

カイコ R2D2 遺伝子のクローニング

正木夕輝¹⁾・田附常幸²⁾・阪下浩介³⁾・李 在萬³⁾・河口 豊³⁾・日下部宜宏³⁾

¹⁾九州大学農学部, ²⁾九州大学大学院生物資源環境科学府, ³⁾九州大学大学院農学研究院

(2008年12月17日; 受理2009年1月7日)

Molecular cloning of R2D2 gene from the silkworm, *Bombyx mori*

YUKI MASAKI, TSUNYUKI TATSUKE, KOSUKE SAKASHITA, LEE JM, YUTAKA KAWAGUCHI, and TAKAHIRO KUSAKABE

R2D2 plays important roles in RNA interference (RNAi) pathway. In *Drosophila*, RNA interference (RNAi) is an evolutionarily conserved gene-silencing pathway whereby double-stranded RNA (dsRNA) molecules trigger sequence-specific post-transcriptional silencing of cognate mRNA. The precise role of *Drosophila* R2D2 in RNAi pathway has been studied, whereas in the silkworm *Bombyx mori*, the characterization of R2D2 homolog has not yet been reported. In this study, we isolated and determined cDNA sequence for *B. mori* R2D2 mRNA. The deduced amino acid sequence revealed that the BmR2D2 mRNA encoded the deduced polypeptide with molecular mass of 36 kDa. The BmR2D2 protein had two double-stranded RNA binding domains conserved in other living organisms. These results suggest that BmR2D2 has important roles of RNA interference (RNAi) pathway as well as other living organisms.

Key words : *Bombyx mori*, R2D2, RNA interference (RNAi)

緒 言

RNA interference (RNAi) とは, siRNA もしくは二本鎖 RNA によって, 配列特異的に遺伝子の発現を抑制現象である (HANNON et al., 2002; TOMARI and ZAMORE, 2005)。細胞内に導入された dsRNA は, Dicer-2/R2D2 複合体によって切断され, siRNA となる。siRNA と Dicer-2/R2D2 は, 他の因子を伴って RISC 前駆体である RLC (RISC loading complex) を形成する。siRNA は Dicer-2/R2D2 によってガイド鎖が選択され, RISC へと受け渡される。RISC は siRNA のガイド鎖と相同的な mRNA を配列特異的に認識し, 切断, 分解する (ZAMORE et al., 2000; LEE, et al., 2004)。しかし, カイコにおける RNAi は, 他の生物種に比べて効きにくいことが報告されている (private communication)。これはカイコの RNAi 経路が, 他の生物種の RNAi 経路とは異なる特徴を持っている可能性を示唆している。そのため, RNAi の誘導から実行に至るまでの過程に関わるとされる R2D2 の機能解析により, 他の生物とは異なる知見が得られると期待される (LIU et al., 2003)。そこで, 本研究では, カイコ R2D2 のクローニングを行い, アミノ酸配列の解析を行った。

材料と方法

カイコ R2D2 のクローニング: ショウジョウバエ由来 R2D2 のアミノ酸配列を用いて, カイコ EST データベース (SilkBase) を検索し, R2D2 タンパク質の全長配列をコードする EST クローン (CeN-5550) を得た。このクローンの塩基配

列をサンガー法により決定した。この部分配列情報をもとに R2D2/5'ATG プライマー (5'- AAAAC TCCCA TAACA GTACT GCAAG AAATG-3') と R2D2/3'SalI プライマー (5'- CCCGT CGACT CACAG AGCGG CGGGC GGCGG AG-3') を設計し, PCR により R2D2 全コード領域を増幅した。得られた DNA 断片を制限酵素 SalI により消化し, pENTR11TM ベクター (Invitrogen) に挿入した。作製した pENTR11-BmR2D2 の塩基配列はシーケンス解析により確認した。

アミノ酸配列解析: 得られた塩基配列から推定されるカイコ R2D2 アミノ酸配列について NCBI BLAST を用いて同源性検索を行い, ClustalW によるマルチプルアライメントの作製を行った。分子系統樹の作製には TreeView X を, ドメイン検索には Pfam データベースを使用した。

結果と考察

決定されたカイコ R2D2 の塩基配列から予測されるアミノ酸配列について, 保存されているドメインを Pfam データベースを用いて検索したところ, 他生物と同様に 2 つの dsRNA 結合ドメインを有していることが確認された (Fig. 1)。R2D2 の 2 つの dsRNA 結合ドメインは siRNA に結合し, RNA-induced silencing complex (RISC) の形成に必要であることと, Dicer-2/R2D2 複合体を形成することにより, dsRNA から生成された siRNA を RISC に受け渡すのに不可欠であると報告されている (HAMMOND et al., 2001; HAMMOND et al., 2000; ELBASHIR et al., 2001; TABARA et al., 2002; GRISHOK et al., 2000)。したがって, カイコ R2D2

^{1), 2)} 〒812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1
Tel, Fax: 092-642-2842
連絡先: kusakabe@agr.kyushu-u.ac.jp

も RNAi 経路に必要であると考えられる。

次に、カイコ R2D2 全長配列をヒト、ショウジョウバエ、及びコクヌストモドキの二本鎖 RNA 結合タンパク質の二本鎖 RNA 結合ドメインのアミノ酸配列と比較し、分子系統樹を作製した (Fig. 2)。カイコ R2D2 の dsRNA 結合ドメインの C 末端型はショウジョウバエとコクヌ

ストモドキのものとも最も近かったことから、R2D2 はこれらの生物と同様の機能を有していることが示唆される。しかし、カイコ R2D2 の dsRNA 結合ドメインの N 末端型はどの生物のものとも遠かったことから、他の生物とは異なる、カイコ特有の機能を有している可能性が考えられる。

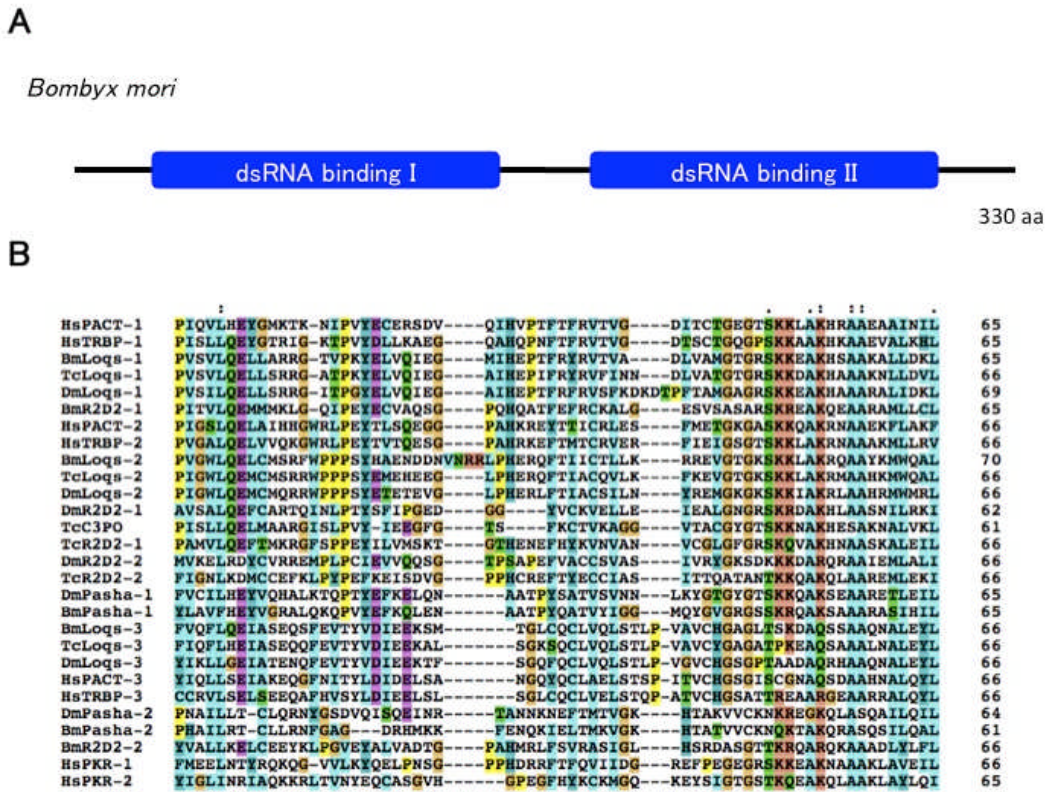


Fig. 1. (A) The domain structure of BmR2D2. Double-stranded binding domains are shown in blue bar. (B) Alignment of amino acid sequences of the double-stranded RNA binding domains from homo sapiens, Tribolium cataneum, Drosophila melanogaster, and Bombyx mori R2D2. PACT and TRBT have a role of forming RISC in human being, Parsha and Loqs have roles of miRNA pathway, PKR is IFN-stimulated gene (ISG).

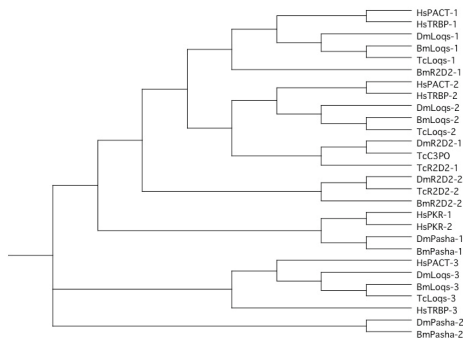


Fig. 2. Phylogenetic tree of the double-stranded RNA binding domains. The tree was generated by using TreeView X software.

摘要

カイコ R2D2 の塩基配列、アミノ酸解析を行った。R2D2 は約 36 kDa のタンパク質で、他の生物と同様に 2 つの dsRNA 結合ドメインを保存していたものの、分子系統樹を作製したところ、カイコ R2D2 の dsRNA 結合ドメインの N 末端型はどの生物のものとも遠かった。このことは、他の生物が有していない、カイコ特有の機能を有している可能性を示唆するものであった。

文献

ELBASHIR, S. M., LENDECKEL, W. and TUSCHL, T. (2001) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleo-

- tide RNAs. *Genes. Dev.*, **15**, 188-200.
- GRISHOK, A., TABARA, H. and MELLO, C. C. (2000) Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans*. *Science*, **287**, 2494-2496.
- HAMMOND, S. M., BERNSTEIN, E., BEACH, D. and HANNON, G. J. (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, **404**, 363-366.
- HAMMOND, S. M., BOETTCHER, S., CAUDY, A. A., KOBAYASHI, R. and HANNON G. J. (2001) Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*, **293**, 1146-1150.
- LEE, Y. S., NAKAHARE, K., PHAM, J. W., KIM, K., HE, Z., SONTEIMER, E. J. and CARTHEW, R. W. (2004) Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell*, **117**, 69-81.
- LIU, Q., RAND, T. A., KALIDAS, S., DU, F., KIM, H., SMITH, D. P. and WANG, X. (2003) R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway. *Science*, **301**, 1921-1925.
- TABARA, H., YIGIT, E., SIOMI, H. and MELLO, C. C. (2002) The dsRNA binding protein RDE-4 interacts with RDE-1, DCR-1, and a DEXH-box helicase to direct RNAi in *C. elegans*. *Cell*, **109**, 861-871.
- ZAMORE, P. D., TUSCHI, T., SHARP, P. A. and BARTEL, D. P. (2000) RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, **101**, 25-33.