

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450489

研究課題名(和文) カイコの胚子活性化時におけるミトコンドリアCa²⁺依存性溶質輸送体の役割研究課題名(英文) The role of mitochondrial Ca²⁺-dependent solute carrier 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、カイコ休眠卵を塩酸処理により休眠移行阻害を行うと卵殻と卵内のCa²⁺量が水で処理したコントロールと比較して1/7に減少することを明らかにした。Mg²⁺ではこの現象は起こらなかったことから、Ca²⁺が特異的に塩酸処理により卵から流出することが明らかとなった。休眠卵・非休眠卵の発生に伴うCa²⁺の定量解析では、休眠卵の方が非休眠卵よりも2.4倍多いことも明らかにした。

一方、Ca²⁺と相互作用する分子の解析も同時に進行させた。その中で、ミトコンドリアCa²⁺依存性溶質輸送体(MCaSC)の発現解析をRT-PCRで行ったところ、塩酸処理に伴って発現が誘導されることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism for preventing entry into embryonic diapause of the diapause of *Bombyx mori* by HCl, the quantitative analysis of Ca²⁺ and Mg²⁺ in the chorion and egg content was performed using ICP-AES. When diapause eggs were treated with HCl solution, the amount of Ca²⁺ in the chorion and egg content after HCl treatment was reduced to one-seventh, as compared with the amount before treatment. In contrast, there was no change in the amount of Mg²⁺ with HCl treatment. The amount of Ca²⁺ in the HCl solution after the diapause eggs were treated increased 7.5-fold, as compared with that of eggs treated with water. The quantitative analysis was also revealed that the amount of Ca²⁺ in diapause eggs was more than 2.4-fold larger than in non-diapause eggs.

Meanwhile, a gene of the mitochondrial Ca²⁺-dependent solute carrier protein (MCaSC) was also examined with HCl-treated diapause eggs. As a result, expression of MCaSC gene was induced by HCl treatment.

研究分野：昆虫生理・生化学

キーワード：Bombyx mori diapause HCl DMSO

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。その中で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ので、非休眠卵・休眠卵、浸酸処理卵での詳細な活性変動と細胞内局在を明らかにした。このカイコ NOS (BmNOS) は、哺乳動物の神経型 NOS (nNOS) や血管内皮型 NOS (eNOS) にホモロジーが高かったが、活性化にカルシウムイオン (Ca^{2+}) が必須であった。nNOS と eNOS は活性化に Ca^{2+} は必要ないので、BmNOS は、胚子活性化時において Ca^{2+} による独特な活性発現調節を受けていると考えられた。そこで、申請者が過去に行った浸酸処理時のマイクロアレイ実験の結果を Ca^{2+} に関係する遺伝子に着目して解析したところ、ミトコンドリア Ca^{2+} 依存性溶質輸送体 (MCAcS) の遺伝子の発現が浸酸処理直後にコントロールと比べて約 5 倍高い事が判明した。この MCAcS は、 Ca^{2+} シグナリングにおいて重要な分子として注目を集めているがその機能に関しては未知な点が多い、更に昆虫に限らず初期発生に関しての MCAcS については報告が無い。申請者が見出したこの MCAcS 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、浸酸処理時の Ca^{2+} の詳細な定量分析も試みるにより、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、浸酸処理時の Ca^{2+} 量変動の詳細な定量解析および胚子発生に参与している MCAcS 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、18 時間照明 (高温長日条件) で催青し、もう一方は 15、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℃ 冷蔵、6 日後比重 1.11、48、6 分浸酸処理後、水洗・風乾し 25℃ 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℃ 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。

卵殻と卵内の Ca^{2+} の定量

浸酸処理前後の 100 個分の卵殻と卵内容物 (卵殻以外の全て) をピノキユラの下で選り分け、それぞれを王水 ($\text{HNO}_3:\text{HCl}=1:3$) で分解後、更に混酸 ($\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$) で 100 程度に加熱して分解 (不溶性物質の無い状態) し、そのサンプルを高周波誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP) とポストイオンクロマトグラフィー装置 (IC) で分析した。この際、 Ca^{2+} のコントロールとして Mg^{2+} の同時定量を行った。

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 μg , 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 μl 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 -1 分, 55 -1 分, 72 -1 分, 30-35 サイクル) を実行した。

4. 研究成果

(1) 浸酸処理前後で卵殻と卵内の Ca^{2+} を高周波誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP) とポストイオンクロマトグラフィー装置 (IC) で定量したところ、浸酸処理を施した休眠卵では浸酸処理を行っていない卵と比べて、卵殻と卵内の Ca^{2+} 量はおよそ 1/7 に減少していた (Fig.1)。また、浸酸処理に用いた溶液の Ca^{2+} 量も測定し、水で同様に処理したものと比較した結果、浸酸処理後の溶液中の Ca^{2+} 量が増加していた。これらの測定時には同時に Mg^{2+} の定量も実施したが変化は無かった (Fig.1)。

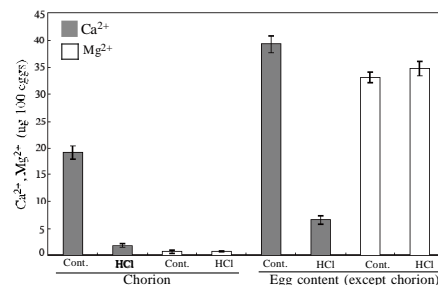


Fig. 1. The Ca^{2+} and Mg^{2+} amount in the chorion and egg content after treatment with HCl. Treatment conditions with HCl are as described in the Materials and Methods section.

休眠卵、非休眠卵も同様に比較した結果、休眠卵の Ca^{2+} は、非休眠卵に比べて約 2.5 倍多く含まれていた。 Mg^{2+} は非休眠卵の方がわずかに多い傾向にあったが、ほぼ変化は無かった (Fig.2)。また、産卵後 0 時間と 48 時間

の休眠卵, 非休眠卵も比較したところ, Ca^{2+} と Mg^{2+} の発生に伴った増減は無かった (Fig.2)。

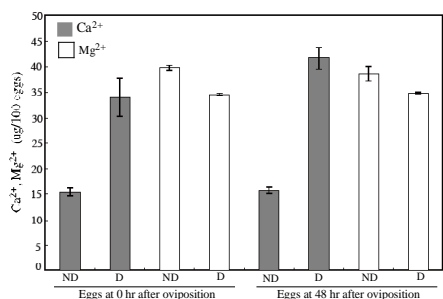


Fig.2. The Ca^{2+} and Mg^{2+} amounts in non-diapause-destined and diapause-destined eggs at 0 and 48 hr after oviposition.

更に, 休眠移行阻害効果が HCl 処理に匹敵する DMSO 処理した休眠卵についても解析を行ったところ, HCl 処理とは異なり処理前後での Ca^{2+} と Mg^{2+} の量に変化はなかった (Fig. 3)。

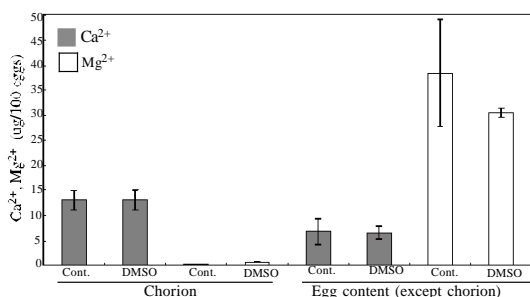


Fig.3. The Ca^{2+} and Mg^{2+} amounts in the chorion and egg content after treatment with DMSO.

(2) 浸酸処理に伴って発現されるカイコ MmCaSC (BmCaSC) の cDNA をクローニングしたところ ORF は 667 アミノ酸をコードしており, SDS-PAGE 上で 74kDa の分子量を示した。その構造中には, ミトコンドリア Ca^{2+} 依存性溶質輸送体スーパーファミリーに特徴的な signature motif 配列 (P x D/E x x R/K) が 3ヶ所認められた。更に, Ca^{2+} の結合に関与する EF-hand モチーフが 2 つ存在していた。また, 浸酸処理後 0, 12, 24, 36, 48 時間での BmCaSC 遺伝子の発現解析を RT-PCR により行ったところ, コントロールでは発現がほとんど無かったが, 処理直後の 0 時間からその後 48 時間後の全てで発現が認められた。このことから, BmCaSC 遺伝子発現は, HCl 処理により誘導されることが示唆された。

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7件)

Kitta R, Okawa S, Saito M, Mase K, Sawada H
HCl treatment for preventing diapause caused Ca^{2+} efflux in *Bombyx mori* eggs.
Zoological Sciences 32, 124-128, 2015. (査読有り)

Mase K, Okada E, Iizuka T, Miyajima T and Yamamoto T.
Low tensile strength due to fragile points on silkworm cocoon filaments.
Journal of Insect Biotechnology and Sericology 84, 43-48, 2015. (査読有り)

山濱由美, 弘中満太郎, 針山孝彦
チャバネアオカメムシ *Plautia crossota stali* の複眼における構造的部域差
日本応用動物昆虫学会誌 58(4): 1-9, 2014 (査読有り)

針山孝彦, 下村政嗣, 山濱由美, 高久康春, 下澤橋夫
ウマノアシガタの高輝度反射と紫外線反射の起源
高分子論文集, 70(5): 221-226, 2013 (査読有り)

不動寺浩, 針山孝彦, 山濱由美, 吉岡伸也, 石井大佑, 木村賢一, 久保英夫, 下村政嗣, 魚津吉弘
ホットエンボッシングによって作製したドーム状構造のオパール膜
高分子論文集, 70(5): 227-231, 2013 (査読有り)

Yamamoto T, Mase K, Sawada H
Diapause prevention effect of *Bombyx mori* by dimethyl sulfoxide.
PLoS ONE 8, e64124, 2013. (査読有り)

Nishioka T, Mase K, Kajiura Z, Morishima M and Kudoh T. Shape of silkworm cocoon changes with size in some races. *Journal of Insect Biotechnology and Sericology* 82, 55-59, 2013. (査読有り)

(学会発表)(計6件)

齋藤美保, 橘田涼, 山濱由美, 間瀬啓介, 澤田博司
カイコの休眠阻害時におけるカルシウム結合性タンパク質の解析
日本動物学会 2015 年 9 月 17 日 / 朱鷺メッセ (新潟)

山本貴之, 中村和生, 澤田博司
カイコの休眠阻害時における protein kinase Akt の遺伝子発現と機能解析
日本動物学会 2015 年 9 月 17 日 / 朱鷺メッセ (新潟)

齋藤美保, 橘田涼, 大川真一郎, 山濱由美, 間瀬啓介, 澤田博司
カイコの休眠卵の休眠阻害時におけるカルシウム量の変動と関連分子の解析

日本動物学会 2014年9月13日 / 東北大学(仙台)

山濱由美, 外山美奈, 針山孝彦
地球上でもっとも深いところに生息する超深海生物に眼はあるか?
日本動物学会本大会 2014年9月11日 / 東北大学(仙台)

間瀬啓介, 外川徹, 澤田博司, 平山力, 岡田英二, 山本公子
カイコ緑繭系統大造のP5CR遺伝子の構造と発現異常
日本蚕糸学会 2014年3月11日 / 日本大学(藤沢)

山濱由美, 村中祥悟, 針山孝彦
昆虫初期胚における脂質輸送分子の局在性~ 高圧凍結・凍結置換法を用いた免疫電顕観察.
日本顕微鏡学会学術講演会 2013年5月20日 / 大阪大学(大阪)

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) 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

(3) 連携研究者

山濱 由美 (YAMAHAMA, Yumi)
浜松医科大学・医学部・教務員
研究者番号: 90242784