

所属・資格 生命科学科・教授

申請者氏名 澤田 博司

研究課題		昆虫の休眠阻害時におけるカルシウムシグナリング関連分子の解析
報告の概要	研究目的 および 研究概要	<p>カイコの卵休眠は、環境条件の悪化の結果やむをえず一時的に発育を休止する休眠ではなく、不良環境が訪れる遙か以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で実行される。この休眠の分子機構の解明が、申請者の最終目的である。</p> <p>申請者は、これまでカイコの休眠卵、非休眠卵、休眠卵に対して人為的に胚子発生を再開させる処理（浸酸処理）を行ったもの等を材料に用いて、発生に関与する遺伝子の解析を行ってきた。その解析中、休眠卵と浸酸処理卵で <math>Ca^{2+}</math> 量が異なる事を見いだした。細胞内の <math>Ca^{2+}</math> 濃度の変化は幅広い細胞応答と関連しており、盛んに研究が行われているが、カイコ初期発生における <math>Ca</math> の役割に関しては詳細な報告はない。浸酸処理により胚子が活性化する時の <math>Ca^{2+}</math> の変動は、<math>Ca^{2+}</math> が関与するシグナリングが胚子の活性化に重要な役割を持つ可能性が極めて高いと考え、本研究の着想に至った。更に、浸酸処理は明治時代より養蚕業を営む者の必須技術であるが、現代でもその機構は、ほとんど未解明である。今年度は、<math>Ca^{2+}</math> に親和性をもつカルシニューリン調節サブユニット (BmCalciR) に着目し生化学的解析を行った。</p>
	研究の結果	<p>カルシニューリンは、細胞内シグナル伝達においてリン酸化された転写因子等を脱リン酸し、その機能を調節することで知られるプロテインフォスファターゼである。触媒サブユニットと調節サブユニットからなり、調節サブユニットに <math>Ca^{2+}</math> が結合すると触媒サブユニットが活性化される。本研究では、このカイコガのカルシニューリン調節サブユニット (BmCalR) に着目し、BmCalR をコードする cDNA のクローニング、遺伝子の発現、リコンビナント BmCalR (r BmCalR) の調製などを行った。クローニングした cDNA は 170 個のアミノ酸をコードしており、<math>Ca^{2+}</math> の結合に関与する EF-hand モチーフが 4 つ存在していた。浸酸処理卵における BmCalR 遺伝子の発現解析を RT-PCR 法により行った結果、浸酸処理後直後から顕著な発現上昇が確認された。次に、pET ベクターに BmCalR cDNA の ORF を挿入した発現ベクターを構築し大腸菌発現系で rBmCalR の作製を試みた。SDS-PAGE を行ったところ 19.3kDa の分子量を示した。ヒスチジンカラムによる精製後の rBmCalR は SDS-PAGE 上で単一のバンドとし確認できた。その精製した rBmCalR を抗原に用いてポリクローナル抗体の作成を試みたところ、rBmCalR を特異的に認識する抗体を得ることができた。一方、BmCalR の機能解析の一環として、rBmCalR と <math>Ca</math> の放射性同位元素である <math>^{45}Ca</math> を用いて <math>Ca^{2+}</math> 結合実験を行った。その結果、rBmCalR は <math>Ca^{2+}</math> と親和性があることが明らかとなった。</p>
	研究の考察・反省	<p>BmCalR は、浸酸処理により遺伝子の発現が誘導される事が強く示唆された。また、<math>Ca^{2+}</math> と親和性があることも明らかとなった。これらの結果から、浸酸刺激により誘導される BmCalR は、浸酸処理により遊離した <math>Ca^{2+}</math> が結合することにより BmCalR がさらに触媒サブユニットに結合し、フォスファターゼとしての機能が活性化されることが示唆される。そして、その結果、休眠移行を阻害（休眠せずに胚子を活性化）しているのではないかと考えられる。一方、rBmCalR が大腸菌発現系で調製する事に成功し、その特異抗体を作製することが出来た。今後、この特異抗体を用いた免疫組織化学で BmCalR の局在と分布を解明できると思われる。</p> <p>反省点としては、今回の rBmCalR は、大腸菌内で封入体として発現してしまった。それにより可溶化剤で可溶化し可溶化剤存在下で精製する事になった。そのため得られた rBmCalR は、抗体作製用としては適しているが、機能解析には不向きである。<math>Ca^{2+}</math> との結合能以外の機能解析を行う場合、rBmCalR を可溶化状態で発現させることが今後の課題の一つである。</p>
研究発表 学会名 発表テーマ 年月日/場所	<p>※ 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。</p> <p>研究発表</p> <p>日本比較内分泌学会</p>	
研究成果物 テーマ 誌名 巻・号 発行年月日 発行所・者	<p>カイコガの休眠阻害時におけるカルシニューリン調節サブユニットの生化学的解析</p> <p>2019年11月9日/さいたま市</p>	