

カイコゲノム情報を利用した比較ゲノム解析—特に胚休眠と遺伝子量補正に着目して—

●嶋田 透¹⁾ ◆鈴木 雅京²⁾

1) 東京大学大学院農学生命科学研究科 2) 理化学研究所

＜研究の目的と進め方＞

カイコは、ショウジョウバエには見られない生物学的特徴をもつ。ショウジョウバエのX染色体は遺伝子量補正機構をもつが、カイコのZ染色体はこれをもたないと考えられており、それゆえに雌雄で量的に異なる遺伝子発現様式を示す。また、カイコは、母親の経験した温度や日長によって、胚発生の初期に細胞分裂を停止し、休眠する場合がある。休眠卵を産下する世代は大きな繭を作ることなど、形態的・生理的な差異も示す。つまり同一のゲノムから発生過程の異なる二型が生じるのである。このような季節多型は変温生物に認められる適応戦略であるが、そのゲノム基盤は未解明である。本研究は、明らかになりつつあるゲノムの塩基配列および既存のカイコESTデータなどに加え、新たに完全長cDNAライブラリーの解析を実施することにより、遺伝子の同定と分類を行う。その結果を他生物ゲノムと比較することにより、カイコ独自の遺伝子もしくは遺伝子ネットワーク、あるいはゲノム構造上の特徴を解明する。

＜研究開始時の研究計画＞

カイコゲノムの塩基配列をもとに推定された遺伝子や、既知のESTに登録されている遺伝子の塩基配列を他の生物のゲノム情報と比較することにより、カイコの遺伝子を進化的関係に基づき以下の3つのクライテリアに分類する。1) ショウジョウバエやハマダラカなどの昆虫の遺伝子と最も高い相同性を示す遺伝子、2) 昆虫以外の生物の遺伝子と最も高い相同性を示す遺伝子、3) 他の生物の遺伝子と相同性を示さない遺伝子。続いてカイコの遺伝子をGene Ontologyに基づいてクラス分けし、カイコの遺伝子を機能的視点から整理する。また、カイコの遺伝子をタンパク質ファミリーごとに分類し、カイコが特に多くもつ、あるいは反対にカイコにおいて特に少ないタンパク質ファミリーを同定する。

カイコの性染色体は、雌がZW、雄がZZであり、性の決定にはW染色体の存否が強い影響を与える。一方で、鱗翅目の昆虫の多くではZ染色体の数が性を決定すると推定されている。ショウジョウバエのX染色体は遺伝子量補正機構をもつが、私たちは、カイコのZ染色体が量補正機構をもたないことを示す結果を報告してきた。性染色体はカイコゲノムに特異的な構造なので、網羅的な情報解析と発現解析を実施する。

＜研究期間の成果＞

1) 完全長cDNAライブラリーの作成とその配列解析
全ゲノムショットガン解析等によってカイコゲノムの塩基配列の大半が解読されようとしている。しかし、カイコの遺伝子はイントロンやUTRが長大で、それらの中に反復配列が挿入されていることが多い。そのため、遺伝子の同定を進めるには、完全長cDNAの塩基配列と照合することが不可欠である。そこで、カイコ翅原基および培養細胞BmNを用いて、それぞれオリゴキャップ法により完全長cDNAライブラリーを構築し、各々約12,000ク

ローンの5'および3'末端の塩基配列を解読した。得られた配列をデータベース化した結果、約90%のクローンが完全長のORFを含むcDNAであると推定された。翅原基のライブラリーから10個の新規なクチクラタンパク質遺伝子が発見され、その一部はカイコ特有のサブファミリーを形成した。また、翅原基および培養細胞のcDNAから、BmUSPに5種類のmRNAアイソフォームが存在することが判明するなど多くの情報が得られた。

(2) DNAマイクロアレイによる休眠卵の遺伝子発現解析

カイコの休眠卵では、胚子が囊胚期に細胞分裂を停止して胚休眠に入る。カイコの休眠には、母親から受け取る休眠ホルモンが必要であることが知られているが、休眠ホルモンの受容から胚子の細胞分裂の停止に至る分子機構は未解明である。休眠卵・非休眠卵からそれぞれ全RNAを抽出し、逆転写およびCy3/Cy5による標識ののち、約6,000種類のcDNA断片が搭載されているcDNAマイクロアレイとハイブリダイゼーションさせた。産卵後18時間および24時間について、休眠卵/非休眠卵間の比較をおこなったところ、RNA蓄積量が異なる遺伝子が複数検出された。すなわち、チトクロム酸化酵素のmRNAは非休眠に多く、アクチン重合阻害因子のmRNAは休眠卵で多かった。

(3) ESTデータベースの比較による休眠特異的発現遺伝子の探索

休眠卵のESTデータベースとしては、すでに産下後40時間の休眠性卵RNA由来のESTセット“e40h”、および産下後12時間、24時間、40時間の休眠性卵RNAの等量混合物に由来するESTセット“fdpe”が作成されている。胚休眠に伴って発現する遺伝子は、産下後40時間で特に発現量が多くなるはずなので、e40h、fdpe、その他、の3区分でのEST出現頻度を比較し、e40hに偏って現れるものを探せばよい。e40hライブラリーの762個のESTをCAP3プログラムによってアセンブルしたところ、88個のコンティグと469個のシングレットを得た。発現量の多い遺伝子に注目するため、3個以上のESTからなる37個のコンティグに注目した。これら37個のコンティグに対応するESTの出現頻度を、e40h、fdpe、その他のEST、の三者間で比較した。その結果、e40hに偏って現れる塩基配列を前述の37個のコンティグから10個のコンティグに絞られた。

実際にこれらに相当するRNAが休眠に伴い増加しているかどうか検証するため、二化性品種であるp50Tを高温明催青に続く短日で飼育し休眠卵を産卵させ、一方で同じ品種から低温暗催青および長日飼育で非休眠卵を得た。産下後6、12、24、36、48、72時間後の休眠卵と非休眠卵からそれぞれRNAを調製し、それらを用いてノーザンブロット解析を行った。その結果、10の候補のうち4種類のRNAが休眠卵に偏って発現することが明らかになった。それら4種類のRNAは、配列の相同性から、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK)、リンゴ酸脱水素酵素 (MDH)、脂肪酸不飽和化酵素 (desat3)、ならびにタバコスズメガのecdysone-regulated

16K protein、のそれぞれをコードしていると推定され、それぞれBmPepck1、BmMdh、desat3、BmEsl6を呼称した。BmPepck1は、産下後48時間および72時間の休眠卵で2.9kb、2.7kb、1.8kbの3本のバンドが強く検出されたが、非休眠卵での発現は非常に弱かった。BmMdh、desat3、BmEsl6の3種類のプローブでは、同様に産下後48時間と72時間の休眠卵で、それぞれ1本のバンドが特異的に検出された。

(4) 休眠に伴って発現上昇する遺伝子の構造と推定される機能

完全長cDNAライブラリーからBmPepck1、BmMdh、desat3、BmDmlに相当するクローンを選び、その全配列を解読した。BmPepck1に関しては、全ゲノムショットガンデータの解析から、ゲノム上によく似た遺伝子が二つあることが分かったが、休眠特異的に発現しているのはそのうちの一つだけである。それがコードするアミノ酸配列は他生物のPEPCKと高い相同性があり、翻訳産物はPEPCK活性を有すると想像された。BmMdhも他生物のMDHと高い相同性があった。PEPCKとMDHは、いずれも糖新生で重要な役割を演じる酵素である。これらのmRNAが休眠に伴って増加することは、休眠への移行期に活発な糖新生が起きていることを示唆している。

(5) カイコZ染色体の構造解析

カイコZ染色体の大規模な構造解析は、Bmkettin遺伝子周辺の領域でしか行われていない。本研究ではBmper、T15.180a、Rcf96、BmClockの3遺伝子をプローブとして、カイコのBACライブラリーを探索した。その結果、Rcf96を出発点として約270kbにわたるBACコンティグが作製できた。また、T15.180a、Bmper、およびBmClockをプローブとして、それぞれ約170kbの断片を含むBACを1個ずつ得た。得られたZ染色体由来のBACについて、ショットガン法で全塩基配列を決定した。その結果、Bmkettin周辺の約320kbにおいて、13個の遺伝子を同定した。またBmperのBACには1個の遺伝子を、Rcf96のBACからは4個の遺伝子を、T15.180aのBACからは、3個の遺伝子を、それぞれ同定した。ショウジョウバエのperが8個のエクソンから成るのに対し、Bmperが25個のエクソンから成る複雑な構造を持つことが判明した。Bmperの5'上流にE box配列CACGTGが認められた。ショウジョウバエのClkは4エクソンから成る遺伝子であるが、BmClkは11個のエクソンから成っていた。BmClkを含むBACには、他にABCトランスポーターMdr49、エステラーゼBmelt、オリゴペプチドトランスポーターopt1の各相同遺伝子が含まれていた。

Z染色体上の遺伝子のコードするアミノ酸配列から生物機能を推定したところ、Z染色体の遺伝子には神経機能や運動機能など行動に関わるものが多い傾向があったが、ハウスキーピング遺伝子と思われる遺伝子も存在していた。細胞あたりのこれらの遺伝子の発現量は雄で多い傾向があり、カイコでは遺伝子両補正が行われていないとする説を支持する結果であった。

(6) ショウジョウバエの遺伝子量補正装置の遺伝子に対応するカイコの遺伝子について

ショウジョウバエの遺伝子量補正を支える遺伝子であるmof、mle、msl-1、msl-2、msl-3、roX1、roX2の7遺伝子のうち、カイコのWGSやESTに存在していたのはmof、mle、msl-3だけだった。これら3者はタンパク質にまで翻訳されていたが、性染色体とは無関係であり、遺伝子量補正以外の機能を担っていると推定される。

〈国内外での成果の位置づけ〉

比較ゲノム解析により鱗翅目昆虫のモデルであるカイコの生物学的特性をゲノムワイドで理解しようとする最初の研究計画である。農水省では全ゲノムショットガン法によるカイコゲノムの解読を進めており、さらに文科省の未来開拓研究でもカイコW染色体の解読などが進められている。本研究は、それら関連研究と連携して情報を共有しながらゲノム機能研究を行っている。なお、カイコESTのPNAS論文は11月5日の東京新聞で紹介された：http://www.ab.a.u-tokyo.ac.jp/igb/tokyo-np_s.jpg

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

大腸菌およびカンジダに感染した幼虫の脂肪体から完全長cDNAライブラリーを作成してEST解析を実施した。新規な抗菌タンパク質遺伝子候補を含む興味深い配列が存在することに気づいているが、データをまだ十分に解析していない。また、休眠直前の胚子の完全長cDNAライブラリーも作成できEST配列は取得してあるが、情報解析は不十分である。

〈今後の課題〉

農水省のプロジェクトで行われた全ゲノムショットガンデータとの統合と、cDNAの全長配列の決定が課題である。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 1) 論文／プロシーディング（査読付きのものに限る）
 - ・ 0404062219: Kazuei Mita, Mitsuoki Morimyo, Kazuhiro Okano, Yoshiko Koike, Junko Nohata, Hideki Kawasaki, Keiko Kadono-Okuda, Kimiko Yamamoto, Masataka G. Suzuki, Toru Shimada, Marian R. Goldsmith, and Susumu Maeda (2003) The construction of an EST database for Bombyx mori and its application. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100(24): 14121-14126.
 - ・ 0404070125: 嶋田 透 (2003) カイコのゲノムが解き明かす昆虫の謎. 東京大学公開講座76「ゲノム 命の設計図」. 東京大学総合研究会編. 東京大学出版会. pp.185-216.
 - ・ 0408241212: Manabu Ote, Kazuei Mita, Hideki Kawasaki, Motoaki Seki, Junko Nohata, Masahiko Kobayashi, and Toru Shimada (2004) Microarray analysis of gene expression profiles in wing discs of Bombyx mori during pupal ecdysis. Insect Biochemistry and Molecular Biology 34(8): 775-784.
 - ・ 0408241218: Marian R. Goldsmith, Toru Shimada, and Hiroaki Abe (2005) The genetics and genomics of the silkworm, Bombyx mori. Annual Review of Entomology 50: 71-100.
- 2) データベース／ソフトウェア
 - ・ カイコ完全長cDNAデータベース
<http://papilio.ab.a.u-tokyo.ac.jp/kanzencdna/>
- 3) 特許など
なし
- 4) その他顕著なもの
なし