

カイコ卵における *seven up* の発現について

柳沼 利信・加藤 大和・新美 輝幸

Toshinobu YAGINUMA, Hirokazu KATOH and Teruyuki NIIMI: Expression of *seven up* during embryogenesis and embryonic diapause of *Bombyx mori**

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

カイコ休眠卵では、卵内のグリコーゲンを素に約150 mMのソルビトールが蓄積されるが、低温処理などによる休眠覚醒期に、それはグリコーゲンへ変換利用される。低温による休眠覚醒の機構を明らかにする目的で、まず、この変換系に注目したところ、NAD-依存性ソルビトール脱水素酵素 (SDH) が律速酵素であることが明らかとなった。さらに、休眠卵を40–50日間5℃冷蔵した場合に、SDHのmRNAが卵黄細胞に新たに出現し、冷蔵期間延長に伴い増加することが判明した。次に、SDHの遺伝子構造を解析したところ、5'上流域にステロイドホルモン受容体スーパーファミリーの一員である *Drosophila* の *Seven up* (SVP) が認識結合すると考えられる共通塩基配列が見出された (Niimi *et al.*, 1996)。また、休眠とは関係なくSDHは胚発生後期において特に幼虫脂肪体細胞で発現することも明らかになっている。

そこで、低温による休眠覚醒期における卵黄細胞でのSDH遺伝子発現および幼虫脂肪体細胞でのSDH遺伝子発現の分子機構を明らかにするために、転写因子の候補者と考えられるSVPのカイコ相同体cDNAを単離し、そのmRNA量とタンパク量の変動を追跡することを目指した。

結果および考察

非休眠 (N_4) の3日令卵から作製した1st strand cDNAを鋳型として、*Drosophila* のSVPとの相同性を利用してPCRを行い部分的な増幅産物を得ることができた。このPCR産物をプローブとして、次に N_4 の3日令卵から作製したcDNAライブラリーをスクリーニングし、最終的に2個のクローン (α , β)を得た。挿入cDNAの塩基配列を決定したところ、全体の長さは1,708と1,556ヌクレオチドであり、それぞれN末端は欠けるものの終止コドンを含む421と161個のアミノ酸残基をコードするORFを含んでいた。推定されるアミノ酸配列を比較したところ、 β はDNA結合領域までは α と同じアミノ酸配列を持つが、リガンド結合領域部分を含まなかった。両者とも *Drosophila* のSVP1と一番高い相同性を示し、DNA結合領域で94%、リガンド結合領域では97%のアミノ酸残基が一致していた。このことからカイコ相同体をコードするcDNAを単離したと判断して、それぞれを *Bm svp- α* 、*Bm svp- β* と呼ぶこととした。

次に、*Bm svp- α* のmRNA量の変動をReverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)法を用いて調査した。非休眠卵 (N_4)の胚発生過程において見ると、産下直後には *Bm svp- α* mRNAは量的に少なかったが、産下後4日まで直線的に増加し、その後幼虫孵化前日に向けて減少した。休眠卵において、産下後から連続して25℃に保護された場合には、mRNA量は産下後10日から減少し、低い値になった。対照的に、産下後2日から5℃処理した卵では低温処理に伴って増加する傾向を示した。

さらに、SVPタンパク量の変動を調査するために、まずウサギで特異的抗体を作製した。抗原としては *Bm svp- α* のリガンド結合領域内の20個のアミノ酸残基をキャリアーに結合させたものを用いた。生じた抗体は、さらに20個のアミノ酸残基を吸着させたアフィニティーカラムを用いて精製した。休眠卵の場合、産下直後では178 kDa (Vtn H)と30 kDa付近に濃染されるバンドが認められたが、産下後1–2日から約85 kDaのバンドが出現し、25℃保護卵では産下後60日には急激に減少していた。5℃冷蔵卵の場合には、冷蔵40日からp85は

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

増加傾向を示した。100日間冷蔵した卵（休眠覚醒卵）を25℃に戻し、胚発生を再開させた場合には、p85はほぼ一定量を維持したが、幼虫期には消失した。非休眠卵（N₄）の場合には、p85のバンドは産下後2-3日から認められ始めたが非常に薄かった。産下後7-8日に濃染され孵化時には消失した。非休眠卵ではさらに67 kDa付近のバンドが検出された。p85がカイコのSVPに相当するものではないかと考えられた。

以上の結果は、SVPのmRNA量およびタンパク量がSDH遺伝子発現パターンと関連して変動しているように見える。今後はSVPタンパクがSDH遺伝子の発現調節領域に結合し、SDH遺伝子発現に関わるかどうかを直接的に解析する必要がある。

引用文献

Niimi, T., O. Yamashita and T. Yaginuma (1996) *Insect Mol. Biol.*, 5, 269-280.