

論文審査の結果の要旨

氏名：山本 貴之

博士の専攻分野の名称：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

審査委員：(主査) 教授 齋藤 稔
(副査) 教授 澤田 博司
(副査) 北里大学教授 中村 和生

昆虫の休眠は、不利な環境条件下での生育を避けるために、生活史の特定の時期に引き起こされる。その中でもカイコガ (*Bombyx mori*) の休眠は、生育に不良な環境の到来に備え、良好な生育環境時から計画される積極的な発育停止現象であり、低温や乾燥など環境条件の悪化に伴い一時的に発育を休止する受動的な休眠とは質的に大きく異なっている。このカイコガの休眠は、休眠ホルモンの作用で胚期の細胞分裂が停止し、発育が止まり、休眠に入ることが知られているが、その分子メカニズムは、未だ明らかになっていない。細胞周期の進行と停止には、プロテインキナーゼによるリン酸化が関与していることは良く知られている。休眠現象に限らずカイコガでも多くのプロテインキナーゼについての報告がある。中でもプロテインキナーゼCK2 (CK2) は、2ndメッセンジャー非依存性のプロテインキナーゼであり、 α と β サブユニットから成るヘテロ4量体構造で機能し、リン酸供与体としてATP以外にもGTPを利用できるなど他のプロテインキナーゼとは異なる性質を持っている。更に、CK2によりリン酸化を受けるタンパク質は、細胞周期や遺伝子発現調節等の重要な役割を担っている機能性タンパク質である。本研究は、このような背景のもとに行われたものであり、申請者が着目したのは、カイコガの休眠・非休眠卵の初期発生におけるCK2の役割を分子レベルで明らかにする事である。その理由は、CK2はカイコガの休眠・非休眠卵においても重要な役割を担っていると考えられていたが、その詳細は未解明であったためである。

まず、カイコガのCK2 α と β サブユニットをコードするcDNAをカイコガでは初めてクローニングする事に成功し、その遺伝子配列を基にして、休眠・非休眠卵の初期発生におけるCK2遺伝子の発現変動パターンを明らかにした。一方、休眠・非休眠卵の初期発生におけるCK2のリン酸化活性の測定も行い、その活性変動パターンが休眠・非休眠で差があることを明らかにした。更に、その両者の変動パターンを詳細に比較検討し、CK2によるリン酸化活性とCK2遺伝子の発現変動パターンとが一致しないことを明らかにした。これらのことから初期発生時のCK2の活性変動は主に転写以降のレベルで制御されていることを明らかにした。

次に、初期発生時でのCK2のリン酸化活性の転写以降のレベルでの制御メカニズムを明らかにするために、大腸菌発現系で作製したカイコガのCK2 α と β サブユニット及びショウジョウバエのCK2 β サブユニットのアイソフォームの組換えタンパク質を用いて、*in vitro*での機能解析を試みた。その結果、CK2 β サブユニットのC末端アミノ酸の差異がCK2 α サブユニットのリン酸化活性に影響を与える事を明らかにし、CK2 α サブユニットは数種の β サブユニットのアイソフォームにより制御を受けている可能性を示唆した。また、休眠卵に特異的かつ多量に含まれている3-ヒドロキシキヌレニンがCK2の活性に対して阻害剤と活性化剤の両方の作用を示す興味深い物質であることも明らかにした。3-ヒドロキシキヌレニンとCK2は同所的局在が明らかとなっているので、生体内でもCK2は3-ヒドロキシキヌレニンにより直接的な制御を受けている可能性も示した。

更に、ジメチルスルホキシド(DMSO)による休眠移行阻害効果とCK2阻害剤の卵内への透過効果について検討した。その結果、DMSOによる休眠移行阻害効果は既に知られているHCl処理に匹敵する事を明らかにした。また、DMSOとHCl処理では、その効果が発揮できる卵の発育ステージが異なることから、休眠移行阻害効果の分子メカニズムが異なることを示唆した。更に、DMSOに溶解したCK2阻害剤で休眠卵を処理することで、孵化率が40%以下に低下する事を明らかにした。この*in vivo*での実験結果から、CK2はカイコガの初期発生の正常な発生進行に必須なタンパク質をリン酸化し、その機能を調節している可能性を示した。

以上のように、本研究はCK2によるリン酸化がカイコガの休眠卵・非休眠卵の初期発生に必須である

ことを明らかにするとともに、その活性調節のメカニズムを分子レベルで明らかにしたものであり、高く評価できる。本研究によって、この分野の研究が大きく発展することが期待される。

よって本論文は、博士（理学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成26年1月24日