

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 11 月 22 日現在

機関番号：82112

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25892032

研究課題名(和文)カイコの卵成熟と発生開始を担うリン酸化カスケードの解明

研究課題名(英文) Study of the mechanism to regulate egg maturation and activation by MEK-MAPK pathway in the silkworm, Bombyx mori

研究代表者

笠嶋 めぐみ (Megumi, Kasashima)

独立行政法人農業生物資源研究所・遺伝子組換えカイコ研究開発ユニット・研究員

研究者番号：90458290

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：産業上、重要なカイコ系統を安定に維持するため、精子を直接、卵に顕微注入する人工授精法(Intra-Cytoplasmic Sperm Injection: ICSI)を開発したい。この技術には、卵の受精前停止を解除する方法が不可欠である。この受精前停止はどのような動物にも見られる。この研究では、カイコ卵の受精前停止にもMEK-MAPK経路が働いていることを確かめ、リン酸化MAPKをモニターすることや、染色体の形態を調べることで細胞周期停止の時期を明らかにした。また、受精前停止の解除の方法を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：For stable maintenance of silkworm strains that are industrially important, establishment of Intra-Cytoplasmic Sperm Injection (ICSI) system is needed. To find the way to release cell cycle arrest of matured egg before fertilization is essential technique for the ICSI. In this study, I identified 1) MEK-MAPK pathway regulated cell cycle during egg maturation. 2) the timing when cell cycle is arrested by monitoring phosphorylated MAPK and nuclear morphology. 3) methods of the activation of matured unfertilized egg in adult's ovary.

研究分野：昆虫発生遺伝学

キーワード：MAPK経路 カイコ ICSI 遺伝子組換え 卵賦活 発生、分化 卵成熟

1. 研究開始当初の背景

動物の未受精卵は、完全に成熟し、受精に至るまでの過程で減数分裂を停止して精子がくるのを待っている。これは単為発生を防ぎ、正常に受精が行われるための重要な機構である。脊椎動物卵は Meta-II(減数第二分裂の中期)と呼ばれる時期で分裂が停止していることが知られている。増井禎夫らは、カエルを用いた実験から、Meta-II 停止を引き起こす何らかの物質が卵の中にあることを発見し、これを細胞分裂抑制因子 (CSF: cytostatic factor) と名付けた(Masui and Merket, 1971, *J. Exp. Zool.* **177**: 129-145)。1989年に佐方功幸らによって、原癌遺伝子 *mos* がコードするタンパク質 (Mos) が CSF の主要な構成因子であることが示された (Sagata *et al.*, 1989, *Nature* **342**: 512-518)。その後、この下流に MAPK (mitogen-activated protein kinase) 経路と呼ばれるリン酸化のカスケードすなわち、Mos (MAPKKK) →MEK(MAPKK) → MAPK, →p90Rsk であり、このリン酸化カスケードが CSF として機能していることが明らかになった。このカスケードの最下流でリン酸化を受ける最終標的タンパク質 Erp1 は、Meta-II 停止を直接的に維持している *cdc2*/サイクリン B (MPF: M 期促進因子) の安定化を調節していることが示され (Inoue *et al.*, 2007, *Nature* **26**: 1100-1104)、脊椎動物におけるこの機構の分子制御の全容が明らかになった (Fig. 1)。一方で、昆虫でも同様の現象が見られるが、分子機構は未だ多くが不明である。昆虫卵は Meta-I (減数第一分裂の中期) と呼ばれる時期で分裂を停止しており、停止時期が脊椎動物とは異なる。申請者はカブラハバチの *mos* 遺伝子を同定し、その産物 (Mos タンパク質) が Mos-MEK-MAPK 経路による Meta-I 停止に関与

していることを示した (Yamamoto *et al.*, 2008, *Mech. Dev.* **125**: 996-1008)。キイロショウジョウバエにおいてもこの経路の関与が示されている。このことから、昆虫の機構も脊椎動物同様に Mos-MEK-MAPK 経路によるリン酸化カスケードが存在していると考えられている。しかしながら、キイロショウジョウバエでは、*mos* 遺伝子の突然変異体でも少数の成熟卵が形成できることから (Ivanovska *et al.*, 2004, *Curr. Biol.* **14**: 75-80)、Mos による制御とは異なる別の因子による MAPK のリン酸化経路があることが示唆されている (Fig.1)。減数分裂という両性生殖を行う動物にとって非常に保存されている現象にもかかわらず、昆虫では減数分裂停止を制御する上流の因子 (MAPKKK) には多様性があることが予想される。昆虫の卵成熟過程や受精の機構を理解するために、このリン酸化カスケードの制御機構を明らかにし、これらの保存性について検証することが重要であるが、その全容は明らかになっていない。この分野の研究には発生開始をコントロールできる実験系が不可欠であるが、ほとんどの昆虫で

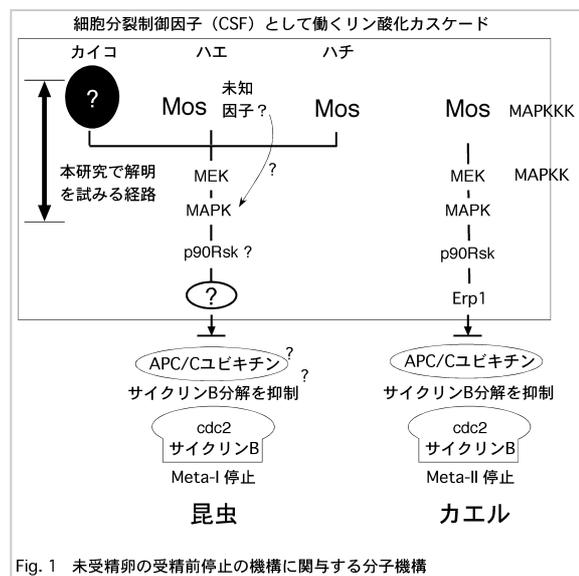


Fig. 1 未受精卵の受精前停止の機構に関する分子機構

正常な発生開始が簡単な操作で人為的に行えない。カイコはこの問題を解決できる。カイコは系統によって差はあるものの、温度処理で未受精卵を単為発生させる方法が確立されている。さらに、全ゲノムが解読されており、トランスポゾンによる遺伝子導入（ノックイン）や TALEN（転写活性因子様ヌクレアーゼ: Transcription Activator-Like Effector Nuclease）を利用したゲノム編集技術による遺伝子ノックアウトができる。従って、昆虫の Meta-I 停止を制御するリン酸化カスケードの解明についてカイコを用いるのが最適であると考えた。

2. 研究の目的

カイコの卵成熟も脊椎動物同様に、*mos* 遺伝子によって制御されているかどうか調べるために、*mos* 遺伝子のカイコホモログを探索する。また、カイコ卵形成過程における MAPK の挙動を調べ、卵成熟に MEK-MAPK 経路が関与していることを示すとともに、成熟時期等を明らかにする。さらに、卵細胞の細胞周期停止に関わる遺伝子を探索する目的で、カイコ卵巣より RNA を抽出し、RNAseq を行う。

3. 研究の方法

(1) カイコ *mos* 遺伝子ホモログの探索

カイコでは、MEK-MAPK 経路の上流のタンパク質キナーゼ (MAPKKK) である *mos* 遺伝子ホモログが見つかっていない。そこで、MEK-MAPK をリン酸化するカイコ MAPKKK タンパク質遺伝子についてカイコの full length cDNA データベースを用いて Blast 検索を行う。

(2) カイコ未受精卵の Meta-I 停止における MAPK 経路の関与

カイコの未受精卵と単為発生あるいは産出させた初期胚での MEK, MAPK の存在やリン酸化状態について、それぞれの特異的抗体を用いたウエスタンブロットティングにより調べる。

(3) カイコ卵巣由来 RNA による発現遺伝子解析

カイコ卵巣から total RNA を抽出し、イルミナ 2000 を用いて、発現遺伝子を解析する。

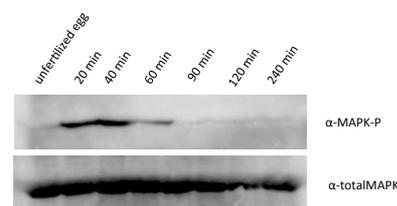
4. 研究成果

(1) カイコ *mos* 遺伝子ホモログの探索

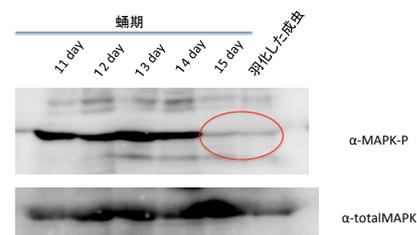
Blast を用いた相同性検索によるカイコ *mos* 遺伝子の探索を行ったが、オルソログと考えられる配列は得られなかった。

(2) カイコ未受精卵の Meta-I 停止における MAPK 経路の関与

①カイコの受精前停止に MAPK 経路が関与しているか調べたところ、産下 20~60 分では、MAPK-P が検出され、その後、検出されなくなった。



産卵された受精卵は電顕による観察から減数分裂の第一の中期であることが報告されている。産卵されるとMAPKはリン酸化され、産卵後1時間で脱リン酸化される。



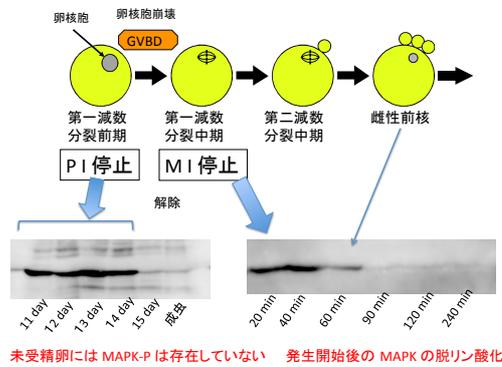
羽化直前で、MAPKの脱リン酸化が起きる。停止の解除

また、未受精卵ではMAPK-Pは検出されなかった。

このことから、カイコの受精前の細胞周期調節に

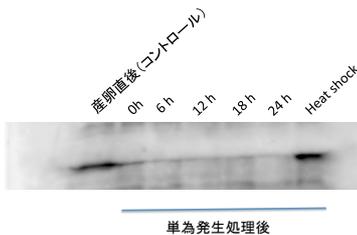
は MAPK 経路が関与していると考えられる。

③カイコの卵成熟過程における MAPK の挙動

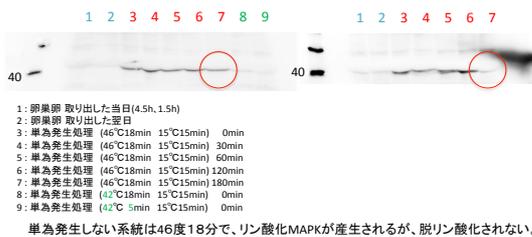


カイコ卵は、産下とほぼ同時に MI 停止と解除が起きていることが分かった。

④単為発生させたときの MAPK の挙動



卵巣から取り出した成熟未受精卵はM期に移行していないと考えられる。48度18分の熱処理で賦活され、細胞分裂的な雌性核のみの発生が始まる。



(3)カイコ卵巣由来 RNA による発現遺伝子解析

カイコ蛹の卵巣から RNA を抽出し、mRNA の配列を網羅的に調べ、卵巣特異的遺伝子の探索を行った。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件) 業績は旧姓使用 (M. Sumitani)

Sumitani M, Sakurai T, Kasashima K, Kobayashi

S, Uchino K, Kanzaki R, Tamura T, Sezutsu H (2015) Establishment of a specific cell death induction system in *Bombyx mori* by a transgene with the conserved apoptotic regulator, mouse Bcl-2-associated X protein (mouse Bax) *Insect Molecular Biology*, **24**: 671-680. 査読あり

[学会発表、シンポジウム] (計1件)

Sumitani M, Yamamoto DS, Sezutsu H, Hatakeyama M. (2016) Conservation of the Mos/MAPK signaling pathway during insect oocyte maturation: a case study in the silkworm, *Bombyx mori*. (Session title: Molecular Strategies/Mechanisms of Insect Reproduction.) XXV International Congress of Entomology (ICE 2016) 29 September, Orland, Florida, USA. 査読あり

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笠嶋めぐみ (KASASHIMA, Megumi)

農業生物資源研究所・遺伝子組換えカイコ研究開発ユニット・任期付研究員

研究者番号：90458290