

## 論文の内容の要旨

氏名：橋田 涼

博士の専攻分野の名称：博士（理学）

論文題名：

カイコガの人工孵化時におけるカルシウムの役割に関する生化学的研究

### 第1章 序論

昆虫は地球上のあらゆる環境に生息しており、最も繁栄している生物群といえる。昆虫は、不適な環境を乗り越える手段として、その生活史に休眠を取り込んだ種も多く存在する。1年に2世代を繰り返す二化性系統のカイコガ (*Bombyx mori*) の場合、母親が胚発生期に受けた環境刺激によって、次世代の卵期において休眠が実行される。親世代が胚発生期に低温短日条件 (15°C, 全暗期) を経験した次世代は非休眠卵となり、高温長日条件 (25°C, 18時間明期; 6時間暗期) を経験した次世代は休眠卵となる (図1)。非休眠卵がおおよそ12日で孵化するのに対し、休眠卵は2ヶ月以上の低温状態を必要とし、孵化までにはおおよそ6ヶ月かかる。他の多くの昆虫が行う休眠は、環境刺激の感受期が同一世代に存在し、低温や乾燥、餌不足など環境条件の悪化に伴い一時的に発育を停止するものである。しかし、カイコガの休眠は将来の生育に不適な環境に備えて好適な環境時から計画的に準備された積極的な発育停止現象であるといえる。カイコガの休眠現象は、発育中の雌蛹の卵巣に休眠ホルモンが作用することで、次世代において実行される。しかし、休眠ホルモンが作用してから休眠が実行されるまでの詳細な分子メカニズムは未だに明らかになっていない。

古くから養蚕業において、休眠卵を人工的に孵化させる手法が用いられてきた。カイコガ卵の人工孵化法として、浸酸処理法およびDMSO処理法などが存在する。これらの手法を用いることで通常孵化するまでに6ヶ月を必要とする休眠卵をおおよそ12日で孵化させることができる。浸酸処理法およびDMSO処理法のどちらにおいても、人工孵化の分子機構は不明である。しかし、浸酸処理法に関しては、浸酸処理によって卵殻からカルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) が減少することおよび卵殻のすぐ内側に塩素イオン ( $\text{Cl}^-$ ) が透過していることが報告されている。このことから  $\text{Ca}^{2+}$  が人工孵化時において重要な役割を担っていると考えられた。本研究は、カイコガの人工孵化時におけるカルシウムの役割を明らかにすることを目的として各種の実験を行い、得られた新知見をまとめたものである。

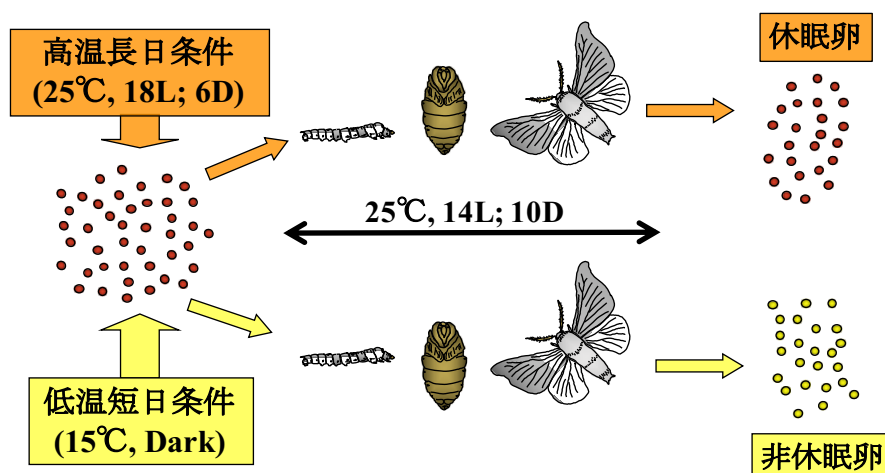


図1 休眠卵と非休眠卵の環境条件

胚発生期に受けた環境要因によって、次世代が休眠卵になるか、非休眠卵になるか決定される。

L：明期，D：暗期

## 第2章 カイコガの人工孵化時における $\text{Ca}^{2+}$ の定量解析

人工孵化時におけるカルシウム量の変動を明らかにするために、ICP-AES を用いてカイコガ卵の卵殻および中身（卵殻以外の全て）における金属元素の定量解析を行った。その結果、浸酸処理を行ったカイコガ卵の卵殻および中身において  $\text{Ca}^{2+}$  量が減少していることが明らかになった（図 2A）。浸酸処理に用いた塩酸溶液において  $\text{Ca}^{2+}$  量が増加していたことから、浸酸処理に伴ってカイコガ卵における  $\text{Ca}^{2+}$  は卵外へ流出していることが明らかになった（図 2B）。休眠卵・非休眠卵・DMSO 処理卵についても同様に解析を行ったが、 $\text{Ca}^{2+}$  量の変動は確認されなかった。また、 $\text{Ca}^{2+}$  と同時に  $\text{Mg}^{2+}$  量の測定も行ったが、全ての卵において  $\text{Mg}^{2+}$  量に変化は見られなかった。つまり、 $\text{Ca}^{2+}$  量が特異的に浸酸処理卵において変動していた。カイコガ卵の卵殻において  $\text{Ca}^{2+}$  結合性タンパク質の流出があるかを確認したところ、変化はみられなかった。これらの結果から、カイコガ卵に存在していた沈着・結合型の Ca が浸酸処理によって遊離の  $\text{Ca}^{2+}$  となり卵外へ流出しているのではないかと推測される。

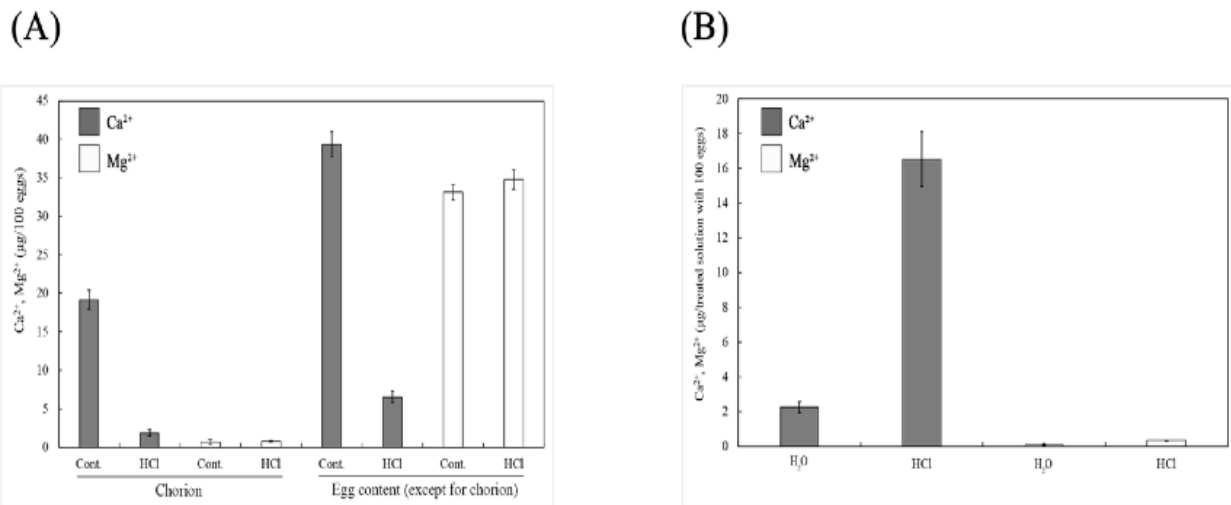


図2 ICP-AES を用いた  $\text{Ca}^{2+}$  および  $\text{Mg}^{2+}$  の定量

(A) 浸酸処理卵の卵殻および中身（卵殻以外の全て）、(B) 浸酸処理に用いた塩酸溶液

## 第3章 カイコガの胚子発生および浸酸処理による人工孵化時における一酸化窒素合成酵素の生化学的解析

第2章では浸酸処理による人工孵化法において  $\text{Ca}^{2+}$  の関与が示唆される結果を記述した。第3章では活性化に  $\text{Ca}^{2+}$  が必須な分子である一酸化窒素合成酵素（NOS）の生化学的解析を行った。NOS はセカンドメッセンジャーとして様々な生物学的反応に関与する一酸化窒素（NO）を合成する酵素であり、カイコガにおける NOS（BmNOS）は、その活性化に補因子として  $\text{Ca}^{2+}$  が必要であることが知られている。

まず、浸酸処理卵における BmNOS の酵素活性を測定した。その結果、超純水で処理した休眠卵と比較して浸酸処理に伴い BmNOS の酵素活性が上昇することが確認された（図 3A）。浸酸処理卵における BmNOS 遺伝子の発現を RT-PCR 法を用いて解析した結果、浸酸処理によって BmNOS の発現が誘導され、AT-0~24 までその発現が持続されていた（図 3B）。これらの結果は、浸酸処理によって BmNOS 遺伝子の転写が誘導されたことを指し示しており、また BmNOS の酵素活性は主に転写レベルで調節されていることを示唆している。

産卵後 0 時間以降、休眠卵における BmNOS の遺伝子発現と酵素活性は、産卵後 12~60 時間の非休眠卵の BmNOS の遺伝子発現および酵素活性とは異なっていた。休眠卵の場合、BmNOS の発現変動は酵素活性の変動パターンとほとんど一致していた。特に、産卵後 48~60 時間の休眠卵における酵素活性の上昇は、転写レベルでの調節を受けている可能性が考えられる。休眠卵を 25°C で保持していると、胚子細胞における有糸分裂活性は徐々に低下し、産卵後 72 時間目には細胞分裂が停止する。それゆえ、産卵後 48~60 時間に BmNOS より合成された NO は、休眠を促進するのに重要な役割を担っている可能性がある。一

方、非休眠卵の場合、産卵後 24 時間と 60 時間に明らかな BmNOS 遺伝子の増幅が検出されているが、酵素活性は低かった。このことは、これらの発生段階の非休眠卵における酵素活性は転写後のレベルで抑制されていることが示唆される。

免疫組織化学の結果より、休眠卵と浸酸処理卵において BmNOS は漿膜細胞、卵黄細胞の核周辺および一部の卵黄細胞中の卵黄顆粒に局在していたが、BmNOS の局在は胚帯において観察されなかった。これらの結果は、本実験に用いた発生段階において BmNOS は休眠卵および浸酸処理卵のどちらの卵においても漿膜細胞と卵黄細胞でのみ機能していることが推測される。

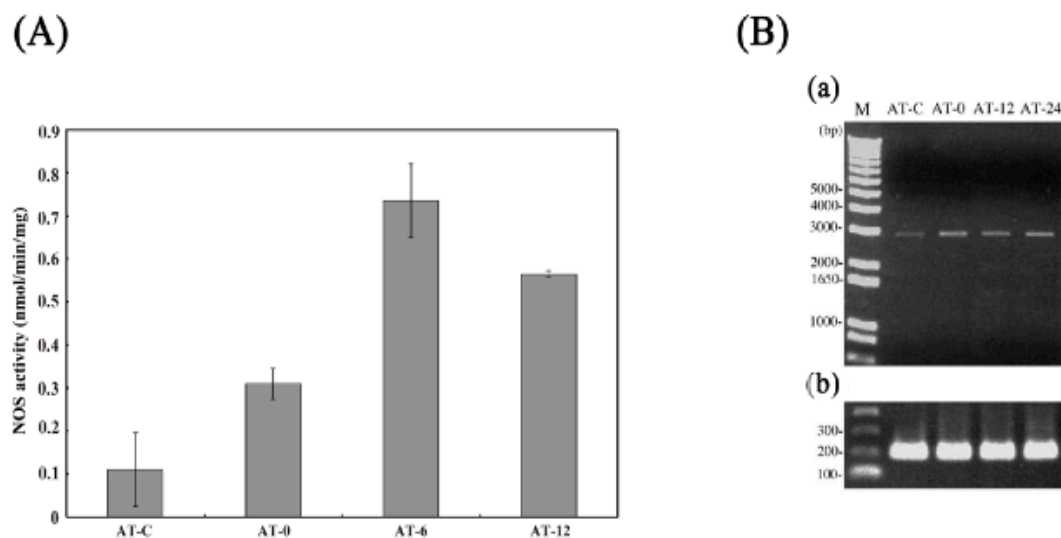


図 3 浸酸処理卵における BmNOS の酵素活性および遺伝子発現解析

(A) BmNOS の酵素活性、(B) RT-PCR による遺伝子発現解析 (a) *BmNOS*, (b) *Ribosomal protein L5*  
AT-0, AT-6, AT-12, AT-24 は、それぞれ処理後 0, 6, 12, 24 時間の浸酸処理卵を示す。AT-C は、塩酸の代わりに超純水で処理したコントロールを示す。

#### 第 4 章 カイコガの人工孵化時におけるミトコンドリア $Ca^{2+}$ 依存的溶質輸送体 (MCSC) の機能と局在

第 2 章では、浸酸処理に伴ってカイコガ卵より  $Ca^{2+}$  が流出することを記述し、第 3 章では浸酸処理に伴って  $Ca^{2+}$  が流出し、減少するにも関わらず、活性化に  $Ca^{2+}$  を必須とする BmNOS 活性が上昇することを記述した。つまり、浸酸処理による胚子発生の活性化には  $Ca^{2+}$  関連分子が関与していることが強く示唆された。そこで本章では、ミトコンドリアにおいて  $Ca^{2+}$  依存的に代謝物や核酸、補因子などの輸送に関与しているカイコガ MCSC (BmMCSC) の浸酸処理時における機能と局在を明らかにするために、BmMCSC の遺伝子発現解析や生化学的解析を行った。

BmMCSC の浸酸処理卵における遺伝子発現解析を行ったところ、浸酸処理後 (AT-0) において顕著な発現上昇が確認された (図 4A)。このことから、 $Ca^{2+}$  は浸酸処理によってカイコガ卵から流出するが、その際にセカンドメッセンジャーとして機能している可能性が示唆される。

続いて、浸酸処理時における BmMCSC の機能解析を行うために大腸菌発現系で作製したリコンビナント BmMCSC (rBmMCSC) と  $Ca$  の放射性同位元素である  $^{45}Ca$  を用いて  $Ca^{2+}$  結合実験を行った (図 4B)。その結果、rBmMCSC と  $^{45}CaCl_2$  を反応させた Spot 2 において  $^{45}Ca$  の強いシグナルが検出された (図 4B-a)。この結果から、rBmMCSC はその N 末端領域に存在する EF-hand モチーフに  $Ca^{2+}$  が結合することでその機能を調節していることが考えられる。

免疫組織化学的解析において、BmMCSC は主に漿膜細胞にその局在が観察されたことから、BmMCSC は漿膜細胞において重要な機能を担っているのではないかと考えられる。

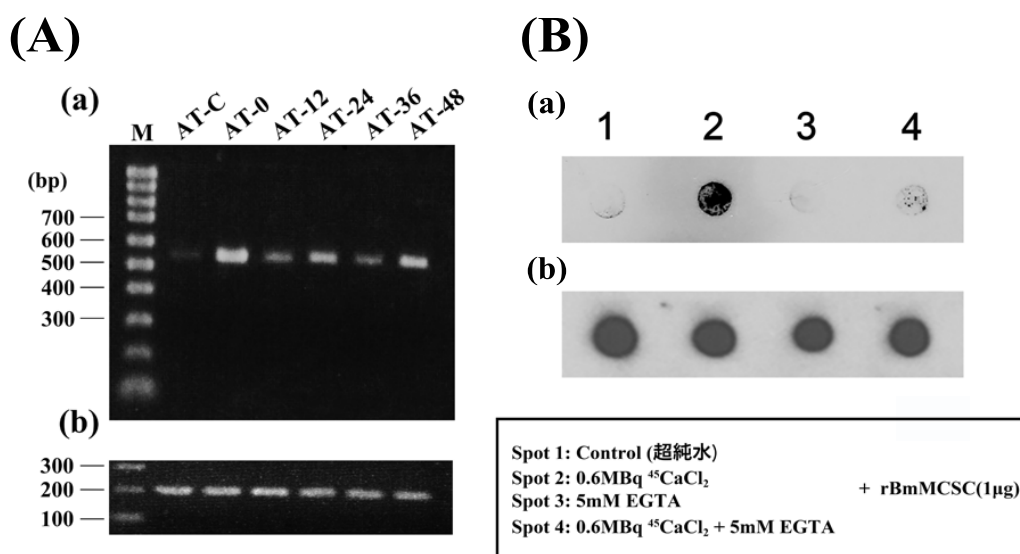


図4 BmMCSC の遺伝子発現解析と機能解析

(A) RT-PCR 法を用いた遺伝子発現解析 (a)*BmMCSC*, (b)*Ribosomal protein L5*

図3と同様に、AT-0, AT-12, AT-24, AT-36, AT-48は、それぞれ処理後0, 12, 24, 36, 48時間の浸酸処理卵を示す。AT-Cは、塩酸の代わりに超純水で処理したコントロールを示す。

(B) (a)<sup>45</sup>Caを用いたCa<sup>2+</sup>結合実験, (b)抗BmMCSC抗血清を用いたイムノドットブロット解析

## 第5章 総括

本論文は、カイコガの人工孵化時におけるカルシウムの役割を解明することを目的として実験を行い、その結果をまとめたものである。第2章で、カイコガ卵の卵殻および中身におけるCa<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>の定量解析について記述した。浸酸処理卵の卵殻および中身において、Ca<sup>2+</sup>量が減少していることが明らかになった。同時に測定したMg<sup>2+</sup>量に変動がないことからこの現象はCa<sup>2+</sup>に特異的であることがわかった。また、カイコガの休眠卵・非休眠卵・DMSO処理卵においても同様の測定を行なったが、Ca<sup>2+</sup>量, Mg<sup>2+</sup>量に変動はみられなかった。そのため、浸酸処理による人工孵化時における分子メカニズムにCa<sup>2+</sup>が関与している可能性が示唆された。そこで、第3章では酵素の活性化にCa<sup>2+</sup>が必須な分子であるBmNOS, 第4章ではCa<sup>2+</sup>依存的に機能調節をしていることが示唆されているBmMCSCの生化学的解析について記述した。BmNOSおよびBmMCSCは浸酸処理に伴って遺伝子発現が上昇していることが明らかとなった。また、BmNOSは浸酸処理によって酵素活性の上昇が確認された。BmMCSCはN末端領域にEF-handモチーフが2ヶ所存在しており、Ca<sup>2+</sup>との結合が確認された。EF-handモチーフにCa<sup>2+</sup>が結合することで、BmMCSCは機能を調節していることが示唆された。また、BmNOSおよびBmMCSCはカイコガ卵において漿膜細胞にその局在が観察された。以上の結果を総合すると、浸酸処理における人工孵化には、Ca<sup>2+</sup>が関与していることが示唆される。その分子メカニズムとしては、浸酸処理によってカイコガ卵における沈着・結合型のCaが遊離のCa<sup>2+</sup>となってカイコガ卵を流動し、流動したCa<sup>2+</sup>がセカンドメッセンジャーとして機能するのではないかと推測される。また、今回解析を行ったCa<sup>2+</sup>関連分子であるBmNOSおよびBmMCSCの局在は漿膜細胞であった。漿膜細胞は、卵殻のすぐ内側に存在する細胞層で、Ca<sup>2+</sup>が卵外へ流出する際にはこの細胞層を通過しなければならない。これらのことから、浸酸処理による人工孵化において漿膜細胞中に存在するBmNOSやBmMCSCを始めとするCa<sup>2+</sup>関連分子が重要な役割を担っている可能性が強く示唆される。