

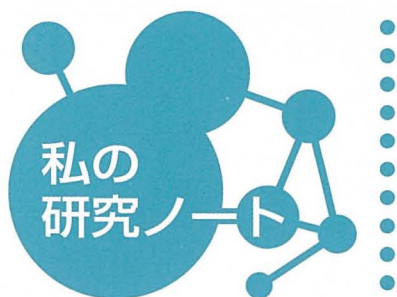
トランスクリプトーム解析によるカイコのゲノム機能の解明

誌名	蚕糸・昆虫バイオテック = Sanshi-konchu biotec
ISSN	18810551
著者名	嶋田,透
発行元	日本蚕糸学会
巻/号	78巻2-3号
巻号補足	
掲載ページ	p. 131-135
発行年月	2009年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター

Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat





トランスクリプトーム解析による カイコのゲノム機能の解明

嶋田 透

(東京大学大学院農学生命科学研究科)

1. 遺伝学からゲノム解析へ

カイコの遺伝学は、外山亀太郎博士によってメンデルの法則の成立が動物で初めて確かめられてから(Toyama, 1906)、すでに 100 年を超える歴史を作ってきた。この間に数百の突然変異が発見され、それらは連関関係および組換え価に基づいて 28 の連関群に配置されている(伴野, 2005)。一方で、Watson and Crick (1953) による DNA の二重らせん構造の発見以降の分子生物学の興隆期には、真核生物の遺伝子のクローニングとしては最も早い成功例の一つである、鈴木義昭博士らによるフィブロイン遺伝子の単離 (Ohshima and Suzuki, 1978) をはじめ、富野士良博士らによる体液タンパク質遺伝子に関する研究 (Sakurai et al., 1988 など) や山下興亜博士らによる休眠ホルモン遺伝子の単離 (Sato et al., 1993) など、日本人がカイコを用いて世界の分子遺伝学をリードする成果を挙げてきた。

従来、個別の遺伝子を対象にしてきた分子生物学は、1990 年代に入ると全ゲノムを網羅的に解読することをめざすゲノム研究にシフトしてゆく。当初は微生物から始まった全ゲノム解析は、人々の予想よりも早く多細胞の動植物に拡がり、1998 年に線虫 *C. elegans* (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998)、1999 年にはキイロショウジョウバエ (Adams. et al., 1999) の全ゲノムの塩基配列が公表されるに至った。これらの動きのなかで、わが国では 1990 年前後からカイコのゲノム解析の機運が高まっていった。

2. カイコのゲノム解析とトランスクリプトーム解析

カイコのゲノム解析は、1991 年に始まった「家蚕ゲノム DNA の物理地図作成に関する基礎研究」(科研費総合研究 A, 代表者: 藤井博九大助教授) で正式にスター

トした。この時代には、実際は「物理地図」の構築は無理であり、私は RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) による連鎖地図の作成などの基礎研究を行っていた。1996 年からは戦略的基礎研究推進事業 (CREST) による「昆虫ウイルスと宿主との分子応答機構とその応用」の中でカイコの大規模な EST データベースおよび全ゲノムをカバーする BAC ライブラリーが初めて構築される。このプロジェクトのリーダーであった前田進博士 (理研) に率いられて、三田和英博士 (当時は放医研、のち生物研へ移る) と私は転写産物の網羅的解析すなわちトランスクリプトーム解析に関する共同研究を始めた。

“EST” とは、Expressed Sequence Tags の略であり、cDNA ライブラリーから多数のクローンを無作為に拾って、末端塩基配列を大量に解読したものを指す。EST は、細胞や組織のトランスクリプトームを、最も単純かつ具体的に記述することのできる手法である。カイコは複雑な器官の分化する動物であり、雌雄異体でもあり、かつ変態によって大きく体制を変化させる。したがって、トランスクリプトームは組織・器官、雌雄、そして発育段階によってきわめて多様であると想像される。そのため、1999 年開始の文科省/未来開拓学術研究「昆虫の性決定の遺伝子ネットワーク」(代表: 嶋田) および 2000 年開始の生研機構基礎研究「カイコの遺伝子機能解析システムの構築」(代表: 生物研田村俊樹博士) では、異なる組織、異なる発育段階から多くの cDNA ライブラリーを新規に作成し、EST 解析に供した。また、同時に cDNA をスライドグラスに多数張り付け、いわゆる cDNA マイクロアレイを作成した。複数の EST データセットの間での比較、およびマイクロアレイを用いた解析は、ゲノムレベルでのトランスクリプトームの比較を可能にした。

2003 年度からは、さらに農水省委託金による「昆虫テクノロジー」研究プロジェクト (2007 年から「アグリゲノム」)、および文科省科研費特定領域研究「統合ゲノム」(2005 年から「比較ゲノム」) でカイコゲノム解

析が支援されるようになり、その中で私たちはトランスクリプトーム解析をさらに深めることができた。この時期の後半になると、生物研や関係者の努力が実って日本と中国の共同研究が実現し、カイコゲノムの高精度塩基配列が得られるようになった (International Silk Worm Genome Consortium, 2008)。そのゲノム情報に助けられて、トランスクリプトームの研究は飛躍的に発展し、SAGE 解析による組織特異的遺伝子の探索や、突然変異と遺伝子の対応付けなどが進展した。

私の研究は、これらの流れに後押しされた。以下に、その結果の代表的なものをいくつか紹介する。

3. EST データベースを用いたカイコ固有の遺伝子の発見

種々の生物で EST データベースが構築されている。カイコの EST データは "SilkBase" (<http://www.ab.a.u-tokyo.ac.jp/silkbase/>) として世界へ公開するとともに、Mita et al. (2000) の論文としても公表した。この時点で、すでに 1 万種類以上の EST 配列が得られていた。私は、この EST データベースと、解読されつつあったゲノムの塩基配列を参照しながら、カイコの遺伝子塩基配列を他の動物、すなわちショウジョウバエ、ハマダラカ、線虫、ヒトなどのゲノム情報と照合し、カイコのみが所有する遺伝子を探索した。

私が「カイコ固有の遺伝子」に関心を持っていた理由は、カイコが示す特異的な現象、たとえば胚休眠、桑葉のみの単食性、絹糸の生産などが、カイコ固有の遺伝子に支配されるのかどうか、という疑問を持っていたからである。種特有の機能は、必ずしも種特異的な遺伝子によって支配されなくてもよく、たとえば遺伝子発現の調

節機構を少し変えることで遺伝子ネットワークを組換えれば、実現できる可能性がある。しかし、結論を先に言えば、カイコには実際に固有の遺伝子が多く存在し、少なくともその一部はカイコ特異的な機能に関係している。

カイコの遺伝子のなかで、他の動物に相同性を示さないものとして、私が最初に注目したのが *BmChi-h* である。*BmChi-h* は翅原基の EST の中から発見され、cDNA 全長の配列は *Serratia* などの細菌のキチナーゼ遺伝子に高い相同性を示した。この遺伝子 *BmChi-h* については、大学院生であった浜田晃太郎および大門高明らによって詳しく研究され、これが病原細菌や共生細菌の遺伝子ではなく、カイコの第 7 染色体に実在することが明らかになった。*BmChi-h* の mRNA は脱皮期の真皮に特異的に発現しており、バキュロウイルスで発現させた組換えタンパク質は、エクソ型のキチナーゼとしての基質特異性を示した。さらに組換えタンパク質を用いて抗体を作成し、幼虫期のタンパク質の局在を調べたところ、眠期の新旧 2 層のクチクラの間にたまる脱皮液に存在することが明らかになった。これらの事実から、*BmChi-h* タンパク質の機能は、脱皮期のクチクラ更新時のキチン分解であろうと推察された。

中腸の EST に発見した新規遺伝子 *BmSuc1* も、動物の既知遺伝子に相同性を示さず、遠くはなれた生物である *Bacillus* 属など細菌の β -フルクトフラノシダーゼ遺伝子に高い相同性を示した。動物の消化管のショ糖分解酵素は通常 α -グルコシダーゼであり、その活性は桑に含まれる DNJ などのアルカロイドで強く阻害される。ところが、大門博士や大学院生の田口知宏らが調べた結果、*BmSuc1* のコードするショ糖分解酵素は DNJ で阻害

表 1 細菌からの水平転移で獲得してきたと推定されるカイコの遺伝子。

遺伝子名	コードするタンパク質の機能 (推定)	最も相同な遺伝子を持つ生物	その相同性	EST の存在するカイコの組織
<i>BmChi-h</i>	chitinase	<i>Serratia marcescens</i>	0.E + 00	翅原基 / 中腸
<i>BmMTOase</i>	N-methyl-L-tryptophan oxidase	<i>Serratia proteamaculans</i>	4.E - 79	脂肪体
<i>BmG1Pase1</i>	glucose-1-phosphatase	<i>Serratia proteamaculans</i>	2.E - 84	脂肪体
<i>BmG1Pase2</i>	glucose-1-phosphatase	<i>Serratia proteamaculans</i>	5.E - 85	脂肪体
<i>BmG1Pase3</i>	glucose-1-phosphatase	<i>Serratia proteamaculans</i>	2.E - 84	脂肪体
<i>BmNDSE1</i>	nucleoside-diphosphate-sugar epimerase	<i>Photobacterium luminescens</i>	3.E - 75	脂肪体
<i>BmNDSE2</i>	nucleoside-diphosphate-sugar epimerase	<i>Photobacterium luminescens</i>	5.E - 78	脂肪体
<i>BmGlpq1</i>	glycerophosphodiester phosphodiesterase	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.E - 133	脂肪体
<i>BmGlpq2</i>	glycerophosphodiester phosphodiesterase	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7.E - 137	中腸
<i>BmSuc1</i>	β -fructofuranosidase	<i>Bacillus licheniformis</i>	5.E - 101	中腸
<i>BmMRC</i>	pMRC01_043 (unknown function)	<i>Lactococcus lactis</i>	1.E - 45	脂肪体
<i>BmKynu</i>	kynureninase	<i>Alkaliphilus oremlandii</i>	2.E - 137	マルピーギ管

カイコゲノム上の推定 cds のうち、イントロンを持たず、かつ公共タンパク質データベースに対する相同性検索で細菌と最も高い相同性を示す遺伝子。



図 1. 上にいる体色の赤い個体が赤血 (*rb/rb*) の幼虫 (生物研 771 系統)。

下は正常な幼虫 (東大 p50T 系統)。赤血変異の原因は、キヌレニナーゼのアミノ酸残基が 1 個置換しているために起きる活性喪失である。キヌレニナーゼ遺伝子は、昆虫ではカイコにしか見いだされておらず、その構造からみて、鱗翅目昆虫が細菌から獲得したものであると推定される (Meng et al., 2009)。

されなかった。したがって、カイコは *BmSuc1* を利用して DNJ の毒性を克服しているのであろうと推察された (Daimon et al., 2008)。

さらに、マルピーギ管の EST から見いだした遺伝子 *BmKynu* は、*Alkaliphilus* など細菌のキヌレニナーゼ遺伝子に高い相同性を示した。cDNA の配列とゲノム情報を照合した結果、*BmKynu* は幼虫体色が赤くなる突然変異「赤血」(*rb*) の原因遺伝子であることが示唆された。私たちの研究室のポスドクであった孟艶博士が実験した結果、実際に *rb* 系統の *BmKynu* はアミノ酸残基が 1 個変異しており、それが原因でコードするキヌレニナーゼの酵素活性がほとんど喪失していることが分かった (Meng et al., 2009)。したがって、*BmKynu* はカイコが正常な体色を保つために必要な遺伝子であると考察される。

これらの通り、カイコゲノムには進化の過程で真正細

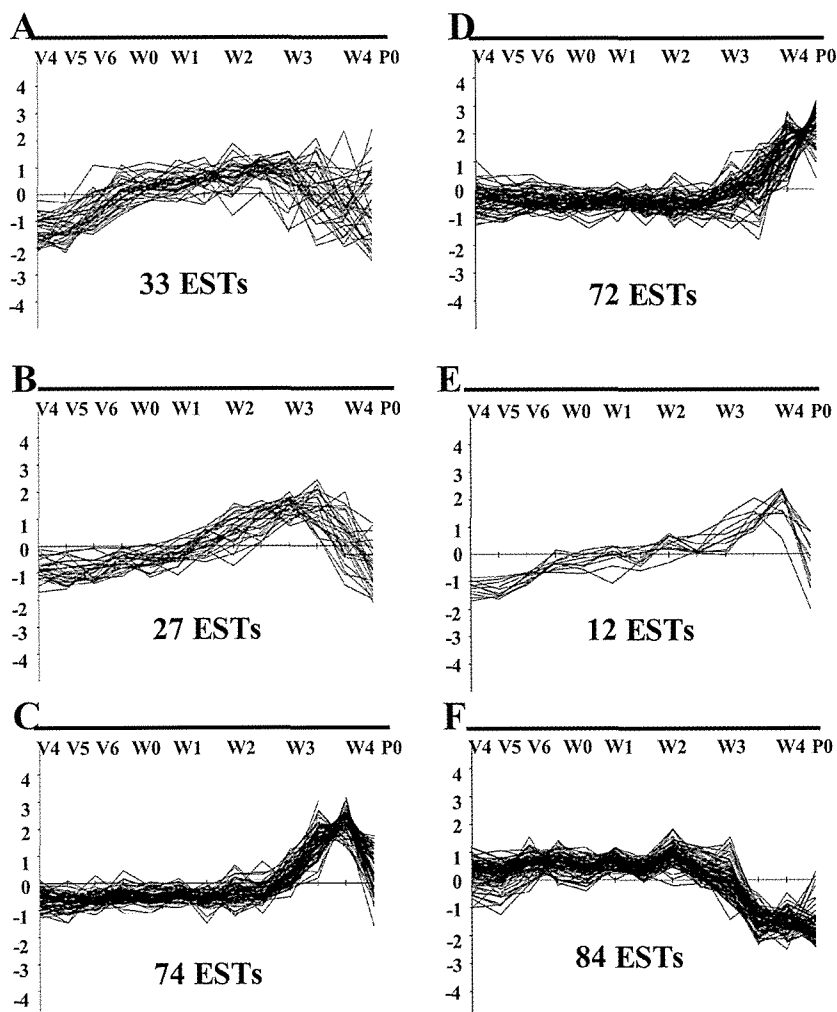


図 2. カイコの 4 齢幼虫から蛹化脱皮にかけての翅原基における遺伝子発現のマイクロアレイによる解析。

遺伝子発現の変動パターンをクラスタリングし、ここでは主要な 6 つのクラスターを示す。血中エクジステロイド濃度のピークは W2 (吐糸 2 日) と W3 (同 3 日) の間にある。エクジステロイド濃度の上昇に最も早く反応するのがクラスター B の遺伝子であり、クチクラ分解に関与するキチナーゼやカルボキシペプチダーゼなどの遺伝子を含む。一方、クチクラタンパク質遺伝子やクチクラのメラニン化を支配する *yellow* 相同遺伝子などはクラスター D に含まれる。Ote et al. (2004) より。

菌から獲得したと推定される遺伝子が存在しており、これらはカイコ特異的な機能の実現に貢献している可能性が高い。このように細菌からの水平転移で獲得されたと想像される遺伝子は、他にもある。表1には、その可能性が高いと私が考えている遺伝子をリストアップした。

4. cDNA マイクロアレイ, SAGE 法などを用いた遺伝子発現の体系的解析

EST データベースは、遺伝子発現すなわち mRNA 量を網羅的に比較する目的にも有用である。たとえば、微生物感染と非感染の個体における EST を比較することによって、生体防御系の遺伝子を体系的に探索することができる。しかし、ゲノムの解読が進んできたカイコのトランスクリプトームを把握するには、手間や経費がかかる EST よりも、cDNA マイクロアレイや SAGE 法のほうが低コストで効率的である。

cDNA マイクロアレイは、多数の cDNA をスライドガラス上に高密度にスポットしたものであり、種々の組織の RNA と反応させることで、遺伝子発現を網羅的に分析するために用いられる。私たちは、カイコで初めて cDNA マイクロアレイを作製した。大学院生だった大手学は、それを用いて変態期の翅原基における mRNA 量の変動すなわち遺伝子発現プロファイルを解析した。その結果、図1に示すように、遺伝子発現プロファイルが6通りの典型的なパターンを示す場合が多いことが分かった。すなわち、エクジステロイド濃度上昇時にはタンパク質分解酵素遺伝子など59の遺伝子が、濃度ピーク後にはクチクラ合成や色素合成に関わる遺伝子など147の遺伝子が、それぞれ誘導されていた (Ote et al., 2004)。それらの遺伝子の大半は未解析の遺伝子であり、本研究によって初めて変態期における特徴的発現が明らかになった。

また、SAGE 法 (Serial Analysis of Gene Expression) は、cDNA の一部の10数塩基のみを取り出して多数連結してライブラリー化し、その塩基配列を決定して計数することにより、効率よく mRNA を定量する方法である。ゲノム解析が行われている生物であれば遺伝子との対応付けは容易であり、マイクロアレイのように相同遺伝子の識別の困難がなく、絶対的な定量が可能である。大学院生であった船隈俊介は東大医学系研究科の橋本真一博士らの指導により、SAGE 法を用いて卵巣小管先端に存在する分化初期 (Stage1-3) の卵室における遺伝子発現を解析した。その結果、この時期には機能未知の非コード RNA が最も多量に発現していることが明らかになった。この RNA は胚子にも存在するが、他の組織には存

表2 カイコ蛹期の卵巣小管先端に存在する Stage1 の卵胞から得た RNA の SAGE 解析。

SAGE タグ配列	アノテーション	出現頻度
GCTGGCAGAGTCGCGA	EST	2.8%
CAGATCTGCTGTCAGG	Multi hit	1.0%
TCCGCATCCTGGCAGG	Multi hit	0.7%
ATCTGAGTTCAAACCG	Multi hit	0.6%
GGCTTCGGTCTCTTTG	Multi hit	0.6%
CGCGCAAGCGTTTAT	No hit	0.6%
GGCAGGTGATCTACAC	Ribosomal protein S25	0.6%
GTGGTCTTGTGCACGG	Multi hit	0.4%
GCGGTGATGGAGGACC	Ribosomal protein S27A	0.4%
TCACGTCCACAGGCAG	Ribosomal protein S26	0.4%
TTGCCGTGGGACCAGC	Multi hit	0.4%
ATGGCGAGTGTGTTTC	Ribosomal protein P1	0.4%
TCTTGTCTCTGAGCTC	CG15697	0.4%
AGGTGATGCTAAACAT	Multi hit	0.4%
GCAACTCTGGCAGTGT	Multi hit	0.3%
CTTTCGTGCTGGTAT	No hit	0.3%
GCCCTCGTTTGTAAA	No hit	0.3%
GATGTTAAGTGCCCTG	CG10423	0.3%
GCATCTACCTCTGCG	Ribosomal protein S3A	0.3%
ACGCTTACGAACTGCG	Ribosomal protein L22	0.3%
GACTCCGCTGAAGGCG	Multi hit	0.3%
CCTTTTGCACGGTACG	Ribosomal protein L14	0.3%
GACCTCTCGACGCTTG	Qm	0.3%
TCGTCTCCCTGCCACA	CG3203	0.3%
CCTGTACAGAAACAAA	Multi hit	0.3%
GATCTTGTAAGACAG	Multi hit	0.3%
GACTGTCCTGTACAGG	Multi hit	0.3%
CTTAAATGAGCGTCTG	No hit	0.3%
GTGTCTCTTCGAAGAA	Multi hit	0.3%
CCAACCAAGATCCTGC	Ribosomal protein S20	0.3%
GTTACATATCGCGTCA	lethal (2) essential for life	0.3%
TCAAGCACTCCAAGTG	Multi hit	0.3%
CCCCTGAGTTTCTTG	No hit	0.3%
GGCTTTGGTCTCTTCG	Ribosomal protein P0	0.3%
ACATCATCGAAGTAGA	Ribosomal protein S17	0.3%
GTGTCAACCAGTTGAA	Ribosomal protein L15	0.3%
CAAAAGAACTTAAAA	Multi hit	0.3%
GGTACACTCAAGAAGG	Multi hit	0.3%
TCCGTACATTGTGCG	No hit	0.3%
CGGAAATACTACAGA	Ribosomal protein L30	0.2%
GAGTACATCCACAGGA	Ribosomal protein L19	0.2%
ATGGCCGCACCATCCG	Ribosomal protein S4	0.2%
GGCGACGGTAACCACT	Multi hit	0.2%
GGTACGAAATGGAAGG	CG8415	0.2%
ACCAACAGATTGTTGG	CG3751	0.2%
CCGCGTGAAATCAAAG	Multi hit	0.2%
GAGACAACCTCGCGGCT	No hit	0.2%
TGTAATGTTTAATTTT	No hit	0.2%
TGGAATCCTAGGCAGT	Ribosomal protein S18	0.2%
CCAGAATTTTGATCCG	No hit	0.2%

表2. Stage1 の SAGE タグ 122060 本における出現頻度の高いものから 50 種類をリストアップした。頻度の最も高い (2.8%) タグは、機能不明の非コード RNA に相当する。Funaguma et al. (2007) より。

在しない。また、特に早い段階の Stage1 で ATP 合成酵素遺伝子など 277 個の遺伝子の発現が多いことも分かった。これらは Stage1 で起こる現象すなわち卵母細胞と栄養細胞の分化に関与している可能性がある (Funaguma et al., 2007)。表 2 に、Stage1 の SAGE 解析で得られたタグを、頻度の多い順に 1 位から 50 位まで示しておく。これらの情報は、今後卵母細胞の分化機構を解明するために役立つと思われる。

5. おわりに

以上のように、私たちの研究は、トランスクリプトーム解析を通して、カイコ特異的な遺伝子の存在や、昆虫に特徴的な生命現象における遺伝子発現を明らかにした。今後は、ゲノム情報や変異体などの資源をさらに高度に活用し、カイコのさまざまな生物機能を支配する分子機構を解明するとともに、その機構を操作・利用して、最終目的である蚕糸業および昆虫バイオテクノロジーの技術開発へ展開してゆかなければならない。

本研究の実施にあたっては、本文中に名前を挙げただけでなく、国内外の多くの研究者からご協力やご助言をいただいた。また、私の所属する昆虫遺伝研究室のスタッフと学生諸君のたゆまぬ努力が成果につながった。ここに深謝したい。なお、本研究は、文科省／学術振興会の科研費、農水省からの受託研究費等の支援を受けた。また、本研究に用いた生物の多くは、文科省ナショナルバイオリソースプロジェクト（九州大学）および農業生物資源研究所から分譲されたものである。

引用文献

- Adams, MD, Venter, JC. et al. (2000) *Science* 287: 2185-2195.
 伴野豊, 藤井博, 河口豊, 山本幸治, 西川和弘, 西坂章文, 田村圭, 江口誠一 (2005) カイコ突然変異体利用の手引き 2005 一遺伝子名と遺伝子記号— 1-30, 九州大学大学院農学研究院.
 C. elegans Sequencing Consortium (1998) *Science* 282: 2012-

2018.
 Daimon, T., Hamada, K., Mita, K., Okano, K., Suzuki, M. G., Kobayashi, M., and Shimada, T. (2003) *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33: 749-759.
 Daimon, T., Katsuma, S., Iwanaga, M., Kang, W.-K., and Shimada, T. (2005) *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35: 1112-1123.
 Daimon, T., Taguchi, T., Meng, Y., Katsuma, S., Mita, K., and Shimada, T. (2008) *J. Biol. Chem.* 283: 15271-15279.
 Funaguma, S., Hashimoto, S., Suzuki, Y., Omuro, N., Sugano, S., Mita, K., Katsuma, S., and Shimada, T. (2007) *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37: 147-154.
 International Silkworm Genome Consortium (2008) *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38: 1036-1045.
 Meng, Y., Katsuma, S., Mita, K., and Shimada, T. (2009) *Genes Cells* 14: 129-140.
 Mita, K., Morimyo, M., Okano, K., Koike, Y., Nohata, J., Kawasaki, H., Kadono-Okuda, K., Yamamoto, K., Suzuki, M. G., Shimada, T., Goldsmith, M. R., and Maeda, S. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100: 14121-14126.
 Ohshima, Y. and Suzuki, Y. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 74: 5363-5367.
 Ote, M., Mita, K., Kawasaki, H., Seki, M., Nohata, J., Kobayashi, M. and Shimada, T. (2004) *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34: 775-784.
 Sakurai, H., Fujii, T., Izumi, S., and Tomino, S. (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 7876-7880.
 Sato, Y., Oguchi, M., Menjo, N., Imai, K., Saito, H., Ikeda, M., Isobe, M., and Yamashita, O. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 90: 3251-3255.
 Toyama, K. (1906) *Bull. Coll. Agric. Tokyo Imp. Univ.* 7: 259-393.
 Watson, J. D. and Crick, F. H. C. (1953) *Nature* 171: 964-967.



【略歴：嶋田 透】

1982 年 東京大学農学部農業生物学科卒業
 1987 年 東京大学大学院農学系研究科博士課程 修了
 1987 年 (財)がん研究振興財団 リサーチレジデント
 1988 年 国立予防衛生研究所 (現 国立感染症研究所) 衛生昆虫部 研究員
 1990 年 東京大学農学部 助手
 1995 年 東京大学農学部助教授
 2004 年 東京大学大学院農学生命科学研究科 教授