

## 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5月15日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580068

研究課題名（和文） カイコの胚子活性化時における新規一酸化窒素合成酵素スプライシングバリエーションの役割

研究課題名（英文） The role of the splicing variant of NOS during the early embryonic development of the silkworm, *Bombyx mori*

研究代表者

澤田 博司 (SAWADA HIROSHI)

日本大学・文理学部・教授

研究者番号：60196326

研究成果の概要（和文）：

本研究は、カイコ休眠卵を浸酸処理し休眠移行を阻害した際に特異的に発現する一酸化窒素合成酵素（NOS）の新規スプライシングバリエーション（NovNOS-V）を見出し、NovNOS-VがNOS遺伝子の35残基のアミノ酸に相当する一つのエクソンを除いて合成されること及びNOS遺伝子が22のエクソンと21のイントロンで構成されていること等を明らかにした。また、休眠卵、非休眠卵、浸酸処理休眠卵でのNOSの遺伝子発現と酵素活性を解析した。その結果、活性変動は転写レベルでなく、翻訳後の修飾による可能性が示唆された。更に、抗NOS抗体を用いた免疫組織化学的解析を行ったところ、NOSは卵黄細胞に局在していることも明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

A splicing variant of nitric oxide synthase (NOS) was found in HCl-treated diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. The splicing variant (NovNOS-V) lacked one exon of NOS gene that was encoded 35 amino acid residue, and NovNOS-V mRNA was expressed just after HCl-treatment. NOS gene expression and NOS activity were also examined with non-diapause, diapause and HCl-treated diapause eggs, respectively. These gene expressions were not parallel with the changes in NOS activity. These results suggest that the changes in NOS activity are regulated mainly at the level of post-transcription during embryonic development in *B. mori*. Furthermore, the distribution and localization of NOS were investigated by an immunohistochemical technique using antibodies against the universal NOS, and the localization of NOS was observed mainly in yolk cells in HCl-treated diapause eggs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫

キーワード：応用昆虫

## 1. 研究開始当初の背景

申請者は、これまでカイコの休眠・非休眠卵、浸酸処理を施し胚子を活性化させた休眠卵等を材料に用いて発生初期に発現する遺伝子の解析を行ってきた。いくつかの分子の解析中、一酸化窒素合成酵素 (NOS) 遺伝子が非休眠卵の発生に伴って発現が強くなる興味深い変動が認められた。更に、浸酸処理直後に本来の分子サイズより小さい DNA のバンドが電気泳動上で確認されたので、その解析を行った結果、既に報告されているカイコ NOS (Imamura et al., *Insect Mol. Biol.*, 2002) 中の 35 残基のアミノ酸に相当する配列のみが欠損していた。NOS は、L-アルギニンを基質にし一酸化窒素 (NO) を合成する酵素である。生成した NO は、受容体を介することなく直接不活性型のグアニル酸シクラーゼのヘムに結合し、酵素を活性化させサイクリック GMP (cGMP) を合成することによって cGMP が関与する情報伝達系を活性化する事が明らかとなり、細胞内情報伝達分子として近年注目されている。しかし、昆虫の初期発生に関与する NO や NOS に関する報告は今までにない。報告者が見出したこの新規 NOS スプライシングバリエント (NovNOS-V) は浸酸処理直後に特異的に発現し胚子活性化のために機能する極めて重要な役割を担っている分子と考え、本研究の着想に至った。更に、浸酸処理の分子機構がほとんど未解明なため、少しでもその手掛かりを掴みたいとの思いも本着想を後押しした。

## 2. 研究の目的

本研究は昆虫の休眠・非休眠機構解明の一環であり、具体的には、カイコガの胚子発生に関与している NOS と新規 NOS スプライシングバリエント (NovNOS-V) の役割の解明を目的として研究を遂行した。

## 3. 研究の方法

### 休眠卵, 非休眠卵, 浸酸処理卵の調整

本実験で用いたカイコガ (*Bombyx mori*) の正常系統は、大造(松村)である。遺伝的背景のそろった卵を2つのグループに分け、一方は25°C、18時間照明(高温長日条件)で催青し、もう一方は15°C、照明なし(低温短日条件)で催青し、休眠卵と非休眠卵を調製した。また、休眠卵に塩酸で刺激を与えることにより休眠を回避させる人工孵化法を施した浸酸処理卵は、産卵後70時間目に5°C冷蔵、6日後比重1.11、48°C、6分浸酸処理後、水洗・風乾し25°Cで催青を開始した。サンプルは、0、12、24、36、48、60時間目に行い液体窒素で凍らせて-80°Cで実験に使用するまで保存した。この浸酸処理法での孵化率は、ほぼ100%である。

## RNA の抽出, 1st-strand cDNA 合成, RT-PCR

### Acid Guanidinium

Thiocyanate-Phenol-Chloroform 法 (Chomczynski and Sacchit, 1987) にてトータル RNA を抽出。抽出したトータル RNA を 5  $\mu$ g、Oligo dT プライマーを使用して 1st-strand cDNA 合成キット (GE Healthcare) にて 1st-strand cDNA 合成をした。PCR 実験は、1  $\mu$ l の 1st-strand cDNA、BmNOS3F、BmNOS3R プライマー、Ex Taq (TAKARA) を使用し、PCR プログラム (94°C-1分、55°C-1分、72°C-1分、30-35 サイクル) を実行した。

### NOS 活性測定

NOS 活性の測定は、NOS activity assay kit (Cayman Chemical Company) と <sup>14</sup>C-アルギニン (GE Healthcare) を用いて行った。

### 抗 NOS 抗体を用いた免疫組織化学

浸酸処理後 0 時間のパラフィン切片と抗 NOS 抗体 (anti-uNOS anti body, Affinity BioReagents) を用いて報告者が以前行った方法で実施した (Sawada et al., *Insect Biochem. mol. Biol.* 36, 911-920, 2006)。

## 4. 研究成果

(1) NovNOS-V と NOS のプローブを用いたゲノムサザンプロット解析を用いた実験により、NovNOS-V と NOS をコードする遺伝子 (ゲノム DNA) は共通で、しかもゲノム (この場合、全染色体を意味する) 中でシングルコピーであることが明らかとなった。そこで、NOS と NovNOS-V の cDNA の塩基配列を基にしてカイコのゲノムデータベースを使って解析を行った。その結果、カイコ NOS (BmNOS) 遺伝子は 21 のエキソンと 20 のイントロンに分かれていた。この知見はカイコでは初となった。このようにエキソンが多くイントロンにより分断されていることは、ショウジョウバエやヒトの NOS 遺伝子の構造とも共通性がみられるので、このような構造は NOS 遺伝子に特有なものであることが考えられた。また、浸酸処理直後に特異的に発現する NovNOS-V (Fig. 1. 矢印) は、35 残基分のアミノ酸をコードする 1 つのエクソン (Exon 11) が選択的スプライシングにより除かれて合成されることが判明した。

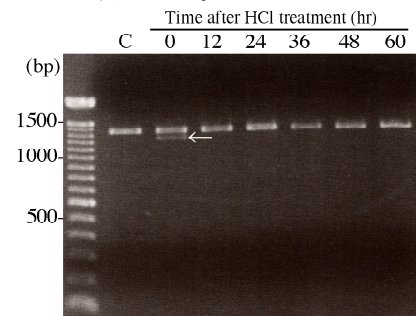


Fig. 1. RT-PCR analysis of *BmNOS* gene expression in HCl-treated diapause eggs.

(2) NOS遺伝子発現解析をRT-PCRにより行った結果、休眠卵では産卵後48時間の発現が高く、非休眠卵では24時間から発現が高くなり60時間までその発現が維持されていた。一方、NOSと*NovNOS-I*遺伝子は浸酸処理を施した直後に発現が高くなることが明らかとなった (Fig. 2)。

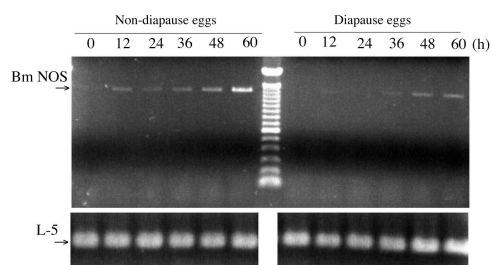


Fig. 2. RT-PCR analysis of *BmNOS* gene expression in non-diapause and diapause eggs.

(3) NOS の酵素活性を測定したところ、休眠卵では 48 時間での酵素活性が高く、非休眠卵では産卵直後の活性が高くその後減少した (Fig. 3)。遺伝子発現の比較では、休眠卵 48 時間での遺伝子発現と酵素活性のみ変動パターンが一致したが、その他は一致しなかった。これは、NOS の活性は翻訳後に調節されている可能性が考えられる。また、浸酸処理後 0, 6, 12 時間目の卵の NOS 活性を測定したところ、6 時間目に活性が高い事が判明した。

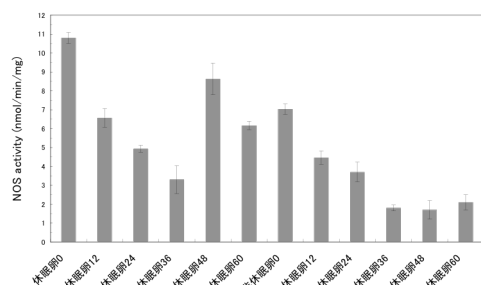


Fig. 3. *BmNOS* activities in non-diapause and diapause eggs.

(4) 抗 NOS 抗体を用いて浸酸処理直後の卵の切片を用いて、免疫組織化学的観察を行ったところ、胚子よりも卵黄細胞に NOS の局在が観察された。この結果より、胚子を取り巻く卵黄細胞が NOS により作られた一酸化窒素を胚子の方へ放出し、休眠打破を促している可能性が示唆された。

## 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 6 件)

① Sawada, H., Yamahama, Y., Yamamoto, T., Togawa, T., Mase, K.  
Developmental changes in the localization of protein kinase CK2 in non-diapause and diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*.  
*Zool. Sci.* 29, 6-10, 2012. (査読有り)

② Tamegai, H., Sawada, H., Nagano, E, Aoki, R., Hirakawa, H, Iino, T, Eguchi, T.  
Role of 20 kDa protein associated with a carbocycle-forming enzyme involved in aminoglycoside biosynthesis in primary and secondary metabolism.  
*Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74 (6), 1215-1219, 2010. (査読有り)

③ Mase, K., Okada, E., Iizuka, T., Yamamoto, T.  
Sericin-producing race of *Bombyx mori* for skincare material.  
*Household and Personal Care Today*, n1,11-13, 2010. (査読有り)

④ 山濱由美, 熊切葉子, 村中祥悟, 針山孝彦  
昆虫胚初期発生過程における脂肪滴形成と脂質輸送～高圧凍結・凍結置換法を用いた電顕観察と免疫電顕観察～  
医学生物学電顕技術学会誌 24(2): 66, 2010. (査読なし)

⑤ Hirakawa, H, Sawada, H., Yamahama, Y., Takikawa, S, Shintaku, H, Hara, A, Mase, K., Kondo, T, Iino, T  
Expression analysis of the aldo-keto reductases involved in the novel biosynthetic pathway of tetrahydrobiopterin in human and mouse tissues.  
*J. Biochem.* 146, 51-60, 2009. (査読有り)

⑥ Yamahama Y., Muranaka Y, Kumakiri Y, Tamotsu S, Hariyama T.  
Ultrastructural analysis of lipid incorporation in the embryonic silkworm *Bombyx mori*.  
*Zool Sci* 26: 321-324, 2009. (査読有り)

[学会発表] (計 6 件)

① 澤田博司, 山本貴之, 山濱由美, 外川徹, 間瀬啓介  
カイコ初期発生における一酸化窒素合成酵素 (NOS) の卵内分布と阻害効果  
日本動物学会 2011年9月21-23日/旭川

② 山本貴之, 澤田博司, 間瀬啓介  
カイコ休眠卵の DMSO 処理により発現変動する *c-Myc* 様遺伝子の解析  
日本動物学会 2011年9月21-23日/旭川

③澤田博司, 山本貴之, 山濱由美, 桑本麻里奈, 菅原沙英子, 外川徹, 間瀬啓介  
カイク初期発生における一酸化窒素合成酵素と GTP-シクロヒドロラーゼ I について  
日本蚕糸学会 2011年3月21日/東京

④山本貴之, 加藤智美, 中村和夫, 間瀬啓介, 澤田博司  
ジメチルスルホキシドによるカイク卵休眠の打破  
日本動物学会 2010年9月25日/東京

⑤澤田博司, 山本貴之, 山濱由美, 間瀬啓介, 平川暖果, 外川徹, 飯野熙彦  
カイクの初期発生における一酸化窒素合成酵素(NOS)について  
日本動物学会 2009年9月19日/静岡

⑥山本貴之, 加藤智美, 中村和生, 間瀬啓介, 澤田博司  
カイク胚子発生初期におけるグリコーゲンシンターゼキナーゼ3βの機能解析  
日本動物学会 2009年9月19日/静岡

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: ジメチルスルホキシド (DMSO) によるカイク休眠卵の人工孵化法及び卵内への化学物質導入方法

発明者: 澤田博司, 間瀬啓介, 山本貴之

権利者: 学校法人日本大学,  
学校法人北里研究所

種類: 日本国内出願特許

番号: 特願 2010-188018

出願年月日: 2010年8月25日

国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

澤田 博司 (SAWADA HIROSHI)

日本大学・文理学部・教授

研究者番号: 60196326

### (2) 研究分担者

山濱 由美 (YAMAHAMA YUMI)

浜松医科大学・医学部・教務員

研究者番号: 90242784

### (3) 連携研究者

間瀬 啓介 (MASE KEISUKE)

日本大学・文理学部・教授

研究者番号: 60414942