絹蛋白の合成と遺伝子工学

田村 俊樹

はじめに

近年分子生物学の発展に伴い、遺伝子工学と呼ばれる一連の技術が開発された。この遺伝子工学は一口で言えば、DNAを適当な大きさの断片にして、それぞれの断片をプラスミド等のベクターに組み込み、これを大腸菌中で増やすことにより、生物の複雑なDNAを断片毎に分け、それぞれを純化して分析することを可能にした技術と言える。たとえば、フィブロイン遺伝子等の特定の遺伝子を有するDNAの断片をプラスミドに組み込み、大腸菌で増やすことにより、mg単位の大量の純化されたDNAを得ることができる。このDNAを用いることにより、シーケンス等の遺伝子の構造解析が可能になるとともに、遺伝子の発現制御等の研究を行うことが出来るようになる。DNAは生物の情報源であり、DNAからRNAが合成され、メッセンジャーRNA(mRNA)のコードに従って蛋白が合成されるという過程は全生物共通の基本的メカニズムであり、絹蛋白の合成も勿論例外ではない。

絹蛋白は70%以上を占めるフィブロインと、その周囲をコートしているセリシンの2種類の蛋白から構成されている。両者に関しては、古くから研究が行われ、多くの研究蓄積がある。これらの研究蓄積に基づいて、近年鈴木らによってフィブロインのmRNAが単離され、遺伝子がクローニングされるとともに構造が明らかにされ、基本的な合成のメカニズムが明らかにされた。一方、セリシンの遺伝子についても、単離、構造解析が行われほぼ基本的メカニズムは明らかにされたといえよう。また、近年その存在が明らかにされたフィブロインを構成するもう一つの蛋白P25についても研究が進められている。さらには、カイコ以外の昆虫のフィブロイン遺伝子がク

ローニングされ、進化学的見地からのフィブロイン遺伝子の比較生化学ともいべき研究が行われている。加えて、絹蛋白合成に関して、合成の効率に関与すると考えられる絹糸腺特異的tRNAやリボゾーム遺伝子の研究も進みつつある。

このように、絹蛋白合成に対する遺伝子工学的アプローチは多岐にわたっており、その全てを限られた紙面で紹介するのは困難であるため、ここではカイコのフィブロイン遺伝子、セリシン遺伝子、P25遺伝子およびカイコ以外の昆虫のフィブロイン遺伝子に関する最近の遺伝子工学を利用した研究に絞って述べることにする。

1. カイコのフィブロイン遺伝子

カイコのフィブロインは、5齢後期に大量に後部絹糸腺によって合成され、中部絹糸腺中に蓄積される。フィブロインは、分子量約350,000ダルトンの巨大なタンパク質であり、アミノ酸含量に占めるグリシンとアラニンの割合が高く、結晶領域の一次構造は(Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser)_nで代表されるように、非常に特殊な配列の繰り返しから構成されている蛋白である。この分子量の巨大さとアミノ酸配列の特殊性を利用して5齢後期の後部絹糸腺から高分子のRNAを分離することにより、鈴木、Brownにより、初めて1972年にフィブロインmRNAが単離され化学的にフィブロインのmRNAであることが同定された¹⁾。続いて、1976年にはアクチノマイシン存在下の密度勾配遠心法によりカイコのゲノムのDNAからフィブロイン遺伝子を部分的に濃縮し、このDNAをプラスミドに挿入し、32PでラベルしたフィブロインmRNAでスクリーニングすることにより、遺伝子がクローニングされた²⁾。そして以後の一連の研究により、フィブロイン遺伝子の構造は第1図のようなも

Silk Synthesis and Genetic Engineering

筆者紹介 Toshiki Tamra, National Institute of Sericultural and Entomological Science. 農林水産省蚕糸・昆虫農林技術研究所遺伝子工学研究室長、農学博士

筆者は、カイコの遺伝ならびに遺伝生化学を専門とされている。

本稿では、遺伝子工学の手法を用いて、どのようにして絹タンパクの生成機構が解析されているかを紹介して頂いた。

2. カイコの P25 遺伝子とセリシン遺伝子

カイコのフィブロインは、最近まで分子量35万の一種類の蛋白から構成されていると考えられてきた。しかし、最近フィブロインを β -メルカプトエタノール等の還元剤で処理すると、分子量35万のH鎖に加え分子量2万5千のL鎖が現れることが報告された⁷⁾。これまで一般にフィブロインと言えはH鎖のことだけが考えられていたが、このL鎖の発見以来、フィブロインについて考える場合、2つの蛋白について考えねばならなかった。このL鎖は分子量が約25キログルトンであるところからP25蛋白と命名された。このP25蛋白は、フィブロインのH鎖とはほぼ同じモル数だけ存在する。Coubleらのグループの研究によると⁸⁾、フィブロインH鎖とP25蛋白遺伝子の後部絹糸腺における発現は全くシンクロナイズしており、同じ細胞内で同じモル数のmRNAが発現することが確認されている。両方の蛋白はほぼ等しいモル数存在することからこの蛋白は1:1の割合でフィブロインH鎖と結合し、フィブロインを構成すると考えられる。このP25蛋白の役割についてはまだ十分わかっていないことが多い。しかし、遺伝子についてはCoubleらによりクローニングされ、その構造が報告されている⁹⁾。しかしながら、この遺伝子は東北大学のグループでクローニングしたP25遺伝子とは異なるという情報もあり、この点については今後の進展が待たれる。

セリシンはフィブロインとは異なり中部絹糸腺中で合成される多数種類の蛋白の総称である。この遺伝子については最初Okamotoらにより5'端とその上流領域がクローニングされ構造解析が行われた¹⁰⁾。この時点においては、遺伝子の3'端側はクローニングできなかった。これは後に明らかになるが、セリシン遺伝子のコア領域は制限酵素Eco R1の切断位置が非常に多く、そのためEco R1で部分的に消化しベクターのEco R1サイトにゲノムDNAを挿入するという従来もっとも一般的に用いられていた手法では、このコア領域をクローニングすることはできないためであった。このことは、最近、フランスのグループにより同じ遺伝子がクローニングされることが明らかになった¹¹⁾。

また同じグループの研究から¹²⁾、セリシンは少なくとも6種類以上の蛋白から構成されているにもかかわらず、遺伝子の数としては2つしかないことが分かった。先に述べた遺伝子は、セリシン1遺伝子であり(第2図)、もう一つはセリシン2遺伝子と呼ばれる。そして、これらの研究からセリシンの場合、遺伝子が2つしかないにもかかわらず、多種類の蛋白が作られるのは、スプライ

セリシン1 遺伝子 = 24 kb

第2図 セリシン遺伝子1の構造とコア領域の塩基配列の一部(10)(11)より改写)

シングの起きる位置が中部絹糸腺細胞の種類と発現時期により異なるためであることが明らかにされた。

たとえば、セリシン1遺伝子の場合、第2図に示したような構造を持ち、多くのエクソンとイントロンが存在する。セリシン1遺伝子からは、10.5、9.0、4.0および2.8kbのmRNAが作られ、セリシン2遺伝子からは5.4と3.1kbのmRNAが作られる。このmRNAに従って蛋白は作られるため結果として、各種の大きさのセリシンが作られる。このことは、遺伝子の発現制御機構を考える上で非常に興味深い現象である。

一方、フィブロインとセリシン遺伝子は遺伝子発現の制御機構を考える上で、ユニークな実験系であるといえる。何故なら、フィブロイン遺伝子は後部絹糸腺でのみ、またセリシン遺伝子は中部絹糸腺でのみ発現するため、異なった組織による遺伝子の発現制御機構の研究を行う上でのモデル系として非常に有用である。この系については、*in vitro*の転写系を用いた研究が進んでおり、近い将来、セリシン遺伝子特異的に働くトランスの要因とフィブロイン遺伝子特異的に作用する要因が単離され、絹糸腺に関する遺伝子の発現制御機構の全貌が明らかにされることが期待される。

3. カイコ以外のフィブロイン遺伝子

フィブロインはカイコだけでなく、広く節足動物全般にわたって各種のものが存在する¹³⁾。一般に繊維として利用されているのは、テンサンやサクサン等野蚕と一般に呼ばれているヤマモユ蛾科の昆虫の作るフィブロインである。これらの生物の作る多種多様のフィブロインは結晶構造のX線解析パターンより分類され、カイコやクワコの β (1)型、テンサン、サクサンの β (3a)型、アナフェエの β (2a)型、変わったところでは、クモの作る β (4)型等の存在が知られている。これらの

に69bpのエクソンと140bpのイントロン、続いてコア領域を有するエクソンとから構成されている。テンサンフィブロインの一次構造(Ala)_nに対応する配列は転写開始点より約800bp下流より始まっている。テンサンのフィブロインの一次構造をコードしているコア領域は第4図に示したようなほぼ同じような塩基配列から構成されており、約90bp毎に(Ala)_nに対応する塩基配列である(GCX)_nが出現する。この配列の基本単位となっている(GCX)_n部位及びこの配列の間の配列には一定の繰り返しがあり、場合によっては離れた部位間の配列が殆ど完全に一致する。この配列から推定されるアミノ酸配列からも明らかなように(Ala)_n配列の間は主にグリシン、セリン及びアラニンより構成されている。このように部分的ではあるが塩基配列から推定されるアミノ酸組成は既報のテンサンのフィブロインのアミノ酸組成とよく一致する¹⁷⁾。また、テンサンのフィブロイン遺伝子についても無細胞転写系を利用した遺伝子発現の研究が行われており、上流領域にはカイコフィブロイン遺伝子と共通なフィブロイン遺伝子特異的転写調節に関するシグナルが存在すると考えられている。

4. 最後に

絹蛋白の生産に関与した遺伝子工学的研究はこれまで述べたように広範囲に研究が行われている。カイコは実験動物として既に家畜化しており、大変取り扱いやすい昆虫である。さらに、遺伝的背景の良く揃った実験系統を手に入れることが用意であり、その上生理・生態的なデータが比較的よく揃っている。このようなことから、遺伝子工学的手法を用いて遺伝子の発現機構を解明するには非常に有利な材料であると言える。ここでは触れなかったが、卵殻を構成しているコリオン蛋白、体液中の30k蛋白、貯蔵蛋白、ピテロジェニン、さらには卵特異的蛋白、脳ホルモン等の遺伝子がクローニングされ構造解析が行われている。

一方現在の遺伝子工学的手法を用いれば、蛋白は大腸菌、酵母、バキュロウイルス等を用いた系により、DNAから直接蛋白を合成して、蛋白の機能を解析することが可能である。このように今後遺伝子工学と呼ばれている一連の手法は各分野において、ますます広範囲に利用されると思われる。絹蛋白の合成機構についても、

このような面からのアプローチが進み、近い将来全貌が明らかになるものと期待される。

文 献

- 1) Y. Suzuki, D.D. Brown; *J. mol. Biol.*, **63**, 42 (1972)
- 2) Y. Oshima, Y. Suzuki; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5363 (1977)
- 3) Y. Tsujimoto, Y. Suzuki; *Cell*, **18**, 591 (1979)
- 4) L.P. Gage, R.F. Manning; *J. Biol. chem.*, **255**, 9444 (1980)
- 5) M. Tsuda, Y. Suzuki; *Cell*, **27**, 175 (1981)
- 6) Y. Suzuki, M. Tsuda, S. Takiya, S. Hirose, E. Suzuki, M. Kameda, O. Ninaki; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 9522 (1986)
- 7) K. Shimura, A. Kikuchi, K. Ohtomo, Y. Katagata, A. Hyodo; *J. Biochem.*, **80**, 693 (1976)
- 8) P. Couble, A. Garel, J.C. Prudhomme; *Devel. Biol.*, **82**, 139 (1981)
- 9) P. Couble, M. Chevillard, A. Moine, P. Ravel-chapus, J.C. Prudhomme; *Nucleic Acids Res.*, **13**, 1801 (1985)
- 10) H. Okamoto, E. Ishikawa, Y. Suzuki; *J. Biol. Chem.*, **257**, (1982)
- 11) J.J. Michaille, P. Couble, J.C. Prudhomme, A. Garel; *Biochimie*, **68**, 1165 (1986)
- 12) P. Couble, J.J. Michaille, A. Garel, M.L. Couble, J.C. Prudhomme; *Devel. Biol.*, **124**, 431 (1987)
- 13) たとえば, F. Lucas, K.M. Rudall; *Comprehensive Biochemistry* vol. 26B (M. Florkin, E.M. Stotz, eds), Else vier, Amsterdam, pp475 (1968) R.Q.B. Fraser, T.P. MacRae; *Conformation in Fibrous Proteins and Related Synthetic Polypeptides*, Academic Press, New York, pp293 (1973)
- 14) J. Kusuda, Y. Tazima, K. Onimaru, O. Ninaki, Y. Suzuki; *Mol. Gen. Genet.*, **203**, 359 (1986)
- 15) T. Tamura, S. Sakate; *Insect Biochem.*, **18**, 169 (1988)
- 16) T. Tamura, H. Inoue, Y. Suzuki; *Mol. Gen. Genet.*, **207**, 189 (1987)
- 17) 桐村二郎; 蚕試報, **17**, 447 (1962)

(平成元年6月2日受理)