

報告年月日	2005年2月17日
報告者氏名	楊平
職種（○で囲む）	○研究員 RA
所属（RAのみ）	研究科 専攻（ 大学配属 年度入学）
担当（指導）教員氏名	鈴木 幸一
申請研究テーマ （50字以内）	天蚕前幼虫における休眠維持・覚醒の分子機構
採用によって得られた成果 具体的に記すこと。 （今年度の申請をふまえて、何が解決され、何が問題として残ったか、予想していなかった結果など） 各項目の長さを適宜調整し、全体で2ページに収まるように記すこと。 図表を入れても構わない。	<p>研究背景</p> <p>日本原産の大型絹糸昆虫である天蚕は、卵内で幼虫体を形成した後、休眠越冬する。この越冬休眠は60～90日間の長期低温処理により打破されるほか、イミダゾール系化合物であるKK-42も休眠打破効果をもつことが明らかにされた（Suzuki <i>et al.</i>, 1990）。このように、多くの休眠越冬する生物の共通現象として、長期の低温接触（2～3ヶ月）により覚醒するという点があり、KK-42による天蚕前幼虫の休眠覚醒は長期の低温処理の現象の短縮反応系（4～5日で休眠覚醒が完了）として利用できる。</p> <p>動物の休眠越冬の発育制御に関わる最先端の研究は、哺乳動物シマリスの冬眠特異的タンパク質の分子生物学的研究とカイコ休眠卵で長期低温に感受する <i>Samui</i> 遺伝子の発見があるだけである。しかし、天蚕のイミダゾール系化合物による「発育停止→発育開始」の独創的モデルは、多くの動植物の休眠・越冬に関わる普遍性の発見に発展する可能性があり、昆虫にとどまらず動植物の発育制御のモデル研究となりうる。</p> <p>目的</p> <p>20世紀の昆虫休眠研究はホルモンの構造と作用を中心として展開され、現在もその延長線上で重要な新しい知見が集積されている。それとは異なる切り口から新しい生体分子とその遺伝子、または人工合成物で昆虫の休眠機構を解明するのが本研究の目的である。すなわち天蚕を研究素材として、休眠の維持と覚醒の分子機構を解析することで、温度と生命の独特の関連性を理解する上で大きな手がかりをもたらすと考えられる。</p> <p>研究方法</p> <p>昆虫も含めた多くの生物は、休眠を覚醒する刺激として数ヶ月に渡る低温接触を利用している。天蚕の場合、自然界における長期にわたる休眠覚醒刺激が、イミダゾール系化合物でわずか4～5日間に短縮されている。つまり、5℃、90日間の刺激が誘起する生化学反応は、KK-42による刺激の生化学的応答と等価である。そこで、このKK-42をツールとし、以下のような方法で特異的遺伝子や、タンパク質の解析を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 特異的遺伝子の解析 休眠前幼虫とKK-42で処理した48時間後の休眠覚醒前幼虫の全体磨砕物から mRNA を単離し、cDNA サブトラクション法より休眠期における特異遺伝子を網羅的に解析した。 2. 休眠特異的蛋白質の同定 休眠前幼虫、KK-42 塗布および低温処理した前幼虫のリン酸バッファー抽出画分を Tricine SDS-PAGE で蛋白質の経時的変化を分析した。

成果と考察

1. サブトラクション法の結果、cytochrome P450、RACK1、elongation factor など重要な遺伝子が同定された。なかでも P450 遺伝子は休眠期において大量発現していることから、さらに解析を行い完全長 cDNA を決定した。その相同性を検索したところ、ヨトウガの CYP4G20 と高い相同性を示し、C末端に Cys を含むヘム鉄結合領域が保存されていることが明らかになった。この天蚕の P450 は P450 nomenclature committee により CYP4G25 と命名した (Yang *et al.*, 論文作成中)。

数多くのイミダゾール化合物が P450 の活性中心であるヘム鉄に配位することにより P450 を阻害するところが明らかになっている。この CYP4G25 の RNAi や抗体を予め休眠中の前幼虫に投与し、その後イミダゾール系化合物を処理しても休眠覚醒の阻止が起こるようであれば、休眠覚醒制御因子の可能性が高い。しかし、その証拠もまだ得られていない。今後、機能解析により、この P450 は休眠にどのように関与しているか、今後の興味ある課題であり、KK-42 がその解明の手がかりを与えたのは確かである。

2. 天蚕の長期にわたる前幼虫休眠において、休眠期に特異的に出現するタンパク質 (P22) の存在を Tricine SDS-PAGE で確認した。さらに P22 に対する KK-42 および長期低温処理の影響を調査した。その結果、このタンパク質は休眠中に維持され、KK-42 の処理により急激に減少し、2日後には消失してしまうことが明らかになった。KK-42 処理後 2 日では休眠覚醒が認められていないことから、この蛋白質は KK-42 の処理により、休眠覚醒に先がけてかなり早い時期に消失することが明らかになった。一方、低温処理中の P22 のバンドには全く変動が確認されなかった。しかし、90 日間の低温処理を施した後 25°C に移すと、1 日後からその量は徐々に減少し、3 日後には完全に消失することが明らかになった。このことは、KK-42 処理による場合と同様に、この P22 は休眠覚醒の早い時期に消失することを示している。

以上のように、生体内では、このタンパク質が長期にわたる休眠覚醒のための低温刺激に反応し、それまで停止していた発育成長の再開のための調節因子として機能する可能性がある。今後この P22 の一次構造を同定し、昆虫の休眠メカニズムを説明する新たな有力分子候補を提案したい。

学会発表など

小野寺千秋・楊平・鈴木幸一 (2004) 天蚕前幼虫と *bbc1* 遺伝子の関係. 東北蚕研報. 29, 11.

楊平・阿部志津子・小野寺千秋・鈴木幸一 (2005.4 予定) 天蚕休眠前幼虫における特異的遺伝子の探索. 日本蚕糸学会第 75 回学術講演会.

小野寺千秋・楊平・鈴木幸一 (2005.4 予定) 天蚕前幼虫休眠における *hsp70* と *bbc1* 様遺伝子のクローニングと発現、機能解析. 日本蚕糸学会第 75 回学術講演会.

佐藤文孝・齋藤直之・楊平・鈴木幸一 (2005.4 予定) 天蚕前幼虫休眠打破機構における Hsp90 の機能解析. 日本蚕糸学会第 75 回学術講演会.