

論文の内容の要旨

氏名：山本 貴之

関連理化学専攻：博士（理学）

論文題名：カイコガ休眠・非休眠卵の初期発生におけるプロテインキナーゼCK2の役割に関する生化学的研究

第1章 序論

昆虫の休眠は、不利な環境条件下での生育を避けるため、生活史の特定の時期に引き起こされる。二化性カイコガは、1年に二世代の生活史を持ち、環境条件により非休眠卵と休眠卵とを産み分ける。孵化時の環境が、低温短日条件下（15℃、明期8時間、暗期16時間）では非休眠卵を産卵し、高温長日条件（25℃、明期16時間、暗期8時間）では休眠卵を産卵する。一般的に見られる休眠は、不適切な環境情報を感知して起こる受動的な休眠であるが、カイコガの卵休眠は将来の不適切な環境が訪れる以前に計画される積極的な発育停止現象である。カイコガの卵休眠は、蛹期に放出された休眠ホルモンが発育中の卵巣に作用することで引き起こされる。産卵された卵の胚発生は2日ほどで停止し、休眠へと移行する。この時、休眠卵に特異的な代謝系である、オモクローム色素合成系とソルビトール合成系が出現する。非休眠卵の卵色は淡黄色のまま色付かないが（図1A）、休眠卵では産卵後36時間ほどからオモクロームにより色付き始め、60時間ほどで濃い小豆色に変色する（図1B）。しかし、これら休眠・非休眠の分子メカニズムは、ほんの一部しか明らかにされていない。

カイコガの休眠は、胚発生が細胞周期のG2期で停止していることから、プロテインキナーゼの関与が考えられる。その中でもプロテインキナーゼCK2（CK2）は、細胞中に普遍的に存在するセカンドメッセンジャー非依存性のセリン・スレオニンプロテインキナーゼであり、2つの触媒（ α ）サブユニットと2つの調節（ β ）サブユニットから成るヘテロ四量体構造を持つ。また、CK2は他のプロテインキナーゼと異なり、リン酸供与体としてATPの他にGTPも利用できる特性を持つ。さらに、CK2は多くの細胞内機能性タンパク質の制御を行っていることから、カイコガの休眠・非休眠時の初期発生においても同様にCK2は重要な役割を担っていると考えられるが、ほとんど研究はなされていない。本論文は、カイコガの休眠・非休眠時の初期発生におけるCK2の役割を明らかにすることを目的として研究を遂行し、そこから得られた新発見を中心にまとめたものである。

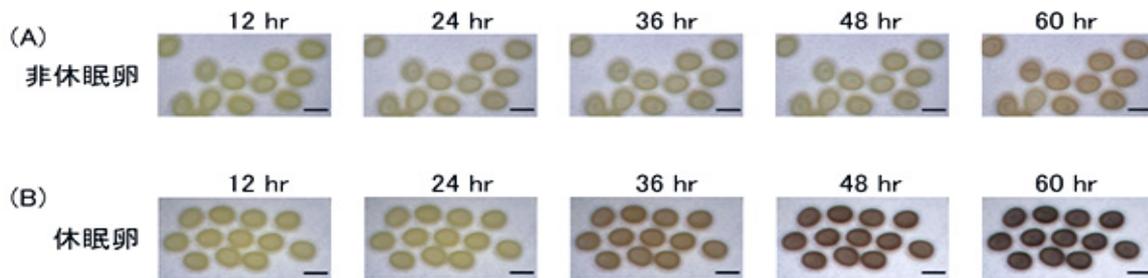


図1 カイコガ休眠卵および非休眠卵の12-60時間までの経時変化
(A)：非休眠卵，(B)：休眠卵，バーは1mmを示す。

第2章 カイコガ初期発生におけるCK2のリン酸化活性測定とCK2遺伝子の発現解析

CK2によるリン酸化と休眠の関係を明らかにするため、休眠卵と非休眠卵の産卵後0-60時間におけるCK2のリン酸化活性測定とCK2遺伝子の発現解析を行った(図2)。カイコガCK2の α サブユニット(*BmCK2 α*)と β サブユニット(*BmCK2 β*)の両遺伝子発現は、非休眠卵に比べて休眠卵の方が高い傾向が見られた(図2A,B)。休眠卵での*BmCK2 α* の発現は0-12時間まで高く、その後は減少していた(図2A)。一方、非休眠卵での両遺伝子の発現は、産卵後の時間経過に伴い減少していた(図2A,B)。CK2のリン酸化活性は、非休眠卵に比べて休眠卵の方が低い傾向が見られた。休眠卵では、12-24時間にやや高いCK2活性が見られたのに対し、非休眠卵でのCK2のリン酸化活性は、時間経過に伴い増加していた(図2C)。このように、休眠卵と非休眠卵とではCK2のリン酸化活性に差が見られた。休眠卵で見られた12-24時間のやや高いCK活性は休眠移行に関与している可能性があり、非休眠卵での産卵後の時間経過に伴うCK2活性の増加は発生の進行に関与していることが考えられた。この遺伝子発現変動とリン酸化活性変動の不一致は、CK2活性が主に転写後のレベルで調節されていることを示唆しており、このCK2の活性調節は休眠・非休眠卵において重要な役割を担っていると考えられる。

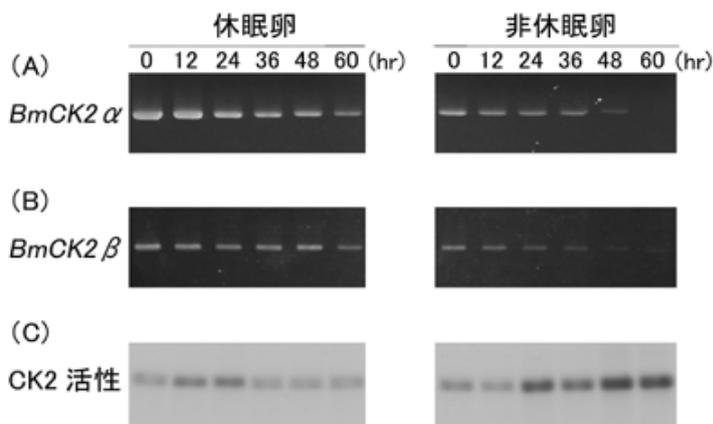


図2 RT-PCRによる休眠卵・非休眠卵におけるCK2遺伝子の発現とCK2のリン酸化活性の変動
(A) : *BmCK2 α* の発現, (B) : *BmCK2 β* の発現, (C) : CK2のリン酸化活性

第3章 組換えCK2を用いた*in vitro*活性調節機構の解析

カイコガの初期発生におけるCK2活性が、主に転写後のレベルで調節されている可能性が示された。そこで、大腸菌発現系で作製した組換えカイコガCK2 (rBmCK α , rBmCK β)と組換えショウジョウバエCK2 (rDmCK β -VIIa, rDmCK β -VIIc)を用いて、*in vitro*でのリン酸化活性の調節機構を解析した。その結果、rBmCK α は単独でリン酸化活性を有しており(図3A, レーン1), rBmCK α と各rCK β を1:1で再構成させた場合、rBmCK α のリン酸化活性は減少した(図3A, レーン2,3,4)。特に、DmCK β -VIIcによる強い活性の抑制が確認された(図3A, レーン4)。両rDmCK β の配列の差は、C末端領域の20残基のアミノ酸のみであることから、rBmCK α の活性調節は、この領域の配列に依存していることが明らかになった。したがって、カイコガにおいてもBmCK α の活性を調節するBmCK β のアイソフォームが存在する可能性が強く示唆された。次に、カイコガ休眠卵に特有な化合物であるソルビトールや3-ヒドロキシキヌレニン(3-OHK)が、rBmCK2のリン酸化活性に与える影響を解析した。休眠卵における生理的濃度のソルビトールではrBmCK α のリン酸化活性に影響を与えなかったが、3-OHKはrBmCK α のリン酸化活性に対して、阻害と活性化の両方の作用を持つことが明らかとなった(図3B)。3-OHKは、カイコガの休眠卵に特異的かつ大量に蓄積している化合物であるが、休眠卵の初期発生時での役割については、色素合成に必須であること以外に不明な点が多く残されている。しかし、本実験の*in vitro*での解析から、休眠卵におけるCK2のリン酸化活性が3-OHKによって制御される新たな可能性が示された。

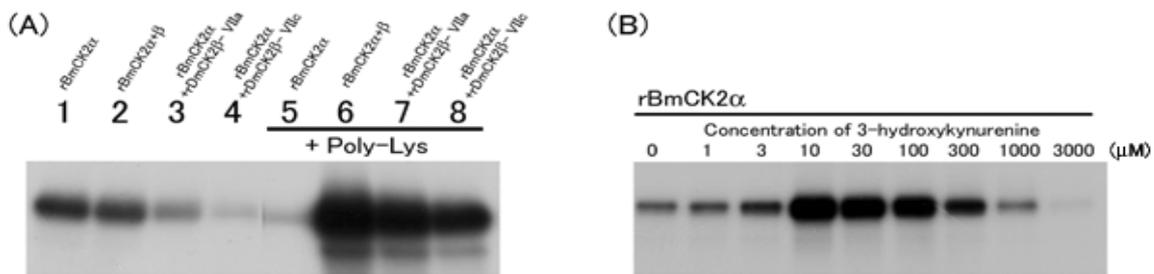


図3 オートラジオグラフィーによるrBmCK2 α のリン酸化活性の*in vitro* 解析

(A) : rCK2 β がrBmCK2 α 活性に与える影響

(B) : 3-ヒドロキシキヌレニンがrBmCK2 α 活性に与える影響

第4章 DMSO を用いた休眠移行阻害効果と CK2 阻害剤の卵内への透過効果

カイコガの休眠卵に対するジメチルスルホキシド (DMSO) の休眠移行阻害効果が、CK2 のリン酸化活性阻害実験の一環で発見された。このため、カイコガの休眠卵に対する DMSO の休眠移行阻害効果を明らかにするために、休眠卵を DMSO 処理することで得られた孵化率を休眠移行阻害効果と見なして、DMSO の処理条件 (濃度, 浸透時間, 産卵後の経過時間) が孵化率に与える影響を検討した。その結果、休眠卵に最大の孵化率を与える DMSO 処理条件は、産卵後 12 時間の休眠卵に対して 100% DMSO を 45 分間浸透させた時であった。また、その孵化率は 78.3% であり、HCl 処理に匹敵するものであった (図 4)。興味深いことに、DMSO による休眠移行阻害効果は産卵後 24 時間以内の休眠卵に限定されていた。休眠卵では、産卵後 36 時間ほど経過すると、漿膜細胞中でオモクローム色素を含んだ色素顆粒が形成することで、着色が起こる。したがって、DMSO 処理の有効期間は色素顆粒形成の直前までと考えられ、成熟した色素顆粒を含んだ漿膜細胞層の形成が DMSO の効果を抑制している可能性がある。

さらに、CK2 の強力な阻害剤である 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole (TBB) の卵内への透過効果の解析を行った。100% DMSO に溶解した 0.1 mM の TBB で休眠卵を処理したところ、孵化率は 36.1% と半減した (図 4)。SEM による卵殻表面構造の観察結果では、DMSO 処理による卵殻表面構造の変化は認められず、DMSO が卵殻に物理的影響を与えたことで、卵内に化学物質が移行している可能性は低いと考えられる。したがって、TBB は DMSO と共に卵内に透過して CK2 のリン酸化活性を阻害した結果、発生が妨げられていることを強く示唆している。

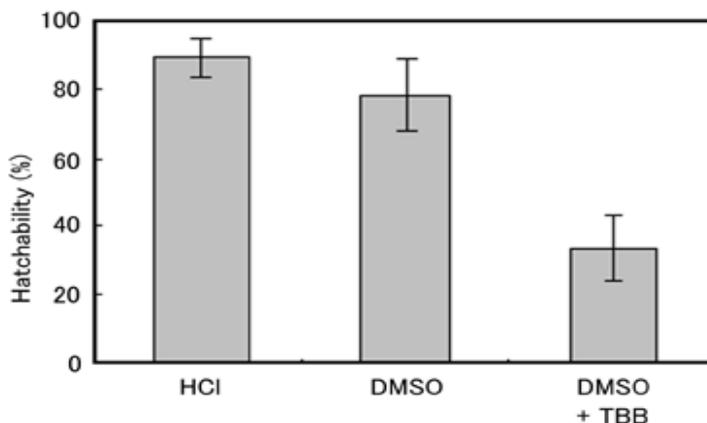


図4 HCl処理とDMSO処理の比較およびDMSOに溶解した化学物質が孵化率に与える影響

第5章 総括

本論文は、カイコガの休眠現象解明の一環として、休眠卵および非休眠卵の初期発生におけるプロテインキナーゼ CK2 の役割を明らかにすることを目的として、解析を行った結果をまとめたものである。休眠卵と非休眠卵の初期発生において、CK2 活性と CK2 遺伝子発現の変動パターンが異なっていたことから、CK2 の活性は転写後のレベルで調節されていることが示唆された。休眠卵で見られる 12-24 時間におけるやや高い CK2 活性は、休眠移行に関与している可能性が考えられ、非休眠卵で見られる時間経過と共に増加する CK2 活性は、発生の進行に関与する分子のリン酸化に特化していると考えられた。組換え CK2 を用いた *in vitro* での解析では、休眠卵に特異的に蓄積している 3-OHK が、rBmCK2 α 単独の活性に対して低濃度では活性化、高濃度では阻害と異なる作用を示した。部分精製の結果からは、カイコガの CK2 は四量体構造で機能していることが示唆された。しかし、*in vitro* ではあるが 3-OHK により rBmCK2 α の活性が変化することから、カイコガにおいても α サブユニット単独で機能している可能性も考えられ、非休眠卵で見られた CK2 の活性化が 3-OHK によって引き起こされている可能性は否定できない。TBB を溶解した DMSO で休眠卵を処理した時、大半の卵の胚発生が進行したにも関わらず、孵化率が 36.1% に半減した。これは、DMSO が胚発生を再開させた後、卵内に透過した TBB が CK2 活性を阻害したためと考えられた。現時点では、CK2 の内因性基質や β サブユニットのアイソフォームに関して不明な点は残されている。しかし、本研究により CK2 によるリン酸化は、カイコガの休眠の維持や胚発生の進行に重要な役割を果たしていることが明らかになった。