

2005

ニュースレター “おかいこさま”

No.5

National Bio-Resources Project "Silkworm"

ナショナルバイオリソースプロジェクト「カイコ」情報誌

平成17年11月1日発行 第5号

<http://kaiko.kyushu-u.ac.jp/index.html>

<http://www.nbrp.jp/index.jsp>

The screenshot shows a web browser window with the URL <http://www.ab.a.u-tokyo.ac.jp/kanzencdna/>. The page features a photograph of silkworm eggs and the title "カイコ完全長cDNAデータベース". Below the photo, there is a list of instructions for using the database, including links to "こちらのページ" (this page), "そちらのページ" (that page), and "こちらのページ" (this page). The right side of the screenshot shows a BLAST search results page with a sequence alignment viewer and a table of significant alignments.

ng significant alignments:	Score (bits)	E Value
	183	7e-85
	102	9e-22
	102	9e-22
	91	3e-18
	60	8e-18
	89	1e-17
	82	9e-16
	51	1e-14

カイコ完全長 cDNA データベース : BLAST による検索や任意のクローンの塩基配列取得などができる

●私の研究メモ

カイコのトランスクリプトーム解析 のための各種リソースとその応用



嶋田 透

東京大学大学院農学生命科学研究科

カイコのゲノム解析は、2004年に日本および中国からそれぞれ全ゲノムショットガン法(WGS)の解説結果が報告され、新たな段階に入りました。カイコのナショナルバイオリソースプロジェクトでは、東京大学大学院農学生命科学研究科と農業生物資源研究所(生物研)がゲノム解析の結果蓄積してきた遺伝子ライブラリー、cDNAクローンなどの頒布およびデータベース公開などを進めています(表紙、図)。

すでに、さまざまな発育段階のカイコの各種組織から計64種類のcDNAライブラリーが作成され、各々1000~10000クローンの5'末端塩基配列(EST=Expressed Sequence Tags)が決定されてきました。これは生物研の三田和英博士ら多くの研究者の協力によるものです。その結果、すでに10万以上のcDNAの末端配列が解説され、それらは約15,000の配列(遺伝子)に分類されています。カイコの遺伝子の総数は約2万個と推定されているので、約75%の遺伝子はcDNA断片として捉えられたこととなります。最近追加されたEST大部分は、オリゴキャップ法またはGキャップ法によって作成された完全長cDNAのESTですので、mRNA全長配列の取得やプロモーターの検索などの遺伝子機能の研究に従来以上に役立つ形になっています。

私たちの研究室では、カイコEST配列のデータベース「SilkBase」を
<http://www.ab.a.u-tokyo.ac.jp/silkbase/>
で公開しています。また、カイコの完全長cDNAのESTを集めたデータベースを
<http://papilio.ab.a.u-tokyo.ac.jp/kanzencdna/>
で公開しています。これらのEST配列を用いてプロモ

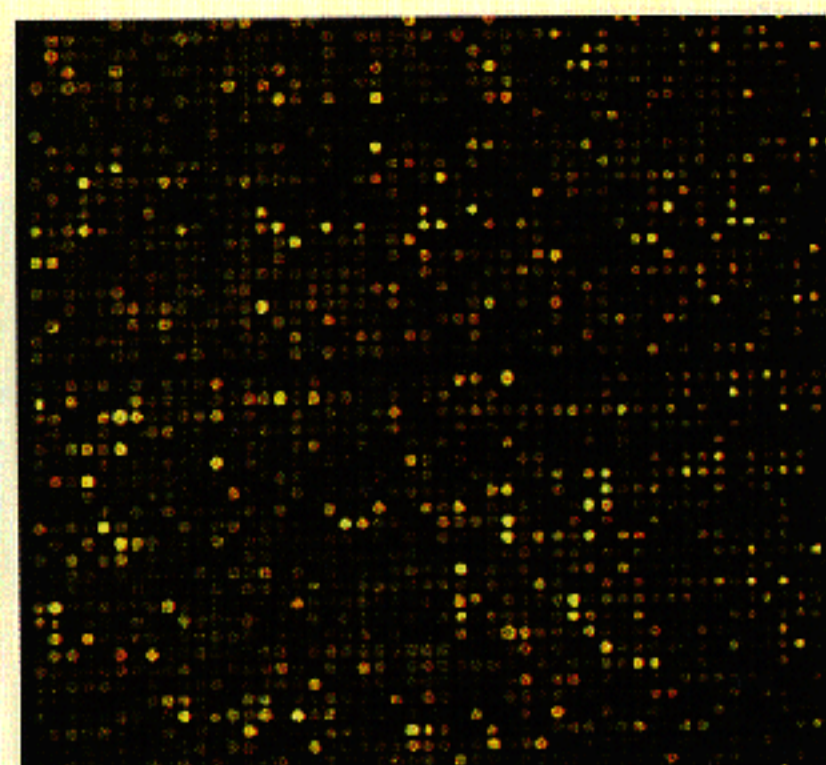


図1. カイコ翅原基のマイクロアレイ解析の一例
赤や緑で見えているスポットは、その時期の翅原基で量的に変動していることを示す

ーターやイントロンの配列を知るには、WGS配列を対象にした検索を

<http://sgp.dna.affrc.go.jp/> (日本・生物研)

<http://silkworm.genomics.org.cn/> (中国 BGI)

などで実行するか、または、WGS配列のデータセットそのものを

<ftp://ftp.ddbj.nig.ac.jp/database2/wgs/>

(ファイル名:日本は BAAB.gz、中国は AADK.gz)から一括ダウンロードして解析することになります。

ESTとは別に、日本・中国・フランスなどでSAGEデータベースが構築されつつあります。SAGEとはSerial Analysis of Gene Expressionの略で、mRNAの末端近傍から14~21塩基の短い配列を抽出し、多数のタグを1個のプラスミドに詰め込んで配列決定する技術です。現在、東大・新領域創成科学研究科の菅野・鈴木研の協力のもとに著者らの研究室が得た約25万のタグ配列を公開するために準備を進めています。cDNAマイクロアレイは現在のゲノム機能解析に必須のツールです。カイコでは、私たちの研究室が中心になって開発した約6000個のcDNAアレイと、最近生物研が中心になって開発した約15000遺伝子に相当する配列を登録したオリゴアレイの2種類があります。前者はEST配列のうち約500塩基をPCRで増幅してスライドガラスに載せたものであり、後者は60塩基のオリゴマーをスライドガラス上に配置したものです(図1)。

これらゲノム関連リソースを用いて著者らの研究室で行ったトランスクリプトーム解析の実例を以下に二つほど述べます。

【応用例1】cDNAマイクロアレイを用いた脱皮特異的カルボキシペプチダーゼの発見

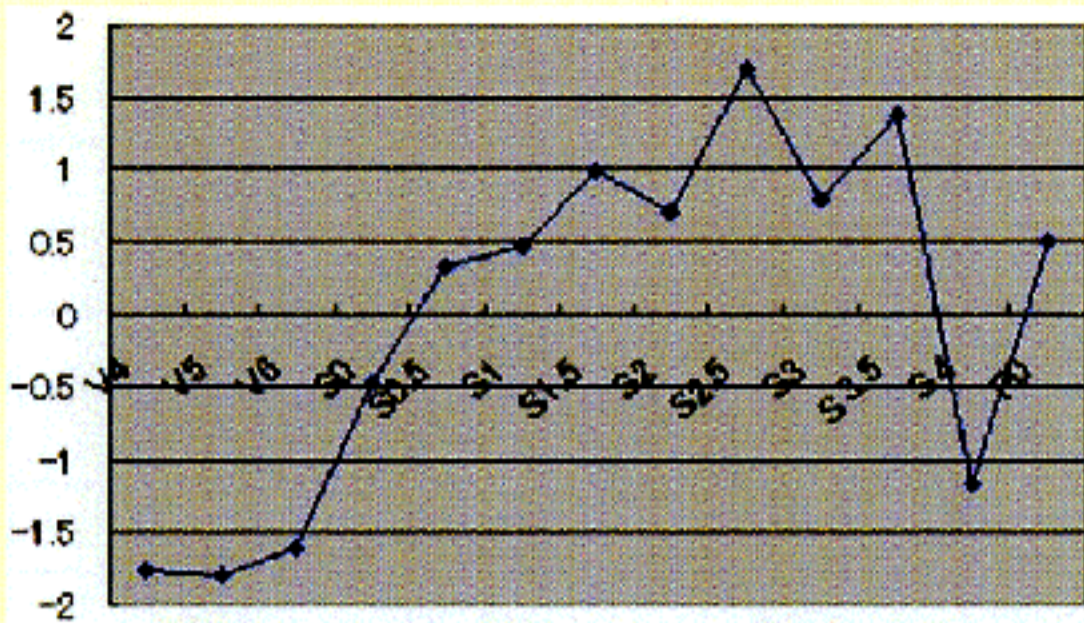


図 2. 翅原基における新規なカルボキシペプチダーゼ MF-CPA の mRNA の量的変動：上蔟期に mRNA が急増している

翅原基は、幼虫から蛹への変態に先立って急激な細胞増殖と細胞分化を示す組織であり、変態の機構を探るのに格好の研究対象です。私たちの研究室の大手らは、5 齢幼虫中期から蛹化期にかけて経時的にサンプリングした翅原基より RNA を調製し、マイクロアレイによって分析しました。その結果、2998 個の遺伝子に対応する mRNA からシグナルが検出され、そのうち 683 個の遺伝子が発育段階依存的な mRNA 量の変動を示しました。特に上蔟期に発現が上昇する遺伝子は、エクジステロイドへの応答性がある可能性が高いので注目されます。それらは、タンパク質分解、キチン分解、アミノ酸代謝などに関わる遺伝子を多く含んでいました。私たちは、いくつかのタンパク質分解酵素コード遺伝子に注目して詳しい解析を行った結果、新規なカルボキシペプチダーゼ (MF-CPA と呼称) をコードする遺伝子を見ました。バキュロウイルスに発現させた MF-CPA タンパク質は、実際にカルボキシペプチダーゼ活性を有していました。抗体を作ったところ、MF-CPA は脱皮期の新旧クチクラ層の間隙 (脱皮液) に存在していました。MF-CPA は別のプロテアーゼと共同してクチクラ構成タンパク質を分解し、アミノ酸を再利用する機能を持つと推定されました (図 2)。

マイクロアレイは、このような時期特異的に発現する遺伝子の探索ばかりでなく、組織特異性、雌雄差、培養条件依存性、感染誘導性、環境依存性、薬物応答性など多くの目的に利用できる可能性があります。

【応用例 2】比較 EST 解析による休眠卵特異的発現遺伝子の発見

カイコの EST は、64 種類の異なる発育段階・組織から得られているので、それらの解析から発育段階特異的、あるいは組織特異的な遺伝子を抽出することが可能です。産卵後 12・24・40 時間の卵の RNA の等量混合物から作成した cDNA ライブラリー (e40) と、

同 40 時間の卵の RNA のみから作成した cDNA ライブラリー (fdpe) からそれぞれ BST データベースを構築し、両者のデータベースを計算機でアセンブリすることにより、同一配列の出現回数を比較してみました。その結果、e40 での発現頻度が fdpe よりも顕著に高い遺伝子を多数発見しました。実際に cDNA クローンをプローブとしてノーザン解析をすると、図 1 に示すように、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK) 遺伝子、リンゴ酸脱水素酵素 (MDH) 遺伝子など計 5 個の遺伝子で、細胞分裂が停止する産卵後 40 時間前後で休眠卵に特異的に発現することが確認されました。なお、cDNA 塩基配列およびゲノム配列の詳細な検討の結果、カイコには塩基配列のよく似た PEPCK 遺伝子が二つあることが判明しましたが、休眠卵で発現しているのはそのうちの片方だけでした。

PEPCK と MDH は、哺乳動物では糖新生の鍵酵素として知られており、飢餓条件でアミノ酸等から糖を合成する機能があります。カイコの休眠卵では耐寒物質であるソルビトールやグリセロールを合成するために、多量のグルコースが使われることが知られています。おそらく、解糖系だけで足りないグルコースを補充するために、糖新生の経路が休眠卵特異的に動いているものと推察されます (図 3)。

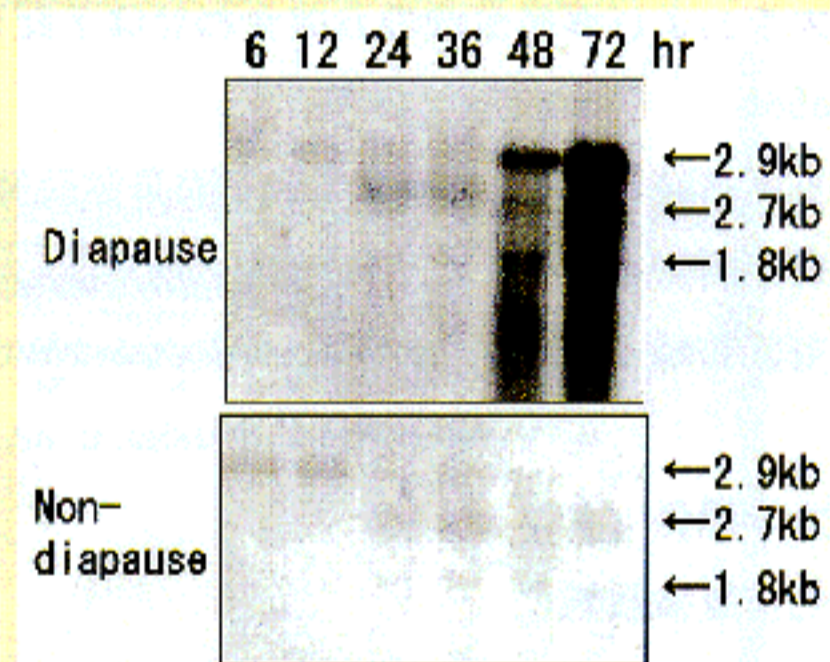


図 3. カイコの休眠卵と非休眠卵における PEPCK mRNA の量的比較休眠卵では産卵後 48 時間以降に 3 種類の mRNA が強く発現しているが、非休眠卵ではほとんど発現が認められない

BST データベースは、以上のような単純な比較を実行するだけでも多くの新規な知見が得られます。さらに現在整備が進められている SAGE データベースとの対応が進んでゆけば、より精度の高い遺伝子発現プロフィールを読み取ることができると期待されます。そのような研究においては、ナショナルバイオリソースプロジェクトが提供している cDNA クローン等の資源が重要な材料になるでしょう。

分譲可能なリソースの紹介

●中核機関（九州大学）関係

冬場もカイコが入手できます。

カイコの系統分譲は春に限定される場合が普通でした。本事業では年間を通しての提供を行っており、既に多くの方に御利用頂いています。基本的には卵で分譲しますが、希望があれば、幼虫・蛹・成虫などでの供給も行っています。

桑葉も供給可能です。

冬期の飼育は通常、人工飼料育となります。しかし、九州大学には鹿児島県指宿市に試験地があり、12月まででしたら桑葉が供給出来ます。また、表のように年内は桑葉でのカイコの飼育依頼も可能です。

本年5回目のカイコ飼育スケジュール

時期	孵化日	幼虫時期	蛹時期
5期	11月18日	11月18～12月10日	12月10～20日

カイコ並びにクワコの DNA を分譲しています。

中核機関で保存しているカイコ系統 500 系統、及びカイコと近縁なクワコの DNA レポジトリを本事業では構築しています。クワコに関しては、北海道から鹿児島県までを含む、全国の20数県から採集したクワコの DNA が分譲可能となっていますのでご利用下さい。

九州大学および事業全般のお問い合わせは下記まで

☎812-8581

福岡市東区箱崎 6-10-1 九州大学大学院農学研究院
遺伝子資源開発研究センター：伴野 豊

福岡市東区箱崎 6-10-1 TEL&FAX 092-624-1011

banno@agr.kyushu-u.ac.jp

●信州大学関係

染色体置換系統

ゲノム情報の解析や多くの実験系に使用されているカイコ系統 p50T は「大造」系統に由来します。この大造系統を突然変異系統に連続戻し交配して、目的の突然変異遺伝子以外はほぼ大造の遺伝的背景と見て差し支えない突然変異系統ラインを NBRP では育成しています。現在まで育成された遺伝子と系統名は以下の通りです。分譲のお問い合わせは信州大学金勝もしくは中核機関へお願いします。

金勝アドレス：rkaneka@giptc.shinshu-u.ac.jp

SU-C-000	大造	SU-C-003a	Bo
SU-C-001	Ze L K	SU-C-004	ae/ae
SU-C-001a	Ze	SU-C-005	Ta C

SU-C-001b	L	SU-C-005a	Ta
SU-C-001c	K	SU-C-005b	C
SU-C-002	p ⁵⁰ P ⁵⁰	SU-C-006	Nd-s U
SU-C-002a	p ⁵⁰	SU-C-006a	Nd-s
SU-C-002b	E ⁵⁰	SU-C-006b	U
SU-C-003	Bo K	SU-C-007	Nd-2
SU-C-008	pnd/pnd	SU-C-012	ow bts/ow bts
SU-C-009	sol/sol	SU-C-012a	ow/ow
SU-C-010	lem q/lem q	SU-C-012b	bts/bts
SU-C-010a	lem/lem	SU-C-013	fl/fl
SU-C-010b	q/q	SU-C-100	育熱
SU-C-011	bd ^f tub/bd ^f tub	SU-C-101	pnd/pnd
SU-C-011a	tub/tub	SU-C-200	関 33
SU-C-011b	bd ^f /bd ^f	SU-C-201	pnd/pnd

野蚕関係

下表の野蚕の分譲が可能ですのでお問い合わせ下さい。連絡は信州大学梶浦もしくは中核機関へお願いします。梶浦アドレス：zkajiur@giptc.shinshu-u.ac.jp

種名	発育段階	時季	量
ヤマユガ	卵	9月～翌4月	100粒
	幼虫	5月～6月	10頭
	蛹	7月～8月	10頭
	蛾	8月	10頭
	サクサン	幼虫	5月～6月 8月～9月
	蛹	9月～翌4月	30頭
エリサン	幼虫	春夏秋冬 1～2回	30頭
	蛹	春夏秋冬 1～2回	30頭
シンジュサン	蛹	9月～翌7月	30頭

ニュースレター“おかいこさま”編集・発行

☎812-8581

福岡市東区箱崎 6-10-1 九州大学大学院農学研究院
遺伝子資源開発研究センター内

ナショナルバイオリソースプロジェクト

「カイコ」中核機関代表 藤井 博

TEL 092-621-4991 fujii@agr.kyushu-u.ac.jp