

所属・資格 生命科学科・助手

申請者氏名 橘田 涼

研究課題		昆虫の胚子活性化時における漿膜細胞局在分子の役割の解明
報告の概要	研究目的 および 研究概要	カイコガの卵休眠は、環境条件の悪化の結果止むを得ず一時的に発育を停止させる休眠ではなく、不良環境が訪れる前の生育にとって不都合のない良好な環境のもとで計画され、次世代の卵において実行される休眠である。カイコガの卵休眠は、塩酸で処理することで人工的に阻害できることが知られており、この浸酸処理法は明治時代より養蚕業において必須技術であるが、その分子機構は未解明である。カイコガ卵の卵殻のすぐ内側には、漿膜という一層の細胞層からなる膜がある。この漿膜が形成されると浸酸処理による孵化率が低下する。つまり、漿膜はカイコガの胚子発生や人工的休眠阻害において極めて重要な役割を担っていることが強く示唆される。申請者はこれまでに、浸酸処理卵と塩酸の代わりに水を用いたコントロールの卵において遺伝子発現の比較を行った。その結果いくつかの分子が浸酸処理卵に特異的に発現していることを明らかにした。そこで、それら分子の各発生ステージにおける遺伝子発現の違いやタンパク質の機能等の解析を行った。
	研究の結果	昨年度、RNA Differential Display 法によって浸酸処理卵の漿膜細胞で発現がみられたカイコガの Sphingomyelin synthase 2-like (BmSMS2) およびカイコガの alpha-tocopherol transfer protein-like (BmαTTP)、カイコガの TBC1 domain family member 23 (BmTBC1D23) のサブクローニングを行い、大腸菌発現系を用いてリコンビナントタンパク質を調製した。その結果、BmαTTP および BmTBC1D23 のリコンビナントタンパク質 (rBmαTTP, rBmTBC1D23) を得た。BmSMS2 は、サブクローニングで得たプラスミド DNA の塩基配列にエラーは確認されなかったが、IPTG によって発現を誘導してもリコンビナントタンパク質を得ることができなかった。そこで、rBmαTTP および rBmTBC1D23 を抗原としてウサギを免疫することでそれぞれに特異的な抗血清を作製した。この抗血清を用いて浸酸処理卵の各ステージにおけるウエスタンブロッティングを行なったところ、rBmαTTP および rBmTBC1D23 は浸酸処理卵において発生が進行してもタンパク質量に変動がみられなかった。
	研究の考察・反省	今回の解析において、抗 BmαTTP 抗血清および抗 BmTBC1D23 抗血清を用いたウエスタンブロッティングの結果、浸酸処理卵の各発生ステージにおいて、タンパク質量に変動が確認されなかった。内部標準として GAPDH のウエスタンブロッティングも行い、タンパク質溶液の調製に問題がなかったか確認する必要があると考える。また、形態学的実験も行い、BmαTTP や BmTBC1D23 の局在を確認する予定である。rBmSMS2 が大腸菌発現系において、発現が確認されなかった理由は不明であるが、現在用いている His タグではなく、GST タグ等の他のタグを用いてリコンビナントタンパク質を調製してみる必要があると考えられる。
研究発表 学会名 発表テーマ 年月日/場所 研究成果物 テーマ 誌名 巻・号 発行年月日 発行所・者	※この欄は、本報告書提出時点で判明している事項についてご記入ください。 【研究成果物】 Molecular characterization and tissue distribution of mitochondrial Ca ²⁺ -dependent solute carrier protein during preventing diapause with HCl treatment in the silkworm, <i>Bombyx mori</i> . Zoological Science 35, 487-493 2018年12月 Ryo Kitta, Yumi Yamahama, Takayuki Yamamoto, Keisuke Mase, Hiroshi Sawada	