

## カイコ卵から単離された遺伝子 *Samui* : 種々の低温処理による発現への影響

森部 頼子・新美 輝幸・柳沼 利信

Yoriko MORIBE, Teruyuki NIIMI and Toshinobu YAGINUMA: A cold-inducible gene, *Samui*, isolated from *Bombyx* eggs: Effects of various cold-temperatures on its expression \*

Laboratory of Sericulture and Entomoresources, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Chikusa, Nagoya, Aichi 464–8601, Japan

カイコは卵期で休眠するが、約2–3ヶ月間5℃冷蔵することによって、休眠を覚醒させることができる。そこで、冷蔵処理による休眠覚醒の分子機構を理解する一助として、RNA differential display法を用いて検討したところ、冷蔵休眠卵に強く発現する遺伝子の一部 (Dif–L2) を増幅することができた。

このDif–L2をプローブとして、Northern-blot分析を行ったところ、約2.5 kbの大きさのmRNAが検出された。また、25℃連続保護休眠卵と、産下2日後から5℃冷蔵した卵のRNAを用いて調査したところ、このmRNAは、25℃保護休眠卵では産下直後には有意に存在するが、産下10日後までに急激に減少し、そのまま低いレベルを保った。一方、5℃冷蔵卵ではそのmRNA量は冷蔵10日後から増加し、冷蔵20日後にはピークを迎え、冷蔵60日後にかけて減少し、その後低いレベルに維持された。また、30日間5℃冷蔵とHCl処理により休眠を覚醒させた卵を、25℃に保護し、胚発生を再開させた場合では、高温催青後、そのmRNA量は著しく低下した。

そこで、さらなる情報を得るために、このDif–L2をプローブとしてカイコ卵から作製したcDNAライブラリーをスクリーニングして陽性クローンを得ることができた。このインサートcDNAの塩基配列を明らかにしたところ、全長は2,400ヌクレオチドで、677個のアミノ酸からなるORFを含んでいた。推定される分子量は約76 kDaであった。また、data base 検索を行った結果、このアミノ酸配列と相同性のあるタンパク質は、今のところ見つからない。次に、この塩基配列を基にReverse transcription–polymerase chain reaction法によりmRNAの変動を調査したところ、先のNorthern-blotの結果を再確認することができた。以上のような性質から、この遺伝子を*Samui*と仮称することとした。

次に*Samui* 遺伝子の翻訳産物であるタンパクがどのような量的変動を示すのかをSDS–ポリアクリルアミド電気泳動分析によるWestern-blot法を用いて調査した。この際に、*Samui* タンパクのアミノ酸配列の190–209番目の19個のアミノ酸にキャリアーを結合させて抗原とし、ウサギに注射して抗体を作製した。

休眠卵を25℃保護したものとは5℃冷蔵したものとを比較したところ、90 kDa付近に2本 (p84, p90)、100 kDa付近に1本 (p100) のバンドが濃染された。このうち、5℃冷蔵によって発現が強く誘導され、さらに、先に述べたNorthern-blotの結果と同様な変動型を示したのはp100であった。

ここでp100に注目し、休眠卵の5℃冷蔵直後にはどのような変動をしているのか、また、冷蔵条件は5℃のみが有効なのかどうかを検討したところ、25℃/5℃の比較では、冷蔵3日後 (産下5日後) から5℃冷蔵したものの方が25℃で保護したものよりも濃染された。しかし、25℃/0℃の比較では差異は検出されなかった。

非休眠卵を5℃低温処理した場合には、休眠卵と同様のバンドが濃染された。そのうち、p100のみが低温処理によって増加する傾向を示した。

したがって、p100の発現には0℃ではなく5℃のほうが適しており、5℃処理3日後から誘導されることが判明した。また、この低温処理は休眠卵に特異的なものではなく、非休眠卵においても、5℃処理によって誘導されることが示された。しかし、*Samui* cDNA から想定される分子量は76 kDaであり、p100の分子量とは異なるため、これを*Samui* タンパクと決定するにはさらなる実験が必要であると考えられる。また、休眠卵の0℃、

\* Abstract of paper read at the 34th Annual Meeting of Arthropodan Embryological Society of Japan, May 21–22, 1998 (Mikawa, Aichi).

5℃、25℃処理直後と、非休眠卵を5℃処理した場合の mRNA 量は、まだ測定していないので、早急に調査し、タンパク量の変動型との比較を行わなければならない。