| | |
|---|---|
| | さかの　だいすけ |
| 氏　　名 | 坂　野　　大　介 |
| 学位(専攻分野) | 博　　士（学術） |
| 学位記番号 | 博甲第２８７号 |
| 学位授与の日付 | 平成 15 年 3 月 25 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規程第３条第３項該当 |
| 研究科・専攻 | 工芸科学研究科　機能科学専攻 |
| 学位論文題目 | 家蚕卵の炭水化物代謝調節に関する研究 |
| | (主査) |
| 審査委員 | 教　授　古澤　壽治 |
| | 教　授　原　三郎 |
| | 教　授　山岡　亮平 |
| | 教　授　杉村　順夫 |

論文内容の要旨

カイコは、卵期で休眠越冬するが、休眠開始に伴い卵内貯蔵グリコーゲンは、耐凍性物質であるソルビトールとグリセロールに変換され、覚醒とともにグリコーゲンに再変換される。一方、産卵後直ちに胚発生が進行し約 10 日で孵化する非休眠卵では、産卵 2 日後に 10℃以下の温度に遭遇させると、休眠卵と同様にソルビトールやグリセロールが蓄積し、約 120 日間孵化能力を維持している。しかし、非休眠卵での胚発育期および低温下での卵内での炭水化物代謝を統合的に捉えた研究は数少ない。本論文は、カイコ卵の長期保存をねらいとし、非休眠卵の胚発育期や低温下での炭水化物代謝変換を遊離糖、燐酸糖の量的変動、これに関わる律速酵素の酵素学的性質から検討し、その調節機構に関してまとめた。

第一章では、本研究の背景と目的が述べられている。

第二章では、非休眠卵での胚発育から孵化までの 10 日間における炭水化物代謝について検討し、産卵直後から 5 日後までは嫌気的代謝に起因するソルビトールの一時的な蓄積とトレハロースの蓄積がおこる。その後、孵化までは、好気的呼吸が起こり、まずトレハロースが分解され、続いてグリコーゲンが急激に分解される。この代謝変換にはホスホフルクトキナーゼ（PFK）とピルビン酸キナーゼ（PK）の活性調節が関与していることを明らかにした。

第二節では、産卵 1 日後に非休眠卵を 5℃に冷蔵すると、胚は約 80 日間孵化能を維持しているので、この間における炭水化物代謝を追跡した。その結果、冷蔵開始とともに、ソルビトール、グリセロールやトレハロース、ピルビン酸、および乳酸が蓄積し、ミトコンドリア系酵素である NAD-イソクエン酸脱水素酵素（NAD-IDH）、PFK ならびに PK 活性は、低いレベルであった。しかし、この冷蔵卵を 25℃に移し、胚発育を再開させると蓄積されていたソルビトールは直ちに消費され、これに続いてトレハロースやグリコーゲンが消費された。このことによって、胚発育に伴って差時的に代謝変換がおこることを明らかにした。

第三章では、胚発育期間における炭水化物代謝変換に関わると推定した PFK とＰＫの酵素学的性質について検討した。その結果、PFK は 48kDa のサブユニットからなる 4 量体として存在し、卵が保護される環境温度によって、サブユニットの解離・会合がおこること、さらに胚発育初期（嫌気的状態）ではリン酸化状態にあり、発育中期（好気的状態）から脱リン酸化が起こることによって活性化されることを明らかにした。さらに PK は 56kDa のサブユニットからなる 4 量体

として存在し、PFK と同様に胚発育中期から脱リン酸化による活性が上昇することを明らかにした。

第四章では、胚発育中期からの PK 活性上昇が PK タンパク質の *de novo* 合成に因るか否かを検討するため、まず、カイコ卵 PK 遺伝子の全塩基配列を明らかにした。すなわち、1519bp の塩基配列からなるカイコ PK の cDNA には、1.4kbp のオープンリーディングフレームが存在し、その内部には 403 個のアミノ酸がコードされていた。また、カイコ PK の遺伝子配列の内部には、これまでに報告されている PK 遺伝子に共通するコンセンサス配列が存在し、cAMP 依存性プロテインキナーゼによるリン酸化部位や N-グリコシレーション部位の存在が推定できた。さらに、このＰＫ遺伝子の一部をプローブとし、胚発育期間中の PK メッセンジャーRNA(mRNA)量の変動をみたところ発育期間中、ほぼ一定で、しかも PK 蛋白質量の変動についても変動はみられず、胚発育中期からの PK 活性上昇は、ＰＫ蛋白質の *de novo* 合成に因らないことを明確にした。

第五章では、カイコ卵での胚発育や低温保護下での炭水化物代謝変動ならびに律速酵素活性調節機構について総合的に考察し、カイコ卵の低温利用による長期保護について論究した。

## 論文審査の結果の要旨

カイコの胚発育や卵休眠期における炭水化物代謝については、発育経過に伴う炭水化物代謝の全体像を捉えた研究は数少ない。本論文では、このことを踏まえ、胚発育ならびに低温下で長期間保護した非休眠卵の炭水化物代謝について研究している。

まず、カイコの非休眠卵での胚の発育に伴う炭水化物代謝調節について検討し胚の発育の前半期は嫌気的代謝、後半期では好気的代謝が起こり、この変換には律速酵素としてフォスホフルクトキナーゼとピルビン酸脱水素酵素の活性調節が大きく関わっていることを明らかにした。そして、ピルビン酸脱水素酵素の遺伝子配列を昆虫分野で初めて決定し、これをプローブとして用いることにより胚発育中期からの活性上昇は、本酵素蛋白質の合成によるものではなく、脱リン酸化によることを明確にした、またホスホフルクトキナーゼについても脱リン酸化によって活性化されることを明らかにした。さらに低温保護した非休眠卵でのソルビトールやトレハロースの蓄積は、ホスホフルクトキナーゼが低活性であることに起因するものと推察し、本酵素はフラクトースー2.6ー二燐酸などのエフェクターだけでなく、卵の保護温度の違いにより、サブユニットの解離、会合によっても調節されていることを示唆している。

以上のように本論文における成果は、昆虫生理学ならびに Cryobiology の分野に新たな知見を加えるだけでなく、低温環境利用によるカイコの遺伝子資源保存に関する技術面に発展的成果を提供している。

本論文の内容は、審査システムの確立している学会誌に次の２報が発表および印刷中であり、他に２報が審査中である。

Toshiharu Furusawa, Aya Konishi, Daisuke Sakano, Eiji Kotani, J.M.Storey and K.B. Storey(1999): Regulatory properties of phosphofructokinase in the eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. Journal of Sericultural Science of Japan Vol.68(3), 181-194

Daisuke Sakano, Toshiharu Furusawa, Yukio Sugimura, J.M.Storey and K.B.

Storey(2003):Metabolic shifts in carbohydrate metabolism during embryonic development of non-diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. Journal of Sericultural Science of Japan Vol.72(2) （印刷中）

Daisuke Sakano, Toshiharu Furusawa, Yukio Sugimura, J.M.Storey and K.B. Storey: Carbohydrate metabolism in non-diapause silkworm eggs under low temperature. Journal of Sericultural Science of Japan（審査中）

Daisuke Sakano, Toshiharu Furusawa, Eiji Kotani, Yukio Sugimura, J.M.Storey and K.B. Storey: Regulatory mechanism of Pyruvate kinase in the embryogenesis of the silkworm, *Bombyx mori*. Journal of Sericultural Science of Japan（審査中）