

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	カイコガの休眠は、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。申請者は、これまでカイコガの休眠卵、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（浸酸処理や DMASO 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カルシウム量が異なる事を見いだした。本研究では、カイコガの初期発生において、カルシウムシグナリングに関与する分子の解析を多面的に行い、複雑な休眠機構の一端を明らかにする事を目的としている。本年度は、cAMP 依存性プロテインキナーゼ (PKA) の生化学的解析および、カイコガの休眠卵で特別に生合成される生体色素の薬理作用の探索も昨年を引き続き行った。
	研究の結果	PKA は触媒サブユニットと調節サブユニットからなるヘテロ 4 量体で、通常は細胞質に局在している。細胞内のサイクリック AMP (cAMP) 濃度が上昇すると、cAMP は PKA の調節サブユニット (PKA-re) に結合し PKA の触媒サブユニット (PKA-cat) を活性化することが知られている。今回は、PKA-cat に着目し、浸酸処理した休眠卵において <i>PKA-cat</i> 遺伝子の発現解析を RT-PCR で行った。その結果、浸酸処理を行った休眠卵では <i>PKA-cat</i> 遺伝子の電気泳動上でのバンドは、コントロールとして塩酸の代わりに水で処理した休眠卵のバンドよりも顕著であることが確認できた。また、カイコガの PKA-cat タンパク質を得るために、大腸菌を用いてリコンビナント PKA-cat (rPKA-cat) の作製を試みた結果、大腸菌破壊液の沈殿画分に rPKA-cat が回収された。 一方、カイコガ休眠卵に特有の色素のオモクロームと同様なフェノキサジン骨格をもつシナバリン酸が PCR に対して低濃度で阻害作用を示す事が確認できた。
	研究の考察・反省	今回の RT-PCR を用いた <i>PKA-cat</i> 遺伝子の発現解析では、コントロールと比較して顕著なバンドが確認できた。この結果より、浸酸処理を行った休眠卵の細胞内では、塩酸による刺激で <i>PKA-cat</i> 遺伝子の発現誘導が起こる事が強く示唆された。同時にこの結果は、PKA-cat が浸酸処理での休眠移行阻害において、重要な役割を担っている事が考えられる。また、大腸菌を用いて rPKA-cat が容易く調整できる事が確認できたので、この rPKA-cat を抗原として用いて rPKA-cat を特異的に認識する抗体を調製する。そして、休眠卵と浸酸処理を行った休眠卵での PKA-cat の組織分布と細胞内局在性を確認するため免疫組織化学的観察を行う事が今後の課題である。 一方、シナバリン酸による PCR の阻害は、オミンと同様に DNA にインターカレートすることで起こる事が考えられる。なぜならば、両者の構造にはフェノキサジン骨格があるからである。今後は、シナバリン酸の制限酵素の阻害活性を検討する必要があると思われる。
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	<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 日本動物学会 第95回長崎大会 カイコガの初期発生における cAMP 依存性プロテインキナーゼの遺伝子発現と細胞内局在の解析 2024年9月12日/長崎大学</p>	