CBP のアイソフォームであり、哺乳類 MLN64 のオーソログである BmStart1 を同定した。また、CBP がカロテノイドの取り込みを支配する黄血遺伝子の実体であることを明らかにし、黄血・黄繭品種から白血・白繭品種が生じた分子機構をゲノム配列から解明した。本研究の成果に基づく今後の展望として次の 2 点が挙げられる。

#### 1) 細胞内カロテノイド輸送機構の解明

カロテノイドは、ビタミン A の前駆体や抗酸化物質として、ヒトも含めた広範な生物で重要な役割を果たす生理活性脂質である。しかしながら、その細胞内輸送機構についてはどの生物でもほとんど解明されていなかった。カロテノイドの細胞内への取り込みや細胞内輸送は、受動拡散によるという説も存在していた。CBP は、初めて機能的に同定されたカロテノイド輸送に関わる細胞内因子である。受動拡散を超えた細胞内輸送機構が、カロテノイドを取り込むために存在することを本研究は明確に示している。生物の細胞内カロテノイド輸送機構を解明していく上で CBP は有力なモデル分子となるだろう。

#### 2) 新しい色特性を持つ絹の開発

繭色に関わる遺伝子座はこれまでにカイコで 15 個知られており、その中で黄血遺伝子は初めて分子実体が同定された遺伝子である。今後、黄血遺伝子と共存することによって絹色を肉色にする *F* 遺伝子、あるいは黄血遺伝子と *F* 遺伝子と共存することによって絹色を赤色にする *Pk* 遺伝子などを同定し、本研究と同様の手法で遺伝子導入をすることで、それぞれの色特性の絹を作るトランスジェニックカイコ系統を作出できると考えられる。また、それぞれの遺伝子の発現量を調節することによって色合いを変化させることも可能であろう。金色の繭を作る *Cricula trifenestrata* など、他種の絹糸虫から繭色に関わる遺伝子を同定し、同様に遺伝子を組み込むことで、新しい色特性を持つカイコの絹を作り出すことが出来るかもしれない。新規絹繊維の作出は繊維・衣料産業への応用的な価値を持つであろう。

本研究を端緒として、カイコの遺伝子資源を生かした脂質輸送機構の解明、及び新しい色特性を持つ絹を作るカイコ系統の作出が進むことを期待している。