

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19580056

研究課題名（和文） カイコの初期胚子発生に關与するカゼインキナーゼ 2 の役割

研究課題名（英文） The role of Casein kinase 2 during 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・准教授

研究者番号：60196326

研究成果の概要：

本研究は、カイコガの休眠卵と非休眠卵とで活性変動の異なるタンパク質リン酸化酵素の一種を見だし、それがカゼインキナーゼ 2 (CK2) であることを同定し、CK2 の  $\alpha$  と  $\beta$  両サブユニットをコードする完全長 cDNA の構造を明らかにした。また、初期発生における CK2 の活性変動の調節は転写レベルではなく、転写後の調節が重要であることも発見し、CK2 の翻訳後修飾における活性調節機構の一部を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

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

タンパク質のリン酸化は、細胞機能の多くの側面を制御する主要な調節機構の一つであり、プロテインキナーゼとして知られる酵素の触媒作用によって引き起こされる。その中でも CK2 は、動物、植物を問わず広く真核生物に存在し、標的タンパク質のセリン又はスレオニンをリン酸化しその機能を制御する重要な酵素として知られている。*in vitro* での生化学的解析においてカゼインを基質として用い比較的簡単に活性を解析できるのでその名が付いているが、生体内においては、

転写因子をはじめとして 160 種を超える機能性タンパク質が CK2 により制御されている事が報告されている (Lin et al., *Nature*, 2002)。多種類の機能性タンパク質をリン酸化することから、CK2 は細胞機能の様々な局面で作用しそれぞれ異なる役割を持つと考えられ、モデル生物を用いて世界中で盛んに解析が進められているが、そのほとんどは、*in vitro* での生化学的解析が中心であり、興味ある昆虫の生命現象と密接に関連した CK2 の役割についてはほとんど解明されていない。従って、カイコガの初期胚中の未知・既

知タンパク質の機能制御においても CK2 は、極めて重要な役割を担っているものと考え本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究は昆虫の休眠・非休眠の分子機構解明の一環であり、具体的には、カイコガの休眠卵と非休眠卵とで異なる活性変動を示すタンパク質リン酸化酵素の一種、カゼインキナーゼ 2 (CK2) の胚子発生初期における役割の解明を目的としている。

## 3. 研究の方法

### (1) Animals

The silkworm *B. mori* used in this study were a pure strain, called Daizo (Matsumura), which was maintained at the National Institute of Agrobiological Sciences. Diapause eggs were obtained from female moths, which had been programmed to lay diapause eggs. The eggs laid within 3 hr were pooled, and kept under a long-day condition (18L:6D) at 25°C during embryonic development. Diapause eggs at 24 hours after oviposition and 2nd instar larvae of a wild type of *D. melanogaster* (Canton-S) were used for isolation of the total RNA.

### (2) RNA extraction and RT-PCR

The total RNA was isolated from the diapause eggs of *B. mori* or the larvae of *D. melanogaster* using the acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction method (Chomczynski and Sacchi, *Anal. Biochem.*, 1987) and further purified by ethanol precipitation. The RNA concentrations were determined spectrophotometrically.

Total RNA (3 mg) was reverse-transcribed by Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads (Amersham Pharmacia Biotech, USA) using an oligo dT primer. A PCR experiment was performed using a 1 ml aliquot of a first-stranded cDNA solution as a template. PCR amplification was processed through 30 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 55°C, and 1 min at 72°C.

### (3) Protein expression in bacteria and gel electrophoresis

The DNAs corresponding to the coding regions of  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits of *B. mori* CK2 (BmCK2  $\alpha$  and BmCK2  $\beta$ ) and  $\beta$ -subunits of *D. melanogaster* CK2 (DmCK2  $\beta$ ) cDNAs were amplified by PCR using mutagenic primers for the *Bam*HI, *Nde*I, and *Xho*I sites. The

CK2 sequences of *B. mori* and *D. melanogaster* were available under accession numbers AB206394 (BmCK2  $\alpha$ ), AB206395 (BmCK2  $\beta$ ), M16535 (DmCK2  $\beta$ -VIIa) and NM\_206692 (DmCK2  $\beta$ -VIIc). The sequences of the PCR primers were: sense of BmCK2  $\alpha$  : 5'-GGCACAGTCATATGGCAGTACCTAG-3', sense of BmCK2  $\beta$  : 5'-AAGCATATGAGTAGTTCGGAGGAGG-3', sense of DmCK2  $\beta$ -VIIa and DmCK2  $\beta$ -VIIc: 5'-ATCCATATGAGCAGCTCCGAGG-3', antisense of BmCK2  $\alpha$  : 5'-AATGCTCGAGTGATTACTCTGC-3', antisense of BmCK2  $\beta$  : 5'-TGTCTCGAGTCGGCGGCTGAGGCCTAACG-3', antisense of DmCK2  $\beta$ -VIIa: 5'-TACGGATCCTTATTAGTTTTTCGCTCG-3', and antisense of DmCK2  $\beta$ -VIIc: 5'-TACGGATCCGCTTAGAGGCGCTTGGGC-3'. The amplified DNA was digested with the restriction enzymes and ligated into the *Bam*HI, *Nde*I, and *Xho*I sites of pET-14b (Novagen) or pCold I (Takara) vector DNA. The recombinant vectors were transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS. Expression of the recombinant His-tag BmCK2 $\alpha$ , BmCK2  $\beta$ , and DmCK2  $\beta$  (designated as rBmCK2 $\alpha$ , rBmCK2  $\beta$ , and rDmCK2  $\beta$ ) was induced by adding isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside (IPTG) at a final concentration of 1 mM, and incubation proceeded for 24 h at 15°C. rBmCK2  $\alpha$  was produced in a soluble form present in the cytosol of bacteria cells. On the other hand, rBmCK2  $\beta$  and rDmCK2  $\beta$  in an aggregated form were present in the inclusion bodies. Solubilization of the aggregated rBmCK2  $\beta$  and rDmCK2  $\beta$  was performed with 6M guanidine hydrochloride, and purification was conducted by a His-Trap column chromatography (Amersham Biosciences) following the manufacturer's instructions. The renaturation of denatured rBmCK2  $\beta$  was carried out using a stepwise dialysis system as described by Umetsu *et al.* (*J. Biol. Chem.*, 2003). The protein concentration was measured with a Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) using bovine serum albumin as a standard protein. The solutions of recombinant proteins were dissolved in an SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) sample buffer (Laemmli, *Nature*, 1970), heated in a boiling water, and then separated by a SDS-PAGE.

(4) Assay of protein kinase activity and analysis of autoradiogram

The reaction mixture (0.1 ml) contained 40 mM Tris-HCl (pH 7.6), 2 mM DTT, 3 mM MnCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 10 mg of α-casein (Sigma Chemical Co., USA), 20 mM [γ-<sup>32</sup>P]GTP (500cpm/pmol, Institute of Isotopes Co., Ltd., Hungary), and the indicated amount of recombinant CK2 solutions. In order to reconstitute the rBmCK2α and rBmCK2β (or rDmCK2β) as a holoenzyme, both subunits of same molar (0.4 pmol) ratio were incubated with the reconstitution buffer (25 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 5 mM DTT, pH 7.4) for 10 min at 30°C before the assay. The reaction mixtures were incubated for 30 min at 30°C and then treated with a 1 vol. of a sample buffer for SDS-PAGE by Laemmli (*Nature*, 1970). The mixture was then heated in a boiling water for 5 min. Aliquots (50 ml) of the mixture were separated on a 15% SDS-polyacrylamide gel, and the gel was stained, dried, and exposed to X-ray film (Fuji Film, Japan). Densitometric analysis of scanned autoradiogram images was performed using an Image-J program (ver. 1.34s, NIH, USA).

(5) Immunohistochemistry

Non-diapause eggs collected at 12-60 hr after oviposition were fixed with 4% paraformaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4, containing 0.15 M NaCl, for 24 hr at room temperature. The chorion, which surrounds the eggs, was removed using needles in the fixative solution. The eggs were dehydrated passing through an ethanol-butanol series, embedded in paraffin, and sectioned at 4 μm. Paraffin was removed from the sections with xylene. After treating with 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol, the sections were incubated with anti-BmCK2α or anti-BmCK2β antisera (1:100 dilution) for 30 min at 25°C, and then incubated with goat anti-rabbit peroxidase-cojugated immunoglobulin (IgG) (Histofine Simple Stain MAX-PO, Nichirei, Japan). The peroxidase activity was visualized with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) solution (Simple Stain DAB Solution, Nichirei), and the sections were stained again with Carazzi's hematoxylin solution.

4. 研究成果

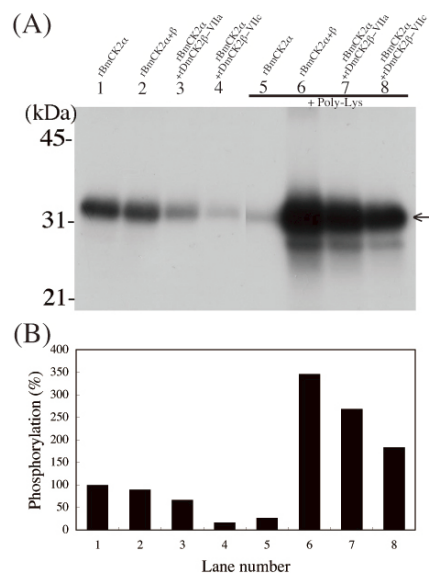
(1) 休眠卵と非休眠卵とで活性変動の異なるタンパク質リン酸化酵素の一種を見だし、それがカイコガのCK2であることを同定した。

(2) カイコガ CK2 のαとβ両サブユニットをコードする完全長 cDNA の単離に成功しその構造を明らかにした。

(3) 胚子発生初期での遺伝子の発現状況を詳細に解析し休眠卵と非休眠卵での活性変動の調節は転写レベルではなく、転写後の調節が重要であることを見だし、CK2 が初期胚子発生において機能するタンパク質の機能制御に必須のプロテインキナーゼであることを明らかにした。

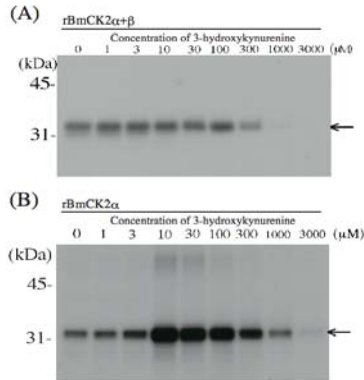
(4) リコンビナントCK2αとCK2βを使って活性測定を行った結果、rCK2α単独で活性があり、rCK2βを添加しても活性に変化がなかった (Fig. 1, lanes 1, 2)。しかし、rCK2β存在化でポリリジンを加えると活性が増大した (Fig. 1, lane 6)。

(5) C 末端部分の配列が異なるショウジョウバエ由来の rCK2β (rDmCK2β) 2種を用いて rBmCK2α の活性に対する影響を調べたところ、C 末端部分の配列が長くなるほど、rBmCK2α の活性が減少する事が明らかとなった (Fig. 1, lanes 6-8)。



**Fig 1.** Influence of rDmCK2β-VIIa and rDmCK2β-VIIc on rBmCK2α activity (A) and densitometric analysis of a scanned autoradiogram of A (B). Lane 1, rBmCK2α alone; lane 2, rBmCK2α + rBmCK2β; lane 3, rBmCK2α + rDmCK2β-VIIa; lane 4, rBmCK2α + rDmCK2β-VIIc; lane 5, rBmCK2α + 1.0 mg Poly-Lys; lane 6, rBmCK2α + rDmCK2β-VIIa + 1.0 mg Poly-Lys; lane 7, rBmCK2α + rDmCK2β-VIIa + 1.0 mg Poly-Lys; and lane 8, rBmCK2α + rDmCK2β-VIIc + 1.0 mg Poly-Lys. The arrow indicates the phosphorylated signals of α-casein (approximately 33 kDa). Phosphorylation by rBmCK2α alone is represented as 100%. The lane numbers for B correspond to those for A.

(6) カイコガの休眠卵に多量に含まれている物質であるソルビトールと 3-ヒドロキシキヌレニン(3-OHK)が rBmCK2 の活性にどのように影響するのかも解析したところ、ソルビトールは影響を与えなかったのに対して、3-OHK は、rBmCK2  $\alpha$  単独の活性に対して濃度が低いときには活性化剤として、また濃度が高いときには阻害剤としてはたらく興味深い結果が得られた (Fig. 2B)。



**Fig. 2.** Influence of 3-hydroxykynurenine on the activities of rBmCK2 $\alpha$  and rBmCK2 $\beta$  (A) and rBmCK2 $\alpha$  alone (B). The arrows indicate the phosphorylated signals of  $\alpha$ -casein (approximately 33 kDa).

(7) 休眠・非休眠卵 (産卵後 12, 24, 60 時間) を免疫組織化学用に固定、包埋した切片と市販の抗 CK2  $\alpha$  抗体と rBmCK2  $\beta$  を抗原として作成した抗 CK2  $\beta$  抗体を用いて、卵内での CK2  $\alpha$  と CK2  $\beta$  の分布と局在の観察を行った。その結果、産卵後 12 時間では休眠・非休眠卵では胚盤葉の細胞に局在が観察されたが、24 時間目以降では非休眠卵では卵黄細胞の細胞質と核に局在が観察された。一方、休眠卵では、胚子に局在が観察され、その分布の違いが明らかとなった。

## 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 5 件)

① Yamamoto, T., Sawada, H.  
In-vitro phosphorylation activity by recombinant  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits of *Bombyx mori* casein kinase 2.  
*Zool. Sci.* 25, 799-805, 2008. (査読あり)

② Yamahama, Y., Seno, K., Hariyama, T.  
Changes in lipid droplet localization during the embryogenesis of the silkworm, *Bombyx mori*.  
*Zool. Sci.* 25, 580-586, 2008. (査読あり)

③ Sawada, H., Yamahama, Y., Mase, K., Hirakawa, H., Iino, T.  
Molecular properties and tissue distribution of 30K proteins as ommin-binding proteins from diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*.  
*Comp. Biochem. Physiol. B* 146, 172-179, 2007. (査読あり)

④ 山濱由美, 熊切葉子, 村中祥悟  
カイコ卵の TEM 試料作製 4.  
*J. Electr. Microsc. Technol. Med. Biol.* 21, 138-139, 2007. (査読なし)

⑤ Mase, K., Iizuka, T., Yamamoto, T., Okada, E., Hara, W.  
Genetic mapping of a food preference gene in the silkworm, *Bombyx mori*, using restriction fragment length polymorphisms (RFLPs).  
*Genes Genet. Syst.* 82, 249-256, 2007. (査読あり)

[学会発表] (計 4 件)

① 澤田博司・山本貴之・山濱由美・間瀬啓介・平川暖果・飯野熙彦  
カイコの初期胚子発生に関するカゼインキナーゼ 2 の活性調節機構の解析. 日本動物学会. 2008 年 9 月 5 日/福岡

② 澤田博司・山本貴之・山濱由美・間瀬啓介・平川暖果・飯野熙彦  
カイコの初期発生に関するカゼインキナーゼ 2 の活性調節機構と組織局在性の解析. 日本蚕糸学会. 2008 年 3 月 20 日/名古屋

③ 澤田博司・山本貴之・山濱由美・間瀬啓介・平川暖果・飯野熙彦  
カイコの初期胚子発生に関するカゼインキナーゼ 2 の活性調節機構と免疫組織化学. 日本動物学会. 2007 年 9 月 20 日/弘前

④ 澤田博司・山本貴之・山濱由美・間瀬啓介・平川暖果・飯野熙彦  
カイコの初期胚子発生に関するカゼインキナーゼ 2 の活性調節機構と細胞内局在. 日本蚕糸学会. 2007 年 4 月 4 日/つくば

## 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・准教授  
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)  
独立行政法人農業生物資源研究所・  
生活資源開発ユニット・主任研究員  
研究者番号：60414942