

# 博士論文

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

日本大学大学院総合基礎科学研究科

相関理化学専攻

橘田 涼

# 目次

## 第1章 序論

1-1 昆虫の生活史について	1
1-2 カイコガの生活史について	2
1-3 昆虫における人工孵化法について	8
1-4 本研究について	11

## 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

2-1 序論	12
2-2 材料と方法	12
2-2-1 実験材料	12
2-2-2 カイコガ休眠卵の浸酸処理および DMSO 処理	13
2-2-3 ICP-AES を用いたカイコガ卵における $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ の定量	13
2-2-3-1 カイコガ卵の解剖	13
2-2-3-2 サンプルの酸加水分解と ICP-AES による測定	14
2-2-3-3 データ処理	14
2-2-4 $^{45}\text{Ca}$ を用いた $\text{Ca}^{2+}$ 結合性タンパク質の検出	16
2-2-4-1 サンプル調製	16
2-2-4-2 SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) および CBB 染色	16
2-2-4-3 セミドライブロットティング	16
2-2-4-4 オートラジオグラフィーによる $^{45}\text{Ca}$ 結合性タンパク質の検出	17
2-3 結果	18
2-3-1 浸酸処理に伴う $\text{Ca}^{2+}$ 量および $\text{Mg}^{2+}$ 量の変動	18
2-3-2 浸酸処理に用いた塩酸溶液の $\text{Ca}^{2+}$ 量および $\text{Mg}^{2+}$ 量の変動	18
2-3-3 $^{45}\text{Ca}$ を用いた $\text{Ca}^{2+}$ 結合性タンパク質の検出	18
2-3-4 DMSO 処理に伴う $\text{Ca}^{2+}$ 量および $\text{Mg}^{2+}$ 量の変動	19
2-3-5 休眠卵・非休眠卵における胚子発生に伴う $\text{Ca}^{2+}$ 量および $\text{Mg}^{2+}$ 量の変動	19

2-4 考察	26
--------	----

### 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

3-1 序論	29
3-2 材料と方法	33
3-2-1 実験材料	33
3-2-2 カイコガ休眠卵の浸酸処理	33
3-2-3 NOS 活性測定	33
3-2-4 RNA 抽出および RT-PCR	34
3-2-5 組換えタンパク質の発現と精製	34
3-2-6 ウェスタンブロット解析	35
3-2-7 免疫組織化学	35
3-3 結果	39
3-3-1 休眠卵と非休眠卵における BmNOS 活性の比較	39
3-3-2 浸酸処理による BmNOS 活性の変動	39
3-3-3 発生に伴う <i>BmNOS</i> の発現	39
3-3-4 大腸菌発現系における rBmNOS の発現と抗体特異性の確認	40
3-3-5 休眠卵と浸酸処理卵における BmNOS の分布と局在	40
3-4 考察	47

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

4-1 序論	49
4-2 材料と方法	49
4-2-1 実験材料	49
4-2-2 カイコガ休眠卵の浸酸処理	49
4-2-3 RNA 抽出および RT-PCR 解析	50
4-2-4 リコンビナントタンパク質の発現と精製	50
4-2-5 SDS-PAGE およびウェスタンブロット解析	51

4-2-6 Ca <sup>2+</sup> 結合解析	51
4-2-7 免疫組織化学	51
4-3 結果	55
4-3-1 <i>BmMCSC</i> cDNA のクローニングとバイオインフォマティクス解析	55
4-3-2 浸酸処理卵における <i>BmMCSC</i> の発現解析	55
4-3-3 大腸菌発現系における r <i>BmMCSC</i> の発現	55
4-3-4 <i>BmMCSC</i> の Ca <sup>2+</sup> 結合能	56
4-3-5 カイコガ卵における <i>BmMCSC</i> の局在	56
4-4 考察	62
第 5 章 総括	66
参考文献	70
謝辞	79

# 第1章 序論

## 1-1 昆虫の生活史について

原始的な昆虫は今から約4億年前に出現し、約3億年前に陸上で多様化が進み、その進化過程で高度な生理機能を得たと考えられている（南條，2009）。したがって、昆虫は極地から赤道直下の砂漠、高山から地下水の中まで、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考えられている。

変温動物である昆虫は、周囲の温度変化の影響を強く受ける。そのため昆虫は冬季の低温や夏季の高温、乾燥、餌不足など昆虫の活動に不適な環境を巧く回避する手段を獲得してきた（嶋田ら，2009）。昆虫は、不適な環境を回避する準備をするために、環境要因によって季節の到来を予測する必要がある。多くの昆虫において季節を知る手がかりとなっているのが日長である。昆虫を含む数多くの生物は、日長をモニタリングすることで季節変化を予測し、光周期変動に対して光周性として知られている生物学的応答を示す（Goto and Matsumoto, 2018）。昆虫の光周性は、最初にイチゴネアブラムシ（*Aphis forbesi*）において報告された。イチゴネアブラムシでは、短日に反応して単為生殖から両性生殖へと切り替えていることが明らかとなった（Marcovitch, 1923）。続いて、カイコガ（*Bombyx mori*）の二化性品種が卵休眠を行うか否かが、親世代の卵期の光周期の影響を受けることが示された（Kogure, 1933）。多くの昆虫は、光周期により休眠が制御されている。休眠は、不適な環境を時間的に回避する手段として行う。不適な季節や期間には発育や活動を停止させ、好適な時期がくるのを待つ。昆虫は休眠をその生活史に取り入れたことで、寒冷地や砂漠に至るまで生息圏を拡大することができたと考えられている。昆虫の休眠は、遺伝的に支配され、環境条件の適否にかかわらず休眠が起こる絶対休眠と環境条件を指標にして休眠状態に入るか否かを決定する随意休眠とに大別される。随意休眠の昆虫では、休眠ステージに先立って休眠誘導のための環境刺激を受容する感受期が存在する。環境刺激の感受期は、一般には休眠を経験する世代に存在するが、卵休眠を行う場合には親世代に存在するものが多い（Nijhout, 1994）。昆虫がどの発育段階で休眠するかはさまざまである。日長や温度など休眠を誘導するための情報は、眼や皮膚などの感覚器官から脳に伝えられ、そこで処理される。その結果、特定の代謝が引き起こされ、休眠に特有な生理状態となる。その制御に関与しているのがホルモンであり、それぞれの休眠によって関与するホルモンも異なっている。例えば、卵休眠を行うカイコガの場合、休眠ホルモンによって休眠が誘導される。終齢幼虫で休眠を行うヨーロッパアワノ

メイガ (*Ostrinia nubilalis*) の場合、休眠の初期に幼若ホルモン (JH) の体液中の濃度が高く、休眠の誘導に JH が必要であるが、休眠の維持には JH の関与がない (Chippendale and Yin, 1979)。同じく終齢幼虫で休眠を行うニカメイガ (*Chilo suppressalis*) の場合、休眠誘導のみならず、休眠維持にも JH が必要である (Yagi and Fukaya, 1974)。多くの昆虫種で知られている蛹休眠は、前胸腺で産生される脱皮ホルモンの欠如によって引き起こされる。セクロピアサン (*Hyalophora cecropia*)、タバコスズメガ (*Manduca sexta*) において、脳から前胸腺刺激ホルモン (PTTH) の分泌が起こらず、前胸腺から脱皮ホルモンが分泌されないために蛹は発達初期の段階で休眠する (Ohtaki and Takahashi, 1972; Walker and Denlinger, 1980; Bowen et al., 1984; Denlinger, 1985)。コロラドハムシ (*Leptinotarsa decemlineata*) などで知られる成虫休眠は、JH の合成、分泌が抑制されることにより引き起こされる (Wilde and Boer, 1961; 1969)。成虫休眠は、卵巣や精巣などの雌雄生殖器官の発達や生殖に関わる生理現象が JH により抑制されることから、生殖休眠ともよばれる。以上のように、多くの昆虫において、休眠現象がホルモンによって制御されていることは報告されているが、その分子機構は不明なままである。

## 1-2 カイコガの生活史について

カイコガが生産する繭から絹を得て利用する養蚕は、非常に古くから行われていた。養蚕は約 5000 年前に中国で野生種のクワコを家畜化することによって発生したとされ、そこからシルクロードを経て全世界に広がった。ヨーロッパに伝わったのは 5 世紀頃であり、日本には弥生時代後期 (1~2 世紀頃) に伝わった (嶋田ら, 2009)。

カイコガは休眠性の違いから、一化性、二化性、多化性に分類することができる。一化性は一年に 1 世代、多化性は一年に複数世代の生活史を送る。これらのカイコガは環境条件に関わらず、一化性は必ず休眠卵を、多化性は必ず非休眠卵を産卵する。これに対して一年に 2 世代を繰り返す二化性系統のカイコガでは、環境条件によって非休眠卵を産むか、休眠卵を産むかが決定される (Fig. 1)。カイコガは家畜化された昆虫であるが、自然界に例えると、春先に休眠から覚醒し孵化する。孵化した幼虫は桑の葉を餌とし、4 回脱皮を行い 1~5 齢の幼虫期をおよそ 25 日過ごす。5 齢幼虫はおよそ 3 日かけて営繭し、繭の中で最終脱皮を行い蛹になる。蛹はおよそ 11 日後に成虫となり繭から出てきて交尾を行う。この時メスが産んだ卵は非休眠卵、時期は夏であり、およそ 12 日後に孵化する。孵化後は上述のように幼虫、蛹、成虫と成長し、秋頃に再びメスが産卵する。この時産まれた卵は休眠卵となり、春先までの

およそ 6 ヶ月間卵休眠を行う。このように、親世代が胚発生期に春先に相当する低温短日条件下（15℃，全暗期）で飼育された次世代は非休眠卵となり，夏に相当する高温長日条件下（25℃，18 時間明期；6 時間暗期）で飼育された次世代は休眠卵となる（Fig. 2）。他の多くの昆虫が行う休眠は，環境刺激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（Nijhout, 1994; Yamashita and Hasegawa, 1985）。

カイコガの休眠は，胚発生初期の囊胚期で起こる。その際，胚子の細胞周期は G<sub>2</sub> 期で停止し，形態的発育も停止する（Yamashita and Hasegawa, 1985; Nakagaki et al., 1991）。一旦休眠が開始されると 2 ヶ月以上の低温状態（5℃）を経験しないと休眠から覚醒しない（Yaginuma et al., 1990）。カイコガの卵休眠は休眠ホルモンによって誘導される。休眠ホルモンは食道下神経節の 1 対の神経分泌細胞で合成された後，側心体-アラタ体複合体に輸送される。そこから血液中に放出され，発育中の雌蛹の卵巣に作用する（Homma et al., 2006）。休眠ホルモンのシグナルを雌蛹中期の発育卵母細胞が受容し，そのシグナルを受け取った卵が受精後の中胚葉形成完了期に達すると休眠を開始する。休眠ホルモンが卵母細胞の細胞膜上に発現する休眠ホルモン受容体に作用すると，卵内にグリコーゲンが蓄積する。休眠ホルモンが作用しない非休眠卵と比較すると，グリコーゲン量は休眠卵において約 1.5 倍となっている。同時にトリプトファン代謝物である 3-ヒドロキシキヌレニン（3-OHK）が血液から卵母細胞に取り込まれる（Sonobe and Ohnishi, 1970）。この 3-OHK は，産卵・受精後の発生に伴い，茶褐色のオモクローム色素に変換され，漿膜細胞内に色素顆粒として蓄積する（Fig. 3）。また，休眠卵に取り込まれたグリコーゲンは，糖アルコールであるソルビトールとグリセロールに変換され蓄積する。その後，5℃シグナルによりソルビトール脱水素酵素（SDH）が活性化され，休眠覚醒後の胚発生の再開とともにソルビトールからグリコーゲンへの変換が行われる。非休眠卵においては，ソルビトールやグリセロールの蓄積はみられないため，これらは休眠卵に特有な物質であるといえる。

カイコガの休眠に関しては，これまでに多くの研究が行われ，様々な報告がされてきた。BAG タンパク質ファミリーに属し，ssDNA 結合モチーフを有する *Samui* タンパク質が 5℃シグナルによって発現上昇され，Hsp70 タンパク質と結合し相互作用を行う。また，*Samui* タンパク質は SDH 発現のための 5℃シグナルを伝達していると提唱されている（Moribe et al., 2001）。カイコガにおいて，母親の卵巣で合成されたエクジステロイドリン酸抱合体は卵黄

タンパク質の一種であるビテリンと結合して卵に移行される。産卵後にこのエクジステロイドリン酸抱合体はビテリンから遊離し、脱リン酸化されてエクジステロイドとなり、胚子発生の調節因子として機能している (Sonobe and Yamada, 2004)。カイコガ卵の卵黄顆粒に存在するカイコシステインプロテアーゼ (BCP) は、胚子発生に伴う卵黄顆粒の酸性化によって活性化される (Yamahama et al., 2003)。DEAD ボックスと相同性をもつ RNA ヘリカーゼ様遺伝子は、塩酸によって人工的に休眠を阻害する浸酸処理を行った卵においてその遺伝子発現の上昇が確認され、非休眠卵において胚盤葉の核および卵黄細胞の核と細胞質に局在することが示された (Sawada et al., 2006)。カイコガ卵の卵黄細胞の核周辺に局在しているプロテインキナーゼ CK2 は、産卵後 12~24 時間においてその活性上昇がみられ、休眠移行に関与している可能性が示唆された (Yamamoto et al., 2005; Yamamoto and Sawada, 2008; Sawada et al., 2012)。このように、カイコガの休眠現象について様々な報告がなされているが、その詳細な分子メカニズムについては未だに明らかにされていない。



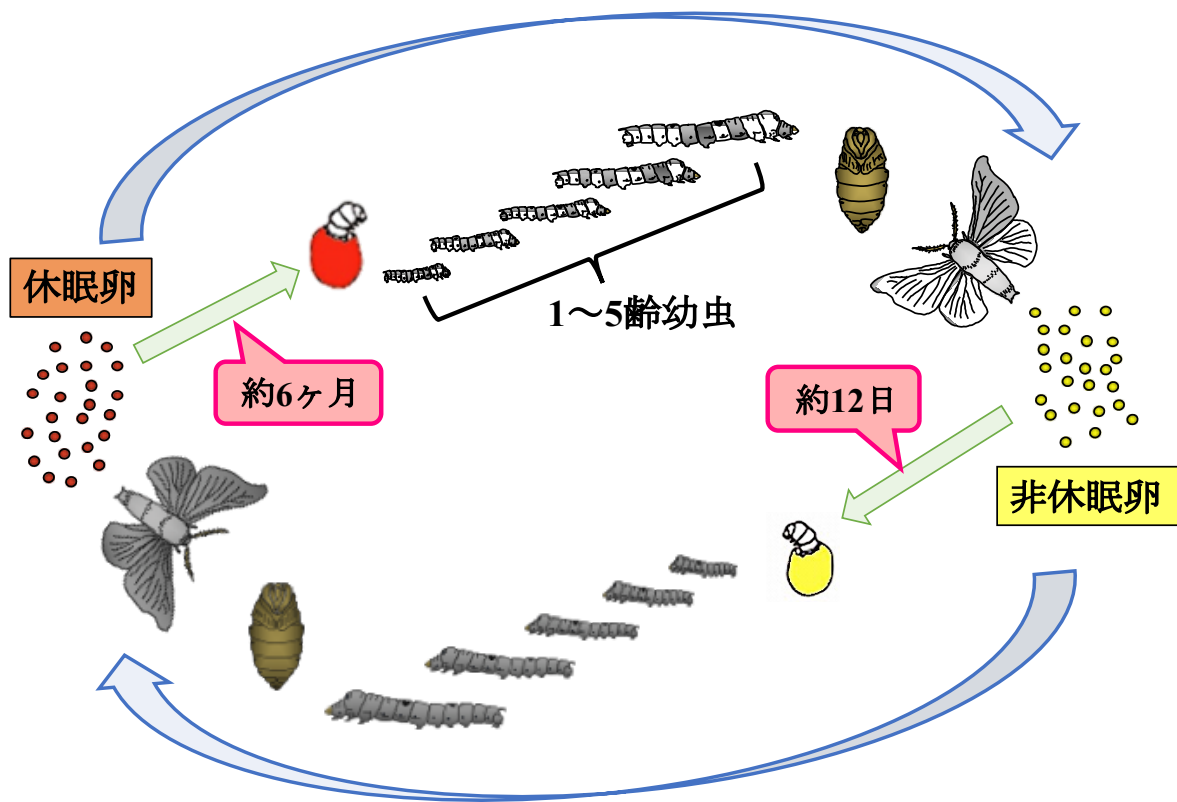


Fig. 1. 二化性系統のカイコガにおける生活史

カイコガの休眠卵は約6ヶ月間休眠を行い、孵化する。孵化した幼虫は4回脱皮を行い1～5齢の幼虫期をおよそ25日間過ごす。5齢幼虫はおよそ3日間かけて営繭し、繭の中で最終脱皮を行い蛹になる。蛹はおよそ11日後に成虫となり繭から出てきて交尾を行う。この時メスが産んだ卵は非休眠卵であり、およそ12日後に孵化する。孵化後は同様に幼虫、蛹、成虫と成長し、交尾を行い、産卵する。この時産まれた卵は休眠卵となる。

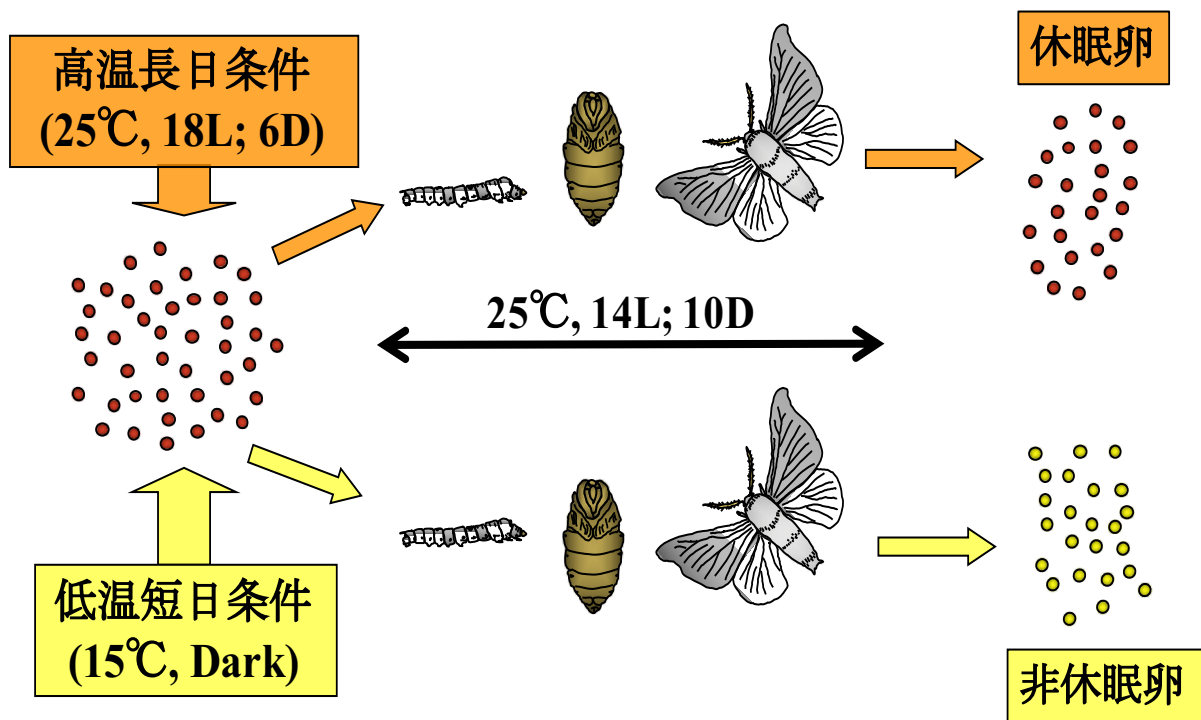


Fig. 2. 非休眠卵と休眠卵の産み分け

メス親が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が決定される。高温長日条件は、温度は 25°C，光周期を 18 時間明るく (Light)，6 時間暗く (Dark) する設定で胚発育をさせた場合であり、次世代は休眠卵となる。一方、低温短日条件は、温度は 15°C，光周期は 24 時間暗くする設定で胚発育をさせた場合であり、次世代は非休眠卵となる。卵から幼虫が孵化した後は、温度は 25°C，光周期は 14 時間明条件下，10 時間暗条件下で飼育した。

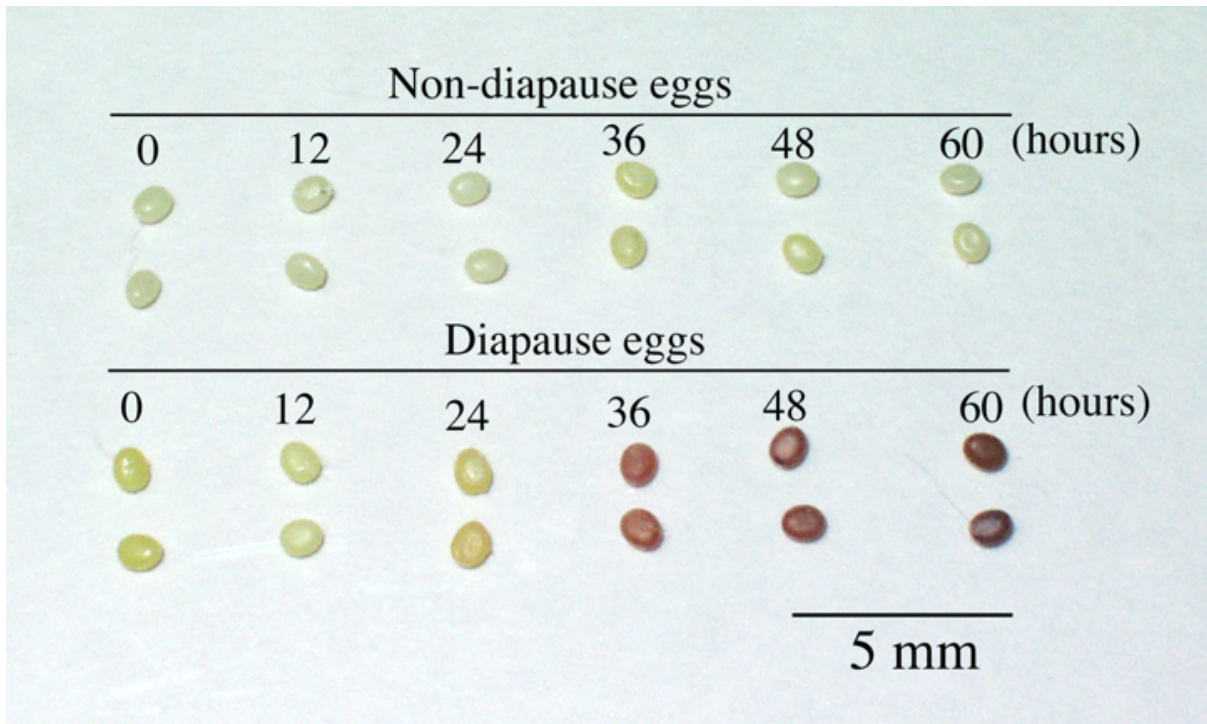


Fig. 3. 非休眠卵と休眠卵の時間経過による着色の違い

上段は非休眠卵，下段は休眠卵であり，25℃において発生を進めた卵である。卵の上に表示する数字は産卵後の経過時間である。スケールバーは5 mmを表す。

### 1-3 昆虫における人工孵化法について

卵で休眠する昆虫を人工的に非休眠化させる方法を人工孵化と呼び、さまざまな昆虫において報告されている。例えばウリハムシモドキ (*Atrachya menestriesi*) である。ウリハムシモドキはダイズやクローバー、レタスなどを食べる害虫である。ウリハムシモドキは卵で休眠を行う昆虫であるが、水銀化合物によって人工的に孵化させることができる (Kurihara and Ando, 1969)。また、ヤマユガにおいても人工孵化法が存在する。すでに記述したように、ヤマユガは卵の中の前幼虫で休眠を行う。この休眠に入ったヤマユガの卵にアセトンで溶解したイミダゾール化合物を塗布すると 10 日以内に幼虫が孵化する (Suzuki et al., 1990; Yang et al., 2004)。

カイコガにおいては、いくつかの人工孵化法が報告されている。その一つが浸酸処理法である。浸酸処理法は約 150 年前にイタリアで発見された。日本の養蚕業において使用され始めたのは約 80 年前である。通常、カイコガの休眠卵が孵化するまでには、2 ヶ月以上の低温状態 (5°C 程度) を経験する必要がある、およそ 6 ヶ月かかる。しかし、休眠卵を塩酸で処理することにより、非休眠卵と同様およそ 12 日間で孵化させることができる (Fig. 4)。そのため浸酸処理法を用いることで、1 年に 4, 5 回カイコガを飼育することが可能となり、絹糸の原料である繭を生産することができるようになった。浸酸処理法には即浸法と冷浸法がある。冷浸法とは冷蔵浸酸法のこと、休眠卵を産卵後 40~50 時間目に 5°C に 40 日間ほど冷蔵し、比重 1.100 の塩酸を用いて 48°C で 4~7 分間処理する方法である。一方、即浸法とは即時浸酸法のことであり、即浸法には常温浸酸法と加温浸酸法がある。常温浸酸法では産卵後 15~20 時間の休眠卵を比重 1.100 の塩酸を用いて 25°C で 60 分、もしくは 30°C で 50 分間処理する方法である。加温浸酸法は産卵後 20 時間の休眠卵を比重 1.075 の塩酸に 46°C で 4~7 分浸漬し処理する方法である。産卵後孵化予定日などに合わせて浸酸処理法を選択する必要がある (Tsurumaru et al., 2010; Kitta et al., 2015)。

カイコガにおける人工孵化法には、ジメチルスルホキシド (DMSO) 処理法も報告されている (Yamamoto et al., 2013)。産卵後 24 時間目までの休眠卵を 100% DMSO に 45 分間浸漬することで、人工的に休眠卵を孵化させることができる。しかし、浸酸処理法と大きく異なる点として、DMSO 処理法は産卵後 24 時間目までの休眠卵でしか効果を発揮しないことが挙げられる。Fig. 2 のように、休眠卵において約 30 時間後から漿膜細胞に色素顆粒が蓄積することにより、茶褐色に色付く。この頃を境に DMSO 処理法の効果は失われる。産卵後 24 時間目までの休眠卵においては、浸酸処理法と同等の効果を発揮することが認められている。

浸酸処理法によって人工的に休眠卵を孵化させる分子メカニズムについてはこれまでにいくつかの報告がある。X線マイクロアナライザーを用いた解析の結果、浸酸処理によって卵殻のカルシウム (Ca) が減少することと、卵殻の内側に塩素イオン (Cl<sup>-</sup>) が透過していることが認められ、この結果から浸酸処理によってカルシウムイオン (Ca<sup>2+</sup>) が卵殻より溶け出し、それが卵内へ移行することで休眠が阻害されると考察されている (Yoshimi et al., 1985, 1986, 1990)。また、浸酸処理によって 8 kDa と 11 kDa の低分子タンパク質が卵殻から消失することが Tsurumaru らによって報告された (Tsurumaru et al., 2010)。しかし、未だに浸酸処理法や DMSO 処理法を用いた人工孵化による休眠阻害の分子メカニズムの詳細は明らかにされていない。

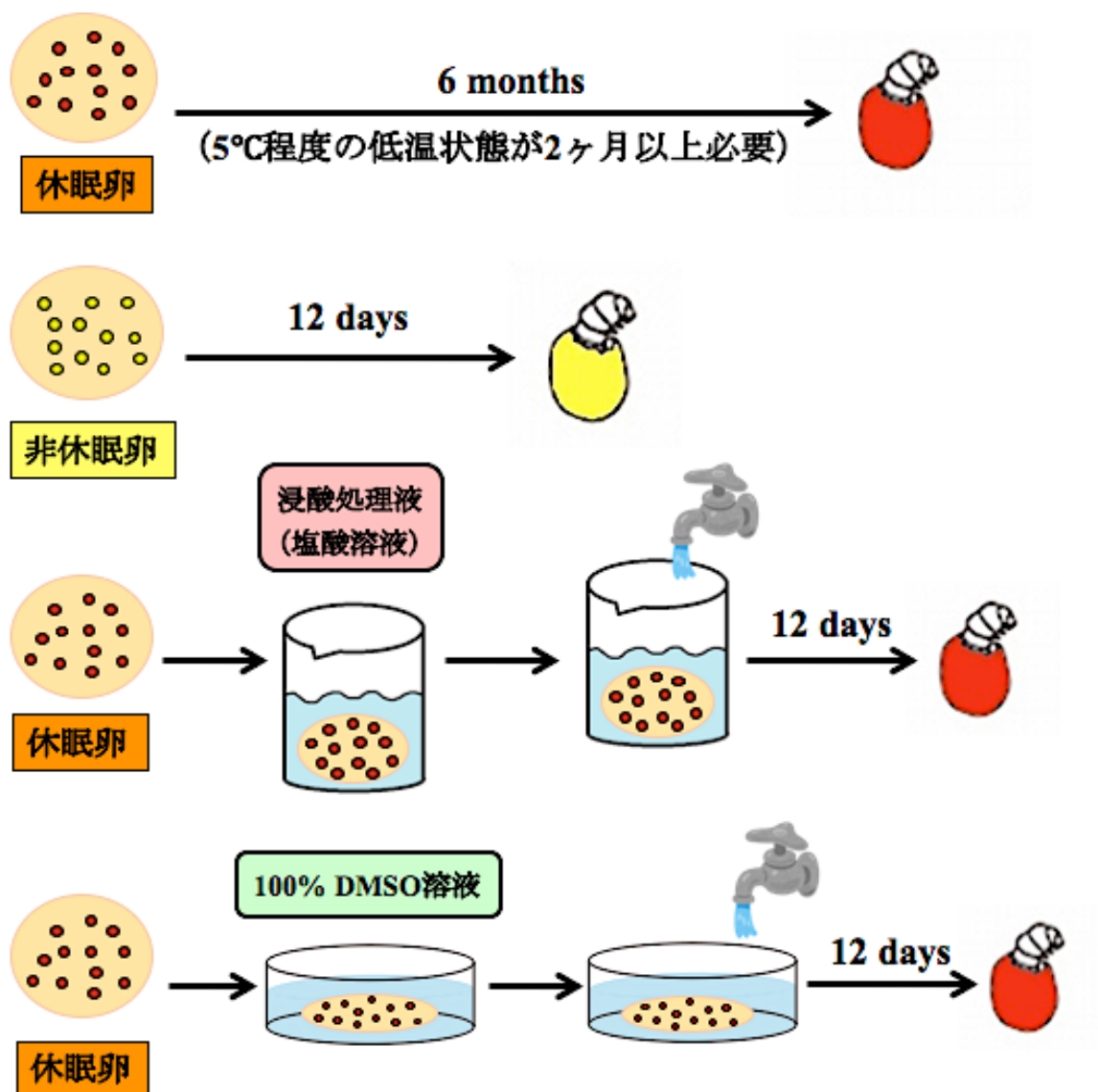


Fig. 4. 人工孵化によるカイコガ卵の孵化までの日数

カイコガ休眠卵・非休眠卵・浸酸処理卵・DMSO 処理卵における孵化までの日数を示す。通常、休眠卵が孵化するまでにはおよそ6ヶ月を要するが、浸酸処理もしくはDMSO 処理を行うことで非休眠卵と同様におよそ12日で孵化させることができる。

## 1-4 本研究について

本研究では、人工孵化時における胚子発生再開の分子メカニズムの解明をカルシウムに着目して試みた。カルシウムは、カイコガ卵の卵殻では殻の強度を保つ役割を担っており、卵内においては様々な反応のセカンドメッセンジャーとして機能していると考えられている。まず第2章では、カイコガ浸酸処理卵、DMSO処理卵、休眠卵、非休眠卵の卵殻および卵の中身における $\text{Ca}^{2+}$ の定量を行った。そして第3章では活性化に $\text{Ca}^{2+}$ が必須な分子であり、細胞内シグナル伝達に関与している一酸化窒素を合成する酵素である一酸化窒素合成酵素(NOS)の遺伝子発現解析および酵素活性測定を行った。さらに、カイコガ卵における局在を調べるために免疫組織化学も行った。第4章では、ミトコンドリアにおいて代謝物や核酸、補因子などの輸送に関与しているミトコンドリア $\text{Ca}^{2+}$ 依存的溶質輸送体(MCSC)の生化学的解析として、まず浸酸処理卵の各発生段階におけるカイコガのMCSC(*BmMCSC*)の発現解析を行った。さらに、大腸菌発現系で作製したリコンビナント*BmMCSC*(*rBmMCSC*)を用いて $\text{Ca}^{2+}$ との結合能に関する機能解析を行い、抗*BmMCSC*抗血清を用いて免疫組織化学を行い、カイコガ卵における*BmMCSC*の分布と局在を調べた。これらの結果をもとに、人工孵化時におけるカルシウムの役割に関して考察を行った。

## 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

### 2-1 序論

カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) はシグナル伝達においてセカンドメッセンジャーとして重要な役割を果たしているが、細胞質内ではきわめて低い濃度が維持されている。これは、細胞質内の  $\text{Ca}^{2+}$  を細胞膜を通して細胞外に積極的に送り出す能動輸送という機構と、 $\text{Ca}^{2+}$  を細胞内の小胞体に能動輸送して貯蔵する機構が存在するからである。また一部のカルシウムはイオンの状態ではなくタンパク質と結合した状態で細胞質中に存在している。さらに、細胞質にあるタンパク質の中にはその機能発現に  $\text{Ca}^{2+}$  を必要とするものがある。

カイコガの卵休眠を人工的に阻害する方法（人工孵化法）として、浸酸処理法と DMSO 処理法が知られている。特に、浸酸処理法は日本の養蚕業において約 80 年ほど前から使用されている。しかし、浸酸処理法および DMSO 処理法によって休眠移行が阻害される分子メカニズムは未だに明らかにされていない。浸酸処理の分子メカニズムに関しては、いくつかの仮説が提唱されている（Sonobe et al., 1979; Sonobe and Nakamura, 1991; Yoshimi et al., 1990; Tsurumaru et al., 2010）。その中の一つに、休眠卵の浸酸処理と  $\text{Ca}^{2+}$  との関係について記述されているものがある（Yoshimi et al., 1990; Xian et al., 1997）。Yoshimi らは、浸酸処理によって卵殻から  $\text{Ca}^{2+}$  が減少することを X 線マイクロアナライザーを用いた実験から報告している。更にその実験から、卵殻より減少した  $\text{Ca}^{2+}$  は卵内へ移行しているのではないかと考察していた。しかし、浸酸処理による卵殻と卵内の  $\text{Ca}^{2+}$  の詳細な定量は行っていなかった。

そこで本実験は、人工孵化法による休眠阻害と  $\text{Ca}^{2+}$  の関係を明らかにするために、浸酸処理卵および DMSO 処理卵の卵殻および卵内の  $\text{Ca}^{2+}$  および  $\text{Mg}^{2+}$  の定量を高周波誘導結合プラズマ発光分光分析法（ICP-AES）を用いて行った。また、休眠卵と非休眠卵の胚子発生に伴う  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の定量解析も行った。

### 2-2 材料と方法

#### 2-2-1 実験材料

本実験で用いたカイコガは、二化性系統の大造（松村）である。休眠卵や非休眠卵、および浸酸処理（48 時間後の休眠卵）に使用した休眠卵を産んだカイコガの幼虫は桑の葉を餌として飼育し、浸酸処理（17 日後の休眠卵）および DMSO 処理に使用した休眠卵を産んだカイコガの幼虫は、人工飼料のシルクメイト（日本農産工業、日本）を使用して飼育した。遺伝



的背景の揃ったカイコガの卵を高温長日条件下（25℃，18 時間明期：6 時間暗期）および低温短日条件下（15℃，24 時間暗期）で胚発育させることで，人工的に休眠卵もしくは非休眠卵を産卵する個体を得た。また休眠卵と非休眠卵のサンプリングは，産卵直後から 12 時間ごとに 60 時間目までサンプリングし，材料とした。

## 2-2-2 カイコガ休眠卵の浸酸処理および DMSO 処理

浸酸処理に使用した休眠卵は，産卵後 48 時間目までは 25℃でインキュベートし，その後 4℃で 6 日間インキュベートした卵である。まず，2%ホルマリン溶液に 2 時間浸し，風乾した。その後，48℃に加温した塩酸（比重 1.110）に 6 時間浸し，流水で 20 時間洗い，風乾した。また，これらを処理後 12 時間ごとに 0～48 時間までサンプリングした。

DMSO 処理には，産卵後 12 時間の休眠卵を使用した。100% DMSO 溶液（和光純薬工業，日本）に浸し，直ちにキムタオル上で 30 時間放置した。その後，流水で 10 時間洗い，風乾した。乾いた後はすぐに-80℃に保存した。

## 2-2-3 ICP-AES を用いたカイコガ卵における $\text{Ca}^{2+}$ ， $\text{Mg}^{2+}$ の定量

### 2-2-3-1 カイコガ卵の解剖

-80℃で保存していた各カイコガ卵を使用した。休眠卵，非休眠卵は産卵後 0 時間および 48 時間の卵を使用し，浸酸処理卵および DMSO 処理卵は処理後 0 時間の卵を使用した。また，浸酸処理卵と DMSO 処理卵のコントロールとして，塩酸および DMSO の代わりに超純水を使用し，同様の処理を行った卵を使用した。

ICP-AES を用いたカイコガ卵における金属元素の定量実験のサンプル調製については，まず実体顕微鏡の下，超純水を入れたシャーレ中で卵を卵殻と卵の中身に分けた（Fig. 5A）。卵殻はもう一度超純水を入れたシャーレ中で洗い，ろ紙上で乾燥させた。乾燥させた卵殻はピンセットで丁寧に酸加水分解用ガラス製ビーカーに移し，卵殻サンプルとした（Fig. 5A-卵殻）。超純水中の卵の中身は，超純水ごと酸加水分解用ガラス製ビーカーに移し，シャーレも数回超純水で洗浄し，ビーカーへ移した。また，卵殻を洗浄した超純水も中身のサンプルとした（Fig. 5A-中身）。全卵は，そのまま酸加水分解用ガラス製ビーカーに入れ，サンプルとした。一回の測定にはそれぞれ 100 粒を使用した。

### 2-2-3-2 サンプルの酸加水分解と ICP-AES による測定

酸加水分解に用いた試薬類はすべて和光純薬工業社（日本）の特級を使用した。

各サンプルの入った酸加水分解用ガラス製ビーカーに王水（硝酸：塩酸 = 1：3）を加え、160°Cで45分加熱濃縮させた。その後、少量の硝酸と過塩素酸混合液（硝酸：過塩素酸 = 1：2）を加え、180°Cで45分加熱濃縮した。最後に少量の硝酸と過塩素酸混合液（硝酸：過塩素酸 = 2：1）を加え、再び180°Cで45分加熱濃縮し、完全にサンプルを可溶化した。このとき、サンプルに含まれるすべての  $\text{Ca}^{2+}$  および  $\text{Mg}^{2+}$  はイオン化されている。酸加水分解したサンプルは超純水に溶解し、高周波誘導結合プラズマ発光分光分析装置である ICP-AES (ICPS-7000 ver.2, SHIMADZU, 日本) を用いて  $\text{Ca}^{2+}$  および  $\text{Mg}^{2+}$  の定量を行った (Fig. 5B)。

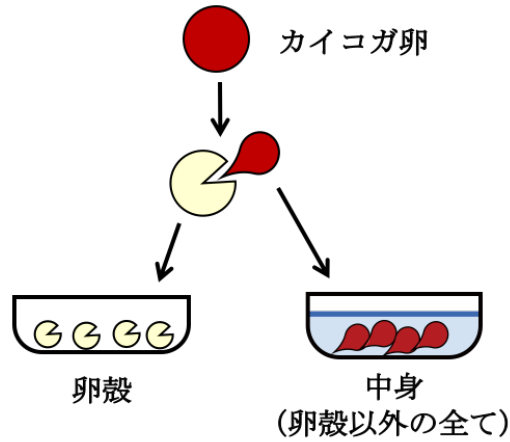
本実験において  $\text{Mg}^{2+}$  は、 $\text{Ca}^{2+}$  量の変動が  $\text{Ca}^{2+}$  に特異的な現象かどうかを検討するためのコントロールである。

### 2-2-3-3 データ処理

$\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  の定量は、同時に1回の測定で検出でき、その1回の測定には100粒を使用した。標準誤差 (S.E.) は、独立した3回の測定より算出し、グラフのエラーバーとして示した。

## サンプル調製

### (A) 解剖



### (B) 酸加水分解

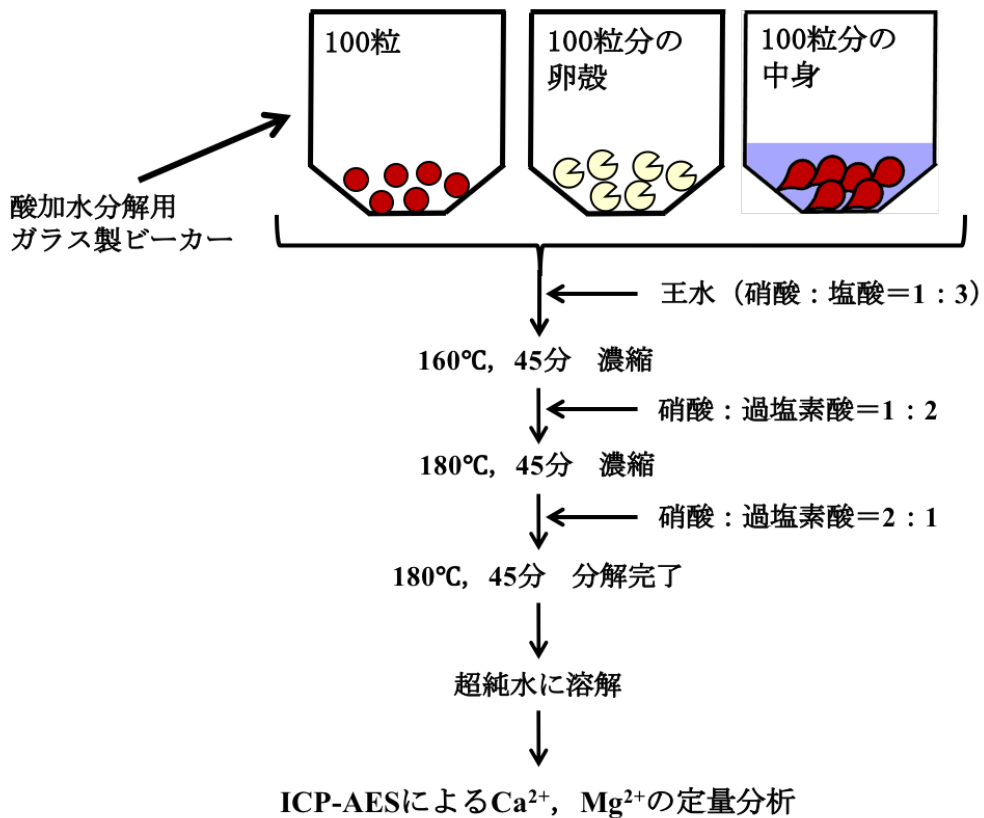


Fig. 5. ICP-AES による金属元素の定量解析サンプルの調製についての概略

(A) 解剖に関しては、2-2-3-1 を参照。(B) 酸加水分解については、2-2-3-2 を参照。

## 2-2-4 <sup>45</sup>Ca を用いた Ca<sup>2+</sup>結合性タンパク質の検出

### 2-2-4-1 サンプル調製

産卵後 48 時間の休眠卵を超純水で処理した卵 (Cont.) と処理後 0 時間の浸酸処理卵 (AT-0) をそれぞれ 25 粒ずつ用意し、解剖した。解剖して得た卵殻を超純水の入った 1.5 ml チューブに入れ、超純水と等量の 2×SDS-Sample buffer (ナカライテスク, 日本) を加え、5 分加熱した。その後、尿素 (ナカライテスク, 日本) を 0.37 g 加え攪拌した。この段階で卵殻、尿素ともに溶解していなかったため、42°C で 20 分加温し、これをホモジナイズした。その後、60°C で 10 分加温し、10 分間攪拌後、この上清をサンプルとして用いた。

卵殻から抽出したタンパク質濃度を 2D-Quant Kit (GE Healthcare, USA) を用いて測定し、AT-Cont および AT-0 サンプルのタンパク質濃度を算出した。

### 2-2-4-2 SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) および CBB 染色

Laemmli 法 (Laemmli, 1970) に従って、20% SDS-PAGE を running buffer (192 mM Glycine, 25 mM Tris, 0.1% SDS) を使用して行い、タンパク質を分離した。タンパク質の有無を確認するために、泳動後のゲルを Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250 (Sigma-Aldrich, USA) を用いて染色した。0.25% CBB 溶液 (エタノール : 酢酸 : 純水 = 9 : 2 : 9) に stacking gel を取り除いたゲルを浸し、1 時間ほどシェイカーにて振盪した。その後、脱色液 (メタノール : 酢酸 : 純水 = 25 : 8 : 65) にて一晩振盪した。脱色したゲルは純水で洗浄し、ポリアクリルアミドゲル乾燥キット (TEFCO, 日本) を用いて乾燥させた。

### 2-2-4-3 セミドライブロットティング

CBB 染色とは別に、<sup>45</sup>Ca と反応させるためにセミドライブロットティングを行った。ブロットティング溶液 A (0.3 M Tris, 10% メタノール, 0.03% SDS), ブロットティング溶液 B (25 mM Tris, 10% メタノール, 0.03% SDS), ブロットティング溶液 C (25 mM Tris, 10% メタノール, 0.03% SDS, 40 mM 6-aminohexanoic acid) の各溶液にセミドライブロットティング用ろ紙 (ATTO, 日本) を浸した。PVDF 膜 (GE Healthcare, USA) は、一度 100% メタノールに浸してから、ブロットティング溶液 B に浸し、前処理を行った。泳動終了後、stacking gel を取り除いたゲルを B 液に浸した。セミドライ式ブロットティング装置 (ATTO, 日本) の下部電極に A 液をかけ十分に湿らせ、A 液に浸しておいたろ紙を重ねておいた。その上に、B 液に浸したろ紙、

PVDF 膜の順に重ね、ゲルを重ねた。その上に C 液に浸しておいたろ紙を重ねた。上部電極を下げ、90 mA で 90 分間ブロッキングを行った。

#### 2-2-4-4 オートラジオグラフィーによる $^{45}\text{Ca}$ 結合性タンパク質の検出

本方法は、GÜLTEKIN and HEERMANN の方法を少し改変し行った (GÜLTEKIN and HEERMANN, 1988)。

ブロッキング後の PVDF 膜を Ca-Binding buffer (10 mM Imidazole-HCl (pH 6.8), 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 60 mM KCl) で 3 回洗浄し、ハイブリバック (コスモ・バイオ, 日本) に少量の Ca-Binding buffer とともに入れ、シールした。シールした PVDF 膜を RI 実験施設にて 3.7 MBq  $^{45}\text{CaCl}_2$  (PerkinElmer, USA) と反応させた。PVDF 膜のプロット面を内側にして、3.7 MBq  $^{45}\text{CaCl}_2$  in Ca-Binding buffer 10 ml が入ったハイブリダイゼーション用ボトルに入れ、25°C で 20 分間インキュベートした。その後、純水および 96% エタノールで洗浄し、X 線フィルム (FUJIFILM, 日本) に 10 日間露光し、 $^{45}\text{Ca}$  シグナルを可視化した。

## 2-3 結果

### 2-3-1 浸酸処理に伴う $\text{Ca}^{2+}$ 量および $\text{Mg}^{2+}$ 量の変動

人工孵化法である浸酸処理による休眠障害のメカニズムを解明するために、ICP-AES を用いて卵殻と卵の中身における  $\text{Ca}^{2+}$ および  $\text{Mg}^{2+}$ の定量分析を行った。本実験における  $\text{Mg}^{2+}$ の定量分析は、 $\text{Ca}^{2+}$ のコントロール実験として行った。今回の実験における浸酸処理卵の孵化率は、約 89%であった。孵化率は処理後 2 週間以内に孵化してきた幼虫数より算出した。産卵後 48 時間の休眠卵の浸酸処理に伴う  $\text{Ca}^{2+}$ 量および  $\text{Mg}^{2+}$ 量の変動を Fig. 6 に示した。Fig. 6 より、超純水で処理した休眠卵の卵殻の  $\text{Ca}^{2+}$ 量は  $19.2 \pm 1.25 \mu\text{g}/100$  粒であり、卵の中身の  $\text{Ca}^{2+}$ 量は  $39.3 \pm 1.61 \mu\text{g}/100$  粒であった。これに対し、浸酸処理卵の卵殻の  $\text{Ca}^{2+}$ 量は  $1.85 \pm 0.40 \mu\text{g}/100$  粒であり、卵の中身の  $\text{Ca}^{2+}$ 量は  $6.50 \pm 0.76 \mu\text{g}/100$  粒であった。

次に、産卵後 17 日目の休眠卵の浸酸処理に伴う  $\text{Ca}^{2+}$ 量および  $\text{Mg}^{2+}$ 量変動を Fig. 7 に示した。この時期の休眠卵に浸酸処理を行っても、休眠障害への影響がないことはすでに報告されている (Tsurumaru et al., 2010)。本実験においても処理後 2 週間以内に孵化してきた個体はいなかった。Fig. 7 より、超純水で処理した休眠卵の卵殻の  $\text{Ca}^{2+}$ 量は  $30.2 \pm 0.66 \mu\text{g}/100$  粒であり、卵の中身の  $\text{Ca}^{2+}$ 量は  $47.9 \pm 4.31 \mu\text{g}/100$  粒であった。これに対し、浸酸処理卵の卵殻における  $\text{Ca}^{2+}$ 量は  $6.42 \pm 2.04 \mu\text{g}/100$  粒であり、卵の中身の  $\text{Ca}^{2+}$ 量は  $12.2 \pm 1.92 \mu\text{g}/100$  粒であった。

産卵後 48 時間および産卵後 17 日目の休眠卵を浸酸処理した場合の卵殻と卵の中身どちらにおいても、 $\text{Mg}^{2+}$ 量に変動はなかった (Fig. 6, 7)。

### 2-3-2 浸酸処理に用いた塩酸溶液の $\text{Ca}^{2+}$ 量および $\text{Mg}^{2+}$ 量の変動

浸酸処理に伴ってカイコガ休眠卵より減少した  $\text{Ca}^{2+}$ が卵外へ流出しているのかを確認するために、浸酸処理に用いた浸酸処理液の  $\text{Ca}^{2+}$ 量および  $\text{Mg}^{2+}$ 量の測定も行った。その結果を Fig. 8 に示した。 $\text{H}_2\text{O}$  は、塩酸の代わりに超純水を用いて同様の操作を行ったものである (2-2-3-1 参照)。 $\text{H}_2\text{O}$  の  $\text{Ca}^{2+}$ 量は  $2.25 \pm 0.31 \mu\text{g}/100$  粒であり、 $\text{HCl}$  における  $\text{Ca}^{2+}$ 量は  $16.5 \pm 1.58 \mu\text{g}/100$  粒であった。一方、 $\text{Mg}^{2+}$ 量は  $\text{H}_2\text{O}$  および  $\text{HCl}$  のどちらにおいても極微量であった。

### 2-3-3 $^{45}\text{Ca}$ を用いた $\text{Ca}^{2+}$ 結合性タンパク質の検出

浸酸処理によってカイコガ休眠卵より  $\text{Ca}^{2+}$ が卵外へ流出していることが確認された。このとき流出した  $\text{Ca}^{2+}$ が、タンパク質と結合した状態で流出しているのかを確認するために、 $^{45}\text{Ca}$

を用いたオートラジオグラフィを行った。タンパク質と結合した状態で  $\text{Ca}^{2+}$  が流出していた場合、浸酸処理したカイコガ休眠卵の卵殻における  $\text{Ca}^{2+}$  結合性タンパク質は減少することが予想された。

Fig. 9 において、青色の矢印で示したバンドが今回検出された  $\text{Ca}^{2+}$  結合性タンパク質である。Cont. と AT では  $\text{Ca}^{2+}$  結合性タンパク質の変動は確認されなかった。

#### 2-3-4 DMSO 処理に伴う $\text{Ca}^{2+}$ 量および $\text{Mg}^{2+}$ 量の変動

DMSO 処理によるカイコガの休眠移行阻害の効果は、浸酸処理と同等の効果を示す (Yamamoto et al., 2013)。そこで、浸酸処理後の  $\text{Ca}^{2+}$  量および  $\text{Mg}^{2+}$  量と比較するために、DMSO 処理卵を用いた  $\text{Ca}^{2+}$  および  $\text{Mg}^{2+}$  の定量解析を行った。その結果を Fig. 10 に示した。本実験の DMSO 処理による孵化率は約 81%であった。孵化率の算出方法は浸酸処理と同様である。Fig. 10 より、DMSO 処理も人工孵化法ではあるが、Cont. と DMSO において  $\text{Ca}^{2+}$  量および  $\text{Mg}^{2+}$  量の変動は確認されなかった。

#### 2-3-5 休眠卵・非休眠卵における胚子発生に伴う $\text{Ca}^{2+}$ 量および $\text{Mg}^{2+}$ 量の変動

カイコガの胚子発生に伴う  $\text{Ca}^{2+}$  量および  $\text{Mg}^{2+}$  量の変動を産卵後 0 時間と 48 時間の非休眠卵、休眠卵を用いて調べた。その結果を Fig. 11 に示した。Fig. 11 より、産卵後 0 時間の非休眠卵の  $\text{Ca}^{2+}$  量は  $15.4 \pm 0.75 \mu\text{g}/100$  粒であり、産卵後 48 時間の非休眠卵の  $\text{Ca}^{2+}$  量は  $15.7 \pm 0.56 \mu\text{g}/100$  粒であった。 $\text{Mg}^{2+}$  量は、産卵後 0 時間の非休眠卵で  $39.8 \pm 0.50 \mu\text{g}/100$  粒であり、産卵後 48 時間の非休眠卵で  $38.7 \pm 1.39 \mu\text{g}/100$  粒であった。一方、産卵後 0 時間の休眠卵の  $\text{Ca}^{2+}$  量は  $34.1 \pm 3.75 \mu\text{g}/100$  粒であり、産卵後 48 時間の休眠卵の  $\text{Ca}^{2+}$  量は  $41.7 \pm 2.16 \mu\text{g}/100$  粒であった。 $\text{Mg}^{2+}$  量は、産卵後 0 時間の休眠卵で  $34.6 \pm 0.27 \mu\text{g}/100$  粒であり、産卵後 48 時間の休眠卵で  $35.0 \pm 0.18 \mu\text{g}/100$  粒であった。

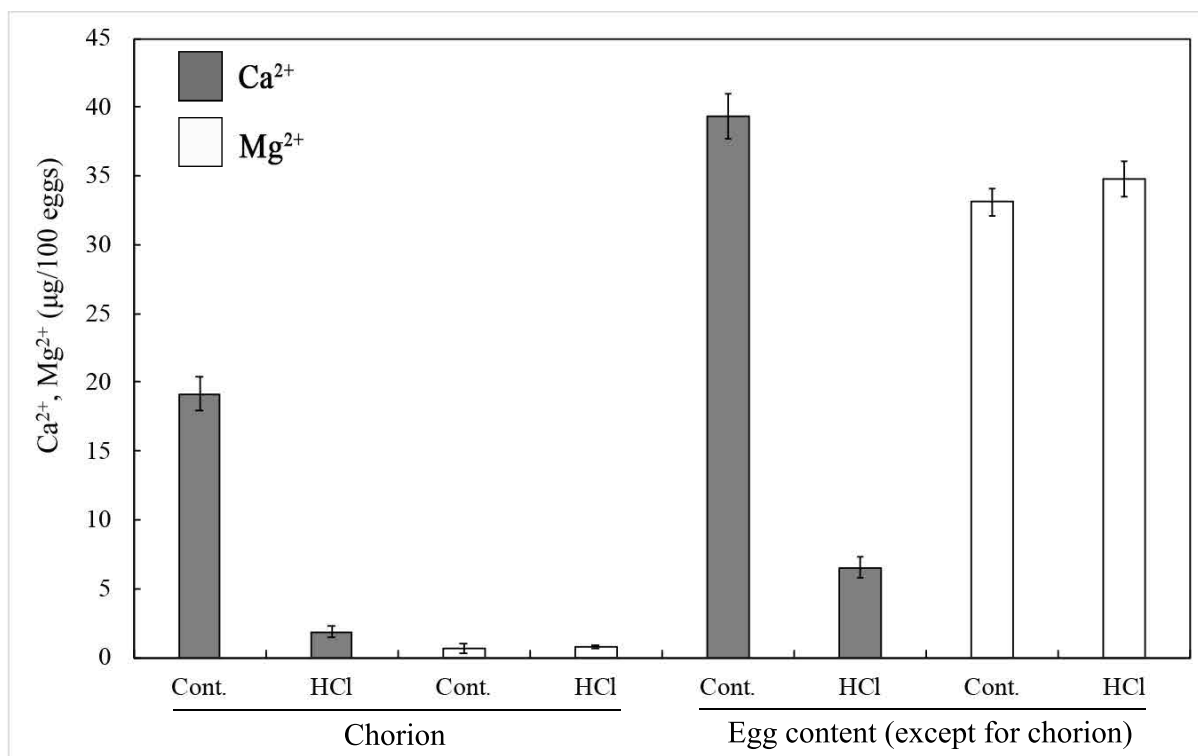


Fig. 6. 浸酸処理後の卵殻と卵の中身における Ca<sup>2+</sup>量, Mg<sup>2+</sup>量

産卵後 48 時間の休眠卵に対して超純水 (Cont. ) および塩酸 (HCl) で処理した卵殻および卵の中身の Ca<sup>2+</sup>量および Mg<sup>2+</sup>量を測定した。灰色のグラフは Ca<sup>2+</sup>量, 白色のグラフは Mg<sup>2+</sup>量を示している。エラーバーは標準誤差であり, 独立した 3 回の実験より算出した。



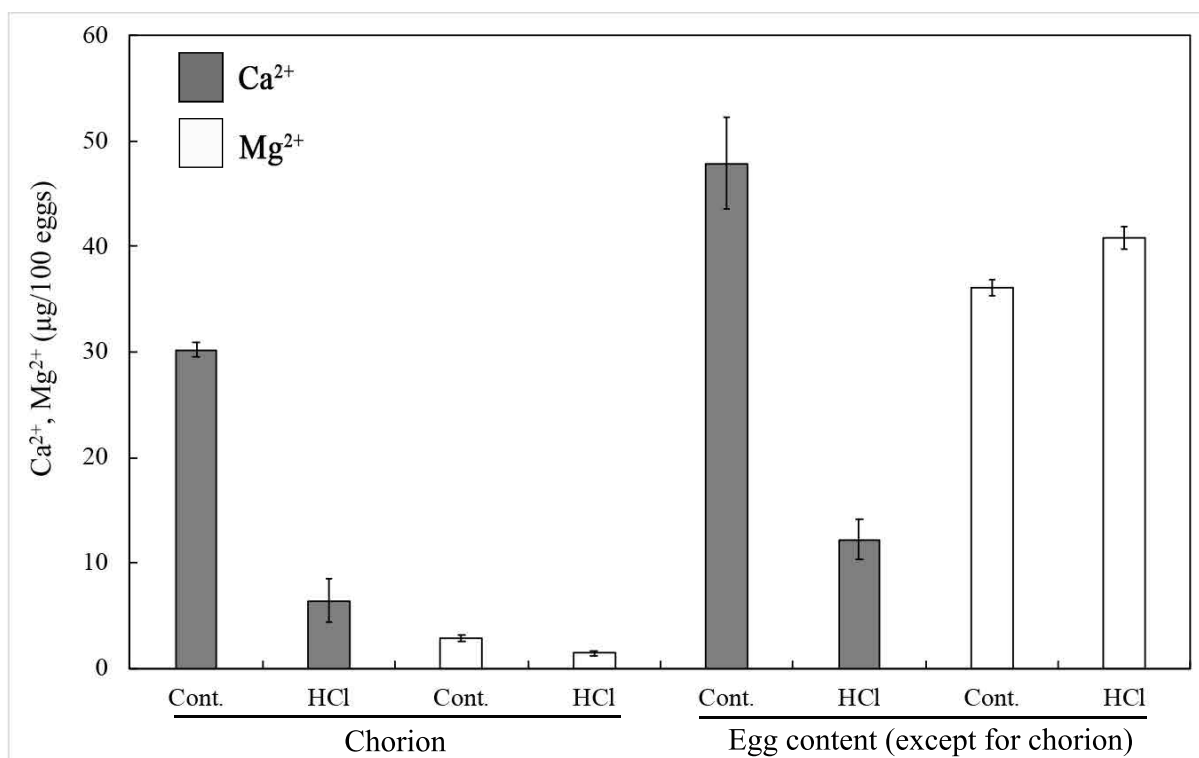


Fig. 7. 産卵後 17 日目の休眠卵を使用した浸酸処理後の卵殻と卵の中身における Ca<sup>2+</sup>量, Mg<sup>2+</sup>量

産卵後 17 日目の休眠卵に対して超純水 (Cont. ) および塩酸 (HCl) で処理した卵殻および卵の中身の Ca<sup>2+</sup>量および Mg<sup>2+</sup>量を測定した。灰色のグラフは Ca<sup>2+</sup>量, 白色のグラフは Mg<sup>2+</sup>量を示している。エラーバーは標準誤差であり, 独立した 3 回の実験より算出した。

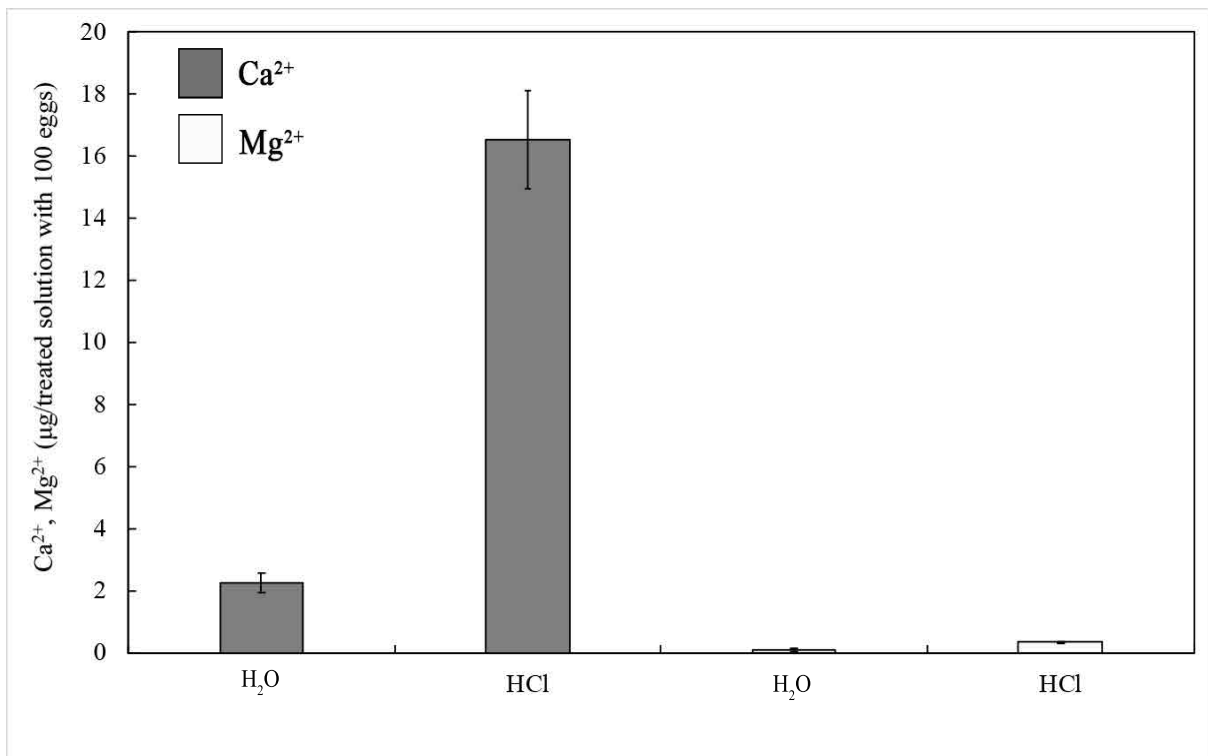


Fig. 8. 浸酸処理後の塩酸溶液における Ca<sup>2+</sup>量, Mg<sup>2+</sup>量

産卵後 48 時間の休眠卵を処理した超純水 (H<sub>2</sub>O) および塩酸溶液 (HCl) の Ca<sup>2+</sup>量および Mg<sup>2+</sup>量を測定した。灰色のグラフは Ca<sup>2+</sup>量, 白色のグラフは Mg<sup>2+</sup>量を示している。エラーバーは標準誤差であり, 独立した 3 回の実験より算出した。

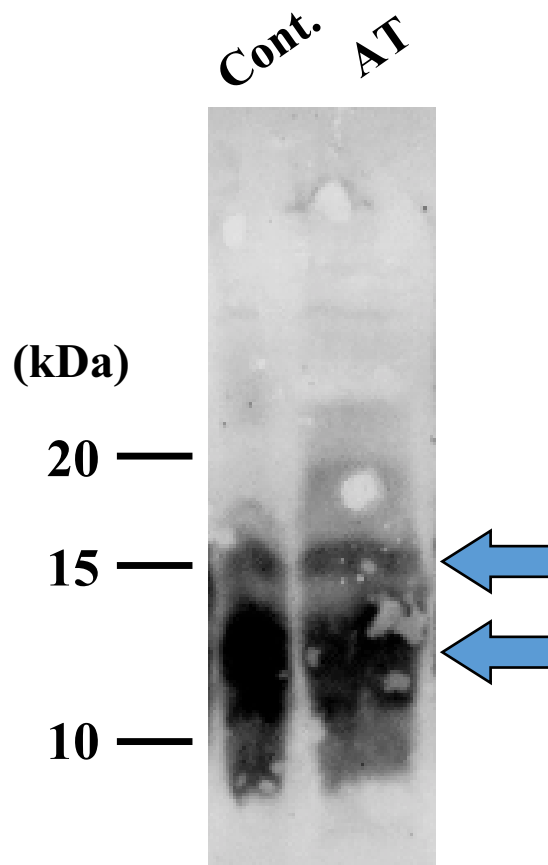


Fig. 9.  $^{45}\text{Ca}$  を用いた  $\text{Ca}^{2+}$  結合タンパク質の検出

Cont. : 産卵後 48 時間の休眠卵を超純水で処理した卵殻から抽出したタンパク質

AT : 産卵後 48 時間の休眠卵に浸酸処理を行った卵殻から抽出したタンパク質

卵殻からのタンパク質抽出については 2-2-4-1 に示した。各 Lane のタンパク質量は  $47.2 \mu\text{g}$  である。青い矢印は  $^{45}\text{Ca}$  と結合した  $\text{Ca}^{2+}$  結合タンパク質のバンドを示している。

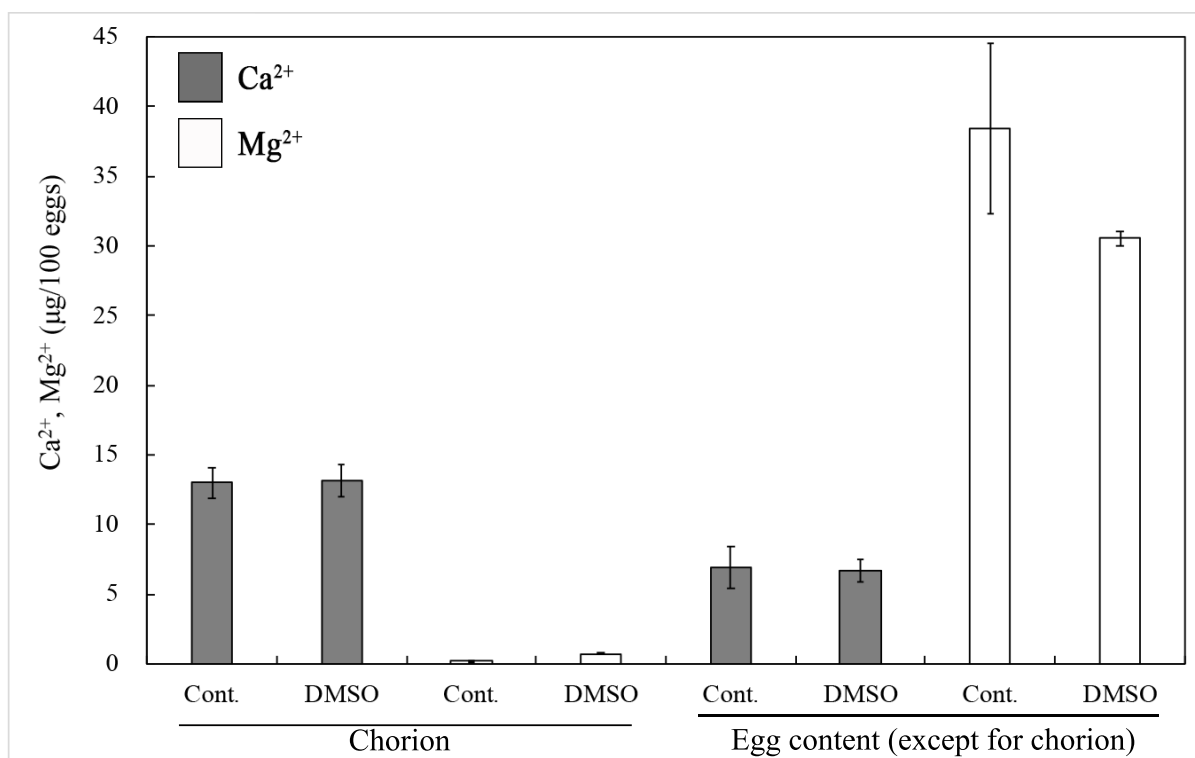


Fig. 10. DMSO 処理後の卵殻と卵の中身における Ca<sup>2+</sup>量, Mg<sup>2+</sup>量

産卵後 12 時間の休眠卵に対して超純水 (Cont. ) および DMSO で処理した卵殻および卵の中身の Ca<sup>2+</sup>量および Mg<sup>2+</sup>量を測定した。灰色のグラフは Ca<sup>2+</sup>量, 白色のグラフは Mg<sup>2+</sup>量を示している。エラーバーは標準誤差であり, 独立した 3 回の実験より算出した。

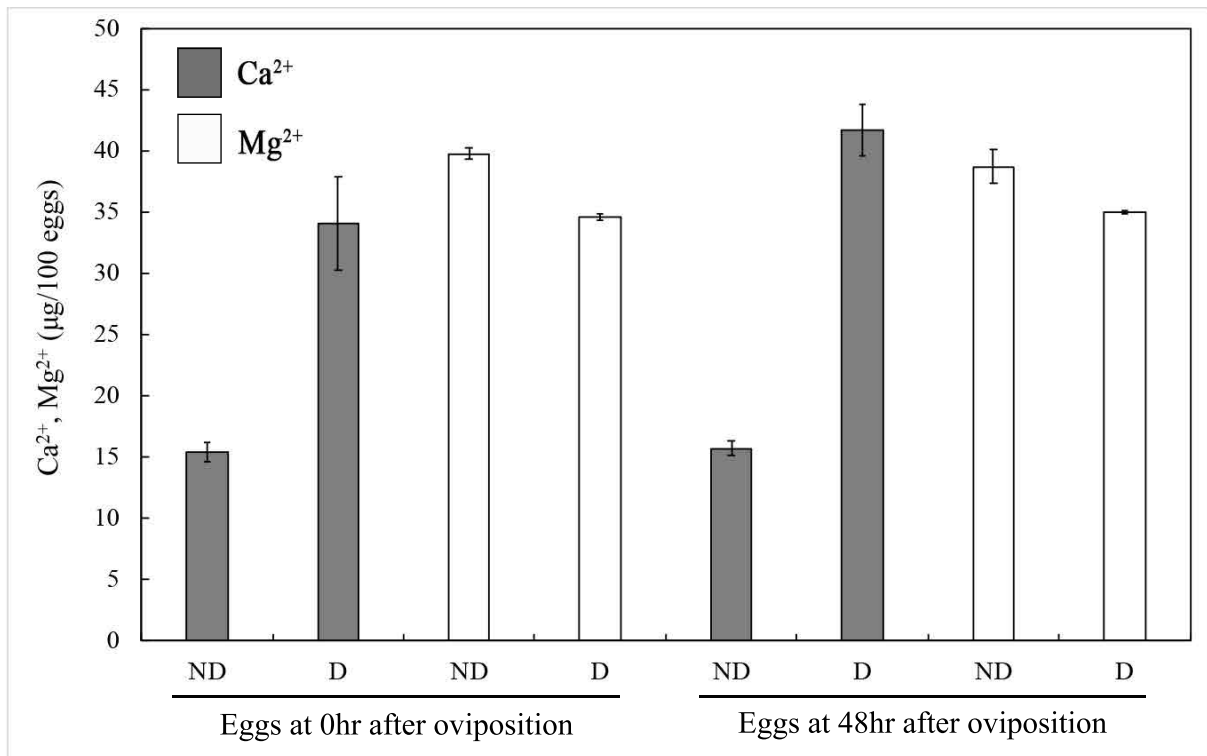


Fig. 11. 産卵後 0 時間と 48 時間の非休眠卵および休眠卵における Ca<sup>2+</sup>量, Mg<sup>2+</sup>量

産卵後 0 時間および 48 時間の非休眠卵 (ND) と休眠卵 (D) の Ca<sup>2+</sup>量および Mg<sup>2+</sup>量を測定した。灰色のグラフは Ca<sup>2+</sup>量, 白色のグラフは Mg<sup>2+</sup>量を示している。エラーバーは標準誤差であり, 独立した 3 回の実験より算出した。

## 2-4 考察

カイコガ休眠卵の卵殻から  $\text{Ca}^{2+}$  が流出することは、過去に報告がある (Yoshimi et al., 1990; Xian et al., 1997)。Yoshimi らは、浸酸処理によって卵殻の  $\text{Ca}^{2+}$  が卵内に移行するのではないかと示唆していた。しかし、これまでの研究において卵殻と卵の中身における詳細な  $\text{Ca}^{2+}$  の定量解析は行われてこなかった。

本実験において、ICP-AES を使用し  $\text{Ca}^{2+}$  量および  $\text{Mg}^{2+}$  量の測定を行った結果、浸酸処理によってカイコガ休眠卵の卵殻および卵の中身の両方で  $\text{Ca}^{2+}$  量は減少していた (Fig. 6)。卵殻および卵の中身の  $\text{Ca}^{2+}$  の総量を超純水で処理した休眠卵と浸酸処理卵で比較すると、およそ 7 分の 1 に減少していることがわかった。この現象はコントロールである  $\text{Mg}^{2+}$  では確認されなかったことから、 $\text{Ca}^{2+}$  に特異的な現象であるということがわかった。また産卵後 17 日目の休眠卵に対して浸酸処理を行った卵においても  $\text{Ca}^{2+}$  の総量はおよそ 5 分の 1 に減少していた (Fig. 7)。この時期の休眠卵に浸酸処理を行っても休眠が打破されないことはすでに報告されている (Tsurumaru et al., 2010)。これらの結果は、休眠移行期と休眠が深くなっている時期での  $\text{Ca}^{2+}$  量の減少の生理的な意義は異なっていることを示唆している。つまり、浸酸処理が効果を発揮できる卵のステージにおいてのみ、 $\text{Ca}^{2+}$  量の減少が休眠移行阻害に何らかの役割を担っていることが考えられる。

Fig. 6 で減少した  $\text{Ca}^{2+}$  が卵外へ流出していることを確認するために、浸酸処理後の塩酸溶液においても  $\text{Ca}^{2+}$  量および  $\text{Mg}^{2+}$  量の測定を行った。Fig. 8 よりコントロールである超純水に比べて、浸酸処理後の塩酸溶液では  $\text{Ca}^{2+}$  量はおよそ 7 倍に増加していた。このことから、浸酸処理によって卵殻および卵内において減少した  $\text{Ca}^{2+}$  は卵外へ流出していることが明らかになった。Fig. 6 で減少した  $\text{Ca}^{2+}$  量と Fig. 8 で増加した  $\text{Ca}^{2+}$  量が一致しなかった。これは、カイコガの幼虫を飼育する際に用いた餌が関与しているのではないかと推測される。Fig. 6 における浸酸処理卵の解析に使用した卵を産んだカイコガは桑の葉で飼育した。一方、Fig. 8 における浸酸外液の解析に使用した卵を産んだカイコガは人工飼料で飼育した。餌による  $\text{Ca}^{2+}$  量の取り込みの差が影響している可能性がある。また、同じ桑の葉でも採取した地域によって土壌などの関係で  $\text{Ca}^{2+}$  量が違う可能性も考えられる。しかし、浸酸処理によってカイコガ卵より  $\text{Ca}^{2+}$  が卵外へ流出することは明らかだといえる。

浸酸処理によって  $\text{Ca}^{2+}$  が卵外へ流出する際に、タンパク質と結合した状態で流出するのか、 $\text{Ca}^{2+}$  単体で流出しているのかを確認するために、卵殻における  $\text{Ca}^{2+}$  結合性タンパク質の変動を調べた (Fig. 9)。その結果、浸酸処理による  $\text{Ca}^{2+}$  結合性タンパク質の変動がみられなかった

ことから、少なくとも今回の方法で検出できた  $\text{Ca}^{2+}$ 結合性タンパク質は浸酸処理に伴い卵殻から流出しないことが確認された。したがって、浸酸処理によってカイコガ休眠卵から流出した  $\text{Ca}^{2+}$ は、沈着・結合型の  $\text{Ca}$  から遊離の  $\text{Ca}^{2+}$  となって卵外へ流出したことを強く示唆している。

もう一つの人工孵化法として知られている DMSO 処理を行ったカイコガ休眠卵においても同様に卵殻と卵の中身における  $\text{Ca}^{2+}$ 量および  $\text{Mg}^{2+}$ 量の定量解析を行った。その結果、 $\text{Ca}^{2+}$ 量および  $\text{Mg}^{2+}$ 量の変動は確認されなかった。DMSO 処理の効果は、産卵後 24 時間以内の休眠卵に限定され、その有効期間は浸酸処理と比べるとわずかに短い (Yamamoto et al., 2013)。このことから、浸酸処理法および DMSO 処理法のどちらもカイコガ休眠卵の休眠移行を阻害することができるが、そのメカニズムは異なるのではないかと推測される。

休眠卵と非休眠卵において  $\text{Ca}^{2+}$ 量および  $\text{Mg}^{2+}$ 量の比較を行ったところ、 $\text{Ca}^{2+}$ 量は休眠卵において非休眠卵より約 2.4 倍多いことが明らかになった。一方、 $\text{Mg}^{2+}$ 量は非休眠卵と比べて休眠卵においてわずかに少ないことがわかった。また、産卵後 0 時間の非休眠卵および休眠卵と、産卵後 48 時間の非休眠卵および休眠卵では、 $\text{Ca}^{2+}$ 量、 $\text{Mg}^{2+}$ 量に変動はなかった。非休眠卵と比べて休眠卵において  $\text{Ca}^{2+}$ 量が多い理由として、おそらく休眠状態を維持するためには非休眠卵よりも多量の  $\text{Ca}^{2+}$ を必要とすることが考えられる。一般的に、卵殻の物理的強度を上げるためには卵殻タンパク質に  $\text{Ca}^{2+}$ の沈着が必要だと思われる。休眠ホルモンの生化学的な作用の一つとして、グリコーゲンと 3-ヒドロキシキヌレニンの発育中の卵巣への取り込みを促進することが知られている (Yamashita and Hasegawa, 1985)。卵への  $\text{Ca}^{2+}$ の取り込みもまた休眠ホルモンによって促進されている可能性も考えられる。しかし、現時点では推測の域を出ないので今後更なる研究が必要である。

カイコガ卵における  $\text{Ca}^{2+}$ の局在に関しては、卵殻においてカルシウムは沈着型として卵殻タンパク質とともに広く一様に分布している。この沈着型の  $\text{Ca}$  は浸酸処理によって遊離の  $\text{Ca}^{2+}$ となり、卵から流出していると思われる。一方、卵内において  $\text{Ca}^{2+}$ は卵黄細胞中の卵黄顆粒に局在していることが報告されている (Niimi et al., 1993)。したがって、卵内からの  $\text{Ca}^{2+}$ の流出は、主に卵黄細胞中の卵黄顆粒、胚子および漿膜からであると推測される。しかし、卵黄顆粒中の  $\text{Ca}^{2+}$ が卵外へ流出するには、卵黄顆粒の膜、卵黄細胞の膜、および漿膜を通過しなければならず、これは物理的に困難なことだと思われる。したがって、浸酸処理後も卵内に残っている  $\text{Ca}^{2+}$ は卵黄顆粒中のものだと考えられる。浸酸処理に伴ってカイコガ卵から  $\text{Ca}^{2+}$ が流出するメカニズムの解明に関してはより詳細な解析が必要である。

本実験より、 $\text{Ca}^{2+}$ 量の変動が明らかとなったのは浸酸処理卵のみであった。このことから、浸酸処理による休眠移行阻害に  $\text{Ca}^{2+}$  が関与しているのではないかと推測される。そこで  $\text{Ca}^{2+}$  に着目し、浸酸処理卵における  $\text{Ca}^{2+}$  関連分子の検索および解析を行う必要があるとの考えに至った。



## 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

### 3-1 序論

一酸化窒素合成酵素 (NOS) は、セカンドメッセンジャーとして様々な生物学的プロセスを調節する一酸化窒素 (NO) を生産する (Knowles and Moncada, 1994)。NOS の反応は、2つの異なるステップから成る (Fig. 12)。L-アルギニンから N<sup>G</sup>-ヒドロキシ-L-アルギニン (L-NHA) を生成するステップと L-NHA を L-シトルリンと NO に変換するステップである (Zhu and Silverman, 2008)。NO の受容体は、可溶性のヘム酵素であるグアニル酸シクラーゼである。NOS により生成された NO は膜を透過して標的細胞の不活性型のグアニル酸シクラーゼのヘム鉄に結合し、活性化する。この活性化に伴い GTP から cGMP が生成され、生成された cGMP は cGMP 依存性タンパク質リン酸化酵素やホスホジエステラーゼなどの活性を調節し、血管拡張や抗アポトーシスなどの応答に関与する (Fig. 13)。哺乳類において NOS は、血管内皮型 NOS (eNOS)、神経型 NOS (nNOS)、そして誘導型 NOS (iNOS) の異なる3つのアイソフォームが存在することが知られている。eNOS と nNOS は、活性化するためにニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH)、フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD)、テトラヒドロビオプテリン (BH<sub>4</sub>)、カルモジュリンや Ca<sup>2+</sup> といった補因子を必要とすることが知られている (Alderton et al., 2001)。しかし、iNOS の活性化には Ca<sup>2+</sup> の経時的な流入に非依存性であり、主に転写レベルで調節されている (Alderton et al., 2001; Aktan, 2004)。

無脊椎動物において、NOS の活性はカ (*Anopheles stephensi*) やカタツムリ (*Biomphalaria glabrata*) といった病原媒介者における寄生虫感染によって誘導される (Ascenzi and Gradoni, 2002)。ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) において、細菌感染に反応して血球で生産される NO は、免疫不全シグナル伝達を活性化する (Foley and O'Farrell, 2003)。NO は、ショウジョウバエ、スズメガ (*Manduca sexta*)、サバクトビバッタ (*Schistocerca gregaria*) において神経系の形態形成もまた調節している (Gibbs and Truman, 1998; Davies, 2000; Siegl et al., 2009)。ミツバチ (*Apis sp.*) において、NO は嗅覚記憶に必要であり、嗅覚に対する慣れにも関係しているという報告がなされている (Müller and Hildebrandt, 2002)。カイコガにおける NOS (BmNOS) は、昆虫免疫に焦点を当て調べられてきた (Imamura et al., 2002)。BmNOS の発現は、リポ多糖刺激 (LPS) によって脂肪体において誘導され、BmNOS の酵素活性には FAD, NADPH, BH<sub>4</sub>, カルモジュリン, Ca<sup>2+</sup> のような補因子が必要であった (Imamura et al.,

2002)。興味深いことに、LPS によって誘導される BmNOS は、その活性の発現に補因子として  $\text{Ca}^{2+}$  を必要とするため、典型的な iNOS の特徴とは異なっていた。

第 2 章より、浸酸処理によって休眠移行を阻害した休眠卵から  $\text{Ca}^{2+}$  が流出することが確認された。よって、浸酸処理後の休眠卵において BmNOS のような  $\text{Ca}^{2+}$  関連タンパク質は、非休眠時の胚発育の進行もしくは休眠移行阻害に関して重要な役割を担っている可能性がある。そこで、本章では浸酸処理後の休眠卵における胚発育も含んだ胚子発生時における BmNOS の遺伝子発現解析、酵素活性測定、および免疫組織化学による BmNOS の局在を調べた。

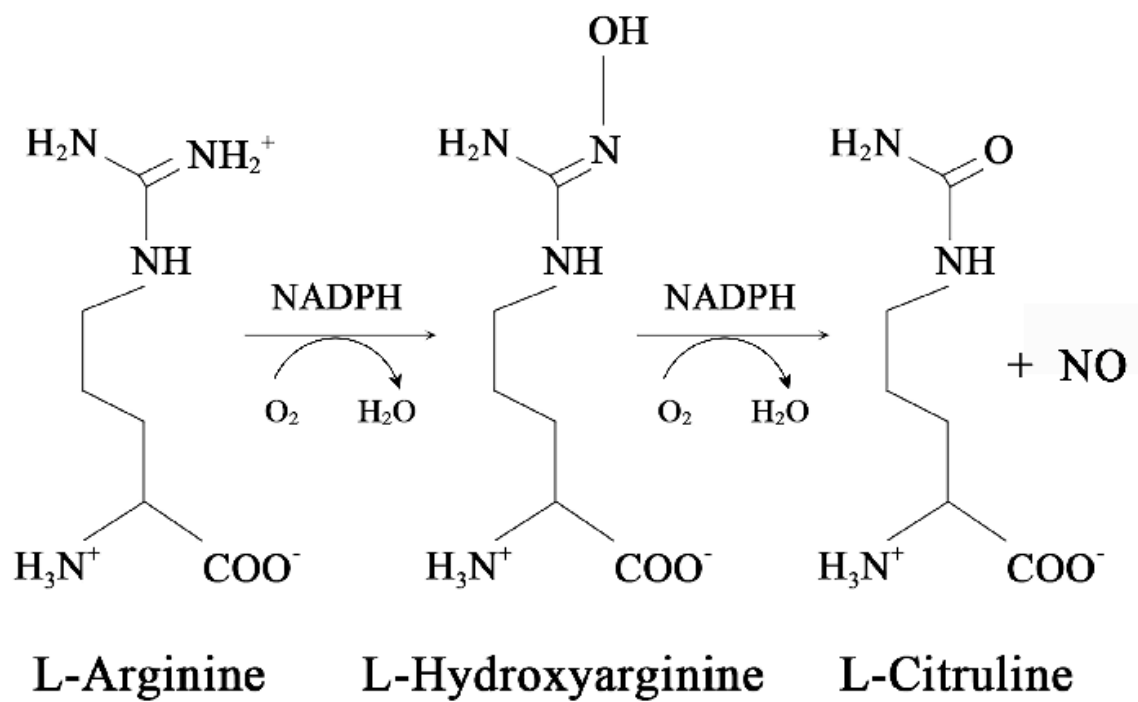


Fig. 12. NO の生合成

L-アルギニンから L-NHA を生成し，生成された L-NHA を L-シトルリンと NO に変換するこの一連の反応を NOS が触媒する。

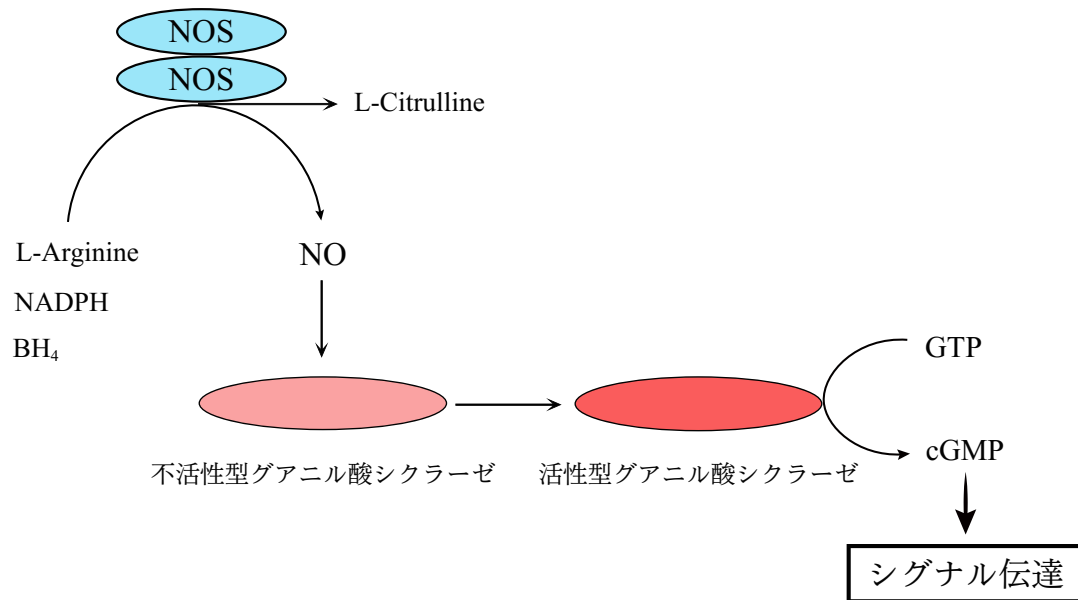


Fig. 13. NO シグナル伝達経路

NOS の触媒により生成した NO は、不活性型グアニル酸シクラーゼのヘム鉄に結合し、活性化する。活性型グアニル酸シクラーゼは GTP から cGMP を生成し、cGMP が関与する各種のシグナル伝達機構を活性化する。特に哺乳類などでは、血管拡張や血小板凝集、抗アポトーシスなどのシグナル伝達に関与する。

## 3-2 材料と方法

### 3-2-1 実験材料

本実験に使用したカイコガは、二化性系統である大造（松村）である。カイコガの幼虫は桑の葉と人工飼料であるシルクメイトを用いて飼育した。休眠卵は、高温長日条件下（25℃，18 時間明期：6 時間暗期）で胚発育させたメス蛾から得た。一方，非休眠卵は低温短日条件下（15℃，24 時間暗期）で胚発育させたメス蛾から得た（Sawada et al., 2012）。休眠卵と非休眠卵のサンプリングは経時時間ごとに行い，-80℃に保存した。

### 3-2-2 カイコガ休眠卵の浸酸処理

遺伝子発現解析および NOS 酵素活性測定サンプルとして浸酸処理を行った休眠卵は，産卵後 48 時間までは 25℃，その後 6 日間 4℃でインキュベートした卵である。その休眠卵を 48℃に加温した塩酸（比重 1.100）で 6 分間処理した。一方，免疫組織化学解析のサンプルとして浸酸処理を行った休眠卵は，産卵後 20 時間まで 25℃でインキュベートし，46℃に加温した塩酸（比重 1.075）で 5 分間処理した。浸酸処理中に産卵台紙からの卵の脱落を防ぐために，前処理として 2%ホルマリン溶液に浸し，風乾した。また，塩酸で処理した後は流水で卵を洗浄し風乾後，経時時間ごとに-80℃に保存した。また，同様に産卵後 48 時間までは 25℃，その後 6 日間 4℃でインキュベートした休眠卵を塩酸ではなく 48℃に加温した超純水で 6 分間処理した卵を浸酸処理卵のコントロールとして用いた（AT-C）。AT-C は流水洗浄はせずに，処理後すぐに-80℃に保存した。

### 3-2-3 NOS 活性測定

BmNOS 活性は，NOS Activity Assay Kit（Cayman Chemical Co., USA）を用いて，NOS によって [U-<sup>14</sup>C] L-アルギニンより変換された [U-<sup>14</sup>C] L-シトルリンの放射活性を測定することにより算出した（Fig. 12）。測定に使用した酵素溶液は，40 粒のカイコガ卵をホモジネート緩衝液（25 mM Tris-HCl (pH 7.4) containing 1 mM EDTA および 1 mM EGTA）中でホモジネートし，抽出した。酵素反応に用いた溶液の組成は Table 1 に示した。酵素反応は 37℃で 50 分間行った。その後，酵素反応溶液に Stop buffer を 400μl ずつ添加し，酵素反応を止めた。酵素反応により生成された [U-<sup>14</sup>C] L-シトルリンは Aquasol-2（PerkinElmer Life and Analytical Science, USA）10ml と混合し，液体シンチレーションカウンター（LSC-6100, Aloka, 日本）を

用いて放射活性を測定した。BmNOS 活性の単位 (nmol/mg/min) は、酵素溶液として使用した BmNOS 1 mg あたりが 1 分間で生成する [U-<sup>14</sup>C] L-シトルリンの量 (nmol) として定義した。

### 3-2-4 RNA 抽出および RT-PCR

Total RNA をカイコガ休眠卵および非休眠卵、浸酸処理卵より acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform 抽出法 (Chomczynski and Sacchi, 1987) を用いて抽出した。使用した Solution D 溶液の組成は、4 M guanidinium thiocyanate, 25 mM sodium citrate (pH 7.0), 0.5% sarcosyl, 0.1 M 2-mercaptoethanol である。卵より抽出した total RNA はエタノール沈殿法を用いて更に精製し、分光光度法により濃度測定を行った。

休眠卵および浸酸処理卵の各ステージ 3 µg の total RNA より、Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads (GE Healthcare, USA) とオリゴ dT プライマーを使用して逆転写により 1st strand cDNA を得た。

RT-PCR は休眠卵と非休眠卵の産卵後 0~60 時間、浸酸処理後 0~24 時間の浸酸処理卵および AT-C の各 1st strand cDNA を鋳型に用いて、TaKaRa Ex Taq キットを用いて行った。PCR 反応溶液の組成は Table 2 に示した。PCR の反応条件は、94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min を 1 サイクルとし、30 サイクル繰り返した。また、RT-PCR に使用したプライマー配列は Table 3 に示した。PCR 産物は 1.5%アガロースゲル電気泳動後、エチジウムブロマイド溶液で染色し、解析を行った。内部標準としてカイコガの *Ribosomal protein L5* mRNA についても RT-PCR を行った。

### 3-2-5 組換えタンパク質の発現と精製

完全長の BmNOS は 1209 個のアミノ酸から成るが、リコンビナント BmNOS (rBmNOS) を BmNOS の C 末端領域の 190 アミノ酸に設定した。190 個のアミノ酸の N 末端と C 末端の一部の配列は [M<sub>1020</sub>PKDLS.....SQKSQT<sub>1209</sub>] である。この 190 アミノ酸に対応する DNA 配列を *Nde* I および *Xho* I の変異誘発プライマーを用い、TaKaRa Ex Taq キットを用いて PCR により増幅した。使用した PCR プライマーの配列は Table 4 に示した。PCR 産物を、pGEM-T Easy Vector キット (Promega, USA) を用いて組換え体を作製し、大腸菌 JM109 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 3 ml の LB 液体培地で 37°C 一晚培養した。構築されたプラスミドは QIAGEN Plasmid Mini Kit を使用して大腸菌より精製した。

得られたプラスミドを制限酵素の *Nde* I および *Xho* I で消化後、pET-14b ベクター (Novagen, ドイツ) に組み込んだ。その後、組換えプラスミドで大腸菌 BL21 (DE3) pLysS 種を形質転換した。目的遺伝子が組込まれていることが確認されたクローンより、上記と同様の手法で構築されたプラスミドを精製し、シーケンス解析により塩基配列を確認した。

rBmNOS の発現を、大腸菌培養液に終濃度 1 mM の IPTG を加えることによって誘導した。封入体に取り込まれた rBmNOS を、6 M 塩酸グアニジンで可溶化し、変性状態のまま His-trap HP を用いたカラムクロマトグラフィー (GE Healthcare, USA) によって精製した。

### 3-2-6 ウェスタンブロット解析

rBmNOS 溶液は、ウシ血清アルブミン (BSA) を標準タンパク質として使用し、XL-Bradford (アプロサイエンス, 日本) を用いて濃度を測定し調製した。総タンパク質 175 ng を 15% ポリアクリルアミドゲルを用いて Laemmli の方法 (Laemmli, 1970) に従い SDS-PAGE を行った。その後、タンパク質は SDS ポリアクリルアミドゲルから PVDF 膜 (Hybond-P, GE Healthcare, USA) にセミドライ式ブロッティング装置により写し取った (Towbin et al., 1979)。

タンパク質を転移後、PVDF 膜は TBS-T 溶液 (25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 0.1% Tween 20) に溶解した 5% スキムミルクで室温で 1 時間処理した。その後、PVDF 膜は Can Get Signal Solution1 (東洋紡, 日本) で 10,000 分の 1 に希釈した抗 universal NOS (uNOS) 抗体 (Affinity BioReagents, USA) で 1 時間室温にて処理し、次に Can Get Signal Solution2 で 20,000 分の 1 に希釈した HRP 標識の抗ウサギ抗体と反応させた。PVDF 膜上の抗体結合タンパク質は ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, USA) を使用し、化学発光を X 線フィルムに現像し、可視化した。抗 uNOS 抗体は、[Q<sub>1113</sub>KRYHEDIFG<sub>1122</sub>] のペプチド配列を認識し、この配列はマウスの iNOS および nNOS の D 残基に対応している。この配列は異なる NOS アイソフォーム間においても高度に保存されている配列である。

### 3-2-7 免疫組織化学

免疫組織化学に使用した浸酸処理卵は、産卵後 20 時間の休眠卵を比重 1.075 の塩酸で 46°C 5 分処理し、25°C で 12 時間インキュベートした後にサンプリングした卵を使用した。産卵後 24 時間の休眠卵および浸酸処理卵を室温で 24 時間 4% パラホルムアルデヒド溶液で固定し、カイコガ卵を覆っている卵殻を固定液中で針を用いて取り除いた。その後、エタノール-ブタ

ノールシリーズに順番に浸して脱水後、パラフィンで包埋し、4  $\mu\text{m}$  の切片を作製した。切片からパラフィンを除去するためにキシレンで処理した。その後、1×クエン酸緩衝液（三菱化学メディエンス，日本）で抗原賦活化処理を行い，メタノールで希釈した 0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  でブロッキングした。ブロッキングした切片は，100 分の 1 に希釈した抗 uNOS 抗体を用いて 18°C で 18 時間反応させた。その後，ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体（ヒストファイン シンプルステイン MAX-PO (R)，ニチレイバイオサイエンス，日本）と反応させた。免疫反応は，3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 溶液（シンプルステイン DAB 溶液，ニチレイバイオサイエンス，日本）を使用して可視化し，さらにカラッチヘマトキシリン溶液でカウンター染色を行った。その後，染色した切片はエタノールおよびキシレンで脱水後，Entellan<sup>®</sup> New（Merck，ドイツ）を加えカバーガラスで封入し，光学顕微鏡で観察した。



Table 1. NOS Activity Assay Kit を用いた酵素反応溶液の組成

2×reaction buffer	25μl	(1×)
10mM NADPH	5μl	(1mM)
[ <sup>14</sup> C] arginine	1μl	(0.5μCi)
6mM CaCl <sub>2</sub>	5μl	(0.6mM)
1μM Calmodulin	4μl	(0.08μM)
酵素溶液	10μl	

Table 2. TaKaRa Ex Taq キットを用いた RT-PCR 反応溶液の組成

10× Ex Taq Buffer	5 μl	(1×)
2.5 mM dNTP Mixture	4 μl	(0.2 mM)
100 μM Primer F	0.5 μl	(1 μM)
100 μM Primer R	0.5 μl	(1 μM)
TaKaRa Ex Taq	0.25 μl	
滅菌超純水	38.75 μl	
1st strand cDNA	1 μl	

Table 3. RT-PCR に使用したプライマー

<b>Gene</b>	<b>GenBank No.</b>		<b>Sequence (5'→3')</b>	<b>Product size (bp)</b>
<i>BmNOS</i>	AB071182	F	GGAGTCTATTCAGTGGATACG	2988
		R	CCGTTCTGTGTCCTGTAAC	
<i>Ribosomal protein L5</i>	AF008229	F	GGCACAACAGATGTCACAGG	200
		R	GATTCTGCATGATAGCCAGG	

Table 4. サブクローニングに使用した変異誘発プライマー

<b>Gene</b>		<b>Sequence (5'→3')</b>
<i>Nde</i> I - <i>BmNOS</i>	F	TTCCATATGCCTAAAGATTTATCAGC
<i>Xho</i> I - <i>BmNOS</i>	R	TGCTCGAGTTAAGTTTGTGACTTCTGTGA

### 3-3 結果

#### 3-3-1 休眠卵と非休眠卵における BmNOS 活性の比較

カイコガの休眠卵と非休眠卵における BmNOS の酵素活性を比較した。酵素活性は、産卵後 0～60 時間の異なる発生段階の卵抽出液を用いて行った。休眠卵と非休眠卵の酵素活性の違いを Fig. 14 に示した。休眠卵および非休眠卵ともに、最も酵素活性が高かったのは産卵後 0 時間の卵であった。しかし、休眠卵と非休眠卵では発生に伴う酵素活性の変動パターンに違いがみられた。休眠卵において、産卵後 0 時間で最も高かった酵素活性は、産卵後 36 時間までに徐々に低くなり、産卵後 48～60 時間ではまた酵素活性が高くなった。一方、非休眠卵においては産卵後 60 時間までに酵素活性が徐々に低下した。

#### 3-3-2 浸酸処理による BmNOS 活性の変動

浸酸処理によって BmNOS が活性化されるかどうかを確かめるために、浸酸処理卵を使用して BmNOS 活性を測定した。産卵後 48 時間の休眠卵を 4℃で 6 日間インキュベートした後、浸酸処理によって休眠移行を阻害した時、BmNOS の活性は処理後 0～12 時間の浸酸処理卵において測定した。コントロールとして、塩酸の代わりに超純水で同様の処理を行った休眠卵を使用した。今回の実験の浸酸処理における孵化率は、約 89%であった。孵化率は産卵後 2 週間以内に孵化してきた幼虫の数より算出した。Fig. 15 に示したように、浸酸処理後 0 時間より BmNOS は活性化されることが明らかとなった。

#### 3-3-3 発生に伴う BmNOS の発現

BmNOS の発現解析は BmNOS のコア領域に対する特異的プライマーを用いた RT-PCR 法によって行った。サンプルには、休眠卵と非休眠卵の産卵後 0～60 時間の total RNA を用いた。増幅された BmNOS (2988 bp) の発現パターンは休眠卵と非休眠卵では少し異なっていた (Fig. 16)。休眠卵の場合、増幅された BmNOS は産卵後 24～60 時間の休眠卵において検出された。特に産卵後 36～48 時間の休眠卵では、産卵後 24 時間と 60 時間の休眠卵に比べて BmNOS の発現量が多かった。一方非休眠卵の場合、産卵後 24 時間と 60 時間において BmNOS の発現が検出された。また、産卵後 12 時間と 48 時間の非休眠卵においてとても少量の BmNOS の発現が検出された。

浸酸処理卵を用いて RT-PCR を行ったところ、増幅された BmNOS は浸酸処理直後から検出された (Fig. 17)。

### 3-3-4 大腸菌発現系における rBmNOS の発現と抗体特異性の確認

精製した rBmNOS を用いた SDS-PAGE および CBB 染色の結果より、rBmNOS は単一のバンドで検出された (Fig. 18A, Lane 5)。結合させた 6 つのヒスチジンとトロンピン切断配列 (約 2 kDa) を除いた rBmNOS の分子質量は、約 24 kDa であった。精製した rBmNOS は、ウエスタンブロット解析の結果、抗 uNOS 抗体によって特異的に認識されることが確認された (Fig. 18B, Lane 3, 4)。大腸菌由来のタンパク質は抗 uNOS 抗体では認識されていなかった (Fig. 18B, Lane 1, 2)。以上より、大腸菌発現系によって得られた rBmNOS は単一のバンドとして精製されており、今回使用した抗体は BmNOS の C 末端領域の [R<sub>1174</sub>YHEDIFG<sub>1181</sub>] という配列に特異性があることが確認された。

### 3-3-5 休眠卵と浸酸処理卵における BmNOS の分布と局在

産卵後 24 時間のカイコガ休眠卵と浸酸処理卵における BmNOS の免疫組織化学の結果を Fig. 19 に示した。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卵黄顆粒に分布していることが確認された (Fig. 19A, C)。一方、休眠卵と浸酸処理卵のどちらにおいても、胚帯細胞では免疫陽性シグナルは観察されなかった。コントロールとしてノーマルウサギ血清を使用した結果では、免疫陽性シグナルは観察されなかった (Fig. 19B, D)。

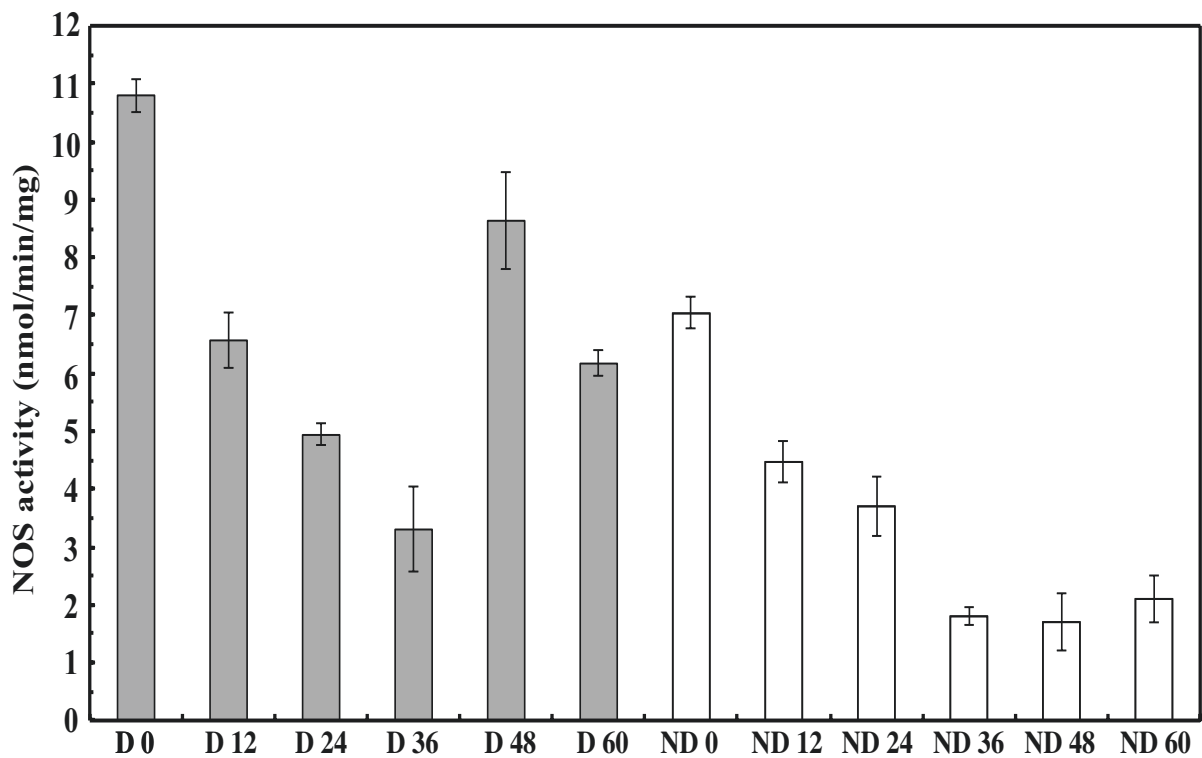


Fig. 14. 休眠卵と非休眠卵における BmNOS 活性

産卵後 0, 12, 24, 36, 48, 60 時間における休眠卵 (D) と非休眠卵 (ND) の BmNOS 活性を測定した。灰色のグラフは休眠卵, 白色のグラフは非休眠卵を示している。エラーバーは標準偏差であり, 独立した 3 回の実験より算出した。

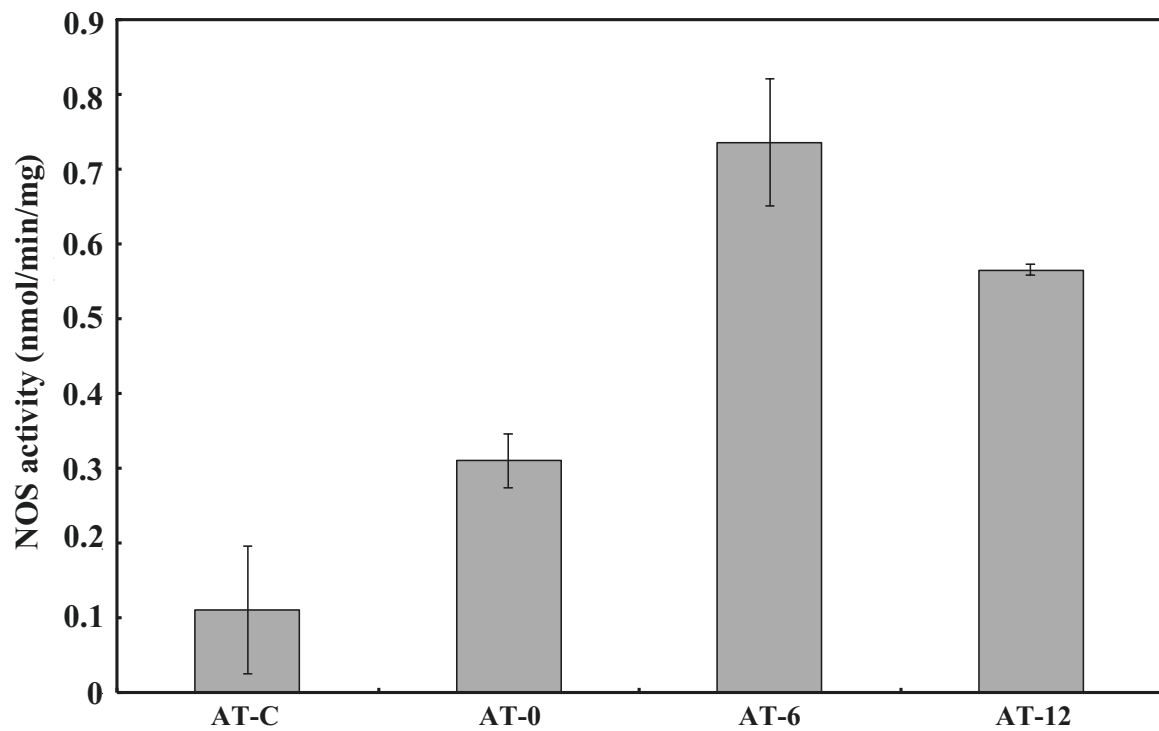


Fig. 15. 浸酸処理卵における BmNOS 活性

処理後 0 (AT-0) , 6 (AT-6) , 12 (AT-12) 時間後の浸酸処理卵における BmNOS 活性を測定した。AT-C は浸酸処理のコントロールとして塩酸の代わりに超純水を用いて同様の処理を行った卵を使用した。エラーバーは標準偏差であり, 独立した 3 回の実験より算出した。

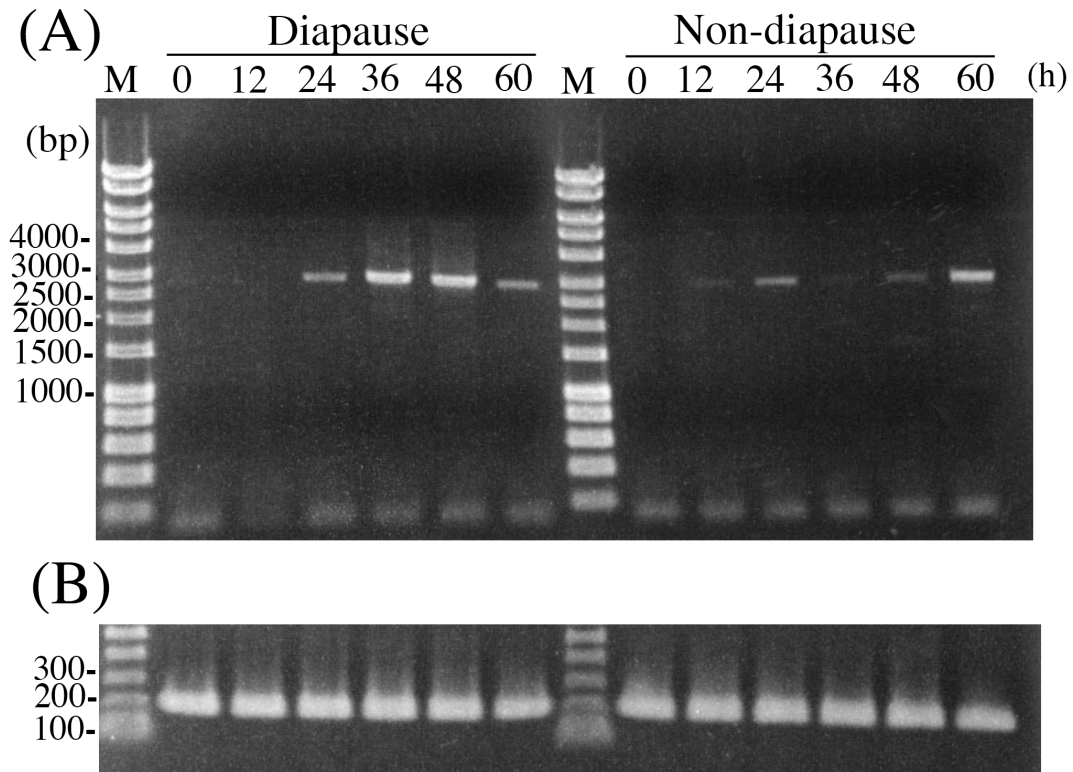


Fig. 16. RT-PCR による休眠卵および非休眠卵の *BmNOS* の発現解析

休眠卵と非休眠卵の胚子発生初期（産卵後 0～60 時間）における *BmNOS* の発現を RT-PCR 法を用いて解析した。*BmNOS* の発現変動の結果を(A), 内部標準として用いた *Ribosomal protein L5* の発現変動の結果を(B)に示す。上段の数字は産卵後の経過時間を示す。Lane M は分子量マーカーである。

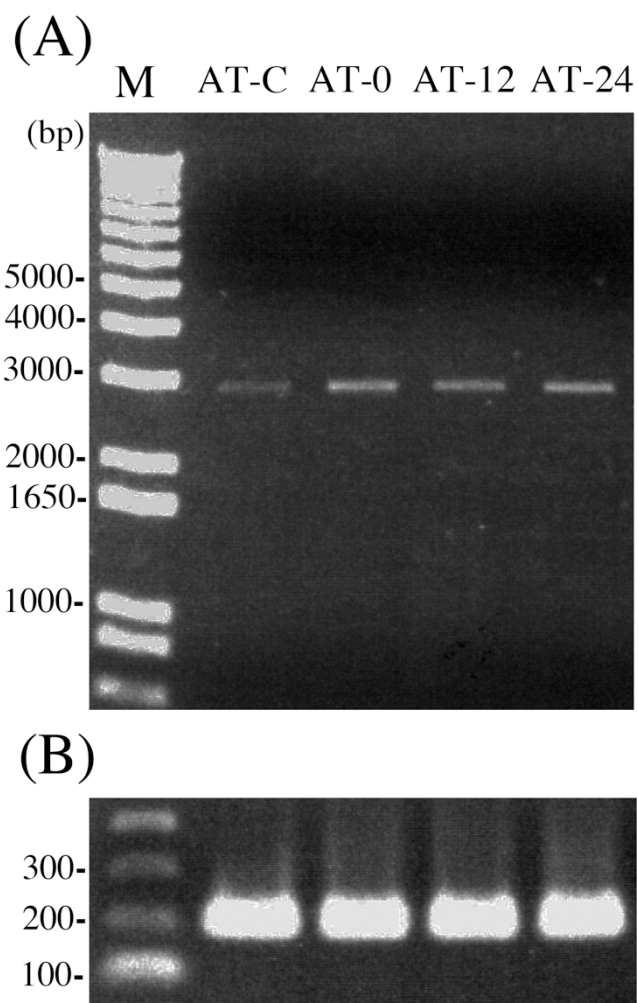


Fig. 17. 浸酸処理卵における *BmNOS* の発現解析

浸酸処理卵における *BmNOS* の発現解析を RT-PCR 法を用いて行った。*BmNOS* の発現変動の結果を(A), 内部標準として用いた *Ribosomal protein L5* の発現変動の結果を(B)に示す。上段の AT-0, AT-12, AT-24 はそれぞれ処理後 0, 12, 24 時間の浸酸処理卵を示す。AT-C はコントロールとして, 塩酸の代わりに超純水を用いて同様の処理を行った休眠卵である。Lane M は分子量マーカーである。



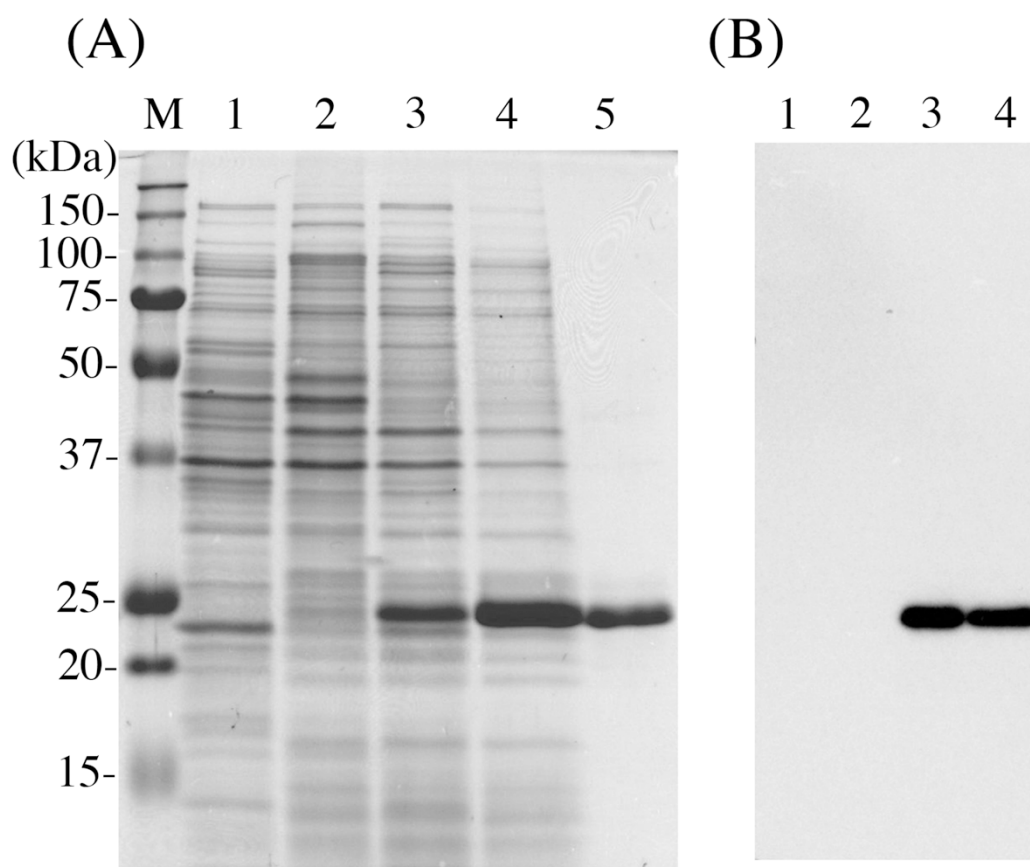


Fig. 18. rBmNOS の調製と抗 uNOS 抗体を用いたウエスタンブロット解析

rBmNOS の SDS-PAGE 解析 (CBB 染色) の結果を(A)に示す。Lane 1 は大腸菌破砕液の可溶性画分, Lane 2 は大腸菌破砕液の不溶性画分, Lane 3 は IPTG 誘導した大腸菌破砕液の可溶性画分, Lane 4 は IPTG 誘導した大腸菌破砕液の不溶性画分, Lane 5 は His-trap カラム精製後の rBmNOS である。Lane M は分子量マーカを示す。Lane 1~5 はタンパク質を 17  $\mu$ g ずつ泳動した。抗 uNOS 抗体を用いたウエスタンブロット解析の結果を (B) に示す。Lane 1, 2 は, (A) の Lane 1, 2 と同様の破砕液を使用した。Lane 3 は IPTG 誘導した大腸菌破砕液の不溶性画分, Lane 4 は精製した rBmNOS 溶液である。各レーンは 175 ng のタンパク質を含む。

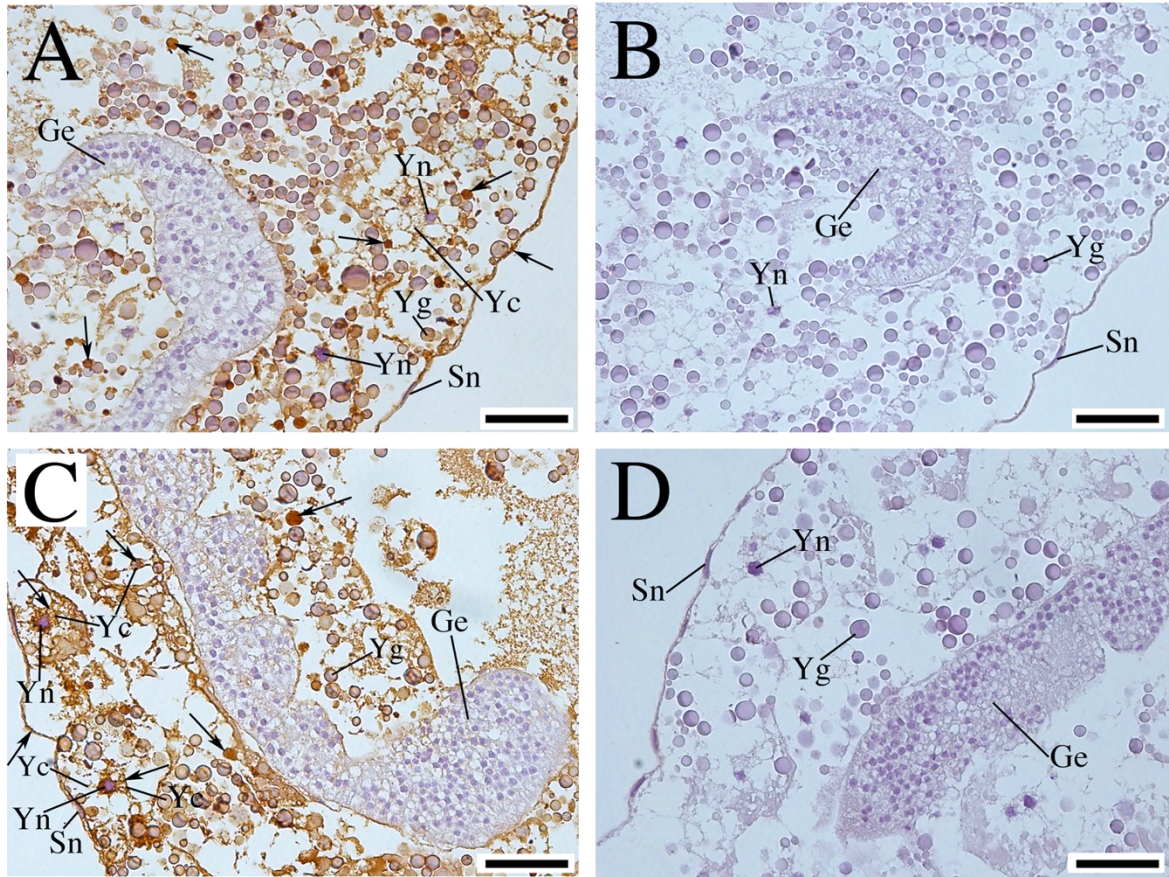


Fig. 19. 免疫組織化学による BmNOS の分布と局在性

A, B は産卵後 24 時間の休眠卵の切片, C, D は浸酸処理卵の切片である。A, C は抗 uNOS 抗体で処理し, B, D はウサギ正常血清で処理した結果である。全ての切片において, 免疫反応を可視化後, カラッチヘマトキシリン溶液で再び染色を行った。免疫陽性部位は茶色に染色されており, 矢印で示している。ヘマトキシリンで染色された領域は紫色に呈色している。Ge は胚帯, Sn は漿膜細胞の核, Yc は卵黄細胞, Yg は卵黄顆粒, Yn は卵黄細胞の核を示す。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を示す。

### 3-4 考察

本章では、カイコガの休眠や休眠移行阻害の分子メカニズムを解明するために、カイコガの胚子発生における NOS の生化学的解析を行った。まず、BmNOS の酵素活性と遺伝子発現解析を行った。浸酸処理によって BmNOS の酵素活性は高くなっていた (Fig. 15)。これは、浸酸処理によって *BmNOS* の発現が誘導されていたことと一致している (Fig. 17)。これらの結果は、浸酸処理によって *BmNOS* の転写が誘導されたことを示しており、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。それに比べて産卵後 0 時間の休眠卵および非休眠卵において BmNOS の強い活性が検出されているにも関わらず、増幅された *BmNOS* は同じ発生段階において検出されなかった。これらの結果から、産卵後 0 時間における BmNOS 活性の増大は、受精刺激によって母性の BmNOS が活性化されたことによって引き起こされている可能性が示唆される (Stricker, 1990; Kuo et al., 2000)。産卵後 0 時間以降、休眠卵における *BmNOS* の発現と、その酵素活性は、産卵後 12~60 時間の非休眠卵の *BmNOS* の発現および、その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、その酵素活性の変動パターンとほとんど同じであった。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 (Kitazawa et al., 1963)。それゆえ、産卵後 48~60 時間に BmNOS より合成された NO は、休眠を促進するため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* 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。

カイコガのゲノムデータベース (KAIKObase) で解析したところ、*BmNOS* をコードする遺伝子は第 10 染色体に座乗しており、cDNA 配列は NOS (GenBank accession no. BM002938) と一致していた。完全長の *BmNOS* をコードする遺伝子はその他の染色体には存在しない。NOS から転写されるアイソフォームにおいて、NOS 活性を有するアイソフォームの存在は報告されていない。したがって本研究における BmNOS 活性は、NOS より転写されたただ一つのタイプの BmNOS の活性を測定したと思われる。

酵素活性測定において、浸酸処理卵と超純水処理卵における BmNOS の活性は、休眠卵および非休眠卵における BmNOS の活性に比べて全体的に低かった。この活性の低下は、塩酸もしくは超純水で処理している間に BmNOS 活性が不活化したことに起因する。NO の半減期

は3～5秒であり、NO産生細胞またはその近傍の細胞で機能する。それゆえ、BmNOS活性が低くても、合成されたNOは浸酸処理卵の特定の細胞において働くと思われる。

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卵黄細胞中の卵黄顆粒に局在していた。全ての卵黄顆粒において免疫陽性シグナルが観察されなかったことから、BmNOSは卵黄顆粒中の特定の顆粒にのみ局在していることが考えられる。一方で、BmNOSの局在は胚帯細胞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。

## 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<sup>2+</sup>依存的溶質輸送体の機能と局在

### 4-1 序論

ミトコンドリア Ca<sup>2+</sup>依存的溶質輸送体 (MCSC) は、真核生物において最も大きな溶質輸送体ファミリーに属する分子の一つであり、ミトコンドリアにおいて、代謝物や補因子、核酸などを輸送している (Arco and Satrustegui, 2005; Palmieri, 2004; Palmieri, 2013)。このファミリーに属する分子の構造上の特徴として、N 末端領域に Ca<sup>2+</sup>が結合する EF-hand ドメインがいくつか存在していることが挙げられる。Aralar1 は MCSC に属する分子の一つであり、哺乳類において初めてミトコンドリアに局在していることが確認された (Arco and Satrustegui, 1998)。Aralar1 は、心臓、骨格筋や脳といった興奮性組織において主に発現している。アスパラギン酸/グルタミン酸交換輸送体としての Aralar1 の活性は、ミトコンドリア内膜に存在している Ca<sup>2+</sup>によって活性化されている (Palmieri et al., 2001)。Aralar1 が活性化されると、ミトコンドリアにおいて ATP の生産が行われる。

第2章において、浸酸処理に伴ってカイコガ卵より Ca<sup>2+</sup>が流出することを記述した。また、第3章では浸酸処理に伴って Ca<sup>2+</sup>が流出し、減少するにも関わらず、活性化に Ca<sup>2+</sup>を必須とする BmNOS の酵素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<sup>2+</sup>関連分子が関与しているのではないかと推測される。そこで本章では、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。

### 4-2 材料と方法

#### 4-2-1 実験材料

本実験に使用したカイコガ休眠卵については、3-2-1 と同様に飼育し、サンプリングした。

#### 4-2-2 カイコガ休眠卵の浸酸処理

3-2-2 と同様に浸酸処理を行い、サンプリングした。サンプリングした卵は-80°Cに保存した。

#### 4-2-3 RNA 抽出および RT-PCR 解析

カイコガ休眠卵および浸酸処理卵からの total RNA の抽出および 1st strand cDNA の調製は、3-2-4 と同様の方法で行った。

RT-PCR は産卵後 48 時間の休眠卵および処理後 0~48 時間の浸酸処理卵の各 1st strand cDNA を鋳型に用いて、TaKaRa Ex Taq キットを用いて行った。PCR 反応溶液の組成は Table 4 に示した。PCR の反応条件は、94°C 30 sec, 55°C 30 sec, 72°C 30 sec を 1 サイクルとし、29 サイクル繰り返した。また、RT-PCR に使用したプライマー配列は Table 5 に示した。PCR 産物は 1.5%アガロースゲル電気泳動後、エチジウムブロマイド溶液で染色し、解析を行った。

#### 4-2-4 リコンビナントタンパク質の発現と精製

タンパク質発現のためのコーディング領域は、*Nde* I および *Bam*H I の変異誘発プライマーを用い、TaKaRa LA Taq キットを用いて PCR により増幅した。PCR 反応溶液の組成は Table 6 に、使用した PCR プライマーの配列は Table 7 に示した。PCR の反応条件は、94°C 30 sec, 50°C 1 min, 72°C 1 min を 1 サイクルとし、35 サイクル繰り返した。PCR により増幅された DNA は、1.5%アガロースゲル電気泳動後、エチジウムブロマイド溶液で染色し、分子量の解析を行った。RT-PCR 産物を、pGEM-T Easy Vector キット (Promega, USA) を用いて組換え体を作製し、大腸菌 JM109 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 3 ml の LB 液体培地で 37°C 一晚培養した。構築されたプラスミドは QIAGEN Plasmid Mini Kit を使用して大腸菌より精製した。

得られたプラスミドを制限酵素の *Nde* I および *Bam*H I で消化後、pET-14b ベクター (Novagen, ドイツ) に組み込んだ。その後、組換えプラスミドで大腸菌 BL21 (DE3) pLysS 種を形質転換した。目的遺伝子が組込まれていることが確認されたクローンより、上記と同様の手法で構築されたプラスミドを精製し、シーケンス解析により塩基配列を確認した。

リコンビナント BmMCSC (rBmMCSC) の発現を、大腸菌培養液に終濃度 1 mM の IPTG を加えることによって誘導した。封入体に取り込まれた rBmMCSC を、6 M 塩酸グアニジンで可溶化し、変性状態のまま His-trap HP を用いたカラムクロマトグラフィー (GE Healthcare, USA) によって精製した。

#### 4-2-5 SDS-PAGE およびウエスタンブロット解析

rBmMCSC 溶液は、ウシ血清アルブミン (BSA) を標準タンパク質として使用し、2-D Quant Kit (GE Healthcare, USA) を用いて濃度を測定し調製した。総タンパク質 3.2  $\mu\text{g}$  を 12.5% ポリアクリルアミドゲルを用いて Laemmli の方法 (Laemmli, 1970) に従い SDS-PAGE を行った。その後、タンパク質は SDS ポリアクリルアミドゲルから PVDF 膜 (Hybond-P, GE Healthcare, USA) にセミドライ式ブロッティング装置により写し取った (Towbin et al., 1979)。

タンパク質を転移後、PVDF 膜は TBS-T 溶液 (25 mM Tris-HCl, pH 7.4; 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 0.1% Tween 20) に溶解した 5% スキムミルクで室温で 1 時間処理した。その後、PVDF 膜は Can Get Signal Solution1 (東洋紡, 日本) で 20,000 分の 1 に希釈した抗 BmMCSC 抗血清で 1 時間室温にて処理し、次に Can Get Signal Solution2 で 20,000 分の 1 に希釈した HRP 標識の抗ウサギ抗体と反応させた。PVDF 膜上の抗体結合タンパク質は Amersham ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare, USA) を使用し、化学発光を X 線フィルムに現像し、可視化した。抗 BmMCSC 抗血清はニュージーランド白ウサギに免疫し、取得した。

#### 4-2-6 $\text{Ca}^{2+}$ 結合解析

$\text{Ca}^{2+}$  結合解析として行ったドットブロット解析および  $^{45}\text{Ca}$  によるオートラジオグラフィーは Bassi らの方法 (Bassi et al., 2005) を少し改変して行った。タンパク質量 1  $\mu\text{g}$  の rBmMCSC 溶液を超純水、0.6 MBq  $^{45}\text{CaCl}_2$ 、5 mM EGTA、0.6 MBq  $^{45}\text{CaCl}_2 + 5 \text{ mM EGTA}$  の各溶液と室温で 15 分間反応させた。この反応溶液を事前にメタノールと純水で処理しておいた PVDF 膜にスポットし、乾燥させた。その後、PVDF 膜をメタノールに浸漬させ、TBS-T で洗浄した。PVDF 膜上の  $^{45}\text{Ca}$  でラベルされたタンパク質は、室温で 1 日 X 線フィルムに感光させ、検出した。

#### 4-2-7 免疫組織化学

産卵後 48 時間の休眠卵および処理直後にサンプリングした浸酸処理卵を 4% パラホルムアルデヒド溶液で固定し、カイコガ卵を覆っている卵殻を固定液中で針を用いて取り除いた。その後、エタノール-ブタノールシリーズに順番に浸して脱水後、パラフィンで包埋し、4  $\mu\text{m}$  の切片を作製した。切片からパラフィンを除去するためにキシレンで処理した。その後、1×クエン酸緩衝液 (三菱化学メディエンス, 日本) で抗原賦活化処理を行い、メタノールで希

積した 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> でブロッキングした。ブロッキングした切片は、100 分の 1 に希釈した抗 BmMCSC 抗血清を用いて室温で 1 時間反応させた後、ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体（ヒストファイン シンプルステイン MAX-PO (R), ニチレイバイオサイエンス, 日本）と反応させた。免疫反応は、DAB 溶液（シンプルステイン DAB 溶液, ニチレイバイオサイエンス, 日本）を使用して可視化した。その後、染色した切片はエタノールおよびキシレンで脱水後、Entellan<sup>®</sup> New (Merck, ドイツ) を加えカバーガラスで封入し、光学顕微鏡で観察した。



Table 4. TaKaRa Ex Taq キットを用いた RT-PCR 反応溶液の組成

10× Ex Taq Buffer	5 µl	(1×)
2.5 mM dNTP Mixture	4 µl	(0.2 mM)
100 µM Primer F	0.5 µl	(1 µM)
100 µM Primer R	0.5 µl	(1 µM)
TaKaRa Ex Taq	0.25 µl	
滅菌超純水	38.75 µl	
1st strand cDNA	1 µl	

Table 5. RT-PCR に使用したプライマー

Gene	GenBank No.		Sequence (5'→3')	Product size (bp)
<i>BmMCSC</i>	XM_012694736	F	TTCTCCGAGTTCCAGGCGTTTG	510
		R	TTTGGTGACCTCTTGCGTGCGATG	
<i>Ribosomal protein L5</i>	AF008229	F	GGCACAACAGATGTCCACAGG	200
		R	GATTCTGCATGATAGCCAGG	

Table 6. TaKaRa LA Taq キットを用いた RT-PCR 反応溶液の組成

10× LA PCR Buffer II (Mg <sup>2+</sup> free)	5 μl	(1×)
25 mM MgCl <sub>2</sub>	5 μl	(2.5 mM)
2.5 mM dNTP Mixture	8 μl	(0.4 mM)
100 μM Primer F	0.5 μl	(1 μM)
100 μM Primer R	0.5 μl	(1 μM)
TaKaRa LA Taq	0.5 μl	
滅菌超純水	29.5 μl	
1st strand cDNA	1 μl	

Table 7. サブクローニングに使用した変異誘発プライマー

Gene		Sequence (5'→3')
<i>Nde</i> I - <i>BmMCSC</i>	F	GACCATATGGATGGGGCTGGTTATTTG
<i>Bam</i> H I - <i>BmMCSC</i>	R	GTCGGATCCTCATTGCTGCGCTGGTTTCGG

## 4-3 結果

### 4-3-1 *BmMCSC* cDNA のクローニングとバイオインフォマティクス解析

今回単離した cDNA は、ORF 領域が 2004 bp であり、ExPASy Compute pI/Mw tool を使用し算出した 667 アミノ酸からなる予想分子質量は 74,424 Da (pI 8.88) であった (Fig. 20)。この cDNA は BLAST 検索の結果、MCSC ファミリーの一つであると同定され、アスパラギン酸/グルタミン酸交換輸送体として知られている Aralar1 (GenBank accession no. XM\_012694736) と高い相同性を有していた。Fig. 20 に示したように、*BmMCSC* の C 末端領域にはミトコンドリア  $\text{Ca}^{2+}$  依存的溶質輸送体スーパーファミリーに特徴的な配列が 3 箇所あり (アミノ酸残基数 : 347-352, 446-451, 538-543), N 末端領域には  $\text{Ca}^{2+}$  結合ドメインである EF-hand モチーフが 2 箇所存在していた (アミノ酸残基数 : 64-76, 98-110)。この推定される *BmMCSC* のアミノ酸配列を Kyte & Doolittle のアミノ酸残基の疎水性指標により解析した (Weber et al., 1997)。その結果、*BmMCSC* は疎水性アミノ酸が豊富な領域が少なくとも 6 箇所あることが明らかになった。PSORT II プログラムによると、*BmMCSC* は 43.5% は細胞質に、21.7% はミトコンドリアに存在していることが予想された。カイコガのゲノムデータベース (KAIKObase) で解析したところ、*BmMCSC* をコードする遺伝子は第 9 染色体に座乗していることがわかった。

### 4-3-2 浸酸処理卵における *BmMCSC* の発現解析

*BmMCSC* の発現は、*BmMCSC* のコア領域に対する特異プライマーを用いて RT-PCR 法により解析を行った。また、サンプルには産卵後 48 時間の休眠卵を超純水で処理したコントロールと処理後 0~48 時間までの浸酸処理卵を用いた。Fig. 21A より、*BmMCSC* は 510 bp の位置に増幅が確認され、浸酸処理卵の全てのステージにおいてその発現が観察された。注目すべきことに、浸酸処理後 0 時間の卵における *BmMCSC* の発現量はコントロールに比べて明らかに増加していた。内部標準として *Ribosomal protein L5* の発現解析も行った (Fig. 21B)。また、浸酸処理卵のコントロールにおける弱い遺伝子発現 (Fig. 21A, Lane C) は、超純水処理後少なくとも 48 時間までは発現の変化は見られなかった。

### 4-3-3 大腸菌発現系における r*BmMCSC* の発現

大腸菌発現系における r*BmMCSC* の発現は、SDS-PAGE と CBB 染色により解析した。r*BmMCSC* は封入体として得られた (Fig. 22A, Lane2)。凝集してしまった r*BmMCSC* の可

溶化は、6 M の塩酸グアニジンにより行い、その後 His-trap HP カラムにより精製した (Fig. 22A, Lane 1)。精製した rBmMCSC は、ウエスタンブロット解析において抗 BmMCSC 抗血清によって特異的に認識された (Fig. 22B, Lane 2)。大腸菌由来のタンパク質は抗血清により認識されなかった (Fig. 22B, Lane 1)。以上より、大腸菌発現系により得られた rBmMCSC は、単一のバンドとして高度に精製されたことが確認され、また抗 BmMCSC 抗血清は rBmMCSC を特異的に認識することが確認された。

#### 4-3-4 BmMCSC の $\text{Ca}^{2+}$ 結合能

rBmMCSC の  $\text{Ca}^{2+}$ 結合能の結果を Fig. 23A に示した。 $\text{Ca}^{2+}$ 結合能はドットブロット解析およびオートラジオグラフィーによって確認した。 $^{45}\text{Ca}$  で標識された rBmMCSC は PVDF 膜にスポットし、検出した。その結果、高度な  $^{45}\text{Ca}$  結合シグナルを Spot 2 で検出された。一方、Spot 4 では  $^{45}\text{Ca}$  結合シグナルは弱かった。Spot 4 において  $^{45}\text{Ca}$  結合シグナルが減少した要因として、 $^{45}\text{Ca}$  と EGTA がキレートを作成したため、rBmMCSC と結合する  $^{45}\text{Ca}$  が減少したためだと推測される。 $^{45}\text{Ca}$  と rBmMCSC の結合の特異性を評価するために、Spot 4 における反応溶液に EGTA を加えた。Spot 4 で  $^{45}\text{Ca}$  結合シグナルが減少し、Spot 2 では強い  $^{45}\text{Ca}$  結合シグナルが確認されたことから、rBmMCSC は  $\text{Ca}^{2+}$  と特異的に結合することが明らかとなった。 $^{45}\text{CaCl}_2$  の代わりに 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$  を用いたイムノドットブロット解析の結果、タンパク質量は各スポットにおいて等量であるということが確認された (Fig. 23B)。

#### 4-3-5 カイコガ卵における BmMCSC の局在

カイコガ休眠卵と浸酸処理卵における BmMCSC の局在を調べるために、BmMCSC に特異的な抗 BmMCSC 抗血清を用いて免疫組織化学を行った。休眠卵と浸酸処理卵において、BmMCSC は漿膜細胞に分布していることが確認された (Fig. 24A, B)。漿膜細胞を拡大した画像から (Fig. 24C, D)、漿膜細胞が一様に染まっていることが観察された。このことから、BmMCSC はカイコガ卵において漿膜細胞の細胞質に局在していることが推測された。休眠卵 (Fig. 24A, C) と浸酸処理卵 (Fig. 24B, D) では BmMCSC の染色パターンに違いは見られなかった。また、コントロールとしてノーマルウサギ血清を使用した結果では、免疫陽性シグナルは観察されなかった (Fig. 24E, F)。

```

1 ATGGATGGGCTGGTTATTTGAAACGGGCTGATTCAGAGAAGCTACATGAGATCTTCTTG 60
1 M D G A G Y L K R A D S E K L H E I F L 20
61 AAGTACGCCACCGTTGAGAAGAACCGTGAGAAGCATACACAAGCGAAGATTTTGTAA 120
21 K Y A T V E K N G E K H I T S E D F V R 40
121 AAATATCTAGGATTAATCTCCGAAGATGATTTCAACAAAGAATCGTCCAGCTCATCGCT 180
41 K Y L G L F S E D D F N K E S V Q L I A 60
181 GGAATCGTCGACATGGACAAGGACGGTTACATATCGTTCTCCGAGTCCAGCGGTTGAA 240
61 G I V D M D K D G Y I S F S E F Q A F E 80
241 GGTCGCTGTCGGTGGTGGACGCTCTGTACAAAACCGCTTTCACACTATCCGATACGAAT 300
81 G L L C V L D A L Y K T A F Q L F D T N 100
301 GGGAATGGACTTGTGTGCTTTTGACGAATTCGCCGAGATTATCGAAAAACGGCCCTCCAC 360
101 G N G L V A F D E F A E I M R K T A L H 120
361 AAGAAGTGCCTTCAACATGGAGAGCACGTTTCGTCGCTGACTTCGGCAAGGATAAG 420
121 K K L P F N M E S T F V R L Y F G K D K 140
421 AAGCGCTCGTAACCTACCTCGAGTTCAGTCAGTTCCTGCACGACTCCACGAAGAATAC 480
141 K R L V T Y P E F S Q F L H D F H E E Y 160
481 GGATCGAAGCGTTCAAGAAATCGACAAGGAGGACCGGATTCATCACAGCCGGCAG 540
161 G V E A F K K C D K E G T G F I T A G D 180
541 TTCAGAAATATCATGATGTCGGTGAAGAGCCATCTTCTCACTAAGGATTTGAAAAGTAAA 600
181 F R N I M M S V K S H L L T K D L K S K 200
601 GTCATCACTGCCTCTGGTTTCCGCAAGCGAGCGAAAGTACAGTTCCCTTACTATATG 660
201 V I T A S G F P Q G E R K I S F P Y Y M 220
661 GCCTCAATTCATTATAACAACATGGAGCTAATCAAGAGGGTGTACCTAAACGCCAG 720
221 A F N S L L N N M E L I K R V Y L N A T 240
721 AACGCCATCGCAGCAAGAGGTCACCAAAGAGGATTTCTGCACCTGCCAGATGATG 780
241 N G H R T Q E V T K E E F L H S A Q M H 260
781 AGTCAAATCACGCCCTTGAAGTGGACATATGTTCAACTGTGCGACATTTCGCACCAT 840
261 S Q I T P L E V D I L F N L C D I L H H 280
841 ACAAAATGGTCGATGTGTACAACGATTTGAACTCCATAACGCCAGAGCAACTACTCAAG 900
281 T N G R I V Y N D L N S I T P E Q Y F K 300
901 CAGCTTACACGAAGAGTAGCAGAATTAAGCTGTTTCACGCCCGGAGGAGAGGGTGTG 960
301 Q V T R R V A E I K A V S S P E E R G V 320
961 CTAATACAATCCTAGAGACACGTACAGATTCACGCTAGGTTCCGTAGCCGGGCGGTG 1020
321 L I Q I L E S T Y R F T L G S V A G A V 340
1021 GGAGCCTCGCGGTTACCCGATAGATCTAGTCAAGACCCGGATGCAGAACCCAGCGCACC 1080
341 G A S A V Y P I D L V K T R M Q N Q R T 360
1081 GGCTCGTTCATCGGCAAGTGGCGTACCCGAACTCGTGGGACTGCTCAAGAAAGTGATC 1140
361 G S F I G E V A Y R N S W D C F K K V I 380
1141 CGGCACGAGGCGTGTTCGGCCTGTACCCGGGCTCGTCCGACGCTCATCGCGCTCGCC 1200
381 R H E G V F G L Y R G L V P Q L I G V A 400
1201 CCGGAGAAAGCCATCAAGTAAACGGTCAACGATTTAGTTCGCGATAAATTCATGGACAAA 1260
401 P E K A I K L T V N D L V R D K F M D K 420
1261 AAAGGAAACATATCATTGTACGCTGAGATCATCGCGGCGCATGCGGGCGGTTCTCAA 1320
421 K G N I S L Y A E I I A G A C A G G S Q 440
1321 GTGGTGTACCGAATCCCCTGGAATTTGTCAAATTCGTTCAAGTCCGCGGGGATA 1380
441 V V F T N F L E I V K I R L Q V A G G I 460
1381 CCGCGGGGACAAAGTGAAGGCTGTCGCTCAAGGACCTCGGGCTCTTCGGACTG 1440
461 A G G T K V K A W S V V K D L G L F G L 480
1441 TACAAGGGGCGAAGGCCCTGCCTCCTCCGCGACCTGCCTCAGCGCCATATACTCCCG 1500
481 Y K G A K A C L L R D V P F S A I Y F P 500
1501 GCCTATGCTCATGTTAAGGTAAGTTCGCGGATGAGAAGGCTACAACCATCCCCTGACG 1560
501 A Y A H V K A K F A D E N G Y N H P L T 520
1561 CTGCTGGCGGGCGGCATCGCGGCATCCCCTCCGCTCGCTCACCCTCCGCTGAC 1620
521 L L A A G A I A G I P A A S L V T F A D 540
1621 GTCATCAAAACAGATTACAGTGGTGGCGGCGCCGACAAAACCTTACACGGAGTT 1680
541 V I K T R L Q V V A R P G Q T T Y N G V 560
1681 ATAGACGCGACCAAGAAATATACGACAGGAAGGCCAGAGCTTCTGGAAGGGCGCT 1740
561 I D A T R K I Y A E E G A R A F W K G A 580
1741 ATCGCTCGCGTGTTCGCTCGCGCAGTTCGGCGTCAAGTTCAGTTCACCTACGAAATA 1800
581 I A R V F R S S P Q F G V T L V T Y E I 600
1801 TTACACGACTCTTCTACGTCGACTTCGAGGGTCTCGTCCACGGGCTCGGAGCTCCAC 1860
601 L Q R L F Y V D F G G S R P T G S E L H 620
1861 GTGCGACCCCATCGAGGAATCGATAAAGAAGCGCACCATCGGGCGCTACCAAGTG 1920
621 V A T P I E E S I K K P H H I G G Y Q V 640
1921 GCCCTACCGTACTGACAGGACTCGAAACCAATTCGGAATCTCCTGCCGAGGTTCTCG 1980
641 A L P V L T G L E T K F G I S L P R F S 660
1981 TATCCGAAACCGCGCAGCAATGA 2004
661 Y P K P A Q Q * 667

```

Fig. 20. *BmMCSC* の cDNA 配列および推定アミノ酸配列

終止コドンは\*で示す。四角で囲ったアミノ酸は  $\text{Ca}^{2+}$  結合ドメインである EF-hand モチーフを示す。点線の下線を付したアミノ酸は MCSC スーパーファミリーに特徴的な配列を示す。上段の数字は塩基数，下段の数字はアミノ酸残基数を示す。

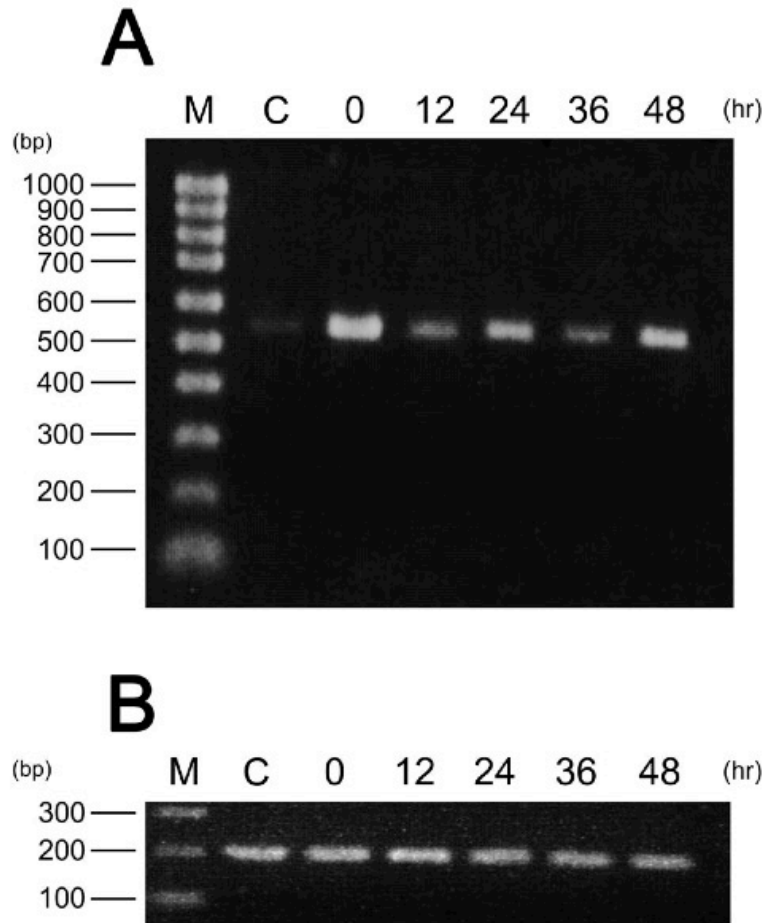


Fig. 21. RT-PCR による浸酸処理卵における *BmMCSC* の発現解析

*BmMCSC* の発現変動の結果を(A), 内部標準として用いた *Ribosomal protein L5* の発現変動の結果を(B)に示す。上段の数字は浸酸処理後の経過時間を示す。Lane C はコントロールで、塩酸の代わりに超純水で処理した休眠卵である。Lane M は分子量マーカである。

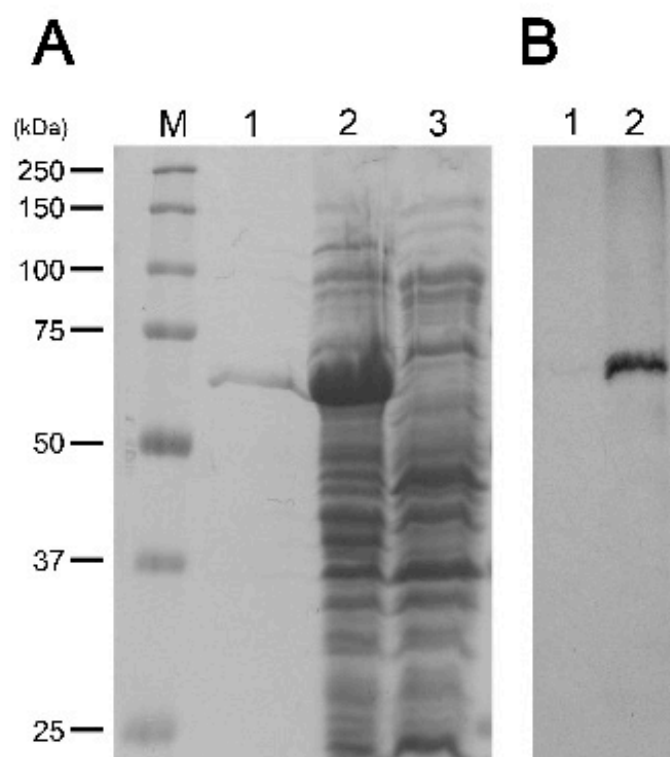


Fig. 22. rBmMCSC の調製と抗 BmMCSC 抗血清の特異性の確認

rBmMCSC を SDS-PAGE 解析 (CBB 染色) を行った結果を(A)に示す。解析に使用したタンパク質溶液は BmMCSC 発現コンストラクトをもつ大腸菌より抽出した。Lane 1 は His-trap カラム精製後の rBmMCSC, Lane 2 は IPTG 誘導後の大腸菌破碎液の不溶性画分, Lane 3 は IPTG 誘導前の大腸菌破碎液の不溶性画分である。Lane M は分子量マーカを示す。

(B)は抗 BmMCSC 抗血清を用いたウエスタンブロット解析の結果を示す。Lane 1 は IPTG 誘導前の大腸菌破碎液の不溶性画分, Lane 2 は His-trap カラム精製後の rBmMCSC である。各 Lane は 3.2  $\mu$ g のタンパク質を含む。

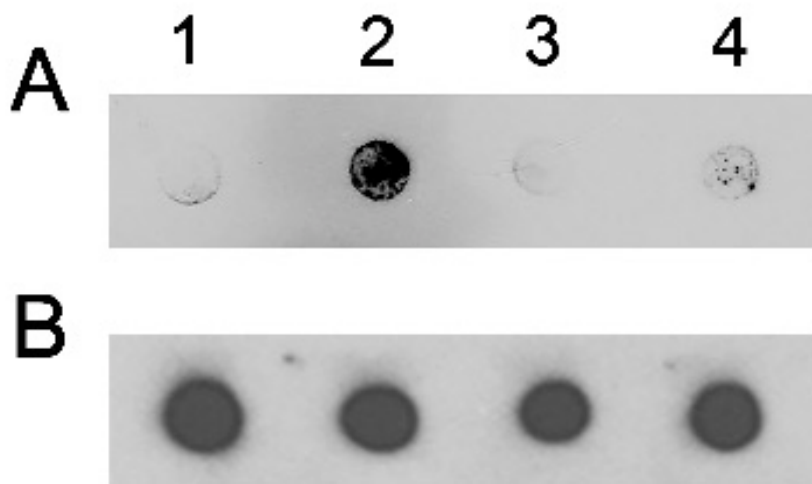


Fig. 23. BmMCSC の  $\text{Ca}^{2+}$ 結合能の検出

BmMCSC の  $\text{Ca}^{2+}$ 結合解析は、ドットブロット解析および  $^{45}\text{Ca}$  を用いたオートラジオグラフィにより調べた(A)。(B)は、コントロール実験として抗 BmMCSC 抗血清を使用したイムノドットブロット解析の結果である。スポット 1 は rBmMCSC と超純水、スポット 2 は rBmMCSC と  $0.6 \text{ MBq } ^{45}\text{CaCl}_2$ 、スポット 3 は rBmMCSC と  $5 \text{ mM EGTA}$ 、スポット 4 は rBmMCSC と  $0.6 \text{ MBq } ^{45}\text{CaCl}_2 + 5 \text{ mM EGTA}$  をそれぞれ反応させた溶液である。各スポットには rBmMCSC を  $1 \mu\text{g}$  使用した。抗 BmMCSC 抗血清を用いたイムノドットブロット解析では、 $0.6 \text{ MBq } ^{45}\text{CaCl}_2$  の代わりに  $2.5 \text{ mM CaCl}_2$  を使用した。



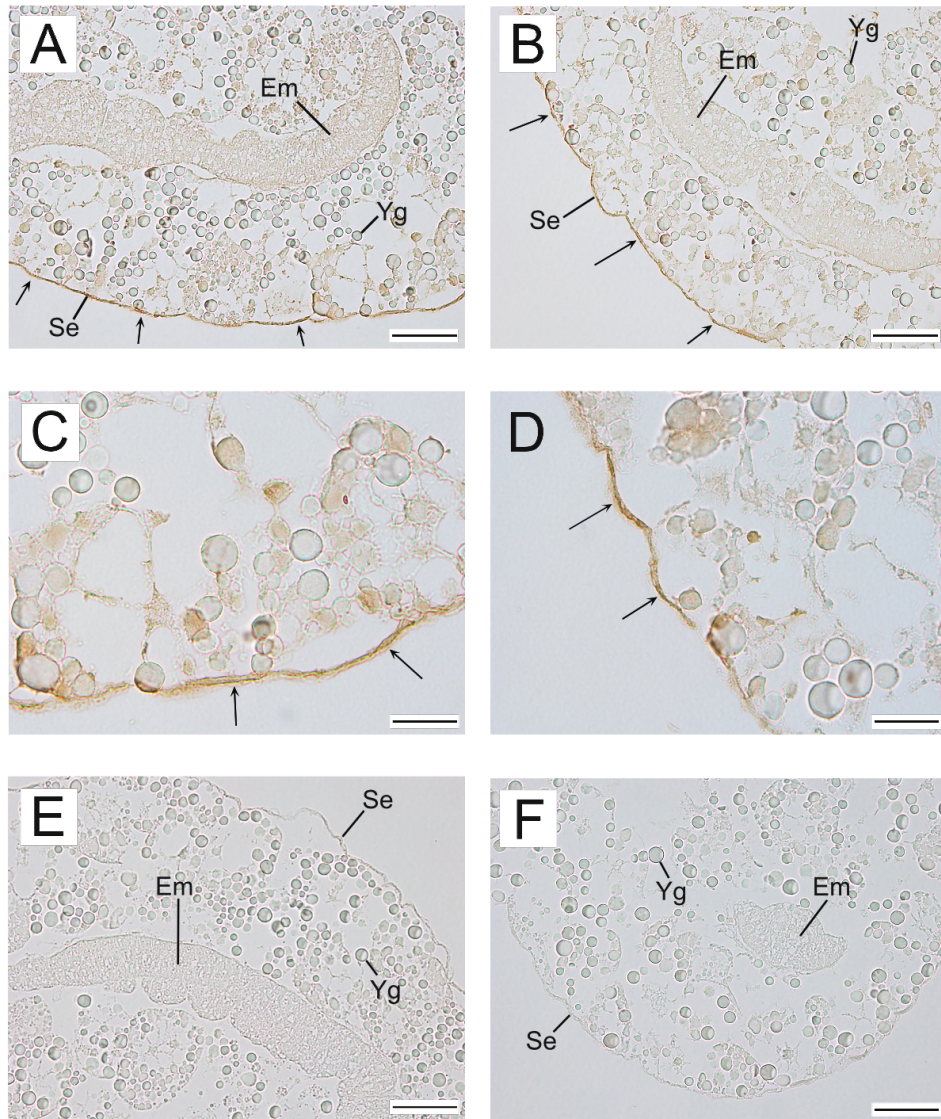


Fig. 24. 免疫組織化学による BmMCSC の分布と局在性

A, C, E は浸酸処理後 0 時間の浸酸処理卵の切片, B, D, F は産卵後 48 時間の休眠卵の切片である。A, B, C, D は抗 BmMCSC 抗血清で処理し, E, F はウサギ正常血清で処理した。免疫陽性部位は茶色に染色されており, 矢印で示している。Se は漿膜細胞, Em は胚子, Yg は卵黄顆粒を示す。A, B, E, F のスケールバーは 50  $\mu\text{m}$ , C, D のスケールバーは 20  $\mu\text{m}$  を示す。

#### 4-4 考察

本章では、BmMCSCの機能を解明するために、まずBmMCSCのアミノ酸配列を解析した。BmMCSCのC末端領域にはミトコンドリアCa<sup>2+</sup>依存的溶質輸送体スーパーファミリーに特徴的な配列が存在し、哺乳類のMCSCとこの配列の相同性が高いことが確認された。また、BmMCSCのN末端領域には2つのEF-handドメインが存在していた (Fig. 20)。ミトコンドリアCa<sup>2+</sup>依存的溶質輸送体スーパーファミリーには、Ca<sup>2+</sup>結合ドメインであるEF-handを含む長鎖のN末端領域を持つlong-Ca<sup>2+</sup>依存的ミトコンドリア輸送体(LCaMCs)とLCaMCsに比べてN末端領域が短いshort-Ca<sup>2+</sup>依存的ミトコンドリア輸送体(SCaMCs)が存在する。LCaMCsはおよそ675アミノ酸から構成されるのに対し、SCaMCsはおよそ480アミノ酸から構成される (Arco et al., 2016)。BmMCSCは667アミノ酸から構成されていることから、BmMCSCはLCaMCsに属するということが明らかとなった。更にBLAST検索を使用した結果、BmMCSCはAralar1と相同性が高いことが判明した。この結果から、BmMCSCの機能はCa<sup>2+</sup>によって制御されている可能性が示唆される。

浸酸処理によって卵殻と卵の中身からCa<sup>2+</sup>が流出することは、過去の報告および第2章で明らかとなっている (Yoshimi et al., 1990; Xian et al., 1997; Kitta et al., 2015)。RT-PCR法を用いた浸酸処理卵におけるBmMCSCの発現解析の結果より、浸酸処理によってBmMCSCの発現が誘導されたことが示された (Fig. 21A)。浸酸処理によって誘導されたBmMCSCの発現上昇は、カイコガ卵から流出する際のCa<sup>2+</sup>が関与しているのではないかと推測される。例えば、浸酸処理によって沈着型のCaがCa<sup>2+</sup>となり、細胞内でセカンドメッセンジャーとして機能した可能性が考えられる。

BmMCSCの興味深い特徴として、N末端に存在する2つのEF-handドメインが挙げられる (Fig. 20)。ミトコンドリアCa<sup>2+</sup>依存的溶質輸送体スーパーファミリーの中でもCa<sup>2+</sup>と結合することが知られているAralar1は、N末端領域に4つのEF-handドメインを有する (Arco and Satrustegui, 1998; Mashima et al., 2003)。BmMCSCはこのAralar1と高い相同性を有し、ドットプロット解析およびオートラジオグラフィよりBmMCSCのCa<sup>2+</sup>結合能が確認されている (Fig. 23)。この結果から、BmMCSCの機能はEF-handドメインにCa<sup>2+</sup>が結合することで調節されていることを強く示唆している。Aralar1のようなLCaMCsは、S<sub>0.5</sub>の値が~300 nMのミトコンドリア外のCa<sup>2+</sup>によって活性化されるのに対し、SCaMCsはS<sub>0.5</sub>の値がμMの範囲で輸送が活性化されることが報告されており、この値はLCaMCsに比べて相当高い (Pardo et al., 2006; Arco et al., 2016)。つまりAralar1は低濃度のCa<sup>2+</sup>によって活性化され機

能していると推測される。BmMCSC も Aralar1 と同様に、低い  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度で輸送体として機能することができると考えられる。なぜならば、カイコガ卵において浸酸処理により  $\text{Ca}^{2+}$ が流出するため、浸酸処理後の  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度は低下している。しかし、BmMCSC の発現は上昇している。このことから、翻訳された BmMCSC はおそらくその低濃度の  $\text{Ca}^{2+}$ で機能を発揮しているのではないかと推測される。

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 (Fig. 24A, C)。産卵後 48 時間の休眠卵と処理後 0 時間の浸酸処理卵において免疫陽性シグナルの違いはみられなかった。しかし、BmMCSC の発現は浸酸処理によって増加していた (Fig. 21A)。浸酸処理によって発現上昇が誘導された遺伝子より翻訳された BmMCSC は、今回の免疫組織化学法では免疫陽性シグナルの違いとして検出されなかったことが考えられる。浸酸処理卵と産卵後 48 時間の休眠卵における BmMCSC の局在は、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が急激に増加した時に備えて一定量の BmMCSC がカイコガ卵に必要なためであると推測する。

カイコガ卵における漿膜細胞とは、卵殻のすぐ内側に存在する単一の細胞層である。休眠卵において、産卵後約 30 時間から漿膜細胞に色素顆粒が蓄積する (Miya, 2003)。カイコガ卵において、浸酸処理法による孵化率は漿膜細胞の形成後から低下する。さらに、もう一つの人工孵化法である DMSO 処理法では漿膜細胞が形成されると効果を示さなくなる (Yamamoto et al., 2013)。卵内から卵外へ  $\text{Ca}^{2+}$ が流出する際には必ず漿膜細胞を通過する。つまり、カイコガの胚子発生および人工孵化において漿膜細胞が重要な役割を担っているのではないかと推測される。

哺乳類において、MCSC は興奮性の組織において特異的に発現しており、ミトコンドリアに局在している (Arco and Satrustegui, 1998)。MCSC はミトコンドリア膜を少なくとも 6 回貫通しており、その N 末端と C 末端は細胞質に突出していることが報告されている。MCSC の N 末端における EF-hand ドメインは膜間腔に面している (Fig. 25)。これらの輸送体は細胞質の  $\text{Ca}^{2+}$ によって調節され、溶質を輸送することでミトコンドリアの基質に細胞質の  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルを伝達することに関与していると考えられている (Arco et al., 2016)。ミトコンドリアにおいて、 $\text{Ca}^{2+}$ の結合によって活性化される MCSC は、代謝物や補因子、核酸の輸送に関与している。BmMCSC に  $\text{Ca}^{2+}$ が結合することは本研究により確認されている。この結果より、BmMCSC は哺乳類の MCSC と似た働きをすることが考えられる。卵外へ  $\text{Ca}^{2+}$ が流出する時に、 $\text{Ca}^{2+}$ が卵内に拡散され、BmMCSC にそれらの  $\text{Ca}^{2+}$ が結合することで活性化していること

が示唆される。活性化された BmMCSC は, ミトコンドリアにおいてエネルギー生産などに関与し, 休眠移行阻害に寄与しているかもしれないと考えている。

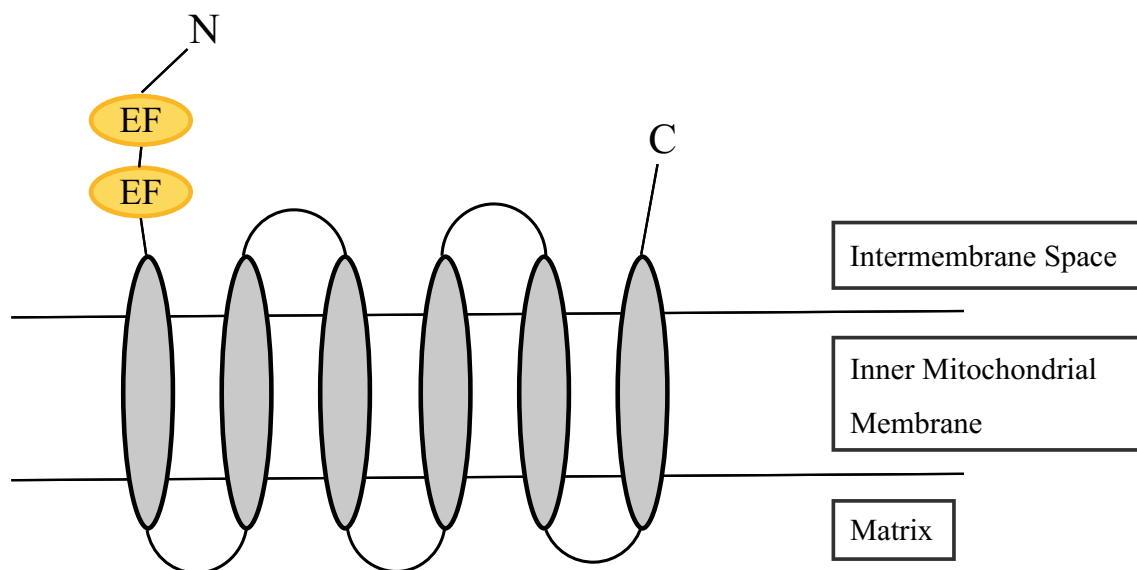


Fig. 25. ミトコンドリア内膜における BmMCSC の模式図

灰色の楕円は膜貫通ドメインを，黄色の楕円の EF は EF-hand ドメインをそれぞれ示している。また，N は N 末端のアミノ酸を，C は C 末端のアミノ酸をそれぞれ示している。

## 第5章 総括

本論文は、カイコガの人工孵化時における分子メカニズム解明の一環として、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実験を行い、その結果をまとめたものである。

これまでも人工孵化法と Ca に関しては、浸酸処理によって Cl<sup>-</sup>が卵殻を透過して漿膜細胞まで達していることおよび卵殻の Ca<sup>2+</sup>量が減少していることが報告されていた (Yoshimi et al., 1990)。また、それらの結果から、卵殻において減少した Ca<sup>2+</sup>が卵殻から卵内へ移行することで休眠が阻害され、胚子発生が再開するのではないかと考察されていた。そこで第2章では卵殻と卵の中身(卵殻以外の全てを含む)を分け、ICP-AES を使用してカイコガ卵における Ca<sup>2+</sup>および Mg<sup>2+</sup>の詳細な定量実験を行った。その結果、浸酸処理卵の卵殻と卵の中身の両方で Ca<sup>2+</sup>量が減少していた。卵殻で Ca<sup>2+</sup>量が減少していたことは過去の報告とも一致していたが、卵の中身においても Ca<sup>2+</sup>量は減少していた。また、浸酸処理に用いた塩酸溶液を測定したところ、Ca<sup>2+</sup>量が増加していた。これらの結果より、浸酸処理卵における Ca<sup>2+</sup>は浸酸処理によってカイコガ卵から卵外へ流出していることが明らかとなった。しかし、Ca<sup>2+</sup>と同様に二価の金属イオンであり、細胞が正常に機能する上で必須である Mg<sup>2+</sup>量に変動はなかった。このことから、浸酸処理により Ca<sup>2+</sup>のみ特異的に流出することが明らかとなった。一方、もう一つの人工孵化法である DMSO 処理卵では Ca<sup>2+</sup>量および Mg<sup>2+</sup>量ともに変動はみられなかった。DMSO 処理法の効果が発揮できる休眠卵の发育ステージは、浸酸処理法のそれと比べて短い (Yamamoto et al., 2013)。つまり、休眠に移行した卵を人工的に孵化させるという現象は浸酸処理法においても DMSO 処理法においても同様であるが、その分子メカニズムは異なるということが推測される。浸酸処理卵の卵殻における Ca<sup>2+</sup>結合性タンパク質は浸酸処理前後で変動がみられなかった。このことから、休眠卵の卵殻および卵の中身に存在していた沈着・結合型の Ca は、浸酸処理によって遊離の Ca<sup>2+</sup>となって卵外へ流出したことが示唆される (Fig. 26)。また、カイコガ卵において主要な金属結合タンパク質は、卵黄タンパク質のピテリンおよび卵特異タンパク質 (ESP) であり、卵黄細胞中の卵黄顆粒に局在している (Niimi et al., 1993)。卵内からの Ca<sup>2+</sup>の流出は、主に卵黄細胞中の卵黄顆粒、胚子および漿膜からであると推測される。しかし、卵黄顆粒中の Ca<sup>2+</sup>が卵外へ流出するには、卵黄顆粒の膜、卵黄細胞の膜、および漿膜を通過しなければならず、これは物理的に困難なことだと思われる。したがって、浸酸処理後も卵内に残っている Ca<sup>2+</sup>は卵黄顆粒中のものだと考えられる。

続いて、人工孵化時における  $\text{Ca}^{2+}$  の役割を解明するために、活性化に  $\text{Ca}^{2+}$  が必須な分子である **BmNOS** および **BmMCSC** に着目して生化学的解析を行った。*BmNOS* および *BmMCSC* はともに、浸酸処理によって遺伝子発現の上昇が確認された。また **BmNOS** は浸酸処理によって酵素活性の上昇も確認された。このことより、**BmNOS** は浸酸処理によって遺伝子の転写が誘導され、酵素活性は転写レベルで調節されているのではないかと推測される。また、*BmMCSC* の発現上昇は、浸酸処理によってカイコガ卵において流動した  $\text{Ca}^{2+}$  が関与しているのではないかと示唆される。**BmMCSC** の N 末端領域には  $\text{Ca}^{2+}$  結合ドメインである EF-hand モチーフが 2 つ存在する。 $^{45}\text{Ca}$  を用いたドットプロット解析より、**BmMCSC** には  $\text{Ca}^{2+}$  が結合することが示された。つまり **BmMCSC** は、EF-hand モチーフに  $\text{Ca}^{2+}$  が結合することでその機能調節をしている可能性がある。浸酸処理によって遊離の  $\text{Ca}^{2+}$  がカイコガ卵から流出する際にカイコガ卵を流動した結果、次の 2 つの細胞内シグナル伝達機構の活性化が起こっているのではないかと推測する。まず、卵黄細胞や漿膜細胞といった特定の細胞で **BmNOS** が  $\text{Ca}^{2+}$  により活性化され、NO を産出し、シグナル伝達を活性化させているのではないか。また、**BmMCSC** の EF-hand モチーフに  $\text{Ca}^{2+}$  が結合することで **BmMCSC** が活性化され、その結果ミトコンドリアでのエネルギー産生に何らかの影響を及ぼしているのではないか。しかし、これらの仮説を立証するには更なる研究が必要である。

免疫組織化学的解析の結果、**BmNOS** は漿膜細胞および卵黄細胞の核周辺、卵黄細胞中の卵黄顆粒にその局在が観察された。また、**BmMCSC** の局在は漿膜細胞の細胞質であった。漿膜細胞とは、卵殻のすぐ内側にある一層の細胞層であり、休眠卵における茶褐色のオモクロームによる色素形成もこの漿膜細胞において行われる。X 線マイクロアナライザーを用いた実験より、浸酸処理によって Cl がこの漿膜細胞まで透過していることが確認されている。浸酸処理に伴って  $\text{Ca}^{2+}$  が卵内から卵外へ流出する際には、必ず漿膜細胞を通過しなければならない (Fig. 27)。これらことから、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  $\text{Ca}^{2+}$  関連分子が重要な役割を担っている可能性が考えられる。

## カイコガ休眠卵

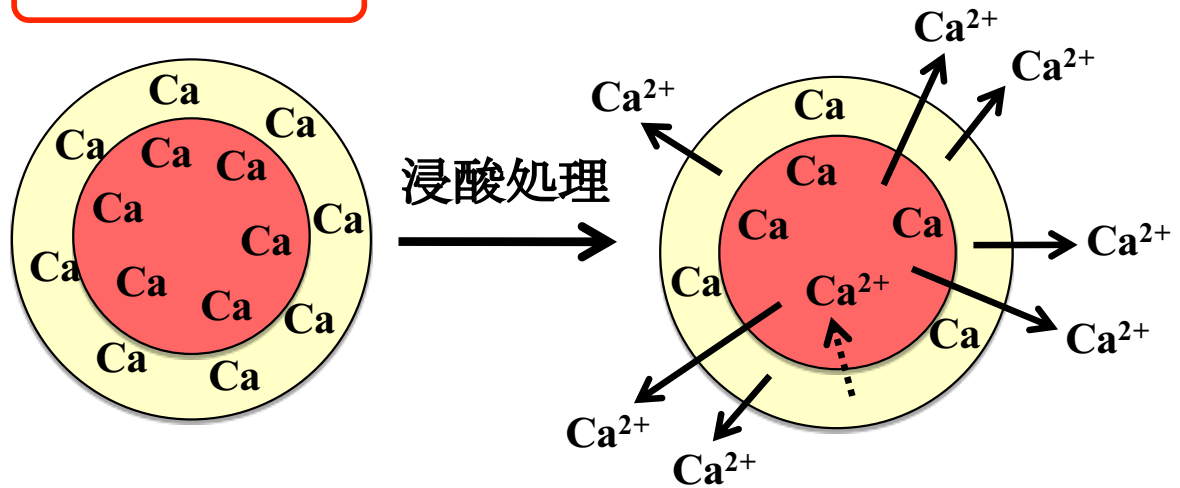


Fig. 26. 浸酸処理に伴う  $\text{Ca}^{2+}$ 流出の概略図

黄色の円が卵殻を，赤い円が卵の中身を示している。卵殻および卵の中身において沈着・結合型の  $\text{Ca}$  が浸酸処理によって遊離の  $\text{Ca}^{2+}$  となり卵外へ流出する様子である。点線の矢印は，卵殻における  $\text{Ca}^{2+}$  の一部が卵の中身へ移行している可能性を示している。



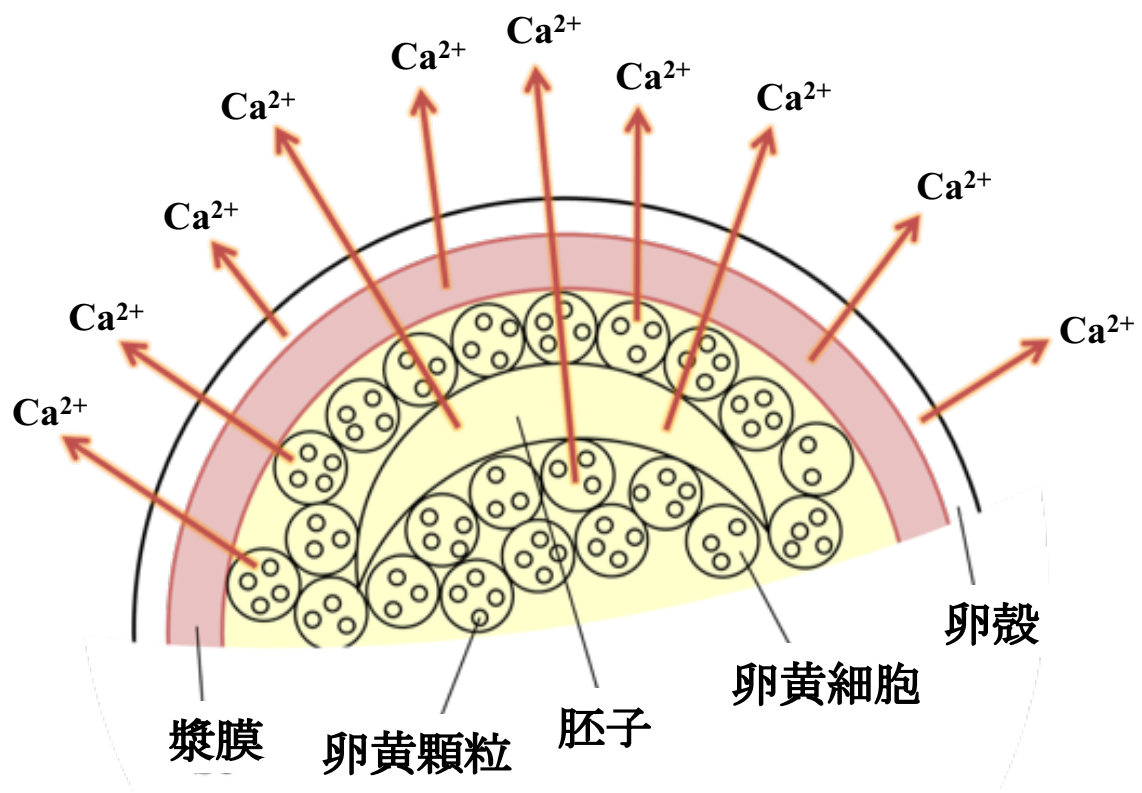


Fig. 27. 浸酸処理によってカイコガ卵の中身より  $\text{Ca}^{2+}$  が流出する様子

最も外側の白い半円は卵殻，その内側の赤い半円は漿膜細胞層，最も内側の黄色い部分は胚子，卵黄細胞，卵黄顆粒から成る卵内容物である。赤い矢印は  $\text{Ca}^{2+}$  の流出を示している。

## 参考文献

Aktan F (2004)

iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation.

Life Sciences, 75: 639-653

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001)

Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition.

Biochemical Journal, 357: 593-615

Arco AD, Satrústegui J (1998)

Molecular cloning of Aralar, a new member of the mitochondrial carrier superfamily that binds calcium and is present in human muscle and brain.

Journal of Biological Chemistry, 273: 23327-23334

Arco AD, Satrústegui J (2005)

New mitochondrial carriers: an overview.

Cellular and Molecular Life Sciences, 62: 2204-2227

Arco AD, Contreras L, Pardo B, Satrústegui J (2016)

Calcium regulation of mitochondrial carriers.

Biochimica et Biophysica Acta, Molecular Cell Research, 1863: 2413-2421

Ascenzi P, Gradoni L (2002)

Nitric oxide limits parasite development in vectors and in invertebrate intermediate hosts.

IUBMB Life, 53: 121-123

Bassi MT, Manzoni M, Bresciani R, Pizzo MT, Monica AD, Barlati S, Monti E, Borsani G (2005)

Cellular expression and alternative splicing of *SLC25A23*, a member of the mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent solute carrier gene family.

Gene, 345: 173-182

Bowen MF, Bollenbacher WE, Gilbert LI (1984)

In vitro studies on the role of the brain and prothoracic glands in the pupal diapause of *Manduca sexta*.

Journal of Experimental Biology, 108: 9-24

Chippendale GM, Yin CM (1979)

Larval diapause of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*: further experiments examining its hormonal control.

Journal of Insect Physiology, 25: 53-58

Chomczynski P, Sacchi N (1987)

Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.

Analytical Biochemistry, 162: 156-159

Davies S (2000)

Nitric oxide signalling in insects.

Insect Biochemistry and Molecular Biology, 30: 1123-1138

Denlinger DL (1985)

Hormonal control of diapause. In "Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, vol. 8."

Eds by Kerkut GA, Gilbert LI, Pergamon Press, Oxford, pp 353-412

Foley E, O'Farrell PH (2003)

Nitric oxide contributes to induction of immune responses to gram-negative bacteria in *Drosophila*.

Genes & Development, 17: 115-125

Gibbs SM, Truman JW (1998)

Nitric oxide and cyclic GMP regulate retinal patterning in the optic lobe in *Drosophila*.

Neuron, 20: 83-93

Goto SG, Matsumoto K (2018)

Photoperiodism, Insects

Encyclopedia of Reproduction, 6: 420-425

Gültekin H, Heermann KH (1988)

The Use of Polyvinylidenedifluoride Membranes as a General Blotting Matrix.

Analytical Biochemistry, 172: 320-329

Homma T, Watanabe K, Tsurumaru S, Kataoka H, Imai K, Kamba M, Niimi T, Yamashita O, Yaginuma T (2006)

G protein-coupled receptor for diapause hormone, an inducer of *Bombyx* embryonic diapause.

Biochemical and Biophysical Research Communications, 344: 386-393

Imamura M, Yang J, Yamakawa M (2002)

cDNA cloning, characterization and gene expression of nitric oxide synthase from the silkworm, *Bombyx mori*.

Insect Molecular Biology, 11: 257-265

Kitazawa T, Kanda T, Takami T (1963)

Changes of mitotic activity in the silkworm eggs in relation to diapause.

Bulletin of the Imperial Sericultural Experiment Station, 18: 283

Kitta R, Okawa S, Saito M, Mase K, Sawada H (2015)

HCl treatment for preventing diapause causes Ca<sup>2+</sup> efflux in *Bombyx mori* eggs.

Zoological Science, 32: 124-128

Knowles RG, Moncada S (1994)

Nitric oxide synthases in mammals.

Biochemical Journal, 298: 249-258

Kogure M (1933)

The influence of light and temperature on certain characters of the silkworm, *Bombyx mori*.

Journal of the Department of Agriculture, Kyushu Imperial University, 4: 1-93

Kuo RC, Baxter GT, Thompson SH, Stricker SA, Patton C, Bonaventura J, Epel D (2000)

NO is necessary and sufficient for egg activation at fertilization.

Nature, 406: 633-636

Kurihara M, Ando Y (1969)

The effect of mercury compounds on breaking of diapause in the eggs of the false melon beetle, *Atrachya menestriesi* faldermann (coleoptera : chrysomelidae).

Applied Entomology and Zoology, 4 (3): 149-151

Laemmli UK (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature, 227: 680-685

Marcovitch S (1923)

Plant lice and light exposure.

Science, 58: 537-538.

Mashima H, Ueda N, Ohno H, Suzuki J, Ohnishi H, Yasuda H, Tsuchida T, Kanamaru C, Makita N, Iiri T, Omata M, Kojima I (2003)

A novel mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-dependent solute carrier in the liver identified by mRNA differential display.

Journal of Biological Chemistry, 278: 9520-9527

松前 紀光 (2004)

休眠の昆虫学 -季節適応の謎- (田中誠二・檜垣守男・小滝豊美 編), pp 1-313. 東海大学出版会, 神奈川

Miya K (2003)

The early embryonic development of *Bombyx mori*.

Eds by Yaginuma T, Suzuki K, Gendaitosho, Sagamihara

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

Müller U, Hildebrandt H (2002)

Nitric oxide/cGMP -mediated protein kinase A activation in the antennal lobes play an important role in appetitive reflex habituation in the honeybee.

Journal of Neuroscience, 22: 8739-8747

Nakagaki M, Takei R, Nagashima E, Yaginuma T (1991)

Cell cycles in embryos of the silkworm, *Bombyx mori*: G<sub>2</sub>-arrest at diapause stage

Roux's Archives of Developmental Biology, 200: 223-229

南條 光章 (2009)

休眠. 「分子昆虫学 ポストゲノムの昆虫研究」 (神村学・日本典秀・葛西真治・竹内秀明・畠山正統・石橋純 編), pp 164-171. 共立出版株式会社, 東京

Niimi T, Yoshimi T, Yamashita O (1993)

Vitellin and egg-specific protein as metal-binding proteins of the silkworm, *Bombyx mori*.

Journal of Sericultural Science of Japan, 62: 310-318

Nijhout HF (1994)

Insect hormones.

Princeton University press, New Jersey, pp1-267

Ohtaki T, Takahashi M (1972)

Induction and termination of pupal diapause in relation to the change of ecdysone titer in the fleshfly, *Sarcophaga peregrine*.

Japanese journal of medical science and biology, 25: 369-376

Palmieri F (2004)

The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications.

European Journal of Physiology, 447: 689-709

Palmieri F (2013)

The mitochondrial transporter family SLC25: Identification, properties and physiopathology.

Molecular Aspects of Medicine, 34: 465-484

Palmieri L, Pardo B, Lasorsa FM, Arco AD, Kobayashi K, Iijima M, Runswick MJ, Walker JE, Saheki T, Satrústegui J, Palmieri F (2001)

Citrin and aralar1 are  $Ca^{2+}$ -stimulated aspartate/glutamate transporters in mitochondria.

EMBO Journal, 20: 5060-5069

Pardo B, Contreras L, Serrano A, Ramos M, Kobayashi K, Iijima M, Saheki T, Satrústegui J (2006)

Essential role of Aralar in the transduction of small  $Ca^{2+}$  signals to neuronal mitochondria.

Journal of Biological Chemistry, 281: 1039-1047

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, Yamamoto T, Togawa T, Mase K (2012)

Developmental changes in the localization of protein kinase CK2 in non-diapause and diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*.

Zoological Science, 29: 6-10

嶋田 透, 嶋田 正和, 竹田 敏, 鎮西 康雄, 寺山 守, 山元 大輔 (2009)

昆虫学の基礎. 「最新応用昆虫学」 (田付貞洋・河野義明 編), pp 62-69, 216-217. 朝倉書店, 東京

Siegl T, Schachtner J, Holstein GR (2009)

NO/cGMP signaling: L-citrulline and cGMP immunostaining in the central complex of the desert locust *Schistocerca gregaria*.

Cell and Tissue Research, 337: 327-340

Sonobe H, Ohnishi E (1970)

Accumulation of 3-hydroxykynurenine in ovarian follicles in relation to diapause in the silkworm, *Bombyx mori* L.

Development, Growth and Differentiation, 12 (1): 41-51

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

Stricker SA (1999)

Comparative biology of calcium signaling during fertilization and egg activation in animals.

Developmental Biology, 211: 157-176

Suzuki K, Minagawa T, Kumagai T, Naya S, Endo Y, Osanai M, Kuwano E (1990)

Control mechanism of diapause of the pharate first-instar larvae of the silkworm *Antheraea yamamai*.

Journal of Insect Physiology, 36 (11): 855-860

Towbin H, Staehlin T, Gordon J (1979)

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitro-cellulose sheets: procedure and some applications.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 76: 4350-4354

- 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
- Walker GP, Denlinger DL (1980)  
Juvenile hormone and moulting hormone titres in diapause- and non-diapause destined flesh flies.  
*Journal of Insect Physiology*, 26: 661-664
- Weber FE, Ministrini G, Dyer JH, Werder M, Boffelli D, Compassi S, Wehrli E, Thomas RM, Schulthess G, Hauser H (1997)  
Molecular cloning of a peroxisomal Ca<sup>2+</sup>-dependent member of the mitochondrial carrier superfamily.  
*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94: 8509-8514
- Wilde JD, Boer JA (1961)  
Physiology of diapause in the adult colorado beetle- II diapause as a case of pseudo-allatectomy.  
*Journal of Insect Physiology*, 6: 152-161
- Wilde JD, Boer JA (1969)  
Humoral and nervous pathways in photoperiodic induction of diapause in *Leptinotarsa decemlineata*.  
*Journal of Insect Physiology*, 15: 661-675
- Xian X, Ozaki M, Kobayashi M (1997)  
Changes of quantity and form of calcium in the silkworm egg induced by artificial hatching treatment.  
*Journal of Sericultural Science of Japan*, 66 (3): 219-221 (in Japanese)
- Yagi S, Fukaya M (1974)  
Juvenile hormone as a key factor regulating larval diapause of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae).  
*Applied Entomology and Zoology*, 9 (4): 247-255
- Yaginuma T, Kobayashi M, Yamashita O (1990)  
Effects of low temperatures on NAD-sorbitol dehydrogenase activity and morphogenesis in non-diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*.  
*Comparative Biochemistry and Physiology*, 97B (3): 495-506



- Yamahama Y, Uto N, Tamotsu S, Miyata T, Yamamoto Y, Watabe S, Takahashi SY (2003)  
In vivo 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 (6): 446-455
- Yamamoto T, Sawada H (2008)  
In-vitro phosphorylation activity by recombinant  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of *Bombyx mori* casein kinase 2.  
*Zoological Science*, 25: 799-805
- Yamamoto T, Mase K, Sawada H (2013)  
Diapause prevention effect of *Bombyx mori* by dimethyl sulfoxide.  
*PLoS One*, 8: e64124
- Yamashita O, Hasegawa K (1985)  
Embryonic diapause. In "Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, vol. 1."  
Eds by Kerkut GA, Gilbert LI, Pergamon Press, Oxford, pp 407-434
- Yang P, Abe S, Zhao Y, An Y, Suzuki K (2004)  
Growth suppression of rat hepatoma cells by a pentapeptide from *Antheraea yamamai*.  
*Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, 73: 7-13
- Yoshimi T, Shikata M, Furusawa T, Tada M (1985)  
Analysis of sodium, and calcium in the egg shell of the silkworm by X-ray microanalyzer.  
*Journal of Sericultural Science of Japan*, 54 (6): 510-515 (in Japanese)
- Yoshimi T, Shikata M, Furusawa T, Tada M (1986)  
Chlorine distribution in the shells, and pH value of the contents from *Bombyx* eggs treated with HCl.  
*Journal of Sericultural Science of Japan*, 55 (3): 197-201 (in Japanese)
- Yoshimi T, Furusawa T, Yamashita O (1990)  
Localization of  $\text{Cl}^-$  in the eggs of the silkworm, *Bombyx mori*, treated with HCl.  
*Journal of Sericultural Science of Japan*, 59: 14-21

Zhu Y, Silverman RB (2008)

Revisiting heme mechanisms. A perspective on the mechanisms of nitric oxide synthase (NOS), heme oxygenase (HO), and cytochrome P450s (CYP450s).

Biochemistry, 47: 2231-2243

## 謝辞

本研究を遂行するために基礎から丁寧に実験手法をお教えいただいたこと、学位論文としてまとめるに当たり適切な御指導と御助言を頂いたこと、また主査として審査を快くお引き受け頂いた、日本大学文理学部生命科学科の澤田博司教授に心より御礼申し上げます。

副査としてご指導を賜りました日本大学文理学部生命科学科の間瀬啓介教授には、本論文作成ならびに実験材料として使用したカイコガの飼育等に関して御指導と御助言を頂いたこと、深く御礼申し上げます。神奈川大学理学部生物科学科の泉進教授には、快く副査として審査をお引き受け頂いたことおよび本論文を作成するに当たり貴重な御助言を頂いたこと、深く御礼申し上げます。同じく副査としてご指導を賜りました日本大学文理学部化学科の橋本伸哉教授には、本論文を作成するに当たり貴重な御指導、御助言を頂いたこと、深く御礼申し上げます。

日本大学文理学部生命科学科の外川徹先生には、研究を進めるにあたり有用な御助言をいただきました。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山本貴之先生には、 $^{45}\text{Ca}$ を用いたオートラジオグラフィーの実験施設の利用等で御助力いただきました。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先生には、免疫組織化学解析に使用したカイコガ卵の切片を作製して頂き、御助言をいただきました。皆様に深く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、御助言を頂いた日本大学文理学部生命科学科の教職員の皆様に御礼申し上げます。

最後にいつも温かく見守り、応援してくれた家族に感謝いたします。