

## カイコ *Loquacious* 遺伝子のクローニング

正木夕輝<sup>1)</sup>・田附常幸<sup>1),4)</sup>・阪下浩介<sup>2)</sup>・吉末真吾<sup>3)</sup>・  
李在萬<sup>2)</sup>・河口 豊<sup>2)</sup>・日下部宜宏<sup>2),\*</sup>

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

(2009年12月28日受付; 2010年1月15日受理)

### Molecular cloning of *Loquacious* gene from the silkworm, *Bombyx mori*

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

*Loquacious* plays important roles in micro RNA (miRNA) pathway. In *Drosophila*, Micro RNAs (miRNAs) are a class of ubiquitously expressed small RNAs, typically, ~22-23 nucleotides (nt) in length. They are derived from endogenous transcripts capable of forming hairpin-like structures, which are sequentially processed by Drosha/Pasha and Dcr-1/Loqs complexes. They predominantly associate with Argonaute-1 (AGO1) and regulate the expression of protein-coding genes. The precise role of *Drosophila Loquacious* in miRNA pathway has been studied, whereas in the silkworm *Bombyx mori*, the characterization of *Loquacious* homolog has not yet been reported. In this study, we isolated and determined cDNA sequence for *B. mori Loquacious* mRNA. The deduced amino acid sequence revealed that the *BmLoquacious* mRNA encoded the deduced polypeptide with molecular mass of 43 kDa. The *BmLoquacious* protein had two double-stranded RNA binding domains conserved in other living organisms. Therefore *BmLoquacious* localized in cytoplasm in silkworm cultured cell, BmN4, from result of immuno stain. These results suggest that *BmLoquacious* has important roles of miRNA pathway as well as other living organisms.

**Key words** : *Bombyx mori*, *Loquacious*, MicroRNA (miRNA)

## 緒 言

MicroRNA 経路は、microRNA とよばれる小分子 RNA を介して引き起こされる遺伝子発現抑制経路で、RNA サイレンシングの1つである。MicroRNA は内在遺伝子の調節を行っていると考えられており、ヒトにおいては約1,000個以上の異なる microRNA が生成されていることが明らかになっているが、その機能の多くは不明である (LEWIS et al., 2005; BEREZIKOV et al., 2005)。MicroRNA は内在のヘアピン構造をとる pri-miRNA が Drosha/Pasha によってプロセッシングを受け pre-miRNA になり、その後 Dcr-1/Loqs によってプロセッシングを受けることで生成される (DENLI et al., 2004; GREGORY et al., 2004; HAN et al., 2006; LANDTHALER et al., 2004)。一方、カイコにおいては micro RNA 経路についての研究は進んでおらず、内在遺伝子の調節機構についても未解明である。また、RNA サイレンシングの1つである RNAi が効きにくいとされる鱗翅目昆虫であることから、他の生物とは異なる知見が得られると期待される。そこで本研究では、microRNA のプロセッシングに関わるとされる *Loquacious* のカイコホモログのクローニングを行い、アミノ酸配列の解析を行った。また、免疫染色法を用いて、カイコ *Loquacious* のカイコ培養細胞内局在解析を行った。

## 材料と方法

カイコ *Loquacious* のクローニング：ショウジョウバエ由来 *Loquacious* 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、*Loquacious* 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 *Loquacious*/5'ATG プライマー (5'-AAAAC TCCCA TAACA GTACT GCAAG AAATG-3') と *Loquacious*/3'SalI プライマー (5'-CCCGT CGACT CACAG AGCGG CGGGC GGCGG AG-3') を設計し、PCR により *Loquacious* 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、pENTR11™ ベクター (Invitrogen) に挿入した。作製した pENTR11-*BmLoquacious* 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 *Loquacious* アミノ酸配列について NCBI BLAST を用いて相同性検索を行い、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。

\* 〒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

## 結果と考察

決定されたカイコ *Loquacious* 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について 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3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)。Loquacious の3つの dsRNA 結合ドメインは、Dicer-1 が pre miRNA を切断する際に RNA と結合して Dicer-1 の機能の安定化を担っており、また Dicer-1/Loquacious 複合体を形成することにより、生成された miRNA を miRISC に受け渡すのに不可欠であると報告されている (Kim et al., 2009)。したがって、カイコ *Loquacious* も microRNA 経路に必要であると考えられる。次に、カイコ *Loquacious* 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 *Loquacious* の3つの dsRNA 結合ドメインはショウジョウバエとコ

### BmLoquacious

```
EGNTVHPHPSVVPGLPPGVIHGMTVHSGSPNGEHFPHGPRRRYQTRPKPNNLQRLPLDEA
AKRKMETLPTKTPVSVLQELLARRETVPKYELLQIEGMIHEPTFRYRVTVADLFAMGTGR
SKKEAKHSAAKALLDKLTGATPSDQTTNGSVPETGAVVPTFEDKLMGNPVGWLRSCVCHD
SGHHHLTMLKTMMLIDQFQVCPHERQFTIICLLKRRVEGTGKSKLAKRQAAAYKMWQA
LQDNPPSEFQNDDEGVAARYADLKDSKISTLTTSSHSHKVSQFHKLKQSVGPNLAKLQV
TPLNNKDFNFVQFLQEIASEQSFVITYVDIEEKSMTGLCQCLVQLSTLPVAVCHGAGLTS
KDAQSSAAQNALEYLKIMTKK
```

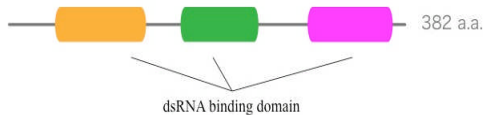


Fig. 1. The amino acid sequence and the domain structure of BmLoquacious.

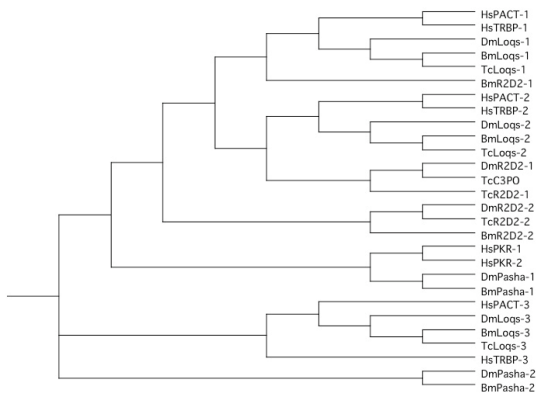


Fig. 2. Phylogenetic tree of the double-stranded RNA binding domains. The tree was generated by using TreeView X software.

クヌストモドキのものと同様に最も類似していたことから、カイコ *Loquacious* 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た。すなわち、カイコ *Loquacious* も microRNA 経路において必要であり、ショウジョウバエと同様に機能しているものと推察された。また、免疫染色によるカイコ培養細胞 BmN4 におけるカイコ *Loquacious* の局在解析の結果から、カイコ *Loquacious* は細胞質に局在しており、ショウジョウバエの Dicer-1/Loquacious が pre miRNA のプロセッシングを行っている場所と一致した (Fig. 3)。

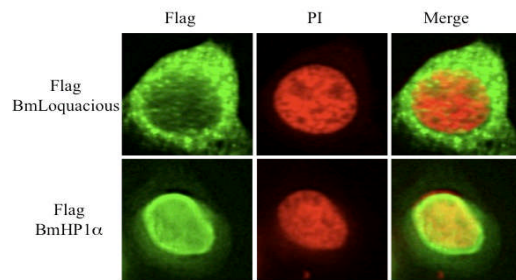


Fig. 3. The localization of BmLoquacious in silkworm cultured cell, BmN4. This was immunostained with a-Flag.

## 摘 要

カイコ *Loquacious* の塩基配列、アミノ酸解析を行った。Loquacious は約 43 kDa のタンパク質で、他の生物と同様に3つの dsRNA 結合ドメインを保存しており、分子系統樹を作製したところ、カイコ *Loquacious* の3つすべての dsRNA 結合ドメインがショウジョウバエとコクヌストモドキのものと同様に最も類似していた。また免疫染色によりカイコ *Loquacious* のカイコ培養細胞内における局在を調べたところ細胞質に局在していることがわかった。このことはカイコ *Loquacious* も microRNA 経路において必要であり、ショウジョウバエと同様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

- BEREZIKOV, E., GURYEV, V., VAN DE BELT, J., WIENHOLDS, E., PLASTERK, R. H. and CUPPEN, E. (2004) Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell*, **120**, 21-24.
- DENLI, A. M., TOPS, B. B., PLASTERK, R. H., KETTING, R. F. and HANNON, G. J. (2004) Processing of primary microRNAs by the microprocessor complex. *Nature*, **432**, 231-235.
- GREGORY, R. I., YAN, K. P., AMUTHAN, G., CHENDRIMADA, T., DORATOTAJ, B., COOCH, N. and SHIEKHATTAR, R.

- (2004) The microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, **432**, 235-240.
- HAN, J., LEE, Y., YEOM, K. H., KIM, Y. K., JIN, H., NAM, J. W., HEO, I., RHEE, J. K., SOHN, S. Y., CHO, Y., et al. (2006) Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell*, **125**, 887-901.
- KIM, V. N., HAN, J. and AIOMI, M. C. (2009) Biogenesis of small RNAs in animals. *Mol. Cell Biol*, **10**, 126-139.
- LANDTHALER, M., YALCIN, A. and TUSCHI, T. (2004). The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its *D. melanogaster* homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr. Biol.* **14**, 2162-2167.
- LEWIS, B. P., BURGE, C. B. and BARTEL, D. P. (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, **120**, 15-20.