

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2009～2011

課題番号：21248007

研究課題名（和文）

カイコ卵の休眠開始と低温受容・伝達に係わる遺伝子の単離と作用機序の解明

研究課題名（英文）

Molecular cloning and characterization of genes responsible for the diapause-initiation and the diapause-termination induced by cold in *Bombyx mori* eggs

研究代表者

柳沼 利信 (YAGINUMA TOSHINOBU)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：60135332

研究成果の概要（和文）：

カイコ胚休眠の開始に関わる遺伝子として知られていた *pnd-1* 及び *-2* 遺伝子をポジショナルクローニング法と RNA 干渉法の併用により単離した。休眠ホルモン・シグナルと *pnd* 遺伝子発現を結びと考えられる遺伝子を DNA マイクロアレイ解析から単離した。5°C シグナルを伝達する因子として熱ショックファクター（HSF）転写因子の遺伝子を単離した。HSF が早期低温誘導性遺伝子の *Samui* と *HSP70* 発現の活性化の要因であることを示した。

研究成果の概要（英文）：

We cloned *pnd-1* and *-2* genes that have been known as genes initiating *Bombyx mori* embryonic diapause, using both procedures of positional cloning and RNA interference. We also cloned a strong candidate gene connected the diapause hormone signal to the expression of *pnd* genes, using DNA microarray analysis. We isolated a gene for heat shock transcription factor (HSF) as a factor transducing the 5°C signal. HSF was shown to bind to heat shock elements at 5'-upstreams of *heat shock protein 70a* and *Samui* genes to confer their transcription activities.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	16,600,000	4,980,000	21,580,000
2010年度	8,500,000	2,550,000	11,050,000
2011年度	8,600,000	2,580,000	11,180,000
総計	33,700,000	10,110,000	43,810,000

研究分野：蚕糸学・分子昆虫学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：カイコ、胚休眠、休眠開始遺伝子、休眠覚醒、低温誘導性遺伝子、低温シグナル受容・伝達

1. 研究開始当初の背景

カイコの胚休眠は休眠ホルモンが雌蛹期の発育卵巣に作用することで誘導されるが、実際休眠が開始される時期は産卵受精後の中胚

葉形成完了の胚両端部が肥大した直後（産卵後2～3日後）である。25°Cに保護される卵では約一年間休眠が維持される。一方、休眠覚醒は、約60日間以上5°Cに卵を冷蔵することによってもたらされる。

2. 研究の目的

本課題では、休眠開始および 5°C 処理による休眠覚醒に関わる遺伝子を単離することを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) ポジショナルクローニング
- (2) 相同性 PCR 法
- (3) DNA マイクロアレイ法
- (4) 定量的リアルタイム PCR 法
- (5) RNA 干渉法
- (6) *In situ* hybridization

4. 研究成果

(1) 休眠ホルモンによる発育卵巣トレハラーゼの活性促進は *trehalase-2* タンパク質に由来することを明らかにした。

休眠ホルモンは、蛹期の発育卵巣に作用し、卵母細胞内に胚休眠のための準備を進める。一例として、グリコーゲン量の蓄積促進がある。血糖トレハロースを卵母細胞膜上のトレハラーゼが二分子のグルコースに分解し、卵母細胞内に取り込む。このグルコースを素材としてグリコーゲンが蓄積され、休眠開始後に蓄積される耐寒性剤ソルビトールやグリセロールの前駆体となる。

① カイコには可溶性と膜結合型トレハラーゼ遺伝子 (*trehalase-1*, *-2*) があるが、それぞれのタンパク質を特異的に認識する抗体を用いたウエスタンブロット法により卵母細胞膜分画のトレハラーゼは *trehalase-2* 由来であることを示した。

② 同時に、定量的リアルタイム PCR 法により、膜結合型トレハラーゼの mRNA 量は可溶性に比較し、圧倒的に多いことを示した。

(2) 完成 (成熟) 卵において休眠ホルモン・シグナルが発現抑制する遺伝子を単離することができた。

休眠ホルモン・シグナルが胚休眠開始に向けて伝達されているとすれば、受精前の完成 (成熟) 卵において何らかの遺伝子発現の差異が認められるものと考えられた。

① 休眠ホルモンの合成器官である食道下神経節を、休眠卵産生カイコの蛹化当日に摘出した実験区 (休眠ホルモン無) と何もしない対照区 (休眠ホルモン有) を準備した。

② 羽化当日に、両区の雌蛾から完成卵を摘出し、全 RNA を抽出した。DNA マイクロアレイ法を駆使し、発現に差異のある遺伝子を網羅的に解析した。

③ 休眠ホルモンによって発現が促進される割合よりも大幅に抑制される遺伝子が見出

された。

④ この遺伝子は、産卵・受精後の非休眠性卵では発現が高く、休眠性卵では発現が低かった。さらに、休眠卵を 5°C 処理により休眠覚醒を誘導する場合に、低温処理期間の増加に従って、この遺伝子発現は増加した。

⑤ 以上のことから、この遺伝子の発現を抑制することによって休眠ホルモン・シグナルが伝達されると推測した。

(3) 休眠開始遺伝子を単離することができた。

pnd (*pigmented and non-diapausing egg*) と名付けられた突然変異カイコでは、雌雄蛾が *pnd* 突然変異体であると、交尾後産下された卵は着色性非休眠卵になるが、*pnd* 雌蛾と野生型雄 (休眠性に関係なく) を交配させると産下卵は着色性休眠卵となる。漿膜の着色は休眠ホルモン・シグナルが受容されたことを意味するので、実際の休眠は受精核由来の *pnd* のタンパク質の働きによって開始するものと考えられている。

① *pnd-1* と *pnd-2* の遺伝子が知られている。これらの突然変異体と野生型を用いた交配・戻し交配を繰り返すポジショナルクローニングを進め、数種の候補遺伝子まで絞り込んだ。

② 次に、それぞれの ORF に対応した二本鎖 RNA を作製し、多核性胞胚期の休眠性卵に注射し、休眠性に変化が認められるかという RNAi 法を試みた。

③ RNAi により、休眠胚の発育段階より発育が進んだ卵を観察できたことから、*pnd-1* と *pnd-2* 遺伝子が単離できたと判断した。

④ しかも、それぞれの ORF から推定されるアミノ酸配列から、*pnd-1* タンパク質は分泌型、*pnd-2* タンパク質は膜結合型と判断できた。

⑤ *In situ* hybridization、免疫組織化学やウエスタンブロット法により、それぞれ遺伝子の発現解析を進めている。

(4) 低温誘導性遺伝子としてのソルビトール脱水素酵素-2a, 2b 遺伝子を単離し、発現解析を進めた。

休眠開始に伴いグリコーゲンから変換されたソルビトールとグリセロールは、5°C 低温処理による休眠覚醒に伴い減少し、グリコーゲンへと変換する。この変換パターンは 5°C による胚発育能賦与パターンと一致することから、休眠覚醒の分子マーカーとして用いられる。

① ソルビトール脱水素酵素 (SDH) *-2a, b* の 2 遺伝子を単離し、これらの遺伝子も低温誘導性であることを示した。

② SDH-2 は、SDH-1 と比較すると基質のソルビトールに対して親和性がより高い。

③ 5°C処理により誘導される酵素活性を指標に精製された酵素はSDH-1に対応すると判断された。

④ 第21染色体上にSDH遺伝子がSDH-2a、SDH-2b、SDH-1の順でタンデムに並んでいることを示した。

⑤ まず、SDH-1遺伝子とSDH-2遺伝子に分かれ、その後、SDH-2遺伝子からSDH-2a遺伝子とSDH-2b遺伝子に分岐したと考えられる。SDH-1遺伝子は休眠中に約150 mMという高濃度で蓄積するソルビトールに対応するように進化した。

(5) 低温誘導性遺伝子としてのグリセロールキナーゼ-3遺伝子を単離し、発現解析を進めた。

休眠中にグリセロールを蓄積する昆虫種は知られているが、グリセロールを再利用する鍵酵素は必ずしも明らかになっていないわけではない。

① グリセロールキナーゼ(GK)活性が5°C処理により誘導されることから、休眠覚醒に伴うグリセロール利用の鍵酵素はGKであることを明らかにした。

② GK-1、-2、-3の3遺伝子を単離し、GK-3遺伝子だけが低温誘導性であることから、低温誘導性の酵素活性はGK-3遺伝子から生じるものと判断した。

(6) 熱ショックタンパク質70(HSP70)と熱ショックファクター(HSF)遺伝子を単離し、機能解析を進めた。

低温誘導性遺伝子SDHやGK-3は5°C処理40~60日後に出現・増加する。外部シグナルとしての5°CはどのようにSDHやGK-3遺伝子発現に結びつくのか?この考えの中でSamui遺伝子が単離された。Samui遺伝子発現は5°C処理5~6日後から活性化され、冷蔵20日後にピークを迎え、その後減少する。Samuiタンパク質はBAG-タンパク質ファミリーの一員であり、HSP70と相互作用し、核に移行可能なタンパク質であることから5°Cシグナルを担う遺伝子と考えられた。

① HSP70遺伝子を単離し、この遺伝子発現もSamuiと同様に5°C処理5~6日後に活性化されることを見出した。

② 熱ショックタンパク質発現の調節因子としてHSF転写因子が知られているので、カイコHSF遺伝子を単離した。

③ Alternative splicingによりHSFa2、b、c、dの4種類のmRNAが生じ、HSPd mRNA発現が5°C処理6~8日後に活性化された。

④ HSF転写因子が認識結合する熱ショック・エレメントがSamui及びHSP70遺伝子の5'-上流域に見出された。

⑤ 一番サイズが大きいHSFd転写因子を無細胞系のタンパク質発現系で合成し、Samuiと

HSP70の熱ショック・エレメントを用いて、ゲルシフト解析を行ったところ、これらの熱ショック・エレメントに特異的に結合した。

⑥ 以上の結果は、HSFd転写因子が5°Cシグナルを受容し、同型三量体を形成し、核内に侵入し、SamuiとHSP70遺伝子の5'-上流域の熱ショック・エレメントに結合し、遺伝子発現を活性化することを示唆した

(7) 今後の課題

① 休眠ホルモンが作用するのが雌蛹中期の発育卵巣である。この時期に受容された休眠ホルモン・シグナルはどのように休眠開始遺伝子pnd発現に結びつくのか?完成卵において休眠ホルモン・シグナルにより抑制される遺伝子が、この間を繋ぐ遺伝子ではないかと考えられる。

② pnd遺伝子が、休眠ホルモン・シグナル受容下ではどのように発現するように調節されているのか?pnd遺伝子は具体的にどのように休眠開始(細胞分裂停止や酸素消費量の減少)をもたらすのか?

③ 5°Cシグナルは、どのようにしてHSFdの同型三量体形成を促進するのか?

④ SDHやGK-3遺伝子の低温誘導性はどのような転写因子によって遂行されるのか?などが今後の課題である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計8件)

(1) Kamei, Y., Hasegawa, Y., Niimi, T., Yamashita, O. and Yaginuma, T. (2011) *trehalase-2* protein contributes to trehalase activity enhanced by diapause hormone in developing ovaries of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, 57 (5), 608-613. 査読有

(2) Rubio, R.O., Suzuki, A., Mitsumasu, K., Homma, T., Niimi, T., Yamashita, O. and Yaginuma, T. (2011) Cloning of cDNAs encoding sorbitol dehydrogenase-2a and b, enzymatic characterization and up-regulated expression of the genes in *Bombyx mori* diapause eggs exposed to 5°C. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 41 (6), 378-387. 査読有

(3) Kihara, F., Niimi, T., Yamashita, O. and Yaginuma, T. (2011) Heat shock factor binds to heat shock elements at 5'-upstreams of *heat shock protein 70a* and *Samui* genes to confer their transcription activities in *Bombyx mori* diapause eggs exposed to 5°C. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 41 (11), 843-851. 査読有

(4) Moribe, Y., Oka, K., Niimi, T., Yamashita, O. and Yaginuma, T. (2010) Expression of heat shock protein 70a mRNA in *Bombyx mori* diapause eggs. *J. Insect Physiol.*, 56, 1246-1252. 査読有

(5) Tsurumaru, S., Kawamori, A., Mitsumasu, K., Niimi, T., Imai, K., Yamashita, O. and Yaginuma, T. (2010) Disappearance of chorion proteins in *Bombyx mori* eggs treated with HCl solution to prevent diapause. *J. Insect Physiol.*, 56, 1721-1727. 査読有

(6) Ohta, H., Tsuchihara, K., Mitsumasu, K., Yaginuma, T., Ozoe, Y. and Asaoka, K. (2009) Comparative pharmacology of two D1-like dopamine receptors cloned from the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 39, 342-347. 査読有

(7) Mitsumasu, K., Tanaka, Y., Niimi, T., Yamashita, O. and Yaginuma, T. (2009) Novel gene encoding precursor protein consisting of possible several neuropeptides expressed in brain and frontal ganglion of the silkworm, *Bombyx mori*. *Peptides*, 30, 1233-1240. 査読有

(8) Kihara, F., Itoh, K., Iwasaka, M., Niimi, T., Yamashita, O. and Yaginuma, T. (2009) Glycerol kinase activity and *glycerol kinase-3* gene are up-regulated by acclimation to 5°C in diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 39, 763-769. 査読有

[学会発表] (計 11 件)

(1) Yaginuma, T., Suzuki, A., Kihara, F., Kamei, Y., Niimi, T., Yamashita, O.: *Bombyx mori* embryonic diapause: transducers of diapause hormone signal for diapause initiation and 5°C signal for diapause termination. The Sixth International Symposium on Molecular Insect Science, 2011 年 10 月 2-5 日, アムステルダム.

(2) 柳沼利信: 温暖化と昆虫-特に休眠の観点から-. 名古屋大学大学院生命農学研究科附属フィールド科学教育研究センター東郷フィールド講演会. 2010 年 6 月 26 日. 東郷町.

(3) 柳沼利信: 形質と環境-カイコ胚休眠の観点から-. 日大理学部自然科学研究所シンポジウム「動物の不思議を科学する」. 2009 年 6 月 20 日, 日本大学.

[図書] (計 3 件)

(1) 柳沼利信・新美輝幸・塩見邦博 (2011) 休眠ホルモンによるカイコ胚休眠の調節. 脱皮・変態の生物学-昆虫と甲殻類のホルモン作用の謎を追う- (園部治之・長澤寛道編), pp. 263-285, 東海大学出版会, 神奈川.

(2) 柳沼利信 (2010) 低温誘導性遺伝子 *Samui*. 昆虫の低温耐性-その仕組みと調べ方- (積木久明・田中一裕・後藤三千代編), pp. 225-233, 岡山大学出版会, 岡山.

(3) 柳沼利信 (2009) カイコ胚休眠の生化学・分子生物学. 虫たちが語る生物学の未来 (衣笠会編), pp.146-153, (財団法人) 衣笠会, 京都.

[その他]

ホームページ等

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~yousan/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳沼 利信 (YAGINUMA TOSHINOBU)
名古屋大学大学院生命農学研究科・教授
研究者番号: 60135332

(2) 研究分担者

新美 輝幸 (NIIMI TERUYUKI)
名古屋大学大学院生命農学研究科・助教
研究者番号: 00293712

池田 素子 (IKEDA MOTOKO)
名古屋大学大学院生命農学研究科・准教授
研究者番号: 20262892

門野 敬子 (KADONO KEIKO)
(独) 農業生物資源研究所・主任研究員
研究者番号: 40355722

塩見 邦博 (SHIOMI KUNIHIRO)
信州大学繊維学部・准教授
研究者番号: 70324241