

論文審査の結果の要旨

氏名： 橘 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

審査委員：（主査）日本大学教授 澤 田 博 司
（副査）日本大学教授 間 瀬 啓 介
（副査）日本大学教授 橋 本 伸 哉
（副査）神奈川大学教授 泉 進

昆虫は地球上のあらゆる環境に生息しており、現在最も繁栄している生物群である。昆虫は不利な環境条件下での発育を避けるために生活史に休眠を取り込んだ種も多く存在する。その中でもカイコガ (*Bombyx mori*) 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卵の状態に休眠に入り、その休眠卵はおよそ半年間休眠する事が知られている。また、養蚕業では、この休眠卵を人工的に非休眠化させる人工孵化法（浸酸処理法）が古くから用いられ、カイコガの飼育を効率的に行っている。この人工孵化では、半年間休眠するはずの休眠卵を約2週間で孵化させることができる。しかし、このカイコガの休眠と人工孵化法の分子メカニズムの詳細は現在でも不明である。本論文は、この人工孵化法の分子メカニズムの解明を目的として生化学的解析を行い、得られた新知見をまとめたものであり、以下の5章から構成される。

第1章は序論であり、さまざまな昆虫の生活史とカイコガの生活史に関する先行研究を詳細に比較し、カイコガの休眠と人工孵化の生物学的意義について明らかにした。また、カイコガの休眠、非休眠、人工孵化の分子機構に関する先行研究の詳細な検討を行い、カイコガの人工孵化時におけるカルシウムの役割の解明という本論文の目的を明確に示した。

第2章では人工孵化時におけるカルシウムイオン (Ca^{2+}) 量の変動を明らかにするために、高周波誘導結合プラズマ発光分光分析法を用いて、カイコガの浸酸処理卵、休眠卵、非休眠卵などの卵殻と中身（卵殻以外の全て）における Ca^{2+} 量とマグネシウムイオン (Mg^{2+}) 量の定量解析を行った。その結果、浸酸処理を行った卵殻および中身において Ca^{2+} 量が減少していることが明らかになった。浸酸処理に用いた塩酸溶液において 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 Ca^{2+} は卵外へ流出していることが明らかになった。休眠卵と非休眠卵の各発生段階において同様に解析を行ったが、 Ca^{2+} 量の変動は確認されなかった。このとき全ての定量解析において Mg^{2+} 量に変化はなかった。つまり、 Ca^{2+} 量が特異的に浸酸処理卵において減少していた。一方、カイコガ卵の卵殻において 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、流出は確認されなかった。これら結果から、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 Ca^{2+} となり卵外へ流出している事が明らかとなった。

第3章では、浸酸処理による人工孵化法において Ca^{2+} の関与が示唆されたため、酵素の活性化に Ca^{2+} が必須な分子であるカイコガの一酸化窒素合成酵素 (BmNOS) の初期発生と浸酸処理時の役

割の解明のための生化学的解析を行った。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。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、処理後 24 時間までその発現が持続されていた。これらは、浸酸処理によって *BmNOS* 遺伝子の転写が誘導されたことを示しており、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強く示唆する結果となった。また、免疫組織化学的解析から、休眠卵と浸酸処理卵の 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ることも明らかとなった。

第 4 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のミトコンドリア Ca^{2+} 依存的溶質輸送体 (BmMCSC) の浸酸処理時における機能と局在の解明のための生化学的解析を行った。まず、浸酸処理卵における *BmMCSC* 遺伝子の発現解析を RT-PCR 法により行った結果、浸酸処理後直後から顕著な発現上昇が確認された。次に、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。その結果、rBmMCSC は Ca^{2+} と親和性があることが明らかとなった。また、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。これらは、BmMCSC が漿膜細胞において Ca^{2+} によりその機能が制御される事を強く示唆する結果となった。

第 5 章は総括であり、浸酸処理による人工孵化法に際し卵殻と卵内から Ca^{2+} が流出する機構、及び BmNOS と BmMCSC の Ca^{2+} による機能制御から浸酸処理時のそれらの役割について考察したものである。カイコガ卵における沈着型の Ca は、卵殻では卵殻タンパク質とともに一様に分布しており、浸酸処理に際して遊離の Ca^{2+} になり容易に流出するが、卵内の Ca^{2+} の流出は主に卵黄細胞中の卵黄顆粒、胚子、および漿膜であり流出は卵殻よりも容易ではないことを論じている。しかし、卵内からの場合は卵殻直下に存在する一層の細胞層からなる漿膜を Ca^{2+} は必ず通過しなければならず、 Ca^{2+} 流出における漿膜の重要性を指摘している。一方、浸酸処理後の漿膜細胞中では、BmNOS の酵素活性は転写レベルで調節され一酸化窒素によるシグナル伝達を活性化させ、BmMCSC は Ca^{2+} と結合することでミトコンドリアへの溶質輸送を活発化させ、それぞれ人工孵化のために寄与している可能性を論じている。

以上のように、本論文では、カイコガの人工孵化時において Ca^{2+} が卵外へ流出することを明らかにするとともに、 Ca^{2+} により機能が制御される分子である BmNOS と BmMCSC の機能解析、遺伝子発現、細胞内局在性等を明らかにし、人工孵化時におけるその役割について詳細に記述したものであり、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 31 年 1 月 10 日