

博士論文

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

日本大学大学院総合基礎科学研究科

相関理化学専攻

山本 貴之

目次

第1章 序論

1-1 昆虫の生活史と休眠	4
1-2 カイコガの生活史と休眠	5
1-3 カイコガ休眠卵の人工的休眠移行阻害	10
1-4 プロテインキナーゼとCK2	10
1-5 本研究について	12

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

2-1 序論	13
2-2 実験材料と試薬	13
2-2-1 実験材料	13
2-2-2 試薬	13
2-3 方法	14
2-3-1 CK2粗酵素画分の抽出	14
2-3-2 カイコガCK2の部分精製	14
2-3-3 部分精製したCK2の特性決定およびゲル内リン酸化法による CK2 α サブユニットの活性解析	14
2-3-4 SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) と オートラジオグラフィー	15
2-3-5 Total RNA抽出および1st cDNAの合成	15
2-3-6 CK2 α および β サブユニットの縮重PCRプライマーの設計と RT-PCR条件	16
2-3-7 カイコガCK2 α および β サブユニットcDNAのクローニングおよび プラスミドDNAの精製とDNA配列決定	16
2-3-8 完全長カイコガCK2 α および β サブユニットcDNAの取得	16

2-3-9	カイコガCK2 α および β サブユニットの特異的プライマーの設計と RT-PCR条件	17
2-4	結果	23
2-4-1	カイコガCK2の部分精製	23
2-4-2	部分精製CK2の特性決定およびゲル内リン酸化	27
2-4-3	休眠卵と非休眠卵におけるCK2のリン酸化活性測定	29
2-4-4	カイコガCK2 α およびCK2 β サブユニットcDNAのクローニング	31
2-4-5	休眠卵と非休眠卵における <i>BmCK2α</i> および <i>BmCK2β</i> の発現解析	31
2-5	考察	38

第3章 組換えCK2を用いた*in vitro*活性調節機構の解析

3-1	序論	40
3-2	実験材料と試薬	40
3-2-1	実験材料	40
3-2-2	試薬	41
3-3	方法	41
3-3-1	RT-PCR	41
3-3-2	サブクローニングとプラスミドDNA精製	43
3-3-3	DNAの塩基配列の解析	43
3-3-4	タンパク質発現とリフォールディング	43
3-3-5	リン酸化活性測定法	43
3-4	結果	43
3-4-1	組換え <i>BmCK2α</i> と <i>BmCK2β</i> の作製とリン酸化活性の解析	43
3-4-2	ソルビトールと3-OHKが <i>rBmCK2</i> のリン酸化活性に与える影響	44
3-4-3	<i>rBmCK2α</i> とC末端構造が異なる <i>rDmCK2β</i> を用いた機能解析	45
3-5	考察	52

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	
4-1 序論	54
4-2 実験材料と試薬	55
4-2-1 実験材料	55
4-2-2 試薬	55
4-3 方法	55
4-3-1 カイコガ休眠卵の塩酸 (HCl) 処理	55
4-3-2 孵化率の算出	55
4-3-3 走査型電子顕微鏡によるカイコガ卵の表面構造の観察	56
4-4 結果	56
4-4-1 休眠卵に対する DMSO の効果	56
4-4-2 非休眠卵に対する DMSO の効果	56
4-4-3 DMSO による化学物質の卵内への透過効果	57
4-4-4 走査型電子顕微鏡によるカイコガ卵の表面構造の観察	57
4-5 考察	67
第 5 章 総括	70
参考文献	72
謝辞	87

第1章 序論

1-1 昆虫の生活史と休眠

昆虫は全動物種の中で最も種数が多く、その生息域は極地から熱帯まで地球上のあらゆる環境にわたり、最も繁栄している生物群といえる (Pears et al., 1987)。このように昆虫が繁栄できた理由として、一世代のサイクルが非常に早く、多くの環境に適した形質を獲得できたことがあげられる。特に、翅と休眠の獲得により、様々な環境に適応することができたと考えられる。まず、翅の獲得が飛翔による大幅な移動を可能にしたと考えられる (Kukalová-Peck, 1983; Jockusch and Nagy, 1997)。そのため、生育に不適な環境に留まる必要がなくなり、生育に適した環境を求めて移動することで空間的な生息域の拡大をもたらした。また、休眠の獲得は適した時期にのみ生育することを可能にしたと考えられる。生育に不適切な時期を休眠で避けることで、時間的な生息域の拡大をもたらした (Danks, 2000)。加えて、休眠を生活史の中に取り込み季節変動と生活史を同調させたことで、発生時期や生育時期が斉一化し、繁殖の機会を増やしたと考えられる (Tauber et al., 1986)。

昆虫は昼と夜の長さに基づく光周期を利用して、種ごとに異なる生活史を季節に同調させている (Numata and Hidaka, 1982; Saunders, 2010)。光周期は一年周期で正確に変動するため、季節の到来を知るための良い指標となる。昆虫の休眠は、直接的にはこの光周期によって支配されており、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 (Yamashita, 1979)。同じ昆虫でも卵から成虫までの発育期間中、どの段階で休眠するかは種によって異なる。イネ (*Oryza sativa*) の主要な害虫として知られるニカメイガ (*Chilo suppressalis*) は通常年2回の生活史を持ち、幼虫で休眠する。この休眠は幼虫初期の段階の短日条件によって誘導され、終齢幼虫で休眠する。休眠時の幼虫の体液中には多量のグリセロールの蓄積がみられ、休眠時の耐凍性を増大させていると考えられる (Fukaya, 1950)。また、モンシロチョウ (*Pieris rapae*) は、蛹で休眠することが知られている。幼虫期の光周条件によって蛹休眠が誘導されるが、長日条件では非休眠蛹に、短日条件では休眠蛹になる (Kono, 1970)。非休眠蛹と休眠蛹は、蛹殻の厚みが異なることで特徴付けられる。これは蛹の表面の炭化水素量の違いによるもので、休眠蛹の炭化水素量は非休眠蛹の15倍にもなり、休眠時の耐乾燥性を付与していると考えられる (Kaneko and Katagiri, 2004)。さらに、成虫で休眠する昆虫として、コガタルリハムシ (*Gastrophysa atrocyanea*) が知られている。春に土中で羽化した成虫は、1週間ほど地上で活動した後、

再び土中に潜り翌年の春まで休眠する生活史を持つ。この成虫休眠には、活動期特異的タンパク質（APAP I）が関与しているとFujitaらが報告している（Fujita et al., 2006）。休眠覚醒させた成虫に対してAPAP IのRNA干渉を行うことで、卵巢の非発達や土中に潜るなど再び休眠時に特異的な行動が見られることから、APAP Iにより休眠が制御されている可能性があると述べている。

一般的に幼虫・蛹・成虫で見られる休眠は、不適切な環境情報を感知してから休眠に入るため、休眠感受期と休眠実行期が時間的に近いのが特徴である。これらの休眠の誘導と覚醒には、アラタ体から分泌される幼若ホルモンが関与していることが知られている（Weaver and Audsley, 2009; Denlinger, 1985; Pérez-Hedo et al., 2011）。幼虫休眠は高濃度の幼若ホルモンが前胸腺刺激ホルモン分泌を抑制することで（Schafellner et al., 2008）、蛹休眠は脳の前胸腺刺激ホルモンの分泌活動が停止することで（Ding et al., 2003）、成虫休眠はアラタ体の幼若ホルモン分泌が不活性化することで起こるとの報告がある（Tauber et al., 1986; Danks, 1987）。これらの報告から分かるように、幼虫・蛹・成虫で見られる休眠には、低温や乾燥などの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である。一方、次に述べる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、生育に適切な環境のもとで実施される積極的な発育停止であり、幼虫・蛹・成虫で見られる休眠とは質的に大きく異なっている。

1-2 カイコガの生活史と休眠

カイコガ（*Bombyx mori*）は、絹糸をとるために人為的に品種改良されてきた鱗翅目に属する完全変態昆虫である。卵から孵化した幼虫は、桑の葉を餌として4回の脱皮を経て5齢幼虫となる。この間、体重は孵化直後に比べて1万倍を超え、特に絹糸腺と呼ばれる1対の器官が発達して体重の30%にもなる。十分に桑の葉を食べた5齢幼虫は、絹糸腺に蓄えられた液状絹を吐糸口から絹糸として吐き、2-3日かけて繭を作る。繭の中で蛹となり、10日ほどで羽化した成虫は繭外へ出た後、餌を食べることなく交尾・産卵して一生を終える。一世代は40-50日ほどであり、交尾したメス蛾は、400-500個ほどの卵を産む（図1）。

カイコガは休眠性の違いから、多化性・一化性・二化性に分類することができる。多化性カイコガは1年に複数世代、一化性カイコガは1年に一世代の生活史を持ち、それぞれ環境条件に関わらず前者は非休眠卵を、後者は休眠卵を産卵する。それに対し、1年に二世代の生活史を持つ二化性カイコガは、環境条件により休眠卵と非休眠卵とを産み分ける

(図 1)。この休眠性の違いは、産卵するメス蛾の胚発生時の温度と光周条件に依存する。具体的には、低温短日条件下（15℃、8 時間明：16 時間暗）で発生が進み孵化した幼虫は将来、非休眠卵を産卵し、高温長日条件（25℃、16 時間明：8 時間暗）で発生が進み孵化した幼虫は将来、休眠卵を産卵する（Kogure, 1933）。すなわち、二化性カイコガは自然状態で春から夏、夏から秋の年 2 回の生育期間を持つが、それぞれの胚発生時の環境条件は前者が春の低温短日条件、後者が夏の高温長日条件に相当する。このように、カイコガの卵休眠は将来の生育に不適切な環境の到来に備え、適切な生育環境時から計画された積極的な発育停止現象であるといえる（Nijhout, 1994; Yamashita and Hasegawa, 1985）。この休眠は、上述した幼虫・蛹・成虫などで見られる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異なる現象である。

カイコガの卵休眠は、休眠ホルモンによって引き起こされることが 1951 年に、Hasegawa と Fukuda のそれぞれ独立した研究によって発見された（Hasegawa, 1951; Fukuda, 1951）。その後、40 年余り費やされた研究により構造決定がなされ、休眠ホルモンは 24 個のアミノ酸からなるペプチドホルモンであることが明らかにされた（Sato et al., 1992）。この休眠ホルモンは、食道下神経節の 7 対 14 個の神経分泌細胞で合成され、側心体から体液中に放出される（Yamashita, 1985; Sato et al., 1993）。休眠ホルモンが放出される時期は、食道下神経節の除去実験から蛹化後約 2 日目であることを Ichikawa らが報告している（Ichikawa, 1997）。体液中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、産卵された卵の胚発生は 2 日ほど進行した後、後期原腸胚の段階で細胞周期が G2 期の状態で停止し、休眠へと移行する（Nakagaki et al., 1991）。この時、休眠卵では非休眠卵には見られない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。産卵直後のカイコガの休眠卵は淡黄色であるが、産卵後 36 時間ほどから色付き始め、60 時間ほどで濃い小豆色に変色する（図 2B）。一方、非休眠卵は淡黄色のまま色付かない（図 2A）。この休眠卵の色付きは、漿膜細胞に蓄積したオミンやキサントマチンなどのオモクローム色素によるものである。オモクローム色素は、トリプトファン由来の 3-ヒドロキシキヌレニン（3-OHK）から生合成され、節足動物の主要な赤色系色素として広く存在している（Kikkawa, 1941; Sonobe and Ohnishi, 1970）。また、オモクローム色素は複眼・翅・体色などで遮光やカモフラージュとしての機能を担っている以外に、紫外線による酸化ストレスを軽減する抗酸化物質としての機能も持っていると考えられている（Sawada et al., 2007; Futahashi et al., 2012）。さらに、休眠卵では糖アルコールの一種であるソルビトールがグリ

コーゲンから作り出され、休眠覚醒とともにソルビトールが消失する (Chino, 1958)。Yaginumaらは、この反応を触媒するソルビトール脱水素酵素 (SDH) の活性が、カイコガ休眠卵を 5°C で 2-3 ヶ月間の低温処理を行うことで出現することを示し、SDH活性の誘導が mRNA のレベルで調節されていることを報告している (Yaginuma and Yamashita, 1979; Yaginuma et al., 1990; Niimi et al., 1993)。休眠卵に特異的に見られるソルビトールの蓄積は、冬期の耐寒性を保障する耐凍物質として作用していると考えられている (Chino, 1957)。

このカイコガの休眠は、親の胚発生期に受容した環境情報を長期間記憶し、次世代の卵で実行するという、上述した幼虫・蛹・成虫での休眠とは大きく異なる非常に興味深い現象である。このため、カイコの休眠に関して多くの報告がある。Moribeらは、カイコガ卵を 5°C で処理すると ssDNA 結合モチーフを持つ BAG タンパク質ファミリーの発現がアップレギュレートされることと、Hsp70 タンパク質と結合し相互作用する可能性を報告した (Moribe et al., 2001)。SonobeらやYamadaらは、初期胚発生時に卵黄顆粒中でエクジステロイドリン酸ホスファターゼの作用によって、エクジステロイドリン酸からエクジステロイドが生成され、卵黄顆粒から放出されることを報告した (Sonobe and Yamada, 2004; Yamada et al., 2005)。Yamahamaらは、*in vivo*でのカイコガ卵で胚発生時に卵黄顆粒の酸性化に伴ってシステインプロテアーゼが活性化される可能性があることを報告した (Yamahama et al., 2003)。Sawadaらは、DEADボックスと相同性をもつRNAヘリカーゼ様遺伝子の発現がHCl処理によって増大することを明らかにし、免疫組織化学的解析から、この分子が非休眠卵の胚盤葉細胞では核に、卵黄細胞では核と細胞質に局在していることを報告した (Sawada et al., 2006)。Trangらは、概日リズムに関与しているプロテインキナーゼCK1の高い発現が、休眠覚醒直後に見られたことを報告した (Trang et al., 2006)。しかしながら、これらの多くの報告があるにも関わらず、カイコガの休眠の分子機構は、その一部しか明らかになっていない。この全体像を解明するためには、休眠覚醒後の胚発生だけではなく、休眠の開始前の胚発生に関しても調査することが重要である。

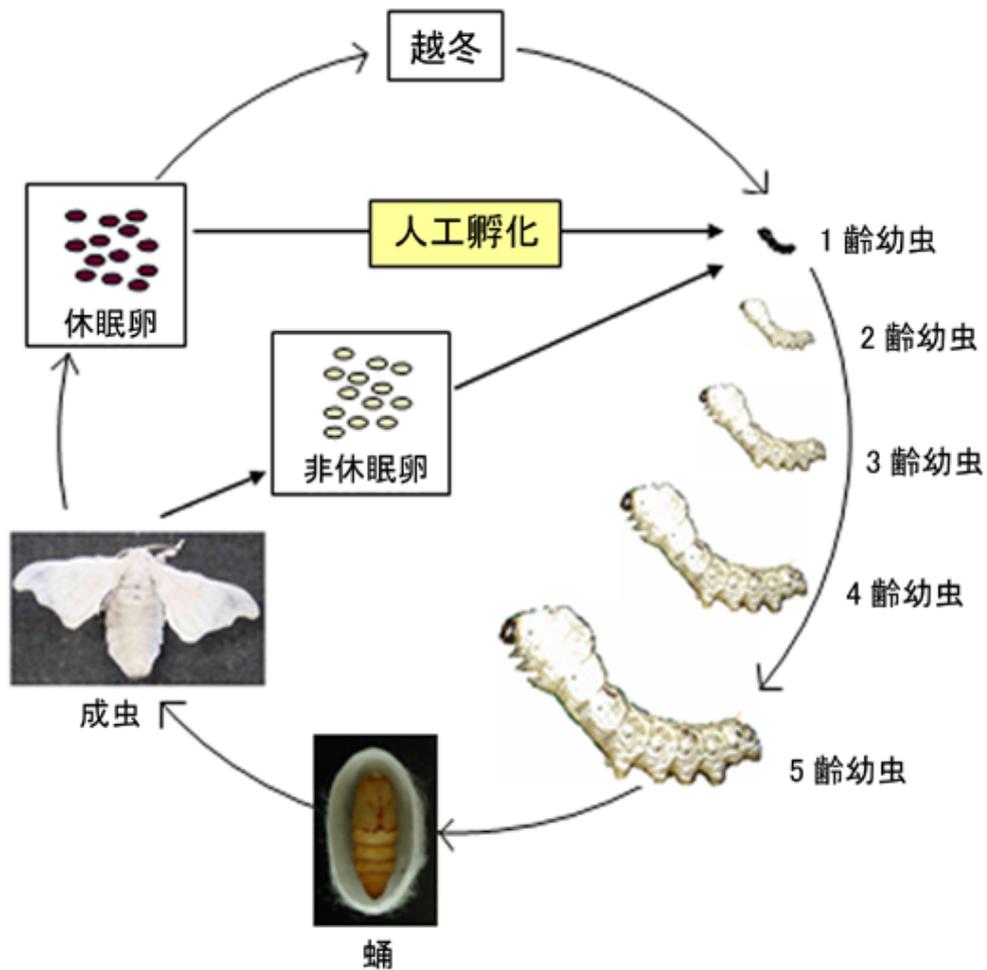


図1 二化性カイコガ (*Bombyx mori*) の生活史

各ステージの期間を以下に示す。

幼虫 (1-5 齢) : 21-25 日

蛹 : 10-12 日

成虫 : 約 10 日

休眠卵 : 100-200 日 (高温短日条件 ; 25℃, 16 時間明, 8 時間暗)

* 休眠卵を薬剤処理することで人工孵化が可能である。

非休眠卵 : 10-14 日 (低温短日条件 ; 15℃, 8 時間明, 16 時間暗)

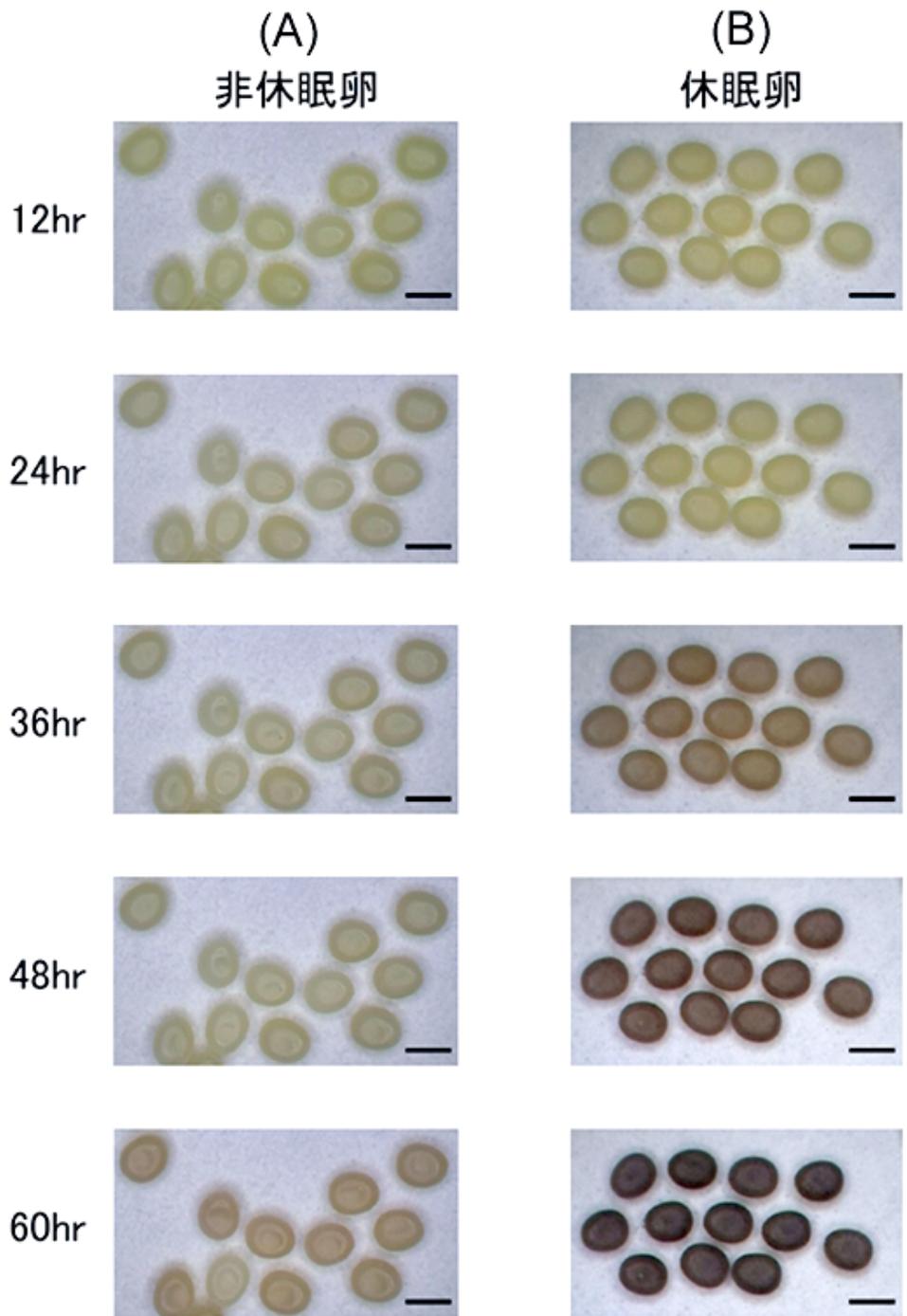


図2 カイコガ休眠卵および非休眠卵の12-60時間の経時変化

(A) は非休眠卵，(B) は休眠卵，バーは1mmを示す。

1-3 カイコガ休眠卵の人工的休眠移行阻害

カイコガの休眠卵を人為的に指定濃度のHClに浸すことで、休眠への移行を阻害して非休眠卵と同様に孵化させることができ、これを浸酸処理法と呼ぶ。産卵後 20 時間の休眠卵を 46°Cに加温したHCl (15°C比重:1.075) に 5 分間浸す即時加温浸酸法や、同じく産卵後 20 時間の休眠卵を常温のHCl (15°C比重:1.110) に 60 分間浸す即時常温浸酸法に加えて、産卵後 48 時間の休眠卵を 5°Cに 30 日間ほど冷蔵後、48°Cに加温したHCl (15°C比重:1.100) に 5 分間浸す冷蔵浸酸法がある。これら浸酸処理法と卵の冷蔵を組み合わせることにより、任意に孵化時期を 1-3 ヶ月後に調節することが可能である。浸酸処理法は、80 年以上前に確立された技術であるが、HClによる休眠の移行阻害、または打破する分子機構は未だ解明されていない。しかしながら、浸酸処理法の効果に関するいくつかの仮説の提唱がなされている (Sonobe et al., 1979; Sonobe and Nakamura, 1991; Yoshimi et al., 1990; Tsurumaru et al., 2010)。また、カイコガ休眠卵の卵殻を物理的に除去することで、孵化には至らないものの胚発生が進行して幼虫の形態が確認できるまでになる除殻卵培養法も知られている (Ohtsuki and Kitazawa, 1974; Park KE and Yoshitake, 1970; Iwata et al., 2005)。

1-4 プロテインキナーゼとCK2

プロテインキナーゼとは、タンパク質にリン酸基を転移させる酵素の総称である。細胞内に存在する多くの酵素や受容体タンパク質は、リン酸化により立体構造の変化を受け、その機能が調節されている。通常、真核生物でのタンパク質のリン酸化は、セリン・スレオニン・チロシン残基に起こり、そのリン酸化能から、プロテインキナーゼはセリン・スレオニンキナーゼとチロシンキナーゼに大別される。セリン・スレオニンキナーゼは、主にATPのリン酸基をタンパク質配列中のセリン・スレオニン残基のヒドロキシル基に共有結合させ、チロシンキナーゼはチロシン残基のヒドロキシル基にリン酸基を共有結合させる。この活性は、他のプロテインキナーゼ、あるいは自らのリン酸化によって厳密に制御されている (Hunter, 1995)。タンパク質の翻訳後修飾のひとつであるリン酸化は、真核生物において広く認められ、細胞増殖・分化・代謝・シグナル伝達など、生体内における様々な生命現象に深く関わっている (Pinna, 1990; Allende and Allende, 1995)。

カイコガは特定の発育段階で変態と休眠をするため、プロテインキナーゼによる遺伝子調節とリン酸化活性制御の調査に適しており (Nijhout, 1994; Yamashita and Hasegawa, 1985)、カイコガの主要な卵黄タンパク質であるビテリンのcAMP依存性プロテインキナー

ゼ (PKA) およびcGMP依存性プロテインキナーゼ (PKG) によるリン酸化 (Takahashi, 1985), 受精卵と未受精卵からの塩基性ポリペプチドで活性化されるプロテインキナーゼの精製 (Saito et al., 1990), 脂肪体cDNAからの2つの異なるサイクリン依存性プロテインキナーゼ (cdc2) のクローニング (Iwasaki et al., 1997), 真核生物翻訳開始因子-2a (eIF2a) プロテインキナーゼのクローニング (Prasad et al., 2003), および雄触覚cDNAライブラリーからのcGMP依存性プロテインキナーゼ (PKG) のクローニング (Tanoue and Nishioka, 2003) など, 多くのプロテインキナーゼについて報告がある。

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る (Hunter, 1995; Pinna, 2002; Montenarh, 2010)。CK2 の分子量は生物種によって異なるが 130-140 kDa 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 (Pinna, 1990; Bolanos-Garcia et al., 2006)。また, そのアミノ酸配列が酵母からヒトに至るまで, 非常に良く保存されている (Lozeman et al., 1990; Padmanabha et al., 1990)。他のプロテインキナーゼとは異なり, CK2 のリン酸化活性は恒常的に認められる (Olsen et al., 2010)。この活性は, ポリリジン (poly-Lys) やポリアルギニン (poly-Arg) などの塩基性ポリペプチドで活性化され, ヘパリン (heparin) などの硫酸化合物で抑制される (Palen and Traugh, 1991; Meggio et al., 1992)。さらに, CK2 のリン酸化部位のコンセンサス配列は (S/T) -X-X- (E/D) であり, リン酸供与体として ATP 以外に GTP を利用できる唯一のプロテインキナーゼである (Allende and Allende, 1995)。

CK2 の基質タンパク質は, c-myc, p53, RNA polymerase, DNA topoisomerase など, 細胞周期の調節や遺伝子発現に関わるタンパク質が多く含まれ, 現在 300 種類を超えるタンパク質が基質として報告されている (Lüscher et al., 1989; Meek and Cox, 2011; Boguta and Graczyk, 2011; Tuteja et al., 2003)。また, CK2 は概日リズムの調節 (Lin et al., 2002; Akten et al., 2003), キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の複眼形成 (Karandikar et al., 2004), アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の初期発生 (Dominguez et al., 2005), DNA の複製, および転写や細胞増殖 (Iwasaki et al., 1997; Meggio and Pinna, 2003; Iwai et al., 2008) などにおいても重要な役割を果たしている。

1-5 本研究について

上述したようにCK2は、多くの細胞内機能性タンパク質の制御を行っており、極めて重要な役割を担っている。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、それに関連する研究はほとんどなされていない。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知見を中心にまとめたものである。

CK2は初期発生において重要な役割を果たしており、特に胚の形態形成では不可欠であることから、まず第2章では、産卵後60時間までの休眠卵および非休眠卵の初期発生時におけるCK2のリン酸化活性を測定し、両卵での活性変動パターンを調査した。さらに、カイコガCK2の α サブユニットと β サブユニットをコードするcDNAのクローニングとRT-PCRによるCK2遺伝子の発現解析を行った。

また、CK2は細胞内で多くのシグナル伝達に関わっており、カイコガの休眠でもCK2のリン酸化を介した調節の関与が考えられた。そこで第3章では、大腸菌発現系で作製したカイコガのリコンビナントCK2 α サブユニットとCK2 β サブユニット、およびキイロシヨウジヨウバエのC末端配列の異なる2種類のCK2 β サブユニットを用いて、*in vitro*でのリン酸化活性調節機構の解析を行った。さらに、休眠卵に特異的かつ多量に含まれている3-OHKとソルビトールがCK2のリン酸化活性に及ぼす影響を検討した。第4章では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。また、最適なDMSO処理条件と浸酸処理法との比較検討を行った。これらの結果を総合して第5章では、カイコガの初期発生におけるCK2の役割について考察した。

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

2-1 序論

真核生物の初期発生において、細胞周期を調節する多くの因子が同定されている (Masri et al., 2013; Padilla and Ladage, 2012)。細胞周期の進行は、直接的にはプロテインキナーゼであるCDKとサイクリンから形成される複合体によって制御されている (Lim and Kaldis, 2013)。CK2のリン酸化によって、細胞周期のG1/S、G2/M両チェックポイントが調節されることが酵母で示されている (Glover, 1998)。また、CK2は、細胞周期の調節に関与する多くのタンパク質をリン酸化することが知られている (Lüscher et al., 1989; Meek and Cox, 2011)。一方、カイコガの休眠では、胚発生の細胞分裂がG2期で停止していることから (Nakagaki et al., 1991)、カイコガの休眠がCK2のリン酸化による調節を受けて引き起こされている可能性が考えられた。そこで、休眠とCK2によるリン酸化と休眠の関係を明らかにするため、休眠卵と非休眠卵での初期発生におけるCK2のリン酸化活性測定とCK2遺伝子の発現解析を行った。さらに、カラムクロマトグラフィーを用いて、非休眠卵からCK2の部分精製を行った。

2-2 実験材料と試薬

2-2-1 実験材料

本実験には二化性カイコガ品種の大造を使用した。休眠卵は高温長日条件 (25°C, 16時間明:8時間暗) で胚発生を行ったメス蛾から、非休眠卵は15°Cの暗室内で胚発生を行ったメス蛾から得た。休眠卵および非休眠卵のサンプリングは、産卵後3時間以内の卵を0時間として、その後12時間ごとに行った。サンプリング後のカイコガ卵は直ちに液体窒素で瞬間凍結し、使用まで-80°Cで保存した。CK2の部分精製には産卵後72時間の非休眠卵を用いた。

2-2-2 試薬

[γ -³²P] GTPおよび[γ -³²P] ATPは、Amersham-Pharmacia Biotech社製 (USA) を使用した。その他の試薬は、Sigma-Aldrich社製 (USA) を使用した。

2-3 方法

2-3-1 CK2 粗酵素画分の抽出

休眠卵と非休眠卵におけるCK2のリン酸化活性測定用のCK2の抽出は、図1の手順で行った。透析・脱塩後の抽出溶液をCK2のリン酸化活性測定に使用した。CK2のリン酸化反応は基質にcasein, リン酸供与体に $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ GTPを用いて30°Cで30分間行った。CK2のリン酸化活性測定用の反応溶液の組成は表1の通りである。

2-3-2 カイコガCK2の部分精製

カイコガ卵からのCK2の部分精製を図1の手順に従い、カラムクロマトグラフィーにより行った。カイコガ卵に対して3.5倍量の1.5 M KClを含む緩衝液(A)を加え、乳鉢中でホモジナイズ後、ホモジネートに65%飽和度になるように硫酸アンモニウムを添加し40分間攪拌した。その後、遠心分離を10,000 gで20分間行い、上清を除去した。得られた沈殿物を少量の0.15 M KClを含む緩衝液(A)に溶解し、同緩衝液で一晩透析・脱塩した。0.15 M KClを含む緩衝液(A)で平衡化したHeparinとの親和性を利用して分離するHeparin-agaroseカラム(Sterogene社)に透析後のCK2画分をアプライし、CK2をゲルに吸着させた。非吸着タンパク質を同緩衝液で溶出させた後、CK2を含む吸着画分を1.0 MのKClを含む緩衝液(A)でアイソクラティック溶出を行った。得られた各溶出画分のCK2のリン酸化活性を測定し、高い活性画分を集めて濃縮遠心を行い、2 ml程度まで濃縮した。次に、0.6 M KClを含む緩衝液(A)で平衡化したゲルろ過クロマトグラフィーであるSuperdex-200にアプライした。フラクションコレクターで回収されたCK2のリン酸化活性の高い溶出画分を集め、濃縮遠心をした後、0.1 MのKClを含む緩衝液(A)で一晩透析した。さらに、透析後の画分を陰イオン交換クロマトグラフィーであるMono-Qカラムにアプライし、0.1-1.0 MのKClでグラジエント溶出を行った。緩衝液(A)の組成は表2の通りである。

2-3-3 部分精製したCK2の特性決定およびゲル内リン酸化法によるCK2 α サブユニットの活性解析

部分精製されたCK2の特性決定を、性質の異なる各種基質(casein, phosvitin, MBP, histone H2A, histone H3)と2種類のリン酸供与体(ATP, GTP)を用いて行った。さらにCK2のリン酸化活性がheparinで阻害され、poly-Lysで活性化されるかの解析を行った。CK2

のリン酸化反応は基質にcaseinの代わりに各種基質を用いた以外は、2-3-1と同様に行った。また、CK2のリン酸化活性の阻害および活性化の解析のため、表1の反応溶液中に、heparinまたはpoly-Lysを1 µg添加した。

部分精製したカイコガCK2 (50 µg/ µl) 20 µlを等量の2× サンプル緩衝液を混合し、沸騰水浴中で5分間処理した。CK2の基質であるcaseinを0.5 mg/ml含んだポリアクリルアミドゲルを作製し、泳動を行った。泳動後のゲルを100 mlの緩衝液(1)中に浸し、30分間振とうした。この操作を2回繰り返す、ゲル内のCK2タンパク質を十分に固定化した。次に緩衝液(2)を100 ml加え、室温で60分間振とうした。この操作を3回繰り返す、ゲルを十分洗浄した。さらに、250 mlの緩衝液(3)で4°C、一晩振とうした。振とう中に溶液交換を3回行い、ゲル内のCK2のリフォールディングを促した。その後、ビニールパック内にゲルを移し、1.85 MBqの[γ-³²P]ATPを含んだ反応液5 ml中で60分間リン酸化反応を行った。反応後のゲルは100 mlの洗浄液に浸し、30分間振とうした。この操作を5回繰り返す、ゲルを十分洗浄した。洗浄後のゲルは乾燥させた後、X線フィルムに感光させ、触媒サブユニットであるCK2αによるリン酸化シグナルを解析した。各種緩衝液、リン酸化反応液および洗浄液の組成は表3の通りである。

2-3-4 SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) とオートラジオグラフィー

SDS-PAGEは、Laemmliの方法 (Laemmli, 1970) に従い、0.1% SDSを含む12.5%ポリアクリルアミドゲルで行った。泳動後のゲルはCoomassie brilliant blue (CBB) で染色し、タンパク質バンドを解析した。放射性リン酸基を転移させたcaseinをSDS-PAGEにより分離後、オートラジオグラフィーにより、CK2のリン酸化活性の検出を行った。CK2のリン酸化活性測定用の反応溶液の組成は表1の通りである。

2-3-5 Total RNA 抽出および1st cDNAの合成

-80°Cで保存していたカイコガ卵を、液体窒素で冷却した乳鉢中で粉砕した。粉砕試料に10倍量 (w/v) の Solution Dを加えて、グアニジウムチオシアネート・フェノール・クロロホルム抽出法 (Chomczynski and Sacchi, 1987) によりTotal RNAを抽出した。抽出されたTotal RNAの濃度は、分光光度法で測定した。Solution Dの組成は表4の通りである。

1st cDNAは、休眠卵・非休眠卵の各ステージ3 µgのTotal RNAから、プライムファーストストランドビーズキット (Amersham-Pharmacia Biotech社製, USA) とオリゴdTまたはpd

(n) ₆ ランダムプライマーを用いて逆転写して合成した。

2-3-6 CK2 α および β サブユニットの縮重PCRプライマーの設計とRT-PCR条件

各生物種 (*Spodoptera frugiperda*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Bos Taurus*, *Gallus gallus*, *Danio rerio*, *Xenopus laevis*, *Homo sapiens*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae*) の配列に基づき、各生物種のORF中で高度に保存された領域の縮重プライマーを設計した。CK2 α および β サブユニットの縮重PCRプライマーの配列は表 5 のとおりである。RT-PCRは、休眠卵および非休眠卵の各ステージの1st cDNAを鋳型に用いて、TAKARA Ex Taqキットの手順に従って行った。RT-PCRの反応溶液組成 (100 μ l) は表 6, 反応条件は表 7 の通りである。

2-3-7 カイコガCK2 α および β サブユニットcDNAのクローニングおよびプラスミドDNAの精製とDNA 配列決定

RT-PCRにより増幅されたcDNAは、1.5%アガロースゲル上で電気泳動後、エチジウムブロマイド染色で分子量の解析を行った。RT-PCR産物のクローニングは、pGEM-T Easy Vector キット (Promega, USA) を用いて行い、JM109 大腸菌を形質転換した。目的cDNA断片の挿入が確認できたクローンを2 mlのLB液体培地で37°C, 16時間培養した。プラスミドDNAは、アルカリミニプレップ法により精製した。

DNA 配列決定はサンガー法 (Sanger, 1981) により、精製プラスミドを鋳型に用いて、Big-dye ターミネーターキット (ABI) によるDNAシーケンシングPCRを行った。増幅されたPCR産物を精製後、ホルムアミドに溶解し、ABI-310 シーケンサーで解析を行った。得られた配列データの解析は、Bio-Edit配列解析ソフトを用いて行った。

2-3-8 完全長カイコガCK2 α および β サブユニットcDNAの取得

完全長CK2 α およびCK2 β のcDNA配列の取得は、マラソンRACE増幅キットを用いて行った。CK2 α およびCK2 β サブユニットの部分配列に基づき、特異的プライマーを作製した。タッチダウンRT-PCRにより、3'および5'方向を伸長し解析した。増幅されたcDNAは2-3-7と同様の手順で、pGEM-T Easy Vectorへのクローニングおよび、プラスミドDNAの精製を行った。

2-3-9 カイコガCK2 α および β サブユニットの特異的プライマーの設計とRT-PCR条件

得られた完全長カイコガCK2 α およびCK2 β のcDNAの配列 (*BmCK2 α* , *BmCK2 β*) を基に, 全ORF部分を含むCK2 α および β サブユニットの特異的プライマーを設計し, RT-PCRを行った。CK2 α および β サブユニットの特異的PCRプライマーの配列は表 8 のとおりである。また, RT-PCRの内部標準として, Ribosomal protein L5 (AF008229) を使用した。Ribosomal protein L5 のプライマー配列は表 8 のとおりである。また, カイコガCK2 α および β サブユニット特異的プライマーを用いたRT-PCRの反応条件は表 9 の通りである。RT-PCRの反応溶液組成は表 6 と同様である。RT-PCRにより増幅されたcDNAは, 上述と同様の手順で分子量の解析, サブクローニング, プラスミドの精製, シーケンスを行った。

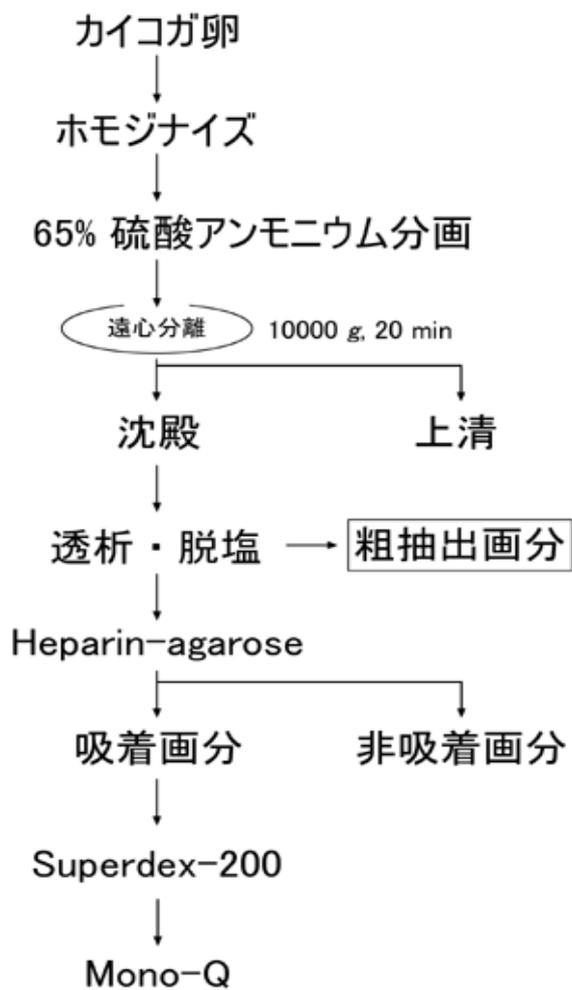


図1 カイコガ卵からのCK2部分精製フローチャート

CK2活性の変動解析には、硫酸アンモニウム分画より調製した粗抽出液を用いた。部分精製は、カラムクロマトグラフィーで行った。

表 1 CK2 のリン酸化活性測定用の反応溶液の組成 (100 μ l)

40 mM	Tris-HCl (pH 7.6)
2 mM	DTT
3 mM	MnCl ₂
10 μ g	casein
20 μ M	[γ - ³² P] GTP (500 cpm/ pmol)
20 μ l	CK2 粗抽出画分 (3.6 μ g protein)

表 2 CK2 の部分精製に用いた緩衝液 (A) の組成

20 mM	Tris-HCl (pH 7.6)
2 mM	dithiothreitol (DTT) * ¹
0.1 mM	phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) * ²
10%	glycerol

*¹ CK2 の失活防止剤

*² セリン・システインプロテアーゼ阻害剤

表3 ゲル内リン酸化法に用いた各緩衝液, リン酸化反応液および
洗浄液の組成

緩衝液 (1)	0.5 M Tris-HCl (pH8.0) , glycerol, 50 mM 2-mercaptoethanol, 20% propanol
緩衝液 (2)	0.5 M Tris-HCl (pH8.0) , glycerol, 50 mM 2-mercaptoethanol,
緩衝液 (3)	0.5 M Tris-HCl (pH8.0) , glycerol, 50 mM 2-mercaptoethanol, 6 M guanidine hydrochloride
緩衝液 (4)	0.5 M Tris-HCl (pH8.0) , glycerol, 50 mM 2-mercaptoethanol, 0.04% Tween-40
リン酸化 反応液	40 mM HEPES-NaOH (pH 8.0) , 8 mM 2-mercaptoethanol, 3 mM MnCl ₂ , 1.85 MBq [γ - ³² P] ATP
洗浄液	5% TCA, 1% sodium pyrophosphate

表4 Total RNAの抽出に用いたSolution Dの組成

4 M	guanidinium thiocyanate
25 mM	sodium citrate
0.5%	sarcosyl
0.1 M	2-mercaptoethanol

表 5 CK2 α および β サブユニットの縮重PCRプライマーの配列

<i>CK2α sense</i>	5'-GTKGTWGAWTGGGGSMHCARGA-3'
<i>CK2β sense</i>	5'-ATGAGYAGYTCNGAGGA-3'
<i>CK2α antisense</i>	5'-TGRTCRRTRTTRTCRTGKCCRTGGAA-3'
<i>CK2β antisense</i>	5'-TGDATYTTTRAADCCRTA-3'

D:G or A or T, H:A or C or T, K:G or T, M:A or C, N:G or A or T or C,
R:G or A, S:G or C, W:A or T, Y:T or C

表 6 縮重プライマーを用いたRT-PCRの反応溶液組成 (100 μ l)

10 \times PCR Ex Taq 緩衝液	10 μ l
2.5 mM dNTP mixture	8 μ l
H ₂ O	79.5 μ l
0.1 mM Primer F	0.5 μ l
0.1 mM Primer R	0.5 μ l
1st cDNA	1 μ l
Ex Taq (5 unit/ μ l)	0.5 μ l

表 7 縮重プライマーを用いたRT-PCRの反応条件

94°C, 1 分間	1 サイクル
94°C, 1 分間	
50°C, 1 分間	35 サイクル
72°C, 1 分間	
72°C, 1 分間	1 サイクル

表 8 カイコガCK2 α および β サブユニットの特異的プライマーおよび、内部標準として用いたRibosomal protein L5 のプライマー配列

<i>BmCK2α</i> sense	5'-CGATGGCAGTACCTAGTAGAGC-3',
<i>BmCK2β</i> sense	5'-ATGAGTAGTTCGGAGGAGG-3'
<i>BmCK2α</i> antisense	5'-CTCTGCAGAATTTACTGGTCC-3'
<i>BmCK2β</i> antisense	5'-ACGTTTACCGTTGTTGTACG-3'
<i>Ribosomal protein L5</i> sense	5'-GGCACAACAGATGTCACAGG-3'
<i>Ribosomal protein L5</i> antisense	5'-GATTCTGCATCATAGCCAGG -3'

表 9 特異的プライマーを用いたRT-PCRの反応条件

94°C, 1 分間	1 サイクル
94°C, 1 分間	
55°C, 1 分間	25 サイクル
72°C, 1 分間	
72°C, 1 分間	1 サイクル

2-4 結果

2-4-1 カイコガCK2の部分精製

CK2の部分精製はKanekastuらの方法(Kanekatsu et al., 1995)に従い、産卵後72時間の非休眠卵を材料として、Heparin-agarose, Superdex-200, Mono-Qの順でカラムクロマトグラフィーでの分離を行った。

Heparin-agarose カラムクロマトグラフィーでの分離

0.15 M KClを含む緩衝液(A)で平衡化したHeparin agaroseカラムにCK2粗抽出画分をアプライし、CK2をはじめとするheparinに親和性のあるタンパク質をゲルに吸着させた。非吸着タンパク質を同緩衝液で溶出させた後、1.0 M KClでアイソクラティック溶出を行い、CK2を含む吸着画分の溶出を行った。非吸着画分にはCK2のリン酸化活性がほとんど見られず、CK2はそのほとんどが吸着画分に見られた(図2B)。得られた吸着画分のCK2のリン酸化活性を測定し、高いCK2のリン酸化活性が見られた吸着画分(図2A; 灰色領域)を集めた。

Superdex-200 カラムクロマトグラフィーでの分離

Heparin-agaroseカラムクロマトグラフィーにより分離したCK2画分の遠心濃縮を行った。その濃縮画分を予め0.6 M KClを含む緩衝液(A)で平衡化したSuperdex-200にアプライした。同緩衝液で溶出を行い、フラクションコレクターで画分の回収を行った。各画分のCK2のリン酸化活性を測定し(図3B)、高いCK2のリン酸化活性がFraction No.13-17の画分(図3A; 灰色領域)に見られた。

ゲル濾過カラムであるSuperdex-200は、分子サイズに基づきタンパク質を分離するため、溶出パターンから分子量を推定できる。それにより、CK2の分子量は約130 kDaと推測された(図3A; 灰色領域)。

Mono-Q カラムクロマトグラフィーでの分離

Superdex-200カラムクロマトグラフィーで分離したCK2画分の濃縮遠心を行い、0.1 M KClを含む緩衝液(A)で一晩透析した。透析したサンプルを0.1 M KClを含む緩衝液(A)で平衡化したMono-Qカラムにアプライし、KClで0.1-1.0 Mのグラジエント溶出を行った。フラクションコレクターで回収された各画分のCK2のリン酸化活性を測定し(図4B)、CK2の高い活性がFraction No.26, 27の画分(図4A; 灰色領域)に見られた。この画分を用い、CK2の特性決定を行った。

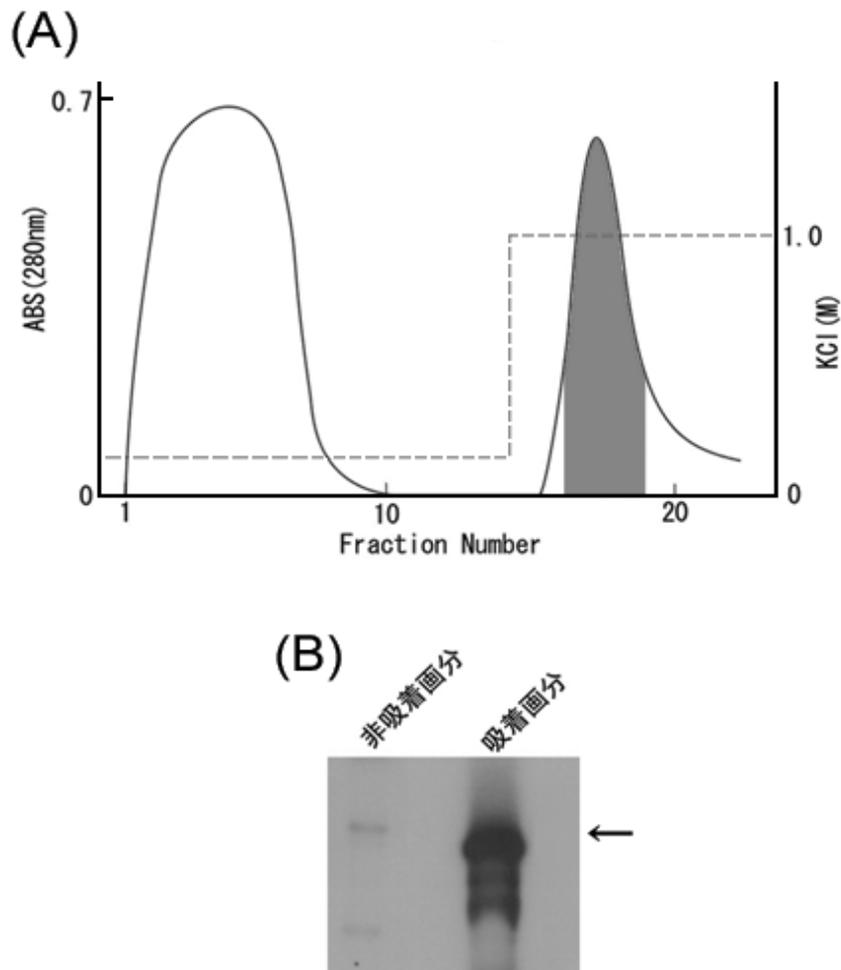


図2 Heparin-agarose カラムクロマトグラフィーでのCK2 溶出結果

- (A) : Heparin-agarose カラムクロマトグラフィーの非吸着画分 (Fraction No.1-10) と吸着画分 (Fraction No.16-18) の溶出パターン。CK2 活性の高い溶出画分を灰色領域で示した。1.0 Mアイソクラティック溶出のKCl濃度を破線で示した。
- (B) : 非吸着画分 (Fraction No.1-10) と吸着画分 (Fraction No.16-18) のCK2 活性の比較。矢印はcasein (約 33 kDa) のリン酸化シグナルを示す。

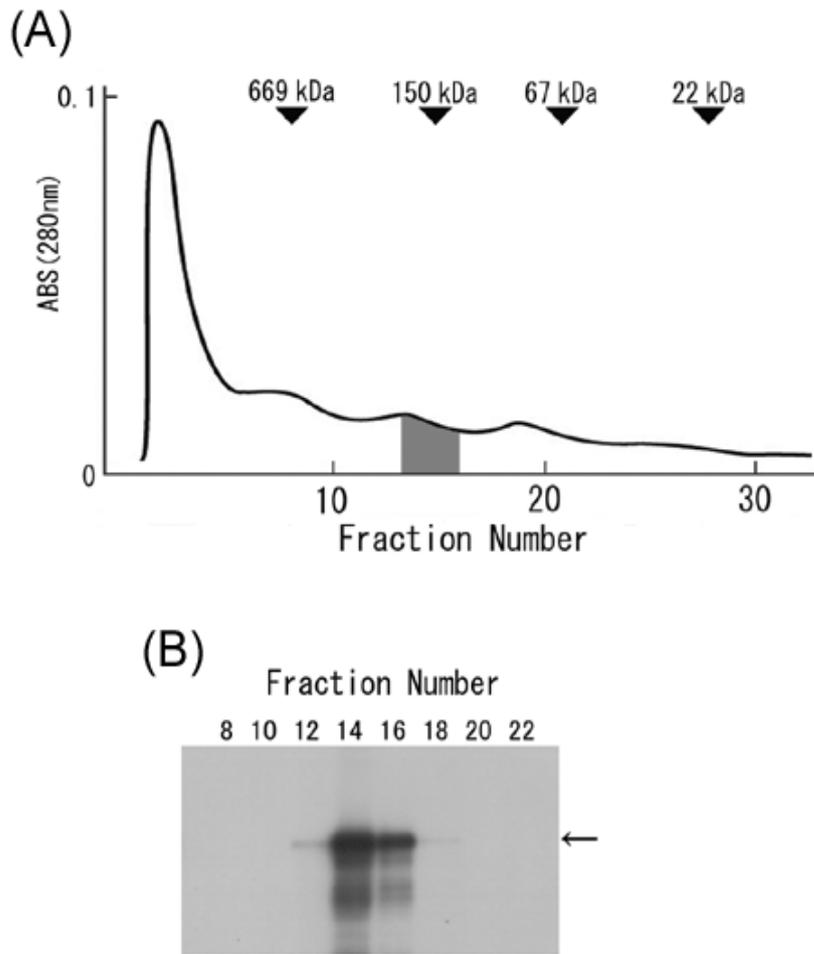


図3 Superdex-200 カラムクロマトグラフィーでのCK2 溶出結果

- (A) : Superdex-200 カラムクロマトグラフィーの溶出パターン。CK2 活性の高い溶出画分 (Fraction No.13-17) を灰色領域で示した。上部矢印の溶出パターンから推測されるCK2 の分子量は、約 130 kDaと推測できた。
- (B) : Fraction No.8-22 のCK2 活性の比較。
矢印はcasein (約 33 kDa) のリン酸化シグナルを示す。

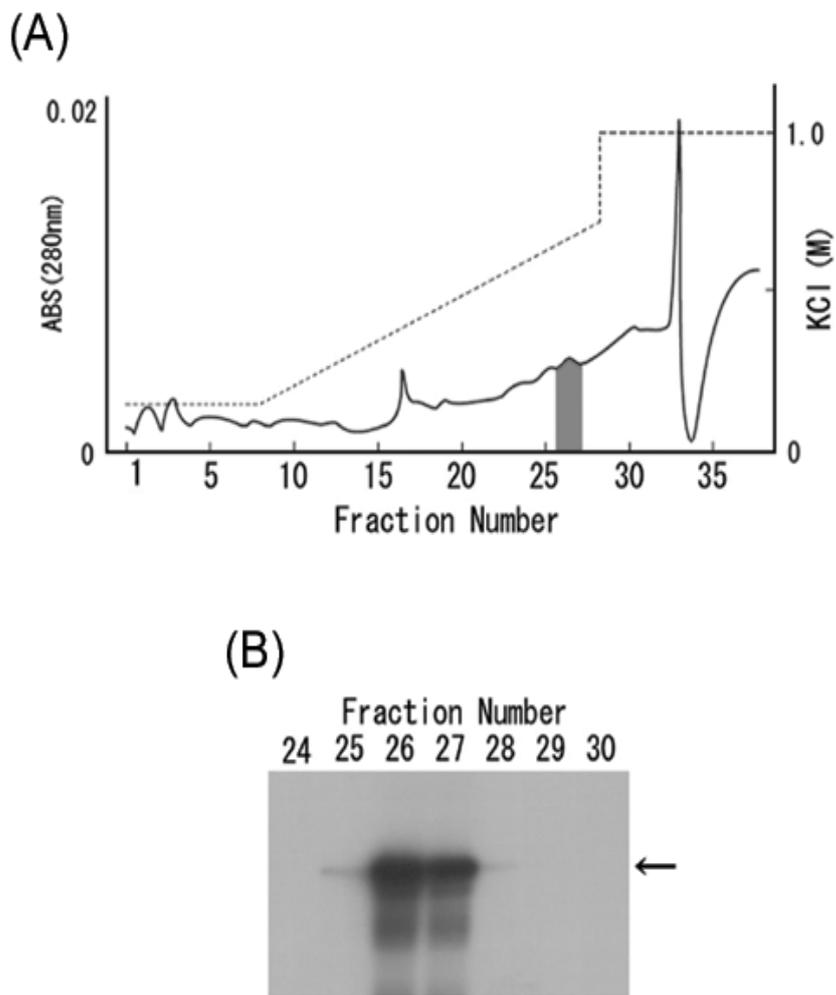


図4 Mono-Q カラムクロマトグラフィーでのCK2 溶出結果

(A) : Mono-Q カラムクロマトグラフィーの溶出パターン。CK2 活性の高い溶出画分 (Fraction No.26, 27) を灰色領域で示した。0.1-1.0 Mグラジェント溶出のKCl濃度を破線で示した。

(B) : Fraction No.8-22 のCK2 活性の比較。

矢印はcasein (約 33 kDa) のリン酸化シグナルを示す。

2-4-2 部分精製CK2 の特性決定およびゲル内リン酸化

Mono-Qカラムの溶出パターンから、CK2 は高度に精製されたと考えられたが、SDS-PAGEでは単一バンドを確認することができなかった。そのため、得られたCK2 画分の特性決定を、各種基質を用いて行った。

CK2 は、caseinを最も良くリン酸化した（図 5A）が、phosvitinをほとんどリン酸化しなかった。一方、塩基性タンパク質であるMBP, histone H2A, histone H3 の分子量に相当する明瞭なリン酸化シグナルは解析できなかった（図 5A ; 矢印）。また、そのリン酸化活性がheparinで阻害され、poly-Lysで増加するといったCK2 の典型的な特徴を示した（図 5B）。この特徴はリン酸供与体を $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ GTPの代わりに、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATPを使用した場合であっても同様であった（図 5B）。さらに、ゲル内リン酸化法によりCK2 α サブユニットのリン酸化活性が検出され、濃度の差はあるがヒト組換えCK2 と同様の挙動を示した（図 5C）。

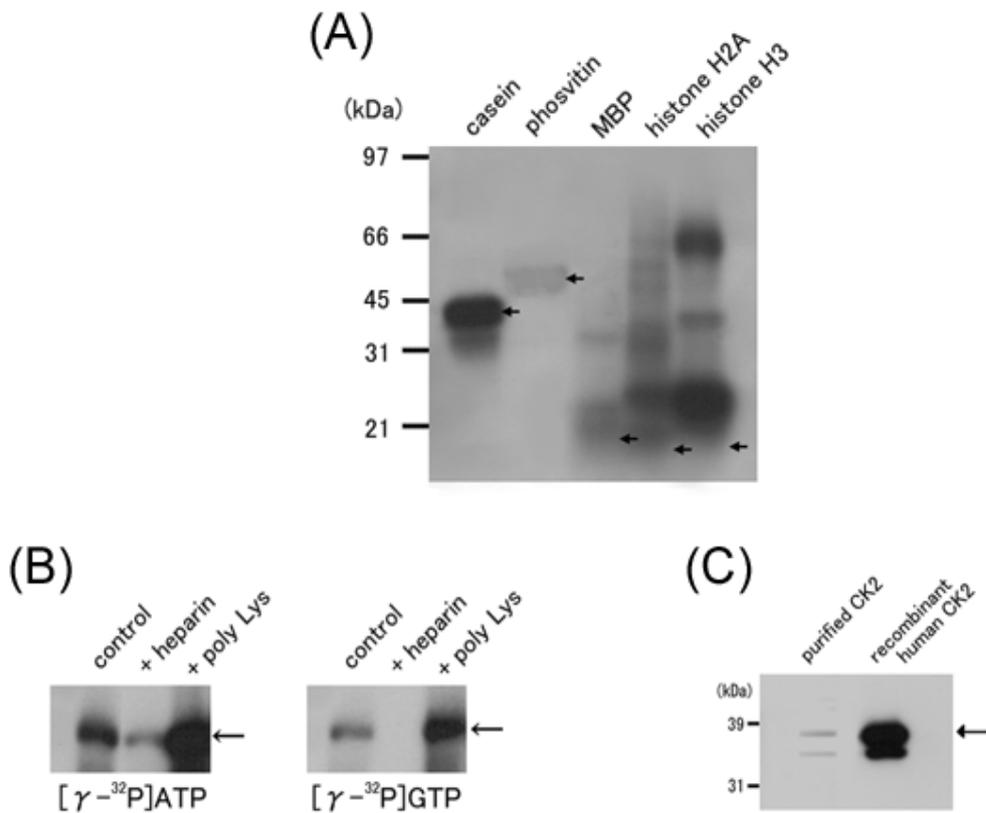


図5 部分精製したCK2の特性決定およびゲル内リン酸化法によるCK2 α サブユニットの活性解析

(A) : 各種基質のリン酸化

矢印は各種基質のリン酸化シグナルを示す。

(B) : ATP と GTP をリン酸供与体にしたときのリン酸化活性の比較

矢印はcasein (約 33 kDa) のリン酸化シグナルを示す。

(C) : ゲル内リン酸化法による CK2 α サブユニットの解析

矢印は CK2 α サブユニットの自己リン酸化シグナルを示す。

2-4-3 休眠卵と非休眠卵におけるCK2のリン酸化活性測定

caseinを基質に用いた休眠卵および非休眠卵における各発達段階でのCK2のリン酸化活性を図6に示した。非休眠卵でのリン酸化シグナルは、各ステージ全体に確認され、そのシグナルは産卵後60時間にかけて徐々に強くなった(図6A)。一方、休眠卵では、最も強いリン酸化シグナルのピークが12-24時間に見られ、その後、シグナルは産卵後60時間にかけて徐々に弱くなった(図6B)。休眠卵と非休眠卵におけるCK2のリン酸化活性は、heparinで減少し(図6C, D)、poly-Lysで増加し(図6E, F)、典型的CK2の特徴を示した(Kanekatsu et al., 1995)。

休眠卵と非休眠卵とでは、CK2のリン酸化活性に明らかな差が見られた。サシガメの一種(*Rhodnius prolixus*)では、卵黄タンパク質の一つであるビテリンが全発生期間中でCK2の主な内因性基質として特定されている(Fialho et al. 1999)。本実験の図6A, Bに示されているcasein以外のリン酸化タンパク質(約180 kDa)は、SDS-PAGEによる移動度から、ビテリン重鎖と考えられた(Takahashi, 1985)。これらのリン酸化されたタンパク質は、各ステージ卵からの抽出した粗CK2溶液中に含まれていたと考えられた。

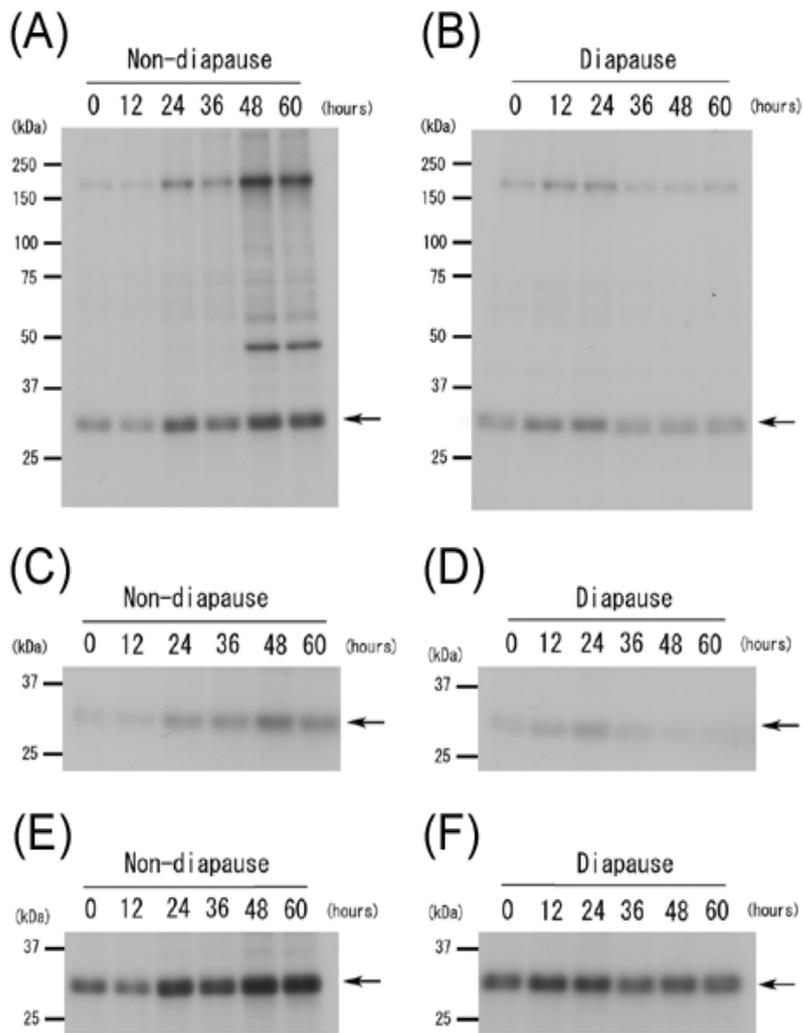


図6 休眠卵および非休眠卵における CK2 のリン酸化活性と阻害剤の heparin, 活性化剤の poly-Lys が CK2 のリン酸化活性に与える影響

- (A) : 非休眠卵の産卵後 0-60 時間の活性変動
 - (B) : 休眠卵の産卵後 0-60 時間の活性変動
 - (C) : (A) と同じサンプルに阻害剤の heparin を加えた時の活性変動
 - (D) : (B) と同じサンプルに阻害剤の heparin を加えた時の活性変動
 - (E) : (A) と同じサンプルに活性化剤の poly-Lys を加えた時の活性変動
 - (F) : (B) と同じサンプルに活性化剤の poly-Lys を加えた時の活性変動
- 矢印は casein (約 33 kDa) のリン酸化シグナルを示す。

2-4-4 カイコガCK2 α およびCK2 β サブユニットcDNAのクローニング

得られたカイコガCK2 α サブユニット (*BmCK2 α*)とCK2 β サブユニット (*BmCK2 β*) をコードする両cDNAには、完全なORF領域が含まれており、それぞれの配列長は*BmCK2 α* : 1785 bp (図 7A) と*BmCK2 β* : 1102 bp (図 7B) であった。また、*BmCK2 α* の予想分子量は 351 アミノ酸からなる 41721 Da (pI 6.8) であり (図 7A), *BmCK2 β* の予想分子量は、220 アミノ酸から成る 25294 Da (pI 5.2) であった (図 7B)。*BmCK2 α* と*BmCK2 β* の塩基配列を基に KAIKObase (<http://sgp.dna.affrc.go.jp/KAIKObase/>) を用いて検索したところ、*BmCK2 α* は第 5 染色体に、*BmCK2 β* は第 15 染色体に座乗していることが明らかになった。また、*BmCK2 α* と*BmCK2 β* の両cDNAから推定されるアミノ酸配列には、典型的なモチーフ配列が含まれていた。*BmCK2 α* では、プロテインキナーゼのATP結合領域 (アミノ酸位置 43-66 ; 図 7A ; 下線赤), およびセリン・スレオニンプロテインキナーゼ活性部位 (アミノ酸位置 150-162 図 7A ; 下線黒) が認められた。また、*BmCK2 β* では、CK2 調節サブユニット領域 (アミノ酸位置 109-140 図 7B ; 下線赤) が認められた。

予測される*BmCK2 α* と*BmCK2 β* の両サブユニットのアミノ酸配列を各種生物種のCK2 と比較したところ (図 8A, B), カイコガのCK2 は昆虫綱チョウ目に属するヨトウガ (*Spodoptera frugiperda*) のCK2 と最も相同性が高く、*BmCK2 α* とは約 90%(図 8A), *BmCK2 β* とは約 85%であった (図 8B)。しかし、昆虫綱双翅目に属するキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) CK2 との相同性は 58%であった (図 8A, B)。CK2 α と β の両サブユニットについて、カイコガおよび図 8 に示した各種生物種との比較を近隣結合法により作成した分子系統樹により行った (図 9A, B)。

2-4-5 休眠卵と非休眠卵における *BmCK2 α* および *BmCK2 β* の発現解析

RT-PCRの結果から、*BmCK2 α* (図 10A) と*BmCK2 β* (図 10B) の両mRNAは、休眠卵と非休眠卵のどちらにも発現していた。両mRNAの発現は、非休眠卵に比べて休眠卵の方が高い傾向が見られた。*BmCK2 α* の発現は、産卵後 0-12 時間まで高く、その後は減少していた。非休眠卵での両mRNAの発現は、休眠卵よりも低く、発生の進行とともに減少していた。内部標準として、*Ribosomal protein L5* 遺伝子の解析も行った (図 10C)。

(A)

```
GTGAGGGATAGGTGGGCGTCATCTTGAAGTTTTGCTGGGTTTGAGCCGGTTTCGTTGAAAAAAGTGAATTATTTAATTTAGTTTTAA 90
CTTTAATTATTAGTATCAAAAAAGTCTATGGATTCTGAAACTGTTATAGTGTAGAGTAGGAATAATCACAGTAATGTTTTAGTAACG 180
CTACTCAAGACGTACGCGATTTCCGGAAAGACTATCGCAGATAAAAACCTTTGGTTTACAAAGGCACAGTACGATGGCAGTACCTAGTAGA 270
1 M A V P S R
GCGAGGGTCTACCGCTGATGTGAACCTCACACGTCCTCAAGGGAATATTGGGATTACGAAAGTTATGTGGTTGATTGGGGGAACCGAGAAGAC 360
7 A R V Y A D V N S Q R P R E Y W D Y E S Y V V D W G N Q E D 36
TATCAGTTGGTTCGCAAGCTGGGTCCGGGAAATACAGTGAAGTATTTGAAGCAATAAATATTACGAATAATGAAAAATGTGTAGTTAAA 450
37 Y Q L V R K L G R G K Y S E V F E A I N I T N N E K C V V K
ATATTAAGCCTGTAAAAAGAAGAAAATTAAGAGAGAAAATAAAAAATTTAGAAAACCTTAAGAGGAGGCACCTAATAATATCTTTACAA 540
67 I L K P V K K K K I K R E I K I L E N L R G G T N I I S L Q
GCTGTAGTCAAAGACCCGTGCTCGCGTACACCTGCACCTTATATTTGAACATGTGAACAATACTGACTTTAAACAGCTATATTGACATTG 630
97 A V V K D P V S R T P A L I F E H V N N T D F K Q L Y S T L
TCAGATTATGATATAAGATACTACTTATATGAGCTTTTAAAGGCATTAGATTATGCCATAGTATGGGGAATGCATAGGGATGTGAAA 720
127 S D Y D I R Y Y L Y E L L K A L D Y C H S M G I M H R D V K
CCTCATAATGTGATGATTGACCATGAACATAGAATGTTACGCCCTTATTGACTGGGGTTAGCTGAGTTCTACCATCCGGGCAAGATTAT 810
157 P H N V M I D H E H R M L R L I D W G L A E F Y H P G Q D Y
AATGTTTCGTTGCTTCTAGATACTTTAAGGGCCCTGAACCTTTGGTAGATTATCAAATGTATGATTATTCATTGGATATGGTCACTA 900
187 N V R V A S R Y F K G P E L L V D Y Q M Y D Y S L D M W S L
GGATGTATGTTGCCATCCATGATTTTCCGTAAGAGCCATTCTCCATGGCCACGATAATTACGACCAGCTGTACGTATTGCGAAAAGTA 990
217 G C M L A S M I F R K E P F F H G H D N Y D Q L V R I A K V
CTGGGTACAGAAGAATTGTTGAGTACTTGGATAAATATCATATAGAAGTGGATCCTCGGTTTAAATGACATACTGGCAGACACTCACGT 1080
247 L G T E E L F E Y L D K Y H I E L D P R F N D I L G R H S R
AAGAGATGGGAGCGATTTATACATTTCAGAAAATCAACATCTTGTATCACCAGAGGCACCTGGACTTCTTGACCGTTTACTGCGTTATGAT 1170
277 K R W E R F I H S E N Q H L V S P E A L D F L D R L L R Y D
CATTATGAACGCTACACTGCTCGTGAAGCTATGGACCAACCATATTTTATCCAATCGTAAAGGAGCAGGGTCAATGGCAACTTCCAAC 1260
307 H Y E R Y T A R E A M D H P Y F Y P I V K E Q G R M A T S N
TCACCTACTOCTAATGCACTGCAAGGACCGATAAATTCTGCAGAGTAATCACAAGAGTCATTAACACTCTTATTAATACTATGATTTTAT 1350
337 S P T P N A L Q G P V N S A E *
ATATACTTGTACAAGATTCAGAAGAGACATTGTAAAAAACAATCAACAAGAGACCGCTGCTTTTGTAAATACACAGAGAAAAGAGAG 1440
ATATGCCTACTCTGTACAACCTGACTATACAGATTGATGTGATTCCAATTAATAAGTTTTTGGAAAGACAATAAATAGTGTTTAAATA 1530
ATTAGTAAAAACTGGTTTTATTTGTTGTTAAAGTGTTTTATCTCTOCTATAAACTGCTGCTGAAACAGTTCTGTGGAAGTGTTCATGTATT 1620
TGAGTTGTCGAGTATCTTGTGGTGGGTTCAATATGTCCAAATTAAAAAACACGATTTTGTACGTGAAATTCGATATTAATTTT 1710
ATTGAAACAAAATAATATAATATTAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCGCGCGCTGAATTC 1785
```

図 7A *BmCK2α*のcDNA配列および推定アミノ酸配列

右側の数字は塩基数を左側の数字はアミノ酸残基数を示す。* は終止コドンを示す。
下線赤はプロテインキナーゼのATP結合領域(アミノ酸位置 43-66)を、下線黒はセリン・スレオニンプロテインキナーゼ活性部位(アミノ酸位置 150-162)を示す。

(B)

```
CCTCCCGTCAAGCGTGGCTAATCAAGGCACGAAAAGAAAATGAGTAGTTCGGAGGAGGTATCCTGGATCGCTTGGTTTTGCAACGCTTCGA 90
1           M S S S E E V S W I A W F C T L R
GGCAATGAGTTTTTCTGTGAGGTTGACGAAGACTACATAAATGATAAATTAATCTAACCGGCTTAAATGAGCAAGTCCACATTATAGA 180
18  G N E F F C E V D E D Y I N D K F N L T G L N E Q V P H Y R
GAGGCGCTGGACATGATTCTGGATCTGGAGCCAGATGATGACATTGAAGACAATCCAATGAATCTGATCTGGTGAACAAGCATCGGAG 270
48  E A L D M I L D L E P D D D I E D N P N E S D L V E Q A S E
ATACTATATGGATTGATACATGCCCGGTACATATTGACCAATAGGGGCATTAGTCAAATGTTGGATAAGTTCAGTCTGGGATTTTGA 360
78  I L Y G L I H A R Y I L T N R G I S Q M L D K F Q S G D F G
TATTGCCACGTTGATACTGTGAATGCCAACCTATGCTGCCAATTGGTTTGTGGACGTCCCGGCCGAAGCGATGGTGAAGCTGTACTGC 450
108 Y C P R V Y C E C Q P M L P I G L S D V P A E A M V K L Y C
CCGCGCTGCATGGACGTGTACACGCCAAATCCTCGCGCCACCACCACACCGACGGCGCTTACTTCGGCACCGGCTTCCCGCACATGGTG 540
138 P R C M D V Y T P K S S R H H H T D G A Y F G T G F P H M V
TTCATGGTGCACCCGATAAACGACAAAACGACCTGCCTCTCAATTCGTACCAAGACTATAACGGTTCAAGATTCACCCGCTCGCCTAC 630
168 F M V H P D K R P K R P A S Q F V P R L Y G F K I H P L A Y
CAAATCCAGCAGGGCGCTGCGAACTCCAAGCCGCGCAGCGCAGCCTGTGTTACAACAACGGTAAACGTTAGGCCTCAGCCGCGCCGACT 720
198 Q I Q Q A A A N S K P P Q R S L S Y N N G K R *
CAACACACATCGCGGAACATTTTGGATCCGATCGTAAATGTTGCAGTCGGAATCACGTACATTTAATTGTCCTTAGGAATAGGAACTATA 810
ATGTTAAGATATTGATAAGAATTTCTAAAAATATACGAGCATGGTAACGCAACGTTATATAAATGGGATTAATTTTTTCAATAAAATT 900
TATTGTTATTTAACTTTACTTCATAAATATGTATTAATAACATGAAGTTGAATAGAGATGTTTCTAGTAATTTGTGTTAGTTTCAATCAT 990
ATTCGAGATTATGTGATTAGACCGTTGCTTAACTAAAGAAACAATAGAACAATATTACTGCACAATAAAAAATTATATCTATCTTCTTT 1080
TATAAATAGGCTTGGTAATTA 1102
```

図 7B *BmCK2β* の cDNA 配列および推定アミノ酸配列

右側の数字は塩基数を左側の数字はアミノ酸残基数を示す。* は終止コドン、二重下線は poly (A) 付加シグナル配列を示す。下線赤は CK2 調節サブユニット領域 (アミノ酸位置 109-140) を示す。

(A)

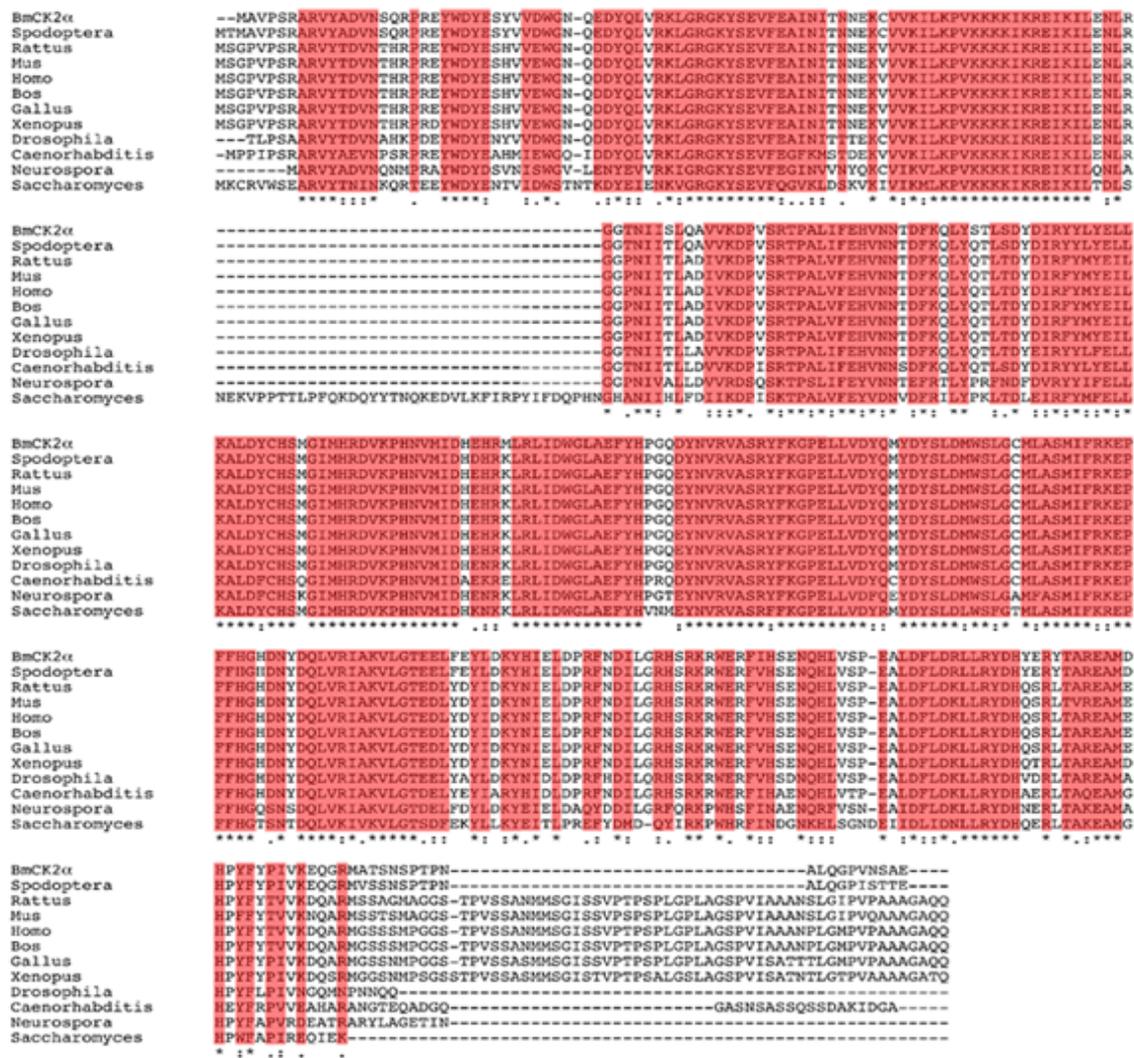


図 8A 各生物種の CK2αサブユニットのアミノ酸配列の比較

カイコガと以下の生物種（アクセション番号）のCK2αサブユニットのアミノ酸配列を比較した。*Spodoptera frugiperda* (AF071210), *Rattus norvegicus* (L15618), *Mus musculus* (U17112), *Homo sapiens* (J02853), *Bos Taurus* (M93665), *Gallus gallus* (M59456), *Xenopus laevis* (X62375), *Drosophila melanogaster* (M16534), *Caenorhabditis elegans* (J05274), *Neurospora crassa* (AF494376), *Saccharomyces cerevisiae* (M22473)。各生物種間で相同性の高い配列部分を赤背景で示した。

* は各生物種で完全に一致したアミノ酸残基を，：は類似性の高いアミノ酸残基を，. は類似性のやや低いアミノ酸残基を示す。

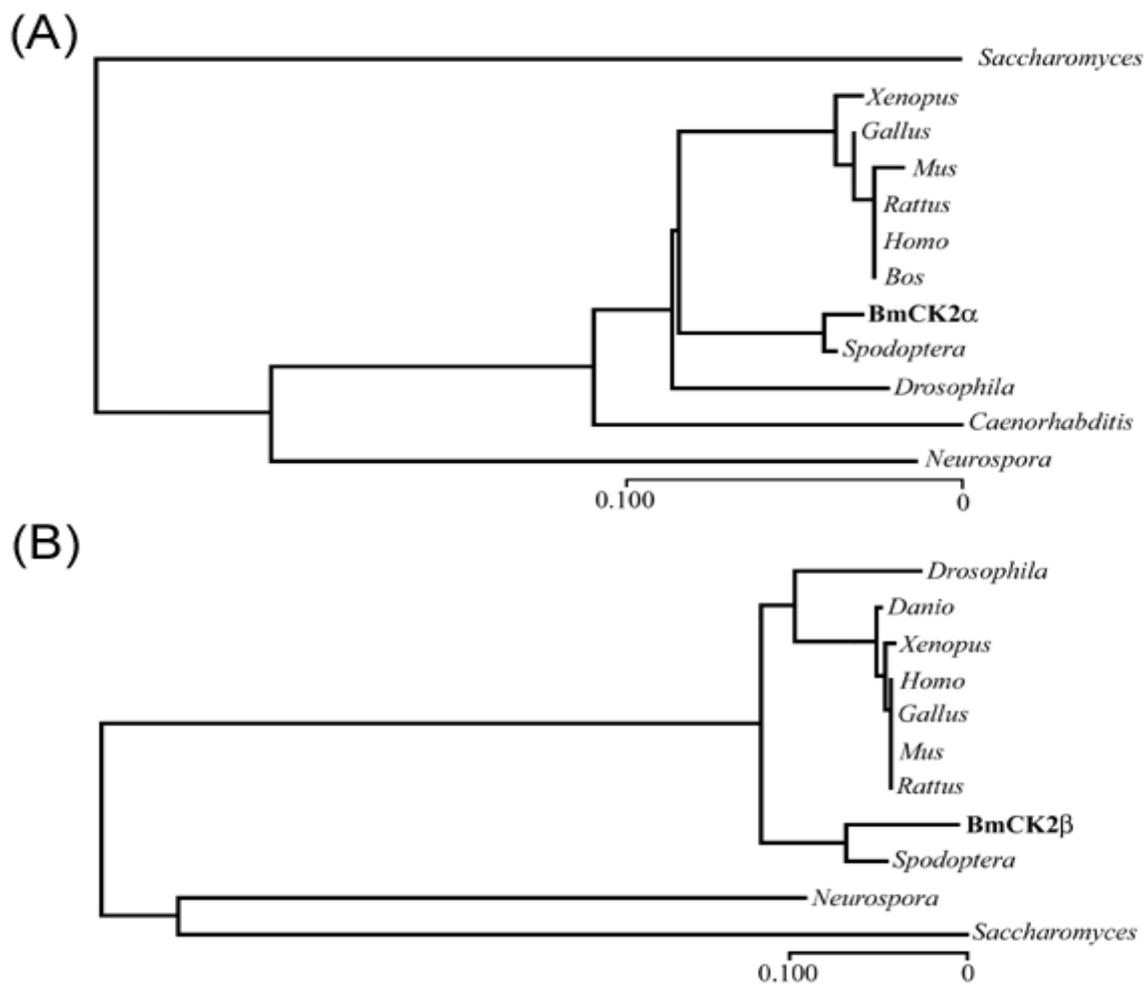


図9 近隣結合法によるBmCK2αとBmCK2βの分子系統樹

(A) : 予測されるカイコガおよび各生物種のCK2αアミノ酸配列の近隣結合法による比較

(B) : 予測されるカイコガおよび各生物種のCK2βアミノ酸配列の近隣結合法による比較

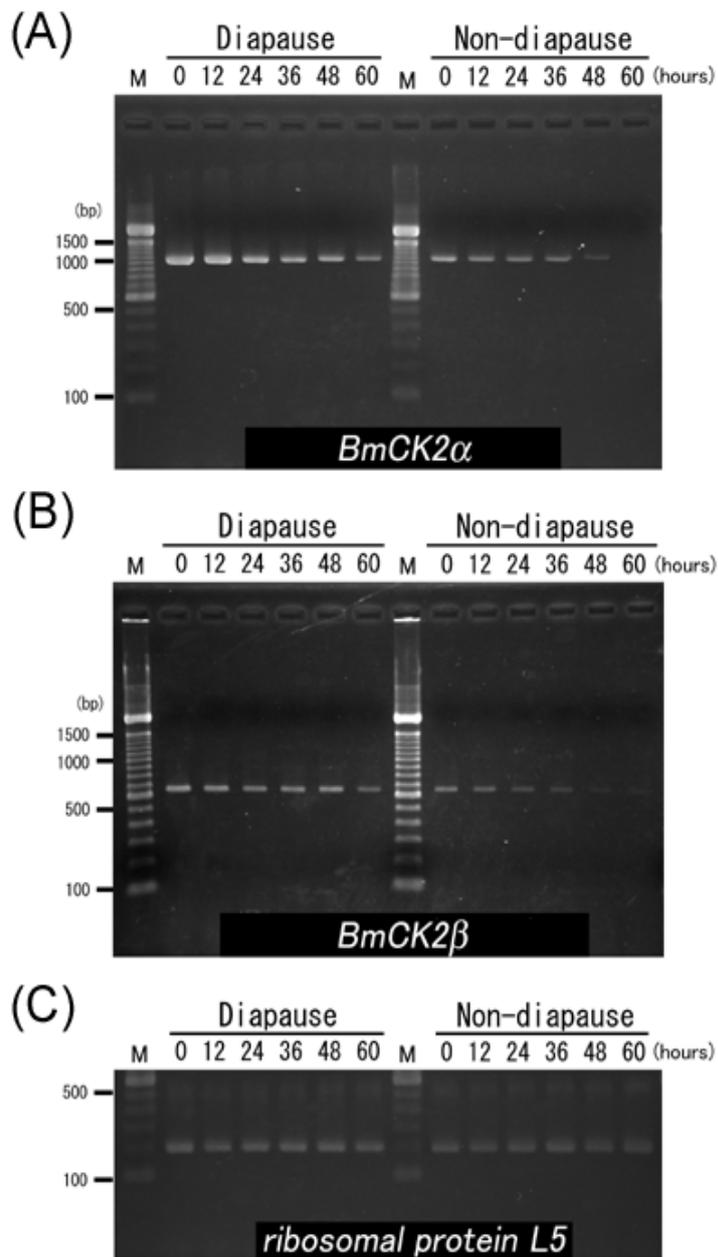


図 10 RT-PCR による休眠卵および非休眠卵の産卵後 0-60 時間における *BmCK2* 遺伝子の発現解析

(A) : *BmCK2α*サブユニット遺伝子の発現変動, 1053 bp に増幅が確認された。

(B) : *BmCK2β*サブユニット遺伝子の発現変動, 660 bp に増幅が確認された。

(C) : 内部標準として用いた *Ribosomal protein L5* 遺伝子の発現変動, 205 bp に増幅が確認された。

2-5 考察

カイコガの初期胚発生時におけるCK2 特性を明らかにするため、カイコガ卵から3種類の異なる性質のカラムクロマトグラフィーによるCK2 の部分精製を試みた。リガンドに heparinを用いたHeparin-agarose カラムにCK2 は良く吸着した(図 2A; 灰色領域)。これは、heparinがCK2 α サブユニットに結合する性質 (Allende and Allende, 1995) を利用したものである。ゲルろ過カラムであるSuperdex-200 の溶出結果から、推察される分子量が約 130 kDaであった(図 3A; 灰色領域)。CK2 は、一般的に生体内で α 2 β 2 の四量体構造をとっており。このことを考慮するとカイコガの場合、 α サブユニットの分子量が約 41000 で、 β サブユニットの分子量が約25000であるので、計算上は 130 kDaに非常に近い値であった。このことから、カイコガのCK2 も α 2 β 2 の四量体で機能している可能性が強く示唆された。さらに、Mono-Qカラムでのグラジエント溶出画分(図 4A; 灰色領域)を用いて、各種基質に対するCK2 のリン酸化特性を解析した。その結果、caseinを特にリン酸化し、MBPや histone H2A, histone H3 をほとんどリン酸化しなかった。また、histone H2A, histone H3 以外に見られるリン酸化シグナルは、精製度の低さに由来する他のタンパク質と考えられた(図 5A)。リン酸供与体にGTPを用いた場合でも、ATPと同様にリン酸化シグナルが検出でき、これらのシグナルはpoly-Lysで活性化し、heparinで阻害された(図 5B)。さらに、ゲル内リン酸化法では、市販の組換えヒトCK2 α と同様の自己リン酸化シグナルが検出できた(図 5C)。これらの結果は、他生物種のCK2 の特徴と一致するものであった (Pinna, 1990)。今回、用いたカイコガCK2 の部分精製標品は、SDS-PAGEによる単一バンドが確認できなかったが、特徴付けの解析においては問題のないレベルまで精製できたと考えられる。

カイコガの初期発生において、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。特に非休眠卵でのCK2 のリン酸化活性が、産卵後 60 時間にかけて徐々に強くなったのに対し(図 6A)、休眠卵では最も強いCK2 のリン酸化活性が 12-24 時間に見られ、そのCK2 のリン酸化活性は産卵後 60 時間にかけて徐々に弱くなっていた(図 6B)。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。産卵後の時間経過に伴う非休眠卵でのCK2 のリン酸化活性の増加は、発生の進行と関連していることが考えられる。非休眠卵では、発生が停止することなく、10 日ほどで幼虫が孵化する (Yaginuma et al., 1990; Niimi et al., 1993)。これに対して、休眠卵は産卵後 48 時間ほどで胚子の細胞分裂が停止することから、休眠卵で見られる 12-24 時間でのCK2 の活性化は、休

眠移行を促進する分子をリン酸化することにより調節していることを強く示唆している。

真核生物の初期発生において、直接的にはプロテインキナーゼであるサイクリン・CDK複合体のリン酸化によって細胞周期が調節されている (Morgan, 1997; Moreau et al., 1998; van den Heuvel, 2005; Coudreuse and Nurse, 2010; Gotoh et al., 2011)。Honmaらは組換え変異体を用いた実験から、CK2による真核生物翻訳開始因子-5 (eIF-5) のリン酸化が、細胞周期の進行に重要な役割を果たしていることを明らかにしている (Homma et al., 2005)。また、Ydeらは、細胞周期の調節に関わるCDC25Aの分解にCK2 β が関与しており、G2/Mチェックポイントの活性化に必須であると述べている (Yde et al., 2008)。カイコガの休眠時の胚発生がG2期で停止していることから (Nakagaki et al., 1991)、このG2期での制御にはCK2も関与している可能性が非常に高いと考えられる。

BmCK2 α と*BmCK2 β* 遺伝子の発現は、休眠卵と非休眠卵とで差が見られた。両mRNAの発現は、休眠卵と非休眠卵の各ステージで見られたが、非休眠卵に比べて休眠卵の方が高い傾向が見られた (図 10A, B)。非休眠卵での両mRNAの発現は、休眠卵よりも低く発生の進行とともに減少していた (図 10A, B)。休眠卵での*BmCK2 α* の発現は、産卵後直後 0 時間から 12 時間まで高く、その後は減少していた (図 10A, B)。休眠卵で、産卵後 0-12 時間の休眠開始前に見られる*BmCK2 α* の高い発現と非休眠卵で見られる両mRNA発現が発生進行とともに減少していたことから、CK2 が休眠移行と関連している可能性がある。この*BmCK2 α* と*BmCK2 β* 両遺伝子の発現 (図 10A, B) とCK2 のリン酸化活性の変動 (図 6A, B) は、休眠卵と非休眠卵で異なっていた。非休眠卵では、遺伝子発現とリン酸化活性の変動が一致していなかったが、休眠卵においてはほぼ一致していた。非休眠卵において、*BmCK2 α* と*BmCK2 β* 両遺伝子の発現が産卵後の時間経過とともに減少していたが (図 10A, B)、CK2 のリン酸化活性は逆に増加していた (図 6A, B)。このことは、非休眠卵でみられる胚発生時のCK2 のリン酸化活性は、主に転写後のレベルで調節されていることを示唆している。一方、休眠卵の休眠開始前で見られる遺伝子発現とリン酸化活性の変動の一致は、CK2による細胞周期の制御と休眠移行に何らかの関連があることを示唆するものである。一般的に、CK2は普遍的にリン酸化活性があることが知られている (Pinna, 1990)。しかし、本実験で休眠卵と非休眠卵におけるCK2のリン酸化活性に明確な差が解析された。これらの結果は、休眠・非休眠時の分子メカニズムの解明において、CK2は非常に重要な役割を担っている可能性があることを示唆している。

第3章 組換えCK2を用いた*in vitro*活性調節機構の解析

3-1 序論

第2章で、CK2のリン酸化活性とCK2遺伝子発現の変動が、休眠・非休眠で異なることから、カイコガ初期発生の分子メカニズム解明において、CK2によるリン酸化調節が非常に重要である可能性が示された。さらに、*BmCK2 α* と*BmCK2 β* 両遺伝子の発現とCK2のリン酸化活性の変動が一致しておらず、胚発生時に見られるCK2活性は主に転写後のレベルで制御されていることが示唆された (Yamamoto et al., 2005)。本章ではCK2 β によるCK2のリン酸化活性調節機構を明らかにするため、まず、大腸菌培養系で作製した組換え*BmCK2* (r*BmCK2 α* とr*BmCK2 β*)を用いて機能解析を行った。

休眠ホルモンはメス蛾の発育中の卵巣で休眠卵への3-ヒドロキシキヌレニン (3-OHK) とグリコーゲンの取り込みを高め (Sonobe and Ohnishi, 1970; Yamashita and Hasegawa, 1985), またグリコーゲンからソルビトールを合成・蓄積させることが知られている (Yaginuma et al., 1990)。これらの報告を踏まえ、r*BmCK2*のリン酸化活性に対するソルビトールと3-OHKの効果を検討した。さらに、CK2 β サブユニットの構造の違いが、CK2リン酸化活性に影響を与えることが知られているが (Jauch et al., 2002; Jauch et al., 2006), カイコガのCK2 β のアイソフォームは現在、報告されていない。そのため、既に報告のあるキイロシヨウジョウバエの2種類の組換えCK2 β サブユニットのアイソフォーム (r*DmCK2 β -VIIa*, r*DmCK2 β -VIIc*) を作製して機能解析を行い、CK2 β サブユニットの構造の違いが*BmCK2*のリン酸化活性に与える影響についても考察した。

3-2 実験材料と試薬

3-2-1 実験材料

Total RNAの抽出には、キイロシヨウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) 野生型系統 (Canton-S) の2齢幼虫と二化性カイコガ品種の大造の産卵後24時間の休眠卵を使用した。カイコガの休眠卵は、高温長日条件 (25°C, 16時間明: 8時間暗) で胚発生を行ったメス蛾から得た。サンプリング後のキイロシヨウジョウバエ幼虫とカイコガ卵は直ちに液体窒素で瞬間凍結し、使用まで-80°Cで保存した。

3-2-2 試薬

[γ -³²P] GTPおよび[γ -³²P] ATPは、Amersham-Pharmacia Biotech社製（USA）を使用した。その他の試薬は、Sigma-Aldrich社製を（USA）を使用した。

3-3 方法

3-3-1 RT-PCR

カイコガのCK2 α と β サブユニットおよびキイロショウジョウバエの2種類のCK2 β サブユニットの各配列の増幅に使用した特異的プライマーは、以下のアクセッション番号 AB206394 (BmCK2 α) , AB206395 (BmCK2 β) , M16535 (DmCK2 β -VIIa) 及びNM_206692 (DmCK2 β -VIIc) に基づき設計した。また、タンパク質発現用のためのコーディング領域は、*Bam*H I, *Nde* I, *Xho* Iの変異誘発プライマーを用いたPCRにより増幅した。使用したPCRプライマーの配列は表 1 の通りである。また、RNA抽出, 1st cDNA合成, RT-PCRの反応溶液組成および反応条件は、第 2 章 2-3 と同様な方法で行った。PCRにより増幅されたcDNAは、1.5%アガロースゲル上で電気泳動後、エチジウムブロマイド染色を行い、分子量の確認をした。

表 1 BmCK2 α , BmCK2 β , DmCK2 β -VIIa, DmCK2 β -VIIcのプライマー配列

<i>BmCK2α sense</i>	5'-GGCACAGTCATATGGCAGTACCTAG-3'
<i>BmCK2β sense</i>	5'-AAGCATATGAGTAGTTCGGAGGAGG-3'
<i>DmCK2β-VIIa sense</i>	5'-ATCCATATGAGCAGCTCCGAGG-3'
<i>DmCK2β-VIIc sense</i>	
<i>BmCK2α antisense</i>	5'-AATGCTCGAGTGATTACTCTGC-3'
<i>BmCK2β antisense</i>	5'-TGTCTCGAGTCGGCGGGCTGAGGCCTAACG-3'
<i>DmCK2β-VIIa antisense</i>	5'-TACGGATCCTTATTAGTTTTTCGCTCG-3'
<i>DmCK2β-VIIc antisense</i>	5'-TACGGATCCGCTTAGAGGCGCTTGGGC-3'

3-3-2 サブクローニングとプラスミドDNA精製

増幅したcDNAを制限酵素の*Bam*HI, *Nde*I, *Xho*I で消化後, pET-14bベクター (Novagen社) またはpCold I ベクター (TAKARA社) に組み込んだ。その後, 組換えベクターを大腸菌 BL21 (DE3) pLysSへ導入し, 形質転換した。プラスミド精製は, 第2章 2-3-4 と同様な方法で行った。

3-3-3 DNAの塩基配列の解析

得られたプラスミドDNAを鋳型に用いて, Big-dye ターミネーターキット (ABI) によるサイクルシーケンシング反応を行った。反応産物を精製後, 50 μ lのホルムアミドに溶解し, ABI-3130 シーケンサーで塩基配列の解析を行った。得られた配列データの解析は, Bio-editソフトを用いて行った。

3-3-4 タンパク質発現とリフォールディング

組換えタンパク質の発現は, 大腸菌によるコールドショック発現系で行った。15°Cで24時間の培養を行った大腸菌に, 最終濃度 1 mMのIPTGを加えることによって組換えタンパク質の発現を誘導した。封入体になっていた組換えタンパク質は, 6 M 塩酸グアニジンによる変成状態のまま, His-tagトラップカラム (Amersham Biosciences社) によって精製した。精製後の組換えタンパク質のリフォールディングは, 段階透析法により行った (Umetsu et al., 2003)。

3-3-5 リン酸化活性測定法

caseinを基質に用いたオートラジオグラフィーにより, リン酸化シグナルの検出を行った。オートラジオグラムのシグナル強度は, Image-J ソフト (NIH Image) を用いたデンストメトリック解析により算出した。

3-4 結果

3-4-1 組換えBmCK2 α とBmCK2 β の作製とリン酸化活性の解析

大腸菌発現系で作製した組換えBmCK2 α は, 細胞質中に可溶化状態で得られたが, rBmCK2 β は封入体となっていた。SDS-PAGEでの分析での結果から, rBmCK2 α とrBmCK2 β

はそれぞれ単一バンドを示し、His-tagトラップカラムにより高度に精製されたことが確認できた(図1)。縮合ヒスチジンおよびトロンビン切断配列(約2 kDa)を除いたrBmCK2 α とrBmCK2 β の分子量は、それぞれ約43および約27 kDaであった(図1)。

rBmCK2 α とrBmCK2 β のリン酸化活性を解析するために、リン酸受容体にcaseinをリン酸供与体に[γ -³²P] GTPを用いてリン酸化反応を行ったところ、rBmCK2 α は単独でリン酸化活性が認められた(図2, レーン1)。Heparinは α サブユニットに結合してCK2のリン酸化活性を阻害すること(Allende and Allende, 1995), poly-Lysは β サブユニットの酸性ループに結合して、CK2のリン酸化活性を増強することが知られている(Meggio et al., 1992; Leroy et al., 1999)。In vitroでのheparinおよびpoly-Lysの存在下におけるBmCK2のリン酸化活性を解析した結果、rBmCK2 α 単独でのリン酸化活性は、poly-Lys(図2, レーン2)と、heparin(図2, レーン3)により阻害された。また、rBmCK2 β のみを酵素として用いたときに、heparinとpoly-Lysの存在に関わらず、リン酸化シグナルは観察されなかった(図2, レーン4-6)。rBmCK2 α とrBmCK2 β を約1:1のモル比で再構成した場合のリン酸化活性は、単独のrBmCK2 α と同程度であったが(図2, レーン7), rBmCK2 α + β にpoly-Lys加えたところ非常に強い活性化が見られた(図2, レーン8)。また、heparinの添加によりrBmCK2 α 単独でのリン酸化活性と同様に阻害された(図2, レーン9)。

3-4-2 ソルビトールと3-OHKがrBmCK2のリン酸化活性に与える影響

休眠卵に特異的に見られるソルビトールは、休眠卵に多量に蓄積されているグリコーゲンから合成される。そのため、休眠卵でのソルビトールは、産卵後2日以降に急激に増加し、蓄積されていく(Chino, 1958)。一方、親蛾の卵巣に蓄積された3-OHKは、産卵後、オモクロームに変化することで徐々に減少する(Yamashita and Hasegawa, 1985)。これら、休眠卵に特異的に存在するソルビトールまたは3-OHKが、rBmCK2リン酸化活性に対してどのような影響を与えるかの解析を行った。その結果、ソルビトール0-0.5 Mの存在下でのリン酸化シグナルに変化は見られなかった(図3A)。対照的に、休眠卵中での生理的濃度である300 μ Mの3-OHKでは、rBmCK2リン酸化活性の抑制効果が見られた(図3B)。rBmCK2 α 単独のリン酸化シグナルは、1000 μ M以上の3-OHKの存在下で弱まったが(図3C), 10-300 μ Mの3-OHKで観察されたリン酸化シグナルは2倍以上の強さを示した(図3C)。これらのデータは、3-OHKがrBmCK2リン酸化活性に対して増強と抑制の両方に顕著な効果を有することを示している。

3-4-3 rBmCK2 α とC末端構造が異なるrDmCK2 β を用いた機能解析

キイロシヨウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) では、少なくとも5つのCK2 β アイソフォームが同定されている (Jauch et al., 2002; Jauch et al., 2006)。タンパク質発現を行ったDmCK2 β -VIIaとDmCK2 β -VIIc (Jauch et al., 2006) は、それぞれC末端領域の長さが異なる。図4は、DmCK2 β -VIIc, DmCK2 β -VIIa, BmCK2 β の配列アラインメント結果を示した。BmCK2のリン酸化活性におけるCK2 β の構造変化の影響を調べるために、rBmCK2 α とrBmCK2 β およびrDmCK2 β を使用して解析を試みた。精製したDmCK2 β -VIIaとDmCK2 β -VIIcの2つのアイソフォームは、SDS-PAGE分析で単一のバンドが確認された(図5)。また、縮合ヒスチジンおよびトロンビン切断配列(約2 kDa)のサイズに基づいた、rDmCK2 β -VIIaとrDmCK2 β -VIIcの分子量は、それぞれ約26 kDaおよび29 kDaであった。rBmCK2 α と、rBmCK2 β の代わりにrDmCK2 β -VIIaまたはrDmCK2 β -VIIcを約1:1のモル比で再構成したときに、CK2活性は減少した(図6, レーン3,4)。特に、rDmCK2 β -VIIcでの活性の減少は20%以下であった(図6, レーン4)。一方、poly-Lysをリン酸化反応溶液に加えたときのCK2リン酸化活性は、2倍以上になった(図6, レーン6-8)。図6, レーン7,8には、poly-Lys存在下におけるrBmCK2 α の活性が、rDmCK2 β サブユニットの影響で異なる結果を示した。これは、rBmCK2 α のリン酸化活性は β サブユニットのC末端領域の長さに依存していることを示唆している。対照的に、rBmCK2 α 単独のリン酸化活性は、poly-Lysで阻害された(図6, レーン5)。この阻害結果は、Romero-Olivaらによって報告されたアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の組換えCK2を用いた結果と同様であった (Romero-Oliva et al., 2003)。

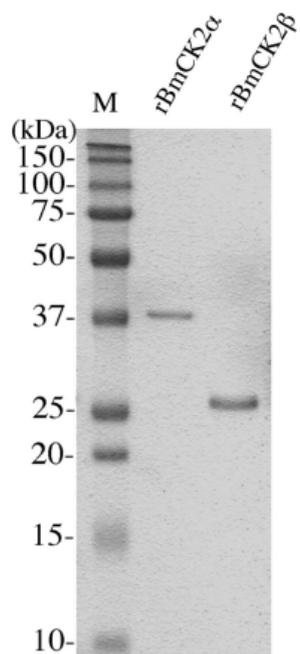


図1 His-tagトラップカラムにより精製したrBmCK2 α とrBmCK2 β の
SDS-PAGEでの分析

rBmCK2 α は 500ng, rBmCK2 β は 600ngを泳動した。

Mはプロテインマーカを示す。

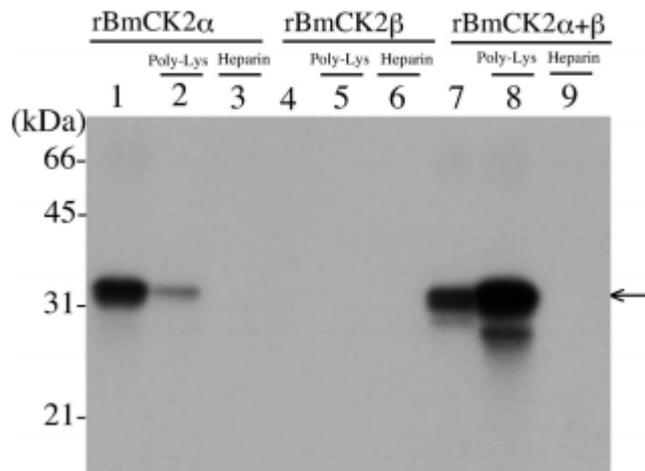


図2 組換えBmCK2 α とBmCK2 β によるリン酸化活性の解析

レーン 1 : rBmCK2 α 単独

レーン 2 : rBmCK2 α +1 mgのpoly-Lys

レーン 3 : rBmCK2 α +10 mgのheparin

レーン 4 : rBmCK2 β 単独

レーン 5 : rBmCK2 β +1 mgのpoly-Lys

レーン 6 : rBmCK2 β +10 mgのheparin

レーン 7 : rBmCK2 α + rBmCK2 β

レーン 8 : rBmCK2 α + rBmCK2 β +1 mgのpoly-Lys

レーン 9 : rBmCK2 α + rBmCK2 β +10 mgのheparin

矢印はcasein (約 33 kDa) のリン酸化シグナルを示す。

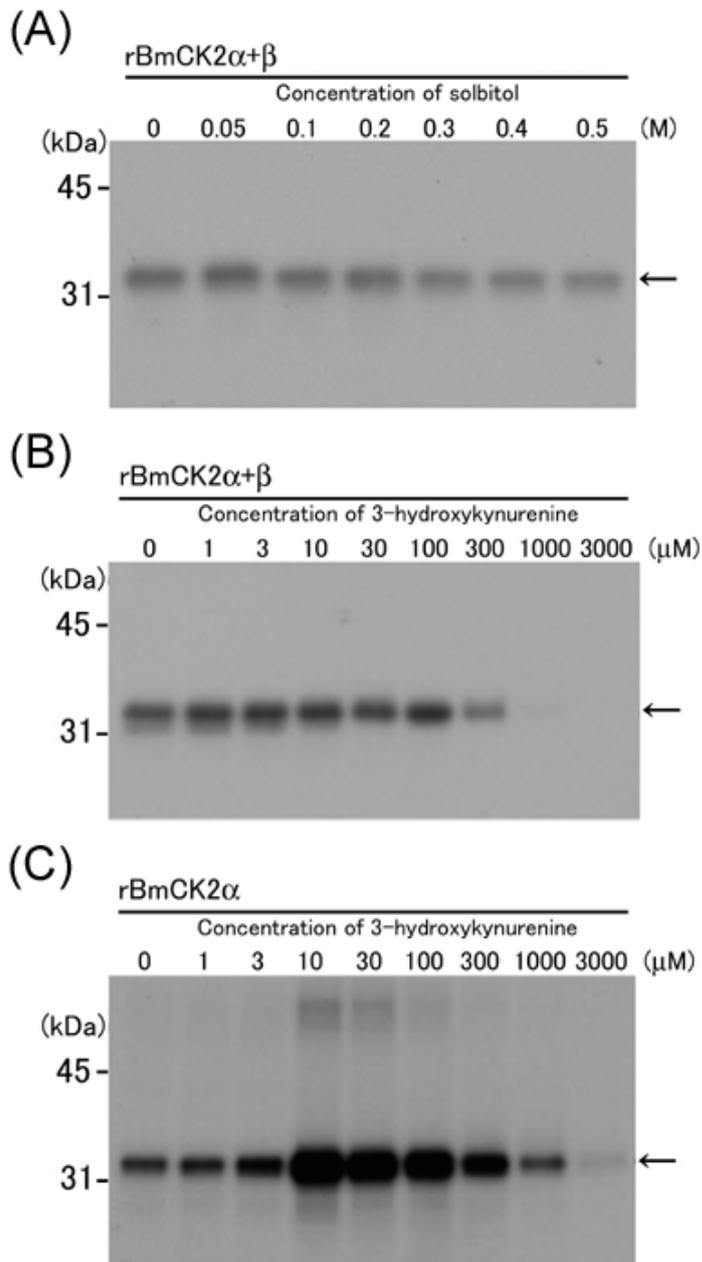


図3 ソルビトールおよび3-OHKがBmCK2リン酸化活性に与える影響

- (A) ソルビトールがBmCK2のリン酸化活性に与える影響
- (B) 3-OHKがBmCK2のリン酸化活性に与える影響
- (C) 3-OHKがrBmCK2 α 単独のリン酸化活性に与える影響

矢印はcasein (約33 kDa)のリン酸化シグナルを示す。

DmCK2β-VIIa	MSSSEEVSWVTFGCLRGNFEFFCEVDEDIQDKFNLTGLNEQVPNYRQAL	50
DmCK2β-VIIc	MSSSEEVSWVTFGCLRGNFEFFCEVDEDIQDKFNLTGLNEQVPNYRQAL	
BmCK2β	MSSSEEVSWIAWFCTLRGNFEFFCEVDEDIQDKFNLTGLNEQVPHYREAL	
	*****:.* ***:*****:*****:*.**	
DmCK2β-VIIa	DMILDLEPEDELEDNPLQSDMTEQAAEMLYGLIHARYILTNRGIAQMIEK	100
DmCK2β-VIIc	DMILDLEPEDELEDNPLQSDMTEQAAEMLYGLIHARYILTNRGIAQMIEK	
BmCK2β	DMILDLEPDDDIEDNPESDLVEQASEILYGLIHARYILTNRGISQMLDK	
	*****:.*:**** :*: ***:*****:*****:*.:**	
DmCK2β-VIIa	YQTGDFGHCPRVYCESQPMLPLGLSDIPGEAMVKTYCPKCIDVYTPKSSR	150
DmCK2β-VIIc	YQTGDFGHCPRVYCESQPMLPLGLSDIPGEAMVKTYCPKCIDVYTPKSSR	
BmCK2β	FQSGDFGYCPRVYCECQMLPIGLSDVPAEAMVKLYCPRCMDVYTPKSSR	
	:*:*:*:*:*:*:* ***:**:*:*:*:* ***:**:*:*:*:*	
DmCK2β-VIIa	HHHTDGAYFGTGFPHMLFMVHPEYRPKRPTNQFVPRLYGFKIHSLAYQIQ	200
DmCK2β-VIIc	HHHTDGAYFGTGFPHMLFMVHPEYRPKRPTNQFVPRLYGFKIHSLAYQIQ	
BmCK2β	HHHTDGAYFGTGFPHMVFMVHPDKRKRPPASQFVPRLYGFKIHPLAYQIQ	
	*****:*****:*****:*****:*****:*****	
DmCK2β-VIIa	LQAAANFKMPLRAKN—————	215
DmCK2β-VIIc	LQAAANFKMPLRAQRGQPPKDEEPENNADTVPKRL	235
BmCK2β	-QAAANSKPPQRSLSYNNGKR—————	220
	***** * * *: : *	

図4 DmCK2β-VIIa, DmCK2β-VIIc, BmCK2βのアミノ酸配列の比較

* は完全に一致したアミノ酸残基を示す。

: は類似性の高いアミノ酸残基を示す。

. は類似性のやや低いアミノ酸残基を示す。

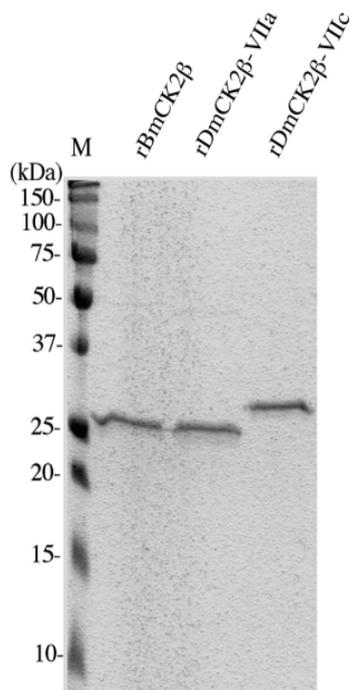


図5 精製したBmCK2 β , DmCK2 β -VIIa, DmCK2 β -VIIcのSDS-PAGEによる分析

各レーンそれぞれ 400ngを泳動した。

Mはプロテインマーカを示す。

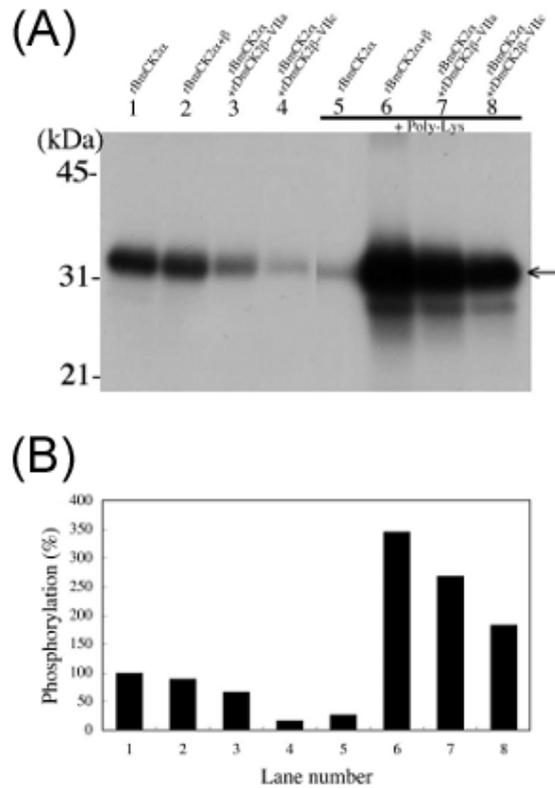


図6 rDmCK2β-VIIaおよびrDmCK2β-VIIcがrBmCK2α活性に及ぼす影響

(A) rBmCK2αのリン酸化活性解析

レーン 1 : rBmCK2α単独

レーン 2 : rBmCK2α+ rBmCK2β

レーン 3 : rBmCK2α+ rDmCK2β-VIIa

レーン 4 : rBmCK2α+ rDmCK2β-VIIc

レーン 5 : rBmCK2α+1.0 mgのpoly-Lys

レーン 6 : rBmCK2α+ rBmCK2β+1.0 mgのpoly-Lys

レーン 7 : rBmCK2α+ rDmCK2β-VIIa+1.0 mgのpoly-Lys

レーン 8 : rBmCK2α+ rDmCK2β-VIIc+1.0 mgのpoly-Lys

矢印はcasein (約 33 kDa) のリン酸化シグナルを示す。

(B) rBmCK2αリン酸化活性のデンストメトリック解析

rBmCK2α単独のリン酸化活性を 100%として、デンストメトリック解析により算出した (A) のオートラジオグラムのシグナル強度を示した。

3-5 考察

本研究では、大腸菌発現系においてrBmCK α 、rBmCK2 β 、およびC末端配列の異なる2種類のrDmCK2 β を作製し、それらの組換えタンパク質を用いて*in vitro*でのリン酸化活性を解析した。rBmCK2 α は単独でリン酸化活性を有していた(図2, レーン1)。rBmCK2 α 単独でのリン酸化活性は、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) やアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) などの動物種での報告と同様であった (Lin and Traugh, 1993; Hinrichs et al., 1993; Romeo-Oliva et al., 2003)。キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) やアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) のrCK2 α は、rCK2 β との四量体構造をとることによって活性化される。rBmCK2 α の場合、rBmCK2 β による活性化は認められなかった(図2, レーン7)。植物のシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) やいくつかの動物種 (*Homo sapiens*, *Xenopus laevis*, *Caenorhabditis elegans*, *Danio rerio*) で、CK2 β のC末端領域は、CK2 β ホモダイマーの形成に関与し、CK2 α との直接的な相互作用を担っている (Bolanos-Garcia et al., 2006)。BmCK2 β 、DmCK2 β -VIIa、DmCK2 β -VIIcでのC末端領域(図4, アミノ酸残基178-205)は、ほぼ同じ配列であるが、図6で示したようにCK2のリン酸化活性の減少度合いは異なっていた。特にDmCK2 β -VIIaとDmCK2 β -VIIcとのアミノ酸配列の違いは、C-末端領域にのみ観察されるので、これらの差はCK2のリン酸化活性に対するC末端領域の205残基以降の配列の影響によるものと考えられる。一方、BmCK2 α のC末端領域は、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) やアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) のアミノ酸配列とは異なる (Yamamoto et al., 2005)。したがって、CK2 β によるCK2 α の活性化はそれぞれの種によって異なるか、またはBmCK2 α を活性化するBmCK2 β アイソフォームの存在が示唆される。

第2章で述べたように休眠卵と非休眠卵とでCK2のリン酸化活性の変化に違いがあり、そのCK2リン酸化活性の変化が、転写後レベルで制御される可能性がある。そこで、rBmCK2のリン酸化活性に対する休眠に特有な化合物であるソルビトールや3-OHKなどの影響を解析した。その結果、休眠卵における生理的濃度のソルビトールでは (Iwata et al., 2005)、rBmCK2リン酸化活性に影響を与えなかった。カイコガ卵巣中の3-OHKの生理的濃度は、1 mM程度と推定され (Yamashita and Hasegawa, 1985)、タンパク質に結合する能力があることから (Korlimbinis and Truscott, 2006)、3-OHKは主に単独のrBmCK2 α と結合することが示唆された(図3B, C)。もし、3-OHKが主に基質であるcaseinと結合した場合、結果で示した図3BとCは同じになると考えられる。3-OHKは、カイコガの休眠卵に見られ

る特異的な化合物であり、卵内に大量に蓄積している (Sonobe and Ohnishi, 1970; Yamashita and Hasegawa, 1985)。3-OHKはキイロショウジョウバエの卵にも存在しているが、休眠することはない (Linzen, 1974; Nijhout, 1994)。したがって、3-OHKが休眠卵の初期胚発生時に、どのような役割を果たしているかについて検討することが重要である。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可能性が示された。休眠卵での3-OHKの局在は、漿膜を形成する前に3-OHKが卵黄細胞中の卵黄顆粒の表面上に主に蓄積していることが知られている (Sonobe and Ohnishi, 1970)。一方、一般的にCK2は普遍的に細胞質に分布しているとされている (Pinna, 1990)。本実験での結果は、CK2の一般的な分布規則 (Pinna, 1990) とは異なるものの、3-OHKとBmCK2 α が休眠卵の初期発生時において、同所的に局在している可能性を示唆している。

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

4-1 序論

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は、CK2 のリン酸化活性阻害実験の一環で発見された。休眠卵の産卵後 12-24 時間におけるCK2 活性が、非休眠卵に比べて高かったことから、この時期のCK2 の活性化が休眠移行に重要な役割を果たしていることが示唆された。したがって、この時期のCK2 活性を抑制することで休眠への移行を阻害できる可能性が考えられた。そこで、CK2 の強力な阻害剤である 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole (TBB) を DMSO に溶解し、休眠卵への塗布を試みた。その結果、孵化する幼虫が確認され、CK2 の活性化が休眠移行に直接的に関与しているかと思われた。しかし、溶媒として用いた DMSO 単独での処理区において、さらに高い孵化率が得られ、DMSO そのものに休眠移行阻害効果があることが判明した。

DMSOは、 $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ の分子式で表される非プロトン性の極性溶媒である (図 1)。水とは任意の割合で混和し、多くの有機・無機化合物をよく溶かす性質を持つ (表 1)。また、DMSOは細胞膜に対して高い浸透性を持ち、毒性が低いことから (Rall and Fahy, 1985; Pegg, 2007; Notman et al., 2007; Aye et al., 2010)、古くから培養細胞の凍結保護剤、細胞融合剤、細胞膜浸透性のエンハンサーとして用いられてきた (Ankong et al., 1975; Notman et al., 2007)。

ヒト前骨髄球性白血病由来のHL-60 細胞をDMSOで処理することで*c-myc*遺伝子の急激な発現低下を引き起こし、好中球への不可逆的な分化を誘導することが明らかにされている (Collins et al., 1978; Collins and Groudine, 1982)。また、Kamiらは、DMSO処理が時期特異的に胚芽腫細胞株由来のP19CL6 細胞の心筋への誘導経路を増強することを報告している (Kami et al., 2008)。さらに、WangらがDMSO処理によるセンチュウ (*Caenorhabditis elegans*) の寿命延長効果を報告しており (Wang et al., 2010)、Frankowskiらは、この寿命延長効果はDMSOがインスリンシグナル伝達系に作用して引き起こされている可能性があるとして述べている (Frankowski et al., 2013)。この様に、細胞分化や生物に対するDMSOの特異的な生物学的機能が報告されている。

本研究でカイコガ休眠卵のDMSO 処理により、休眠への移行が阻害され幼虫が孵化するという新知見が得られたことから、DMSO 処理の詳細な条件検討を行った。また、

DMSO に溶解した TBB の卵内への透過効果についての検討も行った。さらに DMSO が、カイコガ卵の最外層を形成している卵殻に対して物理的影響を与えている可能性が考えられたため、走査型電子顕微鏡によるカイコガ卵の表面構造の詳細な観察を行った。

4-2 実験材料と試薬

4-2-1 実験材料

本実験には実用品種の二化性系統カイコガである錦秋鐘和を使用した。幼虫の飼育はカイコガ用人工飼料の Silkmate（日本農産工業，日本）で行った。休眠卵は，高温長日条件（25℃，16 時間明：8 時間暗）で胚発生をさせたメス蛾から，非休眠卵は 15℃の暗室内で胚発生をさせたメス蛾から得た。休眠卵および非休眠卵のサンプリングは，交尾後 1 時間以内の卵を 0 時間として，その後，12 時間おきに 60 時間まで行った。

4-2-2 試薬

ジメチルスルホキシド (DMSO)，ジメチルホルムアミド (DMF)，硫化ジメチル (DMS)，塩酸 (HCl)，およびβ-カロチン (β-carotene) は，和光純薬工業社製（大阪，日本）を使用した。4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole (TBB) は Sigma-Aldrich 社製品を使用した。

4-3 方法

4-3-1 カイコガ休眠卵の塩酸 (HCl) 処理

産卵後 20 時間の休眠卵を 25℃で 60 分間，HCl（比重 1.10）で処理した。HCl 処理時に産卵台紙からの卵の脱落を防ぐための前処理として 2%ホルマリン溶液に産卵台紙ごと浸し，水洗後乾燥させた。HCl 処理後の卵は十分に水洗乾燥後，孵化するまで 25℃に保った。

4-3-2 孵化率の算出

本実験では，100-150 個の卵の各処理後，2 週間以内に孵化した幼虫数から求めた値を 1 回の実験の孵化率とした。S.D.は，独立した 5 回の実験より算出し，グラフのエラーバーとして示した。

4-3-3 走査型電子顕微鏡によるカイコガ卵の表面構造の観察

走査型電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscope ; SEM) は、試料に照射した電子線を試料表面に走査させた際に発生する二次電子を検出することで表面構造の拡大像が得られる装置である。観察前の処理として、イオンスパッタリング装置により各カイコガ卵 (休眠卵・非休眠卵・DMSO 処理をした休眠卵・HCl 処理をした休眠卵) の卵殻表面に金を蒸着させた。その後、走査型電子顕微鏡 (FE-SEM S-4800) により、加速電圧 5kV、観察倍率 80 倍および 400 倍で、カイコガ卵の表面構造の観察を行った。

4-4 結果

4-4-1 休眠卵に対する DMSO の効果

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、DMSO の様々な濃度、適切な浸透時間、発達段階が処理に与える影響、および DMSO 類似物質の効果を検討した。カイコガ卵を 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、条件検討および解析を行った。

図 2 に示すように、産卵後 12 時間の休眠卵を使用した場合、孵化率は DMSO の濃度依存的に増加した。最大の孵化率は、DMSO 濃度が 100%DMSO の時であり、78.3%であった。次に、DMSO の浸透時間の検討を行った。100%DMSO 処理時に、水洗するまでの DMSO 浸透時間を 0-90 分まで変えたところ、図 3 に示すように最も高い孵化率が得られた浸透時間は 45 分であった。DMSO 処理後に水洗されていない場合、孵化率は 18.2%と大幅に減少した (図 3, ∞)。さらに、休眠卵の発生段階と DMSO の効果との関係を検討した。図 4 に示すように、DMSO の休眠移行阻害効果は産卵後 24 時間以内の休眠卵に対してのみ確認され、産卵後 36 時間以降の休眠卵に対しては、ほとんど効果を示さなかった。加えて、図 5 に示すように、DMSO 類似体および HCl についても同様に解析を行った。100%DMF 処理での孵化率は 7.3%であったが、100%DMS 処理では全く孵化しなかった。また、HCl 処理での孵化率は 89.8%であった (図 5)。

4-4-2 非休眠卵に対する DMSO の効果

非休眠卵でも、休眠卵と同様に DMSO 処理の効果を解析した。非休眠卵は休眠卵とは異なり、発生が停止することなく進行し、約 2 週間で孵化する。産卵後 12 時間の非休眠卵

を 0-100%の様々な DMSO 濃度で 45 分間処理したところ、図 6 に示すように、孵化率は DMSO 濃度依存的に減少した。休眠卵で最も高い孵化率が得られた 100%DMSO 処理では、卵は全て潰れて孵化しなかった。

4-4-3 DMSO による化学物質の卵内への透過効果

DMSO に溶解した化学物質の卵内への透過の影響を解析するため、100%DMSO に溶解した CK2 の阻害剤である TBB (図 7A) および、 β -カロチン (図 7B) で休眠卵を処理した。図 8 に示すように、産卵後 12 時間の休眠卵を使用した時、0.1 mM の TBB 処理による孵化率は 36.1%であった。一方、0.1 mM の β -カロチンを用いたときの孵化率は 69.6%であった (図 8)。 β -カロチンは、食草であるクワ (*Morus bombycis*) の葉由来の生理的成分であり、カイコガの繭にも含まれることからコントロールとして用いた。

4-4-4 走査型電子顕微鏡によるカイコガ卵の表面構造の観察

DMSO 処理により、カイコガ卵殻が物理的影響を受けているかどうかの確認を行うため、走査型電子顕微鏡での卵殻表面構造の観察を行った (図 9)。その結果、休眠卵 (図 8B, F) と DMSO 処理をした休眠卵 (図 9C, G) との間で、卵殻表面構造に明瞭な差は観察できなかった。また、非休眠卵 (図 9A, E) と HCl 処理をした休眠卵 (図 9D, H) についても、卵殻表面構造に明瞭な差や変化は観察できなかった。

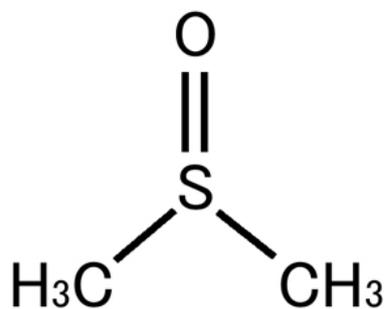


図1 ジメチルスルホキシド (DMSO) の構造式

表1 ジメチルスルホキシド (DMSO) の物理化学的性状

分子式	(CH ₃) ₂ SO
分子量	78.13
融点	17.89°C
沸点	189°C
密度	1.101 g/cm ³ (25°C)
水溶性	自由混和
毒性	LD 50 = 20000 mg/kg (ラット経口)

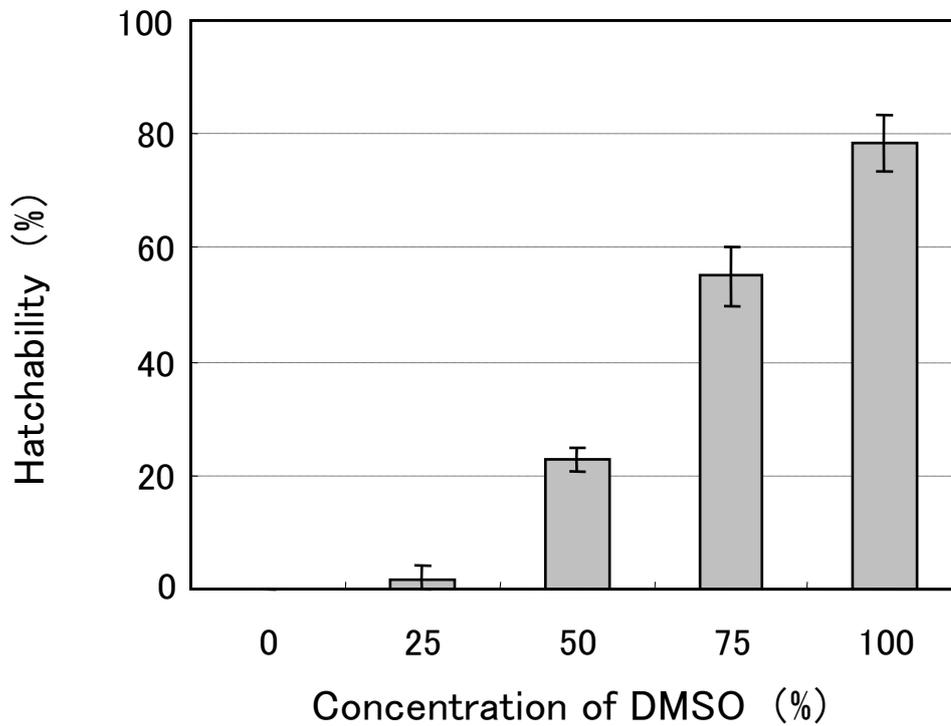


図2 DMSO濃度が休眠卵の孵化率に与える影響

産卵後12時間の休眠卵を0-100%の各濃度のDMSO溶液で、45分間の処理を行った。DMSO濃度0%は純水のみ、100%はDMSOを希釈せずに用いた。1匹のメス蛾が産卵した休眠卵を産卵台紙ごと分割し、それぞれDMSO処理を行った。孵化率およびS.D.の算出は、4-3-2に示した。

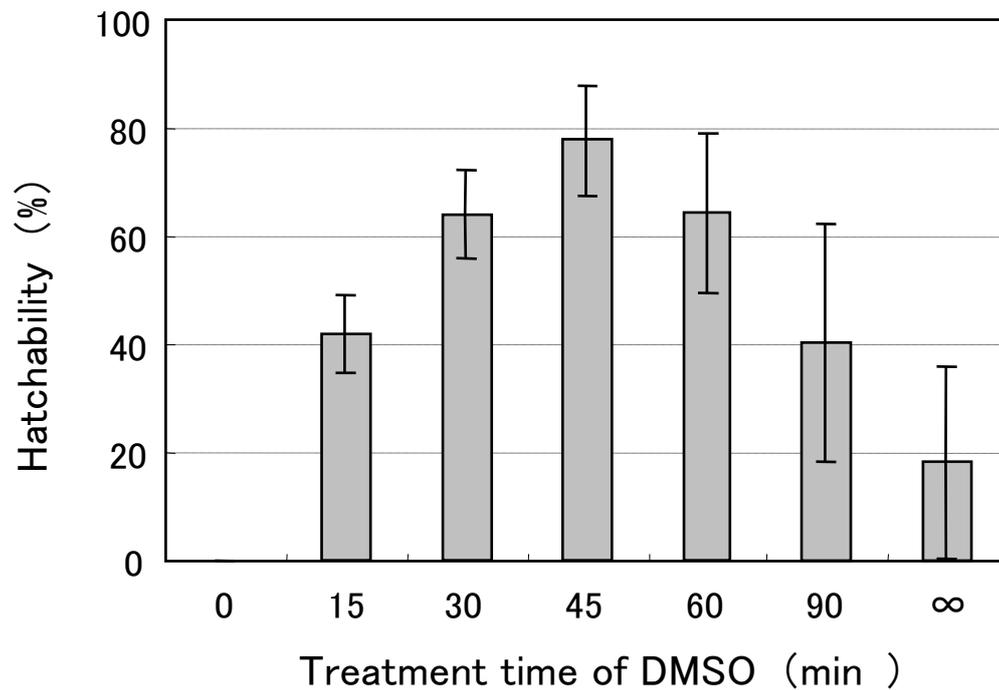


図3 DMSO 浸透時間が休眠移行阻害効果に与える影響

産卵後 12 時間の休眠卵に対して 100%DMSO 溶液を用い、水洗するまでの浸透時間を 0-90 分間の処理を行った。DMSO 処理後に水洗されていない処理区を∞と示した。1 匹のメス蛾が産卵した休眠卵を産卵台紙ごと分割し、それぞれ DMSO 処理を行った。孵化率および S.D.の算出は、4-3-2 に示した。

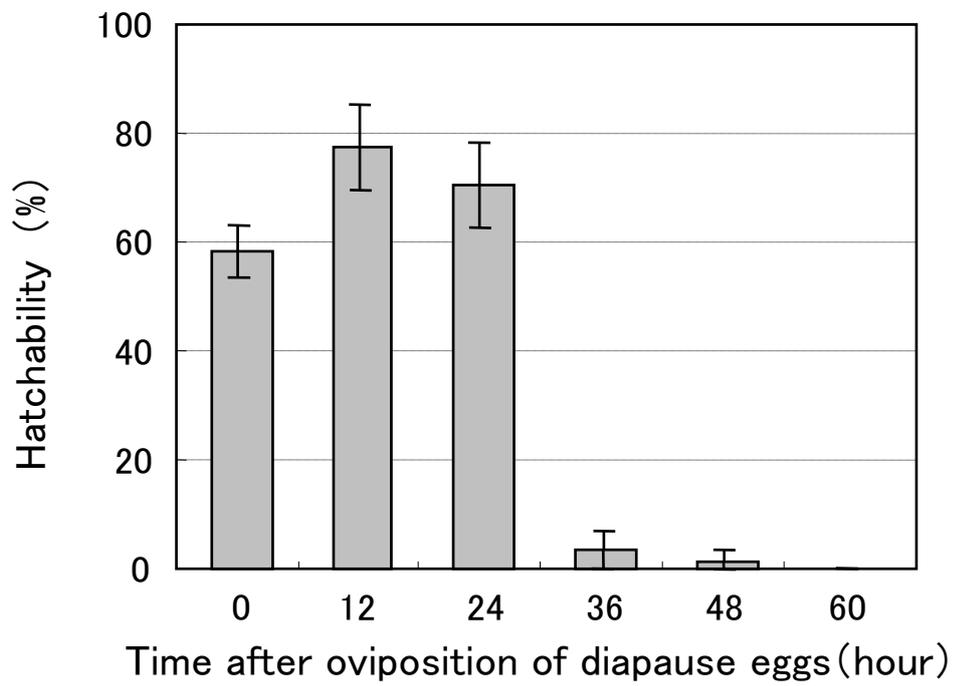


図4 産卵後の経過時間に伴う休眠移行阻害効果

産卵後 0-60 時間の休眠卵を 100%DMSO で 45 分間の処理を行った。1 匹のメス蛾が産卵した休眠卵を産卵台紙ごと分割し、それぞれ DMSO 処理を行った。孵化率および S.D. の算出は、4-3-2 に示した。

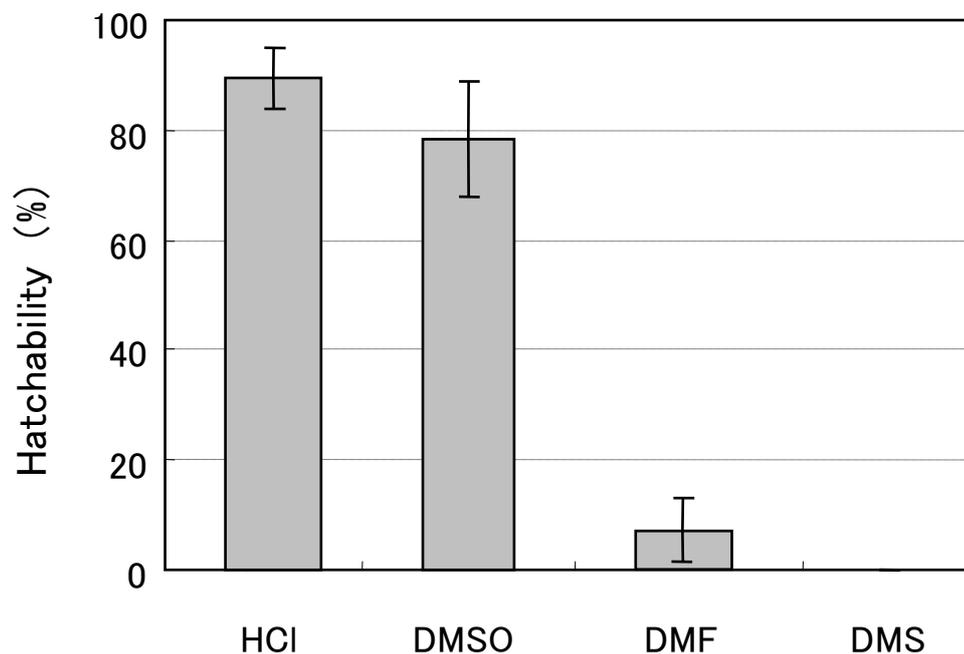


図5 HClとDMSO類似物質であるDMFおよびDMSによる休眠移行阻害効果

産卵後12時間の休眠卵をHCl、DMF、DMSの各溶液で処理を行った。HCl処理は、方法4-3-1に記載した手順で行った。DMFおよびDMS処理には100%溶液を使用した。1匹のメス蛾が産卵した休眠卵を産卵台紙ごと分割し、それぞれに処理を行った。孵化率およびS.D.の算出は、4-3-2に示した。

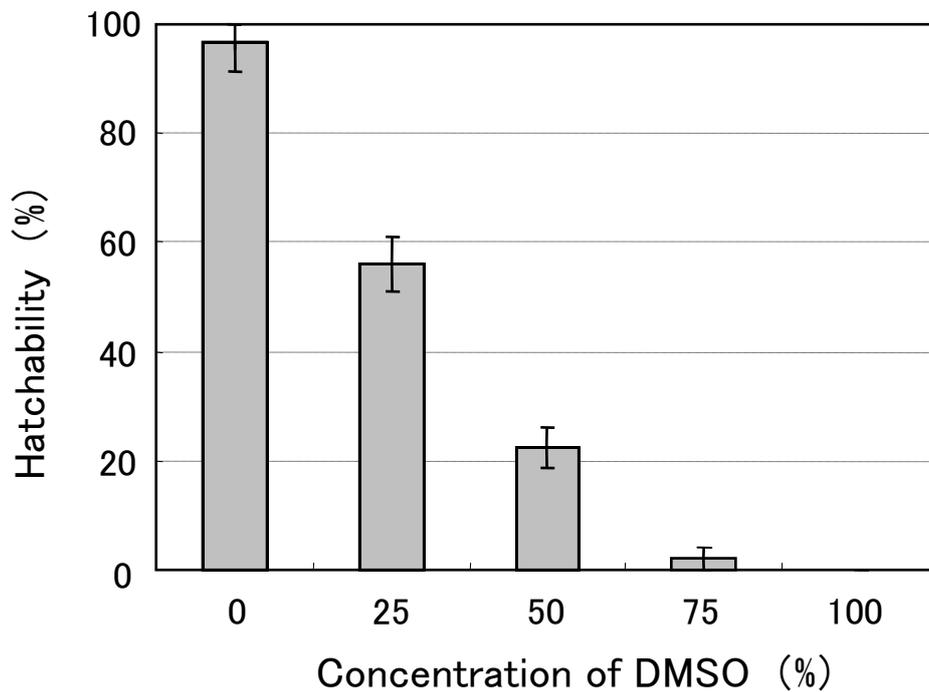


図6 DMSO濃度が非休眠卵の孵化率に与える影響

産卵後12時間の非休眠卵を0-100%の各濃度のDMSO溶液で、45分間の処理を行った。DMSO濃度0%は純水のみ、100%はDMSOを希釈せずに用いた。1匹のメス蛾が産卵した非休眠卵を産卵台紙ごと分割し、それぞれにDMSO処理を行った。孵化率およびS.D.の算出は、4-3-2に示した。

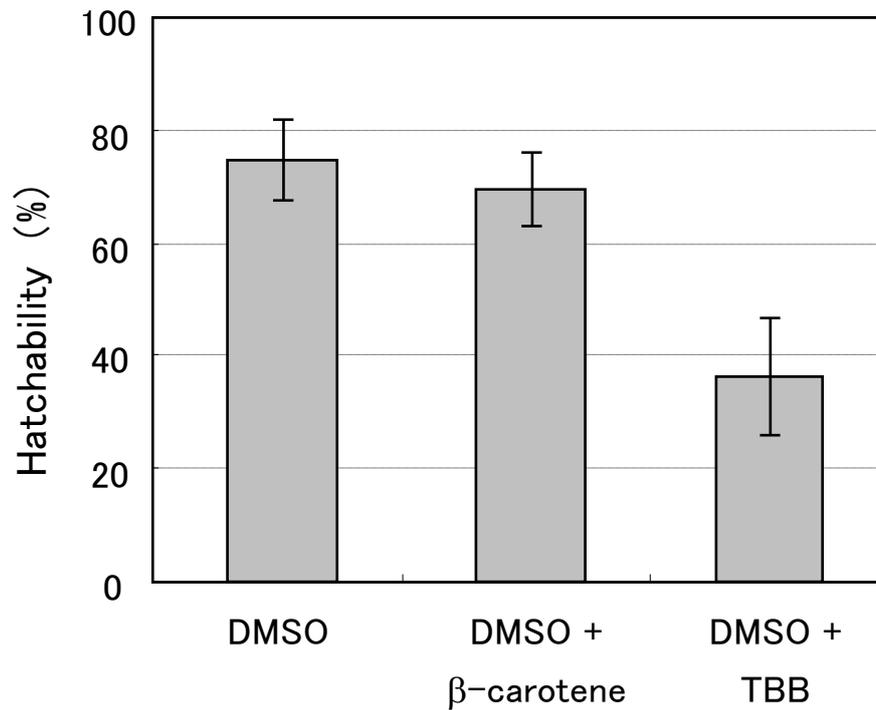


図 8 DMSO に溶解した化学物質が孵化率に与える影響

産卵後 12 時間の休眠卵を 0.1 mM β -carotene または 0.1 mM TBB を溶解させた 100% DMSO で 45 分間の処理を行った。1 匹のメス蛾が産卵した休眠卵を産卵台紙ごと分割し、それぞれに DMSO 処理を行った。孵化率および S.D. の算出は、4-3-2 に示した。

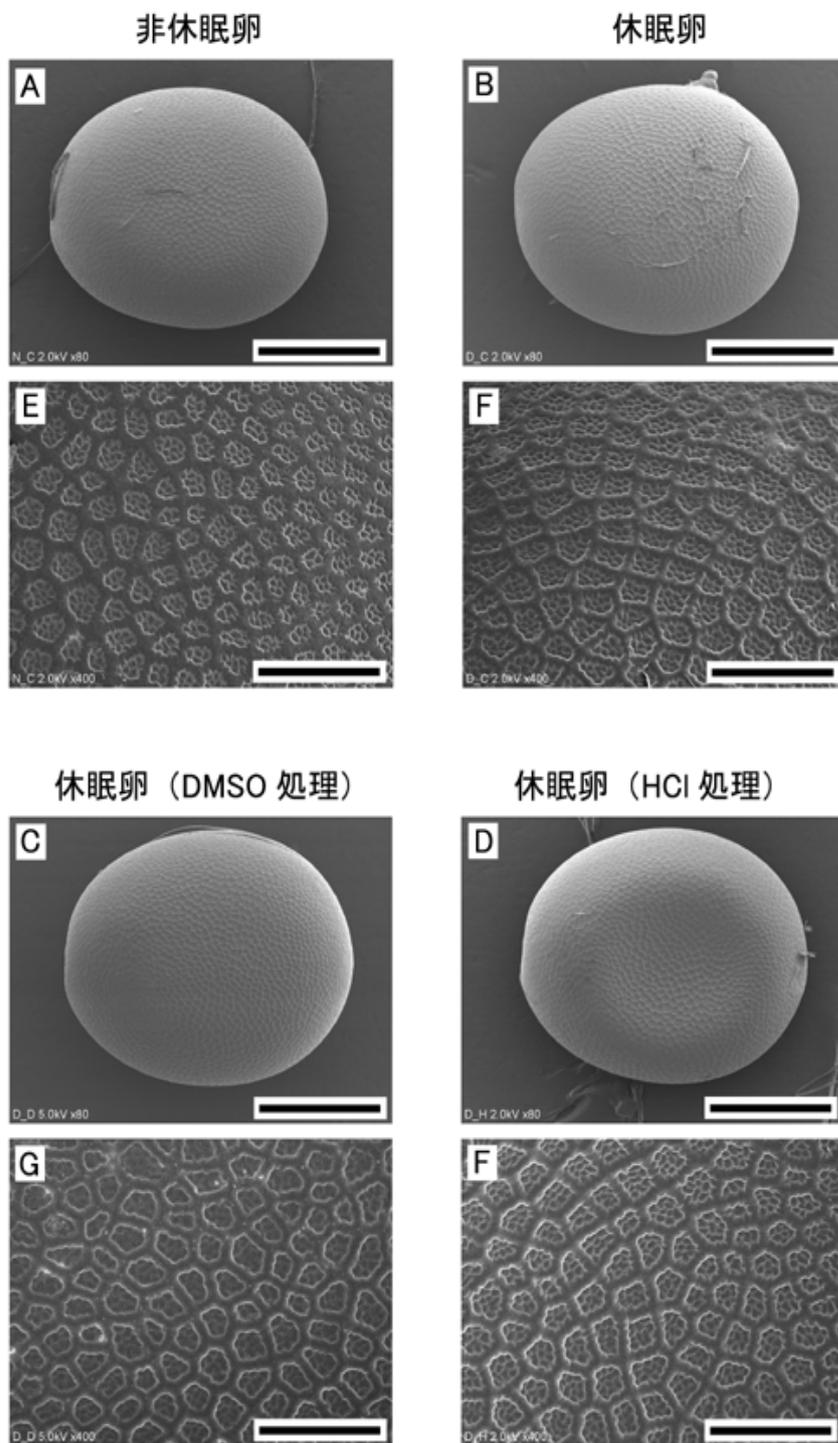


図9 カイコガ卵の表面構造の走査型電子顕微鏡観察像

A-D : 80 倍, スケールバーは 0.5 mm を示す。

E-H : 400 倍, スケールバーは 0.1 mm を示す。

4-5 考察

本研究では、DMSO がカイコガ休眠卵に対して休眠移行阻害効果を示し、孵化にまで至ることを発見した。DMSO 処理を最適条件で行うことで得られた孵化率は 78.3%であり、この孵化率は HCl 処理に匹敵した。まとめとして、この確立した DMSO 処理法の概略を図 10 に示す。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。一方、HCl 処理では産卵後 72 時間程度の休眠卵に対しても有効であり (Yoshimi et al., 1990; Tsurumaru et al., 2010) , DMSO に対する有効時期よりも長い。休眠卵では、産卵後 36 時間ほど経過すると、オモクローム色素による着色が見られる (Sawada et al., 2007) 。このキサントマチンやオミンなどのオモクローム系色素による休眠卵の着色は、漿膜細胞中で色素顆粒が形成することで起こる (Miya, 2003) 。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。対照的に、HCl 処理は漿膜細胞におけるオモクロームの蓄積による色素顆粒を形成した後の休眠卵に対しても効果を有する。これらの結果は、DMSO と HCl が異なる分子メカニズムにより、休眠への移行を阻害している可能性を示唆している。

DMSO 処理後の非洗浄卵のほとんどが胚発生を開始したが、それらの大半が孵化する前に致死したことで孵化率は減少した。また、図 6 に示すように非休眠卵を DMSO で処理したときに、濃度依存的に孵化率が減少した。同様な例がヒト肺腺癌細胞株 CL1-5 細胞でも見られ、*in vitro* で培養した CL1-5 細胞が、5%以上の濃度による DMSO 処理で、細胞死に導かれる (Wang et al., 2012) 。上記の結果および CL1-5 細胞の報告から、過剰な DMSO は細胞に対して毒性を有し、休眠終了後の胚発生および、または非休眠卵の胚発生に阻害効果を与えることを示している。また、DMSO 類似物質である DMF や DMS では、休眠移行阻害効果は、ほとんど見られなかった。DMF と DMS は、DMSO に比べ毒性が高いことが知られている。このため、DMF と DMS は休眠移行を抑制する効果よりも、細胞に損傷を与える影響が大きかったため、処理後 2 週間以内の孵化率が大幅に減少したものと考えられた。

図 8 で示した結果は、TBB を溶解した DMSO で休眠卵を処理した場合の孵化率が 36.1% と DMSO のみでの孵化率 78.3% に比べ半減した。CK2 によるリン酸化は、カイコガの胚発生に重要な役割を果たしていることは、前述した通りである (Yamamoto et al., 2005; Sawada et al., 2012; Yamamoto and Sawada, 2008) 。DMSO は細胞膜浸透性を高める特性を

持つが (Notman et al., 2007) , カイコガの胚は卵の最外層にある硬い卵殻によって囲まれているため、卵内への DMSO 浸透度合いを測定することができない。一方、HCl 処理の効果は、カイコガの品種により異なることが知られている (Takahashi, 1958) 。これは、カイコガの品種により卵殻の厚さが異なることから、HCl の浸透度合いが卵殻の厚さに依存していると考えられる (Takahashi, 1958) 。DMSO 処理でも、HCl 処理と同様に最も高い孵化率が得られる処理条件は、カイコガ品種により異なる可能性が考えられる。さらに、SEM による卵殻表面構造の観察結果 (図 9) からも、DMSO 処理による卵殻表面構造の変化は認められず、DMSO が卵殻に物理的損傷を与えたことで、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ことで、発生が妨げられていることを強く示唆している。

DMSO は細胞や生物に対して特異的な効果を示す。例えば、ヒト前骨髄球性白血病由来の HL-60 細胞は、DMSO 処理により *c-myc* 遺伝子の発現がダウンレギュレーションし、好中球に不可逆的に分化することが知られている (Collins et al., 1978; Gailani et al., 1989; Yamaguchi et al., 1999) 。また、Wang らは、DMSO 処理によるセンチュウ (*Caenorhabditis elegans*) の寿命延長効果は、DMSO がインスリンシグナル伝達系に作用して引き起こされている可能性を報告している (Wang et al., 2010; Frankowski et al., 2013) 。このような、培養細胞または生物に対する DMSO の作用機序と、休眠卵に対する休眠移行阻害効果の作用機序の差異や DMSO による休眠移行阻害や化学物質の透過に関する分子機構の解明は、今後の研究課題である。

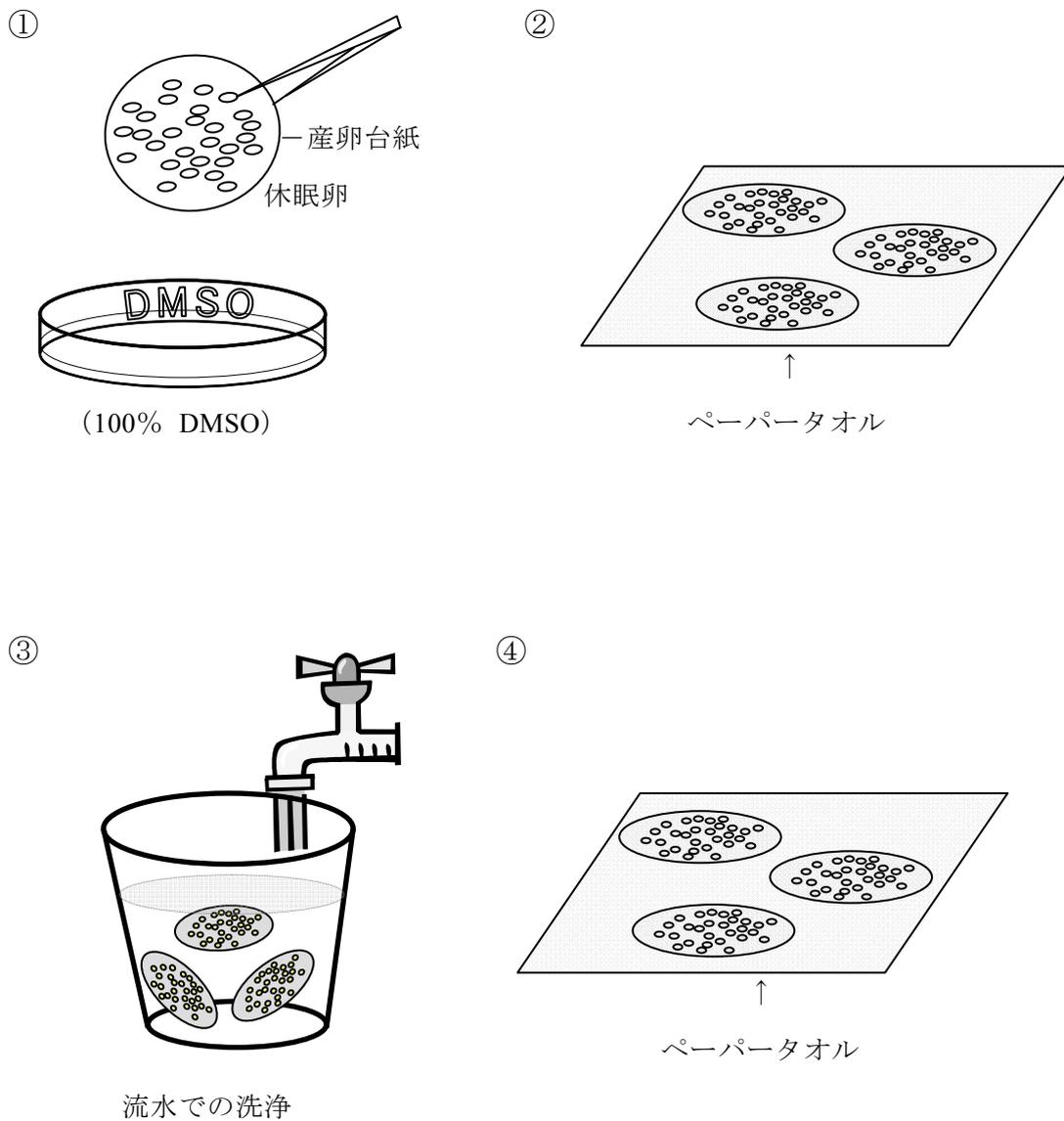


図 10 最適条件でのカイコガ休眠卵の DMSO 処理法の概略

- ① 産卵後 12-24 時間の休眠卵を産卵台紙ごと 100%DMSO 溶液に 2-3 分間浸す。
- ② ペーパータオル上で DMSO を 45 分間浸透させる。
- ③ 過剰な DMSO を水道水で 20 分間洗浄する。
- ④ ペーパータオル上で乾燥させ、孵化までの間 25℃環境下に置く。

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 の活性は転写後に修飾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た。また、非休眠卵で見られる時間経過と共に増加する CK2 活性は、発生の進行によるものと考えられた。このため、CK2 が時期特異的に異なる基質をリン酸化することで、それぞれの分子の機能調節をしている可能性が示唆された。

組換え CK2 を用いた *in vitro* での解析では、休眠卵に特異的な内因性物質である 3-OHK が、rBmCK2 α 単独に対して低濃度では活性化、高濃度では阻害と、異なる両作用を示した。一般的に CK2 は、 $\alpha 2\beta 2$ のヘテロ四量体で機能することが知られている。塩基配列から推測される CK2 の分子量は 134 kDa であり、CK2 の部分精製時の Superdex-200 カラムクロマトグラフィーの溶出パターンから推定される CK2 の分子量とほぼ等しい。これらのことから、カイコガの CK2 もヘテロ四量体構造で機能していることが示唆された。しかし、植物では単量体の α サブユニットによるリン酸化活性が見られることや (Dennis and Browning, 2009; Moreno-Romero et al., 2011), 本研究でも *in vitro* ではあるが 3-OHK により rBmCK2 α 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る。

さらに、非休眠卵の産卵後 24 時間および 60 時間における BmCK2 の局在解析の結果からは、BmCK2 α と BmCK2 β が主に卵黄細胞の核の周囲に局在していることが明らかとなっている (Sawada et al., 2006)。一方、3-OHK は卵黄細胞における卵黄顆粒の表面上に主に蓄積していることが知られ (Sonobe and Ohnishi, 1970; Yamashita and Hasegawa, 1985), 非休眠卵では休眠卵に比べて濃度は低いが存在している。このため、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。

DMSO 処理による孵化率は HCl 処理と同等に高く、実用的に利用することが可能である。古くから養蚕業で用いられてきた HCl による浸酸処理法は、産卵台紙からの卵の脱落を防ぐためにホルマリンによる前処理が必要である。また、処理時には高濃度の HCl

を加熱する必要があるなど、危険を伴う。これに対して、DMSO 処理は、前処理も必要なく産卵台紙ごと DMSO 溶液に浸すだけの簡便な方法である。なお、孵化した幼虫の成育は問題なく、継代飼育が可能である。

DMSO 処理の効果は産卵後 24 時間までの休眠卵に限られるのに対し、HCl 処理は産卵後 60 時間の休眠卵にも有効である。DMSO 処理の効果は、卵の着色が始まることで著しく低下することから、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。対照的に、HCl 処理は漿膜細胞におけるオモクロームの蓄積による色素顆粒を形成した後の休眠卵に対しても効果を有する。これらの結果は、DMSO と HCl が異なる分子メカニズムにより、休眠への移行を阻害している可能性を示唆している。

また、TBB を溶解した DMSO で休眠卵を処理した時、胚発生が進行したにも関わらず、孵化率が 40%未満に減少した。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る。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ある。しかし本研究により、CK2 によるリン酸化はカイコの胚発生に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

参考文献

- Akten B, Jauch E, Genova GK, Kim EY, Edery I, Raabe T, Jackson FR (2003)
A role for CK2 in the *Drosophila* circadian oscillator.
Nature Neuroscience, 6 (3) : 251-257.
- Allende JE, Allende CC (1995)
Protein kinase CK2: an enzyme with multiple substrates and a puzzling regulation.
The FASEB Journal, 9: 313-323
- Ankong QF, Fisher D, Tampion W, Lucy JA (1975)
Mechanisms of cell fusion.
Nature. 17;253 (5488) : 194-195.
- Aye M, Di Giorgio C, De Mo M, Botta A, Perrin J, Courbiere B (2010)
Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants used for human oocyte vitrification:
dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol.
Food and Chemical Toxicology, 48 (7) : 1905-1912.
- Boguta M, Graczyk D (2011)
RNA polymerase III under control: repression and de-repression.
Trends in Biochemical Sciences, 36 (9) : 451-456.
- Bolanos-Garcia VM, Fernandez-Recio J, Allende JE, Blundell TL (2006)
Identifying interaction motifs in CK2beta: a ubiquitous kinase regulatory subunit.
Trends in Biochemical Sciences, 31 (12) : 654-661.
- Chino, H (1957)
Conversion of glycogen to sorbitol and glycerol in the diapause egg of the *Bombyx* silkworm.
Nature, 180: 606-607
- Chino, H (1958)
Carbohydrate metabolism in the diapause egg of the silkworm *Bombyx mori*. - II Conversion
of glycogen into sorbitol and glycerol during diapause.
Journal of Insect Physiology, 2: 1-12.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987)
Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform

- extraction.
Analytical Biochemistry, 162: 156-159.
- Collins SJ, Ruscetti FW, Gallagher RE, Gallo RC (1978)
Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United, 75: 2458-2462.
- Collins SJ, Groudine M (1982)
Amplification of endogenous *myc*-related DNA sequences in a human myeloid leukaemia cell line.
Nature, 298: 679-681.
- Coudreuse D, Nurse P (2010)
Driving the cell cycle with a minimal CDK control network.
Nature. 23;468 (7327) : 1074-1079.
- Danks, HV (1987)
Insect Dormancy: An Ecological Perspective.
Biological Survey of Canada, Ottawa.
- Danks HV (2000)
Dehydration in dormant insects.
Journal of Insect Physiology, 1;46 (6) : 837-852.
- Denlinger, DL (1985)
Hormonal control of diapause. In: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. (Eds) ,
Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. 8: 305-412.
- Dennis MD, Browning KS (2009)
Differential phosphorylation of plant translation initiation factors by *Arabidopsis thaliana* CK2 holoenzymes.
The Journal of Biological Chemistry, 284, 20602-20614.
- Ding L, Li Y, Goto M (2003)
Physiological and biochemical changes in summer and winter diapause and non-diapause pupae of the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae* L. during long-term cold acclimation.
Journal of Insect Physiology, 49 (12) : 1153-1159.

- Dominguez I, Mizuno J, Wu H, Imbrie GA, Symes K, Seldin DC (2005)
A role for CK2 α / β in *Xenopus* early embryonic development.
Molecular and Cellular Biochemistry, 274: 125-131.
- Fialho E, Masuda H, Silva-Neto M (1999)
Protein phosphorylation during *Rhodnius prolixus* embryogenesis protein kinase casein kinase II activity.
Insect Biochemistry and Molecular Biology, 29: 215-223.
- Frankowski H, Alavez S, Spilman P, Mark KA, Nelson JD, Mollahan P, Rao RV, Chen SF, Lithgow GJ, Ellerby HM (2013)
Dimethyl sulfoxide and dimethyl formamide increase lifespan of *C. elegans* in liquid.
Mechanisms of Ageing and Development, 134 (3-4) : 69-78.
- Fujita K., Shimomura K., Yamamoto K., Yamashita T., Suzuki K (2006)
A Family GH48-linked feeding behavior and locomotion activity for lifespan regulatory function.
Biochemical and Biophysical Research Communications, 345: 502-507.
- Fukaya S (1950)
Chilo simplex Buttler
Hoppo Publishing Co. Ltd., Sapporo, upressalis p141
- Fukuda S (1951)
The production of diapause eggs by transplanting the suboesophageal ganglion, in the silkworm.
Proceedings of the Japan Academy, 27: 672-677.
- Futahashi R, Kurita R, Mano H, Fukatsu T (2012)
Redox alters yellow dragonflies into red.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United, 31;109 (31) : 12626-12631.
- Gailani D, Cadwell FJ, O'Donnell PS, Hromas RA, Macfarlane DE (1989)
Absence of phorbol ester-induced down-regulation of myc protein in the phorbol ester-tolerant mutant of HL-60 promyelocytes.
Cancer Research, 49 (19) : 5329-5333.
- Glover CV 3rd (1998)

- On the physiological role of casein kinase II in *Saccharomyces cerevisiae*.
 Progress in Nucleic Acid Research & Molecular Biology, 59: 95-133.
- Gotoh T, Villa LM, Capelluto DG, Finkielstein CV (2011)
 Regulatory pathways coordinating cell cycle progression in early *Xenopus* development.
 Results and Problems in Cell Differentiation, 53: 171-199.
- Hasegawa K (1951)
 Studies on the voltinism in the silkworm, *Bombyx mori* L., with special reference to the organs
 containing determination of voltinism (a preliminary note) .
 Proceedings of the Japan Academy, 27: 667-671.
- Hinrichs MV, Jedlicki A, Tellez R, Pongor S, Gatica M, Allende CC, Allende JE (1993)
 Activity of recombinant α and β subunits of casein kinase II from *Xenopus laevis*.
 Biochemistry, 32: 7310-7316.
- Homma MK, Wada I, Suzuki T, Yamaki J, Krebs EG, Homma Y (2005)
 CK2 phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 5 potentiates cell cycle
 progression.
 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United, 25;102 (43) : 15688-15693.
- Hunter T (1995)
 Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling.
 Cell, 80: 225-236.
- Ichikawa T, Aoki S, Shimizu I (1997)
 Neuroendocrine control of diapause hormone secretion in the silkworm, *Bombyx mori*.
 Journal of Insect Physiology, 43 (12) : 1101-1109.
- Iwai S, Trang LTD, Sehadova H, Takeda M (2008)
 Expression analyses of casein kinase 2 α and casein kinase 2 β in the silkworm, *Bombyx mori*.
 Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 149: 38-46.
- Iwasaki H, Takahashi M, Niimi T, Yamashita O, Yaginuma T (1997)
 Cloning of cDNAs encoding *Bombyx* homologues of Cdc2-related kinase from eggs.
 Insect Molecular Biology, 6: 131-141.
- Iwata K, Fujiwara Y, Takeda M (2005)
 Effects of temperature, sorbitol, alanine and diapause hormone on the embryonic development

- in *Bombyx mori*: *in vitro* tests of old hypotheses.
Physiological Entomology, 30: 317-323.
- Jauch E, Melzig J, Brkulj M, Raabe T (2002)
In vivo functional analysis of *Drosophila* protein kinase casein kinase 2 (CK2) β -subunit.
Gene, 298: 29-39.
- Jauch E, Wecklein H, Stark F, Jauch M, Raabe T (2006)
The *Drosophila melanogaster* DmCK2 β transcription unit encodes for functionally
non-redundant protein isoforms.
Gene, 374: 142-152.
- Jockusch EL, Nagy LM (1997)
Insect evolution: how did insect wings originate?
Current Biology, 1;7 (6) : 358-361.
- Kami D, Shiojima I, Makino H, Matsumoto K, Takahashi Y, Ishii R, Naito AT, Toyoda M, Saito H,
Watanabe M, Komuro I, Umezawa A (2008)
Gremlin enhances the determined path to cardiomyogenesis.
PLoS One 3, e2407.
- Kanekatsu M, Ezumi A, Nakamura T, Ohtsuki K (1995)
Chloroplast ribonucleoproteins (RNPs) as phosphate acceptors for casein kinase II:
Purification by ssDNA-cellulose column chromatography.
Plant and Cell Physiology, 36:1649-1656.
- Kaneko J, Katagiri C (2004)
Epicuticular wax of large and small white butterflies, *Pieris brassicae* and *P. rapae* crucivora:
qualitative and quantitative comparison between diapause and non-diapause pupae.
Naturwissenschaften, 91 (7) : 320-323.
- Karandikar UC, Trott RL, Tim J, Bishop CP, Bidwai AP (2004)
Drosophila CK2 regulates eye morphogenesis via phosphorylation of E (spl) M8.
Mechanisms of Development, 121: 273-286.
- Kikkawa H (1941)
Mechanism of Pigment Formation in *Bombyx* and *Drosophila*.
Genetics, 26 (6) : 587-607.

Kogure M (1933)

The influence of light and temperature on certain characters of the silkworm, *Bombyx mori*.
Journal of the Department of Agriculture, Kyushu University, 4: 1-93.

Kono Y (1970)

Photoperiodic Induction of Diapause in *Pieris rapae crucivora* BOISDUVAL (Lepidoptera :
Pieridae)
Applied Entomology and Zoology, 5 (4) : 213-224.

Korlimbinis A, Truscott RJ (2006)

Identification of 3-hydroxykynurenine bound to proteins in the human lens. A possible role in
age-related nuclear cataract.
Biochemistry, 45: 1950-1960.

Kukalová-Peck J (1983)

Origin of the insect wing and wing articulation from the arthropodan leg Canadian.
Journal of Zoology, 61 (7) : 1618-1669.

Laemmli UK (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature, 227: 680-685.

Leroy D, Filhol O, Quintaine N, Sarrouilhe D, Loue-Mackebach P, Chambaz EM, Cochet C
(1999)

Dissecting subdomains involved in multiple functions of the CK2 β subunit.
Molecular and Cellular Biochemistry, 191: 43-50.

Lim S, Kaldis P (2013)

Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation.
Development, 140 (15) : 3079-3093.

Lin J-M, Kilman VL, Keegan K, Paddock B, Emery-Le M, Rosbash M, Allada R (2002)

A role for casein kinase 2 α in the *Drosophila* circadian clock.
Nature, 420: 816-820.

Lin W-J, Traugh JA (1993)

Renaturatuion of casein kinase II from Recombinant subunits produced in *Escherichia coli*:
purification and characterization of the reconstituted holoenzyme.

- Protein Expression and Purification, 4: 256-264.
- Linzen B (1974)
The tryptophan → ommochrome pathway in insects.
Advances Insect Physiology, 10: 117–246
- Lozeman FJ, Litchfield DW, Piening C, Takio K, Walsh KA, Krebs EG (1990)
Isolation and characterization of human cDNA clones encoding the alpha and the alpha' subunits of casein kinase II.
Biochemistry. 11;29 (36) : 8436-8447.
- Lüscher B, Brizuela L, Beach D, Eisenman RN (1989)
Myc oncoproteins are phosphorylated by casein kinase II
The EMBO Journal, 8: 1111-1119.
- Masri S, Cervantes M, Sassone-Corsi (2013)
The circadian clock and cell cycle: interconnected biological circuits.
Current Opinion in Cell Biology, S0955-0674 (13) : 00129-4.
- Meek DW, Cox M (2011)
Induction and activation of the p53 pathway: a role for the protein kinase CK2?
Molecular and Cellular Biochemistry, 356 (1-2) : 133-138 .
- Meggio F, Boldyreff B, Marin O, Marchiori F, Perich JW, Issinger OG, Pinna LA (1992)
The effect of polylysine on casein-kinase-2 activity is influenced by both the structure of the protein/peptide substrates and the subunit composition of the enzyme.
European Journal of Biochemistry, 205: 939-945
- Meggio F, Pinna LA (2003)
One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2?
The FASEB Journal, 17: 349-368
- Miya K (2003)
The early embryonic development of *Bombyx mori*; An ultrastructural point of view
Gendaitosho,
Sagamihara, Japan.
- Montenarh M (2010)
Cellular regulators of protein kinase CK2.

- Cell and Tissue Research, 342 (2) : 139-146.
- Moreau JL, Marques F, Barakat A, Schatt P, Lozano JC, Peaucellier G, Picard A, Genevière AM (1998)
Cdk2 activity is dispensable for the onset of DNA replication during the first mitotic cycles of the sea urchin early embryo.
Developmental Biology, 15;200 (2) : 182-197.
- Moreno-Romero J, Armengot L, Marquès-Bueno MM, Cadavid-Ordóñez M, Martínez MC (2011)
About the role of CK2 in plant signal transduction.
Molecular and Cellular Biochemistry, 356 (1-2) : 233-240.
- Morgan, D (1997)
Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors.
Annual Review of Cell and Developmental Biology, 13: 261-291.
- Moribe Y, Niimi T, Yamashita O, Yaginuma T (2001)
Samui, a novel cold-inducible gene, encoding a protein with a BAG domain similar to silencer of death domains (SODD/BAG-4), isolated from *Bombyx* diapause eggs.
European Journal of Biochemistry, 268: 3432-3442.
- Nakagaki M, Takei R, Nagashima E, Yaginuma T (1991)
Cell cycles in embryos of the silkworm, *Bombyx mori*: G2-arrest at diapause stage.
Roux's Archives of Developmental Biology, 200: 223-229
- Niimi T, Yamashita O, Yaginuma T (1993)
A cold-inducible *Bombyx* gene encoding a protein similar to mammalian sorbitol dehydrogenase. Yolk nuclei-dependent gene expression in diapause eggs.
European Journal of Biochemistry, 1;213 (3) : 1125-1131.
- Nijhout HF (1994)
Insect hormones. New Jersey:
Princeton University press. 1-267
- Notman R, den Otter WK, Noro MG, Briels WJ, Anwar J (2007)
The permeability enhancing mechanism of DMSO in ceramide bilayers simulated by molecular dynamics.
Biophysical Journal, 93: 2056-2068.

- Numata H., Hidaka T (1982)
Photoperiodic control of adult diapause in the bean bug, *Riptortus clavatus* (Heteroptera: Coreidae) . I. reversible induction and termination of diapause
Applied Entomology and Zoology, 17: 530-538
- Ohtsuki Y, Kitazawa T (1974)
Studies on the termination of diapause in silkworm eggs dechorionated and cultured *in vitro*.
Journal of Sericultural Science of Japan 43 (2) , 111-118
- Olsen BB, Guerra B, Niefind K, Issinger OG (2010)
Structural basis of the constitutive activity of protein kinase CK2.
Methods in Enzymology, 484: 515-529.
- Padilla PA, Ladage ML (2012)
Suspended animation, diapause and quiescence: arresting the cell cycle in *C. elegans*.
Cell Cycle, 11 (9) : 1672-1679.
- Padmanabha R, Chen-Wu JL, Hanna DE, Glover CV (1990)
Isolation, sequencing, and disruption of the yeast CKA2 gene: casein kinase II is essential for viability in *Saccharomyces cerevisiae*.
Molecular and Cellular Biology, 10 (8) : 4089-4099.
- Palen E, Traugh JA (1991)
Phosphorylation of casein kinase II.
Biochemistry. 4; 30 (22) : 5586-5590.
- Park KE, Yoshitake N (1970)
A radioautographic study of diapause in the silkworm, *Bombyx mori*.
Journal of Insect Physiology, 16 (8) : 1655-1663.
- Pears V., Pears J., Buchsbaum M, Buchsbaum R (1987)
Living Invertebrates,
Boxwood Press, Pacific Grove.
- Pegg DE (2007)
Principles of cryopreservation.
Methods in Molecular Biology, 368: 39-57.
- Pérez-Hedo M, Goodman WG, Schafellner C, Martini A, Sehnal F, Eizaguirre M (2011)

Control of larval-pupal-adult molt in the moth *Sesamia nonagrioides* by juvenile hormone and ecdysteroids.

Journal of Insect Physiology, 57 (5) : 602-607.

Pinna LA (1990)

Casein kinase 2: An 'eminence grise' in cellular regulation?

Biochimica et Biophysica Acta, 1054: 267-284.

Pinna LA (2002)

Protein kinase CK2: a challenge to canons,

Journal of Cell Science, 115: 3873-3878.

Prasad MD, Han S-J, Nagaraju J, Lee W-J, Brey PT (2003)

Cloning and characterization of an eukaryotic initiation factor-2a kinase from the silkworm, *Bombyx mori*.

Biochimica et Biophysica Acta, 1628: 56-63.

Rall WF, Fahy GM (1985)

Ice-free cryopreservation of mouse embryo at -196°C by vitrification.

Nature, 313: 573-575.

Romero-Oliva F, Jacob G, Allende JE (2003)

Dual effect of lysine-rich polypeptides on the activity of protein kinase CK2.

Journal of Cellular Biochemistry, 89: 348-355.

Saito H, Shinohara C, Ohtsuki K (1990)

Characterization of basic polypeptide-activated protein kinase in the eggs of the silkworm, *Bombyx mori*.

Biochimica et Biophysica Acta, 1035: 161-168.

Sanger F (1981)

Determination of nucleotide sequences in DNA.

Science. 11; 214 (4526) : 1205-1210.

Sato Y., Nakazawa Y., Menjo N., Imai K., Komiya T., Saito H., Shin M., Ikeda M., Sakakibara K., Isobe M., Yamashita O (1992)

A new diapause hormone molecule of the silkworm, *Bombyx mori*.

Proceedings of the Japan Academy, 68: 75-79.

- Sato Y, Oguchi M, Menjo N, Imai K, Saito H, Ikeda M, Isobe M, Yamashita O (1993)
Precursor polyprotein for multiple neuropeptides secreted from the suboesophageal ganglion of the silkworm *Bombyx mori*: characterization of the cDNA encoding the diapause hormone precursor and identification of additional peptides.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United, 15;90 (8) :3251-3255.
- Saunders DS (2010)
Photoperiodism in insects: migration and diapause responses in Photoperiodism.
J., Denlinger D. L., Somers D. E., editors.
Oxford: Oxford University Press, 218-257.
- Sawada H, Yamahama Y, Yamamoto T, Mase K, Ogawa H, Iino T (2006)
A novel RNA helicase-like protein during early embryonic development in silkworm *Bombyx mori*: molecular characterization and intracellular localization.
Insect Biochemistry and Molecular Biology, 36: 911-920.
- Sawada H, Yamahama Y, Mase K, Hirakawa H, Iino T (2007)
Molecular properties and tissue distribution of 30K proteins as ommin-binding proteins from diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*.
Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 146 (2) : 172-179.
- Sawada H, Yamahama Y, Yamamoto T, Togawa T, Mase T (2012)
Developmental changes in the localization of protein kinase CK2 in non-diapause and diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*.
Zoological Science, 29 (1) : 6-10.
- Schafellner C, Eizaguirre M, López C, Sehnal F (2008)
Juvenile hormone esterase activity in the pupating and diapausing larvae of *Sesamia nonagrioides*.
Journal of Insect Physiology, 54: 916-921.
- Sonobe H, Ohnishi E (1970)
Accumulation of 3-hydroxykynurenine in ovarian follicles in relation to diapause in the silkworm, *Bombyx mori* L.
Development, Growth & Differentiation, 12 (1) : 41-52.
- Sonobe H, Matsumoto A, Fukuzaki Y, Fujiwara S (1979)

- Carbohydrate metabolism and restricted oxygen supply in the eggs of the silkworm, *Bombyx mori*.
Journal of Insect Physiology, 25: 381-388.
- Sonobe H, Nakamura M (1991)
A re-investigation of the oxygen permeability of the chorion in relation to the onset of embryonic diapause in the silkworm, *Bombyx mori*.
Journal of Insect Physiology, 37: 727-731.
- Sonobe H, Yamada R (2004)
Ecdysteroids during early embryonic development in silkworm *Bombyx mori*: metabolism and functions.
Zoological Science, 21: 503-516.
- Takahashi SY (1985)
Characterization of the guanosine 3': 5'-monophosphate-dependent protein kinase from silkworm eggs and analysis of the endogenous protein substrate.
Comparative Biochemistry and Physiology Part B: 155:693-701.
- Tanoue S, Nishioka T (2003)
Molecular characterization of membrane-bound cGMP dependent protein kinase from the silk moth *Bombyx mori*.
Insect Molecular Biology, 12:621-629.
- Tauber MJ, Tauber CA, Masaki S (1986)
Seasonal adaptations of insects.
New York: Oxford University Press; 1986.
- Trang LTD, Sehadova H, Ichihara N, Iwai S, Mita K, Takeda M (2006)
Casein kinase I of the silkworm, *Bombyx mori*: their possible roles in circadian timing and developmental determination.
Journal of Biological Rhythms 21: 335-349.
- Tsurumaru S, Kawamori A, Mitsumasu K, Niimi T, Imai K, Yamashita O, Yaginuma T (2010)
Disappearance of chorion proteins from *Bombyx mori* eggs treated with HCl solution to prevent diapause.
Journal of Insect Physiology, 56: 1721-1727.

- Tuteja N, Reddy MK, Mudgil Y, Yadav BS, Chandok MR, Sopory SK (2003)
Pea DNA topoisomerase I is phosphorylated and stimulated by casein kinase 2 and protein kinase C.
Plant Physiology, 2003 Aug;132 (4) :2108-2115.
- Umetsu M, Tsumoto K, Hara M, Ashish K, Goda S, Adschiri T, Kumagai I (2003)
How additives influence the refolding of immunoglobulin-folded protein in a stepwise dialysis system.
The Journal of Biological Chemistry, 278: 8979-8987.
- van den Heuvel S (2005)
Cell-cycle regulation.
WormBook. 2005 Sep 21:1-16. Review.
- Wang CC, Lin SY, Lai YH, Liu YJ, Hsu YL, Chen JJ (2012)
Dimethyl sulfoxide promotes the multiple functions of the tumor suppressor HLJ1 through activation protein-1 activation in NSCLC cells.
PLoS One 7: e33772.
- Wang X, Wang X, Li L, Wang D (2010)
Lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* by DMSO is dependent on sir-2.1 and daf-16.
Biochemical and Biophysical Research Communications, 400: 613-618.
- Weaver RJ, Audsley N (2009)
Neuropeptide regulators of juvenile hormone synthesis: structures, functions, distribution, and unanswered questions.
Annals of the New York Academy of Sciences, 2009 Apr;1163:316-329.
- Yaginuma T., Yamashita O (1979)
NAD-dependent sorbitol dehydrogenase activity in relation to the termination of diapause in eggs of *Bombyx mori*.
Insect Biochemistry, 9; 547-553.
- Yaginuma T, Kobayashi M, Yamashita O (1990)
Distinct effects of different low temperatures on the induction of NAD-sorbitol dehydrogenase activity in diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*.
Comparative Biochemistry and Physiology Part B: 160, 277-285.

- Yamada R, Yamahama Y, Sonobe H (2005)
Release of ecdysteroid- phosphates from egg yolk granules and their dephosphorylation during early embryonic development in silkworm, *Bombyx mori*.
Zoological Science, 22: 187-198.
- Yamaguchi T, Mukasa T, Uchida E, Kanayasu TT, Hayakawa T (1999)
The role of STAT3 in granulocyte colony-stimulating factor-induced enhancement of neutrophilic differentiation of Me 2 SO-treated HL-60 cells. GM-CSF inhibits the nuclear translocation of tyrosine-phosphorylated STAT3.
The Journal of Biological Chemistry, 274: 15575–15581.
- Yamahama Y, Uto N, Tamotsu S, Miyata T, Yamamoto Y, Watabe S, Takahashi SY (2003)
In vitro activation of pro-form *Bombyx* cysteine protease (BCP) in silkworm eggs: localization of yolk proteins and BCP, and acidification of yolk granules.
Journal of Insect Physiology, 49: 131-140.
- Yamamoto T, Kanekatsu M, Nakagoshi M, Kato T, Mase K, Sawada H (2005)
Casein kinase 2 during early embryonic development in silkworm *Bombyx mori*: cDNA sequence, gene expression, and enzyme activity.
DNA Sequence, 16: 446-455.
- Yamamoto T, Sawada H (2008)
In-Vitro Phosphorylation Activity by Recombinant α and β Subunits of *Bombyx mori* Casein Kinase 2.
Zoological Science, 25 (8) : 799-805.
- Yamashita O, Hasegawa K (1985)
Embryonic diapause.
Comparative Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Oxford: Pergamon Press. 407-434.
- Yamashita O (1979)
Metabolism characteristic of insect diapause [Article in Japanese]
タンパク質核酸酵素 1979;24 (12) :1316-1323.
- Yde CW, Olsen BB, Meek D, Watanabe N, Guerra B (2008)
The regulatory beta-subunit of protein kinase CK2 regulates cell-cycle progression at the

onset of mitosis.

Oncogene. 2008 Aug 28;27 (37) :4986-4997.

Yoshimi T, Furusawa T, Yamashita O (1990)

Localization of Cl⁻ in the eggs of the silkworm, *Bombyx mori*, treated with HCl.

Journal of Insect Biotechnology and Sericology, 59: 14-21.

謝辞

本研究を遂行し学位論文としてまとめるに当たり、主査として審査を快くお引き受け頂いた日本大学文理学部物理生命システム科学科の斎藤稔教授に深くお礼申し上げます。副査としてご指導を賜りました日本大学文理学部物理生命システム科学科の澤田博司教授には、本論文作成において適切かつ具体的なお助言を頂いたこと、実験手法を基礎から丁寧に教えて頂いたこと、研究者としてのスタートラインに立たせて頂いたこと、心より感謝いたします。同じく副査としてご指導を賜りました北里大学一般教育部自然科学教育センター生物学単位の中村和生教授には、本論文作成でのご指導ならびに単位内での業務分担に配慮して頂いたこと、深く感謝いたします。

日本大学文理学部物理生命システム科学科の間瀬啓介教授には、実験材料として使用したカイコの飼育法ならびに研究を進めるに当たり、貴重なお助言を頂きました。東京農工大学農学部生物生産学科の金勝一樹准教授には、プロテインキナーゼCK2の活性測定法ならびに精製法をご指導頂きました。浜松医科大学実験実習機器センター超微形態共同実験室の村中祥悟博士ならびに浜松医科大学医学部総合人間科学講座生物学部門の山濱由美博士には、カイコ卵殻表面構造の観察を行うのに当たり、走査型電子顕微鏡の使用法をご指導頂きました。いわき明星大学薬学部薬学科の中越元子教授ならびに日本大学文理学部物理生命システム科学科の外川徹准教授には、研究に対する有用なお助言を頂きました。北里大学一般教育部自然科学教育センター生物学単位の浜崎浩子教授、小畑秀一准教授、長谷川孝幸講師、加藤智美講師、坂田剛講師、増本三香助教、西村真由子助教には、貴重なお助言を頂きました。皆様に深くお礼申し上げます。