

カイコ *Dicer-2* ホモログのクローニング

吉末真吾¹⁾・田附常幸^{2,3)}・正木夕輝³⁾・阪下浩介³⁾・
李在萬⁴⁾・河口豊⁴⁾・日下部宜宏⁴⁾・*

¹⁾九州大学農学部, ²⁾日本学術振興会, ³⁾九州大学大学院生物資源環境科学府, ⁴⁾九州大学大学院農学研究院

(2009年12月4日受付; 2010年2月28日受理)

Molecular cloning of the silkworm *Dicer-2* homolog gene

SHINGO YOSHIZUE, TSUNEYUKI TATSUKE, YUKI MASAKI, KOSUKE SAKASHITA, JAE-MAN LEE,
YUTAKA KAWAGUCHI and TAKAHIRO KUSAKABE

RNA interference (RNAi) is a powerful method for specifically silencing gene expression in diverse cell types. RNAi is mediated by approximately 21-nucleotide small interfering RNAs (siRNAs), which are produced from larger double-stranded RNAs (dsRNAs) in vivo through the action of DICER, an RNase III-family enzyme. The characterization of *Bombyx mori Dicer-2* (*BmDicer-2*) homolog has not yet been reported. In this study, we determined cDNA sequence for *BmDicer-2* mRNA. The deduced amino acid sequence revealed that the *BmDicer-2* mRNA encodes the deduced polypeptide with molecular size of 190 kDa. The BmDICER-2 protein had two double-stranded RNA binding domains conserved in *Dicer-2* of other living organisms. The BmDICER-2 protein had helicase domain, PAZ domain, two RNase III domains and dsRNA binding domain. These results indicate that BmDICER-2 has RNase III activity and plays an important role in RNAi.

Key words : *Bombyx mori*, *Dicer-2*, RNA interference (RNAi)

緒 言

RNAi は標的遺伝子と相同な二本鎖 RNA (dsRNA) を細胞内に導入した際に、その標的遺伝子を mRNA レベルで抑制する機構である (HANNON, 2002; TOMARI and ZAMORE, 2005)。そのため、遺伝子の機能阻害実験の手法として非常に有効であることが知られている。キイロシヨウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) において、small RNA プロセッシングに関わる RNaseIII 酵素として、*Drosha*, *Dicer-1*, および *Dicer-2* の 3 種類が存在していることが知られている。そのうち *Dicer-2* は、長鎖の二本鎖 RNA (dsRNA) を 20 塩基前後の dsRNA (siRNA) にプロセッシングするリボヌクレアーゼであり (MYERS et al., 2003), RNAi を実行する複合体である RISC (RNA induced silencing complex) に siRNA をリクルートする RISC 構成因子の 1 つとしても知られている (SONTHEIMER, 2005)。そのため、*Dicer-2* は RNAi において不可欠なタンパク質であると考えられる。鱗翅目昆虫のモデル生物であるカイコ (*Bombyx mori*) においても、キイロシヨウジョウバエと同様に RNaseIII 酵素として *Drosha*, *Dicer-1*, および *Dicer-2* の 3 つが存在しているが、それらについての知見がほとんど得られておらず、また十分な RNAi 効果も得られていない。従って、RNAi 関連因子と考えられるカイコ *Dicer-2* の解析を進めることは、カイコにおいて RNAi 法を用いた効果的な遺伝子発現抑制が誘導できない原因の解明に繋がると考えられる。そこで本研究では、カイコ *Dicer-2* 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

cDNA クローニング : カイコ EST データベース (SilkBase) およびカイコゲノム配列 (KAIKO BLAST) をもとに *BmDicer-2* ATG プライマー (5'-AC TACAACAGAAGGAATACAGTATCACG-3') と *BmDicer-2* Stop *Xba*I プライマー (5'-GGGTCTAGATT AAGAGTCTAATATTTTGTAG-3') を設計し、p50T 系統の 5 齢 3 日目の精巢 cDNA ライブラリより、カイコ *Dicer-2* ホモログを PCR 法により増幅した。得られた DNA 断片を制限酵素 *Xba*I により消化し、pENTR11TM ベクター (Invitrogen) に挿入した。

配列解析 : pENTR11 に挿入した *BmDicer-2* の塩基配列を DNA シーケンスによって決定した。塩基配列より予測されるアミノ酸配列をもとに NCBI BLAST を用いてホモロジー検索を行い、ClustalW を用いてマルチプルアライメントを作成した。また、分子系統樹の作成には TreeView X を、ドメインの検索には Pfam データベースを使用した。

結果と考察

カイコ *Dicer-2* ホモログの塩基配列から予想されるアミノ酸配列の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 Helicase ドメイン、PAZ ドメイン、2 つの RNaseIII ドメイン、および dsRNA 結合ドメインが存在していることが確認された (Fig. 1)。*Dicer-2*

* 〒812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1

Tel, Fax: 092-642-2842

E-mail: kusakabe@agr.kyushu-u.ac.jp

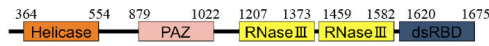


Fig. 1. The domain of the BmDicer-2. Red; Helicase domain, pink; PAZ domain, Yellow; RNaseIII, Blue; dsRBD.

の二本鎖 RNA 切断のプロセッシングは、まず C 末端にある dsRNA 結合ドメインが二本鎖 RNA に結合し、次に 2 つ存在している RNaseIII ドメインが二量体を形成し切断を行う。またこの際に、PAZ ドメインが二本鎖切断の位置を決める働きをもっており、これにより 20 塩基前後に切断されるという報告がされている (ZHANG et al., 2004)。同様のドメインをもつカイコ *Dicer-2* ホモログも、同様の二本鎖 RNA 切断のプロセッシングを行うものと考えられる。

カイコ *Dicer-2* ホモログの RNaseIII ドメインをコクヌストモドキ (*Tribolium confusum*)、キイロショウジョウバエ、オナジショウジョウバエ (*D. simulans*)、およびネッタイシマカ (*Aedes aegypti*) の *Dicer-2* の RNaseIII との間でアミノ酸配列の比較を行った (Fig. 2)。全体的に高い相同性が得られたが、C 末端側の RNaseIII ドメインにおいて、カイコ、コクヌストモドキで保存されている領域が存在していた。

次に、カイコ *Dicer-2* 全長アミノ酸配列をもとに分子系統樹を作成した (Fig. 3)。カイコ *Dicer-2* はコクヌストモドキの *Dicer-2* に最も近縁で、またそれ以外にもキイロショウジョウバエ、オナジショウジョウバエ、ネッタイシマカ等の *Dicer-2* が挙げられ、カイコ *Dicer-2* がこれら昆虫類の *Dicer-2* と同様の機能をもっていると予想することができる。

摘 要

カイコ *Dicer-2* ホモログの塩基配列、アミノ酸配列を同定した。 *Dicer-2* は約 190 kDa のタンパク質で、他の生物種の *Dicer-2* と同様に Helicase ドメイン、PAZ ドメイン、2つの RNaseIII ドメイン、および dsRNA 結合ドメインをもっており、相同性

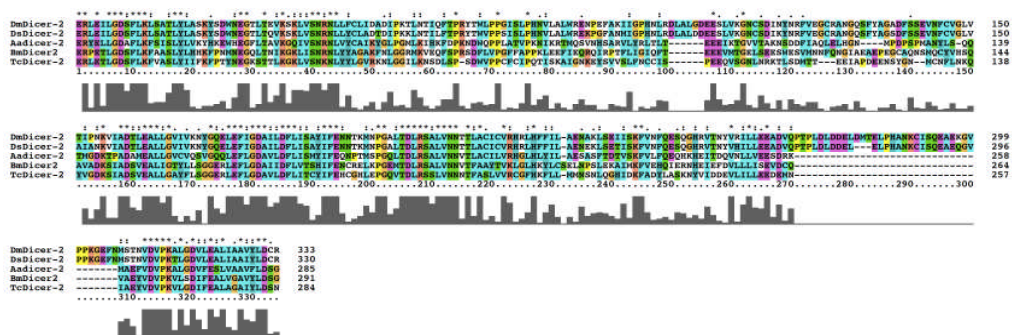


Fig. 2. Alignment of amino acid sequence from *DmDicer-2* (*Drosophila melanogaster*), *DsDicer-2* (*D. simulans*), *AaDicer-2* (*Aedes aegypti*), *BmDicer-2* (*Bombyx mori*) and *TcDicer-2* (*Tribolium confusum*).

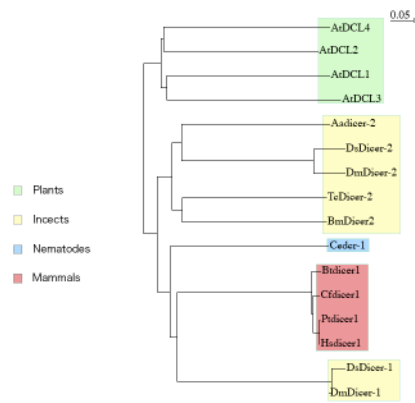


Fig. 3. Phylogenetic tree of Dicer-2. The tree was generated by using Tree View X software. AtDCL1-4 (*Arabidopsis thaliana*), AaDicer2 (*Aedes aegypti*), DsDicer1-2 (*Drosophila simulans*), DmDicer1-2 (*D. melanogaster*), TcDicer-2 (*Tribolium confusum*), BmDicer2 (*Bombyx mori*), Cedcer-1 (*Caenorhabditis elegans*), BtDicer1 (*Bos taurus*), CfDicer1 (*Canis familiaris*), PtDicer1 (*Pan troglodytes*), Hsdicer1 (*Homo sapiens*).

も高かった。これらのことから、カイコ *Dicer-2* は他生物の *Dicer-2* と同様に、RNaseIII 活性をもつと考えられた。

文 献

- HANNON, G. J. (2002) RNA interference. *Nature*, **418**, 244-251.
- MYERS, J. W., JONES, J. T., MEYER, T. and FERRELL, J. E. Jr. (2003) Recombinant Dicer efficiently converts large dsRNAs into siRNAs suitable for gene silencing. *Nature*, **3**, 324-328.
- SONTHEIMER, E. J. (2005) Assembly and function of RNA silencing complexes. *Nature*, **6**, 127-38.
- TOMARI Y, ZAMORE P. D. (2005) Perspective: machines for RNAi. *Genes. Dev.*, **19**, 517-529.
- ZHANG, H., KOLB, F. A., JASKIEWICZ, L., WESTHOF, E. and FILIPOWICZ, W. (2004) Single processing center models for human Dicer and bacterial RNaseIII. *Cell*, **118**, 57-68.