

博士論文

カイコ休眠卵における ソルビトール脱水素酵素 遺伝子の発現機構

名古屋大学図書
和 1144655

名古屋大学大学院農学研究科

新美 輝幸

1993年 4月

目次

第 1 章	緒論	1
第 2 章	5 °C 冷蔵によるソルビトール脱水素酵素の誘導	8
	材料と方法	10
	結果	
	1. カイコ卵の SDH に対する抗ヒツジ SDH 抗体の反応性	13
	2. 5 °C 冷蔵休眠卵における SDH 活性と SDH タンパク質量 の変動	15
	考察	18
	摘要	20
第 3 章	5 °C 冷蔵によるソルビトール脱水素酵素遺伝子の発現	21
	材料と方法	22
	結果	
	1. SDH cDNA のクローニングと塩基配列の決定	26
	2. カイコ SDH と哺乳類の肝臓 SDH との比較	26
	3. 5 °C 冷蔵休眠卵における SDH mRNA 量の変動	30
	4. SDH mRNA の卵内局在	34
	考察	36
	摘要	39
第 4 章	胚子発育に伴うソルビトール脱水素酵素遺伝子の発現	40
	材料と方法	41
	結果	
	1. 非休眠卵の胚子発育に伴う SDH 活性と SDH タンパク質 量の変動	42
	2. 非休眠卵の胚子発育に伴う SDH mRNA 量の変動	42

3.	胚子成長期における SDH mRNA の卵内局在	45
4.	幼虫組織における SDH 活性と SDH タンパク質量の分布	45
5.	幼虫組織における SDH mRNA 量の分布	48
	考察	50
	摘要	52
第 5 章	カイコのソルビトール脱水素酵素遺伝子の構造	53
	材料と方法	54
	結果	
1.	SDH 遺伝子クローンの単離	58
2.	SDH 遺伝子の塩基配列の決定	58
3.	SDH 遺伝子のコピー数の決定	58
4.	休眠覚醒期から幼虫孵化時までの胚子発育過程における SDH mRNA の大きさの変化	64
5.	SDH mRNA の 5' 末端構造の決定	67
	考察	71
	摘要	76
第 6 章	総合考察	77
	謝辞	81
引用文献	(和文)	82
	(英文)	84

昆虫は地球上で最も繁栄している生物である。その種数は 100 万以上にも上り、全動物種の約 70 % を占めるといわれている (Pears et al., 1987)。昆虫は世代が短く、より多くの変異を獲得することが可能であった。そのため、昆虫は地球のあらゆる環境によく適応し、多くの種が存在していると考えられる。昆虫は、この繁栄を保つため環境への適応上、2 つの生物戦略をとったと考えられる。一つは飛翔であり、もう一つは休眠である。前者は”動”を、後者は”静”を象徴するため、これら二つの生物戦略は一見矛盾するかのように思われるが、昆虫は不良環境を避けるという目的のためにこれらの戦略を進化させたのである。昆虫は、羽を形成し、飛翔能力を獲得することにより、積極的に良環境に移動できるようになった。一方、一時的に発育を停止させることによって、酸素消費量を減少させて代謝活性を低く保ち、さらには耐凍物質を蓄積するという特徴をもつ休眠を獲得することにより、不良環境に耐え、それが過ぎるのを待つことができるようになった。休眠は哺乳類、爬虫類あるいは両生類によって獲得された冬眠とは異なるものである。昆虫は、良環境の時に光周期や温度のような環境刺激を情報源として不良環境の到来を予知し、良環境のうちに休眠状態に入るのである。一旦休眠に入ると、形態的・可視的発育は認められないが、ある生理的発育を終了しない限り、不良環境から良環境に戻しても昆虫は休眠から覚醒せず、形態的発育の再開は起こらないのである (Yamashita and Hasegawa, 1985)。この生理的発育を休眠間発育 (diapause development) と呼んでいる (Andrewartha, 1952)。

昆虫は、光周期や温度のような環境刺激 (物理情報) を、脳によって感知して統御し、化学情報に変換することによって、外部環境にその生活環を適応させている。この化学情報系に、内分泌系を用いている。休眠の誘導・覚醒に際し、昆虫は通常の成長や発育・変態に用いられている、昆虫の 2 つのホルモン、幼若ホルモン (JH) - 脱皮ホルモン (エクジステロイド) 系を、主に利用している。昆虫の成長・発育を制御するホルモン系については、以下のような理解がなされている。JH はアラタ体で、エクジステロイドは前胸腺で、それぞれ合成され、血液中へと放出される。それぞれのホルモンの合成・分泌は脳から分泌されるホル

モンによって調節されている。脳のホルモンの中で、エクジステロイドの合成・分泌を調節するものについては前胸腺刺激ホルモン（PTTH）、JH の合成・分泌を調節するものについてはアラタ体刺激ホルモン（アラトロピン）及びアラタ体抑制ホルモン（アラスタチン）が知られている。血液中の JH 濃度が高い状態で、エクジステロイド濃度が増加すると、幼虫から幼虫への脱皮が起こり、JH の欠損下で、エクジステロイドが出現すると、幼虫から蛹への脱皮が引き起こされる。蛹から成虫への変態も、JH 濃度が低い状態でエクジステロイド濃度が増加することによってもたらされる（山下，1984，1992）。

昆虫の休眠は、生活環のうちの卵期、幼虫期、蛹期または成虫期のうちのいずれかで生じる。一般的には、一つの発育時期で休眠した昆虫は他の時期で再び休眠することはない。休眠の内分泌的な調節は、現在以下のように理解されている（山下・茅野，1984；Yamashita and Hasegawa, 1985；Yamashita and Suzuki, 1991）。幼虫休眠の中でも若い幼虫期に休眠する昆虫では、休眠は血液中の JH 濃度を高く持続させることによって誘導され、JH 濃度の低下により覚醒される。最終令幼虫期、成熟幼虫期、及び蛹期での休眠は、低 JH 濃度下におけるエクジステロイドの欠如によって誘導され、エクジステロイドの出現により覚醒される。成虫休眠は、生殖巣の発育阻害によって特徴付けられるが、JH の欠如によって誘導され、JH の出現によって覚醒される。

一方、内分泌器官が分化・形成される以前の発育段階で生じる胚子休眠の誘導－覚醒についての内分泌機構は、昆虫一般においては明らかにされていない。しかし、カイコにおいては、24 個のアミノ酸からなる神経ペプチドホルモン（休眠ホルモン）が休眠誘導に関与していることが明らかにされている（Yamashita and Hasegawa, 1985；Imai et al., 1991；Sato et al., 1992）。蛹－成虫発育期に、食道下神経節から分泌される休眠ホルモンが、卵形成期の卵巣に作用すると、産下された卵は受精後の特異的な時期に胚子発育を停止する。カイコ卵の休眠覚醒については、エクジステロイドが関与しているとの報告（Gharib et al., 1981, 1983；Coulon, 1988）はあるが、統一された見解は得られてはいない。

休眠ホルモンの食道下神経節における合成・分泌には脳が関与していると考えられている（Fukuda, 1952；Matsutani and Sonobe, 1987）。従って、胚子、

幼虫、蛹、成虫休眠とに係わりなく、昆虫は脳を仲介して各々のホルモンを駆使し、各々の発育時期に休眠を取り入れることによって、外部環境に昆虫の生活環を巧みに調和させているものと考えられる。季節の進行に昆虫の生活環を同調させることによって、休眠は単に不良環境における個体としての生存を保証するばかりではなく、集団としての発育の斉一化を図り、生殖機会を増すことをも保証しているのである。

休眠に関する研究は、多くの昆虫において行われているが、胚子休眠に関しては蚕糸業との結び付きから、カイコにおいて古くから研究がなされている。休眠性卵を産むカイコは、最終令幼虫期間が非休眠性卵を産むカイコよりも 2 日間程長い。従って、桑の摂食量が多くなり、その分、繭量・産卵量が増加する。そのうえ、繭質が優れていることから、休眠系統のカイコが養蚕農家で通常飼育されている。農家に飼育用の休眠系統幼虫を必要に応じて提供するために、休眠を随時覚醒させる技術と卵の保護技術とが重要な研究課題であった。

休眠胚子の形態及び休眠するカイコの遺伝的性質については、1909 年に外山によって報告されている（外山，1909）。さらに、カイコ卵の保護の立場から、胚子の形態が休眠卵の生理的状态を判断する指標とされたため、詳細な胚子の発育段階表が作成されている（高見，1969；大槻，1979）。カイコの休眠性卵は産下・受精後 25 °C で保護した場合、産下後 1 - 2 日の頭部と尾部の形成及び中胚葉の分節化直後の時期で発育を停止すること、及びこの発育停止は卵を 25 °C に保護する限り長期にわたって維持されることが明らかになっている（Yamashita and Yaginuma, 1991）。

休眠の覚醒のためには、卵を 5 °C に約 2 カ月間冷蔵することが必要とされる。2 カ月間以上冷蔵した卵は、その後、25 °C に保護することにより胚子発育を再開し、幼虫へと孵化する（Yaginuma et al., 1990a）。また、塩酸処理により人為的に休眠覚醒させる方法も既に今世紀初めに確立されている。この場合には、休眠を回避する方法と休眠を打破する方法の 2 つが知られている。前者は休眠性卵を産下後 24 時間前後に、約 15 % の塩酸で 46 °C、5 分間処理するもので即時浸酸法と呼ばれ、後者は産下後 48 時間から、30 日間 5 °C に冷蔵した休眠卵を、約 15 % 塩酸で 48 °C、5 分間処理するもので冷蔵浸酸法と呼ばれている（Yamashita and Yaginuma, 1991；山下，1993）。塩酸処理効果の分子機構は

まだ明らかにされていないが、この 2 つの方法により、蚕種保護技術は飛躍的に発展した。

カイコの休眠の遺伝的な性質には、1 化性（1 年に 1 世代）、2 化性、及び多化性が知られている。1 化性及び多化性のカイコは外部環境に影響されることなく休眠性卵及び非休眠性卵をそれぞれ産む性質が遺伝的に決定されている。2 化性のカイコに関しては、外部環境（温度と光）が、休眠性を決定する。つまり、卵を 25 °C、長日下（明期 16 時間以上）で保護した場合、その卵から成長した母蛾が産む卵は休眠性卵となる。一方、卵の時期を 15 °C、短日下（暗期 12 時間以上）で過ごした母蛾からは、非休眠性卵が産下される。卵を 20 °C のような中間温度で保護した場合には、長日条件では休眠性卵を、短日条件では非休眠性卵が産下される（Kogure, 1933）。また、化性の異なる品種間の交配実験より、卵の休眠性は、その卵を産んだ母親の化性によって決定されることが明らかにされた（外山, 1909）。さらに、化性の異なる品種間での卵巣移植及び血液移注の実験より、産下される卵の休眠性は、卵巣が養われた母体の血液に支配され、受精前に既に決定されていることが示唆された（梅谷, 1929）。以上のような実験から、休眠と環境情報との関わり、及び休眠性卵産生の性質が明らかにされてきた（梅谷, 1929; 高見, 1969）。このような研究過程で、休眠性卵の産生機構に関する様々な仮説が提唱されていた。これらの仮説はいずれも雌蛹の血液中に存在する物質が卵巣に作用して、卵内に蓄積することによって、胚子休眠を引き起こすという考えである。この物質は、渡辺（1924）による”抑制質”、梅谷（1929）による”化性決定素”、Kogure（1933）による”第一越年性物質（着色性物質）及び第二越年性物質（越年性物質）”等である。これらの物質の存在は、単に仮説に過ぎなかった。しかし、1951 年になって長谷川及び福田のそれぞれ独立した研究によって、カイコの休眠は、食道下神経節より分泌される物質により決定されることが明かにされた（Hasegawa, 1951; Fukuda, 1951）。長谷川は、食道下神経節よりこの物質を粗精製し、休眠を誘導する物質の実体を明かにし、休眠ホルモンと名付けた（Hasegawa, 1957; Yamashita and Hasegawa, 1985）。この研究によって、休眠性卵の産生は、発育中の卵巣が休眠ホルモンの作用に遭うか否かによって決定されることが示されたのである。

また、1958 年に茅野によって、カイコ休眠卵においては、休眠開始期にグリ

コーゲンがソルビトールとグリセロールとに変換されること、及び休眠覚醒期にはソルビトールとグリセロールからグリコーゲンが再合成されることが明らかにされた (Chino, 1958)。その後、柳沼と山下により、グリコーゲンあるいは中性脂肪 (グリセリド) を ^{14}C で標識した休眠卵を用いて、グリコーゲンと多価アルコールとの相互変換系について、より詳細な検討がなされた。その結果、休眠開始期に生成されるソルビトールはすべてグリコーゲンに由来するが、生成されるグリセロールの一部はグリセリドに由来すること、及び休眠覚醒期にはソルビトール減少量に相当するグリコーゲン量が回復するが、グリセロール量はこの時期に減少していないことが明かとなった (柳沼・山下, 1977; Yaginuma and Yamashita, 1978, 1980; Yamashita and Yaginuma, 1991)。従って、グリコーゲンとソルビトールとの相互変換系が、カイコの休眠卵においては、重要であることが示された。カイコ休眠卵においてグリコーゲンと多価アルコールとの相互変換系が見いだされたことは、昆虫の休眠が、ただ単に発育を止めて代謝を低く保つだけではなく、越冬に有利となる代謝系を積極的に確立することにより達成されるものであることを示している。この特異的な代謝系の確立により、耐凍物質であるグリセロール、ソルビトール、及びトレハロース等を蓄積することが可能となった。一般に、これらの耐凍物質は、冬期の零下の低温によって細胞が凍結するのを防いだり、凍結しても細胞構造が破壊されないように働いているものと考えられている (Storey and Storey, 1988)。カイコ卵の場合には、多量に蓄積したソルビトールは、非凍結作用よりは、むしろ、自由水を結合水にすることによって細胞の構造と機能を保護して安定化する役割を果していると考えられている (Suzuki et al., 1983)。このため、カイコ卵の炭水化物代謝は休眠との関連でよく研究が進んでいる。

炭水化物代謝の面からみると、休眠期は大きく 4 つの時期に分けて考えることができる (Yamashita et al., 1981)。つまり、休眠誘導期、休眠開始期、休眠維持期、休眠覚醒期である。休眠誘導期には、食道下神経節から血液中に放出される休眠ホルモンが卵形成期の卵巣に作用し、卵巣の trehalase (EC 3.2.1.28) 活性を約 2 倍上昇させる (Yamashita and Hasegawa, 1967)。この活性の上昇により、血液中のトレハロースが卵内にグルコースとして取り込まれ、休眠性卵では非休眠性卵の約 1.5 倍のグリコーゲンが蓄積する (Chino,

1957; Yamashita et al., 1981)。休眠開始期には、産下 2 日後に、急激な glycogen phosphorylase a (EC 2.4.1.1) 活性の出現がみられる (Yamashita et al., 1975)。この酵素により、グリコーゲンが分解されソルビトール合成の素材が提供され、ソルビトールが蓄積される。非休眠性卵においては、この酵素活性の急激な上昇は認められず、グリコーゲンからソルビトールへの変換も認められない。また、既に述べたように休眠開始期に胚子の細胞分裂は停止するが、その細胞分裂の停止は細胞周期の G₂ 期で起こっていることが明らかにされている (Nakagaki et al., 1991)。休眠維持期には、RNA とタンパク質合成は非常に低い状態にある (Kurata et al., 1979; Sonobe and Odake, 1986; Sonobe, 1989)。休眠は、5 °C で約 2 カ月間冷蔵することにより覚醒される (Yaginuma et al., 1990a)。休眠覚醒期にソルビトールは再びグリコーゲンへと変換される。この変換は、このときに初めて酵素活性が出現する NAD-sorbitol dehydrogenase (SDH, EC 1.1.1.14) によって調節されている (Yaginuma and Yamashita, 1979)。一方、休眠卵を 25 °C で保護し続けた場合、SDH 活性の出現は認められない。つまり、5 °C の様な低温によって SDH 活性は出現すると考えられる。このことから、SDH 活性の調節機構を明らかにすることによって、休眠覚醒を導く低温の作用点を分子レベルで明らかにすることができるものと考えられる。

そこで本研究においては、休眠覚醒期に活性の出現する SDH の活性調節機構について調査した。第 2 章では、抗ヒツジ SDH 抗体を作製し、休眠覚醒期における SDH 活性と SDH タンパク質量の変動を調査し、5 °C 冷蔵により、SDH タンパク質の生合成が開始されることを示した。第 3 章では、抗ヒツジ SDH 抗体を用いてカイコ SDH cDNA を単離し、休眠覚醒期の SDH mRNA 量の変動を調査した。その結果、SDH 遺伝子は、5 °C 冷蔵により発現が開始されることが明かとなった。また、この発現は卵黄細胞核で起きていることを示した。第 4 章では、非休眠卵の胚子発育に伴う SDH 活性、SDH タンパク質量、及び SDH mRNA 量の変動を調査し、それらの出現は 2 つの発育時期 (胚子成長期及び幼虫組織形成期) に相当することを示した。また、SDH mRNA は、幼虫組織では主に脂肪体に局在していた。第 5 章では、SDH 遺伝子の発現機構を解明するため、カイコ SDH 遺伝子を単離し、その塩基配列を決定した。SDH 遺伝子は、8 個のエクソンより構成されていた。

5' 上流域には、TATA box 相同配列が 4 箇所それぞれ離れた箇所に存在していた。カイコの SDH 遺伝子は、ゲノム当り 1 コピーであった。休眠覚醒期から胚子発育期にかけて出現する 2 種の長さの SDH mRNA は、異なる転写開始点によるものであることを示した。これらの結果を総合して、第 6 章ではカイコ SDH 遺伝子の発現調節機構について考察した。

第 2 章 5 ° C 冷蔵によるソルビトール脱水素酵素の誘導

一般に昆虫では、休眠中にポリオール（グリセロール、ソルビトール等）やトレハロースが蓄積して耐寒・耐凍物質として働くことによって、昆虫が越冬することを可能にしている（Hochachka and Somero, 1984; Storey and Storey, 1988）。ポリオールによる耐寒・耐凍性は、ポリオールが、細胞の super cooling point を降下させると共に、細胞中の自由水を減少させ、その分だけ結合水を増加させることによって達せられる。この自由水から結合水への変換によって、生化学的な反応が低下し、低温に対する耐性が獲得されるものと考えられている（Storey and Storey, 1988）。

カイコの卵では、休眠の開始期にグリコーゲンよりソルビトールが生成され、150 mM という高濃度で蓄積される（Chino, 1957, 1958; 柳沼・山下, 1977; Yaginuma and Yamashita, 1978; Yamashita and Yaginuma, 1991）。このソルビトールはカイコの場合、低温下における卵内の細胞の構造と機能を安定化させ、卵に耐寒性をもたらす（Suzuki et al., 1983）。休眠覚醒に有効な約 2 カ月間の 5 °C 冷蔵によって、ソルビトールはグリコーゲンへと変換され、これに伴いソルビトールに使われていた結合水が、再び自由水となる。これによって、生化学的に活発な代謝が可能となる。この自由水の回復は、胚子発育の再開に非常に重要な意味を持つものと考えられる。さらに、休眠覚醒に伴い再び蓄積されたグリコーゲンは胚子の形態形成の過程でエネルギー源として利用される（Yamashita et al., 1975; Yaginuma and Yamashita, 1978; Yaginuma et al., 1990a; Yamashita and Yaginuma, 1991）。

上記のように、休眠覚醒期において、ソルビトールの利用を調節する系が重要な意味を持つと考えられる。そこで、ソルビトールの利用を制御する酵素を同定するため、ソルビトール代謝に関わる 3 種の酵素、aldose reductase（NADP-polyol dehydrogenase, EC 1.1.1.21）、NAD-sorbitol dehydrogenase（SDH, EC 1.1.1.14）、ソルビトールを磷酸化する酵素の活性変動について調査がなされた（Yaginuma and Yamashita, 1979, 1991）。その結果、aldose reductase 活性は、休眠開始・維持・覚醒期を通して高く、ほぼ一定であり、ソルビトールを

磷酸化する酵素の活性は、休眠開始・維持・覚醒期を通して低く、ほぼ一定であった。これに対して、SDH 活性は、休眠開始・維持期にはほとんど認められないが、休眠覚醒期に出現し、増加した。SDH のみがソルビトール量の減少変動型と鏡像関係にある活性変動型を示した (Yaginuma and Yamashita, 1979; Yaginuma et al., 1990a)。つまり、休眠打破に効果的である 5 °C 冷蔵によって、SDH 活性が出現すること、従って SDH 活性によってソルビトール利用が調節されていることが示された。

そこで本章では 5 °C 冷蔵による SDH 活性の出現が、既存の SDH が不活性型から活性型へ変換されることによるものか、新たに合成された SDH によるものかについて検討した。先ずはじめに、SDH タンパク質の検出に必要な抗体を作製するためにカイコ卵から SDH の精製を試みたが、SDH は律速酵素であり、ソルビトール代謝系の中で一番活性が低いことから、そのタンパク質は、微量であることと、失活し易いことから精製は非常に困難であった。そこで、既に精製されて市販されているヒツジの SDH に注目し、カイコとヒツジの SDH タンパク質の間には共通した一次構造が存在するものとの仮定のもとに、市販のヒツジの SDH を抗原に用い、抗体を作製した。次に、この抗体がカイコ卵から部分精製した SDH と反応することを示した。さらに、この抗体を用いて、5 °C で冷蔵した休眠卵において SDH タンパク質量が SDH 活性に比例することを明らかにした。従って、5 °C のような低温によって SDH タンパク質の生合成が開始されるものと結論した。

材料と方法

供試材料

供試蚕品種には、交雑種（錦秋×鐘和、春嶺×鐘月）を用いた。発育の斉一化を図るために、産卵時間を2時間とし、25℃に2日間保護した後、5℃に冷蔵して休眠を覚醒させた。また、休眠の維持には、産下後より、連続して25℃で保護した（Yaginuma et al., 1990a）。

酵素標品の調製

カイコ卵（0.2 g）を、5倍容（V/W）の100 mM Tris - HCl（pH 8.8）で磨砕し、17,000 g、4℃で15分間遠心して上清を得た。この上清のうち一定量を Sephadex G-25 カラム（0.5 × 7 cm; ファルマシア LKB）にかけ、高分子分画を集め、酵素標品として用いた。

酵素活性の測定

酵素活性は、NAD とソルビトールとを酵素標品と 30℃で反応させ、生成された NADH 量を 340 nm での吸光度の変化を測定することによって求めた。

酵素の部分精製

1. 硫安分画

酵素の精製操作は 4℃あるいは 0℃（氷上）で行った。10 g の休眠卵（5℃で300日間冷蔵）から調製した遠心（17,000 g、15分）上清から、60% 飽和硫安で沈澱する分画を集めた。この沈澱物を少量の 20 mM 燐酸緩衝液（ K_2HPO_4 - KH_2PO_4 ）、pH 7.0、に溶解させた後、Sephadex G-25 カラム（2.5 × 10 cm; ファルマシア LKB）にかけ、高分子分画を集めた。

2. Blue Sepharose CL 6B カラムクロマトグラフィー

高分子分画を、予め 20 mM 燐酸緩衝液、pH 7.0、で平衡化した Blue Sepharose CL 6B カラム（2.5 × 10 cm; ファルマシア LKB）に添加した。同じ緩衝液でカラムを十分洗浄し、未吸着分画を取り除いた。カラムに吸着したタンパク質を 0.2 M NaCl を含む 20 mM 燐酸緩衝液により溶出した。流速は

38 ml/hr であり、10 ml ずつを分画した。各フラクションのタンパク質量と SDH 活性を測定した。活性の認められたフラクションを集め、80 % 飽和硫酸で沈澱させ、ごく少量の 0.2 M NaCl を含む 20 mM 燐酸緩衝液に溶解させた。

3. Sephacryl S-300 クロマトグラフィー

Sephacryl S-300 カラム (1.5 × 90 cm; ファルマシア LKB) は、予め 0.2 M NaCl を含む 20 mM 燐酸緩衝液、pH 7.0、で平衡化した。上記のサンプルをカラムに添加し、同上の緩衝液で溶出させた。流速は 12 ml/hr であり、1 ml ずつ分画した。

タンパク質の定量

Bradford (1976) の方法に従った。標準曲線の作製にはウシ血清アルブミンを用いた。また、酵素の精製の指標としてのタンパク質量は波長 280 nm での吸光度から算定した。

SDH タンパク質分画の濃縮

ウエスタンブロッティングに用いる SDH タンパク質分画は以下の方法を用いて濃縮した。0.5 g の卵を 5 倍容 (V/W) の 20 mM 燐酸緩衝液 (pH 7.0) で磨碎し、遠心した後、上清を集めた。これを Blue Sepharose CL 6B カラムにかけ、未吸着のタンパク質を十分洗浄した後、0.2 M NaCl を含む 20 mM 燐酸緩衝液でカラムに吸着したタンパク質を溶出した。これらを脱イオン蒸留水でよく透析し、濃縮したものを SDS-PAGE の試料として用いた。

抗体の作製

抗原には、Boehringer Mannheim 社より購入した、精製されたヒツジの肝臓 SDH (100 μ g) を用いた。初めに、SDS-PAGE により、市販標品の純度を調査したところ、1 本のバンドのみが検出されたのでこの標品をそのまま 200 μ l の PBS (8.2 mM Na_2HPO_4 , 1.5 mM KH_2PO_4 , 137 mM NaCl, 26 mM KCl, pH 7.4) に溶解し、等量の Complete Freund's Adjuvant (Difco Lab.) と混合した。この混合液を 1 週間間隔で合計 4 回マウスの腹腔に注射した。最終の注射から 1 週間後に採血を行い、採集した血液を 10,000 g で 10 分遠心し、得られた上清を

抗体として用いた。また、抗ウマ肝臓アルコール脱水素酵素（ADH）抗体、及び、抗酵母 ADH 抗体も、抗原として用いたそれぞれの精製標品を Boeringer Mannheim 社より購入して同様に作製した。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）

Native-PAGE は 7 % スラブゲルを用い、Davis (1964) の方法に従って行った。SDS-PAGE は 12.5 % スラブゲルを用い、Laemmli (1970) の方法に従って行った。

ウェスタンブロット法

電気泳動後 Towbin et al. (1979) の方法に従ってタンパク質をニトロセルロース膜（Advantec Toyo）に電氣的にブロットした。この膜を 2 % スキムミルク溶液（PBS に溶解）中で 30 分間振盪した後、2,500 倍に希釈した抗ヒツジ SDH 抗体を含む 2 % スキムミルク溶液中で、4 °C で一晩振盪した。2 % スキムミルク溶液でよく洗浄した後、2,500 倍に希釈した 125 I でラベルしたヤギ抗マウス IgG 抗体（Amersham）を含む 2 % スキムミルク溶液中で室温で 2 時間振盪した。再び 2 % スキムミルク溶液中で洗浄した。このニトロセルロース膜を乾燥した後、X 線フィルムに密着し、抗体と反応したタンパク質バンドを検出した。または、一次抗体で振盪した後、Amersham blotting detection kit を用い、説明書（Amersham International）に従って、biotin-avidin-アルカリフォスファターゼ系によって、抗体と反応したタンパク質バンドを検出した。

結 果

1. カイコ卵の SDH に対する抗ヒツジ SDH 抗体の反応性

SDH タンパク質の量的変動を調査するために、市販の精製されたヒツジの SDH を抗原に用いて抗ヒツジ SDH 抗体を作製した。抗ヒツジ SDH 抗体の特異性を見るため、SDH と一次構造上約 30 % 類似性のあるウマ肝臓アルコール脱水素酵素 (ADH) 及び酵母 ADH との反応性を SDS-PAGE とウエスタンブロッティング分析によって調査した (Jeffery and Jornvall, 1988)。その結果、抗ヒツジ SDH 抗体はヒツジ SDH (10 ng) とのみ反応し、ウマ肝臓 ADH (10 μ g) 及び酵母 ADH (10 μ g) とは反応しなかった (結果省略)。さらに、この結果を再確認するため、抗ウマ肝臓 ADH 抗体及び抗酵母 ADH 抗体を作製し、SDH との反応性を調べた。その結果、抗ウマ肝臓 ADH 抗体はウマ肝臓 ADH (100 ng) とのみ反応し、ヒツジ SDH (1 μ g)、酵母 ADH (100 ng) 及び部分精製したカイコ SDH (1 μ g) には反応しなかった (結果省略)。さらに、抗酵母 ADH 抗体は、酵母 ADH (100 ng) とのみ反応し、ウマ肝臓 ADH (100 ng)、ヒツジ SDH (1 μ g) 及び、部分精製したカイコ SDH (1 μ g) には反応しなかった (結果省略)。以上の結果より、抗ヒツジ SDH 抗体は、一次構造上類似性の認められる ADH とは反応せず、SDH とのみ反応することが明らかになった。

次に、抗ヒツジ SDH 抗体のカイコ卵の SDH との反応性について調べた。カイコ卵の SDH を Blue Sepharose CL 6B カラム、Sephacryl S-300 カラムを用いて部分精製した。Sephacryl S-300 カラムの溶出パターンを Fig. 1A に示した。SDH 活性は、フラクション No. 101 が、一番高かった。また、各フラクションにおいて、ウエスタンブロット分析を行ったところ、一番濃いバンドは、フラクション No. 101 で得られ、バンドの濃さと活性の強さのパターンがよく一致していた (Fig. 1A, B)。

さらに、一番活性の強くみられた No. 101 のフラクションのみを用いて、7 % Native-PAGE を行った。同一試料を 3 レーンに泳動した後、ゲルをそれぞれ短冊状に切り出した。第 1 のレーンのゲルは、SDH 活性の測定に用いた。第 2 のレーンのゲルは、ウエスタンブロッティング分析に用いた。第 3 のレーンのゲルは、2 次元目の SDS-PAGE に用いた後、さらにウエスタンブロッティング分析

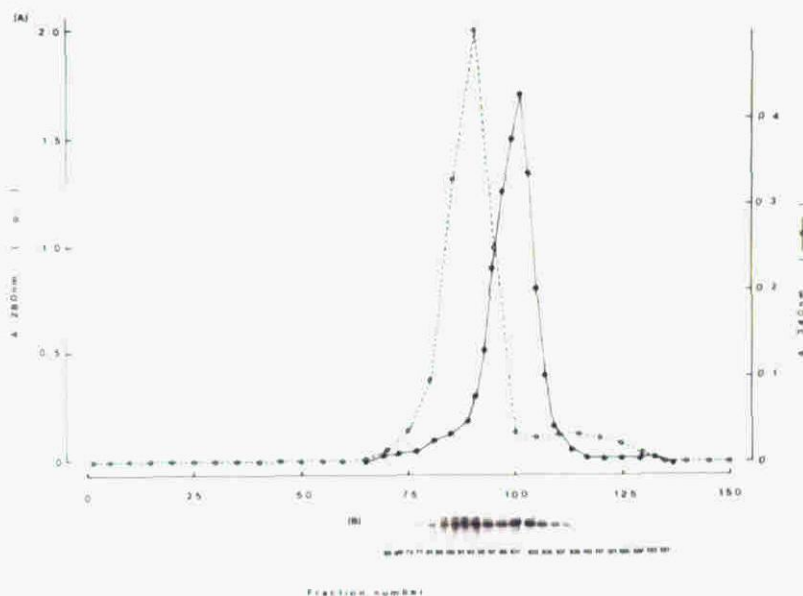


Fig. 1. Sephacryl S-300 column chromatography of Bombyx SDH. (A) Profile of protein concentration and SDH activity. (B) Immunoblotting analysis using anti-sheep SDH serum. The eggs (10 g) were used as the starting material after chilling at 5°C for 300 days. Fractions containing SDH activity after Blue Sepharose chromatography were concentrated and then applied to Sephacryl S-300. Fractions (1 ml) were collected at a flow rate of 12 ml/h. In (A), A. 280 nm ($\cdots \bigcirc \cdots$), absorbance at 280 nm for protein concentration; A. 340 nm ($- \bullet -$), absorbance at 340 nm for SDH activity per 1 h/50 μ l of each fraction. In (B), biotin-avidin-alkaline phosphatase system was used for immunostaining.

を行った (Fig. 2)。Native-PAGE 後の SDH 活性は、電気泳動後のゲルを原点から先端まで 5 mm 間隔で切断し、それぞれのゲルを酵素標品として用いることによって求めた。SDH 活性は Native-PAGE のゲル上では、Rf 値 0.17 - 0.21 の部分に認められた (Fig. 2A)。Native-PAGE 後のウエスタンブロッティングでは、Rf 値 0.21 付近に抗ヒツジ SDH 抗体と反応するバンドが検出された (Fig. 2B)。この Rf 値は活性の認められた Rf 値と一致していた。2 次元目に SDS-PAGE を行った後にウエスタンブロッティングした結果においては、分子量 36,000 の位置に抗体と反応するスポットが確認された (Fig. 2C)。

以上の結果より、抗ヒツジ SDH 抗体はカイコ卵の SDH を認識すること、及びカイコの SDH は 36 kDa のポリペプチドより成ることが示唆された。

2. 5 °C 冷蔵休眠卵における SDH 活性と SDH タンパク質量の変動

休眠卵を産下後 2 日より 5 °C に冷蔵し、一定期間後にサンプリングし、SDH 活性の測定とウエスタンブロッティング分析を行った。活性は冷蔵 44 日まで検出されなかったが、冷蔵 54 日には出現し、以後冷蔵期間とともに上昇した (Fig. 3A)。一方、産下後 25 °C で保護し続けた休眠卵では、SDH 活性はほとんど検出されなかった (結果省略)。

SDH は、微量であるため Blue Sepharose CL 6B カラムを用いて SDH タンパク質分画を濃縮して、SDS-PAGE のサンプル (1 レーン当たり 75 mg の卵に相当) とした。抗ヒツジ SDH 抗体と反応する分子量 36,000 のタンパク質 (Fig. 2C 参照) は、冷蔵 54 日より検出され (Fig. 3B)、以後冷蔵期間とともにバンドの濃度は増加した。一方、産下後 25 °C で保護し続けた場合、抗ヒツジ SDH 抗体に反応するバンドは検出できなかった (結果省略)。

以上の結果より、SDH 活性の強さは、SDH タンパク質の量に比例していることが示された。つまり、低温によって出現する SDH 活性の出現は、SDH タンパク質の生合成によってもたらされることが示唆された。

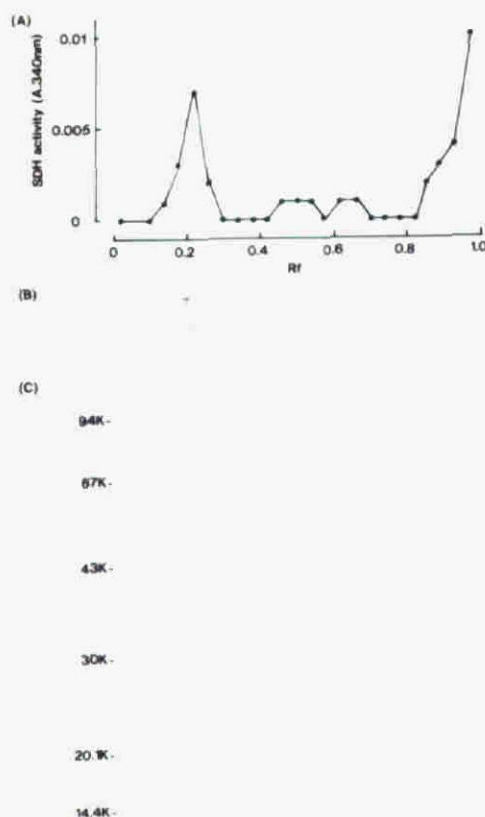


Fig. 2. Analyses by PAGE and immunoblotting of the partially purified *Bombyx* SDH. SDH purified partially by a combination of Blue Sepharose and Sephacryl S-300 chromatography was loaded on the three lanes of 7% native-PAGE gel. After native-PAGE, the three lanes were cut into each strip. Each lane was used for the following analyses. (A) SDH activity on 7% native-PAGE gel. The gel strip was cut into each 5 mm piece from the origin to the front. SDH activity was measured as described in the Materials and Methods, except for use of gel piece instead of enzyme solution. A. 340 nm, absorbance at 340 nm per 1.5 h/one piece of the gel. (B) Immunoblot of 7% native-PAGE gel. (C) Immunoblot after further analysis for 12.5% SDS-PAGE. Biotin-avidin-alkaline phosphatase system was used for immunostaining.

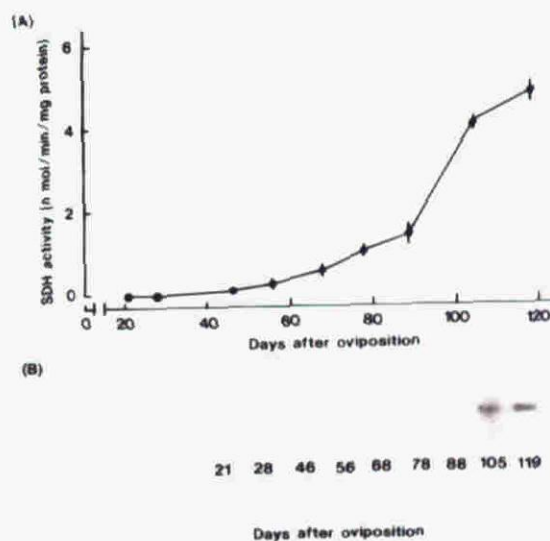


Fig. 3. Changes in activity of SDH (A) and intensity of SDH immunolabeling band (B) in *Bombyx* diapause eggs exposed to 5°C from 2 days after oviposition. The eggs were chilled at 5 °C from 2 days after oviposition. In (A), each point represents a mean of two separate experiments \pm range shown as vertical bars. In (B), each sample, corresponding to 75 mg eggs, was applied to 12.5% SDS-PAGE after Blue Sepharose CL-6B column chromatography (see Materials and Methods). For the immunolabeling, an anti-mouse IgG labeled with ^{125}I was used. The same applies to Fig. 10.

考 察

抗ヒッジ SDH 抗体が、カイコ卵の SDH を認識することが明かとなった。この抗体と反応したカイコの SDH は、分子量 36,000 のサブユニットから成ることが示された。この分子量は、ヒッジの SDH のサブユニットの分子量 38,000 に類似した大きさであった (Jeffery and Jornvall, 1988)。この抗体を用いて休眠覚醒期における SDH タンパク質量の変動を調査し、SDH 活性の変動と比較した。その結果、SDH タンパク質量は、SDH 活性の強さとよく一致していた。このことにより、SDH 活性の出現は SDH タンパク質の生合成に依存していることが示唆された。つまり、5 °C 冷蔵による SDH 活性の出現は、SDH タンパク質の生合成に基づくものであることが示された。

休眠中、または、冷蔵期間中のカイコ卵においては、タンパク質量の変動は、Lowry 法や Bradford 法による定量や SDS-PAGE ゲルのクーマシー染色ではほとんど認められないのは勿論のこと (小林・柳沼, 1986)、放射性同位体で標識したアミノ酸の取り込み (Sonobe and Odake, 1986; Sonobe, 1989)、あるいは、全 RNA を用いた in vitro 翻訳系によるタンパク質合成のレベル (Kurata et al., 1979; 小林・柳沼, 1986) においても、休眠に伴う変動はほとんど検出されていない。また酵素活性の変化では、アリルエステラーゼの 1 種であるエステラーゼ A₄ の活性は休眠卵を 5 °C で 2 週間冷蔵することにより出現することが示されているが、この活性の出現は不活性型から活性型に変換されることによって生じることが唯一示されているのみである (Kai et al., 1987)。

また、Hyalophora cecropia と Philosamia cynthia の休眠蛹や Eurosta solidaginis の越冬幼虫においても、低温によってポリオールやトレハロースが蓄積し、数種の酵素活性 (Glycogen phosphorylase、Hexokinase、phosphofructokinase 等) が増大することが知られている。いずれの場合においても、この酵素活性の増大は、既存する酵素の活性化によって生じることが示唆されている (Ziegler et al., 1979; Storey and Storey, 1981; Storey, 1982; Hayakawa and Chino, 1982a, b)。これに対し、本研究において SDH タンパク質の生合成が、5 °C の様な低温によって、新たに開始されていることが示された。

それでは、SDH タンパク質の生合成は翻訳または転写のいずれのレベルにお

いて調節されているのであろうか？ 転写のレベルで調節されているのであれば、5 °C 冷蔵によって SDH mRNA の合成が開始されると考えられる。また、翻訳のレベルで調節されているのであれば、卵形成期間に合成された SDH mRNA が母性 mRNA として卵に保存され、休眠期間中長期にわたって安定に保たれていると考えられる。そこで次章では、SDH mRNA に対する cDNA をクローン化し、この SDH cDNA をプローブとして SDH mRNA を定量し、SDH mRNA 量が、SDH タンパク質量と比例して変動するものかどうかについて検討した。

摘 要

1. 精製されたヒツジの SDH を用いて抗 SDH 抗体を作製し、この抗体がカイコの SDH を認識することを示した。
2. カイコの SDH タンパク質のサブユニットの分子量は 36,000 であった。
3. 5 °C に冷蔵した休眠卵の SDH 活性の変動のパターンは、SDH タンパク質量の変動のパターンに一致していた。
4. 以上の結果より、5 °C 冷蔵によって出現する SDH 活性は SDH タンパク質の生合成によってもたらされることが示唆された。

第3章 5 ° C 冷蔵によるソルビトール 脱水素酵素遺伝子の発現

第2章では、カイコ卵の SDH を認識する抗ヒツジ SDH 抗体を調製し、この抗体を用いて、休眠卵において 5 °C 冷蔵によって出現する SDH 活性は、SDH タンパク質の生合成によってもたらされることを示した。そこで、本章では SDH タンパク質の生合成が転写または翻訳のいずれのレベルで調節されているかについて検討した。

先ず、5 °C 冷蔵に伴う SDH mRNA 量の変動を調査するため、ハイブリダイゼーションのプロープとする SDH cDNA を調製することとした。前章で調製した抗ヒツジ SDH 抗体を用いて、カイコ幼虫脂肪体の poly (A)⁺ RNA から作製した cDNA ライブラリーをスクリーニングして、SDH cDNA を単離し、この cDNA の塩基配列を決定して、アミノ酸配列を推定した。ホモロジーサーチの結果、カイコ SDH cDNA から推定したアミノ酸配列は、哺乳類の SDH と相同性が高いことが明らかとなった。この cDNA を用いたノーザンブロッティング法または reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法により、SDH mRNA 量の変動を調査したところ、カイコ SDH mRNA は、冷蔵 40 - 50 日より出現し、以後低温接触期間の増加と共に増加した。さらに、この mRNA の卵内における局在性を胚子、卵黄細胞、漿膜について調べたところ、SDH mRNA は主に卵黄細胞に局在することが明らかとなった。以上の結果より、抗ヒツジ SDH 抗体を用いてカイコの SDH cDNA を単離したこと、並びに、SDH タンパク質の生合成は転写レベルで調節されていることが示された。

材料と方法

供試材料

供試蚕品種には、交雑種（春嶺×鐘月）を用いた。発育を同調させるため、産卵時間は 2 時間とした。卵の休眠状態は以下のような処理によって調節した。
(1) 休眠維持：産下後連続して 25 °C に保護、(2) 休眠覚醒：産下後 2 日から 5 °C に冷蔵。

胚子、漿膜、及び卵黄細胞の分離

5 °C で 104 日間冷蔵した休眠卵を解剖に用いた。実体顕微鏡下で鋭い先端のピンセットを用いて冷生理食塩（0.75 % NaCl）中で、胚子（羊膜を含む）、卵黄細胞、漿膜に分けた。

抗ヒツジ SDH 抗体による cDNA ライブラリーのスクリーニング

4 令 2 日の幼虫の脂肪体または 8 日令の卵の poly (A)⁺ RNA より作製した λgt11 cDNA ライブラリーをスクリーニングに用いた。組換え体 λファージを大腸菌 Y1090 に感染させてプラークを形成させた。このプラークに予め 10 mM IPTG で処理したニトロセルロース膜をあて、膜上に発現したタンパク質を吸着させた。この膜を 2 % スキムミルク溶液（PBS 溶解）中で室温で 30 分間振盪した後、2,500 倍に希釈した抗ヒツジ SDH 抗体を含む同じ溶液中で 4 °C、一晩振盪した。2 % スキムミルク溶液でニトロセルロース膜を洗浄し、続いて [¹²⁵I] で標識したヤギ抗マウス IgG 抗体（74 kBq/20 ml; Amersham）を含む同じ溶液中で室温で 2 時間振盪した。陽性のプラークから回収したファージを再び大腸菌に感染させ、スクリーニングを繰り返した。この操作はすべてのプラークが陽性になるまで繰り返した。

cDNA の塩基配列の決定

クローン化した組換え体ファージを EcoRI で切断し、得られた cDNA インサートを M13mp18 ベクター（Toyobo, Tokyo, Japan）のマルチクローニングサイト内にある EcoRI 切断部位にライゲーションキット（Takara, Kyoto, Japan）

を用いて連結した。M13mp18 cDNA 組換え体と JM103 のコンピテント細胞を混合し、形質転換した JM103 コンピテント細胞を得た。形質転換した細胞と JM103 とを同時に培養することにより、組換え体 M13 ファージのプラークを形成させた。組換え体 M13 ファージの RF (replicative form) DNA を調製した (Sambrook et al., 1989)。キロシーケンス用ディリジョンキット (Takara, Kyoto, Japan) を用い、種々のディリジョン ミュータント cDNA を組み入れた M13mp18 ファージを作製した。これらのファージの 1 本鎖 DNA を調製し、これらをテンプレートとしてシーケンス反応に用いた。シーケンス反応は Sequenase (United States Biochemicals Co.) を用い、ジデオキシ法 (Sanger et al., 1977) により、DNA オートシーケンサーを用いて行った (ABI model 370A)。また一次構造は、GENETYX (SDC software develop. Co., Tokyo, Japan) により推定した。

ノーザンブロット法

1. ホルムアルデヒドゲル電気泳動とナイロン膜への転移

全 RNA は Kobayashi et al. (1988) の方法に従いフェノール法によって抽出した。全 RNA (30 μ g) に、2.0 μ l の 5 \times MOPS、3.5 μ l の formaldehyde、10 μ l の formaldehyde gel-loading buffer (50 % glycerol、1 mM EDTA、0.25 % xylene cyanol FE) を加え、電気泳動用試料とした。2.2 M formaldehyde を含む 1.0 % アガロースゲルを作製し、電気泳動緩衝液 (1 \times MOPS) に浸して 5 V/cm、5 分間プレランした後、試料を添加し、3 - 4 V/cm で電気泳動した。泳動後のゲルから RNA をナイロン膜 (Hybond N⁺ nylon membrane, Amersham) に転移した。転移は、0.5 M NaCl をブロッティングバッファーとして用い、毛細管現象を利用する方法で行った。

2. プローブの作製

cDNA を鋳型にして、[α -³²P] dCTP (1.85 MBq) を用いランダムプライマー法により [³²P] で標識したオリゴヌクレオチドを作製した。反応は、Random Primed Labeling Kit (Boehringer Mannheim) を用いて行った。

3. ハイブリダイゼーション

RNA をブロットしたナイロン膜はプレハイブリダイゼーション溶液 (5 \times

SSPE、50 % formamide、5× Denhardt's reagent、0.5 % SDS、10 mg/ml salmon sperm DNA) に浸し、42 °C で少なくとも1時間インキュベートした。プレハイブリダイゼーション溶液を取り除いた後、プレハイブリダイゼーション溶液に [³²P] で標識した DNA プローブ (2×10⁷ cpm/4 ml) を加えたハイブリダイゼーション溶液にナイロン膜を浸し、42 °C で 12 時間インキュベートした。インキュベート後ナイロン膜は、洗浄するため 100 ml の 0.1 % SDS を含む 2×SSPE 溶液に浸し、42 °C で 15 分間振盪した。この操作を2回繰り返した。さらに 200 ml の 0.1 % SDS を含む 0.1× SSPE 溶液に浸し、65 °C で 15 分間振盪した。この操作は 2 回繰り返した。洗浄後ナイロン膜をオートラジオグラフィーに用い、反応したバンドを検出した。

RT-PCR 法

基本的には、Dallman and Porter (1991) の方法に従って行った。1 μg または 0.2 μg の全 RNA 試料をスーパースクリプト (RNase H⁻ reverse transcriptase、GIBCO BRL) によるファーストストランド cDNA の合成に用いた。この cDNA のうち、1/4 量を PCR に使用した。カイコの SDH に特異的なプライマーとして、5'-TACACTGACGAGGAGGTTGT-3'、及び、5'-TTTGACACGTGTATGAGTATT-3' (Fig. 5, 点下線) を用いた。期待される 376 bp の PCR 産物を、アガロースゲル電気泳動した後、ナイロン膜に転移した。この PCR 産物の検出には [³²P] でラベルした 5'-GTGGAGCTGCCGCTCACA-3' (Fig. 5, 二重下線) をプローブに用いて行った。プローブにハイブリダイズした PCR 産物の放射活性の視覚化と数量化は、イメージアナライザー、BAS 2000 (Fujifilm、Tokyo、Japan) を用いて行った。PCR 産物量の log 値は、27 サイクルまで直線的に増加したので、本実験では、25、または、27 サイクルを用いて、PCR を行った。SDH とは異なる発現の対照として、細胞質アクチンについても同様の操作を行った。ただし、PCR のテンプレートには、1/20 量の cDNA を用いた。PCR のプライマーには、5'-ATCAAGGAGAAGCTGTGCTA-3' と 5'-CACTTCATGATGGAGTTGTA-3' を用いた (Mounier and Prudhome, 1986)。PCR 産物の検出のためのプローブには、5'-GCTATCACCATCGGAAACGA-3' を用いた。アクチンの PCR 産物の log 値は、20 サイクルまで直線的に増加したので、本実験では、18 サイクルで PCR を行った。

コンピュータ解析

シーケンス解析は、GENETYX fast homology search (SDC software develop. Co., Tokyo, Japan) を使った FAST program (Lipman and Pearson, 1985) により、NBRF 及び SWISS-PROT のタンパク質データベースのソフトウェアを用いて行った。

結 果

1. SDH cDNA のクローニングと塩基配列の決定

先ず初めに、8 日令の卵を用いて作製した cDNA ライブラリー (Ikeda et al., 1991) のうち、 1.8×10^6 個の組換え体ファージに対して、抗ヒツジ SDH 抗体を用いてスクリーニングを行った。しかし陽性クローンは得られなかった。次に、卵より約 10 倍 SDH 活性の高い幼虫の脂肪体 (Fig. 13 参照) の cDNA ライブラリー (Fujiwara and Yamashita, 1991) のうち、 1.2×10^6 個の組換え体ファージに対してスクリーニングを行い、1 個の陽性クローンを得ることができた。この cDNA インサートの長さは、アガロースゲル電気泳動の易動度から、1.2 kbp と算定された。この大きさは分子量 36,000 の SDH をコードし得る大きさである。cDNA の制限酵素地図及びシーケンスストラテジーを Fig. 4 に示した。シーケンスの結果、cDNA の長さは 1039 bp であり、5' と 3' 末端側が欠損していた。この欠損部分を補うため、SDH 遺伝子をクローン化し、2 つのオリゴプライマー (Fig. 5、上線) を用いて SDH 遺伝子の一部のシーケンスを行った (第 5 章参照)。その結果、上記の cDNA の 5' 末端側は翻訳開始メチオニンコドンまで、また 3' 末端側は翻訳停止コドンまで、それぞれ、5、及び、3 塩基ずつ欠けていることが明かとなった (Fig. 5)。予想された翻訳開始メチオニンコドンより上流に位置する CAAG は、キイロショウジョウバエで報告されている翻訳開始メチオニンコドンの上流に位置するコンセンサス配列 (Cavener, 1987) と一致していた。

2. カイコ SDH と哺乳類の肝臓 SDH との比較

ここで得られた cDNA の翻訳領域は 348 個のアミノ酸をコードしており、タンパク質の分子量は 37,158 と算定され、SDS-PAGE より推定した SDH のサブユニットの分子量 36,000 に類似していた (Fig. 2C)。cDNA の塩基配列より推定されたアミノ酸配列はホモロジーサーチの結果、zinc-containing long chain alcohol/polyol dehydrogenase ファミリーに属し (Jeffery and Jornvall, 1988)、特に哺乳類の SDH に対して相同性が高かった (Fig. 6)。そこで、哺乳類 SDH の Bombyx homolog を得たと結論した。カイコ SDH の一次構造は、ヒ

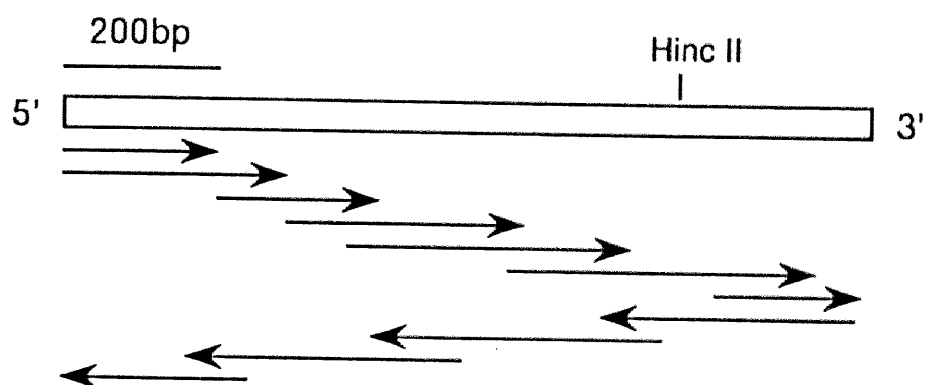


Fig. 4. The restriction map and sequence strategy of cDNA for a Bombyx homolog of mammalian SDH. Although for construction of the map, various restriction enzymes (BamHI, EcoRI, HincII, PstI, SacI, Sall, SmaI and XbaI) were used, a site digested by HincII was only found in the insert cDNA. The arrows indicate the extent and the direction of sequence determination.

```

1  ATGACCGAGAACTACGCTGCTGTGTACACGGAGCCAACGACGTCAGAATCGAGAAAATT 60
1  M T E N Y A A V L H G A N D V R I E K I 20

61  CCAGTGGCCGAGATAAAACGATGACGAGGTTTTAATAAAGATAGACTGTGTGGCATATGC 120
21  P V P E I N D D E V L I K I D C V G I C 40

121  GGTTCGTATGTCAAGTTATACAGCACGGGTACGTGTGGAGCGGATGTTATCGACAAACCG 180
41  G S D V K L Y S T G T C G A D V I D K P 60

181  ATTGTCATTGGTCACGAAGGTGCCGGAAGTGTGGTCAAGGTAGGAGACAAAGTAAGCAGT 240
61  I V I G H E G A G T V V K V G D K V S S 80

241  TTGAGAGTGGGCGACAGAGTGGCAATAGAACCGACGCAGCCGTGTCGGTCTGTGAGCTG 300
81  L R V G D R V A I E P T Q P C R S C E L 100

301  TGCAAGCGAGGGAAGTACAATTTGTGTGTGGAGCCACGTTATTGCTCCTCGATGGGCGCT 360
101  C K R G K Y N L C V E P R Y C S S M G A 120

361  CCGGGAAACCTATGCCGTTACTACAAGCACGTCGCCGATTTTTGTCTATAAATTACCAGAC 420
121  P G N L C R Y Y K H V A D F C H K L P D 140

421  AATCTAACAATGGAGGAAGGGGCGAGCGGTCCAGCCGCTCGCCATCGTGATCCACGCCTGC 480
141  N L T M E E G A A V Q P L A I V I H A C 160

481  AACCGCGCCAAGATAAATCTCGGATCTAAGATCGTTATCCTTGGGGCCGGGCTATTGGT 540
161  N R A K I T L G S K I V I L G A G P I G 180

541  ATTTTGTGTGCTATGTGGCCAAAGCAATGGGAGCTAGCAAAATTATTTTAACAGACGTA 600
181  I L C A M S A K A M G A S K I I L T D V 200

601  GTTCAGTCACGCTTAGACGCAGCACTGGAGTTGGGAGCTGATAACGTCCTCCTCGTCCGT 660
201  V Q S R L D A A L E L G A D N V L L V R 220

661  CGGGAGTACACTGACGAGGAGGTTGTAGAAAAAATTGTGAAGTTGCTCGGTGACCGCCCG 720
221  R E Y T D E E V V E K I V K L L G D R P 240

721  GATGTGTCAATCGATGCGTGTGGGTACGGGTCGGCGCAGAGAGTCGCTCTACTGGTGACT 780
241  D V S I D A C G Y G S A Q R V A L L V T 260

781  AAGACAGCGGGCTTGGTGTGGTGGTGGTGGCATAGCTGACAAAACGGTGGAGCTGCCGCTC 840
261  K T A G L V L V V G I A D K T V E L P L 280

841  TCACAAGCGCTGCTCAGAGAAGTTGACGTTGTAGGGTCCTTTTCGTATTATGAACACGTAC 900
281  S Q A L L R E V D V V G S F R I M N T Y 300

901  CAGCCCCGCCCTGGCCGCGGTGTCCTCCGGGGCCATCCCCTTGGACAAGTTCATCACTCAT 960
301  Q P A L A A V S S G A I P L D K F I T H 320

961  CGCTTCCCCTTGAACAAGACCAAAAGAAGCACTGGATTTAGCCAAATCTGGTGCCCGCCATG 1020
321  R F P L N K T K E A A L D L A K S G A A M 340

1021  AAAATACTCATACACGTGCAAAATTAAAAACACAGTTTCATAACAAAATCCTTGTTTTATT 1080
341  K I L I H V Q N * 348

```

Fig. 5. Nucleotide sequence of cDNA for a *Bombyx* homolog of mammalian SDH (BmSDH) from larval fat body and the deduced amino acid sequence. The nucleotide sequences supplemented with nucleotide sequence of the BmSDH gene are underlined. Stop codon (TAA) is starred. The upperlined sequences were synthesized as primers for determining the missing regions of 5' and 3' ends from a genomic clone. The dot-underlined sequences were used as primers for RT-PCR analysis. An internal oligonucleotide as a hybridization probe for RT-PCR is underlined double.

BmSDH: MTENYAAVLHGANDVRIEKIPVPEINDDDEVLIKIDCVGICGSDVKLY-STGTCGAD 55
 S SDH: AA-AKPENLSLVHGPGLRLNYPPEPGPNEVLLKMHSVIGICGSDVH-YWQHGRIGDF 58
 R SDH: AAPAKGENLSLVHGPGLRLNYPPELGPNDVLLKMHSVIGICGSDVH-YWEHGRIGDF 59
 H SDH: AA-AKPENLSLVHGPGLRLNYPPEPGNEVLLRMHSVIGICGSDVH-YWEYGRIGDF 58

BmSDH: VIDKPIVIGHEGAGTVVKVGDKVSSLRVGDRVAIEPTQPCRSCLECKRGKYNLCVEPRYC 115
 S SDH: VVKKPMVLGHEASGTVVKVGSVLRHLQPGDRVAIQPGAPROTDEFCKIGRYNLSETIFFC 118
 R SDH: VVKKPMVLGHEAAGTVTKVGPVMVHLKPGDRVAIEPGVPREIDFCKIGRYNLTPSIFFC 119
 H SDH: IVKKPMVLGHEASGTVEKVGSSVKHLKPGDRVAIEPGAPRENDEFCKMGRYNLSPSIFFC 118

BmSDH: SSMGAPGNLCRYXKHVADEFCHKLPDNLTMEEGAQVPLAIVIHACNRAKITLGSKIVILG 175
 S SDH: ATPPDDGNLCRFYKHNAFCYKLPDNLTFEEGALIEPLSVGIHACRRAGVTLGKVLVCG 178
 R SDH: ATPPDDGNLCRFYKHSADFCYKLPDSVTFEEGALIEPLSVGIYACRRGSVSLGNKVLVCG 179
 H SDH: ATPPDDGNLCRFYKHNAFCYKLPDNLTFEEGALIEPLSVGIHACRRGGVTLGHKVLVCG 178

BmSDH: AGPIGILCAMSAMGASKIILTDVVQSRLDALELGADNVLLVRREYTDDEEVVEKIVKL 235
 S SDH: AGPIGLVNLAAKAMGAAQVVVTDLSASRLSKAKEVGADFILEISNE-SPEEIAKKVEGL 237
 R SDH: AGPIGIVTLLVAKAMGASQVVVIDLSASRLAKAKEVGADFTIQVAKE-TEHDIKKVESV 238
 H SDH: AGPIGEVTLVAKAMGAAQVVVTDLSATRLSKAKEIGADLVQLISKE-SPOEIARKVEGQ 237

BmSDH: LGDRPDVSDACG-YGSAQRVALLVTKTAG-LVLVVGIAADKTVELPLSQALLREVDVVGS 293
 S SDH: LGSKPEVTIECTGVETSIQAGIYATH-SGGTLVL-VGLGSEMTSVPLVHAATREVDIKGV 295
 R SDH: LGSKPEVTIECTGAESSVQDGIYATH-SGGTLVV-VGMGPEMINLPLVHAATREVDIKGV 296
 H SDH: LGCKPEVTIECTGAESIQAQIYATR-SGGTLVL-VGLGSEMTSVPLVHAATREVDIKGV 295

BmSDH: FRIMNTYQPA---LAAVSSGAIPDKFITHRFPLNKTKEALDLAKSGAAMKILI---HV 346
 S SDH: FRYCNTWPMASMLASKSVNVKPL---VTHRFPLEKALEAFETSKKGLGLKVMIKCDPSD 352
 R SDH: FRYCNTWPMASVSLASKTILNVKPL---VTHRFPLEKAVEAFETAKKGLGLKVMIKCDPND 353
 H SDH: FRYCNTWPEVAISMLASKSVNVKPL---VTHRFPLEKALEAFETFKKGLGLKIMLKCDPSD 352

BmSDH: QN 348
 S SDH: QNP 355
 R SDH: QNP 356
 H SDH: QNP 355

Fig. 6. Comparison of amino acid sequence of BmSDH with SDH sequences from livers of sheep (SSDH), rat (RSDH) and human (HSDH). Residues conserved in at least two species of SDHs are shaded. In the case that the conserved residues are divided into the two groups, only the group which contains BmSDH is shaded. The residues conserved in sheep and human liver SDHs and 16 species of ADHs are indicated with closed circles (Jeffery and Jornvall, 1988; Karlsson et al., 1989). Residue numbers are indicated on the right side in BmSDH and each mammalian SDH.

ツジ (Jeffery et al., 1984; Karlsson et al., 1989)、ラット (Karlsson et al., 1991)、ヒト (Karlsson et al., 1989) 肝臓 SDH の一次構造に対して、それぞれ、47 %、46 %、45 % の相同性を示した。また、大腸菌 Threonine dehydrogenase (TDH) (Aronson and Somerville, 1989)、哺乳類 ADH (Jeffery and Jornvall, 1988) に対しては、それぞれ、28 %、26 - 27 % 相同性を示すにとどまった。カイコ SDH と、哺乳類 SDH とに相同なアミノ酸は、全体にわたって見られた (Fig. 6)。また、zinc-containing long chain alcohol/polyol dehydrogenase ファミリーに共通して存在している、補酵素の NAD や活性に必須な亜鉛の結合、及び 三次構造形成のために重要であると考えられている 22 個のアミノ酸のうち 21 個のアミノ酸はカイコ SDH にも保存されていた (● in Fig. 6)。しかし、基質であるソルビトールの結合に関わると考えられているアミノ酸 11 個のうち 6 個がカイコ SDH では置換していた (Table 1)。

3. 5 °C 冷蔵休眠卵における SDH mRNA 量の変動

³²P で標識したカイコ SDH cDNA をプローブに用い、ノーザンブロット法によって 5 °C 冷蔵中のカイコ休眠卵の SDH mRNA の検出を行った。1.2 kb の mRNA が、5 °C 冷蔵 30 - 111 日の休眠卵で検出された (right half in Fig. 7)。この長さは、cDNA から推定される長さと一致していた。しかし、25 °C 連続保護の休眠卵においては、プローブと反応するバンドはほとんど検出されなかった (left half in Fig. 7)。つまり、低温により SDH 遺伝子の発現が開始されると考えられる。さらに、SDH 遺伝子の発現には、5 °C 冷蔵期間が何日必要であるかを高感度の RT-PCR 法を用いて SDH mRNA 量を測定することによって調査した。その結果、SDH mRNA 量は、冷蔵 10 日から 30 日では非常に少ない値ではば一定に保たれていたが、冷蔵 40 - 50 日より増加し始め、以後冷蔵期間に伴い増加した (Fig. 8A, B)。このパターンは、SDH 活性及び SDH タンパク質量の変動のパターン (Fig. 3 参照) とよく一致していた。アクチン mRNA 量は、この実験期間中ほぼ一定であった (Fig. 8C)。以上の結果は、カイコ SDH 遺伝子の発現には、40 - 50 日間の 5 °C 冷蔵が必要であることを示している。

Table 1. Comparison of amino acid residues which are thought to interact with sorbitol.^a

^a This comparison is based on the sorbitol dehydrogenase model (Eklund et al., 1985).

^b Numbers refer to the horse liver alcohol dehydrogenase amino acid sequence (Eklund et al., 1976, 1981). ^c These numbers refer to each SDH (Jeffery et al., 1984; Karlsson et al., 1989, 1991).

Residue no. ^b	BmSDH	SSDH	RSDH	HSDH
46	Cys ^{40 c}	Cys ^{43 c}	Cys ^{44 c}	Cys ^{43 c}
48	Ser ⁴²	Ser ⁴⁵	Ser ⁴⁶	Ser ⁴⁵
52	Tyr ⁴⁷	Tyr ⁴⁹	Tyr ⁵⁰	Tyr ⁴⁹
57	Cys ⁵²	Ile ⁵⁵	Ile ⁵⁶	Ile ⁵⁵
67	His ⁶⁵	His ⁶⁸	His ⁶⁹	His ⁶⁸
93	Pro ⁹¹	Pro ⁹⁴	Pro ⁹⁵	Pro ⁹⁴
116	Tyr ¹¹⁴	Phe ¹¹⁷	Phe ¹¹⁸	Phe ¹¹⁷
141	Gly ¹¹⁹	Pro ¹²²	Pro ¹²³	Pro ¹²²
174	Gln ¹⁵¹	Glu ¹⁵⁴	Glu ¹⁵⁵	Glu ¹⁵⁴
294	Ile ²⁷¹	Leu ²⁷³	Met ²⁷⁴	Leu ²⁷³
319	Val ²⁹¹	Lys ²⁹³	Lys ²⁹⁴	Lys ²⁹³

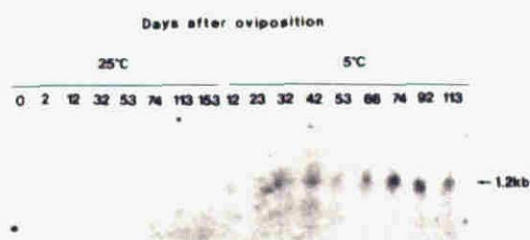


Fig. 7. Northern hybridization analysis for gene expression of BmSDH in diapause eggs. In the left half, the eggs were incubated at 25°C continuously from oviposition. In the right half, the eggs were chilled at 5°C from 2 days after oviposition. Each 30 μ g of total RNAs extracted from eggs with various stages was applied to 1.0% agarose gel. The RNAs were hybridized with radiolabeled cDNA for BmSDH.

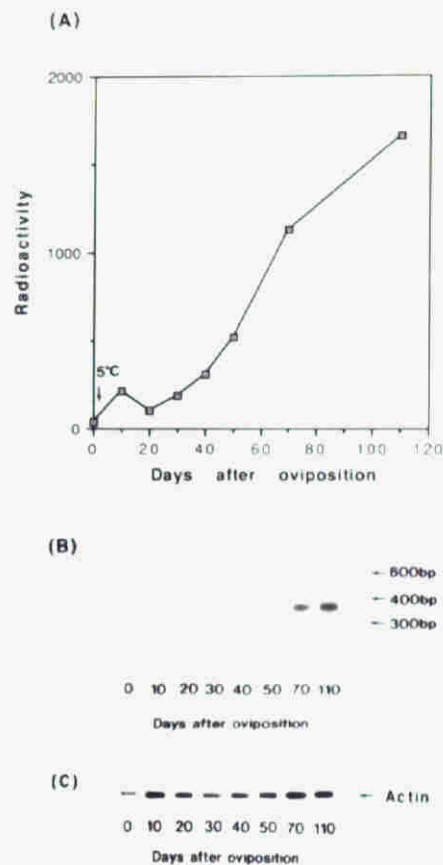


Fig. 8. RT-PCR analysis for gene expression of BmSDH in diapause eggs. RNAs were prepared from diapause eggs exposed to 5°C for various periods from 2 days after oviposition. In (A) and (B), using each RNA sample (1 μ g) the first stranded cDNA was synthesized and used as a template for PCR (25 cycles) with primers for BmSDH transcript. The PCR product was electrophoresed in an agarose gel, blotted and hybridized with a radiolabeled internal oligonucleotide (see Fig. 5). (A) Quantification of the PCR products for BmSDH transcript. Each point represents a mean of the duplicate experiments (each SEM was within 6%). (B) Autoradiograph of the PCR products for BmSDH transcript. (C) Autoradiograph of the PCR products for actin transcript using the same RNA samples as for BmSDH transcript. The amounts of actin transcript in the eggs were at almost constant levels throughout the experiments. Molecular size makers were co-migrated.

4. SDH mRNA の卵内局在

次に、休眠覚醒期の SDH mRNA が卵内のどこで発現しているかを明らかにするために、5 °C で 104 日間冷蔵した卵を解剖して、胚子（羊膜を含む）、卵黄細胞、漿膜に分け、それぞれより全 RNA を抽出し、RT-PCR とサザンハイブリダイゼーションを行った。供試した卵 1 個当りの全 RNA 量は、卵全体では $0.534 \pm 0.006 \mu\text{g}$ 、胚子では $0.105 \pm 0.003 \mu\text{g}$ 、卵黄細胞では $0.099 \pm 0.003 \mu\text{g}$ 、漿膜では $0.117 \pm 0.009 \mu\text{g}$ であった。胚子と漿膜は、解剖によってほぼ完全に回収されたが、卵黄細胞は、生理食塩水中に分散してしまうため全てを回収することは困難であった。このため、卵黄細胞の全 RNA 量は、明かに実際の値よりも少なく算出されているものと考えられる。そこで、卵黄細胞中の真の全 RNA 量は、卵全体の全 RNA 量から胚子の全 RNA 量と漿膜の全 RNA 量を差し引いた値であると仮定すると、 $0.312 \mu\text{g}$ と見積ることができる。この前提に立つと、1 個の卵当りの SDH の RT-PCR 産物の放射活性は、卵全体では 17,096 cpm、胚子では 464 cpm、卵黄細胞では 5,345 - 16,843 cpm ($0.099 - 0.312 \mu\text{g}$ の RNA 量に基づく)、漿膜では 347 cpm と算定される。また、全 RNA 当りで見ると SDH の RT-PCR 産物の放射活性は、卵全体では $6,403 \pm 793 \text{ cpm}$ 、胚子では $883 \pm 85 \text{ cpm}$ 、卵黄細胞では $10,797 \pm 5,053 \text{ cpm}$ 、漿膜では $594 \pm 356 \text{ cpm}$ であった (Fig. 9)。つまり、卵黄細胞の SDH mRNA 量は、胚子及び漿膜の SDH mRNA 量に対し卵当りでは、約 10 - 40 倍、全 RNA 量当りでは約 10 倍多いと考えられる。同様に、アクチン mRNA についても RT-PCR を行ったところ、アクチン mRNA は漿膜に局在していた (Fig. 9C)。

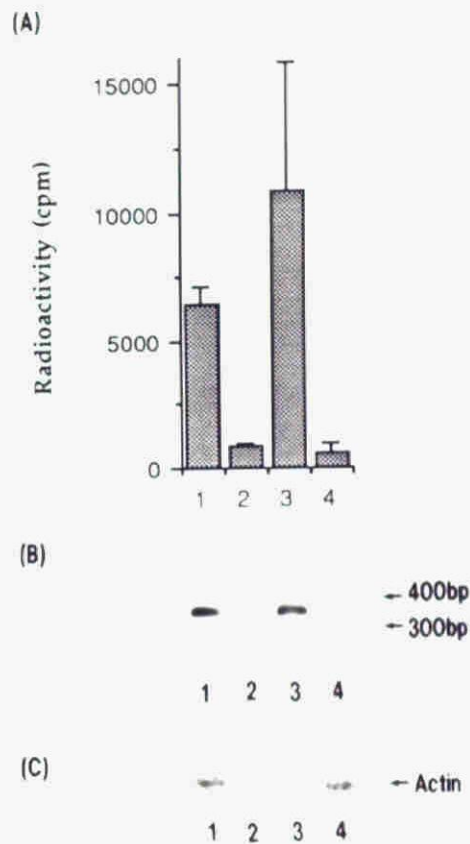


Fig. 9. RT-PCR analysis for localized transcript for BmSDH in a diapause egg. From diapause eggs (10 individuals) chilled at 5°C for 104 days from 2 days after oviposition, embryos, yolk cells and serosal membranes were manually isolated. In (A) and (B), RNAs were prepared from each sample, and 0.2 μ g of the total RNAs was used for RT-PCR analysis (27 cycles) with primers for BmSDH transcript. (A) Quantification of the PCR products for BmSDH transcript. Each vertical bar represents a value of SEM (n = 3). (B) Autoradiograph of the PCR products for BmSDH transcript. (C) Autoradiograph of the PCR products for actin transcript using the same RNA samples as for BmSDH transcript. The actin transcript was abundant in serosal membranes. Molecular size markers were co-migrated. 1, whole eggs; 2, embryos; 3, yolk cells; 4, serosal membranes.

考 察

本章では、抗ヒツジ SDH 抗体を用いて、カイコ SDH cDNA をクローン化し、塩基配列を決定した。推定された一次構造は、哺乳類の SDH に対して約 50 % の相同性を示した。NAD と亜鉛の結合、及び三次構造の形成に重要と考えられているアミノ酸は保存されていたが、ソルビトール結合に関わると考えられている部位のいくつかのアミノ酸には置換がみられた。この置換の中でどのアミノ酸が実際のソルビトールの結合に影響しているか、今の段階では明かではないが、このためカイコではソルビトールに対する親和性が低いのではないかと考えられた。実際、カイコの SDH のソルビトールに対する K_m 値は、136 mM (Yaginuma and Yamashita, 1979) であり、この K_m 値は、ヒツジ SDH 及びヒト SDH のソルビトールに対する K_m 値 1 - 6 mM (Smith, 1962; Christensen et al., 1975; Lindstad et al., 1992)、及び 0.6 mM (Maret and Auld, 1988) と比較すると明かに高い。しかし、リンゴの果実の SDH で見られるようにソルビトールに対する K_m 値が 125 mM と高い他の例の報告もある (Yamaki, 1980)。従って、SDH には、哺乳類でみられるようにソルビトールに対する K_m 値が低いものと、カイコやリンゴでみられるように K_m 値が高いものと 2 種類があると考えられる。SDH がソルビトールに対して高い K_m 値を持つカイコやリンゴでは、高濃度のソルビトールが休眠卵 (150 mM) や転流糖 (200 - 800 mM; 山木, 1984) にそれぞれ蓄積される。一方、ソルビトールに対して低い K_m 値を持つ哺乳類の肝臓では、有意なソルビトールの蓄積は認められない。このような生理的な違いが、進化の過程で異なった SDH の出現に関わってきたのではないかと推測される。

カイコ SDH cDNA を用いて、低温によって開始される SDH タンパク質の生合成が、転写または翻訳のいずれのレベルにおいて調節されているのかについて検討した。ノーザンブロット分析の結果より、SDH 遺伝子からの転写産物は、単一の 1.2 kb の RNA であることが明かとなった。25 °C 保護休眠卵では SDH mRNA は有意なレベルでは検出されなかった。しかし、休眠卵を一定期間 5 °C に冷蔵することによって SDH mRNA が出現することが明らかになった。SDH mRNA は微量であるため、高感度である RT-PCR 法を用いて、SDH mRNA 量の変動を調べたところ、SDH mRNA は、産下後 0 日から 30 日間冷蔵までの卵ではほとんど検出され

なかったが、40 - 50 日間 5 °C で冷蔵することによって増加し始めた。つまり、SDH 遺伝子の発現は、接合核由来であり、低温によって開始されることが示された。

次に、SDH mRNA が卵のどの部分に存在しているかについて RT-PCR 法によって検討した。その結果、卵黄細胞中の SDH mRNA 量/全 RNA は、胚子、漿膜中のそれに比べ、約 10 倍多いことが明らかとなった。つまり、冷蔵 104 日間の休眠卵では、SDH mRNA は、主に卵黄細胞に局在していることから、卵黄細胞核で発現していることが示唆された。休眠覚醒期の卵では、グリコーゲン顆粒が、卵黄細胞内の脂質卵黄顆粒の間に点在し始め、その数は、グリコーゲン量の回復とともに増加することが電子顕微鏡観察により明らかにされている (Miya et al., 1972)。つまり、SDH 遺伝子の発現場所とソルビトールからグリコーゲンへの合成場所とが一致しているものと考えられる。このこともまた、今回クローン化した cDNA が、ソルビトールからグリコーゲンへの変換系における鍵酵素である SDH そのものをコードしていることを支持するものである。

昆虫においては、卵黄細胞は胚子発育のための栄養源の貯蔵庫として考えられている (Kunkel and Nordin, 1985; Yamashita and Suzuki, 1991)。カイコ、*Bruchidius*、*Oncopeltus* の卵黄細胞において全 RNA または poly (A)⁺ RNA の合成が行われているという 2、3 の報告 (Park and Yoshitake, 1970; Capco and Jeffery, 1978; Buning, 1980) はあるものの、卵黄細胞核が、積極的に胚子に何らかの作用を及ぼしているとは考えられておらず (Lawrence, 1992)、卵黄細胞核の役割についてはまだ明らかにされていない (Sander et al., 1985)。しかし、カイコの休眠卵においては、卵黄細胞核が 5 °C 冷蔵に応答し、胚子の形態形成が再開される前に SDH 遺伝子を発現していることが示された。このことは、休眠覚醒期の卵における胚子と卵黄細胞との相互作用を理解する上で重要な知見を提供するものである。

カイコの休眠卵における胚子と卵黄細胞との関係については、古くより 2 つの説が考えられてきた (桑名・高見, 1957)。1 つは、休眠は卵黄の状態が胚子の発育に不適當であるために起こるのであって、もし卵黄の状態が好転すれば胚子はいつでも発育を開始できるという考えである。2 つめは、休眠卵が発育を再開する際には卵黄ばかりでなく、胚子そのものの活性化も必要とされるというも

のである。本章において SDH 遺伝子の発現が休眠覚醒期に卵黄細胞で生じることを示したことは、休眠覚醒期において卵黄系が活性化されることを分子レベルで明らかにしたことを意味している。

摘 要

1. 抗ヒッジ SDH 抗体を用いて、カイコの幼虫脂肪体 cDNA ライブラリーをスクリーニングして陽性クローンを得た。
2. この cDNA は 1,047 bp であり、348 個のアミノ酸から成るタンパク質をコードしていた。タンパク質の一次構造レベルで相同配列検索を行ったところ、哺乳類肝臓 SDH と約 50 % の相同性が認められた。哺乳類 SDH のカイコの相同体 cDNA を得たと結論した。
3. SDH cDNA を用いたノーザンブロット法及び RT-PCR 法により、SDH mRNA は、休眠卵を 40 - 50 日間 5 °C 冷蔵することにより出現し、以後冷蔵日数と共に増加することが明かとなった。
4. RT-PCR 法により、SDH mRNA は、主に卵黄細胞に局在することが示された。
5. 以上の結果より、カイコ休眠卵の SDH 遺伝子の発現は、卵を 40 - 50 日間冷蔵することによって卵黄細胞内で開始されること、並びに SDH 活性は転写レベルで調節されていることが示された。

第 4 章 胚子発育に伴うソルビトール脱水素酵素遺伝子の発現

第 2 章と第 3 章では、休眠卵におけるソルビトール脱水素酵素の活性、生合成、及び遺伝子発現について検討した。SDH 遺伝子は、休眠卵においては 5 °C 冷蔵によって、主として卵黄細胞核で発現すること、及び産下後 25 °C に連続保護した休眠卵においては SDH 遺伝子は発現しないことが明らかとなった。一方、休眠覚醒卵及び非休眠卵においては、25 °C 下で胚子発育は進行し、それに伴い SDH 活性が出現することが明らかにされている (Yaginuma and Yamashita, 1979; Yaginuma et al., 1990b)。緒論で述べたように、非休眠卵においては 25 °C 下ではソルビトールの有意な蓄積は認められない。しかし、非休眠卵を産下 1 日後に低温あるいは嫌氣的な条件で処理した場合、ソルビトールが蓄積する。この蓄積したソルビトールの利用には、SDH が関与することが示唆されている (Yaginuma et al., 1990b)。

本章では、胚子発育に伴って出現する SDH 活性の調節機構が、休眠覚醒期に出現する SDH 活性の調節機構と同じものかどうかを明らかにするため、SDH 活性、タンパク質量、mRNA 量の変動及びその局在について検討を加えた。その結果、胚子発育に伴って出現する SDH 活性は、SDH タンパク質量及び SDH mRNA 量に比例していた。従って、この場合にも SDH 活性は、転写レベルで調節されていると結論した。さらに、SDH mRNA は、胚子成長期には主に胚子に局在すること、及び幼虫組織形成期には主に脂肪体に局在することが示唆された。

材料と方法

供試材料

供試蚕品種は多化性である N₄ 種を用いた。3 時間以内に産下された卵を採集し、25 °C で保護し、胚子発育を進めた。また、5 °C で 160 日間冷蔵した休眠卵も用いた。

胚子、及び卵黄細胞の分離

産下後 3 日と 5 日の卵を、第 3 章と同様の方法で、解剖して、卵黄細胞と胚子（羊膜を含む）に分けた。

5 令幼虫の解剖

5 令幼虫を、採血した後、冷生理食塩中で解剖して脂肪体、絹糸腺、及び中腸に分け、残りの部分を残渣とした。

酵素標品の調製、酵素活性の測定、タンパク質の定量、SDH タンパク質分画の濃縮、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）、及びウエスタンブロット法
第 2 章と同様の方法で行った。

RT-PCR 法

第 3 章の方法と同様にして行った。

結 果

1. 非休眠卵の胚子発育に伴う SDH 活性と SDH タンパク質量の変動

先ず初めに非休眠卵の胚子発育に伴う SDH 活性の変動を調査した。活性は産下後 1 - 2 日より出現し、産下後 6 日まで上昇した (Fig. 10A)。産下後 7 日において一旦減少した。産下後 8 日から幼虫孵化に向けて再び増加した。一方、抗ヒツジ SDH 抗体に反応するバンドは分子量 36,000 であり、産下後 3 日より検出され、そのバンドの濃さは、産下後 6 日まで増加し、産下後 7 日において減少したが、以後幼虫孵化にかけて再び増加した (Fig. 10B)。この結果は、SDH 活性が、SDH タンパク質量に依存して変動していることを示している。つまり、非休眠卵においても SDH 活性は SDH タンパク質の生合成によってもたらされることが示された。また、SDH 活性と SDH タンパク質量は胚子の発育過程において 2 つのピークを持つことが明らかになった。1 つめのピークは、反転期後期直後の 1 次胚脱皮に存在し、このピークに至る増加期は、胚子の成長期に相当すると考えられた。2 つめのピークは幼虫孵化時にみられ、このピークに至る増加期は、幼虫組織の形成時期に相当すると考えられた。

2. 非休眠卵の胚子発育に伴う SDH mRNA 量の変動

RT-PCR とサザンハイブリダイゼーションにより、非休眠卵の胚子発育に伴う SDH mRNA 量の変動を調査した (Fig. 11A, B)。産下後 0 日と産下後 1 日の卵では、SDH mRNA から合成された cDNA に基づいて PCR で増幅された 376 bp の断片のバンドはほとんど検出されなかった。産下後 2 日には、PCR 産物のバンドが検出されており、その放射活性は、胚子発育に伴い産下後 5 日まで増加した。バンドの放射活性は、産下後 6 日と 7 日では減少し、産下後 8 日より幼虫孵化に向けて再び増加した。また、同様の方法で調べたアクチン mRNA は、この実験期間を通して、多少のばらつきはあるもののほぼ一定であった (Fig. 11C)。SDH mRNA 量は、胚子発育に伴い、2 つのピークを持つ消長を示しており、SDH mRNA 量の変動のパターンは、SDH 活性と SDH タンパク質量の変動のパターンと非常によく一致していた (Fig. 10)。従って、非休眠卵の胚子発育においても SDH 活性は、転写レベルで調節されていると考えられる。

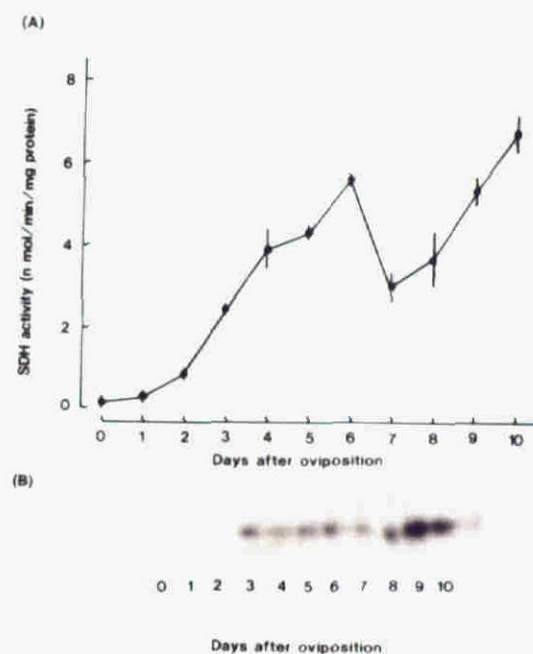


Fig. 10. Changes in activity of SDH (A) and intensity of SDH immunolabeling band in non-diapause eggs of *Bombyx mori* (B). The eggs were incubated at 25 °C from oviposition. Larvae hatched 10 days after oviposition.

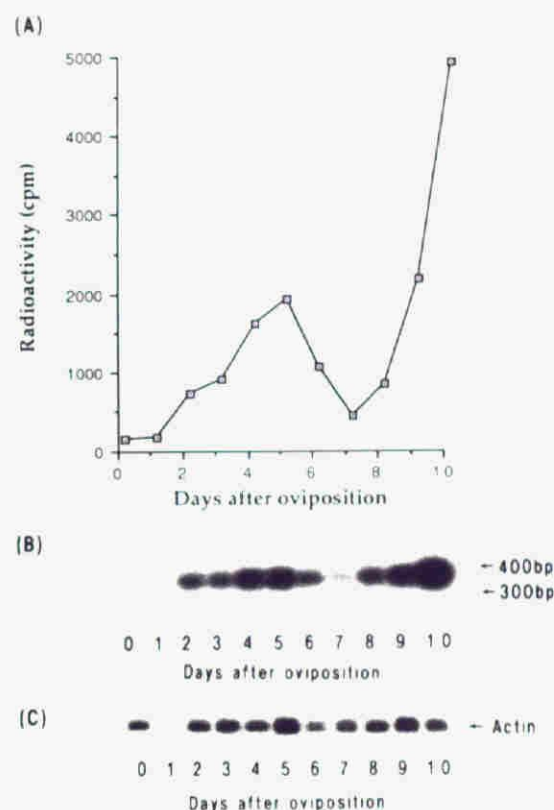


Fig. 11. Change in the amount of BmSDH transcript during embryogenesis in non-diapause eggs of *Bombyx mori*. Non-diapause eggs (N₄) were incubated at 25°C from oviposition. Larvae started to hatch 9.5 days after oviposition. One microgram of the total RNAs from each sample was used for synthesis of the first strand cDNA, and one-fourth of the synthesized cDNA was used as a template for PCR amplification. (A) Quantification of the PCR products for BmSDH transcript. Each point represents a mean of the duplicate experiments (each SEM was within 6%). (B) Autoradiograph of the PCR products for BmSDH transcript. For PCR analysis, 25-cycle was adopted with primers for BmSDH transcript. (C) Autoradiograph of the PCR products for cytoplasmic actin transcript. By using one-twentieth of the first stranded cDNA, PCR was carried out 18 cycles with primers for actin transcript. Molecular size markers were co-migrated.

3. 胚子成長期における SDH mRNA の卵内局在

胚子成長期（産下後 2 - 6 日）において SDH mRNA が卵のどの部分に存在するのかを調査した。非休眠卵において SDH mRNA 量が増加しつつある産下後 3 日と SDH mRNA 量が 1 つめのピークに達した産下後 5 日の卵を解剖して胚子（羊膜を含む）と卵黄細胞に分け、それぞれから全 RNA を抽出して RT-PCR 分析を行った。漿膜も回収するよう試みたが、この時期の漿膜は粘着性が強くほとんど回収することはできなかった。産下後 3 日の卵では、PCR 産物の放射活性/全 RNA は、胚子と卵黄細胞ではほぼ同じレベルであった（Fig. 12A, B）。しかし、産下後 5 日の卵では、胚子の PCR 産物の放射活性/全 RNA は、卵黄細胞での放射活性に比較して 3 倍高かった（Fig. 12D, E）。また同様にアクチン mRNA について RT-PCR を行った結果、アクチン mRNA は、胚子よりはむしろ卵黄細胞に多く存在することが示唆された（Fig. 12C, F）。以上の結果から、胚子成長期での SDH mRNA 量の増加は、主に胚子細胞での発現によってもたらされるものと考えられた。

4. 幼虫組織における SDH 活性と SDH タンパク質量の分布

次に幼虫組織形成期（産下後 6 日 - 幼虫孵化時）において、SDH が卵のどの組織に存在するのかを調査しようとしたが、卵内の潜幼虫の組織を別々に分けるのは困難であったので、ここでは解剖の容易な 5 令幼虫について調査を行った。5 令幼虫を脂肪体、絹糸腺、中腸、血液及び残渣に分け、SDH 活性測定と抗ヒッジ SDH 抗体によるウエスタンブロッティング分析を行った。その結果、脂肪体において最も高い活性が認められ、以下活性の強さは、中腸、残渣、絹糸腺の順であった（Fig. 13A）。また、ウエスタンブロット分析で検出されたバンドは、卵と幼虫のいずれの組織においても、すべて同じ易動度を示した。従って、SDH タンパク質は、卵や幼虫のどの組織においても同じ 36 kDa のポリペプチドより成るものと考えられる。次に、抗ヒッジ SDH 抗体に反応するバンドの濃さについてみると、脂肪体において最も濃いバンドが検出され、他の組織においては薄いバンドであったが、中腸、残渣、絹糸腺の順で検出された。血液においては、バンドはほとんど検出されなかった（Fig. 13B）。残渣で検出されたバンドは、脂肪体の混入によるものであると考えられる。従って、幼虫組織形成期に出現する SDH

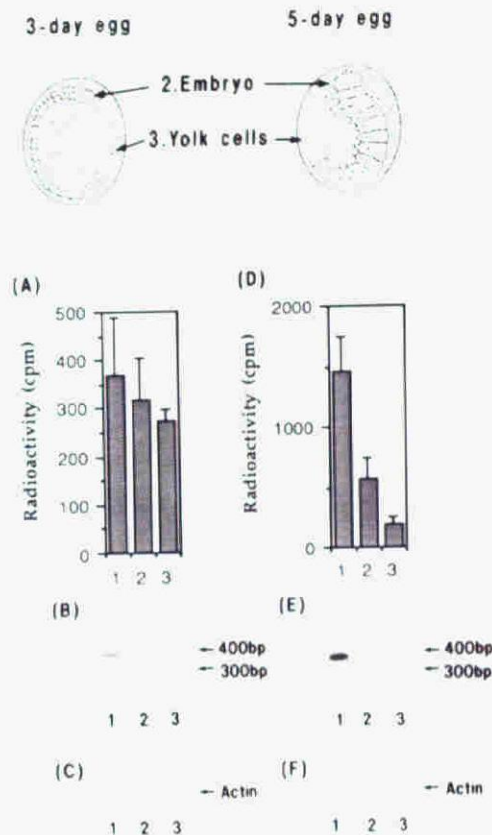


Fig. 12. Localized transcript for BmSDH in 3-day and 5-day non-diapause eggs. From 3-day and 5-day non-diapause eggs (10 individuals) at 25°C, embryos and yolk cells were manually isolated. The total RNAs (each 0.2 μ g) from each sample were used for the first strand cDNA for semi-quantitative analysis (see Materials and Methods). For PCR, 27-cycle or 18-cycle was adopted with primers for BmSDH or actin transcript, respectively. Upper panel indicates the morphology of embryo at each stage. Quantification of the PCR products for BmSDH transcript of 3-day (A) and 5-day non-diapause eggs (D). Each vertical bar represents a value of SEM (n=2). Autoradiograph of the PCR products for BmSDH transcript of 3-day (B) and 5-day non-diapause eggs (E). Autoradiograph of the PCR products for actin transcript of 3-day (C) and 5-day non-diapause eggs (F). Molecular size markers were co-migrated. 1, Whole eggs; 2, embryos; 3, yolk cells.

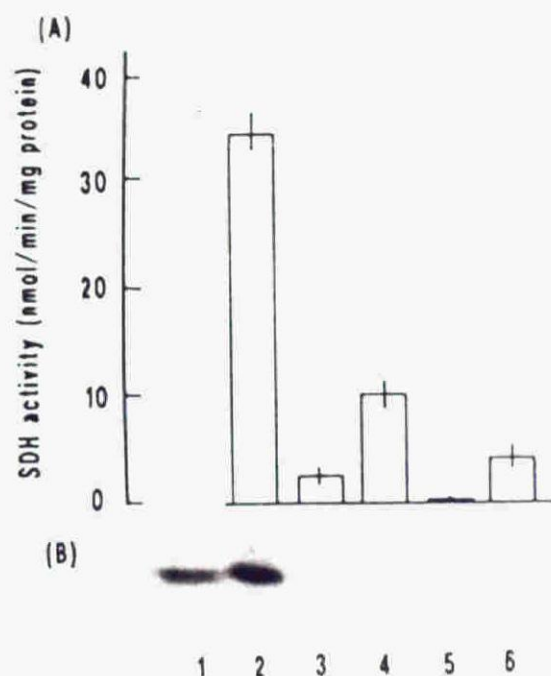


Fig. 13. Activity of SDH (A) and intensity of SDH immunolabeling band (B) in various tissues of 5th instar larvae. Each tissue was isolated from 5-day-old larvae of 5th instar. In (A), each bar represents a mean of two separate experiments \pm range shown as vertical bars. In (B), the supernatant fractions (100 μ g) of crude homogenates from fat-body (lane 2), silk-gland (lane 3), mid-gut (lane 4), hemolymph (lane 5) and remaining carcass (lane 6) were applied to 12.5% SDS-PAGE. As a mobility reference, egg sample, corresponding to 75 mg of eggs chilled for 220 days, was applied to 12.5% SDS-PAGE after Blue Sepharose CL-6B column chromatography (lane 1).

タンパク質は、主に脂肪体に由来するものと考えられる。

5. 幼虫組織における SDH mRNA 量の分布

幼虫組織形成期における SDH mRNA がどの組織に局在するかの調査を試みたが困難であったので、前述したように 5 令幼虫を解剖し、脂肪体、絹糸腺及び中腸に分けて全 RNA を抽出し、RT-PCR 分析を行った。その結果、脂肪体の SDH mRNA に基づく PCR 産物の放射活性/全 RNA は中腸のそれより約 7 倍高かったが、絹糸腺では非常に弱い放射活性のみが認められた (Fig. 14A, B)。また、アクチン mRNA (PCR 産物の放射活性/全 RNA) は、中腸で一番高く、続いて脂肪体、絹糸腺の順であった (Fig. 14C)。以上の結果は、幼虫では、SDH mRNA は脂肪体において、多く存在することを示しており、幼虫組織形成期においても SDH mRNA は、主に脂肪体に局在すると考えられた。幼虫組織における SDH mRNA 量の分布は、既に述べた SDH 活性、タンパク質量の分布とよく一致していた (Fig. 13 参照)。従って、幼虫組織における SDH 活性の分布は、転写レベルで調節されているものと考えられる。

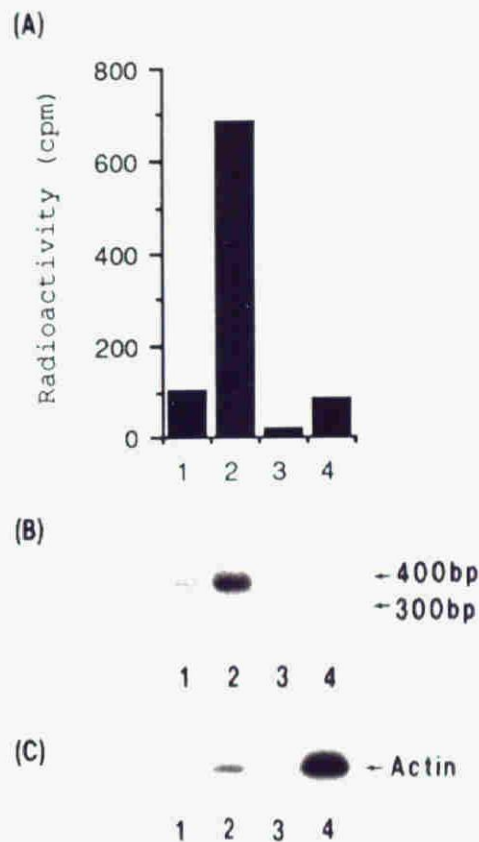


Fig. 14. Localized transcript of BmSDH in various tissues of 5th instar larvae. One microgram of the total RNAs from each tissues was used for synthesis of the first strand cDNA for semi-quantitative PCR analysis (see Materials and Methods). PCR was carried out 25 or 18 cycles with primers for BmSDH or actin transcript, respectively. (A) Quantification of the PCR products for BmSDH transcript of fat-body (lane 2), silk-gland (lane 3) and mid-gut (lane 4). Each point represents a mean of the duplicate experiments (each SEM was within 6%). (B) Autoradiograph of the PCR products for BmSDH transcript of each tissue. (C) Autoradiograph of the PCR products for cytoplasmic actin transcript of each tissue. As a comparison in quantity, the total RNA from diapause eggs exposed to 5°C for 160 days was used for RT-PCR analysis (lane 1). Molecular size markers were co-migrated.

考 察

本章の結果は、非休眠卵の胚子発育期及び幼虫期の組織においても、SDH 活性は、SDH タンパク質量、並びに SDH mRNA 量に依存していることを示している。従って、非休眠卵及び幼虫組織における SDH 活性も休眠覚醒期の卵と同様に転写レベルで調節されているものと考えられる。

休眠覚醒期における SDH の機能は、高濃度で蓄積したソルビトールの利用を律速することである。しかしながら、SDH 遺伝子の発現は休眠覚醒期の卵よりもむしろ幼虫期の脂肪体において活発に行われている。昆虫において、脂肪体は代謝の中心器官であり、哺乳類における肝臓に相当する器官であると考えられている (Dean et al., 1985)。ところが、5 令幼虫の血液及び脂肪体において生理的に有意なソルビトールの蓄積は認められない (古沢・梁, 1991)。従って、もし SDH が *in vivo* でも機能しているとすれば、steady state にソルビトールを代謝しているものと考えられる。哺乳類において、SDH は肝臓に多く存在しているが、肝臓での有意なソルビトールの蓄積は見られず、*in vivo* での SDH の機能についてはまだ不明な点が多い (Jeffery and Jornvall, 1988)。嫌氣的な状態や低温に遭遇した場合、カイコの非休眠卵にはソルビトールが有意な量で蓄積されるが、この蓄積されたソルビトールの利用に SDH が関与していることが明らかにされている (Yaginuma et al., 1990b)。従って、幼虫の脂肪体においても何等かの状態によりソルビトールの蓄積が生じた場合には、蓄積されたソルビトールは SDH によってすみやかに利用されるものと考えられる。

非休眠卵の胚子発育の過程で SDH mRNA は、2 つの異なる時期に出現した。SDH mRNA は、産下後 2 日には既に出現しており、産下後 3 日では SDH 遺伝子は卵黄細胞と胚子において発現している。非休眠卵の SDH 遺伝子が、胚子と卵黄細胞のどちらで先に発現するかは本章では明らかにしていないが、第 3 章の休眠卵の結果を考慮すると、非休眠卵において SDH 遺伝子は卵黄細胞で先に発現しているものと考えられる。その後、胚子が発育のための栄養源として卵黄を活発に利用するようになると卵黄細胞は崩壊する。この過程で卵黄細胞の SDH mRNA 量は減少していくと考えられる。一方、この時期に胚子細胞は、盛んに分裂して増加するため、胚子は成長する。これに伴い、胚子の SDH mRNA 量は増加する。こ

の SDH mRNA 量の増加は、反転期後期の産下後 5 日まで続くが、その後急激に減少する。この減少と並行して、SDH mRNA は、産下後 6 - 7 日より再び出現し始めると考えられる。SDH mRNA は、主として幼虫脂肪体に局在することから、この時期の SDH mRNA 量の変動パターンは、脂肪体の発生・分化を反映しているものと考えられる。

この SDH 遺伝子の発現様相に基づいて、胚子の成長と幼虫組織の分化という同時に連続して起こっているかのように見える現象を、前述のように 2 つの相（胚子成長期と幼虫組織形成期）に分けることができる。第 1 の相から第 2 の相に移行する時期が、幼虫組織細胞の最終分化（Terminal differentiation）の開始時期であると考えられる。非休眠卵では、この時期（産下後 5 - 6 日）に、1 次胚脱皮が行われる（大槻ら、1976）。胚脱皮は、胚子から幼虫体への发育過程における一つの断点であると考えられる。この時期に、SDH 遺伝子の発現が胚子細胞から幼虫脂肪体細胞へと移行する機構が明かにされることによって、幼虫組織分化の開始機構が明らかになるものと考えられる。

前章及び本章の結果より、休眠覚醒期、胚子发育期、及び幼虫期において、SDH 遺伝子は、異なった時期・組織で発現をすることが示された。この SDH 遺伝子の異なる発現調節機構の理解には、先ず SDH 遺伝子構造を明らかにする必要がある。そこで次章では、SDH 遺伝子をクローン化して塩基配列を決定した。この遺伝子構造に基づいて、異なる時期・組織での SDH 遺伝子の発現について検討した。

摘 要

1. 非休眠卵の胚子発育、及び幼虫組織において、SDH 活性、SDH タンパク質量、及び SDH mRNA 量は、すべて比例して変動していた。
2. このことから、SDH 活性は如何なる場合においても転写レベルで調節されていることが示唆された。
3. 胚子発育に伴う SDH mRNA の出現は、胚子の成長期、及び幼虫組織形成期の 2 つの発育相に相当していた。
4. 第 1 の発育相では、SDH mRNA は、主に胚子に存在するものと考えられた。
5. 幼虫組織においては、SDH mRNA は主に脂肪体に局在していた。このことから、胚子発育に伴う第 2 の発育相では、SDH mRNA は、主に脂肪体に存在するものと考えられた。
6. 以上の結果より、非休眠卵の胚子発育に伴う SDH 遺伝子の発現について考察した。

第 5 章 カイコのソルビトール脱水素酵素遺伝子の構造

第 3 章においては、カイコの休眠卵では 5 °C 冷蔵により、SDH 遺伝子の発現が卵黄細胞で開始されることを示した。また第 4 章では、非休眠卵の胚子発育過程において、胚子成長期では主に胚子で、幼虫組織形成期では主に脂肪体で SDH 遺伝子の発現が起きていることを示した。これらの結果は、カイコ SDH 遺伝子はそれぞれ異なった発育時期・組織に依存してその発現が調節されていることを意味している。この発現調節機構の理解には、カイコ SDH 遺伝子の構造を知ることが先ず第一に必要である。

そこで本章では、カイコ SDH cDNA をプローブに用い、カイコゲノムライブラリーより SDH 遺伝子を単離し、その構造を決定した。その結果、SDH 遺伝子は約 10 kbp にわたり、7 個のイントロンを含むことが明かとなった。5' 上流域には、4 個の TATA box に相同な配列がそれぞれ離れた箇所に存在していた。また、ゲノムサザンの結果により、SDH 遺伝子は、ハプロイドゲノム当り 1 コピーであると結論された。休眠覚醒期から胚子発育期にわたって、ノーザンブロット分析を行ったところ休眠覚醒期から胚子発育期の前半では、1.2 kb、胚子発育期の後半では 1.1 kb の 2 種類の長さの mRNA が検出された。プライマーエクステンション法、及び rapid amplification cDNA end (RACE) 法により、休眠覚醒期の卵と幼虫組織では、異なる転写開始点に基づく mRNA が転写されることが示唆された。以上の結果を総合して、カイコ SDH 遺伝子の発現調節について考察した。

材 料 と 方 法

供試材料

供試蚕品種には、交雑種（錦秋×鐘和、東海×朝日）を用いた。休眠を覚醒させるために冷蔵浸酸処理を行った。冷蔵浸酸処理は、産下後 2 日より 5 °C で 30 日間冷蔵した後、浸酸処理（15 °C での比重 1.100 の塩酸に 48 °C で 5 分間浸漬）を行い、その後卵を 25 °C に保護した。幼虫は、浸酸処理後 12 日に孵化した。冷蔵のみによる休眠覚醒卵には、産下後 2 日より 5 °C で 160 日間冷蔵したものをを用いた。5 令幼虫は、解剖して脂肪体、絹糸腺、中腸に分けて用いた（第 4 章参照）。

ゲノム DNA の抽出

ゲノム DNA は、Sato and Yamashita（1991）の方法に従い、5 令幼虫の絹糸腺から調製した。絹糸腺をおよそ 5 倍容（V/W）の核抽出緩衝液（40 mM Tris - HCl, pH 8.0, 5 mM MgCl₂, 25 % シュークロース, 12.5 % グリセロール, 3 mM ジチオスレイトール）中で 2 mm² 程度の細片にした。2,000 g で 5 分間遠心後、沈澱を DNA 抽出緩衝液（20 mM Tris - HCl, pH 8.0, 100 mM EDTA, 0.5 % SDS, 1 mg / ml RNase）と共に磨砕し、37 °C で 1 時間インキュベーションした。その後、最終濃度が 200 µg / ml になるようにプロテイナーゼ K を加え、50 °C で 3 時間インキュベーションした。DNA をフェノール / クロロホルム / イソアミルアルコール（容量比 25:24:1）とクロロホルム / イソアミルアルコール（容量比 24:1）で抽出し、1 mM EDTA を含む 10 mM Tris - HCl, pH 8.0 で一晩透析した。

RNA の調製

全 RNA は、第 3 章の方法に従って抽出し、ノーザンブロット分析に用いた。休眠覚醒卵（5 °C 冷蔵 160 日）と 5 令幼虫の脂肪体、絹糸腺及び中腸より抽出した全 RNA は、Oligotex - dT30 を用いて poly (A)⁺ RNA に精製し、プライマーエクステンション法、及び RACE 法に用いた。

ハイブリダイゼーション

ゲノム DNA ライブラリーのスクリーニング、ゲノム DNA サザン分析及びノーザンブロット分析の際のハイブリダイゼーションは、全鎖長の カイコ SDH cDNA をプローブに用い、第3章の方法に従って行った。

ゲノム DNA ライブラリーのスクリーニング

λ EMBL3 をベクターとしたカイコ（東海×朝日）のゲノム DNA ライブラリーは、富野士良教授（東京都立大学理学部）より分与された（Fujii et al., 1989）。 $[^{32}\text{P}]$ でラベルした全鎖長の cDNA をプローブとし、ブランクハイブリダイゼーションによりスクリーニングを行い（Benton and Davis, 1977）、陽性クローンをブランク純化した。

DNA の塩基配列の決定

制限酵素処理により生じた種々の DNA 断片を Bluescript KS⁺ に挿入した。ディリーションは第3章の方法に従った。塩基配列の決定は、蛍光標識プライマーと Taq ポリメラーゼによる伸長反応を用いたジデオキシ法によった（Sanger et al., 1977; Johnston - Dow et al., 1987）。伸長反応の鋳型には大腸菌から精製した 2 本鎖プラスミド DNA を用いた。電気泳動と塩基配列の読み取りは DNA 自動シーケンサー（ABI model 373A; Applied Biosystems Inc.）により行った。

ノーザンハイブリダイゼーション分析

冷蔵浸酸処理した後、卵を 25 °C に保護して胚子発育を再開させ、孵化まで毎日サンプリングした。これらの卵より全 RNA を抽出し、カイコ SDH cDNA をプローブに用い、第3章の方法に基づいてノーザンハイブリダイゼーション分析をした。

プライマーエクステンション

休眠覚醒卵（5 °C 冷蔵 160 日）、5 令幼虫の脂肪体、絹糸腺及び中腸より精製した 2 μg の poly (A)⁺ RNA を鋳型に用いた。プライマーには、5'-GCAGA

TAATAAATCTTCTTT-3' (SDH 1 in Fig. 16) を用い、第 3 章と同様に [γ - 32 P] ATP で末端標識した。逆転写反応は、200 U のスパーسكريプト (GIBCO, BRL) を用いて、42 °C で 1 時間行った。逆転写反応物の検出は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動後のオートラジオグラフィーにより行った。同じプライマーと Taq ポリメラーゼにより、適当な Bluescript クローンの 2 本鎖 DNA を鋳型としてシーケンスラダーを作製し、サイズマーカーとした。

RACE 法 (Fig. 20 参照)

1. ファーストストランド cDNA の合成

休眠覚醒卵 (5 °C 冷蔵 160 日)、5 令幼虫の脂肪体、絹糸腺及び中腸より精製した 2 μ g の poly (A)⁺ RNA を鋳型に、2 pmol の SDH 遺伝子に特異的なオリゴヌクレオチド 5'-GATTCTGACGTCGTTGGC-3' (SDH-A in Fig. 16) をプライマーに用いて第 3 章と同様の方法でファーストストランド cDNA を合成した。未反応のプライマーは、SUPRECTM-02 (Takara, Kyoto, Japan) を用いて除去した。

2. オリゴヌクレオチドの付加

上記のファーストストランド cDNA の 3' 末端に dC を付加する目的で、上記で合成した cDNA の 1/10 量を熱変性させ、これに最終濃度が 25 mM Tris - HCl, pH 8.3, 37.5 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1 mM dCTP となるようにそれぞれの試薬を加え、10 U の terminal deoxynucleotidyl transferase (Takara, Kyoto, Japan) と混合し、37 °C で 5 分間反応させた。次に T₇ primer の 3' 末端に dG を付加するため、50 pmol の T₇ primer に最終濃度が 10 mM Tris - HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.01 % gelatin, 1 mM dGTP となるようにそれぞれの試薬を加え、30 U の terminal deoxynucleotidyl transferase と混合し、37 °C で 5 分間反応させた。その後、100 °C で 10 分間熱し、酵素反応を止めた (Schuster et al., 1992)。

3. PCR

上記の oligo dG を付加した 5 pmol の T₇ primer、50 pmol の T₇ primer、50 pmol の SDH cDNA に特異的なプライマー 5'-GTAACACAGCAGCGTAGTTC-3' (SDH-B in Fig. 16) と 3' 末端に oligo dC を付加した上記のそれぞれの組織の cDNA (1/4 量)を混合し、50 μ l の反応スケールで PCR を行った。

4. サザンブローディング分析

各組織の試料について行ったそれぞれの PCR 産物 5 μ l をアガロースゲル電気泳動に用いた。これを第 3 章と同様の方法でナイロン膜に転移したものを 3 枚作製した。SDH 遺伝子に特異的な 3 種の合成オリゴヌクレオチド 5'-GCAGATAATAAATCTTCTTT-3' (SDH 1 in Fig. 16), 5'-GCAGAGGCGAGGGGTCTTCA-3' (SDH 2 in Fig. 16), 5'-AGGCAAAGCATAAATATCTC-3' (SDH 3 in Fig. 16) を [γ - 32 P] ATP で末端標識したものをプローブに用いて第 3 章と同様にハイブリダイゼーションした。

5. PCR 産物の塩基配列の決定

PCR 産物を Bluescript KS⁺ に挿入した。2 種の合成オリゴヌクレオチド、SDH 1 と SDH 2 をプローブとし、コロニーハイブリダイゼーションによりスクリーニングを行い、陽性クローンを得た。前述の方法でインサートされた PCR 産物の塩基配列を決定した。

コンピューターによる解析

第 3 章と同様の方法で行った。

結 果

1. SDH 遺伝子クローンの単離

カイコの遺伝子ライブラリー（ λ EMBL3）からカイコ SDH cDNA をプローブに用い約 4×10^5 個のクローンをスクリーニングした。その結果、2 個の陽性クローンを得た。これらのクローンのインサートの長さは、それぞれ約 17 Kbp と 14 Kbp であった。制限酵素地図を作成したところ長いインサートのクローンは、短いインサートのクローンを含むことが判明した（結果省略）。Fig. 15 に長いインサートを持つクローンの制限酵素地図を示した。全鎖長の カイコ SDH cDNA をプローブに用いたサザンハイブリダイゼーションの結果と制限酵素地図を比較することにより、このクローンはタンパク質をコードする部分をすべて含むものと推測された（結果省略）。

2. SDH 遺伝子の塩基配列の決定

長いインサートを持つクローンの種々の制限酵素断片を Bluescript KS⁺ に挿入し、種々の長さのインサートを持つクローンを作製し、塩基配列を決定した。その結果、SDH 遺伝子は約 10 Kbp にわたり、7 個のイントロンを含んでいた（Fig. 16）。多くの遺伝子において保存されているイントロンの両端の配列 5'-GT---AG-3'（Mount, 1982）が、すべてのイントロンの両端に存在していた。5' 上流域には、4 個の TATA box がそれぞれ離れた箇所に存在していた。しかし、多くの真核生物遺伝子に認められるシスエレメントである CAT box は、一般に -80 から -100 に位置するが（Benoist et al., 1980）、カイコ SDH 遺伝子には認められなかった。ポリアデニル化シグナルであるヘキサヌクレオチド AATAAA（Brinstiel et al., 1985）は認められなかったが、これに類似した配列 AATATA または AATAAT は、存在していた。カイコ SDH cDNA と カイコ SDH 遺伝子の塩基配列を比較したところすべて一致していた（Figs. 5 and 16）。

3. SDH 遺伝子のコピー数の決定

ハプロイドゲノム当りの SDH 遺伝子のコピー数をサザンハイブリダイゼーションにより推定した。ゲノム DNA は、交雑種（東海×朝日）から調製した。ゲノ

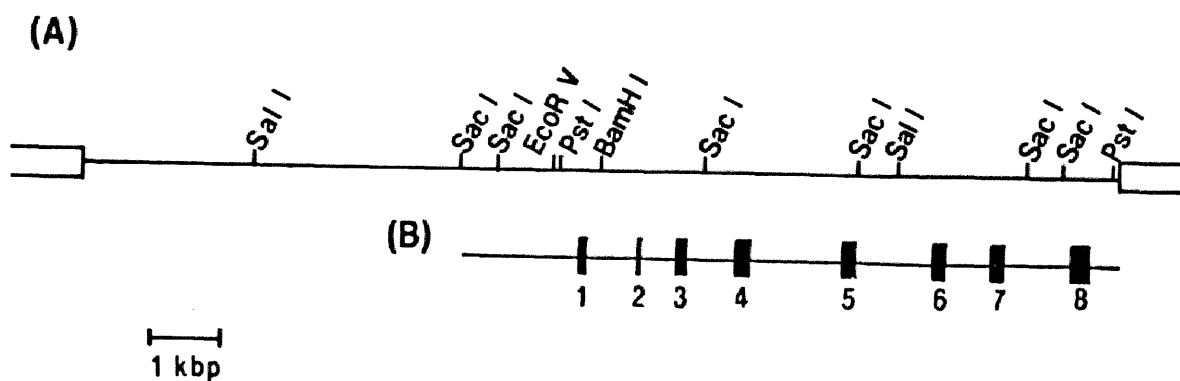


Fig. 15. Structure of the BmSDH gene. (A) Restriction map obtained with five enzymes, SalI, SacI, PstI, EcorV and BamHI. Box, vector DNA; line, genomic insert DNA. (B) The exon-intron structure of the BmSDH gene is shown. The eight exons are numbered and represented by filled boxes. The sequenced region of the BmSDH gene is shown by the line.

-1450 ttccacaacacgccctgataccagtatcacagataatctcttaatcacctttaacgatac
 -1390 ccacgggaggagatgcactggtgcttttcaagaccgatcccacacagccaaagacttttt
 -1330 caacagctttacaattgaagcgcgccatcaaagctaagcaatgagcctctctacaaaga
 -1270 catcgaaaatgccgtcgtaacctggatacttgaactggtgcaataacacaatgggtgtc
 -1210 gtaccttttgagcggtaacgcataactgtttcaccttcatcatgcatatcggaatataat
 -1150 ttacatacaactaatattgtacgctgctacctatgcaaggaaagcaggtatattaagcga
 -1090 gatcatcaactcgacgttaataaatgtttttacattgataatctcaaggcactttaatad
 -1030 atTTTTTTTTTgcttagttgggtggacgagctcacagcccacctggtgtcaagtgggttac
 -970 tgaagcccatagacattttacgacgtaaatgcgccacccaccttgaqatataaqtctctaaa
 -910 atcacaacggctgccccacccttcaaacggtaacgcattactgcttcacggcagcaatag
 -850 cagatgctatataataatagcacactgctaacaggttgcaaccctaaaaatataaca
 -790 atcagaagggaggagatatttatgctttgcttttagaaaacaattcatttttctctat
 SDH3
 -730 caagtcctatgcggtttttgtaatgtgttatacatagttacctattaattgctctagtcta
 -670 aactctttgggttcgttaggaagttaacgagctctgtgcttcacatccggtcatcggttctcgt
 -610 cgaaccgcgtcgctcgcgacgaagggtcgacgagtaaatlaaccctcagacacagccca
 -550 tgaqgtttctcgccggtatcttctcaatgagtcgctttccgatccggtggttagattctgcg
 -490 aagcacgggtctttgctaggggttcgtgttggcaacgtcatcaggtttgagccccgcgagct
 -430 gacctactagttaaagcgcgacgctgacatagcctctcaaggctatcagcttaggttaggaaa
 -370 aaaacacatagcttaacgtcggttcactcatttaaagctttgaaaagaaattatagttacgc
 -310 tttatctaaaagatatatgactcttaataataaagtattatctatggccatgctctcata
 -250 atggggacttatcttatgaagcatagctctgggggaatgcgtactgttatagaagtatat
 -190 aaaggtcctctcaattacgttacaattacagctatcacaatttataggagtagttgaagt
 -130 ttgaagaccctcgcctctgcagctctaccgaatcttctgattaatagtacaacagctctc
 SDH2
 -70 tttccgattttacagaacattatagtttcaacaaatctactttatatttacacttttgagga
 +1
 -10 attttatgcaTTT TAGAGTTTATTCCAGATTGTGTATTGAATTTCTTTCACATAAAAAACC
 -51 TAACGCTATTTATTATATAAAATTCAGAAGAATGCATATCGATCGAACGCTCCTACAGATG
 OΔ □ O □ Δ
 -111 AACATCCTTAATTTTTTATTTTAAAGAAGATTTATTATCTGCGTCCAAAGATATCGCGCTC
 SDH1
 -171 TCGTTACGATTTTGTAATCATTTCTCAAATAGTTTATCGAAGTTAACGGGTTGCAAGATGA
 M T
 -231 CCGAGAACTACGCTGCTGTGTTACACGGAGCCAACGACGTCAGAATCgtgaggctctttt
 E N Y A A V L H G A N D V R I SDH-A
 SDH-B
 tactatcaatattaattatatacaaaaatatttaatatgtgtatttaaaattactttatatt
 taatcttttaaaacaaagacattaaattgttttatgtatagcttctaattacgtccagctt
 gtcttgcgagtgacacgcgtagaatgtctctataattgtgttcgaaattaacctgagct
 tataaaatttgaaaccattgtgttgatgcattaatgatacagtagtagtcataaagtaa
 tgaaatctttcacttcaatttgaacacctcttctaactgttatatcgctccttaagcttg
 ggatcctctggatgcaggcagccaggactgatctttgtggcgaagtttggcggagacctta
 tgtccagcagtgagcgtctgtgctctgtgacagaacagaagcttgacaatttgtttatt
 ttttatttctaatgaaagtaccataaatgaattacgatctattaagacgaggaagaata
 taaaactcttaattgaacacagtagaaaatgcaaaattagttaaataaagtaaatatgat
 aagataactagtgttaacaattggcgacatttagcgaaatttacaaggtaaacctgtatttg
 tgattttattcgtcaatgtaaatgtaaaaaatatagttatataataaaaaacaatataca
 acaaaactgaattataatttttatttttacgttgccttatcacattgaccttttgaggaatg
 ataatgggaagatatattttgatgaaaactttcatagagctgttataaattaaaatgaat
 -1071 agtttttttttattattttactactttatgtaatttaatttcagGAGAAAATTCCAGTG
 E K I P V
 -1131 CCCGAGATAAACGATGACGgtaaaagtatttttttaatttgtctataaacattaaaatc
 P E I N D D E
 atcaaagatcaacagacttaaatagtttttaatttatattttcggttgttattcaagcg
 cgttttttagtataatctatgttatacatagatttgcgtctgttctatttttata
 ataataataaggccggtttatttccaatccataataataatcgttattacatgagattta
 atattaatattactaggttaatttcttttattttcttttattcgctatcgttattttcttc
 agtaccattgatcgaaacccttctcaggcaaggccctcctccagcatcttctaaccac
 tttgtccatggctttcttttccaattgcttccctgctatcgcttttatattttatata
 actttttctaggcgccctcttcttttctcttgggtccttttcacatagttgtctgtaa
 tgtccattttttgtctgtgctcttactatgtggttctatttttacctaaattaaaatgt
 -1671 tttattttttgatgcagAGGTTTAAATAAAGATAGACTGTGTCGGCATATGCGGTTCTGAT
 V L I K I D C V G I C G S D

Fig. 16 (continue)

1731 GTCAAGTTATACAGCACGGGTACGTGTGGAGCGGATGTTATCGACAAACCGATTGTCATT
 V K L Y S T G T C G A D V I D K P I V I
 1791 GGTACGAAGGTGCCGGAAGTGTGGTCAAGgttacataaatgattacatgaatataacgc
 G H E G A G T V V K
 taatcttctgttttaagctgcccttaaattttaagaatccctaaaataagtagtcatgta
 aaataagtagcgtcggtcatggacttttagcaatgccagggcaaagccaagccgctgtcta
 ccattaagtactctgcacaagcctagtttaagatggacatgtcatagcgctcggaagc
 accgtagagctcattccaaagtctgatggtacgtggcaaaaatgatctctggaagcgcac
 tatggatgaacgcaggggcttcaggtagtatggatgaactctactccggtggcagggcgtg
 gcgatggtaaaaacgggatggaggtatcatctcaacaattcctcagagcactccccatg
 gaacatacggtaaaaaatacagaggtgaccgaagtccttcgcagaccagaggttccaa
 acgatccgtgatagtgggattatcgacaatccgaatagccttctactgtatggagtcaaa
 tggaaatcaattattctgtacctaataaataaaccacatgaatttgtaaattacgt
 acctaattactagcggcaggacatattatccctattttcgcgatttatatatatcgatca
 2451 tcacatgataacgataaaaaggtaatacatatcggcagGTAGGAGACAAAGTAAGCAGTTT
 V G D K V S S L
 2511 GAGAGTGGGCGACAGAGTGGCAATAGAACCGACGCAGCCGTGTCGGTCTGTGAGCTGTG
 R V G D R V A I E P T Q P C R S C E L C
 2571 CAAGCGAGGGAAGTACAATTTGTGTGTGGAGCCACGTTATTGCTCCTCGATGGGCGCTCC
 K R G K Y N L C V E P R Y C S S M G A P
 2631 GGGAAACCTATGCCGTTACTACAAGCAGCTCGCCGATTTTTGTGCATAAgtaagtaaactg
 G N L C R Y Y K H V A D F C H K
 ttttgtttttcaaattcggttacaataatctataactaatctactaataaaataacttc
 tataactaatattataaagaggaaagctttgtttgtttgtttgtattggataggttccgaa
 actgctgaaccgatttgaaaaattcttacactgtttggaagctacactattcctgagtga
 cataggggtggtgcgatcaatggccttatagggggcgcccgatggggccagtcctgac
 cgtgggggtaccgaagctgctgcaacggccgcaacgcaccatcggggtcagggtaaccg
 atcgagaggggtggtggttgtggcgccgatgaccaccggtccggcggtcccgagggggagg
 gtgatgggagagatgtgctccgcactaaacgcttcaactctcctcctttgcattttcatga
 gttctgtctcatgagaggtcggacgtgggttgttgagcgacaggaggttttagtcggtt
 cgactacgacataccccgcccgcctctccagtggaggggtgggagtccggagatttctctc
 ctgacaaaaaaaataatcctcgaataacataggcttctttgtaacaaaaatagggtatc
 ttaggaaaactccaataatgttacgcaaatataaaaaataataatttaaaaaataatatta
 gaatagataaaaaatattaataatattattcaaatattatttaaatgaaaaataaaga
 tcattaaaaataataattattcaaaactacctttataatttctctatttttagaaacctgacg
 caaatataaggggttatgtgtgtgtattataattttttattttcatatttttgtaaaagac
 ccgagcaagccgcagcagggccgctagtaataaataaatgtgttttttaaaactcgtcact
 gtcgtcaggcctaagttacccgaggattcaaagcgagttttgtactgactttaacgtatt
 attgaaattcgcttaattgattatatgtatgaccattatgtacattaggagatttgagag
 tgttaaaacataatctgttaatttaaatgcgtgtttgtttattattgtggcgaagctt
 ggggagggcccatgtgcaacagtggttctgtaggctgaaggtaataattagattagttt
 gttaaatctgaagatttggaatagggtgactctgaaaaatgtgcaacttctgcaacta
 aaaaaaatcaatttcttttttttaaccgactcttttttagatgtgtaattatgtaattc
 cgtattaataataaataaccaatcggaatatccggttctgatcattttgttaagagatag
 4011 ctccttaggtttttttctctattagattttcctcctattagATTACCAGACAATCTAACAA
 L P D N L T M
 4071 TGGAGGAAGGGGCGAGCGGTCCAGCCGCTCGCCATCGTGATCCACGCCTGCAACCGGCCA
 E E G A A V Q P L A I V I H A C N R A K
 4131 AGATAACTCTCGGATCTAAGATCGTTATCCTTGGGGCCGGGCCTATTGGTATTTTGTGTG
 I T L G S K I V I L G A G P I G I L C A
 4191 CTATGTCGGCCAAAGCAATGGGAGCTAGCAAAATTATTTTAACAGgtagcaaaatataat
 M S A K A M G A S K I I L T D
 gataactattataatattattttactagaaaaatttcgggttatttaggtggcaggacatat
 tgtgaactgtcaacagttgtctataacctaacggtgcttttaggtaacccaagcatc
 ggtcatcgttctcgtcaaaaccggttgccttgcgacgaaggggtcggcgagtaaatataacc
 acagacacagcccactgaqtcttctcgcgcgaacttctcagtggttcgcttccgactccg
 gtagtgaattctgcgaagcacggctcttgcaggttgcgtgttagcaacaaacgtcaggtt
 tgagcccgcgagctcacctactagtgttggtgaatctagaataacccctcgaggttacta
 aaataggtagtgattctgacgggatttacgtccagtagaccagtgaaattactgaaatag
 ctttagtagcagtagcaacggttggttagtattcagtaattatttcttctcttgctaaagata
 gtcgacgagcttacggccaccttgattttggtttacagaagcccatgccatctcaacgtg
 acaaaattaagttcacgccgtgtacaaagcctgttgcatcttttaaaactggcacacgttaa
 ctgctatagtcagtagctgttataagtttgaagactgtttgaagtcgtcgtgcctaaagg
 ataagacgtccggtgcattcgtatctagcagatgcaccggtgttcgtatcccgtgcgag

Fig. 16 (continue)

tacqaatttttctaataaatacgtacttaacaaatgttcacgattgacttccatgqtaa
 aggaataaaaacatcgtqtagtaaaaatcaaacccgcaaaattataaattgttqgtgta
 tttgaggggtgagggcagccgttggaaactatactgagatcttagaacttatatctcaatgt
 gggcggcggcatttacgttqtagatgtctatgggcttcagtaaccacttaacaccaggtg
 ggctgtgagccgctccaccaactgagcaataaaaaaaaaagctttgcctattccaccaa
 -5271 tgtcattgatcttacagACGTAGTTCAGTCACGCTTAGACGCAGCACTGGAGTTGGGAGC
 V V Q S R L D A A L E L G A
 -5331 TGATAACGTCTCCTCGTCCGTCGGGAGTACACTGACGAGGAGGTTGTAGAAAAAATGT
 D N V L L V R R E Y T D E E V E K I V
 -5391 GAAGTTGCTCGGTGACCGCCCGGATGTGTCAATCGATGCGTGTGGGTACGGGTCCGGCA
 K L L G D R P D V S I D A C G Y G S A Q
 -5451 GAGAGTCGCTCTACTGgtatgtctctatatgttattttattttatgaccagtgaaccggtt
 R V A L L
 acgcttcggtgactggtgctaaatgtacgaagaattaccttttttgcctagtgttgcggcg
 tattgcaagaggatagcgaacaaactctatactgtcaatttctgtcgcaaaacagtcgtgt
 ctagtccgaagggtgaggatcgttttccgacaaaatttagatttcacctaagggtcccaa
 ggtaggggagcaccattctcactgggtttcggtagcaacatagcaccagatgagtcgtatg
 tcttccctcatccgtttacacaattaaataaactgttaaaactaattaaaacaaccactt
 taacgggctttccattaaaacatatcatacgtcatctcttctcacggactcacactctt
 ctcttgacatcccttctcatagtcacacgggtcttttaggacgccccgtgcggcttcaa
 aatacaaccatattttcaaagtacttcattaggtgtaccataaaaaatcattcgcaaa
 gcagctacccttgagctgttaggtctcttcggaggcgctcgggcaactgttagctaate
 ccacccatctccaggctgagcctttgctcgccacctatgcaagtgaactggaaggcc
 tccgggccaccagtaatacttcagtcataaaaaaccgtaaaaatataaaaaaaaaacat
 gatgttcatttttgaatacgtctcctcgtttgtcaatgtgaggagtgataggtttatc
 -6231 caattccagGTGACTAAGACAGCGGCTTGGTGTGGTGGTGGCATAGCTGACAAAACG
 V T K T A G L V L V V G I A D K I T
 -6291 GTGGAGCTGCCGCTCTCACAAGCGCTGCTCAGAGAAGTTGACGTTGTAGGGTCCTTTCGT
 V E L P L S Q A L L R E V D V V G S F R
 -6351 ATTATGAACACgtacgtagcgaattttgttaatcttggcaatctgattgtgcagatctat
 I M N T
 ctaccttgggtattttgtggtggttgatcatatgcattaccagttgcattattaggtagt
 caaagtagaggggaagaggtcaaccgaagaaggcatggatggagtgtgtgaatatgagag
 agagagagagaggagtgagtgttgagatgacggctgatagaagagaatgggagagaaaat
 tagctgtgccgatcccacctagtgggataaagttgagaaaaagaagagaagatcatat
 gcattactattatattcaattatattgattaaatgtgaaagactcgtgcagtgcgaatga
 gattttgacctcaagtctgaagggtggcgacattcgcggtctatgagctctgtgacatcta
 tgagctccagtgattgttttgaccaattgaaccgtgagcttgttcgcctatacatatac
 atacaaaaaattgataaaatgacatgtatctgtgacaaatgaatgcaaaatttcaacat
 tttcatgcgctcttgtgaaggcacgcataaggcttcaatgagactatttgtgtaccagta
 ggctgtgagctcgcccgcccatgatcaggaataactaaaaaaatgtgtgcacttcacacg
 tagtataagcgggacctttagaagtattctatctcattggcttacaactaaattatgta
 tgtctgtcccttttctgttcacgagtttcaaatacacagcgggtgctaaagaagcttcgct
 gtgaacactcgtgaacaaacttaacatcggtttcccgaaagaacttttagggatcaatt
 gcctaactgagagcaaatatttgggtttcaatttatatttattgacgcggaatgcaac
 acgaaggcagctggccgcccgcgctcccggtcatctctcgagtcgttgaccgcaat
 ttttacattgcgcggaatgctaaaagttatttgtgcaatatatacactactgagacct
 tagaacttatatctcaagattttacgggatttacgtttagatgtctatgggctctagta
 aacacttaataaccagggtcactgtgagctcgtccactcatctaaacaataaaaaagtttt
 -7491 cttcggtcgtgacgcgaatcattgcagGTACAGCCCGCCCTGGCCGCGGTGTCTCCGG
 Y Q P A L A A V S S G
 -7551 GGCCATCCCCTTGGACAAGTTCATCACTACGCTTCCCGTTGAACAAGACCAAGAAGC
 A I P L D K F I T H R F P L N K T K E A
 -7611 ACTGGATTTAGCCAAATCTGGTGCCGCCATGAAAATACTCATAACGTCGAAAATTAAaa
 L D L A K S G A A M K I L I H V Q N ---
 cacagtttcataacaaaatccttgttttatttcataaaacattaactaatatatttt
 taaaaaattacatcgatataatgcaaatgagatttattattgttattcaaaatggcagat
 gcacgagagtacgctttctgggttatatttccggttaaagccctgtaaaacaatcaaattt
 gtttgataaatttgtcaaacttatgttttcatcaacaatagattaaaagatcaaaccaa
 agatcaacaagtttatttttaacttgccgtagattcggttttctccttgccgtgactg
 agatcttgtttgacaaacacgccgtcaatcaagatttccatcaaacgcgtcaaacacgta
 gactgtttgacaaacgcgtcaaaacaagctgcatgctgtcaataatttgacaaacaatt
 tgatcgtttacagggcgctttaaacaacaatttttaaagtggaattttattttaggatta
 cgatgagtttaacataatttatgatccgttgacctgcaggtcgac

•8194

Fig. 16 (continue)

Fig. 16. Structure of the BmSDH gene. The nucleotide sequence of the SDH gene and the deduced amino acid sequence, beginning with the initiator methionine, are shown. The transcription start site in fat-body determined by primer extension analysis is indicated by +1. Nucleotides on the 5' side from the transcription start site in fat-body are indicated by negative numbers. The exon sequences are shown in upper case letters, and the intron sequences and the 3' of the terminator codon (---) in lower case letters. Sequences similar to the TATA motifs are underlined (at positions -843 to -837, -195 to -189, -30 to -24 and +64 to +70). Boxes indicate the repeated sequence in Bombyx genome. The consensus sequence which is recognized by BmFTZ-F1 is shaded. The consensus sequence which is found in the genes expressed mainly in larval and pupal fat-bodies is dot-underlined. The 5' ends of the PCR products obtained by RACE analysis (Fig. 20) are indicated by ★ in cold acclimated egg (at position -129), ○ in fat-body (at positions +65 and +85), △ in silk-gland (at positions +66 and +95) and □ in mid-gut (at positions +72 and +87). Arrows (SDH1, 2, 3; SDH-A, -B) indicate the oligonucleotides used for primer extension analysis in Fig. 19 and RACE analysis in Fig. 20.

ム DNA を BamHI, PstI, EcoRV で切断し、全鎖長の カイコ SDH cDNA をプローブとして、ハイブリダイゼーションを行った。BamHI で切断した場合は 2 本のバンドが、PstI, EcoRV で切断した場合は 1 本のバンドが検出された (Fig. 17)。この結果を、SDH 遺伝子の制限酵素地図 (Fig. 15) と比較したところ、ハプロイド当り 1 コピーの SDH 遺伝子が存在していることが示唆された。

4. 休眠覚醒期から幼虫孵化時までの胚子発育過程における SDH mRNA の大きさの変化

第 3 章及び第 4 章の結果から、カイコ卵において SDH 遺伝子は、休眠覚醒期に卵黄細胞で、胚子成長期に胚子細胞で、幼虫組織形成期に脂肪体細胞で発現することが明かとなった。また、上記の結果から、SDH 遺伝子はハプロイド当り 1 コピーであることが示された。従って、それぞれの時期・組織特異的な SDH 遺伝子の発現に際して、それぞれに対応して異なった大きさの mRNA あるいは異なったエクソンから構成される mRNA が転写される可能性が考えられた。

そこで、休眠を覚醒させる方法の一つである冷蔵浸酸処理を行い、25 °C で胚子発育を再開させた卵から、種々の時期に、全 RNA を抽出してノーザンハイブリダイゼーションを行った (Fig. 18)。この冷蔵浸酸処理卵の場合には、浸酸処理時から約 3 日間までの休眠覚醒期、及びその後の幼虫孵化時 (浸酸処理後 12 日) までの胚子発育過程の期間に対応する SDH 活性の変動を同時に検出することができる (Yaginuma and Yamashita, 1979)。この冷蔵浸酸処理卵において、カイコ SDH cDNA プローブによって 1.2 kb の SDH mRNA が浸酸処理後 1 日より 5 日まで検出された。しかし、浸酸処理後 4 - 5 日より 1.1 kb の SDH mRNA が出現し始め、その後は、1.1 kb の SDH mRNA のみが検出された。1.1 kb の SDH mRNA 量は、バンドの濃さから判断して、浸酸処理後 6 日まで増加した。その後 1.1 kb の SDH mRNA 量は、浸酸処理後 9 日まで減少し、幼虫孵化 (浸酸処理後 12 日) に向けて再び増加した。以上の結果、及び第 3 章の結果 (Fig. 7 参照) から、休眠覚醒期の SDH mRNA の大きさは 1.2 kb であり、幼虫孵化時に向けて幼虫脂肪体細胞で発現される SDH mRNA の大きさは 1.1 kb であると考えられた。また、胚子成長期の胚子細胞で認められる SDH mRNA は、おそらく 1.1 kb であると推測された。

1 2 3

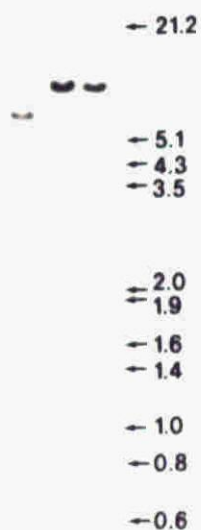


Fig. 17. Southern hybridization analysis of genomic DNA. Genomic DNA was digested with BamHI (lane 1), PstI (lane 2) or EcoRV (lane 3) and then hybridized with full length BmSDH cDNA as a probe. Numerals on the right indicate the position of fragments of λ DNA double-digested with HindIII and EcoRI as size markers.

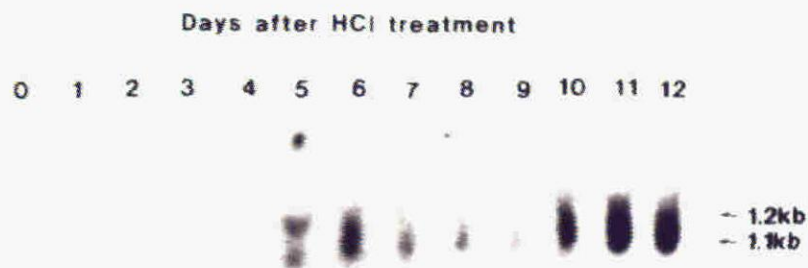


Fig. 18. Northern hybridization analysis for gene expression of the BmSDH during embryogenesis. Diapause was broken by HCl treatment (specific gravity, 1.100 at 15 °C; 48 °C for 5 min) after chilling at 5 °C for 30 days from 2 days after oviposition. The HCl-treated eggs were incubated at 25 °C until larval hatching (12 days). Each 30 μ g of total RNAs extracted from eggs with various stages was applied to 1.0% agarose gel. The RNAs were hybridized with radiolabeled cDNA for BmSDH.

5. SDH mRNA の 5' 末端構造の決定

第3章の結果と上記の結果より、休眠覚醒期に出現する SDH mRNA と幼虫組織で発現する SDH mRNA の大きさが異なることが推測された。さらに SDH 遺伝子上流域には TATA box 相同配列がそれぞれ離れた箇所に 4 個存在していた。従って、この mRNA の大きさの差異は、5' 末端構造の違いによるものであると考えられた。そこで SDH mRNA の 5' 末端構造、つまり、イントロンの存在の有無、及び転写開始点を決定するため、先ず初めに常法に従い、プライマーエクステンション法により転写開始点の決定を試みた (Fig. 19)。その結果、5 令幼虫の脂肪体では、翻訳開始点から 216 b 上流の T で停止した反応物が検出され、この点を転写開始点とし、Fig. 16 において +1 とした。この転写開始点の 30 b 上流には、TATA box として考えられる TATATTT 配列が存在していた。しかし、休眠覚醒卵 (Fig. 19)、絹糸腺 (結果省略)、及び中腸 (結果省略) では、鋳型とした SDH mRNA が少量であるためと考えられるが、プライマーエクステンション法では転写反応物を検出することはできなかった。

そこで、微量の mRNA でも末端構造の決定が可能な RACE 法を用いて解析を試みた (Fig. 20)。RACE 法による PCR 産物をアガロースゲル電気泳動し、ナイロン膜に転移して、SDH1、SDH2、SDH3 のオリゴヌクレオチド (Fig. 16 参照) をそれぞれプローブに用いてハイブリダイゼーションを行った。その結果、SDH3 のプローブに反応するバンドは検出されなかった (Fig. 20D)。SDH2 のプローブに反応するバンド (約 300 bp) は、休眠覚醒卵で強く検出されたが、幼虫の脂肪体、絹糸腺、中腸では検出されなかった (Fig. 20C)。SDH1 のプローブに反応するバンド (約 300 bp) は全ての組織において見られた (Fig. 20B)。従って、休眠覚醒卵と幼虫組織とでは、SDH mRNA が異なる 5' 末端構造を持つことが示唆された。

次にこれらの PCR 産物を Bluescript にサブクローニングし、SDH1 及び SDH2 のプローブに反応するコロニーをスクリーニングした。その結果、約 2×10^3 個のクローン中、休眠覚醒卵では、陽性クローンは 56 個、脂肪体では、陽性クローンは 70 個、絹糸腺では、陽性クローンは 33 個、中腸では、陽性クローンは 37 個であった。各組織につき、2 個のクローンを無作為に選び出し、

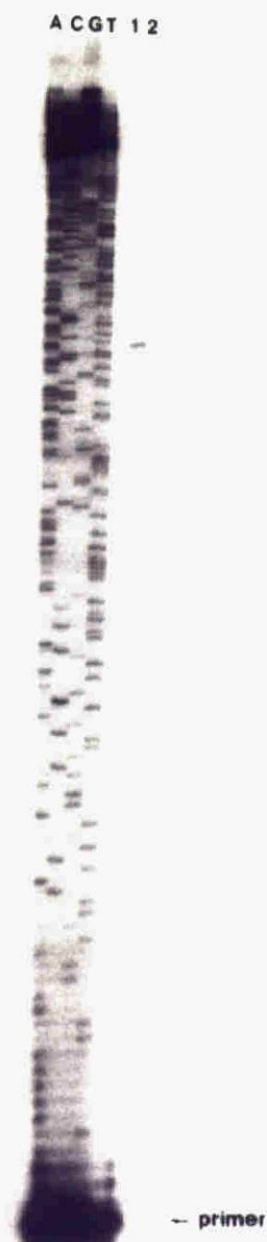


Fig. 19. Primer extension analysis. A synthetic oligonucleotide primer (SDH1 in Fig. 16) was end-labeled, annealed with 2 μ g poly(A)⁺ RNA from cold acclimated eggs (lane 1) or larval fat-body (lane 2), and extended. The sequence ladder generated with the same primer on a cloned DNA template shown in lanes A, C, G and T, was used as a size marker.

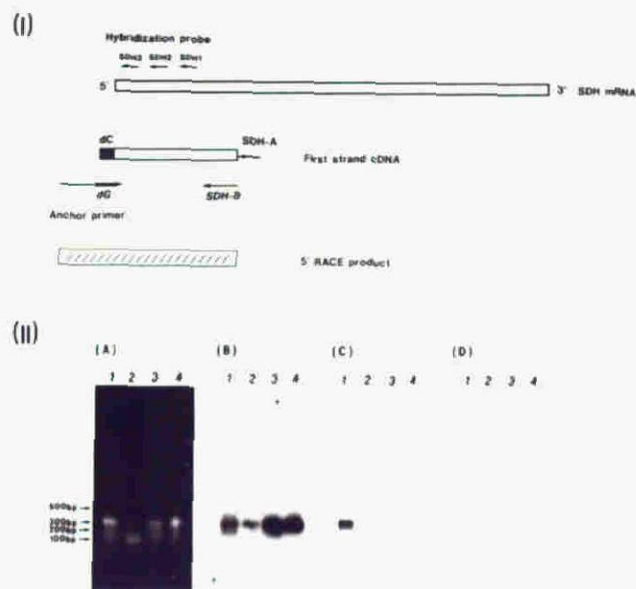


Fig. 20. 5' rapid amplification of cDNA end (RACE) of BmSDH mRNA. (I) Procedure for RACE. Oligonucleotide sequences for SDH-A, SDH-B, SDH 1, SDH 2 and SDH 3 were shown in Fig. 16. Each 2 μ g of poly (A)⁺ RNA from diapause eggs chilled for 160 days (lane 1), fat-body (lane 2), silk-gland (lane 3) or mid-gut (lane 4) was used for first strand cDNA synthesis using BmSDH specific primer (SDH-A). The cDNA was dC-tailed by terminal deoxynucleotidyl transferase and amplified by polymerase chain reaction using dG-tailed T7 primer and internal BmSDH specific primer (SDH-B). In (II), half volume (25 μ l) of each reaction product was analysed by 1.0% agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide (panel A), and one-tenth (5 μ l) by 1.0% agarose gel electrophoresis and Southern blot using each oligonucleotide probe; SDH 1 (panel B), SDH 2 (panel C) or SDH 3 (panel D).

インサートされた PCR 産物の塩基配列を決定した。

Terminal deoxynucleotidyl transferase による 3' 末端への dG または dC の付加は、10 - 19 個であり、平均すると 14 個であった。休眠覚醒卵では、-129 の T (★, Fig. 16) を 5' 末端にもつ PCR 産物を含むクローンが 2 個得られた。この PCR 産物の塩基配列と SDH 遺伝子の -129 から +234 にかけての塩基配列は、完全に一致していた。従って、SDH 遺伝子のこの領域には、イントロンが存在しないと考えられた。

休眠覚醒卵からの PCR 産物を含むクローンに対し、脂肪体では、+65 と +85 の A (○, Fig. 16)、絹糸腺では、+66 の T と +95 の A (△, Fig. 16)、中腸では、+72 の T と +87 の A (□, Fig. 16)、を 5' 末端にもつ PCR 産物を含むクローンがそれぞれ得られたが、これより更に上流に位置する 5' 末端を持つ PCR 産物を含むクローンは得られなかった。これらのクローンの場合にも、PCR 産物の塩基配列と、SDH 遺伝子の +65 から +234 にかけての塩基配列は完全に一致していた。従って、この場合も SDH 遺伝子のこの領域には、イントロンは含まれていないものと考えられた。しかし、前述のように、これらのクローンの PCR 産物の 5' 末端の塩基は必ずしも一致することではなく、休眠覚醒卵、絹糸腺、及び中腸における SDH 遺伝子の転写開始点をここで行った RACE 法によって決定するには至らなかった。

考 察

カイコ SDH cDNA をプローブに用いて、カイコ SDH 遺伝子をクローン化し、約 10 kbp にわたって塩基配列を決定した。これを カイコ SDH cDNA の塩基配列と比較した結果、カイコ SDH 遺伝子には 7 個のイントロンが含まれることが明らかとなった。カイコ SDH は、zinc-containing long chain alcohol/polyol dehydrogenase ファミリーに属することが、第 3 章で示された。このファミリーでは、すでにヒト ADH (Jeffery and Jornvall, 1988)、トウモロコシ ADH 1 (Dennis et al., 1984)、トウモロコシ ADH 2 (Dennis et al., 1985)、オオムギ ADH 1, 2, and 3 (Trick et al., 1988)、*Aspergillus nidulans* ADH (McKnight et al., 1985)、*Pennisetum glaucum* ADH (Gaut and Clegg, 1991)、*Pisum sativum* ADH (Llewellyn et al., 1987)、*Arabidopsis thaliana* ADH (Chang and Meyerowitz, 1986)、酵母 ADH (Jeffery and Jornvall, 1988) で遺伝子構造は明らかにされているが、SDH において遺伝子構造が明らかにされたのは カイコ SDH の遺伝子が初めてである。

上記の ADH と カイコ SDH でタンパク質の一次構造上どの位置にイントロンの挿入箇所が存在しているかを比較した。その結果、タンパク質の 3 次構造上ドメインと呼ばれる単位間 (Branden et al., 1984) に、イントロンが挿入されているものは少なく、カイコ SDH の場合、イントロンの挿入箇所はドメインの区切れには存在しなかった (結果省略)。しかし、一般に、モジュールと呼ばれる単位間に、イントロンが挿入されていることが示唆されており (Go, 1981, 1983)、カイコ SDH においてもモジュールの区切れにイントロンが挿入されていることが明らかとなった (郷、私信)。

カイコ SDH 遺伝子の 3' 非コード領域のポリアデニル化シグナルである AATAAA は、タンパク質をコードする部分の末端である TAA から 526 bp 下流までには存在しなかった。これは、トウモロコシ ADH 1 遺伝子のように、mRNA の 3' 末端に poly(A) が付加されているにもかかわらず、ポリアデニル化シグナルを持たないものなのか (Dennis et al., 1984)、もし AATAAA が存在するならばさらに下流域に存在するものなのか、それとも、AATAAA に類似した塩基配列 (AATATA または AATAAT) で代用するもの (Birnstiel et al., 1985) なのか

現時点では明かではない。しかし、カイコ SDH cDNA は、幼虫の脂肪体の poly (A)⁺ RNA より作製されたライブラリーから得られたものであるから、SDH mRNA の 3' 末端には、poly (A) は、付加されているものと考えられる。

一般に遺伝子の 5' 上流域には、遺伝子の発現を調節している因子が存在している。カイコ SDH 遺伝子の 5' 上流域には、TATA box に相当する配列が、4 箇所それぞれ離れた箇所に認められた。ゲノム DNA のサザンハイブリダイゼーションの結果より、カイコ SDH 遺伝子は、ハプロイドゲノム当り、1 コピーであると考えられた。しかし、ノーザンハイブリダイゼーションの結果より、SDH mRNA は 1.2 kb と 1.1 kb の 2 種類の大きさのものが存在することが示された。この mRNA の大きさの差異は、5' 末端構造、または、3' 末端構造の違いによるもの、あるいは、オールターナティブスプライシングによるエクソンの違いによるものの 3 つの可能性が考えられた。

プライマーエクステンション法により、幼虫脂肪体での転写開始点は決定されたが、休眠覚醒卵、絹糸腺、及び中腸での転写開始点は決定されなかった。そこで、RACE 法を行ったところ、休眠覚醒卵の SDH mRNA に由来する PCR 産物の 5' 末端は、脂肪体でのプライマーエクステンション法による転写開始点より、さらに上流に位置していた。一方、幼虫組織の SDH mRNA に由来する PCR 産物の 5' 末端は、脂肪体での転写開始点より下流に位置していた。従って、ここで行った RACE 法では、それぞれの転写開始点を決定するには至らなかったが、少なくとも休眠覚醒卵と幼虫組織では、転写開始点が異なることが示唆された。

1.2 kb と 1.1 kb の長さの SDH mRNA は、SDH 遺伝子の 5' 側より 2 番目と 3 番目の TATA box からの転写の違いに起因するものと考えられる。つまり、休眠覚醒卵では、ディスタルプロモーター、幼虫組織では、プロキシマルプロモーターからの転写が行われているものと考えられる。

このようなオールターナティブプロモーターを持つ遺伝子 (Schibler and Sierra, 1987) は、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) ADH gene, antennapedia gene, caudal gene、マウスとラット alpha amylase genes、ラット aldose A gene、ヒト aldose gene、数種の生物種の myosin light chain gene で知られている。

また、他の遺伝子で同定されているシスエレメントのうち、以下のものはカ

イコ SDH 遺伝子の上流域にも認められた。カイコ、タバコスズメガ (*Manduca sexta*)、及びキイロショウジョウバエの脂肪体で発現している貯蔵タンパク質遺伝子の 5' 上流域に見い出されている 5'-TGA(T/A)AA(A/T/G)-3' (Willott et al., 1989) がカイコ SDH 遺伝子にも存在していた (Fig. 16, 点下線)。従って、おそらくこのシスエレメントは、貯蔵タンパク質遺伝子のみではなく、幼虫脂肪体で発現している遺伝子群に普遍的に存在する配列ではないかと考えられた。

そこで、現在まで、昆虫で報告されている遺伝子の中で、脂肪体で発現している遺伝子の 5' 上流域の塩基配列を調べたところ、幼虫及び蛹の脂肪体で発現するものには、このシスエレメントが見いだされた (Table 2)。しかし、主に成虫脂肪体で発現しているもの、例えば、キイロショウジョウバエの卵黄タンパク質 YP-1 (Hung and Wensink, 1981; Hovemann and Galler, 1982)、YP-2 (Hung and Wensink, 1983)、YP-3 (Yan et al., 1987)、タバコスズメガの Apolipoprotein III (Cole and Wells, 1990; Cole et al., 1990)、Microvitellogenin (Kawooya and Law, 1983; Wang et al., 1989) の遺伝子には上記のシスエレメントは見い出されなかった。しかも、キイロショウジョウバエの ADH の遺伝子では、このシスエレメントは、成虫脂肪体での発現に参与するディスタルプロモーターの上流には存在せず、幼虫脂肪体での発現に参与するプロキシマルプロモーターの上流域には存在していた (Benyajati et al., 1983)。また、カイコの貯蔵タンパク質 SP1, SP2 遺伝子では、ゲルシフトアッセイにより、幼虫脂肪体由来の核抽出物の中にこのシスエレメントに結合するタンパク質の存在が示唆されている (Sakurai et al., 1989)。従って、このシスエレメントは、幼虫・蛹脂肪体での発現に特異的であり、このシスエレメントに結合する幼虫脂肪体特異的因子によって、SDH 遺伝子の幼虫脂肪体での発現が調節されている可能性が示唆された。

また、カイコの *fushi tarazu* 調節タンパク質 (FTZ-F1) 結合配列 5'-PyCAAGGPYCPu-3' (Ueda and Hirose, 1991) が、カイコ SDH 遺伝子にも認められた (Fig. 16, 網掛け)。このタンパク質は、絹糸腺でのフィブロイン遺伝子の発現に関係があることが示唆されている (Ueda and Hirose, 1990)。従って、このシスエレメントは絹糸腺での SDH 遺伝子の発現にも関係していると考え

Table 2 Heptanucleotide sequence in the upstream region of the genes which are mainly expressed in larval and pupal fat bodies. The numbers refer to the position of the 5' end of the sequence in the gene and are numbered relative to the transcription start site. The references are as follows. 1. Hishida, 1993. 2. Fujiwara and Yamashita, 1992. 3. Sakurai et al., 1988. 4. Fujii et al., 1989. 5. Mori et al., 1991a. 6. Mori et al., 1991b. 7. Sun et al., 1991. 8. Xanthopoulos et al., 1988. 9. Willott et al., 1989. 10. Benyajati et al., 1983. 11. Kylsten et al., 1990. 12. Reichhart et al., 1992. 13. Delaney et al., 1986. 14. Kobayashi et al., 1989. 15. Matsumoto et al., 1986.

				reference
<i>Bombyx mori</i>	Sorbitol dehydrogenase	-332	TGAAAAG	
	Anti-chymotrypsin	-46	TGATAAA	1
	Chymotrypsin inhibitor 1	-1001	TGAAAAT	1
	Larval serum protein	-73	TGATAAA	2
	Storage protein 1	-170	TGAAAAA	3
		-72	TGATAAT	
	Storage protein 2	-534	TGAAAAA	4
		-117	TGAAAAG	
		-94	TGATAAT	
	30K protein 6G1	-1428	TGAAAAT	5
<i>Hyalophora cecropia</i>		-1384	TGAAAAA	
	30K protein 19G1	-149	TGATAAT	6
	30K protein 21G1	-66	TGATAAG	6
	Acidic attacin	-643	TGATAAT	7
		-240	TGATAAT	
		-164	TGATAAT	
		-123	TGATAAA	
	Basic attacin	-219	TGAAAAG	7
	Cecropin B	-328	TGAAAAA	8
	Arylphorin α subunit	-89	TGATAAA	9
<i>Munduca sexta</i>	β subunit	-93	TGATAAA	9
		-76	TGAAAAG	10
<i>Drosophila melanogaster</i>	Alcohol dehydrogenase	-678	TGAAAAA	11
	Cecropin A1	-593	TGAAAAA	
		-2199	TGAAAAA	12
		-212	TGAAAAT	
	Larval serum protein 1- α	-468	TGATAAA	13
	1- β	-200	TGAAAAA	
	1- γ	-285	TGATAAG	
		-230	TGATAAT	14
<i>Sarcophaga peregrina</i>	Lectin	-230	TGATAAT	14
	Storage protein	-89	TGAAAAA	15
Consensus		TGA (A/T) AA (A/G/T)		

えられる。また、エクジステロイド応答エレメント (Ozyhar et al., 1991; Cherbas et al., 1991)、heat shock 反応エレメント (Pelham, 1985) に相同性のある配列は カイコ SDH 遺伝子には認められなかった。

また、カイコのゲノム中に見いだされている繰り返し配列である Bm1 (Adams et al., 1986)、BmX (Wilson et al., 1988)、フィブロイン第 1 イントロン (Kusuda et al., 1986) 相同配列が、カイコ SDH 遺伝子上流域及びイントロン中に認められた。このような繰り返し配列が遺伝子進化の中で重複等の役割を果たしてきたと考えられている (Ichihara and Mita, 1992)。

第 3 章及び第 4 章において、カイコ SDH 遺伝子は、休眠覚醒期では卵黄細胞、胚子成長期では胚子細胞、幼虫組織形成期では脂肪体細胞で発現することが示された。このような複雑な発現調節の現れの一つに、オールターナティブプロモーターの使い分けがあり、2 種類の大きさの mRNA を生じさせていることが示唆された。今後、SDH 遺伝子の発現が、どのような転写因子によって調節されているかを明らかにすることが課題である。

摘 要

1. カイコ SDH 遺伝子は、約 10 kbp にわたり、8 個のエクソンより成り立っていた。上流域には、TATA box 相同配列が、4 個それぞれ離れた箇所に存在していた。
2. カイコ SDH 遺伝子はハプロイドゲノム当り、1 コピーであることが示唆された。
3. 冷蔵浸酸卵を用いたノーザンハイブリダイゼーション分析により 2 つの異なる長さの SDH mRNA が検出された。つまり、冷蔵浸酸処理後（休眠覚醒期から胚子発育前期） 1 - 5 日は 1.2 kb の大きさ、冷蔵浸酸処理後（胚子発育後期） 4 - 12 日は 1.1 kb の大きさであった。
4. プライマーエクステンション法及び 5' RACE 法により、SDH 遺伝子は、休眠覚醒卵（160 日間冷蔵）ではディスタルプロモーター、幼虫組織ではプロキシマルプロモーターより転写が開始されることが示唆された。
5. SDH 遺伝子の 5' 上流域に、幼虫・蛹脂肪体で発現する遺伝子に作用するシスエレメントが同定された。

総 合 考 察

本研究を総合した結果を Fig. 21 に示した。SDH 遺伝子の発現は、以下のよう
に調節されていると結論した。休眠卵の場合、25 °C では中胚葉の分節化の段
階までは胚子の発育が進むが、その後発育は停止する。この卵においては、SDH
遺伝子の発現は起こらない。しかし、5 °C で 40 - 50 日間冷蔵することにより、
SDH 遺伝子の発現が卵黄細胞で開始される。このときに発現する SDH mRNA は、
ディスタルプロモーターから転写され、1.2 kb の大きさである。

一方、非休眠卵の場合、25 °C で、胚子発育に伴い SDH 遺伝子は産下後
1 - 2 日 (stage 7; 中胚葉の分節化直後であり休眠ステージの胚子と形態的に
類似した胚子のステージ、高見, 1969) から発現する。産下後 3 日の SDH 遺伝
子の発現場所は、卵黄細胞と胚子である。非休眠卵では連続して胚子発育が進行
するため卵黄細胞と胚子でどちらの発現が早いかにについては明かではないが、休
眠卵の結果を考慮すると卵黄細胞の方が早いものと推測される。この卵黄細胞で
の発現は、SDH 遺伝子のディスタルプロモーターから転写される 1.2 kb の
mRNA であると考えられる。その後、胚子の発育に伴い SDH mRNA の発現量は胚子
細胞で増加していく。卵黄の利用に伴い、卵黄細胞は崩壊し、卵黄細胞の SDH
mRNA 量は減少する。胚子で発現される SDH mRNA の大きさは、まだ明らかではな
いが、おそらくプロキシマルプロモーターから転写される 1.1 kb の mRNA であ
ると考えられる。この増加は、反転期後期直後の 1 次胚脱皮の時期まで続くが、
その後は減少する。次に、幼虫の組織形成、つまり、脂肪体の形成に伴い再び
SDH mRNA の発現量は孵化まで増加する。この幼虫組織での発現は、SDH 遺伝子の
プロキシマルプロモーターに依存している。

以上のように、SDH 遺伝子は、休眠覚醒期に卵黄細胞、胚子成長期に胚子細
胞、及び幼虫組織形成期に脂肪体細胞において発現している。一般に、遺伝子の
発現調節には、時期・組織特異的な転写因子 (シスエレメント及びトランスアク
ティングファクター) が関与していると考えられている。

休眠覚醒期での SDH 遺伝子の発現調節には、2 つの可能性が考えられる。
SDH 遺伝子の発現に、活性化因子の出現が関与している場合と抑制因子の消失が
関与している場合とである。SDH 遺伝子の発現を調節する因子の同定には、休眠

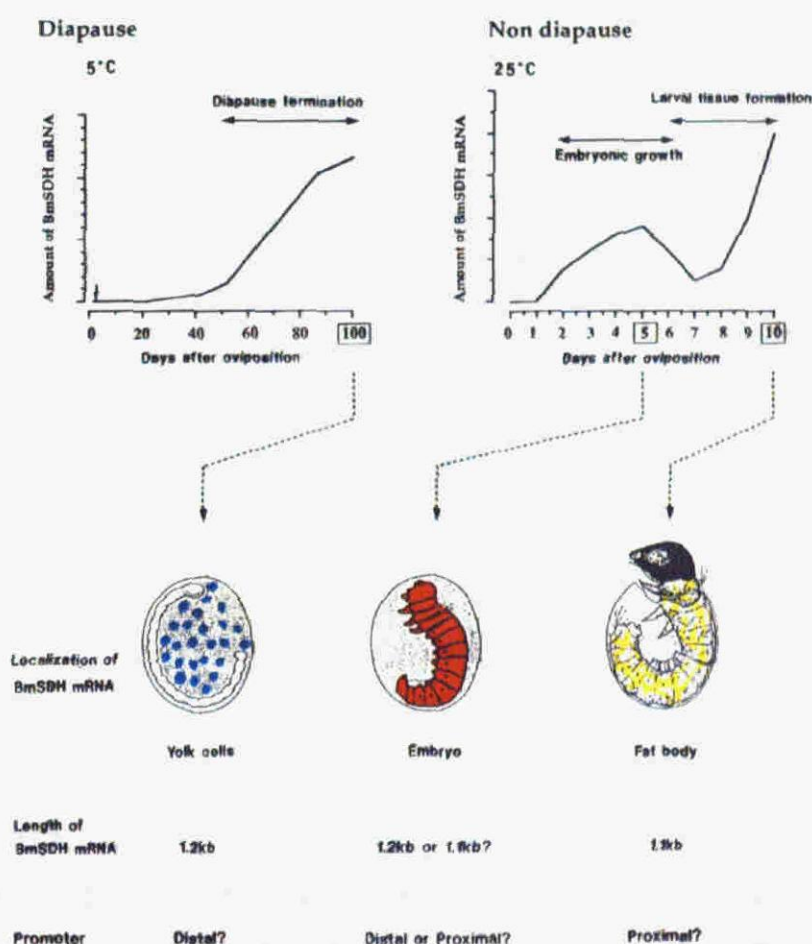


Fig. 21. Summarized results for the temporal and spatial expression of BmSDH gene in diapause and non-diapause eggs of *B. mori*. In diapause eggs, BmSDH gene is induced by chilling at 5°C which is effective to break down the diapause, and the gene expression occurs in yolk cells, indicating yolk nucleus-dependent gene expression. In non-diapause eggs at 25°C, BmSDH gene is expressed in the course of embryonic development. The occurrence of BmSDH transcript corresponds to two developmental phases, the first phase to the growth of embryo and the second phase to the formation of larval tissues. During the first or the second phase, BmSDH gene is expressed mainly in embryonic cells or fat-body cells, respectively.

維持期及び休眠覚醒期の卵からそれぞれ核タンパク質を抽出して、SDH 遺伝子の 5' 上流域に結合するタンパク質が存在するかどうかをゲルシフト法等を用いて調査する必要がある。SDH 遺伝子に結合するタンパク質が、休眠維持期の核タンパク質から検出された場合には SDH 遺伝子の発現に抑制因子が関与することが、あるいは休眠覚醒期の核タンパク質から検出された場合には活性化因子が関与することが考えられる。SDH 遺伝子の発現調節機構に関わる転写因子を明らかにすることによって、これまで全く明らかにされていなかった 5 °C による休眠覚醒に至る分子レベルでの機構が順次明らかになるものと考えられる。

胚子発育に伴う SDH 遺伝子の発現の特徴は、胚子成長期から幼虫組織形成期への発現の切り替えが起こることである。SDH 遺伝子の発現のこの切り替えは、時期・組織特異的な転写因子によって調節されていると考えられる。このような転写因子を明らかにすることによって、胚子発育における幼虫組織分化の開始機構を明らかにすることができるものと考えられる。

カイコ休眠卵においては、SDH 遺伝子の発現は 5 °C 冷蔵によって開始されるが、一般に、多くの生物でも外部環境の変化〔温度 (Schlesinger, 1990)、化学物質 (Marguet and Lauquin, 1986)、嫌気状態 (Sach et al., 1980; Dolferus et al., 1985)、浸透圧 (Gutierrez et al., 1989)等〕によって特異的なタンパク質が誘導されることが知られている。低温による cold shock protein の誘導は、大腸菌 (Jones et al., 1987; Goldstein et al., 1990)、酵母 (Kondo and Inouye, 1991; Kondo et al., 1992)、粘菌 (Maniak and Nellen, 1988; Muller-Taubenberger et al., 1988)、高等植物 (Guy, 1990; Thomashow, 1990) で知られているが、いずれの場合も数時間のうちに誘導されることが明かにされている。外部環境の変化によって誘導されるタンパク質の中で最もよく知られているのは、heat shock protein (HSP) で、温度と遺伝子発現の関係から詳細な研究がなされている (Sorger, 1991)。しかし、環境刺激がいかにして HSP 遺伝子の発現に作用するのか、また温度センサーは何か、についてはまだ明らかにされていない (VanBogelen and Neidhardt, 1990)。

カイコ休眠卵での SDH 遺伝子の発現には、5 °C の冷蔵が 40 - 50 日間必要である。従って、上記のタンパク質の誘導とは当然異なった発現調節機構が存在するものと考えられる。この長期の低温に応答した遺伝子発現は、昆虫の休眠現

象の中で、冬という比較的長い時間単位（2 - 3 カ月）に対応するために、昆虫が発生のプログラムの中で獲得して来たものであろう。また、このような長期間の低温が、生物の発育にとって必要とされるのは、昆虫の休眠に限られた現象ではなく、様々な生物種で観察される現象である。

例えば、ミズクラゲ（Aurelia aurita）は、ポリプからストロビラ、そしてエフィラへと変態する時、つまり、無性生殖から有性生殖へ移行する時には、光と 15 °C の低温を約 1 - 4 週間必要とする（柿沼、1975；楠元・高木、1978；加藤、1986）。ムツノエダアシクラゲ（Cladonema uchidai）のポリプは、10 - 13 °C の低温に 2 - 3 カ月間冷蔵することにより、ポリプの中央部に水母が形成され始める（加藤、1978）。また、エヒドラ（Pelmatohydra robusta）が有性生殖をするための雌雄分化を開始するためには、18 °C から 10 °C、18 °C から 24 °C へのような急激な温度差と、低温または高温に一定期間晒すことが必要である（Pears et al., 1987）。しかし、いずれの場合においても、低温がどの様に分子レベルで作用しているかは明らかにされていない。生物の発育に必要とされる上記のような低温の作用を分子レベルで解明する上で、カイコ休眠卵での低温による SDH 遺伝子発現の分子機構を明らかにすることは、重要な意義をもつものと考えられる。

謝 辞

本研究を行うにあたり、始終変わらぬ御指導、御鞭撻を賜りました名古屋大学農学部 of 柳沼利信博士に厚くお礼申し上げます。また、研究の遂行及び本論文の作成にあたり、多くの御教示と御助言を頂戴致しました名古屋大学農学部の山下興亜教授、小林迪弘助教授に深く感謝申し上げます。研究の過程で様々な御教示と御助言を頂戴致しました名古屋大学農学部の山木昭平教授、名古屋大学理学部の郷通子教授、藤田保健衛生大学医学部の小川久光助教授、農林水産省農業生物資源研究所の佐々木卓治博士、名古屋大学農学部の金山喜則博士に深く感謝申し上げます。また、DNA 自動シーケンサー及びイメージアナライザーを使用するにあたって御助言を頂くとともに、本論文を親しく御高覧頂きました名古屋大学農学部の渡辺昭教授に深謝致します。さらに、本論文を親しく御高覧頂きました名古屋大学農学部の宮田正教授、ならびに実験の過程で御協力頂いた名古屋大学農学部の楠原清技官、養蚕学講座の皆様心からお礼申し上げます。

引用文献 (和文)

- 古沢壽治・梁元鎮 (1991) カイコの成長・変態に伴う遊離糖類の変動－特に1～2 齢幼虫と蛹卵巣でのソルビトール蓄積－. 京工織大報 15, 11-20.
- 菱田智昭 (1993) カイコ体液中セルピン型インヒビターの遺伝子構造と発現調節機構に関する研究. 修士論文. 名古屋大学大学院農学研究科.
- 柿沼好子 (1975) クラゲ. 岩波講座 現代生物科学 10 組織と器官 I (飯島宗一・入沢宏・岡田節人編). 岩波書店、東京. pp. 75-96.
- 加藤憲一 (1978) クラゲの変態. 変態の生物学 (日本発生生物学会編). 岩波書店、東京. pp. 35-63.
- 加藤憲一 (1986) 人工海水で腔腸動物を飼育する. 採集と飼育 48, 104-106.
- 小林迪弘・柳沼利信 (1986) ソルビトールおよびたんぱく質代謝調節による蚕卵の長期保存. 家蚕卵の長期保存に関する研究 (代表、山下興亜). 科研費報、pp. 21-30.
- 楠元守・高木勝行 (1978) ミズクラゲ. 採集と飼育 40, 498-501.
- 桑名寿一・高見丈夫 (1957) 昆虫類 Insecta. 無脊椎動物発生学 (久米又三・団勝磨編). 培風館、東京. pp. 287-231.
- 大槻良樹 (1979) 蚕種. 総合蚕糸学 (日本蚕糸学会編). 日本蚕糸新聞社、東京. pp. 156-173.
- 大槻良樹・森精・神田俊男・北沢敏男 (1976) カイコの胚脱皮に関する形態学的観察. 日蚕雑 45, 225-231.
- 高見丈夫 (1969) 蚕種総論. 全国蚕種協会、東京.
- 外山亀太郎 (1909) 蚕種論. 丸山舎、東京.
- 梅谷与七郎 (1929) 蚕種学. 弘道館、東京.
- 渡辺勘次 (1924) 家蚕の化性に関する研究. 蚕試報 6, 411-455.
- 柳沼利信・山下興亜 (1977) 家蚕卵の休眠開始・維持・覚醒にともなうグリコーゲン、ソルビトール、グリセロール量の変動. 日蚕雑 46, 5-10.
- 山本昭平 (1984) 果実への同化産物の集積のしくみ. 遺伝 38, 9-14.
- 山下興亜 (1984) 成長と変態. 家蚕生化学 (伊藤智夫編著). 裳華房、東京. pp. 213-248.

山下興亜（1992）昆虫の変態・休眠とホルモン．新ファール昆虫記（日本化学会編）．大日本図書、東京．pp. 15-44.

山下興亜（1993）催眠薬で休眠．卵休眠とホルモンの正体．シルクのはなし（小林勝利・鳥山國士編）．技報堂、東京．pp. 58-63.

山下興亜・茅野春雄（1984）休眠．家蚕生化学（伊藤智夫編著）．裳華房、東京．pp. 249-279.

(英 文)

- Adams, D. S., Eickbush, T. H., Herrera, R. J. and Lizardi, P. M. (1986) A highly reiterated family of transcribed oligo(A)-terminated, interspersed DNA elements in the genome of Bombyx mori. J. Mol. Biol. 187, 465-478.
- Andrewartha, H. G. (1952) Diapause in relation to the ecology of insects. Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc. 27, 50-107.
- Aronson, B. D. and Somerville, R. L. (1989) The primary structure of Escherichia coli L-threonine dehydrogenase. J. Biol. Chem. 264, 5226-5232.
- Benoist, C., O'Hare, K., Breathnach, R. and Chambon, P. (1980) The ovalbumin gene-sequence of putative control regions. Nucl. Acids Res. 8, 127-142.
- Benton, W. E. and Davis, R. W. (1977) Screening λ gt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. Science 196, 180-182.
- Benyajati, C., Spoerel, N., Haymerle, H. and Ashburner, M. (1983) The messenger RNA for alcohol dehydrogenase in Drosophila melanogaster differs in its 5' end in different developmental stages. Cell 33, 125-133.
- Birnstiel, M. L., Busslinger, M. and Strub, K. (1985) Transcription termination and 3' processing: the end is in site! Cell 41, 349-359.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.

- Branden, C.-I., Eklund, H., Cambillau, C. and Pryor, A. J. (1984) Correlation of exons with structural domains in alcohol dehydrogenase. EMBO J. 3, 1307-1310.
- Buning, J. (1980) RNA synthesis during early embryogenesis of mass cultured highly synchronized coleopteran embryos. Wilhelm Roux's Arch. 188, 215-224.
- Capco, D. G. and Jeffery, W. R. (1978) Differential distribution of poly(A)-containing RNA in the embryonic cells of Oncopeltus fasciatus. Dev. Biol. 67, 137-151.
- Cavener, D. R. (1987) Comparison of the consensus sequence flanking translation start site in Drosophila and vertebrates. Nucl. Acids Res. 15, 1353-1362.
- Chang, C. and Meyerowitz, E. M. (1986) Molecular cloning and DNA sequence of the Arabidopsis thaliana alcohol dehydrogenase gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 1408-1412.
- Cherbas, L., Lee, K. and Cherbas, P. (1991) Identification of ecdysone response elements by analysis of the Drosophila Eip28/29 gene. Genes Devel. 5, 120-131.
- Chino, H. (1957) Conversion of glycogen to sorbitol and glycerol in the diapause egg of the Bombyx silkworm. Nature 180, 606-607.
- Chino, H. (1958) Carbohydrate metabolism in the diapause egg of the silkworm Bombyx mori.- II Conversion of glycogen into sorbitol and glycerol during diapause. J. Insect Physiol. 2, 1-12.
- Christensen, U., Tuchsén, E. and Andersen, B. (1975) Initial velocity and product inhibition studies on L-iditol:NAD oxidoreductase. Acta Chem. Scand. B, 29, 81-87.

- Cole, K. D. and Wells, M. A. (1990) A comparison of adult and larval Manduca sexta apolipophorin-III. Insect Biochem. 20, 373-380.
- Cole, K. D., Smith, A. F. and Wells, M. A. (1990) The structure of the apolipophorin-III gene from Manduca sexta. Insect Biochem. 20, 381-388.
- Coulon, M. (1988) Comparative changes of ecdysteroid content in Bombyx mori eggs in diapausing and non-diapausing development. Comp. Biochem. Physiol. 89A, 503-509.
- Dallman, M. J. and Porter, A. C. G. (1991) Semi-quantitative PCR for the analysis of gene expression. In PCR, A Practical Approach (ed. by McPherson, M. J., Quirke, P. and Taylor, G. R.), pp. 215-224. Oxford University Press, Oxford.
- Davis, B.J. (1964) Disk electrophoresis. II. Method and application to human serum protein. Ann. NY Acad. Sci. 121, 404-427.
- Dean, R. L., Locke, M. and Collins, J. V. (1985) Structure of the fat body. In Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology (ed. by Kerkut, G. A. and Gilbert, L. I.), Vol. 3, pp. 155-210. Pergamon Press, New York.
- Delaney, S. J., Smith, D. F., McClelland, A., Sunkel, C. and Glover, D. M. (1986) Sequence conservation around the 5' ends of the larval serum protein 1 genes of Drosophila melanogaster. J. Mol. Biol. 189, 1-11.
- Dennis, E. S., Gerlach, W. L., Pryor, A. J., Bennetzen, J. L., Inglis, A., Llewellyn, D., Sachs, M. M., Ferl, R. J. and Peacock, W. J. (1984) Molecular analysis of the alcohol dehydrogenase (Adh1) gene of maize. Nucl. Acids Res. 12,

3983-4000.

- Dennis, E. S., Sachs, M. M., Gerlach, W. L., Finnegan, E. J. and Peacock, W. J. (1985) Molecular analysis of the alcohol dehydrogenase 2 (Adh2) gene of maize. Nucl. Acids Res. 13, 727-743.
- Dolferus, R., Marbaix, G. and Jacobs, M. (1985) Alcohol dehydrogenase in Arabidopsis: analysis of the induction phenomenon in plantlets and tissue cultures. Mol. Gen. Genet. 199, 256-264.
- Eklund, H., Horjales, E., Jornvall, H., Branden, C.-I. and Jeffery, J. (1985) Molecular aspects of functional differences between alcohol and sorbitol dehydrogenases. Biochemistry 24, 8005-8012.
- Eklund, H., Nordstrom, B., Zeppezauer, E., Soderlund, G., Ohlsson, I., Boiwe, T., Solderberg B., Tapia O. and Branden C.-I. (1976) Three-dimensional structure of horse liver alcohol dehydrogenase at 2.4 A resolution. J. Mol. Biol. 102, 27-59.
- Eklund, H., Samama, J.-P., Wallen, L., Branden, C.-I., Akeson, A. and Jones, T. A. (1981) Structure of a triclinic complex of horse liver alcohol dehydrogenase at 2.9 A resolution. J. Mol. Biol. 146, 561-587.
- Fujii, T., Sakurai, H., Izumi, S. and Tomino, S. (1989) Structure of the gene for the arylphorin-type storage protein SP2 of Bombyx mori. J. Biol. Chem. 264, 11020-11025.
- Fujiwara, Y. and Yamashita, O. (1991) A larval serum protein of the silkworm, Bombyx mori: cDNA sequence and developmental specificity of the transcript. Insect Biochem. 21, 735-742.

- Fujiwara, Y. and Yamashita, O. (1992) Gene structure of Bombyx mori larval serum protein (BmLSP). Insect Mol. Biol. 1, 63-69.
- Fukuda, S. (1951) The production of diapause eggs by transplanting the suboesophageal ganglion in the silkworm. Proc. Jap. Acad. 27, 672-677.
- Fukuda, S. (1952) Function of the pupal brain and suboesophageal ganglion in the production of non-diapause and diapause eggs in the silkworm. Annt. Zool. Japon. 25, 149-155.
- Gaut, B. S. and Clegg, M. T. (1991) Molecular evolution of alcohol dehydrogenase 1 in members of the grass family. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 2060-2064.
- Gharib, B., Legay, J.-M. and Reggi, M. D. (1981) Potentiation of developmental abilities of diapausing eggs of Bombyx mori by 20-hydroxyecdysone. J. Insect Physiol. 27, 711-713.
- Gharib, B., Reggi, D. M., Connat, J.-L. and Chaix, J.-C. (1983) Ecdysteroid and juvenile hormone changes in Bombyx mori eggs, related to the initiation of diapause. FEBS Letters 160, 119-123.
- Go, M. (1981) Correlation of DNA exonic regions with protein structural units in haemoglobin. Nature 291, 90-92.
- Go, M. (1983) Modular structural units, exons, and function in chicken lysozyme. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1964-1968.
- Goldstein, J., Pollitt, N. S. and Inouye, M. (1990) Major cold shock protein of Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 283-287.
- Gutierrez, C., Ardourel, M., Bremer, E., Middendorf, A., Boos, W. and Ehmann, U. (1989) Analysis and DNA sequence of the

- osmoregulated treA gene encoding the periplasmic trehalase of Escherichia coli K12. Mol. Gen. Genet. 217, 347-354.
- Guy, C. L. (1990) Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 41, 187-223.
- Hasegawa, K. (1951) Studies on the voltinism in the silkworm, Bombyx mori L., with special reference to organs containing determination of voltinism (a preliminary note). Proc. Jap. Acad. 27, 667-671.
- Hasegawa, K. (1957) The diapause hormone of the silkworm, Bombyx mori. Nature 179, 1300-1301.
- Hayakawa, Y. and Chino, H. (1982a) Temperature-dependent activation or inactivation of glycogen phosphorylase and synthesis of fat body of the silkworm Philosamia cynthia: the possible mechanism of the temperature-dependent interconversion between glycogen and trehalose. Insect Biochem. 12, 361-366.
- Hayakawa, Y. and Chino, H. (1982b) Phosphofructokinase as a possible key enzyme regulating glycerol or trehalose accumulation in diapausing insects. Insect Biochem. 12, 639-642.
- Hochachka, P.W. and Somero, G.N. (1984) Off-switches in metabolism: from anhydrobiosis to hibernation. In Biochemical Adaptation, pp. 204-249, Princeton University Press, New Jersey.
- Hoffmann, J. A. and Lagueux, M. (1985) Endocrine aspects of embryonic development in insects. In Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology (ed. by Kerkut, G.

- A. and Gilbert, L. I.), Vol. 1, pp. 435-460. Pergamon Press, New York.
- Hovemann, B. and Galler, R. (1982) Vitellogenin in Drosophila melanogaster: a comparison of the YPI and YPII genes and their transcription products. Nucl. Acids Res. 10, 2261-2274.
- Hung, M.-C. and Wensink, P. C. (1981) The sequence of the Drosophila melanogaster gene for yolk protein 1. Nucl. Acids Res. 9, 6407-6419.
- Hung, M.-C. and Wensink, P. C. (1983) Sequence and structure conservation in yolk proteins and their genes. J. Mol. Biol. 164, 481-492.
- Ichimura, S. and Mita, K. (1992) Essential role of duplications of short motif sequence in the genomic evolution of Bombyx mori. J. Mol. Evol. 35, 123-130.
- Ikeda, M., Yaginuma, T., Kobayashi, M. and Yamashita, O. (1991) cDNA cloning, sequencing and temporal expression of the protease responsible for vitellin degradation in the silkworm, Bombyx mori. Comp. Biochem. Physiol. 99B, 405-411.
- Imai, K., Konno, T., Nakazawa, Y., Komiya, T., Isobe, M., Koga, K., Goto, T., Yaginuma, T., Sakakibara, K., Hasegawa, K., and Yamashita, O. (1991) Isolation and structure of diapause hormone of the silkworm, Bombyx mori. Proc. Jap. Acad. 67, Ser. B, 98-101.
- Jeffery, J., Cederlund, E. and Jornvall, H. (1984) Sorbitol dehydrogenase. The primary structure of the sheep-liver enzyme. Eur. J. Biochem. 140, 7-16.
- Jeffery, J. and Jornvall, H. (1988) Sorbitol dehydrogenase.

Adv. Enzymol. 61, 47-106.

Johnston-Dow, L., Mardis, E., Heiner, C. and Roe, B. A. (1987)
Optimized methods for fluorescent and radiolabeled DNA
sequencing. BioTechniques 5, 754-765.

Jones, P. G., VanBogelen, R. A. and Neidhardt, F. C. (1987)
Induction of proteins in response to low temperature in
Escherichia coli. J. Bacteriol. 169, 2092-2095.

Kai, H., Kawai, T. and Kawai, K. (1987) A time-interval
activation of esterase A₄ by cold. Relation to the
termination of embryonic diapause in the silkworm Bombyx
mori. Insect Biochem. 17, 367-372.

Karlsson, C., Jornvall, H. and Hoog, J.-O. (1991) Sorbitol
dehydrogenase: cDNA coding for the rat enzyme. Variations
within the alcohol dehydrogenase family independent of
quaternary structure and content. Eur. J. Biochem. 198, 761-
765.

Karlsson, C., Maret, W., Auld, D.S., Hoog, J.-O. and Jornvall, H.
(1989) Variability within mammalian sorbitol dehydrogenases.
The primary structure of the human liver enzyme. Eur. J.
Biochem. 186, 543-550.

Kawooya, J. K. and Law, J. H. (1983) Purification and properties
of microvitellogenin of Manduca sexta. Role of juvenile
hormone in appearance and uptake. Biochem. Biophys. Res.
Commun. 117, 643-650.

Kobayashi, M., Hashimoto, Y., Seki, H. and Watanabe, H. (1988)
In vitro translation of RNA from the midgut of the silkworm,
Bombyx mori, infected with a Densonucleosis Virus. J.
Invertebr. Pathol. 52, 259-267.

- Kobayashi, A., Hirai, H., Kubo, T., Ueno, K., Nakanishi, Y. and Natori, S. (1989) Cloning and in vitro transcription of the Sarcophaga lectin gene. Biochim. Biophys. Acta 1009, 244-250.
- Kogure, M. (1933) The influence of light and temperature on certain characters of the silkworm, Bombyx mori. J. Dept. Agr. Kyushu Imp. Univ. 4, 1-93.
- Kondo, K. and Inouye, M. (1991) TIP 1, a cold shock-inducible gene of Sacchromyces cerevisiae. J. Biol. Chem. 266, 17537-17544.
- Kondo, K., Kowalski, L. R. Z. and Inouye, M. (1992) Cold shock induction of yeast NSR1 protein and its role in pre-rRNA processing. J. Biol. Chem. 267, 16259-16265.
- Kunkel, J. G. and Nordin, J. H. (1985) Yolk proteins. In Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology (ed. by Kerkut, G. A. and Gilbert, L. I.), Vol. 1, pp. 83-111, Pergamon Press, Oxford and Elmsford, New York.
- Kurata, S., Koga, K. and Sakaguchi, B. (1979) Differential changes in nucleolar size and ribosomal RNA synthesis during diapause break by prolonged chilling in Bombyx eggs. J. Insect Physiol. 25, 115-118.
- Kusuda, J., Tazima, Y., Onimaru, K., Ninaki, O. and Suzuki, Y. (1986) The sequence around the 5' end of the fibroin gene from the wild silkworm, Bombyx mandarina, and comparison with that of the domestic species, B. mori. Mol. Gen. Genet. 203, 359-364.
- Kylsten, P., Samakovlis, C. and Hultmark, D. (1990) The cecropin

- locus in Drosophila; a compact gene cluster involved in the response to infection. EMBO J. 9, 217-224.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.
- Lawrence, P. A. (1992) The Making of a Fly, Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Lindstad, R. I., Hermannsen, H. and McKinley-McKee, J. S. (1992) The kinetic mechanism of sheep liver sorbitol dehydrogenase. Eur. J. Biochem. 210, 641-647.
- Lipman, D. J. and Pearson W. R. (1985) Rapid and sensitive protein similarity searches. Science 227, 519-524.
- Llewellyn, D. J., Finnegan, E. J., Ellis, J. G., Dennis E. S. and Peacock, W. J. (1987) Structure and expression of an alcohol dehydrogenase 1 gene from Pisum sativum (cv. "greenfeast"). J. Mol. Biol. 195, 115-123.
- Maniak, M. and Nellen, W. (1988) A developmentally regulated membrane protein gene in Dictyostelium discoideum is also induced by heat shock and cold shock. Mol. Cell. Biol. 8, 153-159.
- Maret, W. and Auld, D. S. (1988) Purification and characterization of human liver sorbitol dehydrogenase. Biochemistry 27, 1622-1628.
- Marguet, D. and Lauquin, G. J -M. (1986) The yeast SRP gene: positive modulation by glucose of its transcriptional expression. Biochem. Biophys. Res. Commun. 138, 297-303.
- Matsumoto, N., Nakanishi, Y. and Natori, S. (1986) Homologies of nucleotide sequences in the 5'-end regions of two

developmentally regulated gene of Sarcophaga peregrina.
Nucl. Acids Res. 14, 2685-2884.

Matsutani, K. and Sonobe, H. (1987) Control of diapause-factor secretion from the suboesophageal ganglion in the silkworm, Bombyx mori: the roles of the protocerebrum and tritocerebrum. J. Insect Physiol. 33, 279-285.

McKight, G. L., Kato, H., Upshall, A., Parker, M. D., Saari, G. and O'Hara, P. J. (1985) Identification and molecular analysis of a third Aspergillus nidulans alcohol dehydrogeanse gene. EMBO J. 4, 2093-2099.

Miya, K., Kurihara, M. and Tanimura, I. (1972) Changes of fine structures of the serosa cell and the yolk cell during diapause and post-diapause development in the silkworm, Bombyx mori L. J. Fac. Agric. Iwate Univ. 11, 51-87.

Mori, S., Izumi, S. and Tomino, S. (1991a) Structure and organization of major plasma protein genes of the silkworm Bombyx mori. J. Mol. Biol. 218, 7-12.

Mori, S., Izumi, S. and Tomino, S. (1991b) Complete nucleotide sequences of major plasma protein genes of Bombyx mori. Biochim. Biophys. Acta 1090, 129-132.

Mounier, N. and Prudhome, J. C. (1986) Isolation of actin genes in Bombyx mori: the coding sequence of a cytoplasmic actin gene expressed in the silk gland is interrupted by a single intron in an unusual position. Biochimie. 68, 1053-1061.

Mount, S. M. (1982) A catalogue of splice junction sequences. Nucl. Acides Res. 10, 459-472.

Muller-Taubenberger, A., Hagmann, J., Noegel, A. and Gerisch, G. (1988) Ubiquitin gene expression in Dictyostelium is induced

- by heat and cold shock, cadmium, and inhibitors of protein synthesis. J. Cell. Sci. 90, 51-58.
- Nakagaki, M., Takei, R., Nagashima, E. and Yaginuma, T. (1991) Cell cycles in embryos of the silkworm, Bombyx mori: G₂-arrest at diapause stage. Roux's Arch. Dev. Biol. 200, 223-229.
- Ozyhar, A., Strangmann-Diekmann, M., Kiltz, H.-H. and Pongs, O. (1991) Characterization of a specific ecdysteroid receptor-DNA complex reveals common properties for invertebrate and vertebrate hormone-receptor/DNA interactions. Eur. J. Biochem. 200, 329-335.
- Park, K. E. and Yoshitake, N. (1970) Function of the embryo and the yolk cells in diapause of the silkworm egg (Bombyx mori). J. Insect Physiol. 16, 2223-2239.
- Pears, V., Pears, J., Buchsbaum, M. and Buchsbaum, R. (1987) Living Invertebrates, Boxwood Press, Pacific Grove.
- Pelham, H. (1985) Activation of heat-shock genes in eukaryotes. Trens Genet. 1, 31-35.
- Reichhart, J.-M., Meister, M., Dimarcq, J.-L., Zachary, D., Hoffmann, D., Ruiz, C., Richards, G. and Hoffmann, J. A. (1992) Insect immunity: developmental and inducible activity of the Drosophila dipterecin promoter. EMBO J. 11, 1469-1477.
- Sachs, M. M., Freeling, M. and Okimoto, R. (1980) The anaerobic proteins of maize. Cell, 20, 761-767.
- Sakurai, H., Izumi, S. and Tomino, S. (1989) Nuclear proteins bind to the 5' flanking region of storage protein gene of Bombyx mori. Devlop. Growth Differ. 31, 384.

- Sakurai, H., Fujii, T., Izumi, S. and Tomino, S. (1988) Structure and expression of gene coding for sex-specific storage protein of Bombyx mori. J. Biol. Chem. 263, 7876-7880.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sander, K., Guzeit, H. O. Jackle, H. (1985) Insect embryogenesis: morphology, physiology, genetical and molecular aspects. In Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology (ed. by Kerkut, G. A. & Gilbert, L. I.), Vol. 1, pp. 319-385, Pergamon Press, Oxford and Elmsford, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467.
- Sato, Y., Nakazawa, Y., Menjo, N., Imai, K., Komiya, T., Saito, H., Shin, M., Ikeda, M., Sakakibara, K., Isobe, M. and Yamashita, O. (1992) A new diapause hormone molecule of the silkworm, Bombyx mori. Proc. Jap. Acad. 68, Ser. B, 75-79.
- Sato, Y. and Yamashita, O. (1991) Structure and expression of a gene coding for egg-specific protein in the silkworm, Bombyx mori. Insect Biochem. 21, 495-505.
- Schibler, U. and Sierra, F. (1987) Alternative promoters in developmental gene expression. Ann. Rsv. Genet. 21, 237-257.
- Schlesinger, M. J. (1990) Heat shock proteins. J. Biol. Chem. 265, 12111-12114.
- Shuster, D. M., Buchman, G. W. and Rashtchain, A. (1992) A simple and efficient method for amplification of cDNA ends using 5'

- RACE. Focus 14, 46-52.
- Smith, M. G. (1962) Polyol dehydrogenase. 4. Crystallization of the L-iditol dehydrogenase of sheep liver. Biochem. J. 83, 135-144.
- Sonobe, H. (1989) Studies on embryonic diapause in the pnd mutant of the silkworm, Bombyx mori: characterization of protein synthesis during early development. Zool. Sci. 6, 515-521.
- Sonobe, H. and Odake, H. (1986) Studies on embryonic diapause in the pnd mutant of the silkworm, Bombyx mori. V. Identification of a pnd gene-specific protein. Roux's Arch. Dev. Biol. 195, 229-235.
- Sorger, P. K. (1991) Heat shock factor and the heat shock response. Cell 65, 363-366.
- Storey, K. B. (1982) Phosphofructokinase from the overwintering gall fly larva, Eurosta solidaginis: control of cryoprotectant polyol synthesis. Insect Biochem. 12, 501-505.
- Storey, K. B. and Storey, J. M. (1981) Biochemical strategies of overwintering in the gall fly larva, Eurosta solidaginis: effect of low temperature acclimation on the activities of enzymes of intermediary metabolism. J. Comp. Physiol. B 144, 191-199.
- Storey, K. B. and Storey, J. M. (1988) Freeze tolerance in animals. Physiol. Rev. 68, 27-84.
- Sun, S.-C., Lindstrom, I., Lee, J.-Y. and Faye, I. (1991) Structure and expression of the attacin genes in Hyalophora cecropia. Eur. J. Biochem. 196, 247-254.
- Suzuki, K., Fujita, M. and Miya, K. (1983) Changes in

- supercooling point of the silkworm eggs. J. seric. Sci. Jpn. 52, 185-190.
- Thomashow, M. F. (1990) Molecular genetics of cold acclimation in higher plants. Adv. Genet. 28, 99-131.
- Towbin, H., Staehelin, R. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354.
- Trick, M., Dennis, E. S., Edwards, K. J. R. and Peacock, W. J. (1988) Molecular analysis of the alcohol dehydrogenase gene family of barley. Plant Mol. Biol. 11, 147-160.
- Ueda, H. and Hirose, S. (1990) Identification and purification of Bombyx mori homologue of FTZ-F1. Nucl. Acids Res. 18, 7229-7234.
- Ueda, H. and Hirose, S. (1991) Defining the sequence recognized with BmFTZ-F1, a sequence specific DNA binding factor in the silkworm, Bombyx mori, as revealed by direct sequencing of bound oligonucleotides and gel mobility shift competition analysis. Nucl. Acids Res. 19, 3689-3693.
- VanBogelen, R. A. and Neidhardt, F. C. (1990) Ribosomes as sensors of heat and cold shock in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 5589-5593.
- Wang, X.-Y., Cole, K. D. and Law, J. H. (1989) The nucleotide sequence of a microvitellogenin encoding gene from the tobacco hornworm, Manduca sexta. Gene 80, 259-268.
- Willott, E., Wang, X.-Y. and Wells, M. A. (1989) cDNA and gene sequence of Manduca sexta arylphorin, an aromatic amino acid-rich larval serum protein. J. Biol. Chem. 264, 19052-

19059.

Wilson, E. T., Condliffe, D. P. and Sprague, K. U. (1988)

Transcriptional properties of BmX, a moderately repetitive silkworm gene that is an RNA polymerase III template. Mol. Cell. Biol. 8, 624-631.

Xanthopoulos, K. G., Lee, J.-Y., Gan, R., Kockum, K., Faye, I.

and Boman, H. G. (1988) The structure of the gene for cecropin B, an antibacterial immune protein from Hyalophora cecropia. Eur. J. Biochem. 172, 371-376.

Yaginuma, T. and Yamashita, O. (1978) Polyol metabolism related to diapause in Bombyx eggs: different behaviour of sorbitol from glycerol during diapause and post-diapause. J. Insect Physiol. 24, 347-354.

Yaginuma, T. and Yamashita, O. (1979) NAD-dependent sorbitol dehydrogenase activity in relation to the termination of diapause in eggs of Bombyx mori. Insect Biochem. 9, 547-553.

Yaginuma, T. and Yamashita, O. (1980) The origin of free glycerol accumulated in diapause eggs of Bombyx mori. Physiol. Entomol. 5, 93-97.

Yaginuma, T. and Yamashita, O. (1991) Does an enzyme activity capable of phosphorylating sorbitol control utilization of sorbitol at the termination of diapause in eggs of the silkworm, Bombyx mori ? Comp. Biochem. Physiol. 98B, 135-141.

Yaginuma, T, Kobayashi, M. and Yamashita, O. (1990a) Distinct effects of different low temperatures on the induction of NAD-sorbitol dehydrogenase activity in diapause eggs of the silkworm, Bombyx mori. J. Comp. Physiol. B 160, 277-285.

- Yaginuma, T., Kobayashi, M. and Yamashita, O. (1990b) Effects of low temperatures on NAD-sorbitol dehydrogenase activity and morphogenesis in non-diapause eggs of the silkworm, Bombyx mori. Comp. Biochem. Physiol. 97B, 495-506.
- Yamaki, S. (1980) Properties and functions of sorbitol-6-phosphate dehydrogenase, sorbitol dehydrogenase and sorbitol oxidase in fruit and cotyledon of apple (Malus pumila Mill. var. domestica Schneid.) J. Japan. Soc. Hort. Sci. 49, 429-434.
- Yamashita, O. and Hasegawa, K. (1967) The effect of the diapause hormone on the trehalase activity in pupal ovaries of the silkworm (a preliminary note). Proc. Jap. Acad. 43, 547-551.
- Yamashita, O. and Hasegawa, K. (1985) Embryonic diapause. In Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology (ed. by Kerkut G. A. and Gilbert L.I.), vol. 1, 407-434.
- Yamashita, O. and Suzuki, K. (1991) Roles of morphogenic hormones in embryonic diapause. In Morphogenetic Hormones of Arthropods (ed. by Gupta, A. P.), Vol. 3, pp. 81-128, Rutgers, University Press, New Jersey.
- Yamashita, O. and Yaginuma, T. (1991) Silkworm eggs at low temperatures: Implications for sericulture. In Insects at Low Temperature (ed. by Lee R. E. Jr. and Delinger D. L.), pp. 424-445, Chapman and Hall, New York.
- Yamashita, O., Suzuki, K. and Hasegawa, K. (1975) Glycogen phosphorylase activity in relation to diapause initiation in Bombyx eggs. Insect Biochem. 5, 707-718.
- Yamashita, O., Yaginuma, T. and Hasegawa, K. (1981) Hormonal and

metabolic control of egg diapause of the silkworm, Bombyx mori (Lepidoptera: Bombycidae). Ent. Gen. 7, 195-211.

Yan, Y. L., Kunert, C. J. and Postlethwait, J. H. (1987) Sequence homologies among the three yolk polypeptide (Yp) genes in Drosophila melanogaster. Nucl. Acids Res. 15, 67-85.

Ziegler, R., Ashida, M., Fallon, A. M., Wimer, L. T., Wyatt, S. S. and Wyatt, G. R. (1979) Regulation of glycogen phosphorylase in fat body of Cecropia silkmoth pupae. J. Comp. Physiol. 131, 321-332.

報文目録

1. Niimi, T. and Yaginuma, T. (1992) Biosynthesis of NAD-sorbitol dehydrogenase is induced by acclimation at 5°C in diapause eggs of the silkworm, Bombyx mori. Comp. Biochem. Physiol. 102B, 169-173.
2. Niimi, T., Yamashita, O. and Yaginuma, T. (1992) Activity of NAD-sorbitol dehydrogenase is caused by biosynthesis of enzyme protein in diapause and non-diapause eggs of the silkworm, Bombyx mori. Comp. Biochem. Physiol. 103B, 657-661.
3. Niimi, T., Yamashita, O. and Yaginuma, T. (1993) A cold-inducible Bombyx gene encoding a protein similar to mammalian sorbitol dehydrogenase. Yolk nuclei-dependent gene expression in diapause eggs. Eur. J. Biochem. (in press)
4. Niimi, T., Yamashita, O. and Yaginuma, T. (1993) Developmental profile of the gene expression of a Bombyx homolog of mammalian sorbitol dehydrogenase during embryogenesis in non-diapause eggs. Comp. Biochem. Physiol. B. (in press)