

研究成果報告書

【申請者氏名】

神村 学

【所属機関】

農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門

【研究題目】

構造色遺伝子のカイコへの導入：構造色を帯びたカイコ、絹糸作出の試み

【研究目的】

生物、なかでも昆虫は構造色の宝庫である。構造色は光の波長程度のサイズの微細構造が作り出す色であり、染料・顔料に比べて退色しづらく、毒性や環境負荷が小さいという優れた特性を持つ。そのため、生物の構造色を生み出す物理構造を明らかにして産業利用しようという生物模倣（バイオミメティクス）研究が盛んに行われている。モルフォチョウ（南米に生息するメタリック・ブルーをした蝶）の翅の色を模倣した繊維や塗料が開発されたことはその好例である。しかし、構造色を作り出す分子生物学的機構、すなわちどんな遺伝子やタンパク質がどのような機能を発揮することにより発色するかは、いずれの生物でもほとんどわかっていない。

このような中、研究代表者の神村は、コガネムシから構造色発色に必須の遺伝子 *LCPI* を発見した。この遺伝子の発現を抑えると、どのコガネムシでも構造色が消えてしまうことから（図1）、この遺伝子はコガネムシが構造色を発色する上で鍵となる機能を担っていると考えられる。これは世界で初めて発見された昆虫の構造色遺伝子であり、産業利用を含めて様々な方向に展開可能な研究の芽になるものと考えている。

そこで、本研究では、このコガネムシの構造色遺伝子をカイコに導入ことにより、構造色による色彩を発現マーカーなどの分子遺伝学的ツールとして利用する可能性を検討するとともに、新たな衣料素材として利用可能な構造色を帯びた絹糸を作り出せないか調べた

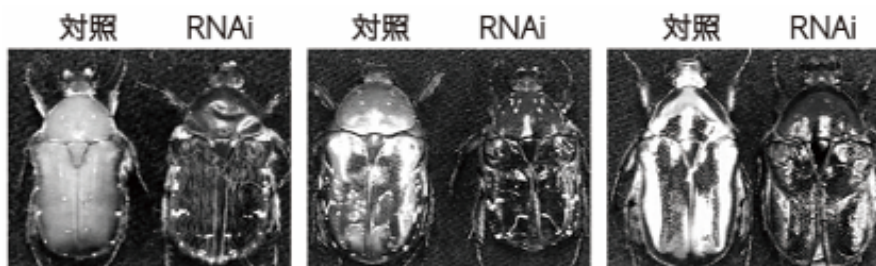


図1 3種のコガネムシにおける構造色遺伝子 *LCPI* の発現抑制実験

LCPI 遺伝子の RNAi により3種全てのコガネムシで構造色が消えて真っ黒になった。写真は左から、ナミハナムグリ、キョウトアオハナムグリ、リュウキュウツヤハナムグリ。

【研究内容及び成果】

本研究では、緑色と赤銅色の構造色を持つコガネムシの1種ナミハナムグリ *Cetonia pilifera* の *LCP1* cDNA のコード領域全長を導入したトランスジェニック・カイコ系統を作出し、GAL4-UAS バイナリー発現システムを使って表皮を含む全身および後部絹糸腺のみで発現することを試みた(図2)。ただ、令和3年2月末時点では、作出した *LCP1* 遺伝子発現カイコのステージが4齢幼虫期にとどまるため、蛹と成虫の組織の観察と繭の色彩の観察は間に合わなかった。ここでは、行った実験内容と得られた成果を項目ごとにまとめ、予定していたが間に合わなかった解析については、次の【今後の課題】で述べる。

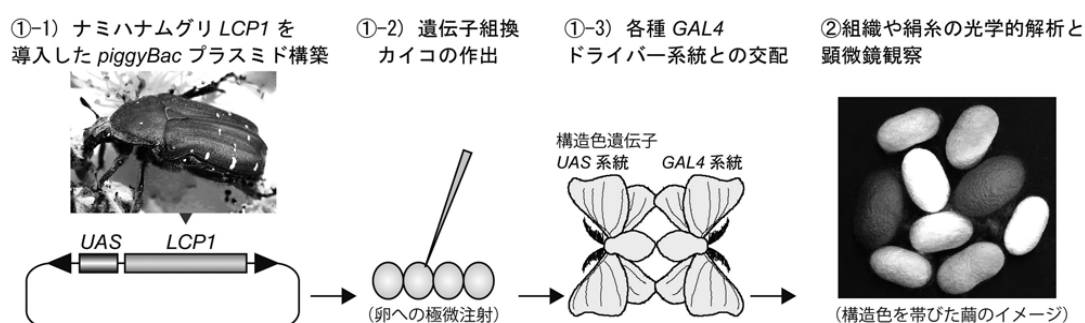


図2 カイコに構造色を付与する実験のスキーム

①コガネムシの構造色発色の鍵となる遺伝子 *LCP1* 遺伝子を導入した *UAS-LCP1* トランスジェニック・カイコ系統を作出し、*GAL4-UAS* バイナリー発現システムを使って表皮を含む全身もしくは後部絹糸腺のみで発現させて、②体表クチクラに構造色を付与できないか、また、構造色を帯びた絹糸を作り出せないかを調べた。

① コガネムシの構造色遺伝子 *LCP1* を発現するカイコ系統の作出

ナミハナムグリの構造色遺伝子 *LCP1* を *piggyBac* プラスミド (1-3)pBacMCS[UAS-SV40, 3xP3-egfp] にサブクロニングした。(1-3)pBacMCS[UAS-SV40, 3xP3-egfp]は、*UAS* プロモーターの下流に目的の遺伝子を挿入でき、また、眼で強く発現する *3xP3* プロモーターにより *GFP* 遺伝子が発現するカセットを持つため、*piggyBac* プラスミドの注射後に目的の遺伝子がカイコゲノムに組み込まれたかどうかを、幼虫単眼が緑色蛍光を持つかどうかで判別できるようになった *piggyBac* プラスミドである。また、まだ *LCP1* タンパク質の抗体を作成できていないため、タンパク質の発現確認用に、*LCP1* タンパク質の C 末端にヘルペスウイルス (herpes simplex virus) 由来の HSV タグと x6 ヒスチジンタグを結合させた融合タンパク質として発現させた。

得られたプラスミドのシークエンスを確認した後、w1-pnd 系統の初期胚に、トランスポザーゼを発現するヘルパーDNA ベクター及びヘルパーRNA とともに顕微注射した。そして、組換え当代を sib 交配して取得した T1 世代において、産卵の1週間後(気管螺旋糸発生期)に単眼の緑色蛍光の有無により遺伝子導入の有無を確認した。9 蛾区の導入系統が得られたが、最終的に 4 系統に絞り込んだ。

次に、このようにして得られた *UAS-LCP1* 系統と *actin A3* 遺伝子プロモーターにより *GAL4* 転写因子を発現誘導する *A3-GAL4* 系統、もしくは *fibroin heavy-chain (FibH)* 遺伝子プロモーターにより *GAL4* 転写因子を発現誘導する *FibH-GAL4* 系統と交配させ、 F_1 個体で *GAL4/UAS* のバイナリー発現システムを使って、全身 (*actin A3* 遺伝子プロモーターにより発現誘導) もしくは後部絹糸腺のみ (*FibH* 遺伝子プロモーターにより発現誘導) で *LCP1* 遺伝子を発現させた。それぞれの交配には異なるロットの *UAS-LCP1* 系統を用いた。両 *GAL4* ドライバー系統は *3xP3* プロモーターにより *dsRed* 遺伝子が発現するために眼が赤い蛍光を発する。そこで、緑色と赤色の両方の蛍光を発する個体を選んでその後の実験に用いた。

② *LCP1* 遺伝子発現カイコの構造色の有無の確認

作出した *FibH-GAL4/UAS-LCP1* 系統および *A3-GAL4/UAS-LCP1* 系統が令和3年2月末時点で4齢幼虫であるため、このステージで体表における構造色の有無を確認するとともに、解剖して絹糸腺が構造色発色しているかを調べた。

体表における構造色の有無を、*UAS-LCP1* 系統、*FibH-GAL4* 系統、*FibH-GAL4/UAS-LCP1* 系統および *A3-GAL4/UAS-LCP1* 系統の間で比較したが、表皮に構造色が発現することが期待される *A3-GAL4/UAS-LCP1* 系統を含めて構造色が観察できた系統は無かった (図3)。

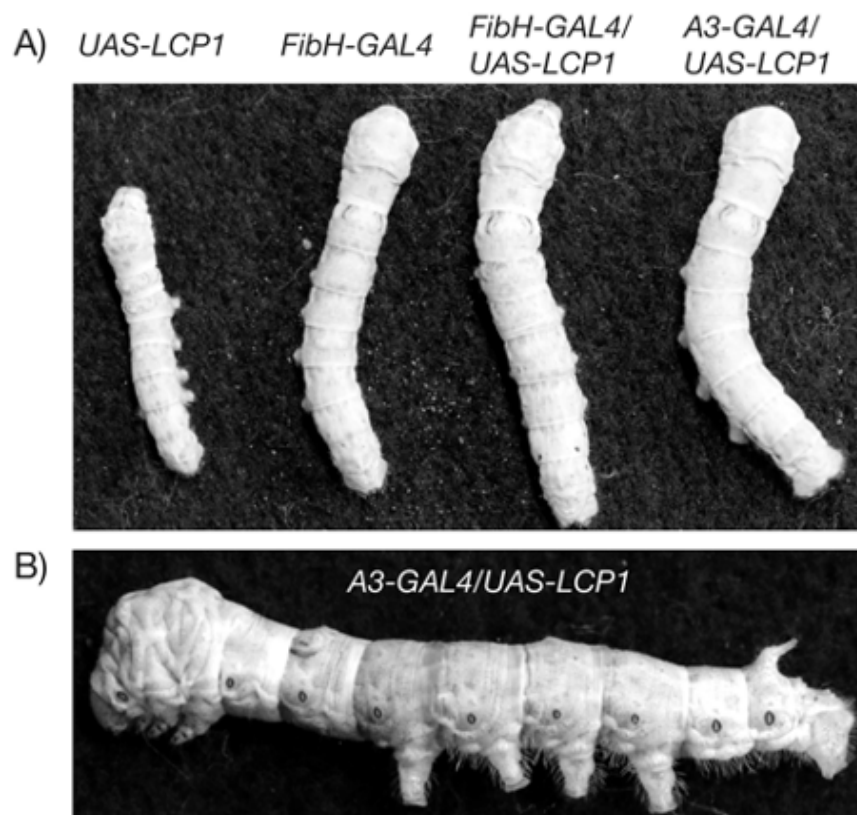


図3 *LCP1* 遺伝子を導入したトランスジェニックカイコの体色

A) 各系統の体色の比較。いずれの個体でも構造色は確認できなかった。B) *A3-GAL4/UAS-LCP1* の体側面の拡大図。体表で *LCP1* 遺伝子を強く発現していた *A3-GAL4/UAS-LCP1* 系統でも構造色は確認できなかった。

次に、絹糸腺が構造色を帯びているかを、絹糸腺を摘出して観察した。*UAS-LCP1* 系統、*FibH-GAL4/UAS-LCP1* 系統および *A3-GAL4/UAS-LCP1* 系統の間で比較したが、絹糸腺についても、構造色が強く発現することが期待される *FibH-GAL4/UAS-LCP1* 系統を含めて構造色が観察できた系統は無かった (図 4)。

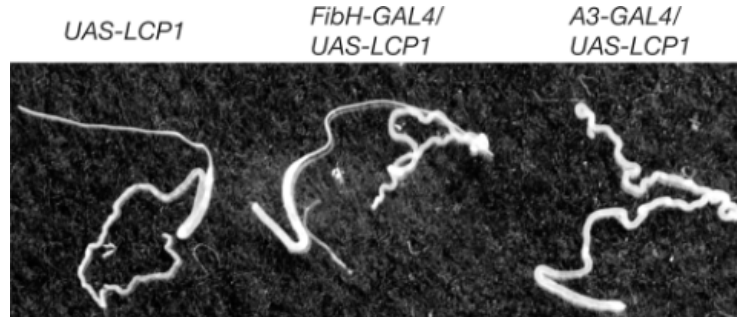


図 4 *LCP1* 遺伝子を導入したトランスジェニックカイコの絹糸腺の色彩
いずれの系統でも色彩の変化は認められなかった。

最後に、各系統への *LCP1* 遺伝子の導入の有無と発現レベルを、それぞれゲノム DNA と各組織由来の cDNA を鋳型に使った PCR で確認した (図 5)。*A3-GAL4/UAS-LCP1* 系統ではゲノムへの *LCP1* 遺伝子の導入、真皮と後部絹糸腺での *LCP1* mRNA の発現ともに確認できた。一方、*FibH-GAL4/UAS-LCP1* 系統では、ゲノム DNA を鋳型に使った PCR では微弱なシグナルしか確認できず、RT-PCR ではまったくシグナルを確認できなかった。眼の赤色蛍光は確認できているので、ゲノムへの組換えは起こっていると考えられるが、交配に使った *UAS-LCP1* 系統 (*A3-GAL4/UAS-LCP1* 系統の作出とは異なるロットを使用) では予想外のことが起こっているのかもしれない。また、別のロットの *UAS-LCP1* 系統ではゲノムへの *LCP1* 遺伝子の導入を確認すると共に、後部絹糸腺でのリーキーな発現も確認した。以上の結果から、*FibH-GAL4/UAS-LCP1* 系統では、交配に使った親の *UAS-LCP1* 系統に問題がある可能性が示唆された。

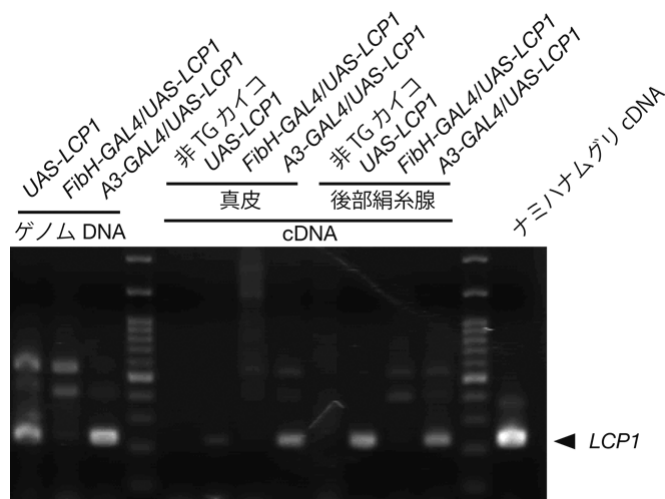


図 5 PCR によるゲノムへの *LCP1* 遺伝子の挿入と組織での *LCP1* mRNA の発現の確認

以上、4 齢幼虫では、体表、絹糸腺共に、*LCP1* 発現カイコで構造色の発現は確認できなかった。

【今後の課題】

飼育が間に合わなかったため、今回の報告では、4 齢幼虫期での体組織の色彩への影響までしか調べられなかったが、今後さらに飼育を続け、当初計画に沿って 5 齢幼虫や蛹、成虫の色彩、さらに繭の色彩を調べる必要がある。特に、この研究の主要な目的である、絹糸に構造色を付与できるかどうかについては、今飼育している系統は問題がある可能性があるため、別ロットで交配を行い最優先で調べたい。

全身での発現誘導に使った *actin A3* 遺伝子プロモーターは全ステージを通して強い発現を誘導できるので、4 齢期幼虫でも十分量の *LCP1* mRNA を発現できているはずである。実際、RT-PCR で強い発現を確認できている。それにも関わらず、*A3-GAL4/UAS-LCP1* 系統で構造色が見られないことから、*LCP1* タンパク質単独では構造色が作り出せないのかも知れない。コガネムシの仲間でも、構造色は成虫期だけで見られ、幼虫期には見られない。もしかしたら、成虫の皮膚形成に関わる他の因子が構造色の発色に必要なのかも知れない。この点は、飼育を続け成虫での色彩を観察することである程度は検証可能と考えている。

もしくは、発現した *LCP1* mRNA からうまくタンパク質が翻訳できていないか、翻訳されてもすぐに分解されたのかも知れない。これまで、大腸菌の系とバキュロウイルス&昆虫培養細胞の系で *LCP1* タンパク質の発現を試しているが、前者では全長タンパク質がうまく発現できず、後者では発現できるものの、収量が非常に少なく、また、精製の過程で非常に分解しやすい。これらの結果は、*LCP1* タンパク質がコガネムシの表皮以外で不安定なことを示唆しており、カイコの表皮でもうまく発現できていない可能性が考えられる。今後、C 末端に結合させている HSV タグや his タグに対する抗体を使った western blotting で *LCP1* タンパク質の発現の有無を確認したい。

LCP1 タンパク質が発現については、*FibH-GAL4/UAS-LCP1* 系統の 5 齢幼虫期の中部絹糸腺における発現（蓄積）の有無についても注目している。上述したように、これまで大腸菌の系とバキュロウイルス&昆虫培養細胞の系で *LCP1* タンパク質の発現を試しているが、うまくいっていない。*FibH-GAL4/UAS-LCP1* 系統の絹糸腺で *LCP1* タンパク質を大量に発現させることができれば、このカイコを組換え *LCP1* タンパク質の供給元として使うことも可能になり、*LCP1* タンパク質を使った様々な生化学的解析が可能になる。このような展望も視野に入れて、*FibH-GAL4/UAS-LCP1* 系統の絹糸腺での *LCP1* タンパク質の発現についても調べていきたい。

【発表論文等】

神村学 (2021) 「昆虫の構造色の研究：発色機構の解明と利用を目指して」 令和 3 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 日本蚕糸学会第 91 回大会 特別シンポジウム「データ解析を駆使した新しい昆虫研究展開」で得られた成果の一部を紹介する予定