

カイコ羽化ホルモンの精製・単離と  
遺伝子に関する研究

上 遠 岳 彦

①

カイコ羽化ホルモンの精製・単離と

遺伝子に関する研究

上遠 岳彦

## 目次

	ページ
緒言	1
第一章 カイコ羽化ホルモンの精製と単離	
第1節 生物検定法	
1-1 カイコの羽化リズム	12
1-2 生物検定法	12
1-3 考察	14
第2節 蛹頭部からの羽化ホルモンの精製と単離	18
2-1 EHの部分精製	19
2-2 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いたEHの単離	25
2-3 アミノ酸配列分析	26
2-4 まとめ及び考察	30
第二章 カイコ羽化ホルモンの遺伝子に関する研究	
序論	33
第1節 カイコ羽化ホルモンのcDNAの解析	
1-1 mRNAの調製	34
1-2 $\lambda$ gt10 cDNAライブラリーのスクリーニング	
1-2-1 cDNAライブラリーの作製	35
1-2-2 合成DNAプローブを用いたスクリーニング	36
1-2-3 EH cDNAクローン、 $\lambda$ EH01の解析	38
1-2-4 $\lambda$ gt10ライブラリーの再スクリーニング	45
1-2-5 まとめ及び考察	47
1-3 $\lambda$ gt11 cDNAライブラリーのスクリーニング	
1-3-1 合成DNAプローブを用いたスクリーニング	49
1-3-2 PCR法を用いた $\lambda$ gt11クローンのサブクローニング	51
1-3-3 まとめ及び考察	57
1-4 プライマー伸長法によるmRNA 5'末端領域の解析	59
1-5 PCR法を用いたmRNA 5'末端領域の解析	61
1-6 まとめ及び考察	70

第2節 カイコ羽化ホルモンのゲノムDNAの解析	77
2-1 EHアミノ末端翻訳或をコードするエクソンの解析	
2-1-1 アミノ酸配列を基に設計したプローブを用いた解析	78
2-1-2 cDNA配列を基に設計したプローブを用いた解析	79
2-2 3'末端非翻訳領域の解析	87
2-3 ゲノムDNAのサザンハイブリダイゼーション	89
2-4 まとめ及び考察	91
第3節 カイコ脳内に於ける、EH遺伝子の発現と分布	
3-1 ノーザンハイブリダイゼーション	95
3-2 ホールマウント <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション	99
3-3 免疫組織化学	102
3-4 まとめ及び考察	109
総括	111
実験の部	116
謝辞	136
参考文献	138

## 緒言

生物は、生命活動を維持するために、多種多様な化学物質を高度に組織化して用いてきた。細胞内の複雑な生化学的過程は、個体レベルでの生命活動そのものを形作っており、遺伝情報を伝えるDNA、RNAは、世代を越えて、言わば、現在から未来へ向けて生命活動を組織化して行く働きを担っている。一方、生物の基本単位である細胞のレベルを越え、細胞間、或いは、個体間での、化学物質を媒体とした情報伝達も、生物に普遍的に見られる現象である。単細胞生物では、原核生物の細菌類<sup>1)</sup>、真核生物の酵母<sup>2)</sup> などから性フェロモンが見出され、多細胞生物では、各細胞間の緊密な情報伝達が、胚発生の初期の段階から欠かせないものとなっている。さらに、昆虫類など多細胞生物のあるものも、各種のフェロモンによって個体間の情報伝達を成し遂げ、時としてこれらの化学物質は、種のレベルを越えて他の生物にも情報を伝達し、生態系の複雑なシステムの一翼を担っている。

生命活動の協調的な維持に関わる、各種の化学物質の中でも、多くの多細胞生物の内分泌系で生産されるホルモンは、自らの体を構成する細胞、器官を組織化し、多様な活性を統合して行くために不可欠のものである。1889年、Mering、Minkowski は、犬の膵臓に、現在インスリンとして知られている、糖代謝に関与するホルモンの存在を確認した。それに続いて、主に脊椎動物から各種のホルモンが見出された。一方、無脊椎動物については、1922年に、ポーランドの昆虫学者Kopecが、マイマイガ (*Lymantria dispar*) を材料に用いて、脳から分泌されるホルモンによって変態が誘導されることを示した<sup>3)</sup>。これは、昆虫にもホルモンが存在することを明らかにすると共に、それまで脊椎動物でも発見されていなかった神経分泌ホ

ルモンが存在を示す、初めての報告となった。その後、多くの昆虫学者の手によって、幾つもの昆虫ホルモンが見出されてきた。

この様に昆虫ホルモンに関する研究が進展する中で、昆虫の羽化の行動にも、ホルモンが関与していることが明らかにされた。羽化は、完全変態の昆虫で、蛹皮内で成虫化が完成した後に、蛹の殻から脱出して翅を伸展させる一連の行動である(図・緒-1)。多くの昆虫で、羽化行動が自然条件下で1日のうちのある決まった時間帯に集中して起こることは古くから知られていた<sup>4)</sup>。この現象に関する科学的な研究が、1970年、TrumanとRiddiford<sup>5)</sup>によって、ヤママユガに近縁な互いに異なった羽化リズムを持つ2種の蛾、サクサン(*Antheraea pernyi*)とセクロピアサン(*Hyalophora cecropia*)を用いて始められた。この2種の蛾は、17時間明期-7時間暗期の光周期条件で飼育すると、セクロピアサンは明期開始後数時間以内に、サクサンは明期の終わり近くの時間帯に、それぞれ集中して羽化が観察される。ところが、手術によって蛹から脳を除去(除脳)すると、羽化はランダムな時刻に起こるようになり、リズムを消失する。従って、脳の働きと関係のある、ほぼ24時間のリズムを刻む体内時計(概日時計)の制御の下に、羽化行動が引き起こされると考えられた。また、脳を摘出することで脳につながる神経を切断した後、同一個体の腹部に脳を再移植すると、正常な個体とほぼ同じ羽化リズムが回復した。この結果は、羽化の指令が神経経路ではなく体液経路で、液性因子により伝達されることを示している。次に、Trumanらは、セクロピアサンの脳を、除脳したサクサンの腹部へ、サクサンの脳を、除脳したセクロピアサンの腹部へと移植する、脳の交換移植実験を行った。その結果、セクロピアサンはサクサンの、サクサンはセクロピアサンのリズムで羽化を行い、脳の交換によって、羽化リズムの交換も同時に起こることが示された。これらの一連の実験により、羽化リス

ムを支配する概日時計が脳自体に存在し、羽化行動を引き起こす液性因子が、種、或いは、属に特異的ではないことが示唆された<sup>5)</sup>。さらに、羽化直前のサクサンの脳磨砕物を、サクサンの潜成虫（成虫化の準備の整った蛹皮内成虫）に注射すると、概日リズムとは無関係に注射後1~2時間以内に羽化行動が観察された。ここに至って、脳で生産され、概日時計の支配の下に放出されて羽化行動を引き起こす作用を有する新たな昆虫ホルモンの存在が証明され、Trumanにより“羽化ホルモン（Ecdysis hormone、以下EHと略す）”という名が提唱された<sup>6)</sup>。

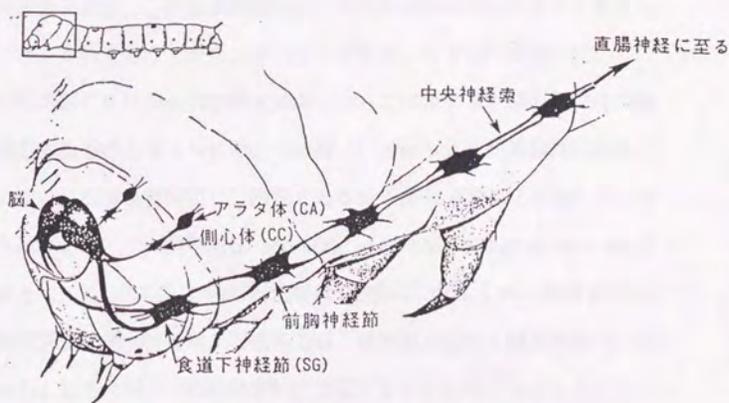
一方、カイコ（*Bombyx mori*）についても、羽化が早朝に集中して起こることは古くから知られており、早くも1910年には、坪井<sup>7)</sup>によりこの現象と光条件との関係が明らかにされている。その後も、蚕種製造の観点から、羽化リズムに関する多くの研究がなされたが<sup>8)</sup>、<sup>9)</sup>、1978年、黄色、渡辺<sup>10)</sup>、<sup>11)</sup>は、種々の光周条件下での集団羽化リズムを詳細に検討し、羽化時刻が内因性の概日時計によって制御されている可能性の高いことを報告した。また、羽化直前の蛹の脳間部中央神経分泌細胞に見出されたバラアルデヒドフクシン染色陽性物質が、羽化直後の成虫では、末端をアラタ体に開く軸索中にも見られることを観察し、この神経分泌物と思われる物質が、羽化に関与している可能性を示唆した<sup>11)</sup>。一方、Morohoshi と Fugo <sup>12)</sup> は、カイコの成虫及び蛹の頭部の抽出物を羽化直前の蛹に注射し、1~2時間以内に羽化行動が引き起こされることを報告した。さらに、エリサン（*Samia cynthia ricini*）の脳抽出物に、カイコの羽化行動を誘導する物質が存在することが確かめられた<sup>13)</sup>。これらの研究により、Trumanらがサクサン、セクロピアサンについて示したものと同様の羽化リズムとEH様ホルモンが、カイコとエリサンにも存在することが明らかになった。

EHの生理学的研究は、その後Trumanら、及び、普後らの研究グループ

により精力的に行われ、龐大な知見が得られている。以下にその一端を記す。羽化行動は、羽化の約1時間前の腹部の回転運動などの羽化前行動に始まり、蛹皮から脱出した後、翅を伸展するという一連の行動が、ある決まった行動プログラムに従って起こる<sup>14) 15)</sup>。EHは、神経系に直接作用してこの行動プログラムを開始させることが、*in vitro*での電気生理学的研究から明らかにされた<sup>16)</sup>。脳の神経分泌細胞で生産されたEHは、側心体(CC)、アラタ体(CA)などの脳後方内分泌系(rectocerebral endocrin system)(図・緒-2)へ輸送される。そして、サクサンではCCに<sup>17)</sup>、タバコスズメガ(*Manduca sexta*)では側心体-アラタ体連合(CC-CA)に<sup>18)</sup>、カイコではCAに<sup>19)</sup>一時的に蓄えられ、羽化に際して体液中に放出される。さらに、羽化のみならず、胚脱皮、幼虫脱皮、及び、蛹脱皮の際にもEHが放出され、脱皮行動を引き起こすことが、タバコスズメガで示された<sup>20)</sup>。また、幼虫脱皮し際してEHは、中央神経索を直腸神経まで延びる長い軸索を輸送され、直腸神経末端から血中に放出されることも明らかになった<sup>21)</sup>。カイコの孵化行動は羽化と同様に光周期に依存するリズムを示すが、その行動もEHの放出により引き起こされると考えられている<sup>22)</sup>。即ち、EHは、胚期から成虫になるまで、全ての脱皮行動を直接的に支配している<sup>20)</sup>。昆虫は幼虫、成虫といった各々の発生段階で、その段階に特徴的な行動パターンを持つが、その行動パターンの切り換え(behavioral switching)<sup>23)</sup>にも、EHは必須のものとして関与している<sup>24) 25)</sup>。さらにEHは、成虫翅の伸展に必要な翅の組織の可塑性<sup>22) 23)</sup>や、羽化の後に不要となる蛹の筋肉の崩壊を引き起こす<sup>6) 23)</sup>。これらの作用は、神経を介した二次的なものではなく、EHが直接働いていることが明らかになっている。即ち、神経系だけでなく、これらの組織もEHの標的となっており、単一のホルモンでありながら、多様な生理活性を示すことが次第に明らかにされてきた<sup>26)</sup>。



図・緒-1 カイコの羽化行動



図・緒-2 カイコ幼虫の中央神経系、脳後方内分泌系の模式図

左上は、拡大した位置を示す

この様な、生物学的研究の成果を基に、物質としてのEHを、化学的に、或いは、生物化学的に捉える研究が行われるようになり、多くの成果が得られている。Trumanは、セクロビアサン潜成虫<sup>27)</sup>、及び、タバコスズメガ潜蛹(蛹化脱皮直前の幼虫)<sup>28)</sup>を用いた実験から、EHの標的組織とされる腹部神経球(abdominal ganglia)中の環状グアニル酸(cGMP)含量が、EHの投与の結果、有意に上昇することを明らかにした。また、タバコスズメガ潜蛹に、cGMPを分解するホスホジエステラーゼの阻害剤、テオフィリンを投与すると脱皮行動が引き起こされること<sup>28)</sup>、さらに、潜蛹から蛹への脱皮と、潜成虫から成虫への羽化のいずれもが20-ヒドロキシエクダイソン(20-HE)投与により遅延することを発見した<sup>28)</sup>、<sup>29)</sup>。20-HEが、脱皮の際に新しいクチクラ層の形成を開始させる働きがあることは既に知られていたが、EHの作用発現にも関与しているという、新たな知見が得られたことになる。一方、普後はカイコを材料に用いた実験で、cGMPがEHと類似の活性を持ち、しかも濃度依存的に羽化誘導率が高くなることを示した<sup>30)</sup>、<sup>31)</sup>。これらのことから、タバコスズメガ、カイコの両者に於いて、羽化行動の際にEHからの情報をcGMPによって仲介する、類似した作用機構が存在するものと考えられた。その後、Trumanらは腹部神経球に注目し、EH、或いはcGMP依存的にリン酸化される分子量54,000の2種類のタンパク質を発見し<sup>32)</sup>、EGPs(EH and cGMP regulated phosphoproteins)と名付けた<sup>33)</sup>。このEGPsは羽化直前の潜成虫にも見られ、潜蛹では脳、胸部神経球、腹部神経球に、潜成虫では、後胸部神経球と腹部神経球のみ存在し、しかも極めて時期特異的に出現することを明らかにした<sup>33)</sup>。また、タンパク合成阻害剤の投与実験などから、EGPsは脱皮直前の時期に新たに合成され、EHに対して応答を示すようになることも明らかになっている<sup>34)</sup>。

上記の一連の実験から、Trumanらは、EHの作用機作に関するモデルを提出した<sup>35)</sup>。それによると、20-EHに一旦晒され、次に20-EHが減少することで機能を持つEHレセプターが出現して、EHに应答してcGMPの増加が起こるようになる。しかしこの時期には、まだ、脱皮行動は引き起こさない。そして16-20時間後にEGPsが合成され、EHに应答して脱皮行動を起こすための機構が完成する、というものである。しかし、現在まで、EGPs、或いは、EHレセプターに関するその後の報告はなされていない。

EHを精製し、その化学的本体を明らかにしようという試みは、まずTrumanらによって開始された<sup>36)</sup>。彼らは、羽化直前のタバコスズメガ頭部を抽出材料に用い、熱水抽出、アセトン分別沈澱、透析、DEAE-Cellulose、Biogel P-10、SP-Sephadex、Sephadex G-50 (2回) という8段階の精製により、1.2%の回収率で1 mg当りCC-CA 228個分の活性を示す部分精製物を得たが、単離には到らなかった。一方、筆者らの研究グループでは、カイコ成虫、或いは、蛹の頭部を抽出材料に用い、EHの精製を試みた<sup>37)</sup>。各種の精製法を検討した後<sup>38)</sup>、最終的に、18万頭のカイコ蛹頭部を抽出材料に用いて精製を行い、約10  $\mu$ gのEHの単離に成功し、N-末端から13残基のアミノ酸配列を明らかにした<sup>39) 40) 41)</sup>。この過程については、本論文、第一章に詳細に記した。しかし、単離できたEHの量が極めて微量であったため、それ以上の配列を明らかにすることはできなかった。その後、筆者の研究を引き継いだ高野らは、EH全構造の解明を目的に新たに精製を行い<sup>42)</sup>、96万頭の蛹頭部を抽出材料に用い、18段階の精製工程を経て複数の分画から合計35  $\mu$ gのEHを単離した。そして、様々な酵素処理により生じたフラグメントの構造解析の結果、N-末端から61残基のカイコEHのアミノ酸配列を決定した<sup>43)</sup>。しかし、C-末端の構造、及び、配列分析の一部に、若干の不確実な点が残された。ほぼ同じ時期に、米国の2つの研究室から

タバコスズメガのEHのアミノ酸配列が、独立に相次いで報告された<sup>44)</sup>  
45)。タバコスズメガのEHは62残基のアミノ酸から成り、カイコEHとア  
ミノ酸レベルで、80%のシーケンスホモロジーを有していた。カイコEHに  
ついては、その後の検討により、C-末端にさらにLeu<sup>62</sup>残基が存在する可能  
性が高いことがHPLCの保持時間の比較などから示されたが<sup>46)</sup>、ペプチ  
ドの配列分析からは、直接決定出来ず、遺伝子の解析による証明を待たね  
ばならなかった。

遺伝子の解析は、シグナルペプチドの配列など、精製したペプチドの配  
列分析からは得られない前駆体タンパク質の構造、或いは、レセプタータ  
ンパクなど、分子量の大きな微量のタンパク質の全配列を明らかにできる  
手法であり、タンパク質、ペプチドの構造解析法として、有力な手段の一  
つといえる。また、大腸菌などに遺伝子を導入して発現させることにより、  
多量の試料を必要とするX線結晶解析などの高次構造解析に、充分な量の  
ペプチドを得ることがができる。さらに、突然変異の導入など、タンパク工  
学的手法による構造機能相関の解析にも道を拓くものとなる。また、発現  
調節機構など、DNA配列上に記されている各種の情報を解き明かすこと  
は、遺伝子構造を解析する大きな意義の一つである。ペプチドホルモンは、  
組織特異的、或いは時期特異的に合成、分泌され、そのことによって生体  
内の複雑な内分泌的調節機構が協調的に機能することが初めて可能になる。  
従って、ペプチドホルモン遺伝子の発現調節は、ホルモンを生体内で有効  
に機能させる上で、欠くことの出来ない重要性を持っている。そこで、ペ  
プチドの精製、単離の研究に続き、筆者の所属する研究室ではカイコEH  
の遺伝子のクローニングが試みられた。以下に、研究の流れをまとめる。

カイコEH遺伝子の研究は、まず、ゲノムDNAの解析から着手された。  
佐藤<sup>47)</sup>は、カイコの幼虫から染色体DNAを抽出し、ベクターにλEMBL3

ファージを用いてゲノムライブラリーを作製し、EHのアミノ酸配列を基に合成した、3種類のオリゴヌクレオチドをプローブとしてスクリーニングを行った。そして $1.2 \times 10^4$ クローンのスクリーニングの結果、プローブとハイブリダイズするクローン、 $\lambda$ EH201を得、これを解析した。制限酵素地図作製の結果、3本のプローブはどれも同じ断片とハイブリダイズしており、サブクローニング、配列分析によって、図・緒-3に示すEHの塩基配列が明らかになった<sup>47), 48)</sup>。しかし、配列を分析したフラグメントは、EH分子の全アミノ酸配列をコードするエクソンを含まず、N-末端から5残基目に相当するAla<sup>5</sup>をコードするコドンの上流にはイントロンが存在していた。塩基配列から予想されるアミノ酸配列は、Ala<sup>5</sup>からLys<sup>61</sup>までのアミノ酸配列が、ペプチド側から決定した配列<sup>43)</sup>と完全に一致した。また、cDNAについては、田中がスクリーニングを試みたが、EH cDNAクローンは、得られなかった。これらの研究成果を踏まえ、筆者は、EH cDNAの単離と配列分析、及び、ゲノムDNAのさらなる解析を試みた。その結果、すべての翻訳領域を含む、ゲノム上の2つのエクソンの構造、及び、転写領域の全長を含むcDNAの配列<sup>49)</sup>が明らかになった。その詳細については、本論文の第二章に記した。

一方、タバコスズメガEHのゲノムDNA、及び、cDNAが、最近Horodyskiら<sup>50)</sup>によってクローニングされ、その塩基配列が明らかになった。それによると、タバコスズメガEH遺伝子は、3ヶ所のエクソンからなり、全体で7.8kbの長さを持っていた。エクソンIは、5'末端非翻訳領域の約60bpを含み、エクソンIIは、26アミノ酸から成るシグナルペプチドとEHのアミノ末端のアミノ酸4残基をコードする配列を含んでおり、エクソンIIIがEHの残りの部分をコードしている(図・緒-4)。また、遺伝子はゲノム上にシングルコピーで存在し、0.8 kbのmRNAに転写され、幼虫及び



蛹の脳で発現されていることが、in situ ハイブリダイゼーションにより確認された。また、Trumanら<sup>51)</sup>は、タバコスズメガEH遺伝子の翻訳領域のDNA断片をプローブに、各種の昆虫のゲノムDNAと、ハイブリダイゼーション実験を行った。その結果、ショウジョウバエ(Drosophila sp.)、コオロギの一種(Acheta domestica)、ネッタイシマカ(Aedes aegypti)、チャイロコメノゴミムシ(Tenebrio molitor)、及び、カイコのゲノムDNAに、タバコスズメガEH遺伝子と相同性のある配列が含まれていることが明らかになった。さらに、ショウジョウバエでは、唾液腺染色体のin situ ハイブリダイゼーションが行なわれ、第3染色体の90Bの位置にEH遺伝子の存在が認められた。また、第二章に詳述するように、筆者らの解析したカイコEHの遺伝子は、配列のみならず、エクソンの構成などの構造も、タバコスズメガEHと類似していた。筆者ら、及び、Trumanらの報告を考え合わせると、EHは昆虫類全体に保持され、昆虫類に共通に見られる全ての脱皮行動を制御している可能性が高い。また、各々の昆虫のEHは、遺伝子レベル、或いは、ペプチドレベルで相同性が高いことが予想され、EHが昆虫の生活環に欠かすことの出来ない役割を演じていることが示唆された。

以上、EHに関する研究の背景、現在の状況に関する概略を述べてきた。筆者は、これらの背景の下に、EHの精製・単離と、遺伝子に関する研究を行った。第一章には、EHを精製し、初めて単離に到った研究について述べた。第二章では、cDNA、及び、ゲノムDNAを単離し、塩基配列と構造を明らかにした研究、及び、組織化学的手法などによって得られた、EHの生体内での生合成、貯蔵、分泌機構に関する新たな知見について述べる。

## 第一章 カイコ羽化ホルモンの精製と単離

### 第1節 生物検定法

#### 1-1 カイコの羽化リズム

カイコの蛹を、25℃、16時間明期-8時間暗期(16L-8D と表す)の実験条件に置くと、羽化は蛹化後8日目或いは9日目の明期開始後1~2時間に集中して見られ、他の時間帯に羽化する個体は、殆どない(図1-1)。この現象は、羽化行動の発現にある種の“gate”が存在し、生理的に成虫化の準備が充分整っても、特定の時刻に“gate”が開いてE Hが放出されるまでは羽化行動を起こさずに待機している、と解釈されている<sup>5,2)</sup>。この“gate”の開く時刻は、光周期に同調した内因性の概日時計によって決定されている。カイコの場合、蛹を3周期以上16L-8Dの条件に置くことで、概日時計を同調させることができ、一旦、概日時計が同調した後は、明暗のリズムのない条件、即ち恒明(LL)や恒暗(DD)の条件に移しても、20~24時間の内因性のリズムが暫く継続される。従って、羽化前日の明期開始後に、最終暗期を除いたLLの条件に蛹を置いた場合、16L-8Dの条件で次の明期が始まるべき時刻、即ち、最終の明期開始後20~24時間後に、集中して羽化がみられる<sup>15)</sup>。

#### 1-2 生物検定法

E Hの生物検定は、上述のE H放出リズムを利用した普後らの方法<sup>5,2)</sup>に従い、以下のように行った。

まず検定に用いるカイコ蛹を、25℃、16L-8Dの条件に3周期以上置き、蛹化後7~8日目の明期に、以下に述べるような形態的な特徴から次の明期開始時刻に“gate”が開いて羽化を行うものと判断した個体を選別する。検定に用いたJ106号 x Daizo種(雄)の場合、蛹化後3~4日目に目の着色が見られ、

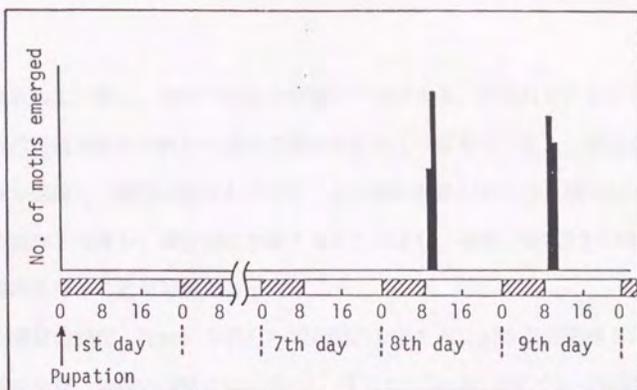


図1-1 カイコの羽化リズム

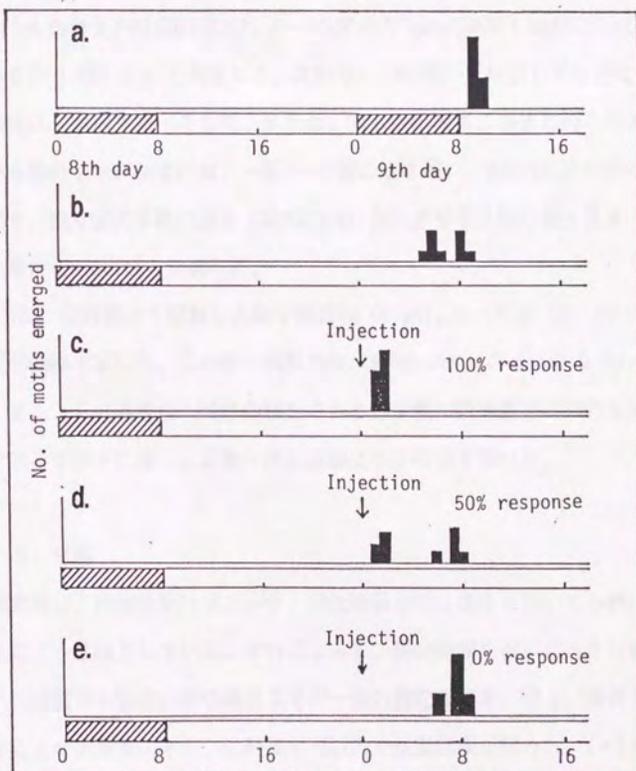


図1-2 生物検定結果のモデル

その後成虫化に伴い、触角や体全体の着色が進行する。羽化前日になると成虫翅の斑紋が蛹皮の外から透けて観察出来るようになり、また、蛹皮と成虫皮が遊離し、腹部が柔らかくなる。このような形態的变化と、蛹化後の経過日数等を考慮し、総合的に判断することにより、通常、90%以上の確率で、選別を行うことが可能であった。

羽化前日の蛹は、“gate”の開く7~8時間前からEHに対する感受性を持つようになり、待機の状態にはいる<sup>52)</sup>。そこで、“gate”の開く6~7時間前、即ち、最終暗期の始まるべき時刻付近で検定蛹の胸腹間から腹部体腔内に検定する試料溶液を注射し、その後はLL条件に置いた。注射後、3時間以内に羽化した個体を(+) (図1-2, c)、6~7時間後の“gate”が開く時刻に羽化した個体を(-) (図1-2, e)と判定した。注射後、10時間以上経過しても羽化しない個体は、選別を誤ったもの、または、何らかの異常のあるものと考え、検定から除外した。検定には、一区5~10頭の蛹を用い、50%の反応(図1-2, d)、即ち、検定区の半数の蛹を3時間以内に羽化させる活性の最少量を、1EH単位(EH unit)と定義した。

図1-3に、蛹頭部から調製した部分精製物 (highly purified EH) の、容量-反応曲線を示した。この部分精製物は、約80ng/unitの比活性を示している。また、EH活性は、活性の検出される最少量の数倍量で100%の反応を引き起こす強さに達し、容量-反応曲線はS字曲線を描いた。

### 1-3 考察

本検定法は、内因性羽化リズムが、羽化前日からLL条件においても維持されることを基礎としている。それによって、最終暗期を省くことが可能になり、注射から羽化行動の観察までの一連の検定作業を、明るい条件下で行うことが出来る。また、注射後半日以内で検定結果が得られ、(+)ま



たは(一)の判定だけであれば、1~2時間で可能である。このことは、昆虫の他のペプチドホルモンの生物検定法、例えば、前胸腺刺激ホルモンの生物検定では数日から10日以上かかることと比較して、精製を進める上で非常に有利な特長である。

検定蛹は、蛹化後4日以内に4℃に冷蔵することにより、実験の進展状況に合わせて検定日を調節することが可能であった。この場合、冷蔵中は成虫化が殆ど進行せず、例えば5日間冷蔵した場合、蛹化後12~14日目に通常より4~5日遅れて羽化がみられた。冷蔵中は光周期に留意せず、再保温から検定までに3周期以上16L-8Dの条件に置くことにより、概日時計を光周期に同調させた。これは、実験を進める上で極めて便利であったが、冷蔵期間は、長くても10日が限度であり、冷蔵により、感度の低下や羽化行動に異常を示す個体の増加が見られることに留意する必要があった。

実際の検定に於いては、カイコの品種や性別、体重、桑葉飼育か人工飼料育かといった幼虫期の飼育条件、さらに、個体差などによって試料に対する感受性にかかなりの差が認められた。従って、本検定法によって求められた力価は、真の値の1/2から2倍までの範囲に入る幅を持った値となり、半定量的な検定法といえる。そのため、検定蛹の平均体重、飼育条件、検定時の室温などの記録が、判定の補助材料となった。また、脳内に内因性のEHを保持している個体に試料を注射しているため、試料中にEH放出因子が存在した場合、EHと区別することができない可能性があった。しかし、普後らは<sup>53)</sup>、蛹頭部の部分精製物の注射によって羽化が誘導された成虫の頭部には、羽化前と同等の強いEH活性が残存していることを確認し、蛹頭部中のEH活性物質が、EH放出因子ではないことを報告している。従って、頭部抽出物に検出されるEH活性は、EH放出因子によるものではなく、EHによるものであると判断した。

また、試料の塩濃度が0.2M以上、または、有機溶媒濃度10%以上の場合に、偽陽性の反応を示す個体が多く見られた。従って、検定試料溶液が偽陽性を示す組成とならないよう考慮して、精製実験のスケールや溶媒条件を設定する必要があった。ただし、酢酸アンモニウムなど、揮発性の塩の緩衝液系を用いた場合には試料の凍結乾燥によって塩の除去が可能であり、検定試料の調製に於いて非常に有効であった。高濃度の塩などによる偽陽性の羽化個体の場合、羽化時刻がまとまらず、また、羽化完了後にも蛹皮からの脱出時に見られる蠕動運動を続けたり、脱皮液の吸収が不完全である、などの異常がみられた。このような異常が起こることから考えて、塩類や有機溶媒の作用は、神経系に対するなんらかの不完全な羽化行動解発刺激を与えるものであり、脳からの内因性EHの放出作用ではない可能性が高い。検定に際しては、通常、上記の観察結果を含め、総合的に判断することにより、真に陽性の場合と区別することが可能であった。

本検定法を行うにあたり、最も労力を要したのは検定蛹の飼育であった。J106xDaizo種では、冷蔵保存卵の保温を開始してから検定まで、25℃で約25日を必要とする。そのため、精製の進度に合わせて必要な数の検定蛹を用意することが難しく、常にある程度の数を飼育しなければならない。しかし、そのためには給餌等の作業に連日多くの時間を割かねばならず、大量飼育のシステムが確立されていない環境では、充分量の検定蛹の供給は、困難であった。本研究の場合、共同研究者の東京農工大学、普後一助教授から、主に夏期に検定蛹の供給を受け、精製を効率よく進めることが可能となった。

## 第2節 カイコ蛹頭部からの羽化ホルモンの精製と単離

カイコEHは、緒言でも述べたように、脳の神経分泌細胞で作られ、その量は、羽化数日前から羽化までの間がもっとも多い<sup>9)</sup>。そこで、予備的に羽化直前の蛹頭部からの精製が試みられた<sup>37)</sup>が、その結果から、EHを単離するには少なくとも十萬頭単位の蛹が必要であることが明らかになった。一方、筆者の属する研究室では、以前からカイコ雄成虫の頭部を材料とした昆虫ホルモンの抽出と精製を手がけており、成虫の頭部であれば、年間200萬頭の入手が可能であった。この雄成虫頭部のEH活性を調べたところ、蛹の10~20%の活性が含まれていた。そこで、活性は劣るものの、大量入手が可能な、雄成虫頭部を材料に、EHの精製を試み、各種の精製条件の検討を行った<sup>38) 39)</sup>。しかし、その結果、含量の少ない成虫頭部からは、単離に至るのが困難であることが明らかになった。そこで、単位重量当りの含量が多い材料を用いた方が精製がより容易であり、回収率の向上も期待できることから、EHを単離するための抽出材料として大量の羽化直前のカイコ蛹を用いて、再度精製を試みることにした。抽出の出発材料として脳のみを用いることが可能であれば、夾雑物が少なく、また重量も少ないので好都合である。しかし、数十萬頭という大量の蛹から脳を取り出すことは技術的に極めて困難であると考えられることから、蛹頭部全体を材料に用いることにした。大量のカイコ蛹頭部の入手は成虫頭部に比較して経費及び設備の面で格段に困難であったが、東京近県の蚕糸試験場などの協力によって、大量の入手が可能になった。

## 2-1 EHの部分精製

カイコ蛹からのEH精製は、先に行った成虫頭部から出発したEHの部分精製法<sup>38) 39)</sup>を基に再検討を加え、初期精製の条件検討を行った。精製作業は、全て氷冷下、または4°Cの低温室で行い、タンパク量は、280nm、または225nmのUV吸収から牛血清アルブミン(BSA)換算量として算出した。精製の各段階では、試料の一部を凍結乾燥した後、安定化剤として0.4μg/μlのBSAを含む0.1M トリス-塩酸緩衝液(pH 7.8)に溶解し、第1節に詳細に記した普後らの方法<sup>5) 2)</sup>に従って生物検定による活性測定を行った。

蛹は、まず脳内に含まれるEH量が最も多くなる羽化直前に、カミソリを用いて頭部を切り落とし、抽出時まで-20°Cにて冷凍保存した。この作業も、重量で換算すると約100倍の精製になった。

蛹頭部20万頭分を抽出材料とし、82,000頭、118,000頭の2区に分けて精製を開始した。精製の初めの8段階は、主に溶媒抽出、沈澱法を組み合わせ、以下のように行った(図1-4)。即ち、頭部1区を、アセトン、ついで80%エタノールで抽出し、それぞれの溶媒に可溶性の物質を除去した。EH活性は、抽出残渣に回収された。蛹頭部は、切断操作の都合上、成虫に比べ蛹皮や前胸部の組織が多く混入し、頭部一個当たりの重量は、成虫の約2倍(15mg)となった。蛹の皮下組織には、多量の脂肪体が存在するため、夾雑物の多くを脂溶性物質が占めることが予想された。そこで、上記の抽出操作は、成虫の場合2回のところを3回ずつ行った。次に、EH活性を含む残渣を、2%食塩水で抽出した。食塩水抽出液の活性は、全体で $3.6 \times 10^5$  EH unit、比活性1500μg/EH unitであった。

食塩水抽出液は、100°C 10分間熱処理し、その結果生じた不溶物は、遠心分離により除いた。続いて、80%飽和硫酸アンモニウム、50-75%アセトン、90%飽和ピクリン酸による各分別沈澱法で精製を行ない、さらに、ピク

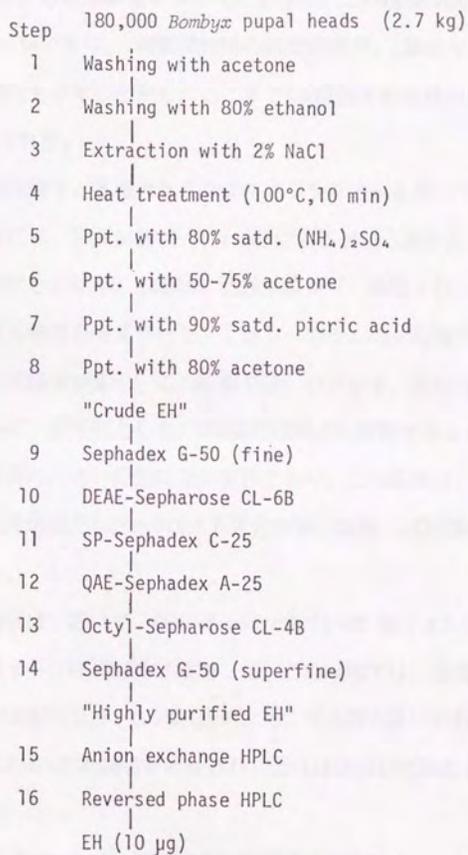


図1-4 カイコ蛹頭部からのEH単離工程

リン酸を除くために80%アセトン沈澱を行なった。以上8段階の精製で、比活性  $39 \mu\text{g}/\text{EH unit}$  の粗抽出物(crude EH)を得た。この段階の活性は、1頭当り  $1.6 \text{ EH units}$  であり、精製開始時の脳磨砕物が、1頭当り  $1.4 \sim 2.0 \text{ EH units}$  の活性を示すことから、ここまでの8段階での活性の回収率は、80%以上と考えられた。

次にこの粗抽出物を、各種カラムクロマトグラフィーを用いて精製した。まず第9段階目には、Sephadex G-50(fine)によるゲルろ過を行った。溶出画分を細かく検定した結果、広範囲に活性が広がり、活性を持つ複数の分子種が存在する可能性も考えられた。しかし、カラムの分離能が低い為に活性が広がった可能性が高く、この段階では、ひとまず、活性のある溶出区をすべて集めて、活性区とした。280nmの吸収から判断すると、約50%が、活性のない分子量の大きい分画に溶出されており、この段階は、約2倍の精製となった。この段階で、2つのロットを合わせ、以後、20万頭のスケールで精製を行った。

ゲルろ過活性区は、続いて、DEAE-Sephadex CL-6B 陰イオン交換カラムクロマトグラフィー(10段階目)で精製した。この段階では、活性はあまり吸着されず、非吸着区及び、 $0.2 \text{ M}$ 酢酸アンモニウム溶出区に回収された。しかし、全体の約40%の夾雑物が吸着され、活性はほぼ100%回収されたため、1.7倍の精製となった。

11段階目のSP-Sephadex C-25陽イオン交換では、DEAE-Sephadex CL-6B 活性区を、 $\text{pH} 4.0$ 、 $0.1 \text{ M}$ 酢酸アンモニウム溶液に調製して、カラムに吸着させた。それを、 $\text{pH} 4.2$ 、 $4.7$ 、 $7.0$ 、 $9.0$ の $0.1 \text{ M}$ 酢酸アンモニウム溶液で順次溶出させた。その結果、 $\text{pH} 7.0$ の溶出区に、回収率80%で、比活性  $5.2 \mu\text{g}/\text{EH unit}$  の活性物質が回収された。

12段階目の、QAE-Sephadex A-25 陰イオン交換クロマトグラフィーでは、

予備実験段階で、いろいろな条件下で活性が複数の分画に分かれた。そして最終的に、0.05M酢酸アンモニウムpH8.5で吸着させた後、pH8.5で0.05M、0.1Mの溶液で洗い、次に、pHを8.1に下げた0.2M溶液を流し、その後、pH8.5、0.5M、pH7.0、0.5Mを流すという複雑な条件で、pH8.1、0.2Mの溶出区に活性が回収されることを見いだした。しかし、大量の試料で精製を行ったところ、予備実験の結果に反して、活性が2つの分画に分かれ、pH8.1、0.2M溶出区に67%、pH8.5、0.5M溶出区に25%の活性が回収され、比活性は、それぞれ2.1、6.6 $\mu$ g/EH unitとなった(図1-5)。そこで、pH8.5、0.5M溶出区を蒸留水で7倍に希釈し、酢酸アンモニウム濃度を約0.07Mに下げて再びQAE-Sephadex A-25に吸着させた。これを、pH8.5、0.1M、pH7.8、0.2M、pH8.5、0.5M、pH7.0、0.5Mの酢酸アンモニウム溶液で順次段階的に溶出させた(図1-6)。その結果、活性は再び二つに分かれ、0.2M溶出区に50%(全体の12.5%)、pH8.5、0.5M溶出区に40%(全体の10%)の活性が回収された。比活性は、それぞれ2.6、11.0 $\mu$ g/EH unitであった。以上2回のクロマトグラフィーに於いて、0.2M溶出区では、いずれも比活性3 $\mu$ g/EH unit以下となったため、両者を合わせてQAE-Sephadex 活性区とし、以下の精製を進めた。

以上4段階のカラムクロマトグラフィーでは、各段階毎に約2倍の精製となり、2.2 $\mu$ g/EH unitの精製物が得られた。

次に、QAE-Sephadex活性区に、固体の酢酸アンモニウムを加え3M溶液とし、Octyl-Sepharose CL-4Bによる疎水性クロマトグラフィーを行なった。この第13段階目の精製では、移動相の流速を厳密に4.0~4.5 ml/hrに制御し、0.1M酢酸アンモニウム溶液でアセトニトリル濃度0~50%のグラジエント溶出を行なった(図1-7)。その結果、アセトニトリル濃度20~34%の分画に活性が溶出され、比活性225 ng/EH unitの精製物が得られた。

第14段階では、Sephadex G-50(superfine)によるゲルろ過を行った(図

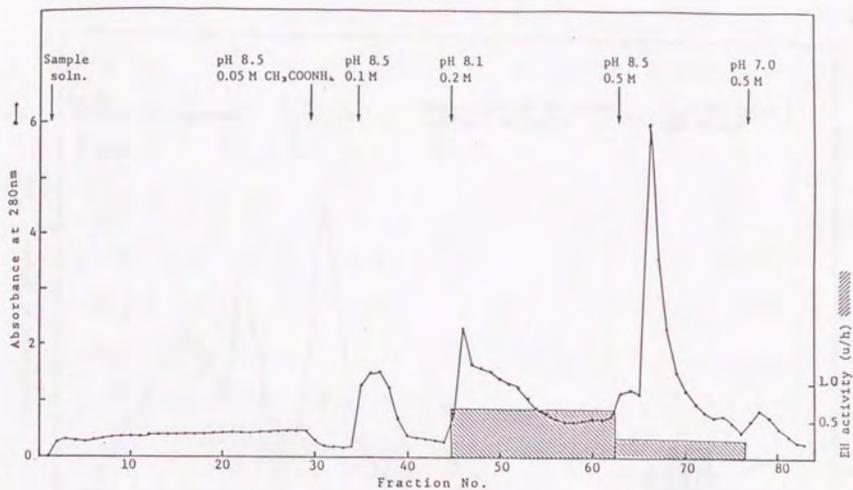


図 1-5 QAE-Sephadex A-25 陰イオン交換クロマトグラフィー (1)

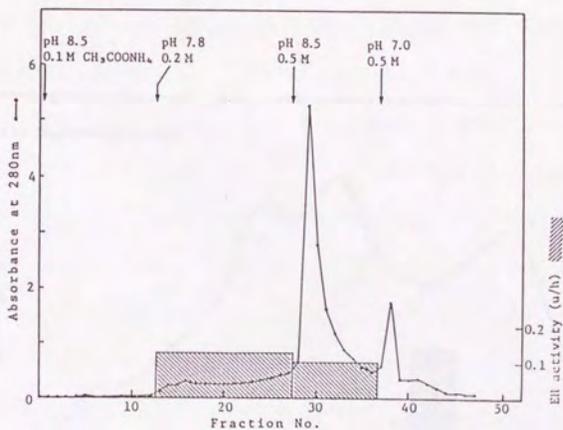


図 1-6 QAE-Sephadex A-25 陰イオン交換クロマトグラフィー (2)

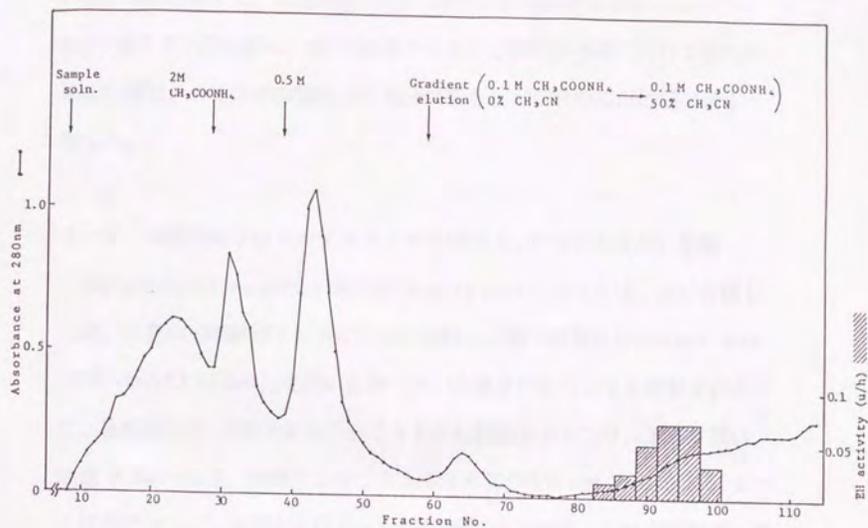


図 1-7 Octyl-Sepharose CL-4B 疎水性クロマトグラフィー

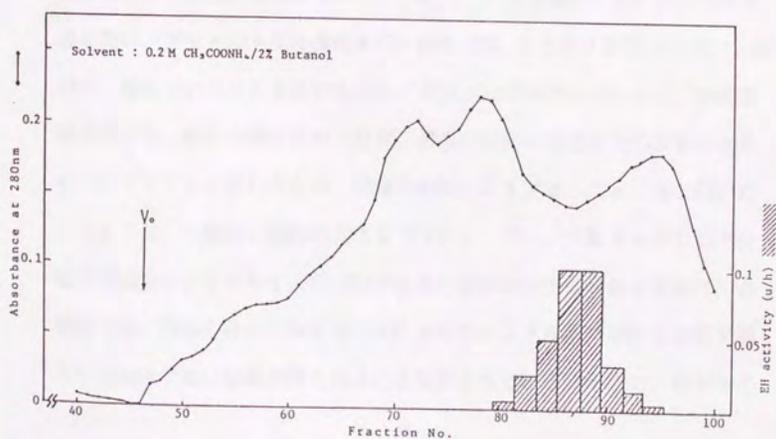


図 1-8 Sephadex G-50 (superfine) ゲルろ過

1-8)。この段階では、比活性0.11ng/EH unit の精製物(highly purified EH)を得たが、回収率は、約50%と低かった。このゲルろ過に於ける活性の溶出位置は、カイコ成虫頭部から部分精製されたEHの溶出位置とよく一致した。

## 2-2 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いたEHの単離

Sephadex G-50(superfine)活性区(highly purified EH)は、凍結乾燥した後、少量の10mM酢酸アンモニウムに溶解し、第15段階目のTSK-gel DEAE-5PWカラム(7.5X75mm)を用いた陰イオン交換HPLCによる精製を行なった。移動相には、10%アセトニトリルを含む酢酸アンモニウム溶液を用い、流速 0.8ml/minで、酢酸アンモニウム濃度を20分で0.01M から 0.15M まで上げるグラジエント溶出を行なった(図1-9)。その結果、EHは酢酸アンモニウム濃度約0.1M の分画に溶出され、比活性 8.6ng/EH unitの精製物が得られた。この第15段階では、一段階で約13倍の精製となった。

第16段階では、逆相HPLCによる精製を行なった。HPLC条件は、移動相に用いる溶媒の、塩の種類、pH、有機溶媒の種類、グラジエントプログラムなどについて検討を行ない、0.1%TFAを含むアセトニトリル溶液を用い、アセトニトリル濃度を10% から 50% まであげるグラジエント溶出が、優れていることを見出した。イソプロピルアルコールは、有機溶媒の中では、最も分離が良かったが、濃度の変化に伴う圧力の変動が大きくベースラインが乱れるため、同様の効果を示すアセトニトリルを用いることとした。一般に、比較的大きなペプチド、タンパク質をHPLCで分離する場合は、ポアサイズ(孔径)が大きい担体のカラムが適しており、逆相系では、担体の疎水性側鎖は、ODS よりもオクチル基やプロピル基を導入した担体で良い結果が得られることが知られている。そこで、ポアサイ

ズの大きな、タンパク質分離用として開発されている Protesil-Octyl や Hi-Pore RP-304、さらに通常の低分子の分離に用いられている Develosil-ODS、Partisil-ODS、TSK-ODS 120A などのカラムを各種溶媒系で比較検討した。また、シアノプロピル基を持つ Nucleosil-CN、フェニル基を持つ Develosil-Phenyl などのカラムも検討を行った。その結果、 $C_4$ -シリカゲルのカラムである Hi-Pore RP-304 (4.6x250mm) が、他のカラムに比べ、非常に分離能が高く優れていることを見いだした。

ここまでの各段階での条件検討で、2万頭分の試料が消費され、この時点で18万頭分の試料が残った。そこで、Hi-Pore RP-304カラムを用い、前記の溶媒条件で、18万頭分の全試料の HPLC を行なった。その結果、UV 225nm で検出される、分離度の高い対称性のよい単一のピークにのみ活性が回収された(図1-10)。この分画は、吸光度から判断して、BSA換算で約  $10\mu\text{g}$  のペプチドを含んでいたことから、比活性は  $0.83\text{ng/EH unit}$  であると考えられる。後に述べるように、この分画は、十分にアミノ酸配列分析を行える純度を有しており、ここに、EH が単離されたものと判断した。

表1-1に以上の精製過程をまとめた。各段階の値は、18万頭相当に換算して表示した。食塩抽出物から比活性で  $1.04 \times 10^6$  倍の精製が行われ、3.3%の回収率で、 $0.83\text{ng/EH unit}$  の EH が単離された。比活性を見ると、9~12段階、及び14段階では、各段階で約2倍の精製であるが、13段階目、及び、二回の HPLC による精製では、各段階で約10倍の精製効率となった。

### 2-3 アミノ酸配列分析

新規ペプチドを単離した場合、一般に、まず初めにアミノ酸組成分析、及び、配列分析が行われる。組成分析では、全構成アミノ酸の組成から、そのペプチドの化学的性質、及び、物理化学的情報を得ることができるが、

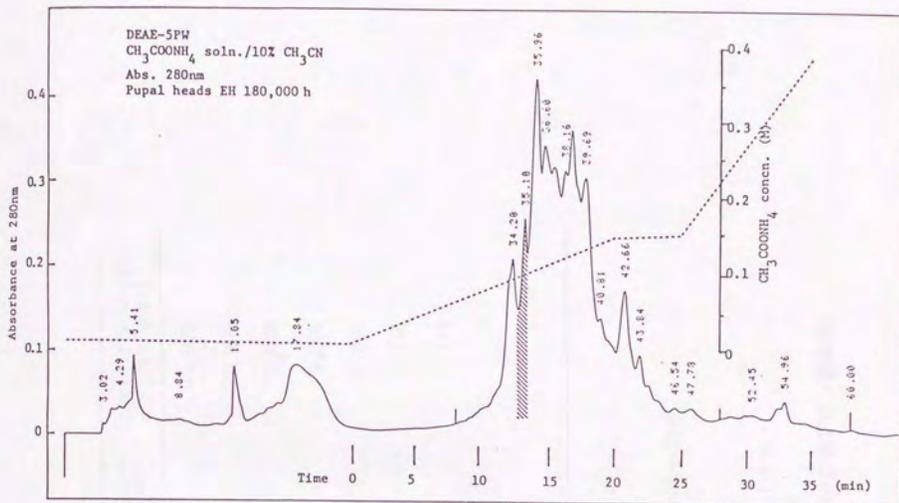


図 1-9 DEAE-5PW 陰イオン交換HPLC (活性区を斜線で示す)

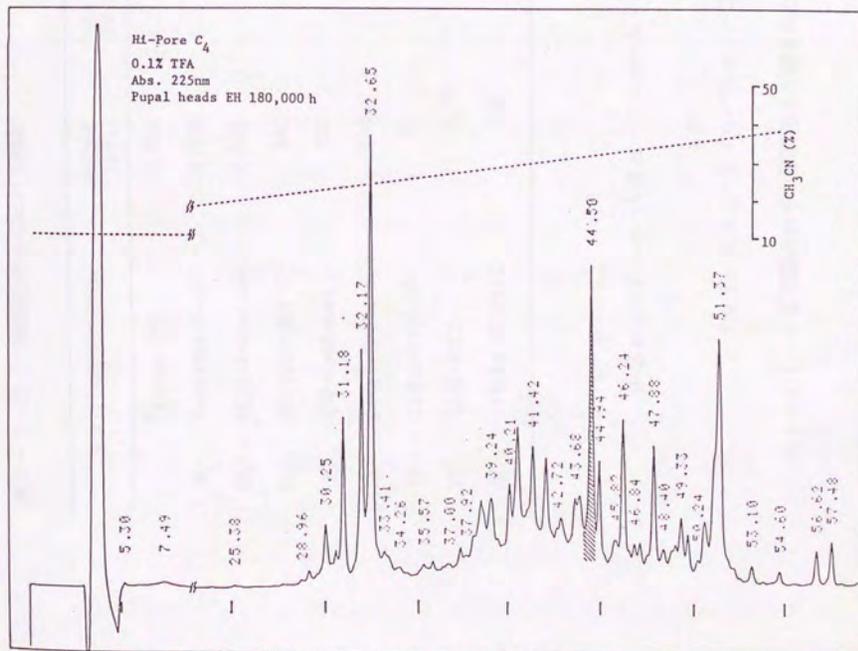


図 1-10 Hi-pore  $\text{C}_4$  逆相HPLC (活性区を斜線で示す)

表1-1 カイコ幼虫頭部からのEHの精製

Purification step	Weight (mg)	Total activity (EH unit $\times 10^3$ )	Specific activity (ng/EH unit)
"Crude EH"	10,800	280	39,000
9. Sephadex G-50	4,400	225	20,000
10. DEAE-Sephadex	2,600	225	12,000
11. SP-Sephadex	940	180	5,200
12. QAE-Sephadex	312	142	2,200
13. Octyl-Sephadex	230	90	255
14. Sephadex G-50	50	45	112
15. DEAE-HPLC	0.16	18	8.6
16. Silica C <sub>4</sub> -HPLC	0.01	12	0.83

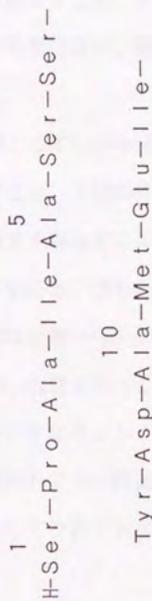


図1-1 18万頭のカイコ幼虫頭部より得られたEHのN-末端アミノ酸配列

各アミノ酸の化学的の性質の違いなどから、すべてのアミノ酸組成が決定出来ない場合も多い。また、試料の純度に対しては、均一性の証拠となる情報を得ることは極めて難しく、逆に、純度の保証されていない試料の分析値は、化学的データとしての意味を持たない。一方、配列分析では、アミノ末端からの配列情報を得ることができるが、全配列に関する情報を得るのは非常に困難であり、大量の試料が必要になる。しかし、配列分析で単一の配列が解析できれば、試料中のペプチドの純度が高いことを明らかにすることができる。また、僅かな配列情報しか与えられなくとも、その配列に特異的な抗体の作製や、DNAプローブの設計が可能になり、異なる研究手法による解析が可能になる。

今回単離したEHは、僅か10 $\mu$ g、分子量を仮に8,000として1.3nmol程度で、すべての分析を行うことは不可能な量であった。そこで、上記の分析法の特徴を考慮した上、単離したEHについて、純度検定を兼ねてエドマン法によるN-末端配列分析を行なうこととした。配列分析には、得られた試料の半量、5 $\mu$ gを用いた。エドマン分解は、基本的には成書<sup>54)</sup> 従って行ったが、試料が非常に微量であるため、損失を防ぐため、改変を行った(実験の項参照)。エドマン分解によって得られたフェニルチオヒダントイン(PTH)-アミノ酸は、逆相HPLCを用いて同定した。各PTH-アミノ酸は、HPLCで同定後、標準PTH-アミノ酸と co-injection してクロマトグラム上でピークが一致することを確認した。

その結果、N-末端から5残基の単一のアミノ酸配列が明らかになった。これによって、16段階の精製の後、HPLC上で単一のピークとして検出されたEHが、純度の高いペプチドであり、EHが単離されたことが確認された。また、この分析の後に、高感度で配列分析が行える気相式プロテインシーケンサー(Applied Biosystems 社、Model 470A)<sup>55)</sup> が利用できるよ

うになったため、残りの試料の内 $2.7\mu\text{g}$ を用いて、配列分析を行った。その結果、最終的にN-末端から13残基のアミノ酸配列が明らかになった(図1-11)。

#### 2-4 まとめ及び考察

カイコ蛹頭部を抽出材料に用い、各種の沈澱法とゲルろ過、イオン交換、逆相、のカラムクロマトグラフィーを組み合わせた14段階の精製を行い、次に、イオン交換、逆相の2段階のHPLCによる精製を行なって合計16段階の単離工程を確立した。この精製により、18万のカイコ蛹頭部から $10\mu\text{g}$ のEHを単離した。精製の初めの14段階では、蛹のEHは、成虫頭部から部分精製したEHと基本的に同じ挙動を示した。最終2段階のHPLCによる精製では、非常に効率のよい精製が行われ、単離に到ることができた(表1)。単離したEHは、非常にわずかな量であったが、微量用に改良した手動エドマン法、及び、気相式プロテインシーケンサーによる配列分析によって、N-末端から13残基のアミノ酸配列を明らかにすることが出来た(図1-11)。特に気相式プロテインシーケンサーは、手動法の半量の試料で、3倍以上の配列を読むことが出来、今後、微量ペプチドの配列分析には、有力な手段となると考えられた。明らかになったアミノ酸配列は、報告されているどのペプチドとも相同性を有していなかった。このEHは、 $0.83\text{ng}$ (約 $1 \times 10^{-13}\text{mol}$ )でカイコ潜成虫の羽化を誘導し、カイコ蛹の体液量を $170\mu\text{l}$ とすると<sup>5,6)</sup>、EHの有効濃度は、 $6.0 \times 10^{-11}\text{M}$ と計算できる。蛹頭部の食塩抽出物は、一頭あたり2 EH unit、 $1.7\text{ng}$ のEHを含んでいた。普後らは、蛹の脳に2 EH unitのEHが存在すると報告しており<sup>5,2)</sup>、今回単離された蛹頭部のEHは、ほとんどが脳に由来すると思われる。

昆虫のペプチドホルモンの精製における最も困難な点は、昆虫は体が小

さく、含まれるペプチドホルモンの量が極めて少ないことである。そのため、その単離には大量の材料と高度の精製技術が必要になる。従って、今回の確立した精製法は、他の高分子のペプチドホルモンを単離する上で、有用な示唆を与えるものと考えられる。著者がEHを単離した時点までに単離されていた昆虫の神経分泌ペプチドホルモンは、脂質動員ホルモン<sup>57)</sup>、neurohormone D<sup>58)</sup>、ボンビキシン<sup>59)</sup>のみであり、カイコEHは、4番目の単離の報告となり、また、これら中では最も分子量の大きなホルモンであった。

なお、EHの構造決定は、この後、筆者の研究を引き継いだ高野らにより精力的に続けられ、95万頭のカイコ蛹頭部から、約35 $\mu$ gのEHが単離された<sup>46)</sup>。このEHを、各種のプロテアーゼで消化し、生じたフラグメントの配列分析を行った結果、アミノ末端から61残基のアミノ酸配列が明らかになっている(図1-12)。

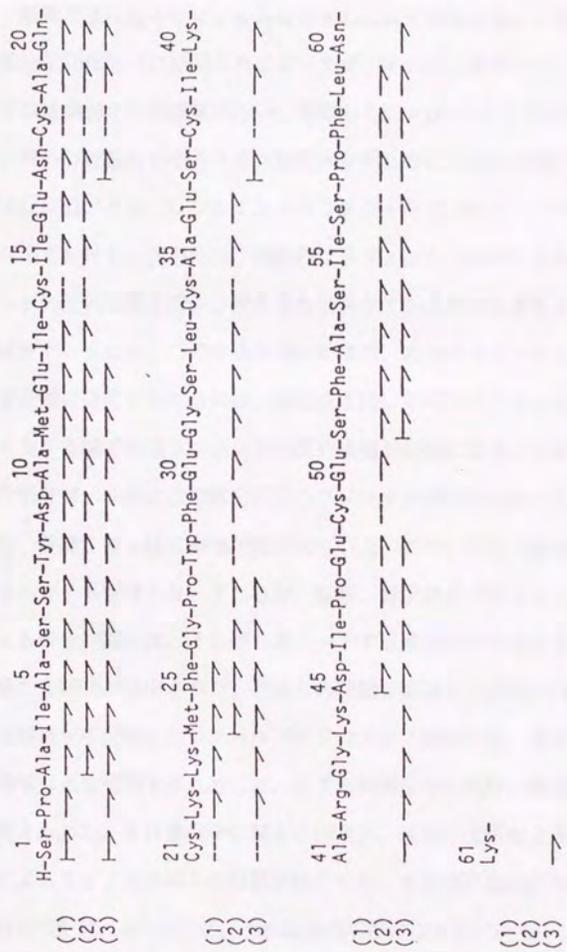


図 1-12 高野ら<sup>43)</sup>により、ペプチドの分析から明らかにされたカイコE.H.の  
61残基のアミノ酸配列 (主要な単一の分画から得られた配列のみを示す)

- (1) N-末端からの配列分析
- (2) リジルエンドペプチデーターゼ消化物の配列分析
- (3) V8プロテアーゼ消化物の配列分析

## 第二章 カイコ羽化ホルモンの遺伝子に関する研究

### 序論

前章で述べたように、EHは著者らにより単離され、N-末端アミノ酸の部分配列(図1-11)が明らかになったが、その後、高野らは、96万頭分のカイコ蛹頭部からの精製を行い、単離した35 $\mu$ gのペプチドの配列分析により、EHの61残基目までのアミノ酸配列を明らかにした<sup>46)</sup>(図1-12)。この分析過程に於いては、リシルエンドペプチダーゼなどのエンドペプチドチダーゼ類でEHを一旦消化し、複数のフラグメントに分解した後、各フラグメントの配列分析を行い、得られたシーケンスをつなぎ合わせるという手法が用いられた。この手法を用いた場合、各フラグメントの接続点の配列を正確に決定するためには、接続点を跨いで両フラグメントにわたる配列を有する第三のフラグメントの配列情報が必要になる。しかし、高野らの分析では、一部にこの第三のフラグメントが得られなかった接続部分があり、疑問を差し挟む余地が残されていた。また、アミノ末端の長さの異なるペプチドが得られ、それらが、転写、翻訳後のプロセッシングや分解によるのか、或いは、それぞれをコードする遺伝子が存在するのか、という新たな疑問が提出された。これらの問題を解決し、また、ペプチド側からの解析が不可能なシグナルペプチドのアミノ酸配列や、遺伝子の発現調節機構などを解明するためには、まずEH遺伝子の単離、構造決定が必要と考えられた。EH遺伝子に関する研究は、緒言に述べたように、既に佐藤によってゲノムDNAの解析が試みられ、その部分塩基配列が明らかにされた(図・緒-3)<sup>47)</sup> <sup>48)</sup>が、それ以上の解析はなされていない。そこで、以下に述べるcDNAの解析から遺伝子に関する研究を着手した。

## 第1節 カイコEHのcDNAの解析

### 1-1 カイコmRNAの調製

mRNAの調製は、グアニジニウム塩<sup>60)61)</sup>や、フェノール<sup>62)</sup>などを用いる各種の方法が開発され、動物、植物を問わず多くの報告例がある。そこで、まずはじめに、最も一般的に用いられているグアニジン-超遠心分離法<sup>63)</sup>でRNAの調製を試みた。

カイコ4令眠、及び、5令幼虫の脳約2500個を顕微鏡下で摘出し、4M チオシアン酸グアニジン(GTC)中で粉碎し、5.7M 塩化セシウム(CsCl)に重層した後、遠心分離でRNAを沈澱させた。大部分のDNA、タンパク質は、RNAより比重が小さいため、CsCl層の上部に残り、RNAと分離された。RNAの沈澱を、1% ラウリル硫酸ナトリウム(SDS)を含む10mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.5)/1mM EDTA(TE)に溶解し、クロロホルム抽出で混入したタンパク質を除去した後、エタノール沈澱にてRNAを回収した。得られた全RNAは、260nmのUV吸収より、約550 $\mu$ gと計算された。この全RNAを、oligo dT-cellulose カラムを用いて精製し、12 $\mu$ gのpoly(A)<sup>+</sup>RNAを得た。

上記のカイコ幼虫の脳から得た全RNAは、約0.2 $\mu$ g/brainと少なかった。カイコの脳のように、非常に小さな組織からの調製には、抽出中の分解や吸着などによるRNAの損失を考えると、小スケールに適した改良が必要であると考えられた。カイコの脳を材料にしたRNA調製の報告は、SDS-フェノール法<sup>64)65)</sup>、AGPC法<sup>66)</sup>などがある。そこでまず、カイコ蛹の脳のmRNAを、SDS-フェノール法で調製した。即ち、蛹化後2~5日目のカイコ蛹の脳535個を、液体窒素中で良く磨碎し、緩衝液に溶解してからフェノール、フェノール/クロロホルム=1:1で抽出してタンパク質を除いた。続いて、水相にLiCl加えてDNAとの分別沈澱を行った。RNAの沈澱を緩衝液に

溶解後、フェノール/クロロホルム=1:1で抽出してSDSを除き、エタノール沈澱で、全RNAを回収した。これは、260nmのUV吸収強度から約650  $\mu$ gと定量された。この全RNAの約半量、317  $\mu$ gを、oligo dT-Latex を用いて精製し<sup>67)</sup>、11.7  $\mu$ gのpoly(A)+RNAを得た。この精製では、脳からのRNA調製量は、全RNA 1.2  $\mu$ g/brain、poly(A)+RNA 45 ng/Br となり、GTC、CsCl超遠心を行った前回に比べ、約6倍のRNAが得られた。なお、全RNAの3.7%がpoly(A)+RNAであった。

## 1-2 $\lambda$ gt10 ライブラリーのスクリーニング

### 1-2-1 cDNAライブラリーの作製

幼虫のmRNAを、oligo dT をプライマーにして poly(A) tail から逆転写反応を行い、1st strand cDNA を合成した。続いてRNase H で鋳型にしたRNAを分解し、その後、DNA ポリメラーゼで相補鎖を合成した。合成した2本鎖cDNAを、EcoRI メチラーゼを用いてEcoRI切断部位のアデニンを、6-methyl aminopurine に変換して切断部位を保護した。このcDNAの両末端に、DNA リガーゼで EcoRI linker を付けた後、EcoRI で消化した。これを、EcoRIで消化した $\lambda$ gt10ファージの断片とライゲーションした。ライゲーションした $\lambda$ gt10は、ファージタンパク質の混合物と混ぜ、*in vitro* packaging を行った。野生型の  $\lambda$ gt10は、*E. coli* NM514株に感染させると溶原化し、明瞭なプラークは形成しない。しかし、*cl* repressor 遺伝子上にEcoRIクローニング部位を持つため、ここに外来DNAが挿入された組み替え体は*cl*<sup>-</sup>となり、溶原化せずにプラークを形成するようになる。そこで、packaging した $\lambda$ ファージ粒子を、*E. coli* NM514株に感染させ、組み替え体のみを選別した。ライブラリーサイズは、 $5 \times 10^4$  plaque formation unit (pfu)であった。

## 1-2-2 合成オリゴヌクレオチドプローブによる、 $\lambda$ gt10 cDNA ライブラリーのスクリーニング

先に述べたように、佐藤によりEHゲノムDNAの解析が試みられ、ゲノムDNAクローンの部分配列が明らかになった。そこで、その情報を基にしてプローブを設計し、 $\lambda$ gt10ライブラリーのスクリーニングを行った。

まず、 $\lambda$ gt10ファージを、1プレートあたり $10^4 \sim 10^5$  プラーク程度となるようにSM培地を用いて希釈し、Luria-Beryani's broth (LB培地と略す)で一晩培養した*E. coli*・NM514株と混和し、10mM MgCl<sub>2</sub>を加えた50  $\mu$ g/mlのアンピシリンを含むLB培地(LB-Ampと略す)プレートに重層して培養し、透明なプラークの形成を確認した後、ナイロンメンブレンに吸着させた。ハイブリダイゼーションによるスクリーニングには、ゲノムDNAの配列を基に、ホスホアミダイト法<sup>68) 69)</sup>を用いて合成した、アンチセンスの54mer、36mer、17merの、3種類のオリゴヌクレオチドをプローブとして用いた<sup>70)</sup>。この3種類のプローブは、それぞれ、EHの Tyr<sup>6</sup>-Phe<sup>25</sup>、Ile<sup>39</sup>-Glu<sup>50</sup>、及び、Gly<sup>26</sup>-Gly<sup>31</sup>をコードする部分の塩基配列に相当する(図2-1)。これらのプローブに、[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATPを基質としてT4-キナーゼを反応させ、3'末端ラベルを行って実験に用いた。

ハイブリダイゼーション実験に於いては、用いるプローブの解離温度(T<sub>m</sub>)によって、ハイブリダイゼーション温度を調製することが重要であり、通常その温度は、T<sub>m</sub>-10°Cと設定される<sup>63)</sup>。この二つの合成プローブの解離温度(T<sub>m</sub>)は、以下の式で表される<sup>71)</sup>。

$$T_m = 81.5 - 16.6(\log_{10} [Na^+]) + 0.41(\%G+C) - (600/N) \quad : N = \text{塩基数}$$

この式によれば、1xSSC中では、54mer=99.6°C；36mer=96.0°Cと求めら

17mer probe

- 26 31  
(A) Gly-Pro-Trp-Phe-Glu-Gly  
(B) 5'-GGC. CCT. TGG. TTC. GAG. GGA-3'  
(C) 3'-CCG. GGA. ACC. AAG. CTC. CCT-5'

36mer probe

- 39 50  
(A) Ile-Lys-Ala-Arg-Gly-Lys-Asp-Ile-Pro-Glu-Cys-Glu  
(B) 5'-ATC. AAA. GCC. AGA. GGC. AAA. GAC. ATT. CCG. GAA. TGC. GAA-3'  
(C) 3'-TAG. TTT. CCG. TCT. CCG. TTT. CTG. TAA. GGC. CTT. ACG. CTT-5'

54mer probe

- 8 25  
(A) Tyr-Asp-Ala-Met-Glu-Ile-Cys-Ile-Glu-Asn-Cys-Ala-Gln-Cys-Lys-Lys-Met-Phe  
(B) 5'-TAC. GAC. GCA. ATG. GAA. ATT. TGC. ATC. GAG. AAC. TGC. GCG. CAA. TGC. AAA. AAA. ATG. TTC-3'  
(C) 3'-ATG. CTG. CGT. TAC. CTT. TAA. ACG. TAG. CTC. TTG. ACG. CGC. CTT. ACG. TTT. TTT. TAC. AAG-5'

図2-1 54mer、36mer、17merのオリゴヌクレオチドプローブ(C)と、それに対応するEHのアミノ酸配列(A)、ゲノムDNA配列(B)。

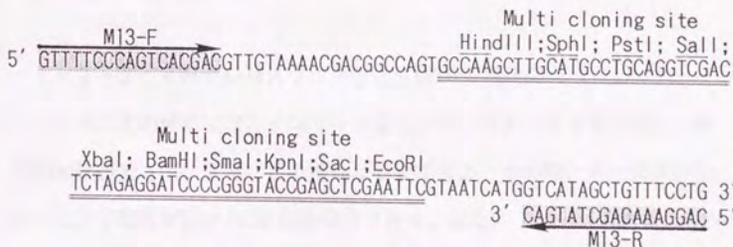


図2-2 pUC118プラスミド配列分析用プライマー (M13-F、M13-R)

れる。そこで、ハイブリダイゼーション温度は、54mer では 89.6°C、36merでは 86.0°Cと求められた。しかし、プローブが長い場合など、計算上  $T_m$  が非常に高くなる時には、反応温度は溶液の変性や蒸発を防ぐために 65°C程度に抑えることが望ましいとされている<sup>63)</sup>。そこでスクリーニングは、まず65°Cにハイブリダイゼーション温度を設定し、54mer、36merの両方のプローブとハイブリダイズするクローンをスクリーニングした。ブランクを形成したプレートからは、プレート1枚あたり4枚ずつメンブレンに転写し、2枚ずつそれぞれのプローブでハイブリダイゼーションを行った。

1.1x10<sup>4</sup>クローンのスクリーニングを行ったところ、4枚のメンブレンすべてに一致するハイブリダイゼーションシグナルを与えるブランクは、一つも見出せなかった。そこで、ハイブリダイゼーション温度を、50°Cに下げ、さらに1.0x10<sup>3</sup>クローンのスクリーニングを行った。その結果、54mer、36mer両方のプローブとハイブリダイズするクローンが、一つ見出された。そこで、このクローンを拾い、54merのプローブを用いて、50°Cの条件で2次、3次スクリーニングを行い、純化したクローンをλEHC01と名付けた。

### 1-2-3 EHC DNAクローン、λEHC01の解析

cDNAの解析には、インサート部分のフラグメントを切り出し、各種の制限酵素で消化するなどの操作が必要になる。その際、λgt10は、クローニング部位がEcoRI切断部位のみであり、また、ファージの培養、DNAの調製に時間がかかるという欠点を持っている。そこで、λEHC01のインサート部分を、扱いが容易でDNAの調製が簡単であるpUC118プラスミド<sup>72)</sup>にサブクローニングし、解析することとした。

pUC118プラスミドは、β-ラクタマーゼをコードする遺伝子を持つためアンピシリン耐性(Amp<sup>r</sup>)を示し、isoschizomer も含め13種類の制限酵素切断

部位を含むマルチクローニング部位を持つ。また、M13ファージの inter-genic region (IG) があるため、M13 K07 などのヘルパーファージを感染させることで、一本鎖DNAとして回収できる、いわゆるファージミドの性質を持つ。さらに、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの $\alpha$ -サブユニットタンパク質をコードする、LacZ' 遺伝子を持つ。そのため、*E. coli* JM109株などの、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの $\omega$ -サブユニットタンパク質をコードする部分を持つがLacZ' を欠いた *E. coli* (LacZ $\Delta$ M15) に形質転換すると、プラスミド由来の $\alpha$ -サブユニットが供給されて、完全な $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性が発現される" $\alpha$ -相補性"<sup>73)</sup>を示す。また、マルチクローニング部位がLacZ' 中に位置しているため、外来DNAが挿入されたプラスミドは、LacZ' を発現せず" $\alpha$ -相補性"を示さない。この性質を利用して、培地にLacZ' 遺伝子を誘導する isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) と、 $\beta$ -ガラクトシダーゼによって分解され、青色の色素を生じる 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside (X-gal) を加えることで、導入したプラスミドの挿入断片がある場合には白色、無い場合には青色のコロニーが生じ、コロニーの色で容易に選別が可能である利点があった。

まず、 $\lambda$ EHC01を200mlスケールで培養し、超遠心分離を行ってファージDNAを大量調製し、これを用いてEcoRI消化断片のサザンハイブリダイゼーションを行った。即ち、DNAをEcoRIで消化し、アガロースゲル電気泳動した後、サザンプロットングを行った。プロットングしたメンブレンは、54merのプロープで、65°Cでハイブリダイゼーションを行った。その結果、290bpのバンドが、プロープとハイブリダイズした。この結果から、 $\lambda$ EHC01はインサート中に、EcoRI切断部位を含まない290bp程度のフラグメントを持つことが明らかになった。サブクローニングに際しては、インサート中の制限酵素切断部位の有無が最も問題になる。即ち、サブクローニ

ングに用いる制限酵素切断部位がインサート中にあった場合、インサートの全長をサブクローニングすることが出来ない。上記の実験からは、インサート中のEcoRI切断部位の有無は分からず、290bpのフラグメントがインサート全長で有るか否かを言うことは出来ない。しかし、ゲノム上でそれまでに解析された領域(230bp)よりも長いフラグメント(290bp)が得られたため、このフラグメントのサブクローニングを行うこととした。

サブクローニングでは、まず、 $\lambda$ EHC01ファージDNAの12.5 $\mu$ gを、10単位のEcoRIで消化し、アガロースゲル電気泳動を行った。次に、先にザンハイブリダイゼーションで54merのプローブとハイブリダイズした290bpのフラグメントを切り出して精製した。このフラグメントを、EcoRIで消化した後、子牛小腸アルカリホスファターゼ(CIP)で脱リン酸化したベクター-pUC118とモル比で1:1~3となるように混合し、T4-リガーゼを用いて16°Cで17時間、ライゲーション反応を行った。ライゲーションしたDNAは、*E. coli* JM109株のコンピテントセルに形質転換し、12枚の0.5mM IPTGと、0.044%のX-galを含むLB-Ampプレート(LB-Amp-IPTG-X-gal)に撒いて、37°Cで一晩培養した。培養後、各プレートには、インサートの挿入されたpUC118が形質転換された3~4個の白いコロニーが観察された。そこで、まず発育の良い5つのコロニーを選んで、10mlのLB培地で培養し、7Mリ-SDS法でプラスミドを調製した。これを、EcoRIで切断してアガロースゲル電気泳動を行ったところ、5つ全てに約290bpのインサートが確認できた。そこで、このサブクローンの一つをpEHC01と名付け、新たに200mlのLB-Amp培地で培養し、7Mリ-SDS法でプラスミドを調製した後、ポリエチレングリコール(PEG)沈澱にてさらに精製し、混入した*E. coli*のゲノムDNAなどを除いて、配列分析に用いる純度の高いプラスミドを調製した。

pEHC01は、ダイデオキシ法による配列分析反応を行い、ポリアクリルア

ミドゲル電気泳動(PAGE)にかけた。泳動後、ゲルはオートラジオグラフィを行い、配列を解析した。プライマーには、pUC118のマルチクローニング部位の両脇にある、M13ファージ由来の領域にハイブリダイズする市販のForward、及びReverse プライマー (M13-F、及び、M13-Rと略す、図2-2)を用いた。その結果、図2-3 に示した309残基のcDNAの配列が明らかとなった。この配列は、ゲノムの解析では見出されていなかった未知のエクソンにコードされる、EHのN-末端の4残基をコードする領域を含み、さらにその上流に、シグナルペプチドと思われる21残基の、疎水性アミノ酸に富んだペプチドがコードされていた。翻訳の開始シグナルとなる可能性のあるメチオニン残基は、-9残基目の一つだけ見られた。シグナルペプチドは、一般的には15~30アミノ酸の長さがあり<sup>74)</sup>、また、そのN-末端付近には塩基性アミノ酸を含む<sup>75)</sup>。このメチオニン残基から翻訳が始まった場合、合成されるシグナルペプチドはこの性質に合わず、また、さらに上流にも疎水性アミノ酸に富むペプチドが引き続きコードされていることから、このメチオニン残基は、翻訳開始シグナルではないと考えられた。従って、このクローンは、残念ながら上流域の開始メチオニンを含む数残基のシグナルペプチドのN-末端部分をコードする領域を欠いており、不完全なものであることが明らかになった。

このような不完全な長さのcDNAが得られた理由として、インサート内部にEcoRI切断部位が存在し、サブクローニングの過程でインサートがそこで切断され、EcoRI フラグメントの脱落が起こった可能性が考えられた。5'末端領域については、EcoRI切断部位付近の配列が、GAATCCCとなっており、これは、ライブラリー作製に用いたEcoRIリンカーの配列(GGGAATCCC)と一致し、λEHC01が上流域を含んでいなかったと考えられた。一方、3'末端領域については、ゲノムDNAの配列からEH遺伝子が終止コドンの下



流28残基にEcoRI切断部位を持つことが明らかになっていたが、cDNAも3'末端はここまでしか含んでいなかった。従って、poly(A) tail までの領域が脱落した可能性が考えられた。

この点を明らかにするために、まず $\lambda$ gt10のEcoRIクローニング部位の両側にハイブリダイズする市販の $\lambda$ gt10 Forward 及び Reverse プライマー (GT10-F及びGT10-Rと略す;図2-4)を用いて、 $\lambda$ EHC01の塩基配列分析を試みた。しかし、通常の条件の配列分析では、配列が解析できなかった。これは、50kb以上の長さを持っている $\lambda$ EHC01の分析では、充分なモル数を反応させるために大量のDNAが必要であり、高濃度のDNAが伸長反応を阻害したことに原因があると考えられた。そこで、 $\lambda$ EHC01をEcoRI以外の制限酵素で消化し、EcoRIクローニング部位を含んだフラグメントをサブクローニングし、配列分析を試みた。

まず3'末端側の分析は、 $\lambda$ gt10の right armの、EcoRI切断部位から900 bp離れたところにあるBglII切断部位と、EHcDNAのHindIII切断部位で二重消化した。この操作では、図2-5に示したように、10種類のフラグメントが生じると予想された。そこで、消化物のアガロースゲル電気泳動を行ったところ、検出の困難な短いフラグメントを除き、ほぼ予想通りのバンドパターンが得られた。目的のcDNA3'末端を含むフラグメントの長さは、 $\alpha_2$  bpのEcoRIフラグメントが存在すると仮定すると、 $962 + \alpha_2$  bpと予想されたが(図2-5)、約1kbのところにそれと考えられるバンドが認められた。そこでその1kbのフラグメントを切り出して精製し、BglIIと対合する接着末端を生じる BamHI、及び、HindIII で二重消化した pUC118 プラスミドにサブクローニングした。このクローンを、M13-F、及び、GT10-F プライマーを用いて、塩基配列分析を行ったところ、pEHC01インサートの3'末端の配列に続いてEcoRI部位、及び、 $\lambda$ gt10のarmの配列が確認された。

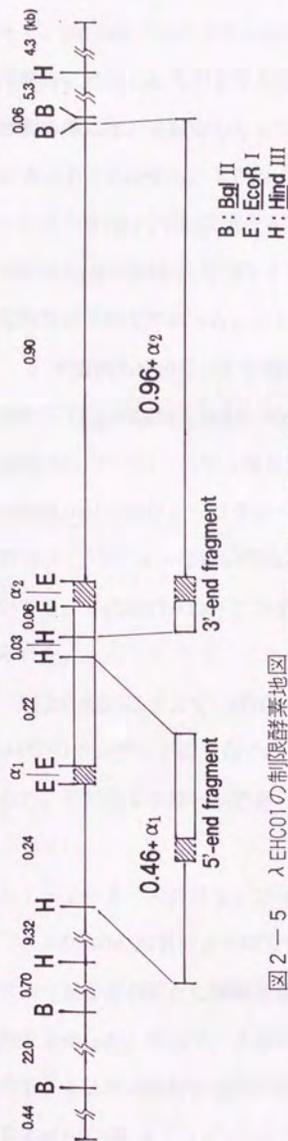


図2-5  $\lambda$  EHC01の制限酵素地図

下段は、インサートの5', 3'末端配列決定のためにサブクローニングした断片を示す。5', 3'末端に存在する可能性のあったEcoRI断片は、斜線を引いた $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  bpの長さの断片として表した。

amino acid	-21	-8
cDNA sequence	Thr-Ala-Val-Ile-Val-Val-Ala-Leu-Ala-Val-Ala-Phe-Met-Val	
42mer probe	5'-ACC. GCA. GTC. ATC. GTT. GCT. CTC. GCC. GTG. GCA. TTC. ATG. GTC-3'	
	3'-TGG. CGT. CAG. TAG. CAA. CAA. CGA. GAG. CGG. CAC. CGT. AAG. TAG. CAG-5'	

図2-6 42merオリゴヌクレオチドプローブと、対応するcDNA配列、及び、アミノ酸配列。

従って、 $\lambda$ EHC01は、EHの終止コドンの下流32bpまでの配列しか含んでおらず、poly(A) tail からこのEcoRI切断部位までの部分は、ライブラリー作製時に脱落したものと考えられた。前項で述べたように、ライブラリー作製の際には、逆転写したcDNAのEcoRI切断部位をEcoRIメチラーゼによってメチル化し、cDNA内部のEcoRI切断部位を保護した後にEcoRIリンカーを付け、EcoRI消化を行う。従って、今回分離された $\lambda$ EHC01が、内部のEcoRI切断部位で消化されたインサートを含んでいたことは、メチル化反応が不完全であったことを示している。

5'末端側の解析は、3'末端側と同様の戦略を用い、 $\lambda$ EHC01をHindIIIで消化してEcoRI部位を挟む $0.46 + \alpha$  kbと予想されるHindIIIフラグメントを(図2-5)、アガロースゲル電気泳動によって同定、精製した。それを、pUC118のHindIII部位にサブクローニングし、プラスミドを調製して、M13-F、GT10-R プライマーを用いて塩基配列分析を行った。その結果、5'末端についても、 $\lambda$ gt10のクローニング部位の配列に続いてcDNAの配列が認められた。

以上の検討によって、pEHC01にサブクローニングされていた配列は、 $\lambda$ EHC01インサートの全長であり、 $\lambda$ EHC01自体が3'末端、5'末端共に欠除した、不完全なクローンであったことが明らかとなった。

#### 1-2-4 $\lambda$ gt10ライブラリーの再スクリーニング

$\lambda$ EHC01の解析により得られたEHcDNAの配列は、シグナルペプチドの一部などの新たな情報を含んでいたが、全配列を明らかにすることは出来なかった。従って、さらにスクリーニングを行う必要が生じた。ところで、cDNA調製の過程では、3'末端のpoly(A) tailにハイブリダイズするoligo dTをプライマーに用いて逆転写反応を行っているため、前項の

ようなメチル化が不完全な場合以外は、3'末端側の配列はcDNAに含まれる。しかし、5'末端領域は、鋳型となるmRNAの分解や、逆転写反応が不十分であることなどの要因によって、欠落する可能性が高い。従って、完全長のcDNAを得るためには、5'末端に近い領域にハイブリダイズするプローブを用いてスクリーニングすることが望ましいと考えられた。そこで新たに、λEHC01の解析で明らかになったシグナルペプチドの部分にハイブリダイズする、アンチセンスの42merのオリゴヌクレオチドプローブを合成した(図2-6)。

次に、合成した42merプローブを用いて、ハイブリダイゼーション温度65°Cで、再びλgt10ライブラリーのスクリーニングを行った。3x10<sup>3</sup>クローンを、スクリーニングしたところ、ハイブリダイズするものが見いだされなかったため、再び、50°Cでハイブリダイズさせた。その結果、10個程度のクローンがポジティブとなった。そのうち、シグナルの強かった5クローンを拾い、42merプローブ、50°Cで2次スクリーニングにかけ、ポジティブシグナルを与えた3クローンを純化した。これらのクローンは、GT10-FとGT10-Rのプライマーを用いて、polymerase chain reaction (以下PCRと略す)<sup>76)</sup>を行い、インサートを増幅した。PCRの条件は、変性94°C2分・アニール37°C3分・伸長72°C5分・25サイクルとした。PCRの一般的条件設定法の詳細については、第1節-3-2項で述べる。増幅した断片をアガロースゲル電気泳動にかけたところ、3クローン中2つで、約600bpの断片が増幅し、これは、λEHC01のインサート(316bp)の約2倍の長さを持っていた。そこで、600bpの断片をアガロースゲルから切り出し、精製した後、T4キナーゼを用いて末端をリン酸化した。これを、制限酵素SmaIで消化した平滑末端のpUC118にサブクローニングした。β-ガラクトシダーゼ活性の失われた白いコロニーとして検出されたものの中で、32クローンのプラスミド

を調製し、pUC118のマルチクローニング部位全体を含む322bpの消化断片を与える制限酵素PvuII、または、既知のcDNA配列内に切断部位の無い、SacI/XbaIの二つの制限酵素で消化して、インサートを含んだ断片を得た。これをアガロースゲル電気泳動にかけたところ、600bpのインサートが認められたのは、僅か2クローンであり、他の30クローンには、電気泳動で確認できる50bp以上の大きさのインサートは認められなかった。この原因としては、平滑末端のDNA断片をライゲーションする場合、塩基対の水素結合による配列特異的な対合が生じないことなどのため、混入した短い塩基の挿入などが起きた可能性が考えられる。600bpのインサートを持ったクローンは、次いで、M13-F、-Rのプライマーを用いてインサート両端の塩基配列の分析を行ったが、得られた300bp以上の配列には、既知の配列と一致する領域は見いだせず、EH cDNAクローンは、含まれていないと考えられた。

#### 1-2-5 まとめ及び考察

カイコ5令幼虫の脳から調製したmRNAを用いて、λgt10ファージをベクターにしたcDNAライブラリーを作製し、ゲノムDNAの部分配列を基に合成したオリゴヌクレオチドをプローブにして、合計 $1.5 \times 10^4$ クローンをスクリーニングした。その結果、cDNAクローンλEHC01が分離され、配列分析によって、EHのN-末端のアミノ酸4残基、及び、シグナルペプチドの一部をコードする配列が初めて明らかになった。しかし、このクローンのインサートは、5'、3'の両方の末端を欠く不完全なものであることが示された。配列分析を行っていないその他のポジティブクローンについては、インサートの長さを確認したものはすべて300bp以下であり、λEHC01の解析で明らかになった以上の配列を含んでいることは、あまり期待でき

なかった。これらの結果から、ライブラリー作製時にEcoRI切断部位のメチル化が不完全であった可能性が考えられ、従って、クローンに含まれる他のcDNAも、λEHC01のインサートと同様に3'末端領域のEcoRI部位で切断されていることが予想された。そこで、必ずしも十分な数のスクリーニングを行ってはいないものの、このλgt10ライブラリーのスクリーニングは、この時点で終了した。

### 1-3 $\lambda$ gt11 cDNAライブラリーのスクリーニング

$\lambda$ gt10ライブラリーのスクリーニングにより得られた、cDNAクローンは、不完全なものであり、その原因としてライブラリーの調製自体に問題があると考えられた。そこで次に、 $\lambda$ gt11ファージをベクターにしてカイコ5令幼虫の脳より調製されたcDNAライブラリーを用いて、cDNAのスクリーニングを行った。このライブラリーは、名古屋大学理学部岩見雅史博士から供与されたもので、これを用いて、既にカイコ前胸腺刺激ホルモンのcDNAが、単離されている<sup>77)</sup>。

#### 1-3-1 合成DNAプローブを用いたスクリーニング

供与された $\lambda$ gt11ライブラリーを、SM培地を用いて $10^{-2}$ から $10^{-8}$ まで段階的に希釈して、一晚培養した *E. coli* Y1090株と混和し、10mM MgCl<sub>2</sub>を含む LB-Amp プレートに重層した。これを42°Cで、4時間培養し、生成したブラック数を計測してライブラリーの力価を算出した。その結果、 $10^{-7}$ 希釈で120~150ブラック、 $10^{-8}$ 希釈で8~15ブラックが得られ、供与された $\lambda$ gt11ライブラリーは、少なくとも $1 \times 10^{10}$  pfu/ml の力価を持つと予想された。そこで、 $\lambda$ gt11をプレート1枚あたり $1 \times 10^3 \sim 10^4$ ブラックとなるように希釈し、培養後、生じたブラックを、ナイロンメンブレン2枚ずつに転写し、ハイブリダイゼーションを行った。

1次スクリーニングでは、前項で得られたpEHC01から切り出したcDNAフラグメントを鋳型とし、ランダムプライム法を用いてラベルしたcDNAを、プローブとして用いた。ランダムプライム法によるラベルは、末端ラベルしたものに比べて比放射活性が高いプローブが得られ、スクリーニングのように高い感度が要求される実験には適している。しかし、十分に比放射活性の高いプローブを得るには、鋳型となるDNAは、100bp以上の

長さが必要であり、オリゴヌクレオチドプローブのラベルには適さない。従って、 $\lambda$ gt10のスクリーニングにより $\lambda$ EHC01が得られたことにより、初めて比活性の高いプローブの利用が可能になった。

上記のプローブにより、ハイブリダイズ温度を65°Cに設定して $2.5 \times 10^5$ クローンをスクリーニングしたところ、明瞭なポジティブシグナルを与える14クローンが得られた。そこで、まず14クローンの内、シグナルの強い5クローンを選んで、二次、三次スクリーニングにかけた。その結果、4つのクローン、 $\lambda$ EHC11、12、13、15が純化された。ここまでのスクリーニングは、全てランダムプライム法でラベルしたcDNAをプローブとして用いてきた。しかし、ランダムプライム法でラベルしたプローブは、種々の長さのヌクレオチドの混合物であり、目的のクローン以外のものや、cDNAの一部だけの短いインサートを含むクローンにもハイブリダイズする可能性がある。その場合にも、比活性が強いために明瞭なポジティブシグナルを与えると考えられた。そこで、これら4クローンの三次スクリーニングのメンブレンを良く洗浄してハイブリダイズしたプローブを落とし、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  dATPで末端ラベルした、シグナルペプチドをコードする部分にアニールする42merのオリゴヌクレオチドプローブ(図2-6)を用いて、60°Cで再ハイブリダイゼーションを行った。これにより、少なくともシグナルペプチドの部分までをコードする長さを持つcDNAクローンが、高い確率で得られると考えられた。その結果、4クローンの内、 $\lambda$ EHC11と15の2つのクローンにのみポジティブシグナルが多数認められ、 $\lambda$ EHC12、13のブランクは、ハイブリダイズしなかった。次項に述べるPCR法によって明らかになった各クローンのインサートの長さを見ると、シグナルの出なかった $\lambda$ EHC12、13は、それぞれ750bp、700bpであり、 $\lambda$ EHC11(870bp)、15(850bp)に比べ短かった。従って、 $\lambda$ EHC12、13は、42merプローブとハイブリダイズする

5'末端側の領域を欠いているものと考えられた。

### 1-3-2 PCR法を用いた $\lambda$ gt11クローンのサブクローニング

前項で分離した4クローンについて、PCR法<sup>76),78)</sup>を用いてインサートを増幅し、サブクローニングを行った。

PCR法では、プライマーの設計、各ステップの温度、反応時間の設定、などが重要な条件である。特に、PCR法において最も頻度の高いトラブルである非特異的なDNAの増幅は、プライマーの設計に原因がある場合が多い。プライマー設計の際の一般的な注意事項としては、GC含量が偏らず、プライマーが分子内、或いは、プライマー間で二次構造や水素結合をなるべく形成しないように配列を考えること、などが指摘されている<sup>79)</sup>。今回の実験に際しては、 $\lambda$ gt11のクローニング部位の外側にアニールするプライマーが市販されていたため、これを利用することを考えた。この市販のプライマー(図2-7)は、Forward と Reverse の2つのプライマーのGC含量がそれぞれ75%、46%と大きく異なり、従って  $T_m$  も、GT11-F = 99°C、GT11-R = 87°Cと異なり、PCRにはあまり適していないと思われた。しかし、新たなプライマーの設計、合成には、時間と費用がかかるため、まず入手の簡便なこのプライマーでPCRを試みた。

PCRに先立ち、まず $\lambda$ gt11の4クローンのブランクを滅菌したつまようじでつついてファージを拾い、蒸留水に懸濁して浸透圧でファージの外皮たん白質を破壊した。その後90°Cに加熱してDNAを変性し、PCRの試料とした。プライマーは、GT11-F と GT11-R を使い、変性94°C1分・アニール45°C2分・伸長72°C3分・25サイクルと条件を設定した。PCR産物を、アガロースゲル電気泳動にかけたところ、図2-8 に示すように、それぞれ700~900bpの単一なバンドが検出された。そこで、850bp以上のより長いフ

$\xrightarrow{\text{GT11-F}}$  EcoRI (cloning site)  
 5' GGATTGGTGGCGACGACTCCTGGAGCCCGTCAGTATCGGCGGAATTCAGCTGAGCGCCG

GTCGCTACCATTACCAGTTGGTCTGGTGTCAAAAATAATAATAACCGGGCAGGCCATGTC 3'  
 3'  $\xleftarrow{\text{GT11-R}}$  GTAATGGTCAACCAGACCACAGTT 5'

GT11-F : 24mer  $T_m = 99^\circ\text{C}$   
 GT11-R : 24mer  $T_m = 87^\circ\text{C}$

図2-7  $\lambda$ gt11 プライマー (GT11-F、GT11-R)

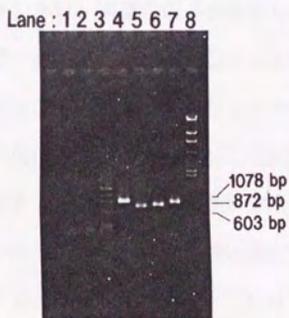


図2-8  $\lambda$ gt11クローンのPCR増幅断片のアガロースゲル電気泳動

Lane 1, 2 : コントロール (鋳型DNAを加えずにPCR)  
 Lane 3 : Marker ( $\phi$  x-174 DNA/HaeIII)  
 Lane 4~8 :  $\lambda$  EHC11, 13, 12, 15 の各クローン  
 Lane : Marker ( $\lambda$  DNA/HindIII)

ラグメントが増幅した $\lambda$ EHC11と、 $\lambda$ EHC15の二つのクローン(図2-8; Lane 4, 8)を選別し、解析を進めた。なお、この両クローンは、前項で述べたように、42merのオリゴヌクレオチドプローブともハイブリダイズし、シグナルペプチド部分まで含んでいると考えられた。

まず、精製した $\lambda$ EHC11と15のインサートを、T4-キナーゼによって末端をリン酸化した後、SmaIで消化したpUC118プラスミドにライゲーションし、E. coli JM109株に形質転換した。その結果、多数の白いコロニーが見られ、それぞれのクローンから8コロニーずつ選んで、プラスミドを調製した。合計16のプラスミドを、SacI/XbaIで二重消化し、インサートを切り出してアガロースゲル電気泳動によって長さを確認した。しかし、いずれのプラスミドもpUC118自体の長さに相当する3.1kb付近にのみバンドが見られ、850 bp以上のインサートは、認められなかった。この原因の一つには、PCRで増幅したフラグメントは、末端の塩基が必ずしも平滑末端になっていないことが挙げられる。従って、ライゲーションの効率が悪くなり、混入した短いDNAフラグメントとのライゲーションや、ベクターの末端塩基の分解などが起こった可能性が考えられた。この問題の解決法として、5'→3'ポリメラーゼ活性と、3'→5'エクソヌクレアーゼ活性を持つ、T4ファージのDNAポリメラーゼによる末端の平滑化反応を行う方法が考えられた。しかし、その場合にも、接着末端のライゲーションよりも効率の悪い平滑末端ライゲーションを行なう必要があり、確実な方法とは考え難かった。

そこで次に、PCRで増幅されたフラグメントが、両端近辺に $\lambda$ gt10のクローニングサイトに由来するEcoRI切断部位を持つことに着目し、EcoRIによりインサートを切り出し、EcoRIの接着末端でライゲーションを行い、サブクローニングする計画を立てた。但し、EH遺伝子中には、EcoRI切断部位が少なくとも一つ存在することが既に明らかにされており、この計画

では、一つのインサートから、2つ以上のフラグメントが生じ、それぞれをサブクローニングする必要があると予想された。最も長いインサートを持つλEHC11のPCR増幅フラグメントをEcoRIで消化し、アガロースゲル電気泳動したところ、0.4kb、0.5kbの2つのフラグメントが検出された。この時点では、5'末端、3'末端の非翻訳領域の長さが不明で、どちらのフラグメントが、どちらの末端を含むのかは、判断できなかった。0.4kb、0.5kbのフラグメントをアガロースゲルから切り出して精製し、各々EcoRIで消化したpUC118プラスミドにサブクローニングし、それをE. coli JM109株に形質転換した。インサートの入ったpUC118が導入された白色のコロニーを、各々の実験区から8コロニーずつ拾い、プラスミドを調製したところ、ほとんどのクローンで0.4kb、或いは、0.5kbのインサートが確認できた。

これらのクローンを、M13-F、M13-Rのプライマーを用いて、ダイデオキシ法による塩基配列の分析<sup>80)</sup>を行った。今回の配列分析では、従来の[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTPを用いたRI法と共に、蛍光ラベルした dideoxy NTP を用いるDNAシーケンサーによる分析も併せて行った。DNAシーケンサーによる分析は、RI法に比べ半分以下の150bp程度の配列しか正確には読み取れなかった。しかし、これは予備実験として試用したものであり、反応時のテンプレートDNA、ddNTP、プライマーの量などの反応条件の検討、実験操作の習熟などによって、分析能力の向上が期待できる。また、今回は蛍光色素をddNTPに導入した、Dye Deoxy™ Terminator法を用いたが、一般的にはプライマーをラベルしたDye Primer法の方が良好な結果が得られるという。そこで、Dye Primer法による反応も検討する余地がある。但し、Dye Primer法では、M13系のプラスミド、ファージ用の市販プライマーを使えない場合には、プライマーの蛍光ラベル化反応が必要になり、時間と労力がかかることを考慮しなければならない。

上記二種類の手法による配列分析の結果を、図2-9に示した。0.4kbのインサートを持つクローンからは、シグナルペプチドのAla<sup>-13</sup>をコードする配列付近から終止コドン下流54残基のEcoRI切断部位までの配列が読み取れ、このインサートにcDNAの上流域が含まれていることが明らかになった。しかし、0.4kbのインサートの分析では、3クローンを分析したが、全てのクローンでM13-Fと-Rのどちらをプライマーにした場合にも、インサートの5'末端付近にアクリルアミド電気泳動のゲル上でバンドの縮重が見られ、配列が読み難かった。そこで、アンチセンスの57mer、36mer、17mer(図2-1)、42mer(図2-6)のオリゴヌクレオチドをプライマーに用いて、0.4kbのクローンの配列分析を行った。その結果、翻訳開始メチオニン残基をコードするATGコダンの上流12bpまでの配列が明らかになった(図2-9)。しかし、5'末端部分は、相変わらず縮重が起こり、インサートのすべての配列は決められなかった。この縮重は、配列分析のポリメラーゼ反応の際に、基質としてdGTPの代わりに2'-deoxy-inosine triphosphate(dITP)<sup>8,11</sup>、或いは、2'-deoxy-7-deaza-guanosine triphosphate(dc<sup>7</sup>GTP)<sup>8,21</sup>を用いた場合にも、解消されなかった。これらの基質は、いずれもグアノシンを置換することで、水素結合3カ所で強く結合するGCベアーによる二次構造の形成を回避することのできる基質であるが、顕著な改善はみられなかった。

0.5kbのインサートを持つクローンの分析では、poly(A) tail からcDNA中のEcoRI切断部位まで、3'末端非翻訳領域の392残基の配列が明らかになった(図2-9)。また、poly(A) tail 近傍など、M13-F、-Rのプライマーからの分析では配列が読みにくい部分があったため、さらに3'末端非翻訳領域にアニールする、33mer、34merのオリゴヌクレオチド(図2-9)をプライマーに配列分析を行い、配列を確認した。

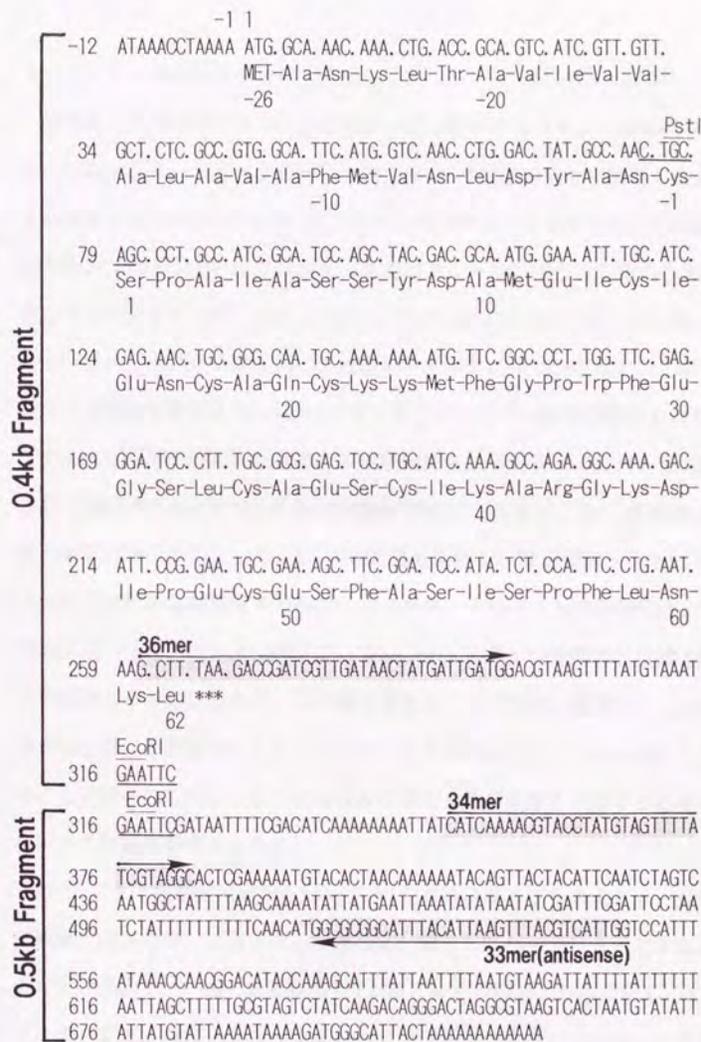


図2-9 λEHC15の塩基配列と、EcoRI消化断片

5', 3'末端配列分析に用いた各種のプライマー、及び、PstI、EcoRI切断部位を図中に示した。特に、3'末端配列分析に用いた新たに合成したオリゴヌクレオチドプローブは、( )を付した。

### 1-3-3 まとめ及び考察

前項の $\lambda$ gt10ライブラリーから得られたcDNAクローン、pEHC01をプローブにし、 $\lambda$ gt11をベクターにしてカイコ5令幼虫の脳から調製したEHcDNAライブラリーの $2.5 \times 10^5$ クローンをスクリーニングした。その結果、新たに、プローブとハイブリダイズする14クローンが得られ、そのうち、長いインサートを含み、42merのプローブともハイブリダイズしたクローンのインサートをPCR法を用いて増幅し、サブクローニングした。このクローンを解析したところ、図2-9に示すように、アミノ酸26残基からなるシグナルペプチドを含む、88残基のEH前駆体をコードするcDNA上の読み取り枠が明らかになり、3'末端非翻訳領域も、poly(A) tail まで440塩基の配列が明らかになった。5'-末端の塩基配列も、翻訳開始メチオニンコドンの上流約10塩基程度が明らかになったが、それより上流の領域は、配列分析を行うと、ゲル上に強いコンプレクションシグナルが現れ、正確な配列の読みとりが妨げられた。この様な現象は、GCの多い配列や、二次構造を作り易い配列を持ったDNAを分析する場合などにしばしば観測されることが知られている。EHcDNAの場合、この現象を回避するために、次のような戦略が考えられた。

1) ここまで塩基配列分析を行ってきた2本鎖DNAプラスミドは、調製が簡単ではあるが、プライマーが相補鎖と競合してハイブリダイズすることなどが原因で、一般に塩基配列が1本鎖DNAの場合よりも解析しにくい。そこで、EHcDNAクローンは、pUC118ファージミドにクローニングされていることを利用し、M13 K07などのヘルパーファージを用いて1本鎖DNAを調製し、その塩基配列分析を行う<sup>72)</sup>。2) 二次構造が不安定化する高温条件(60~70°C)で配列分析の伸長反応を行えるDNAポリメラーゼ(Taq polymerase など)を用いた分析を行う<sup>83)</sup>。3) 伸長反応の際、反応系

にsingle strand binding protein を加え、二次構造の形成を回避する。

4) dITP や dc7GTP などの核酸塩基誘導体を含んだデオキシヌクレオチドを、dGTPの代わりに用いた伸長反応を行う<sup>81), 82)</sup>。

このうち、3)、4)については、前述したように検討を行ったが、現在まで問題の解決には至っていない。

$\lambda$ EHC11は、配列分析のポリメラーゼ反応の際にフラグメントの脱落が起こっていないとした場合、PAGEのゲル上のバンドの泳動距離から、5'末端の非翻訳領域を18塩基程度しか含んでいないと考えられた。後述のプライマー伸長実験の結果では、この領域は66塩基の長さがあることが示され、それを考慮すると、 $\lambda$ EHC11も、5'末端は完全長のものより40塩基以上短いことになる。現在までに得られたクローンの内、 $\lambda$ EHC11は最も長いインサートを持っており、より長い5'末端領域を持つインサートを含むクローンを得るためには、新たなスクリーニング操作が必要であると考えられた。

#### 1-4 プライマー伸長法による mRNA 5' 末端領域の解析

前項で述べたように、cDNAの5'上流域の配列分析では、問題が生じ、正確な配列の決定が困難であった。また、配列が分析できた場合でも、5'末端領域は最も長いクローンで18塩基程度しか含んでいない可能性が考えられた。そこで、新たに解析を行う前に、5'末端領域の長さを明らかにするために、プライマー伸長法による分析<sup>6,3)</sup>を行った。

プライマー伸長法は、一般に mRNA 転写開始部位の決定のため、S1 マッピング法などと共に用いられる。この方法は、まず、mRNA と相補的なオリゴヌクレオチドをプライマーとして逆転写反応を行い、合成された cDNA を PAGE で分析する。そして PAGE で展開する際、同時に、転写開始部位付近の配列を持つゲノム DNA を同じプライマーを用いて配列分析反応を行った反応液を、隣接するレーンに展開し、cDNA のバンドの位置を対照することで転写開始部位の塩基を決定することができる。しかし、EH 遺伝子の場合は、まだ転写開始部位付近の領域を含むエクソンが単離されていない。そこで、pEHC01 (第1節-2-3参照) のダイデオキシ法による配列分析反応物をサイズマーカーとして用い、mRNA の5'末端の塩基鎖長を明らかにすることを目的に、プライマー伸長法を行った。

プライマー伸長法では、類似した配列へのプライマーのアニール、mRNA の二次構造形成などによる逆転写反応の停止、或いは、mRNA の分解などが原因で、通常は PAGE 上に複数の cDNA のバンドが得られる。ゲノム DNA からの情報がない場合、cDNA の長さの情報だけで意味のあるバンドを特定することは難しい。そこで、プライマーに、アンチセンスの36mer (図2-1)、及び、42mer (図2-6) の2種類のオリゴヌクレオチドを用いて逆転写反応を行った。この2種類のプライマーは、EH mRNA 上の互いに171塩基離れた位置にアニールする。従って、5'末端が等しい mRNA

Lane : 1 2 MARKER

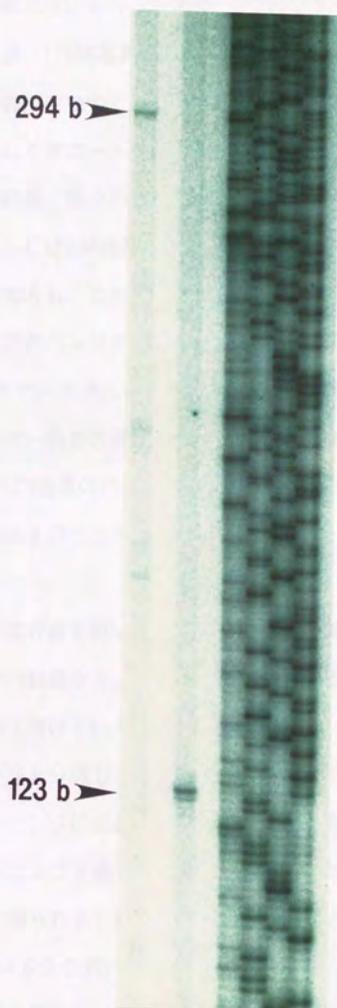


図2-10 プライマー伸長法によるEHmRNAの分析

Lane 1 : 36mer プライマーからの伸長

Lane 2 : 42mer プライマーからの伸長

MARKER : pEHC01 の、36mer プライマーを用いた  
ダイデオキシ反応産物

を鋳型に逆転写反応を行った場合、2つのプライマーから正確に逆転写された cDNA は、171塩基異なる長さを持つと考えられる。即ち、両方のプライマーからの反応物中で、丁度171塩基異なる鎖長のものが得られれば、それらは、正しくアニールしたプライマーからの逆転写物である可能性が高い。その結果、各々の反応物を PAGE で展開したところ、36mer プライマーのレーンには294塩基の、42mer プライマーのレーンには123塩基の濃いバンドが認められ、これらの長さは、171塩基異なっていた(図2-10)。このことから、このバンドが、EH mRNA の逆転写物であると考えられた。42mer プライマーがアニールする位置から、翻訳開始メチオニンまでの配列は、プライマー自身の長さも含めて57塩基である。従って、PAGE 上で認められた123塩基のバンドから計算して、EH mRNA は、66塩基の5'末端非翻訳領域を持つと予想された。

#### 1-5 PCR法を用いた mRNA 5'末端領域の解析

前項までの結果から、今までに得られている cDNA クローンは、5'末端が40bp以上欠けていることが明らかになり、全領域を解析するには、新たなクローンを分離し、解析する必要があると考えられた。しかし、新たなスクリーニングには多大な労力と時間を必要とするため、ライブラリーのスクリーニングを経ずに、短時日で、5'末端の配列がより長く含まれたクローンを得られると期待される、アンカーとなる配列を利用した PCR 法(アンカー PCR)<sup>84)</sup>による解析を試みた。

その概略を図2-11に示した。即ち、まず mRNA を鋳型に逆転写酵素を用いて 1st strand cDNA を合成し、その 3'末端に、terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) を用いて poly(G)配列を付加する。この cDNA に、付加した poly(G)とハイブリダイズする poly(C)配列を持った

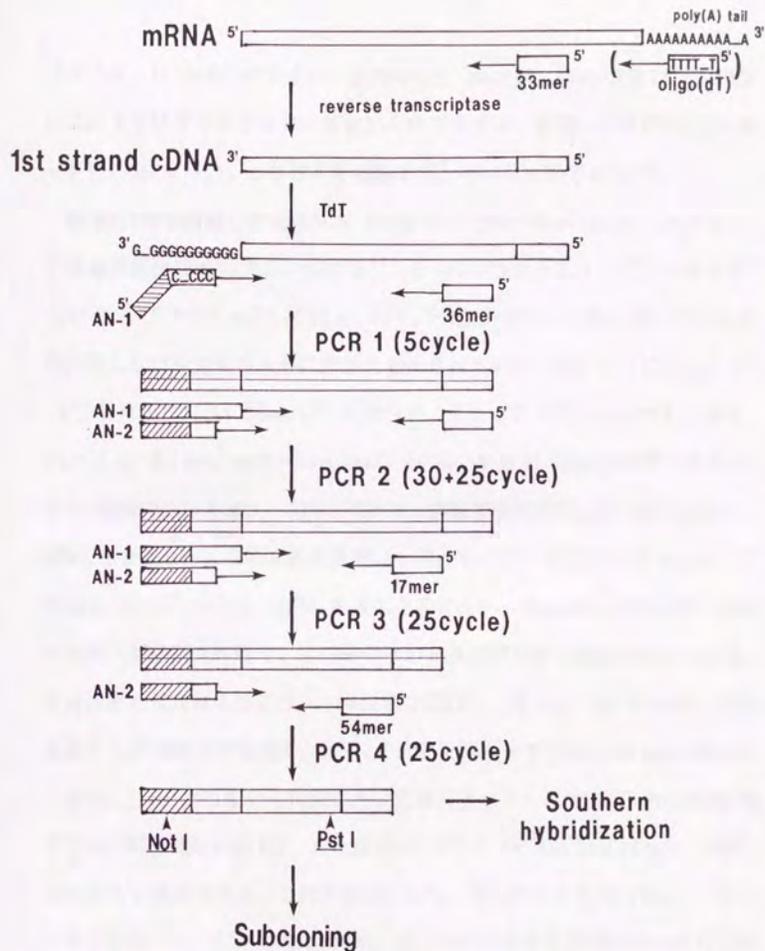


図2-1-1 アンカーを用いたPCR法（アンカーPCR）の概略

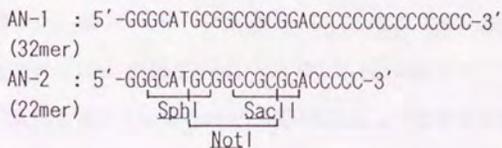


図2-1-2 アンカーPCRに用いたオリゴヌクレオチドプライマー、AN-1 (32mer)、AN-2 (22mer)。

プライマー(これを“アンカー”と呼ぶ)と、poly(A) tail または既知の配列にハイブリダイズするアンチセンスのプライマーを用いてPCR(アンカーPCR)を行い、cDNAを増幅する、というものである<sup>64)</sup>。

第1節-1項で調製した全RNA 10 $\mu$ g に、18mer のoligo dT、または、3'末端非翻訳領域にアニールするアンチセンス33merオリゴヌクレオチド(図2-9)をプライマーとして加え、65°C 5分加熱変性した後、ゆっくりと室温に戻しながら全RNA中に含まれるmRNAのpoly(A) tailにoligo dTを、EHmRNAに36merプライマーを、それぞれアニールさせた。次に20unitのMoloney murine leukemia virus (M-MLV) 逆転写酵素と基質となる4種類のdNTPを加え、37°C、1時間、逆転写反応を行って1st strand cDNAを合成した。この逆転写酵素は、現在広く用いられているavian myeloblastosis virus (AMV) 由来のものに比べ、RNaseH 活性が弱いためmRNAが分解され難く、より長いcDNAを得やすい特長を持っている。合成されたcDNAはエタノール沈澱で回収し、それにTdT 10unit、及び、基質として1mM GTPを加え、37°C、1時間反応させて、1st strand cDNAの3'末端に、poly(G)配列を付加した。これによって、3'末端にpoly(G)配列を持ち、5'末端にpoly(T)、または33merプライマーの配列を持った一本鎖cDNAが調製された。これを鋳型にして、次にPCRを行った。

PCR法では、3'末端のpoly(G)とアニールさせるプライマーとして図2-12に示したAN-1とAN-2の2種類を、5'末端の側のプロンプには、18merのoligo dT、または、アンチセンスの54mer、36mer、17mer(図2-1)を適宜選んで用いた。AN-1、-2は、5'末端に、SacII、NotI、SphIの制限酵素切断部位が含まれる17merの塩基を付け、3'側に、poly(G)とアニールするoligo dCの配列を持っているもので、河野強氏により設計されたものを御供与頂いた。PCRでは、プライマーのアニール後、DNA鎖の合成が進んで

行くプライマーの3'末端側は、正確にハイブリダイズする配列を持つ必要があるが、5'末端側については、このAN-1,-2のように、全く異なる短い配列が付加されても、ハイブリダイズが妨げられない限り反応を進めることが出来る。特に今回の設計の場合、アニールする部分の塩基対が全てGCペアであり、他の塩基対に比べ、より強固な水素結合でハイブリダイズすると考えられる。従って、17塩基程度の付加は、ハイブリダイズの効率に大きな影響は及ぼさないと考えられた。

PCRは、まずはじめに、モル比で AN-1:AN-2=1:24 の割合で混合した AN-mixと、EHcDNA特異的な36merオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いた。この36merオリゴヌクレオチドは、図2-1に示した3種プライマーの内でもpoly(A) tailに近い領域にアニールするため、増幅後の断片は他の2種のプライマーがアニールする配列を含む。従って、反応物をさらに内側のプライマーを用いて増幅することができ、より特異的にEHcDNAを選択できると考えられた。鑄型には、33merのプライマーで逆転写反応を行ったcDNAを用い、変性94°C3分・アニール45°C3分・伸長72°C3分・5サイクルの条件でPCR(PCR 1)を行った。この初めの5サイクルでは、AN-1が、5'末端の15塩基のoligo dCの部分でpoly(G)とアニールし、poly(G)と36merのプライマーとハイブリダイズする配列に挟まれた領域が増幅することを期待した。続いて、初めの5サイクルで増幅したAN-1に由来する配列を末端に持ったフラグメントとAN-1,-2が、プライマーの全長で100%マッチしてアニールすることを期待して、アニール温度を55°Cに上げ、AN-1,-2と36merの間でのPCR反応を30サイクル行った(変性94°C2分・アニール55°C3分・伸長72°C3分)(PCR 2)。このPCR反応液をアガロースゲル電気泳動したところ、殆どDNAバンドが検出されず、十分に増幅が進行していなかったことが明らかになった。そこで、反応液にTag

polymerase 2.5 unit を追加し、さらに、変性94°C2分・アニール45°C3分・伸長 72°C5分・25サイクルのPCR (PCR 2)を行ったところ、全体にスメアーなDNA像が見られ、0.7kb付近には濃いバンドが認められた。mRNAの5'末端の長さを、62塩基と仮定すると(第1節-4項参照)、このPCRによって増幅されるフラグメントは、320bp程度と予想され、その位置には、バンドが見られなかった。そこで、さらに特異的にEHcDNAのフラグメントを増幅するために、反応溶液の一部を採り、AN-mix と 17merのプライマーを用いてPCRを行った。反応条件は、変性94°C2分・アニール45°C2分・伸長72°C5分・25サイクルと設定した(PCR 3)。これにより、36mer、17merの両方のプライマーとハイブリダイズする配列をもつDNAが選択的に増幅されると考えられた。これをアガロースゲル電気泳動にかけると、目的の250bp 付近にバンドが現れたが、そのほかの部分にも、スメア状にDNAが検出された。スメア状に少量のDNAが増幅される原因の一つに、AN-1が15merのoligo dC 配列を持つ為に、GC結合により相補性の低い領域にハイブリダイズし易くなり、非特異的にDNAが増幅されることが考えられた。そこでこの反応液を、アガロースゲル電気泳動にかけ、目的のバンドが含まれる230~280塩基の領域を切り出して精製し、これを鋳型に、oligo dC 配列が短いAN-2 と 54mer のプライマーでPCRを行った。反応条件は、非特異的なアニールをできるだけ抑えるためにアニール温度を高め、変性94°C1分・アニール55°C3分・伸長72°C5分・25サイクルと設定した(PCR 4)。その反応物を、各種のPCR条件検討を行った反応物と共にアガロースゲル電気泳動を行った(図2-13, A)。その結果、目的の230bp付近にDNAの幅広いバンドがみられた(Lane 7)が、ほかの領域にも、薄くスメアー状のDNAが検出された。これを、42merプローブを用い、65°Cでザザンハイブリダイゼーションを行ったところ、230bp のバン

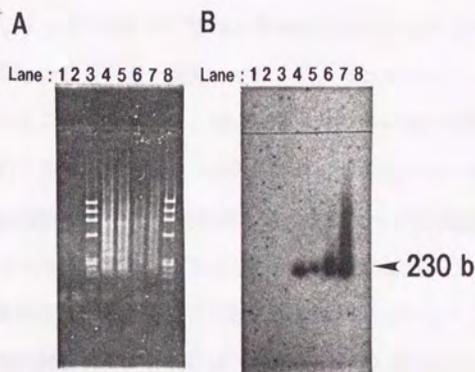


図 2-13 アンカードPCRによる反応物のアガロースゲル電気泳動、及び、サザンハイブリダイゼーション

A : アガロースゲル電気泳動

B : 42merプローブを用いたサザンハイブリダイゼーション

Lane 1 : 36mer - AN-mix (5+25 cycle)

Lane 2 : 同上 (oligo (dT) からの逆転写産物)

Lane 4 : 36mer - AN-mix (5+25 cycle)

→ 54mer - AN-mix (25 cycle)

Lane 5 : 36mer - AN-mix (5+25 cycle)

→ 17mer - AN-mix (25 cycle)

Lane 6 : 36mer - AN-mix (5+25 cycle)

→ 54mer - AN-mix (25 cycle)

→ 54mer - AN-mix (25 cycle) (70-1155°C)

Lane 7 : 36mer - AN-mix (5+25 cycle)

→ 17mer - AN-mix (25 cycle)

→ 54mer - AN-2 (25 cycle)

Lane 3, 8 : Marker ( $\phi$  x-174 DNA/HaeIII)

Lane 2 以外は、33merオリゴヌクレオチドをプライマーに用いた逆転写産物を、鋳型とした。

ドに強いシグナルが見られ(図2-13, B)、このフラグメントが、E H c DNAの5'末端領域を含んでいると判断した。Lane 7に見られるシグナルがスミアーになっているのは、増幅が予想より良好に進展して、アガロースゲルに展開したDNA量が過剰になり、テーリングを起こした可能性が高い。

増幅したフラグメントは、AN-2プライマー中のNotI切断部位と、E H c DNAの、シグナルペプチドのカルボキシル末端をコードする配列付近にあるPstI切断部位(図2-9)を利用して、この二つの制限酵素で二重消化し、サブクローニングする計画を立てた。未知の領域の中に、これらの制限酵素の切断部位が存在した場合には、全領域のサブクローニングが困難になるが、制限酵素の片方のNotIは rare cutter と呼ばれる8塩基認識の制限酵素で、切断部位が現れる確率は非常に低く、目的のDNA断片中に、これらの制限酵素切断部位が存在する可能性は、低いと考えられた。サブクローニングするベクターには、NotIとPstIでサブクローニングできるpGEM 5Zf(+)(PROMEGA社)を用いた。このプラスミドは、マルチクローニング部位の両脇にSP6とT7ファージのプロモーター領域を持つため、RNAプローブを合成することが出来、また、アンピシリン耐性、lacZ $\Delta$ M15の $\alpha$ -相補性、線状ファージの複製起点の配列<sup>95)</sup>があり、pUC118と同様の選択手法を利用することが可能であった。

そこで、pGEMをNotI、PstIで消化し、アガロースゲル電気泳動にかけ、消化断片を切り出して精製した。PCR反応液は、電気泳動ゲルから約230bp付近の領域を切り出して精製した後、NotI、PstIで消化した。この230bpフラグメント消化物と、pGEM/NotI/PstIベクターを混ぜてライゲーションし、E. coli JM109株に形質転換した。次に、インサートの入ったプラスミドが導入された白いコロニーを、8コロニー拾い、プラスミドを調製した。これを、SalI、EcoRVで消化し、インサートを切り出して、アガロース

ゲル電気泳動を行った。その結果、7コロニーで約250bpのフラグメントが確認された。このゲルを、42merプローブを用いて60°Cでサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、すべてのクローンで、約250bpのフラグメントに、ハイブリダイズしたシグナルが検出された。

そこで、これらのクローンについて、M13-Fと-Rのプライマーを用いて、配列分析を行った。その結果、翻訳開始メチオニンコドンの上流に、72塩基の5'末端非翻訳領域の配列が明らかになった。図2-14に、十分に長い配列の読み取れた5クローンの配列を並べて示した。この図より分かるように、5クローン中3クローンは5'末端が6塩基短いインサートを持っていた。この短いクローンの非翻訳領域の長さは、66塩基で、第1節-5項のプライマー伸長法の結果と一致する。cDNAの5'末端については、鋳型のmRNAには存在しない、末端に相補的な逆向きの配列が付加されていた例が、同じ昆虫のペプチドホルモンの一つであるポンピキシンのcDNAで知られており<sup>86)</sup>、この場合も、何らかの原因で、6塩基の配列が付加した可能性も考えられた。しかし、この6塩基の配列には、付近の配列との相同性、相補性は見られなかった。一方、昆虫の遺伝子の転写開始点の配列については、5' ATCAG/TTC/T 3' というコンセンサス配列が、報告されているが<sup>87)</sup>、非翻訳領域72塩基の5'末端の配列は、このコンセンサス配列と良く一致した。以上のことを考え合わせると、本来の5'末端非翻訳領域は、72塩基の長さがあり、プライマー伸長法や、3クローンで見られた66塩基の配列は、不完全なものであったと考えられる。但し、同じ66塩基の位置までのcDNAが、優先的に生じることを考慮すると、mRNAの2次構造の形成など、部位特異的に逆転写反応が停止し易い構造を取っている可能性がある。また、全体に塩基置換が起こっていると思われるものが非常に多く、5'末端非翻訳領域では、明らかになった5クローンの全配列の5.0%が誤っていた。特に

1 37 50  
 5' ATCAAAGCCACATTCTGAAGTGAATCGGCTAGAGGAGAGCATCAAGAAA

A ATCAAAGCCACATTCTGAAGTGAATCGGCTAGAGGAGAGCTTCAAGAAA  
 B ATCAAAGCCACATTCTGAAGTGAATCGGCTAGAGGGAGCATCAAGAGA  
 C ———GCCACATTCTGAAGTGAATAGGCTAGAGGAGAGCATCAAGAAA  
 D ———GCCACATTCTGAATTAGAATC—GCCAGAGGGAGCATCAAGAAA  
 E ———GCCACATTCTGAAGTGAATCGTCTAGAGAGAGCATCAAGAAA

54 57 72  
 CATTCAGCCAATAAACCTAAAAATGGCAAACTGACCGCAGTCATCG 3'

A CATCCAGCCAATAAACCTAAAAATGGCAAGCAAAGTGAAGGCAGTCATCG  
 B CATGCAACCAATAAACCAAGAATGGCAAACTGACCGCAGTCATCG  
 C CGTTCAACCAATAAACCTAAAAATGGCAAACTGACCGCAGTCATCG  
 D CATTAGCCAATAAACCTAAAAATGGCAAACTGACCGCAGTCATCG  
 E CATTCAGCCAATAAACCTAAAGGTGGCAAACTGACCGCAGTCATCG

図 2-14 PCR法で明らかになったEHmRNA5'末端の塩基配列

塩基番号を付した最上段は、分析した5クローン (A~D) の共通の配列を示す。但し、(▽)で示した塩基は、確定していない。分析過程で置換が起ったと考えられる塩基は、(●)で示した。翻訳開始メチオニンコドンには、下線を付した。

3カ所で(図2-14、塩基No. 37, 54, 57)、5クローン中2クローンに同じ塩基への置換が見られ、正しい塩基を確定することが出来なかった。PCR法に於いては、Taq polymerase の読み間違いが、他のDNAポリメラーゼに比べて高頻度で生じることが知られている<sup>79)</sup>。しかし、読み間違いの起こる頻度は、一連の増幅反応全体で、約0.25%とされており<sup>88)</sup>、シングルコピーの鋳型から30~50サイクル反応させた場合でも、数学的な解析によれば、予想されるエラーは1%程度とされ<sup>89)</sup>、5%のエラーは、非常に高率であるといえる。一方、エラー率の高くなる原因として、サイクル数が多いことや、低いdNTP濃度(1 $\mu$ M以下)などの条件が報告されているが<sup>90)</sup>、今回の一連のサブクローニングでは、4回のPCRで合計110サイクルの反応が行われていることを考えると、サイクル数が多いためにエラーが蓄積されたことも考えられる。また、5'末端の領域はGC塩基の多い配列となっており、前項のcDNAの配列分析で問題が生じたように、PCRに於いても2次構造の形成がエラーの原因になっている可能性もある。

#### 1-6 まとめ及び考察

EHcDNAの解析を目的に、カイコ幼虫の脳からmRNAを抽出し、 $\lambda$ gt10ライブラリーを作製した。このライブラリーの12,000クローンをスクリーニングし、EHcDNAクローン、 $\lambda$ EHC01を得た。このクローンを分析したところ、mRNAの3'、5'両末端に対応する部分を欠く不完全なものであった。そこで、さらに $\lambda$ gt11ライブラリーの $2.5 \times 10^5$ クローンをスクリーニングした。その結果、アミノ酸26残基のシグナルペプチドと62残基のEH本体をコードする、267塩基の読みとり枠、及び、poly(A) tail に至る440塩基の3'末端非翻訳領域が明らかになった。PAGEゲル上で、バンドの縮重が起り、解析が困難であった5'末端領域については、mRN

Aの逆転写とアンカードPCR法(図2-11)を用いて解析し、72塩基の5'末端非翻訳領域の配列を明らかにした。

以上の結果を図2-15にまとめた。第1節-5項で触れたように、5'末端の4塩基は、Hultmarkら<sup>97)</sup>が、ショウジョウバエ(*Drosophila*)やカイコの遺伝子を比較して見出した、昆虫の転写開始部位のコンセンサス配列、5' ATCAG/TTC/T 3'に一致した。翻訳開始部位(AUG)付近の配列は、Kozak<sup>91) 92) 93)</sup>により脊椎動物の遺伝子について研究され、5' CANCAUGG 3'というコンセンサス配列が見出されている。しかし、無脊椎動物である昆虫に於いては、このコンセンサス配列が当てはまらない例も見出された。そこで、Cavener<sup>94)</sup>は、77種類の*Drosophila*の遺伝子について同様の検討を行い、*Drosophila*のコンセンサス配列として5' C/AAAA/CAUG 3'を報告した。さらに、*Drosophila*では、AUGコドンの上流10塩基中8塩基でAが現れる確率が最も高く、脊椎動物ではCが優先しているのとは対照的であった。カイコEHC DNAは、AUGコドン付近の配列(AAAAAUGG)は、*Drosophila*のコンセンサス配列を完全に満足し、さらに、上流10塩基中7塩基がAであった。また、タバコスズメガEH<sup>50)</sup>のこの領域の配列(AACAAUGG)とも、類似していた。脊椎動物で、コンセンサス配列とされている+4塩基目のGについては、*Drosophila*では、特にGに偏った傾向は見られていないが<sup>94)</sup>、EHC DNAでは、+4塩基はGであった。

翻訳開始AUGコドンから下流の配列にコードされるペプチドのうち、メチオニンに続くアミノ酸26残基は、分泌型のペプチドに見られるシグナルペプチドの配列と考えられた。シグナルペプチドは、真核生物では、通常生合成直後に小胞体内に輸送される際に、膜の通過を開始させる役割を持ち、膜通過後には、小胞体内のプロセッシング酵素で、速やかに切断、消化される。従って、ペプチドとして単離することは困難であり、遺伝子の情報

- 1 ATCAAAGCCACATTCTGAACTAGAATCGGCTAGAGGAGCATCAAGAAACATTCAAGCA
- 161 ATAAACCTAAAA ATG. GCA. AAC. AAA. CTG. ACC. GCA. GTC. ATC. GTT. GTT.  
MET-Ala-Asn-Lys-Leu-Thr-Ala-Val-Ile-Val-Val-  
-26 -20
- 105 GCT. CTC. GCC. GTG. GCA. TTC. ATG. GTC. AAC. CTG. GAC. TAT. GCC. AAC. TGC.  
Ala-Leu-Ala-Val-Ala-Phe-Met-Val-Asn-Leu-Asp-Tyr-Ala-Asn-Cys-  
-10 -1
- 151 AGC. CCT. GCC. ATC. GCA. TCC. AGC. TAC. GAC. GCA. ATG. GAA. ATT. TGC. ATC.  
Ser-Pro-Ala-Ile-Ala-Ser-Ser-Tyr-Asp-Ala-Met-Glu-Ile-Cys-Ile-  
1 10
- 196 GAG. AAC. TGC. GCG. CAA. TGC. AAA. AAA. ATG. TTC. GGC. CCT. TGG. TTC. GAG.  
Glu-Asn-Cys-Ala-Gln-Cys-Lys-Lys-Met-Phe-Gly-Pro-Trp-Phe-Glu-  
20 30
- 241 GGA. TCC. CTT. TGC. GCG. GAG. TCC. TGC. ATC. AAA. GCC. AGA. GGC. AAA. GAC.  
Gly-Ser-Leu-Cys-Ala-Glu-Ser-Cys-Ile-Lys-Ala-Arg-Gly-Lys-Asp-  
40
- 286 ATT. CCG. GAA. TGC. GAA. AGC. TTC. GCA. TCC. ATA. TCT. CCA. TTC. CTG. AAT.  
Ile-Pro-Glu-Cys-Glu-Ser-Phe-Ala-Ser-Ile-Ser-Pro-Phe-Leu-Asn-  
50 60
- 331 AAG. CTT. TAA. GACCGATCGTTGATAACTATGATTGATGGACGTAAGTTTTATGTAAT  
Lys-Leu \*\*\*  
62
- 388 GAATTCGATAATTTTCGACATCAAAAAAATTATCATCAAAACGTACCTATGTAGTTTTA  
448 TCGTAGGCACCTCGAAAAATGTACACTAACAAAAATACAGTTACTACATTCACATCTAGTC  
508 AATGGCTATTTTAAAGCAAAATATTATGAATTAATATATAATATCGATTTTCGATTCCTAA  
568 TCTATTTTTTTTTCAACATGGCGCGCATTTACATTAAGTTTACGTCATTGGTCCATTT  
628 ATAAACCAACGGACATACCAAGCATTTATTAATTTAATGTAAGATTATTTATTTTTT  
688 AATTAGCTTTTTGCGTAGTCTATCAAGACAGGGACTAGGCGTAAGTCACTAATGTATATT  
748 ATTATGTATTAATAAAGATGGGCATTACTA  
△

図 2-15 EHcDNAの全塩基配列

アミノ酸26残基のシグナルペプチド、及び、62残基のEH本体の  
アミノ酸配列を共に記した。poly(A) 付加シグナル(2ヶ所)は、下線  
で示し、poly(A) tail 付加部位は、(△)で示した。5'末端非翻訳  
領域の、(●)で示した3つの塩基は確定されていない(本文参照)。  
各行の左に、5'末端からの塩基数を示した。

によって初めて構造が明らかになった。シグナルペプチドは、一般に、N-末端領域に塩基性アミノ酸を持ち、中央部には長い疎水性アミノ酸に富んだ領域がある。そして、C-末端の切断部位付近には、極性アミノ酸が位置している<sup>75)</sup>。また、切断部位付近については、さらに詳しい解析が行われた<sup>95)</sup>。即ち、切断部位の-1残基目には、Ala, Ser, Gly, Cys, Thr, Gln などのアミノ酸が見られ、-3残基目には、以下のアミノ酸が現れない；芳香族(Phe, His, Tyr, Trp)、電荷を持つもの(Asp, Glu, Lys, Arg)、炭素鎖の長い極性の側鎖を持つもの(Asn, Gln)。EHのシグナルペプチドは、N-末端から5残基目に、塩基性アミノ酸(Lys)があり、中央部分には、疎水性のAla, Val, Ileなどに富んだ領域があり、C-末端には-1残基目にCys、-3残基目にAla、が位置している。これらの特徴は、すべて、上記の一般的特徴を満足し、また、ハイドロパシープロット(図2-16)からも読みとることができる。シグナルペプチドに続く、アミノ酸62残基の配列の内、N-末端から61残基は、ペプチドの分析によって明らかになった配列<sup>43)</sup>と一致した。また、C-末端のLeu残基の存在も、HPLCを用いたペプチドフラグメントの保持時間の比較から、間接的に示唆された結果<sup>46)</sup>と矛盾しない。

真核生物のmRNAでは、一般に poly(A) tail 付加シグナルとなる、5'AAUAAA3'、または、5'AUUAAA3'などの配列が、poly(A) tail 付加部位の約20塩基上流に見られる<sup>96)</sup>。EHcDNAでは、3'末端には、440塩基の長い非翻訳領域がみられ、poly(A) tail 付加部位の上流25~20塩基に5'AAUAAA3'、20-15塩基に5'AUUAAA3'の、配列が見られ、これらは poly(A) tail 付加シグナルと考えられた。

以上の考察の結果、EHcDNAの779塩基の配列は、一般的にcDNAで解析される特徴をすべて満足し、EHmRNAの全構造を含んでいることが明らかにされた。但し、1-5項で触れた5'末端非翻訳領域の3カ所の塩

基については、解析した5クローンのうち、2つに置換が起こっており、さらに多くのクローンの解析、或いは、ゲノムDNAの解析から確認する必要がある。

緒言に述べたように、Horodyskiら<sup>50)</sup>によってタバコスズメガのEH cDNAの配列が明らかにされている。両種のEHのcDNAを、ホモロジーマトリクス法<sup>97)</sup>で比較したものを、図2-17に示した。EH本体のペプチドをコードする部分で、塩基配列のホモロジーが高く、特に、Cysが3残基集中するN-末端側の約1/3の領域で、塩基が良く保存された領域が続いている。ペプチドの構造解析の研究から、N-末端の6残基は、活性発現にあまり関与していないことが示唆されているが<sup>98)</sup>、塩基レベルでもN-末端10残基までは、ホモロジーの低い領域が存在し、塩基置換が許容される領域であると考えられる。ホモロジーの高いMet<sup>11</sup>~Met<sup>24</sup>の領域は、アミノ酸レベルでも完全に保存されており、この領域が活性発現に関与している可能性が考えられる。図2-16に両種のEH前駆体(preEH)の疎水性、親水性領域をハイドロパシープロットで示し、比較した。この図からも、Met<sup>11</sup>~Met<sup>24</sup>が保存され、この中にLys<sup>22</sup>付近の親水性領域が含まれていることが分かる。Cys<sup>21</sup>とCys<sup>49</sup>がジスルフィド結合を作っていること<sup>98)</sup>を考慮すると、このLys<sup>22</sup>付近の親水性領域は、もう一つの保存されている親水性領域、Glu<sup>48</sup>-Ser<sup>51</sup>と空間的に近い位置に存在すると考えられ、分子の表面に位置してレセプターの認識などに関与している可能性も考えられる。ホモロジーマトリックスでも、Glu<sup>48</sup>-Ser<sup>51</sup>に相当する領域は、高いホモロジーを示している。

今後、大腸菌やバキュロウイルスなどを用いた、EHの発現、生産系<sup>99)</sup>の改良と、各種の突然変異導入によるタンパク工学的手法により、EHの活性発現に関わる高次構造の解析が期待される。

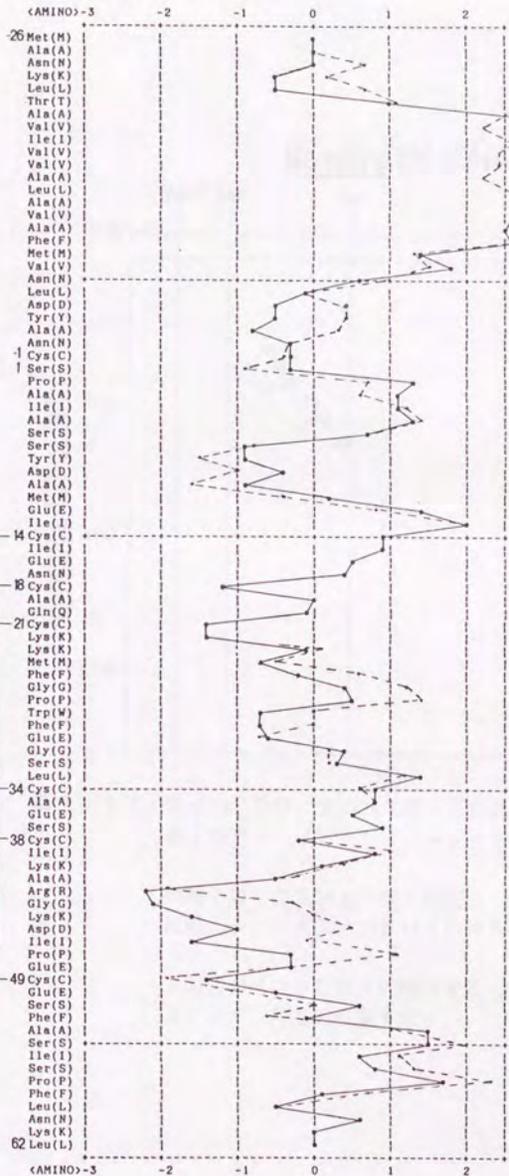


図 2-16 カイク、及び、タバコスズメガのEH前駆体ペプチドの  
ハイドロパシブロット

図下部に、カイクEH前駆体のアミノ酸配列を示し、  
ジスルフィド結合で架橋するシステイン残基を、線で結んだ。

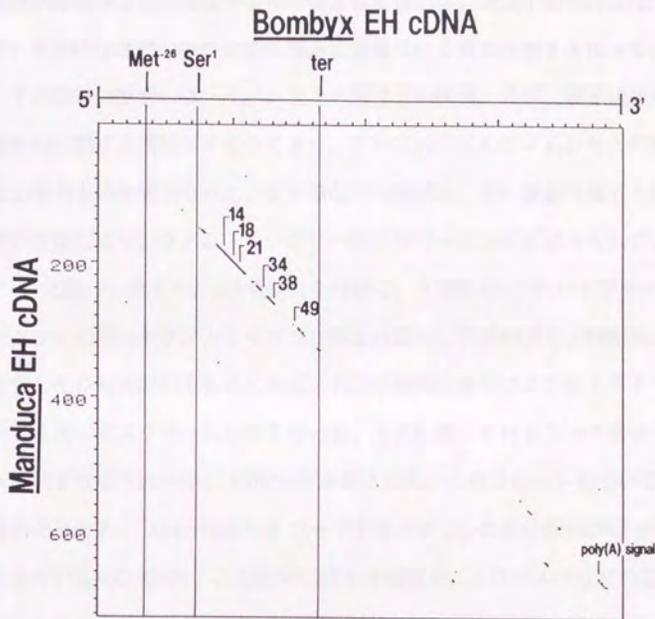


図2-17 カイコ、及び、タバコスズメガEHの、cDNA塩基配列  
ホモロジー (Harr plot)

横軸：カイコEHcDNA配列

縦軸：タバコスズメガEHcDNA配列

上段にカイコcDNAの構造を示し、図中の番号は、  
システイン残基の位置を示す。

## 第2節 カイコ羽化ホルモンのゲノムDNAの解析

発現調節機構などの遺伝子自体に含まれる機能は、遺伝子産物の生理作用を、生物の生活環の中の特定の場所に位置づける重要な働きを担っている。その機能の解析には、ゲノム上での遺伝子の構造、及び、調節領域の塩基配列に関する情報が不可欠であり、EHに於いてもゲノムDNAの解析は必須のものと考えられた。EH遺伝子の解析は、先に筆者の属する研究室の佐藤により、ゲノムライブラリーのスクリーニングが試みられている<sup>47)</sup>。佐藤は、まずカイコ3令幼虫を材料に、λEMBL3バクテリオファージをベクターに用いてゲノムライブラリーを作製し、EHのアミノ酸配列から推定したDNA配列をもとに合成された三種類のオリゴヌクレオチドプローブを用いてスクリーニングを行った。その結果、EHをコードするDNA配列を含むクローン、λEH201が単離された。このクローンについて配列分析が行われ、Ala<sup>5</sup>-Leu<sup>62</sup>をコードするエクソンの部分配列が明らかにされている(図・緒-3)。この配列に関する情報が、cDNAの分析の際に用いられたことは、前節で述べた通りである。しかし、佐藤の解析したエクソンの5'側には、真核生物のスプライスジャンクションのコンセンサス配列<sup>101)</sup>に一致する塩基配列がみられ、この部分にイントロンの介在が認められた。従って、EHのN-末端領域をコードする配列は、明らかにされていない。また、終止コドンより3'側の領域についても、わずかに54塩基の配列が明らかになったに過ぎず、poly(A) tail 付加シグナル配列などを含むと考えられる3'末端非翻訳領域のほとんどについて、情報が得られていなかった。そこで、EH遺伝子の全構造を明らかにするために、新たにゲノムDNAの解析を行った。

## 2-1 EHアミノ末端領域をコードするエクソンの解析

ゲノムDNAクローン、λEH201は、前述したように、12 kbの全インサートの3.3%に当たる0.4 kbしか配列が決定されておらず、未解析の部分に有用な配列情報を含んでいることが予想された。そこで、まず、λEH201について、EHのアミノ末端領域を含むエクソンの探索から実験を開始した。

### 2-1-1 アミノ酸配列を基に設計したプローブを用いた解析

未知のエクソンの解析は、λEH201の制限酵素地図の作製し、サザンハイブリダイゼーションによって目的の塩基配列を含む断片の特定を試みた。まず、材料となるλEH201のDNAを調製した。ホストとなる大腸菌には、E. coli・P2 392株を用いた。この株は、P2阻害感受性(SPI)であり、SPI+の表現型のP2ファージが感染した場合には、溶原化しプラークを形成しない。しかし、λEMBL3は、ライブラリーを作製する際の組み替えによってSPI+の表現型に關与する遺伝子をスタッファー領域と共に失うため、λEH201などの組み替え体は、増殖してプラークを形成することが出来る。このE. coli・P2 392株に、適当に希釈してλEH201を感染させ、得られたファージ溶菌液の力価(pfu)を検定した後、多重感染度(moi) 0.01~0.03で、E. coli・P2 392株に感染させた。溶菌液上清から、ポリエチレングリコール(PEG)沈澱、CsCl密度勾配でファージ粒子を回収し、プロテイナーゼKで外皮蛋白を除いて、ファージDNAを得た。

得られたλEH201 DNAを、SalI、BamHI、EcoRIの各制限酵素を組み合わせで消化した後、アガロースゲル電気泳動を行った。泳動後、ゲル内のDNA断片を、ナイロンメンブレンにブロットニングした。ハイブリダイゼーションには、EHのアミノ末端5残基のアミノ酸配列に基づいて<sup>102)</sup>、昆虫の遺伝子におけるコドン使用頻度<sup>77), 103~7)</sup>を参考に合成した、15merの

混合オリゴヌクレオチド(図2-18)を、プローブとして用いた。このプローブの設計では、明らかになっているアミノ酸配列から推定できる塩基配列が、4塩基しかなかったため、プローブを少しでも長くし、より信頼性の高いハイブリダイズを行うために、5'末端に、スプライスジャンクションのコンセンサスシーケンス<sup>101)</sup>の一部である“GT”のアンチセンスである“AC”を2塩基つけ加えた。ハイブリダイズには、15A=13.8 pM、15T=21.4 pM となる濃度で2つのプローブを混合したもの(15mer mix)を用いた。また、既に解析されたエクソンを確認するために、アンチセンスの54merのプローブ(図2-1)を用いた。

λEH201 DNA を、SalI、BamHI、EcoRI、SalI/BamHI、SalI/EcoRI、で消化し、アガロースゲル電気泳動にかけた後、サザンハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション温度は、15mer mix は35°C、54merは65°Cと設定した。その結果、SalI/BamHIの5.1kbフラグメント、及び、その領域を含むフラグメントが、15mer mix とハイブリダイズし、ここにEHのアミノ末端をコードするエクソンが含まれていると考えられた。

#### 2-1-2 cDNA配列を基に設計したプローブを用いた解析

15mer mix プローブを用いた解析が、前項に記した段階まで進行した時点で、並行して進めていたcDNAクローンλEHC01の解析(前節参照)によって、シグナルペプチドの一部をコードする塩基配列が明らかになった。そこで、より信頼性の高い解析を行うために、シグナルペプチド領域の塩基配列を基に合成した42merのオリゴヌクレオチド(図2-6)をプローブに、λEH201 DNA の解析を行った。

はじめに、λEH201 DNA を、制限酵素SalI、SalI/XbaI、BamHI、BamHI/XbaI、XbaI、XbaI/EcoRI、EcoRIで消化し、アガロースゲル電気泳動にか

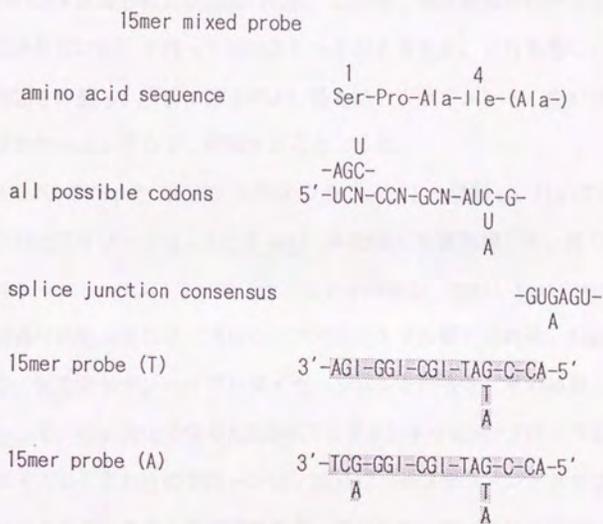


図 2-18 ゲノムDNAクローンの解析に用いた、15merの、2種類のオリゴヌクレオチドプローブ

対応するアミノ酸配列、及び、コンセンサス配列を併記した  
 N : A, U, G, C 、 I : Inosine

けた。それを、42merプローブを用いて65℃でサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、図2-19に示したように、各制限酵素のレーンに一つずつハイブリダイズするバンドが検出された。但し、EcoRI、BamHI消化のレーンでは、42merプローブとハイブリダイズする20kb以上の長いフラグメントのバンドが見られたが(図2-19, b)、これは、制限酵素消化が不十分で、消化されない断片が残って検出されたものと考えた。これを基に、制限酵素地図を作製し、解析に都合のよい最も短いフラグメント、XbaI-3.0kb をサブクローニングして、解析することとした。

$\lambda$ EH201をXbaIで消化後、3.0kb フラグメントを精製し、XbaIで消化したpUC118とライゲーションし、E. coli JM109株に形質転換した。生じた白いコロニーから、8コロニーのプラスミドを調製し、XbaI、XbaI/SalI、SalIの3通りの組み合わせで消化し、アガロースゲル電気泳動後、42merプローブで、65℃でサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、2つのクローンで、XbaI消化で生じた3.0kbフラグメントが42merプローブとハイブリダイズし、これらのクローンに、XbaI-3.0kbフラグメントがサブクローニングされていることが確認された。これらのクローンは、pEH2015、pEH2016 と名付け、まずpEH2015の配列分析を行った。

pEH2015のインサートは3.0kbの長さがあり、両端からの配列分析では、インサートの中央部の1~2kbは解析できない。しかし、末端近くに目的のエクソンが存在することも考えられる。そこで、まず、プローブにM13-Fと-Rを用いて両端からの配列分析を行った。その結果、両方のプライマーから、各々400bp程度の配列が明らかになったが、その中には、エクソンの配列は認められなかった。

上記の結果から、pEH2015は、端から400bp以上内側にエクソンが存在すると考えられた。pEH2015の様に長いインサートの配列を分析するには、以



下のような方法が考えられる。1)制限酵素消化してさらにサブクローニングする方法。2)明らかになった配列を基にプライマーを合成して少しずつ内側の配列を読んで行くウォーキング法。3)配列分析の際、Sequenase™などの改良されたDNAポリメラーゼを用いて、dNTP、ddCTPなどの基質濃度比を調整して長い伸長反応物を得る方法。4)クローニング部位からインサートを少しずつ削除した段階的欠損導入株を作製し、その配列を分析する方法<sup>108)</sup>。これらの方法の内、1)、2)は、5~10kb以上の配列分析には適しているが、pEH2015の様に3kb程度の分析には、時間と労力の面を考慮するとあまり適さないと判断した。3)は、最も手軽な方法であるが、それまでの経験では、正確に1kb以上を解読するのは困難であった。そこで、4)の段階的欠損導入株を用いる手法で解析することとした。

実験に用いたプラスミドは、切断部位が5'末端突出になる制限酵素でインサートの隣接部位を、3'末端突出になる制限酵素でプラスミド側を、各々切断し、次に2本鎖のDNAの片方の鎖を3'末端から消化して行くエクソヌクレアーゼIIIで、インサートを段階を追って任意の時間消化し、短くなったインサートを再びライゲーションして作製した。従って、3'末端突出型と5'末端突出型の2種類の制限酵素を、マルチクローニング部位の中で適切に選択する必要が生じる。pEH2015は、pUC118のマルチクローニング部位のほぼ中央に位置するXbaI部位にインサートがクローニングされているため、インサートの左右両側で、適当な2種類の制限酵素を選択することが可能であった。即ち、M13-Fプライマーのアニール部位の側から欠損させるには、3'末端突出型のPstIまたはSphI、5'末端突出型のSalIまたはAccI、などが選択できる。また、M13-Rプライマーのアニール部位の側からの欠損には、3'末端突出型のSacI または KpnI、5'末端突出型のXmaI または BamHI、が選択できた。そこで、欠損導入に先立ち、これらの制限酵素を用いて

pEH2015を消化し、インサート内部の切断部位を調べた。その結果、PstI、SacI消化で、各々約2.5及び2.1kbのフラグメントが現れ、この二つの制限酵素は、インサート内部に切断部位を持つことが明らかになった。そこで、SalI/SphIで消化し、インサートの欠損導入を行うこととした。pEH2015を、これらの制限酵素で、30秒～1分間隔で10分まで反応させた段階的欠損導入株を作製し、E. coli・JM109株に形質転換した。形質転換したE. coli・JM109株は、任意に拾い上げ、プラスミドを調製した後、EcoRI/HindIIIで消化してインサートを切り出し、アガロースゲル電気泳動で長さを確認した。その結果、サブクローン88株から、0.5～3.0 kbの種々の長さのインサートを持ったクローンが得られた(図2-20A)。それらのクローンを、42merのオリゴヌクレオチド(図2-6)をプローブに、65℃でサザンハイブリダイゼーション分析を行ったところ、最も短い0.5 kbのクローンまで、すべてのクローンが、このプローブとハイブリダイズした(図2-20B)。配列分析は、0.5kbと、0.6kbの短いインサートを持つ2つのクローンについて、M13-F、-Rをプライマーに用いて行った。その結果、EHのアミノ末端4残基とアミノ酸26残基のシグナルペプチドをコードする101bpのエクソンの配列を含む、750bpの配列が明らかになった(図2-21)。この配列には、翻訳開始メチオニンコドンの上流、-11塩基目からスプライスジャンクションのコンセンサス配列<sup>101)</sup>が見られ、また、転写開始領域のコンセンサス配列<sup>97)</sup>や、転写調節に關与する配列<sup>109)</sup>が見出せなかった。従って、-11塩基より5'末端側はイントロンの配列であり、mRNAの5'末端非翻訳領域を含む未知のエクソンが存在することが示唆された。

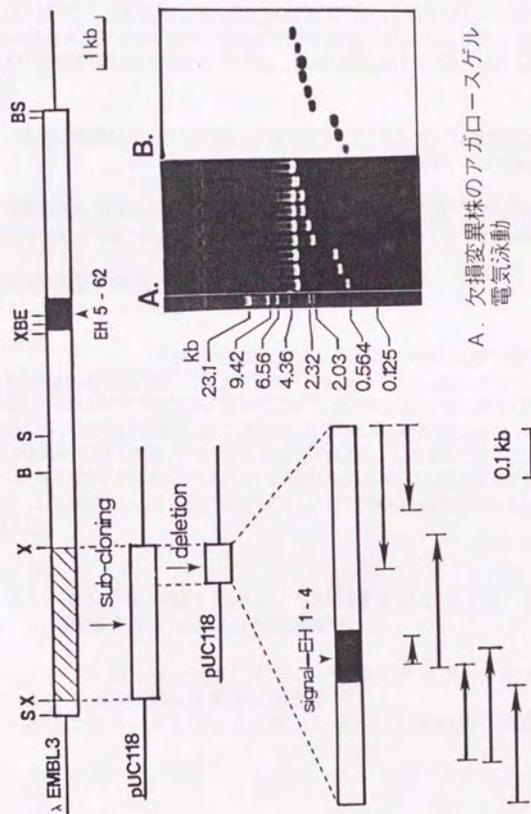


図 2-20 段階的欠損変異株作製による、λEH201の解析

CGCATTTGATTCGGGTAGTTATATTATTTATTTGTAATTTGATTCATTGAAT  
 ACCGGTTTTTTGTCATGGACGTGTAACGAACTCACGGTACTTCTGATGTTAAATGCCTA  
 CCGAAGATCATAACGTAACACATCGTGATTTGGGGGCCACCAGTGCGGGCTTGATTGAT  
 TTTAAAACGCATCTTATTAGAGATAGTACCTAGATATCATGTTTTATGATAAACTAATT  
TCAG

AAACCTAAAA ATG. GCA. AAC. AAA. CTG. ACC. GCA. GTC. ATC. GTT. GTT.  
 MET-Ala-Asn-Lys-Leu-Thr-Ala-Val-Ile-Val-Val-  
 -26 -20

GCT. CTC. GCC. GTG. GCA. TTC. ATG. GTC. AAC. CTG. GAC. TAT. GCC. AAC. TGC.  
 Ala-Leu-Ala-Val-Ala-Phe-Met-Val-Asn-Leu-Asp-Tyr-Ala-Asn-Cys-  
 -10 -1

AGC. CCT. GCC. ATC. G  
 Ser-Pro-Ala-Ile-(Ala)  
 1 4

GTAAAGTACAAAGGGCGAGGGTCTGAAATAAATTACATAGGGC  
 TATATCCTAAGACGTACAATTTATACTTTAATATATAAATCTACAGTGGTTTTACGGAT  
 GTTCCGTATAACTGCTGCACCATGCATCCGATTGACTTGAAACTTGGTATCCATGTATT  
 GGTGTATGCTTGGTATGCATATATTTATGTACTTAATGGATAGGCTAATATTTATATG  
 AGTGTGCGACTCCCTACACTAGTTCGCGGGATGTTAATGATGAGGATCTTTGTGGGGATG  
 AGAAATAATAATTGACAAATGTTAATTTTAAACAAAAAATGTGTGCGTGTACTAGTGAC  
 ACACGTAAGAAGTGAAACTTATTTATGGCCTATTTTCGAAAAATGATCATCATGCAAC  
 TTTCTAGA

図 2-21 E H、N-末端をコードする配列を含むエクソン、及び、隣接するイントロンの塩基配列

エクソン部分は、( ) で示し、翻訳されるアミノ酸を記し、  
 E H N-末端のSerを基準に番号を付した。  
 スプライスジャンクションのコンセンサス配列は、下線で示した。

## 2-2 3'末端非翻訳領域の解析

$\lambda$ EH201の3'末端非翻訳領域は、終止コドンの下流54bpのEcoRI切断部位までの配列しか明らかになっていなかった。そこで、未解析の領域を解析するために、 $\lambda$ EH201を各種の制限酵素で消化し、サブクローニングを行った。図2-20に示した制限酵素地図を参考にして、BamHIで $\lambda$ EH201を消化し、終止コドン下流のEcoRI切断部位を含む4.0 kbのフラグメントを、pUC18にサブクローニングした。このクローンpEH2014を、M13-F、-Rプライマーを用いて配列分析し、EcoRI切断部位の下流、約100bpの配列を明らかにした。次に、さらに短いフラグメントのサブクローニングを行うため、pEH2014をEcoRI、HindIII、PstI、BamHIの各制限酵素で消化し、生じたフラグメントを解析した。しかし、いずれの制限酵素でも、解析に適した1kb以下のフラグメントが得られなかった。そこで、pEH2014をEcoRIで消化し、アガロースゲル電気泳動で6.5kbのフラグメントを精製した。これにより、既に解析された終止コドンの下流のEcoRI切断部位までを含む、250bpのフラグメントが除去された。このフラグメントを再びライゲーションし、pEH2014より150bp短いインサートを持つクローン、pEH2020を得た。pEH2020は、プライマーにM13-F、-R、及び、33mer、34mer、36merのオリゴヌクレオチド(図2-9)を用いて、配列分析を行った。その結果、EcoRI切断部位の下流484bpの配列が明らかになった(図2-22)。pEH2020のEcoRI切断部位付近の配列は、先にpEH2014の分析で明らかになった配列と一致し、終止コドンの下流54bpのEcoRI切断部位から下流が、pEH2020にサブクローニングされたことが確認できた。

以上の解析により、終止コドンの下流540bpの配列が明らかになり(図2-22)、このうち、mRNAのpoly(A)+RNA付加部位までの440bpは、cDNAで解析されたもの(図2-15)と一致した。



### 2-3 ゲノムDNAのサザンハイブリダイゼーション

第1節、及び、第2節の前項までの実験によって明らかになったEH遺伝子の塩基配列は、cDNA、ゲノムDNAを問わず全ての配列が一致していた。一方、長澤ら<sup>42)</sup>、或いは、高野ら<sup>43)</sup>によって精製されたEHの配列分析からは、アミノ酸鎖長の異なる複数のペプチドが含まれていることが明らかになっている。これらの heterogeneity は、精製過程で分解された結果である可能性が強いが<sup>46)</sup>、遺伝子レベルで、heterogeneity が存在する可能性も否定できない。そこで、ゲノムDNA中の、EH遺伝子のコピー数を明らかにするために、サザンハイブリダイゼーションによる分析を行った。

カイコ5令幼虫の絹糸腺から抽出したゲノムDNA 5 $\mu$ gに、25~35 unitの制限酵素を加え、37 $^{\circ}$ C、16時間反応して消化した。制限酵素は、Sall、PstI、HindIII、EcoRI、BamHIの5種類を用いた。消化物を、アガロースゲル電気泳動にかけたところ、どのレーンでも一様にスメア状のDNAが見られた。これを、54merのオリゴヌクレオチド(図2-1)をプローブに用いて、サザンハイブリダイゼーション分析を行った。その結果、図2-23に示すように、どの制限酵素で消化したレーンにも、ハイブリダイズするバンドが1本のみ認められた。BamHI消化物のレーンのバンドは、約2.6kbであり、この長さは、 $\lambda$ EH201をBamHIで消化した場合に生じる54merプローブとハイブリダイズするフラグメントと一致した。

同種の分子をコードする複数の遺伝子を持つ場合、時間の経過と共に各々の遺伝子がランダムに塩基の置換を蓄積して行くと考えると、長さの異なる制限酵素断片を生じる可能性が高くなる。従って、以上の結果からEH遺伝子はゲノム上に単一な分子種として存在することが示唆され、ハプロイド当たり1コピーである可能性が高い。よって、先に精製されたペプチ

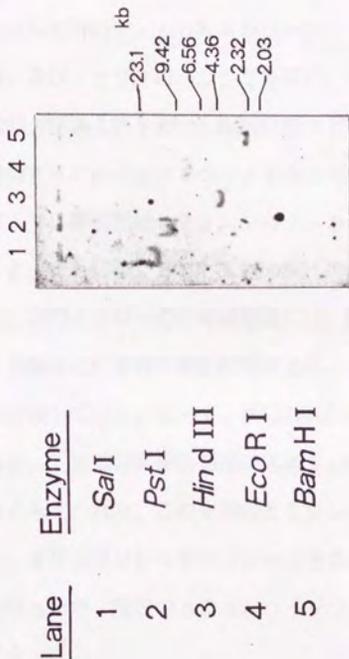


図2-23 54merオリゴヌクレオチドをプローブに用いた、カイコ的全ゲノムDNAのサザンハイブリダイゼーション分析

試料：カイコ5令幼虫、絹糸線DNA  
 プローブ：EHの Tyr<sup>a</sup>-Phe<sup>2,5</sup> に対応する  
 54merオリゴヌクレオチド (図 2-1参照)

ドのheterogeneityは、複数の遺伝子が存在するためではないと考えられた。

#### 2-4 まとめ及び考察

カイコEHのゲノムDNAクローン、λEH201について、制限酵素地図の作製、及び、サブクローニングを行い、EHの遺伝子構造の解析を行った。段階的欠損導入法を用いた配列分析などの結果、440bpの3'末端非翻訳配列を持つEHA1a<sup>5</sup>-Leu<sup>6</sup>2をコードするエクソンの上流に、4.7kbのイントロンを挟んで、翻訳開始メチオニンコドンからアミノ酸26残基のシグナルペプチドと、それに続くEHN-末端のSer<sup>1</sup>-Ile<sup>4</sup>をコードするエクソンが見出された。このエクソンの5'末端領域には、翻訳開始メチオニンコドンの上流に、10塩基の5'末端非翻訳配列があり、その上流には、新たに、イントロンが介在していた。従って、第1節に述べたcDNAの配列分析結果を考慮すると、5'末端の非翻訳領域62塩基をコードする、未知のエクソンが存在すると考えられる。この未知のエクソンについては、cDNAの情報をもとに、オリゴヌクレオチドプローブを合成し、λEH201の上流部分などの解析を行ったが、現在のところ、ハイブリダイズするフラグメントは得られていない。

イントロンの領域は、786bpの配列が明らかになった。ショウジョウバエの遺伝子では、調節因子の一つである *ecdysone-responsive element*<sup>110)</sup> が転写開始部位の下流のイントロン中に存在する例も報告されている<sup>111)</sup> が、今回明らかになったイントロンの配列中には、既知の転写制御因子と相同性のある配列は、見出されなかった。

ゲノムDNAの構造の模式図を、cDNAの解析で得られた結果と合わせて図2-24に示した。ゲノム側からは得られていない5'末端非翻訳領域62塩基は、一つのエクソンに含まれると仮定して図示している。

緒言に述べたように、1989年に、Horodyskiら<sup>50)</sup>は、タバコスズメガ (*Manduca sexta*) のEH遺伝子を単離し、構造を明らかにした(図・緒-4)。そのDNA配列と、今回明らかになったカイコEHの配列を比較したものを、図2-25に示した。図から分かるように、両種のEH遺伝子は、配列のみならず、構造も良く保存されていた。真核生物にみられる、イントロンを持つ遺伝子構造は、同じ産物をコードするものでは種が異なっても構造が保存されている例が、脊椎動物の $\beta$ -グロビン遺伝子などで知られている<sup>112)</sup>が、EHも同様の特徴を示した。この両種のEHは、EH本体の部分のアミノ酸レベルで81%のホモロジーを持っているが、塩基レベルでも、77%のホモロジーを有していた。またシグナルペプチド部分のホモロジーは、アミノ酸レベルで35%、塩基レベルで55%であった。イントロンの部分、及び、3'、5'末端の非翻訳領域では、いずれも40%以下のホモロジーしか示していない。これは、翻訳されて機能するEH本体をコードする領域で、塩基置換が起こり難く、良く保存されていることを示している。カイコとタバコスズメガは、分類上異なる科に属しており、同じ鱗翅目昆虫ではあるが、類縁関係は近くない。しかし、EH遺伝子は、非常に良く保存されており、このことは、EHが昆虫の生活環に於いて重要な役割を演じていることの表れと考えられる。緒言で述べたように、EHは鱗翅目以外の数種の昆虫で存在が示唆されており、広く、昆虫類全体に保持されて、昆虫に共通してみられる脱皮行動を制御している可能性が高い。また、昆虫類以外にも、昆虫と同様の変態、脱皮という生活環を持つ甲殻類などで、EHが見出される可能性も考えられる。DNAデータバンク (Gen Bank, EMBL等)でホモロジー検索を行ったが、現在のところEH遺伝子と相同性のある他のペプチドの遺伝子は見出されていない。しかし、昆虫以外の無脊椎動物のペプチドホルモンで遺伝子レベルまで解析された例は非常に少なく、

例えば甲殻類では、カニ(*Carcinus maenas*)の血糖上昇ホルモン (CHH) の僅か 1例<sup>1,3)</sup> が報告されているに過ぎない。今後、遺伝子レベルの研究の進展に伴い、EH様ホルモンの全体像が明らかになって行くことが期待でき、本研究は、その進展に寄与するものと考えられる。

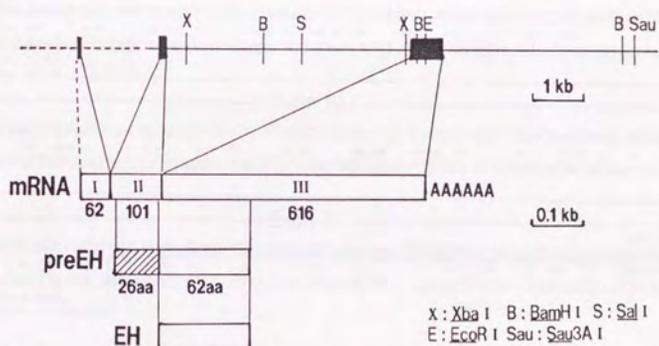


図2-24 カイコEH遺伝子、及び、ペプチドの構造

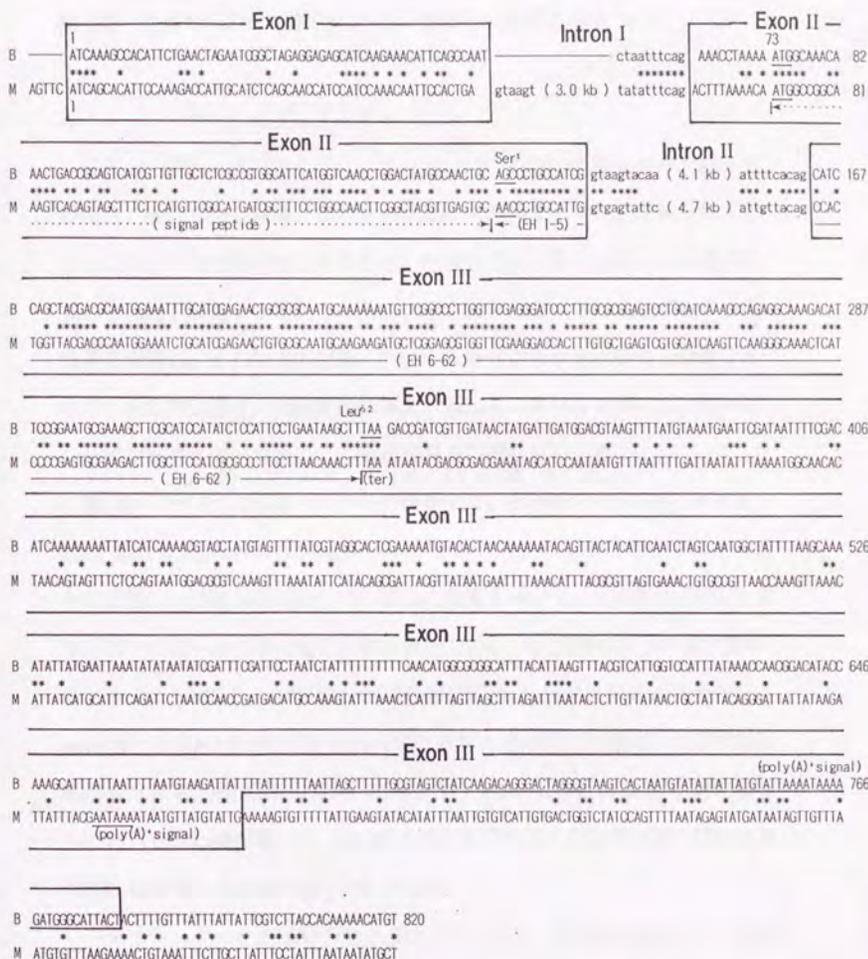


図 2-25 カイコ、及び、タバコスズメガの遺伝子配列と構造の比較

上段(B)にカイコ、下段(M)にタバコスズメガの配列を示す。  
 カイコの配列のみ、右端に、転写開始点からの塩基番号を付した。  
 カイコとタバコスズメガで一致した塩基は、\*で示した。

### 第3節 生体内に於ける羽化ホルモン遺伝子の発現と分布

#### 3-1 ノーザンハイブリダイゼーション

EHは、緒言で述べたように、神経系以外にも標的組織を持ち、翅の可塑性や、蛹の筋肉の崩壊、などを引き起こす作用を示すことが知られている。このような作用が存在するため、EH分子が、脳で生産され神経節に働いて行動を解発する役割とは別に、全く独立に脳以外の組織でもEH遺伝子を発現し、その特定の組織に於いて生理作用を示す可能性も否定できない。そこで、脳と、数種類の組織より抽出したRNAを用いて、ノーザンハイブリダイゼーションによるmRNAの解析を行った。

第1節-1項に記したSDS-フェノール法で調製した、各組織の poly(A)<sup>+</sup>RNA 4 $\mu$ g または 全RNA 20 $\mu$ g を、ジメチルスルホキシド、グリオキサール中で変性し、文献(63)に従って作製した装置を用いて、0.01M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>を含む1.4%アガロースゲルで電気泳動を行った。用いた試料は以下の通りである。カイコ(J106xDaizo種)蛹、2~5日目の脳の poly(A)<sup>+</sup>RNA、全RNA、poly(A)<sup>-</sup>RNA(全RNAからpoly(A)<sup>+</sup>RNAを抽出した残渣)；以下の組織の全RNA；蛹0日目(J122xC115種)脳；5令0~2日目(J122xC115種)脳；5令2日目(錦秋x鐘和種, ♀) 消化管・表皮及び筋肉・中部絹糸腺；5令4日目(春嶺x照月種) 後部絹糸腺；3令 全虫体。

アガロースゲル電気泳動のサイズマーカーには、制限酵素HindIIIで消化した $\lambda$ ファージDNAとHinfII消化したpBR322プラスミドの断片を混合し、試料と同様にグリオキサールで変性して一本鎖にしたものを用いた。変性処理したDNA及びRNAは、一本鎖であるため、通常検出に用いられるエチジウムブロミド染色では、検出感度が悪く、バンドが確認できない可能性もある。そこでアガロースゲル電気泳動の際に、マーカーDNAと、

蛹の全RNAを1レーンずつ多く泳動し、プロットティングの後、そのレーンのメンブレンを切断し、メチレンブルーで染色して核酸を検出した。

ハイブリダイゼーションのプロープには、第2節で調製したEHcDNAのサブクローン、pEHC01のインサートを鋳型とし、ランダムプライムラベル法によって [ $^{32}\text{P}$ ] ラベルしたDNA断片を用いた。ノーザンハイブリダイゼーションの結果、図2-26に示すように、脳由来の全RNA、及びpoly(A)+RNAを展開したレーンで、0.9kbの位置に、強くハイブリダイズするバンドが検出され、5令幼虫、蛹とも、0.9kbのEHmRNAを発現していると考えられた。また、脳の全RNA、poly(A)-RNAのレーンで0.56kbの位置にハイブリダイズした薄いバンドがみられた。この詳細については検討していないが、poly(A)+RNAのレーンにはこのバンドが見られないことから、poly(A) tail の配列を欠いたEHmRNAの分解物である可能性がある。0.9kbのバンドのシグナルの強度については、5令幼虫の全RNAのシグナルが、蛹のpoly(A)+RNAと同等の強度を示した。電気泳動には、全RNA (20  $\mu\text{g}$ ) は poly(A)+RNA (4  $\mu\text{g}$ ) の5倍量の試料を用いている。一般に、全RNAの数%がmRNAであることを考えると、ゲルに乗せたEHmRNAの量は、mRNA分画の方が実質的には全RNA分画より数倍多いと予想される。従って、5令幼虫の全RNA中には、同じ量の蛹の全RNAに比べ、数倍のEHmRNAが含まれていたといえる。しかしこの値は、必ずしも幼虫の時期に発現量が増加していることにはならない。なぜなら、蛹の時期に、脳が急激に体積、及び形態の変化を起こすこと(第3節-3項参照)を考慮しなければならないからである。この様な劇的な変化をすする時期には、mRNAの合成も盛んになることが予想され、体積の増加と相俟って、全RNA中のEHmRNAの割合は、相対的に幼虫の時期よりも小さくなることが考えられる。そこで、調製した全RNA量から脳1個

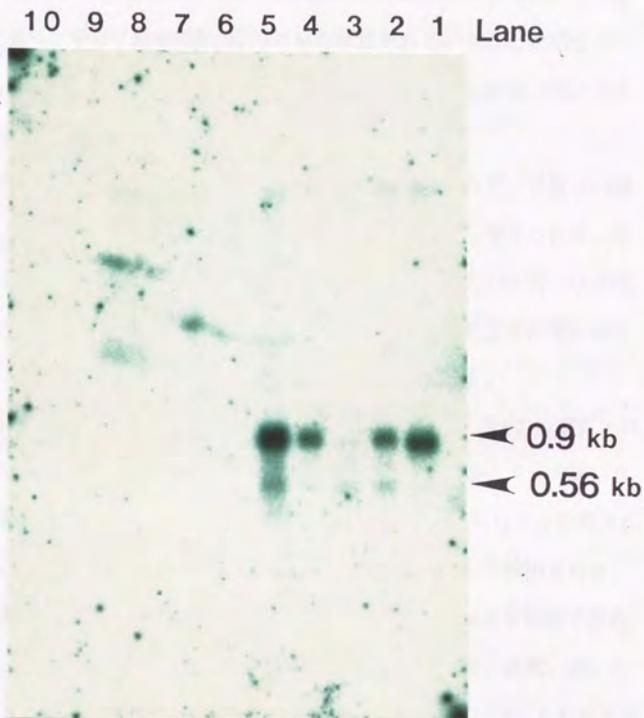


図2-26 カイコの各種の組織から調製したRNAを用いた、  
ノーザンハイブリダイゼーション

Lane 1 :	脳 蛹(2~5日目)	;	poly(A)+RNA	4 $\mu$ g
Lane 2 :	同上	;	全RNA	20 $\mu$ g
Lane 3 :	同上	;	全RNAからpoly(A)+RNAを 抽出した残渣RNA	20 $\mu$ g
Lane 4 :	脳 蛹(0日目)	;	全RNA	20 $\mu$ g
Lane 5 :	脳 5令幼虫(0~2日目)	;	同上	
Lane 6 :	消化管 5令幼虫(2日目)	;	同上	
Lane 7 :	表皮、筋肉 5令幼虫(2日目)	;	同上	
Lane 8 :	中部絹糸腺 5令幼虫(2日目)	;	同上	
Lane 9 :	後部絹糸腺 5令幼虫(4日目)	;	同上	
Lane 10 :	全虫体 3令幼虫	;	同上	

あたりの全RNA量を計算すると、5令幼虫で 339ng/brain、蛹で1.2  $\mu$ g/brainとなり、やはり幼虫の約3倍のRNAが含まれていることが明らかになった。従って、1頭あたりのEHmRNA発現量は、5令幼虫と蛹とで大きな差はないと結論できる。

脳以外の組織については、どの位置にもバンドがみられず、これらの組織では、検出できる量のEHmRNAは発現していないと考えられた。また、3令幼虫の全虫体でもバンドが検出できなかった。この試料には当然、脳内のmRNAが含まれているが、全虫体に占める脳の割合が非常に小さいため、mRNA量が検出限界以下であったと考えられる。

メチレンブルーで染色した全RNAのレーンには、約2.3kbの位置にrRNAの大きなバンドが見られ、その低分子側に、ほぼ様にスメア状にRNAが検出された。RNaseの混入などにより、調製中にRNAが分解された場合には、泳動の先端近くに分解したRNA断片が偏って検出される。今回の調製では偏りがみられず、分解の少ない良質のRNAが調製できたと判断した。また、脊椎動物の全RNAを泳動した場合は、通常、28Sと18SrRNAの2本のバンドが見られる。しかし、カイコの28SrRNA鎖には、生体内で切断される部位が一カ所あり、変性して泳動した場合には、28Sのバンドが2つのユニットに分かれ、18SのrRNAとほぼ同じ位置に重なって泳動されることが知られている。今回の泳動でも、28Sに相当するバンドは認められなかった。以上のノーザンハイブリダイゼーション実験により、EH遺伝子は、5令幼虫と蛹の両方の時期に、脳内で特異的に0.9kbのmRNAが転写され、発現していることが示唆された。

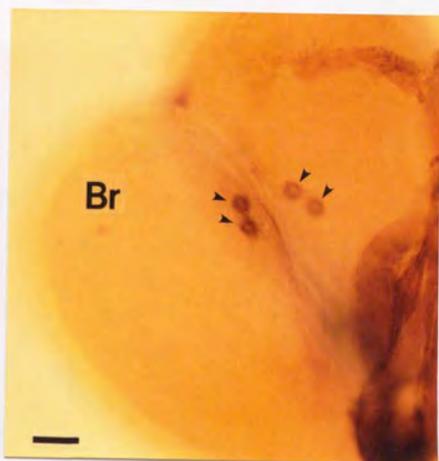
### 3-2 ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション

*in situ* ハイブリダイゼーション実験は、植物起源のステロイドの一つであるdigoxigenin (DIG)でDNAプローブをラベルし、検出する方法<sup>114)</sup>を用いた。試料は、カイコ幼虫(J106xDaizo, J122xC115種)あるいは、蛹(J122xC115種)の脳、神経節を用い、85%エタノール/5%酢酸/4%ホルムアルデヒドで固定<sup>115)</sup>した後、ハイブリダイゼーションを行った<sup>116)</sup>。

36merオリゴヌクレオチドプローブ(図2-1)の3'末端に、ターミナル・トランスフェラーゼによるヌクレオチド付加反応により、DIGをラベルしたダイデオキシUTP(DIG-ddUTP)を付加した。このプローブを、固定したカイコ5令幼虫、蛹及び成虫の、脳、食道下神経節(SG)と混合し、37°Cで15時間保温して、組織中のmRNAとハイブリダイズさせた。次に、アルカリホスファターゼでラベルした抗DIG抗体を、DIGラベルしたプローブと結合させ、アルカリホスファターゼを用いた5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルリ酸とニトロブルーテトラゾリウム塩の発色反応によって染色した。染色した脳は、顕微鏡を用いて観察した。

その結果、5令幼虫(3日目)及び蛹(0日目)の脳で、脳間部の2対の細胞が、検出された(図2-27;A, B, C)。蛹では、試料とした9個の脳の内、4例で片方、或いは、両方の脳半球に3個の細胞が検出された(図2-27;D)。5令幼虫では、試料とした12個の内、2対以上の細胞が検出されたのは、僅かに1例であり、それも、蛹の場合とは全く異なった側方部に近い部位の細胞が、片側のみ2個多く検出された。検出された細胞は、いずれも非常に大型の細胞で、脳内の神経分泌細胞の特徴と一致していた。各々の細胞は、細胞質にmRNAが存在するため、核は染まらず、淡色の像として観察された(図2-27; B)。プローブ或いは抗DIG抗体が、非特異的に組織に吸着され発色している場合には、核が淡色に認められることはなく、特異的に細胞質が染まって

A



B



図2-27(1) 36merプローブを用いた、カイコ幼虫、及び、蛹の脳のホルマウント *in situ* ハイブリダイゼーション

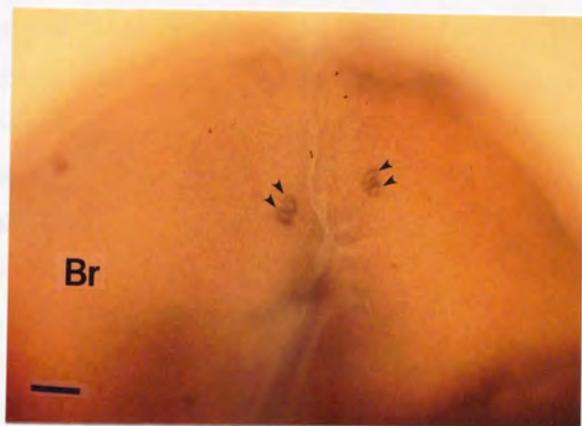
A : 5令3日目, 脳 (x200)

B : 同上 (x400)

品種 : J122xC115

スケールバー : 50  $\mu$ m

C



D

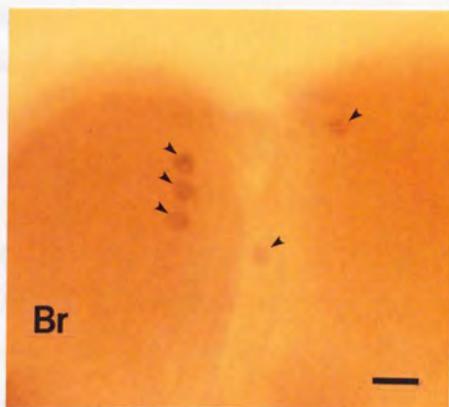


図2-27(2) 36merプローブを用いた、カイコ幼虫、及び、蛹の脳のホルマウント *in situ* ハイブリダイゼーション

C : 蛹0日目、脳 (x200)

D : 蛹0日目、脳 片半球あたり、3個以上の細胞が認められたもの (x200)

品種 : J122xC115

スケールバー : 50  $\mu$ m

いる場合と区別が可能であった。側心体(CC)、アラタ体(CA)には、染色される細胞は認められなかった。

上記のように、幼虫と蛹では、検出され細胞数に差が認められた。この原因の一つとしては、蛹期にEH産生細胞数が増加することが考えられる。蛹期の脳は、第3節-3項で述べるように、形態的に大きな変化を遂げる。この様な変化を生じる中で、EH産生細胞の数も変化する可能性も考えられる。また、幼虫でただ一例観察された2対以上の細胞が検出されたものについては、比較検討する材料に乏しく、明確な解釈は出来なかった。いずれにしろ、これらの結果を正しく解釈するためには、飼育条件等を揃えたカイコを用いて、各時期の脳を多数試験する必要がある。

### 3-3 免疫組織化学

EHの免疫組織化学的研究は、高野らにより、カイコの蛹期の脳についてEH特異的モノクローナル抗体を用いた分析が行なわれ、2対の脳間部神経分泌細胞(ventromedial neurosecretory cell)に、EHの存在が認められた<sup>117)</sup>。また、普後ら<sup>19)</sup>は、各組織の抽出物中のEH活性を、生物検定を指標に分析し、蛹の時期の脳、CC、CA(図・緒-2 参照)にEHが存在することを示した。このことから、脳で生産され、CC、CAに送られて貯蔵、放出されるというEHの分泌経路が予想されているが、細胞レベルでの証明は行われていない。一方、Trumanら<sup>118)</sup>は、タバコスズメガ(*Manduca sexta*)EHの部分精製物を抗原としてウサギに注射し、得られた抗血清を用いて、タバコスズメガの免疫組織化学的研究を行った。その結果、幼虫期のタバコスズメガでは、EHは2対のventromedial neurosecretory cellで産生され、中央神経索を通り直腸神経にまで至る長い軸索を經由して、直腸神経末端から放出されるという、新たな脳神経分泌経路を明らか

にした<sup>21)</sup>。また、蛹では、タバコスズメガの場合もCC、CAにEH活性が認められ、ここに送られるEHは、幼虫期とは位置の異なる、脳側方部の5対の神経分泌細胞により産生されることを報告している<sup>116)</sup>。これら5対の細胞は、脳の同側のCC·CA連合へ至る軸索を持つ細胞 (ipsilateral projecting cells)<sup>119)</sup> と同定された。しかしその後、同グループのHorodyskiらによる、*in situ* ハイブリダイゼーション実験<sup>50)</sup> では、蛹期の脳側方部の細胞には、EH mRNA が認められず、幼虫期と同じ脳間部の2対の細胞のみが検出された。蛹期の実験については、抗体作製に用いた抗原が、CC·CA連合の部分精製物であり、EH以外の神経分泌ペプチドが混入していた可能性もあり、実験に再考の余地があると考えられる。また、市川<sup>120)</sup> は、カイコの5令幼虫の脳の神経分泌細胞を、組織化学的、及び、電気生理学的に解析し、細胞の詳細な分類、同定を行った。その結果、EH産生細胞は、脳間部の2対の神経分泌細胞(M3細胞)と同定された。このM3細胞は、脳の同じ側から中央神経索を通り、直腸神経末端まで至る軸索を伸ばしていたという<sup>121)</sup>。

以上の様に、EHの貯蔵分泌と、昆虫の成長過程による産生細胞の変化に関する実験結果については、統一的な見解が得られていない。特に、幼虫脱皮、蛹化脱皮に際して機能する、中央神経索に長い軸索を伸ばす細胞と、羽化時に働くEHをCC·CAに送る細胞の異同については、明らかにされておらず、また、カイコの幼虫、或いは、脳以外の組織についても、免疫組織化学的研究は、行われていなかった。

そこで、カイコに於いて、幼虫期、蛹期のEHの産生細胞、貯蔵分泌経路を明らかにするために、EH特異的モノクローナル抗体を用いて、免疫組織化学的解析を行った。抗体は、高野<sup>17)</sup> の作製した、EHのカルボキシル末端のアミノ酸12残基(Cys<sup>49</sup>-Lys<sup>61</sup>)を認識する、モノクローナル抗体

を用いた。

試料として、以下に示す発生段階のカイコ(J106xDaizo種)の、脳(Br)、食道下神経節(SG)、胸部神経節以降の中央神経系(CNS)、側心体(CC)、アラタ体(CA)を摘出して用いた。

幼虫 : 5令脱皮直前、即ち、4令4日目( $IV_4$ ) ; Br, SG, CNS, CC, CA

5令4日目( $V_4$ ) ; Br, CC, CA

5令吐糸期( $V_{sp}$ ) ; Br, SG, CNS, CC, CA

蛹化脱皮直前(ph. P) ; Br, SG, CNS, CC, CA

蛹 : 蛹化直後( $P_0$ ) ; Br, CNS, CC, CA

蛹4日目( $P_4$ ) ; Br, SG

蛹6日目( $P_6$ ) ; Br, SG

羽化直前(ph. Ad) ; Br, SG, CC, CA

成虫 : 羽化直後(Ad) ; Br, SG

その結果、まず脳では、いずれの発生段階のものでも、2対、4個の脳間部の腹側の神経分泌細胞(ventromedial neurosecretory cells)に、EHの存在が観察され(図2-28; A, B, C)、 $P_6$ では、複数の軸索が、脳の中央部で交差せずに同じ側に伸びているのが観察された(図2-28; C)。カイコの脳神経分泌ホルモンの中で、既に免疫組織化学的研究がなされているボンビキシン<sup>1,2,3</sup>、前胸腺刺激ホルモン<sup>1,2,3</sup>、の産生細胞の軸索は、いずれも脳の中央部で交差し、反対側の脳半球からCA (contralateral CA) へ伸びているのとは、対照的である。

$P_6$ の1例でのみ細胞数の異なる脳が観察され、2対の細胞と離れて、SGに近い位置に1個の細胞が、片方の脳半球だけに認められた。

EHを含む細胞は、 $P_4$ 期以降(図2-28; B, C)では同半球の2つが近接していたが、幼虫及び $P_0$ (図2-28; A)では、腹側に2つが離れた位置に観察され

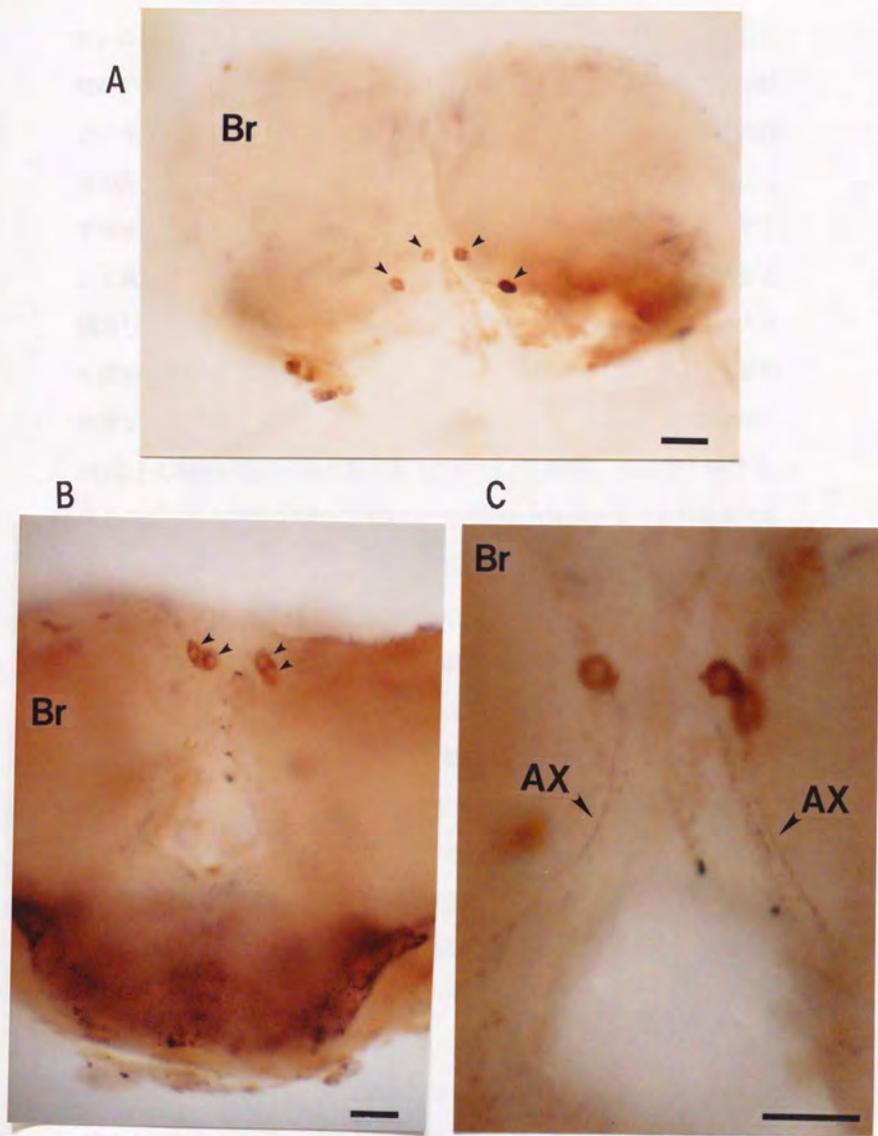


図 2-28 免疫組織化学的解析 (1)  
 -カイコ5令幼虫、及び、蛹の脳の解析

A : 5令吐糸期. 脳 (x200)  
 B : 蛹6日目. 脳 (x200)  
 C : 同上 (x400)      スケールバー : 50  $\mu$ m

た。これは、脳内で細胞の相対的な位置が変化すること、或いは、異なる細胞でEHが生産されるようになることを示唆している。第3節-1項で触れたように、脳は、蛹期に急速に体積を増加させ、蛹後期には、幼虫時の数倍の大きさになる。これに伴って、脳側方から視葉(optic lobe)が分化してゆき、大きな成虫の複眼を形成する。さらに、幼虫期に脳とSGを隔てていた食道が蛹期に急速に退化し、SGは脳に近づいて、蛹後期には脳と殆ど融合した形態となる(図2-28:B, C)。この様に、蛹期の間脳の状態が大きく変わることを考慮すると、幼虫、P<sub>0</sub>期と蛹後期でEH産生細胞の相対的位置が変化することは、十分に考えられる。一方、僅か1例ではあるが、2対以上の細胞が認められた脳があることは、過渡的に、幼虫期と蛹後期の異なるEH産生細胞が同時に存在している時期が存在することの結果である可能性も残っている。細胞の位置、及び、数は、P<sub>0</sub>の1例を除き、市川<sup>120)</sup>、高野<sup>117)</sup>の結果とほぼ一致した。

Vsp期の神経系では、SGと胸部神経節を結ぶ中央神経索中に、EHを含む軸索が認められた(図2-29)。タバコスズメガでは、EHは脳から中央神経索中を輸送され、直腸神経末端から放出されるという、Trumanらの解析結果<sup>21)</sup>と矛盾せず、同様の分泌経路がカイコにも存在することを示唆している。IV<sub>4</sub>及びph.PのCNSには、EHを含む軸索は認められなかったが、これは、EH輸送の時期と摘出の時期が合わなかったためか、或いは、EH量が少ないために検出できなかった可能性がある。

CC、CAを染色したものでは、ph.AdでCCに、非常に多くのEHが認められた(図2-30)。しかし、CAについては、この時期のCC-CA間の軸索と、CA表面の軸索に僅かに確認できたのみで、CA本体に貯蔵されているEHは、殆ど認められなかった(図2-30)。CC、CA内のEHは、すべて一様に染色された小粒子状の形態で観察され、明瞭に核が認められる脳内の大型の細胞とは、

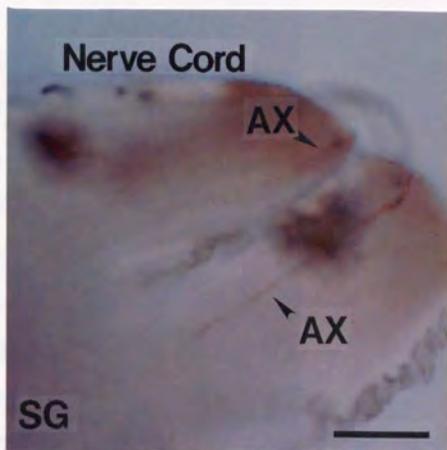


図2-29 免疫組織化学的解析(2)  
 -カイコ5令幼虫の食道下神経節、中央神経索の解析

食道下神経節下流の中央神経索中の、染色される軸索(AX)を( )で示した。(x400)      スケールバー : 50 $\mu$ m

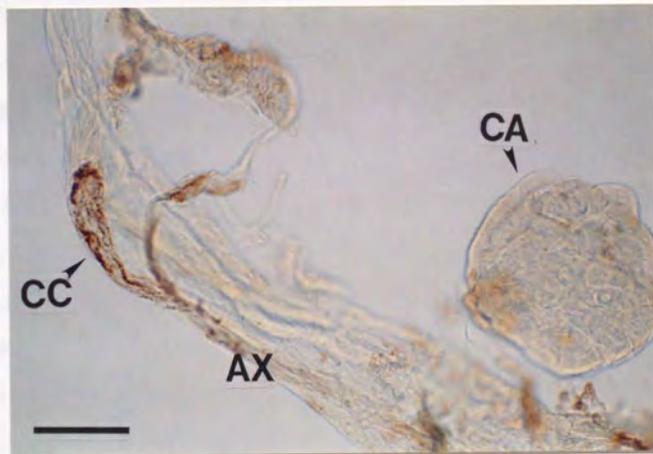


図2-30 免疫組織化学的解析(3)  
 -カイコ蛹(蛹皮内成虫)の、側心体(CC)、アラタ体(CA)の解析

CC : 側心体      CA : アラタ体      AX : 軸索  
 (x400)                      スケールバー : 50 $\mu$ m

明らかに異なっていた。これらのEHは、CC、CAの細胞で産生されているものではなく、軸索末端に貯蔵されているものと考えられた。また、脳からCCに到る軸索中にも、EHが観察された。これらの結果は、CCが主要なEHの貯蔵器官であることを示している。市川<sup>123)</sup>は、ごく最近、カイコ脳内のEH産生細胞の軸索が、蛹化にともなって、約24時間で脳の同じ側のCC、CAへ分枝して伸長して行くことを報告した。それによると、蛹期のEH産生細胞の軸索を染色した結果、多くの細かく分枝した軸索が、CCに末端を開き、CAまで伸びているものは僅かであることが観察されている。これは、CCが主要なEH貯蔵器官として観察された著者の結果を支持するものである。先に普後ら<sup>19)</sup>は、羽化前後のCAを摘出し、その抽出物中のEH活性を、生物検定を指標に分析して、EHがCAに貯蔵され、羽化に際して放出されることを示している。今回の実験結果は、一見この報告と矛盾するように見える。しかし、カイコのCCは、CAに到る軸索が途中僅かに膨らんでいるだけの不明瞭な形態をとっており(図・緒-2, 参照)、摘出に際し軸索と明瞭に区別するのは難しい。従って、普後らの実験では、抽出、生物検定に供したCA摘出の際に、軸索と共に若干数のCCが含まれていた可能性があり<sup>124)</sup>、CCに貯蔵されるという今回の実験結果を否定するものではないと考えられる。

P<sub>0</sub>以前の時期のCC、CAには、EHは全く認められなかった。

以上の結果から、EHは、脳間部神経分泌細胞で産生され、幼虫期には、中央神経索に輸送され、蛹期には、主にCCに貯蔵されて、羽化に際して放出されることが示唆された。

### 3-4 まとめ及び考察

幼虫、及び蛹の、脳、消化管、絹糸腺などの組織から、mRNAを調製し、EHcDNAをプローブに、ノーザンハイブリダイゼーション分析を行った。その結果、5令幼虫、及び、蛹の脳で、0.9kbのEHmRNAが転写されていることが明らかになった。また、その他の組織からは、EHmRNAは検出されなかった。

5令幼虫(3日目)、蛹(0日目)の脳を、DIG標識したオリゴヌクレオチドプローブを用いて、ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションにより分析したところ、脳間部の腹側の2対の細胞で、EHmRNAが検出された。これらの細胞は、大型の神経分泌細胞と考えられた。また、蛹の脳の約40%で、脳半球当たり3個の細胞が検出され、蛹化にともないEH産生細胞数が変化する可能性も考えられたが、明確な結論を出すためには、より詳細な検討が必要と考えられる。EH特異的抗体を用いた、免疫組織化学的研究では、4令、5令幼虫、及び、蛹の脳で、EHを含む2対の神経分泌細胞が認められた。これらの細胞は、*in situ* ハイブリダイゼーション、及び、先に高野の行った蛹の脳の抗体染色実験で検出された細胞と、同じものと考えられた。P<sub>0</sub>期以前と、P<sub>4</sub>期以降では、細胞の相対的な位置に変化がみられ、脳の形態変化に伴うEH産生細胞の移動、或いは、異なる産生細胞に交代することが示唆された。但し、EH産生細胞は、蛹化直後に軸索が分枝し、CC、CAに軸索を伸展させて行くこと<sup>12)</sup>を考えると、EH産生細胞が、別の細胞に交代するということは考えにくい。P<sub>0</sub>期の脳の *in situ* ハイブリダイゼーションで見られたような2対以上の細胞は、P<sub>0</sub>の1例以外、認められなかった。この2種類の実験は、材料にしたカイコの品種、飼育条件などが異なっている。*in situ* は J122xC115 種で、6~7月に桑葉で飼育。抗体染色は J106xDaizo 種で、9~11月に人工飼料で飼

育。)従って、両者を比較するには、上記の条件を厳密に揃えた材料で再度実験を行う必要があると考えられる。ph. Pでは、SGと胸部神経節を結ぶ中央神経索中に、EHを含む軸索が認められ、EHが中央神経索に輸送されていることが示唆された。また、ph. AdのCCには、EHが蓄積されていることが明らかになった。従来、蛹期のEHは、カイコではCAに貯蔵され羽化に際して放出されると考えられてきたが、本実験により、CAに輸送されるのは極めて僅かで、主要な貯蔵、及び、分泌器官はCCであることが示された。

以上の結果と、市川<sup>120) 121)</sup>、Trumanら<sup>21)</sup>の報告を考え併せると、次のようなカイコの脱皮、羽化に関わる内分泌系の存在が予想される。即ち、幼虫期には、脳間部の神経分泌細胞(M3細胞)で生産されたEHが、中央神経索に伸びる軸索を經由して輸送されて直腸神経末端から放出され、脱皮行動を引き起こす。この分泌では、羽化にみられるような、概日時計による明瞭な分泌制御は受けない。また、蛹化脱皮を行うと、その直後からEH分泌細胞(M3細胞)から伸びる軸索が分枝して、新しい軸索を24時間以内に脳の同じ側のCC、CAへと伸展させる。それと共に、細胞体からEHが輸送され、主にCCに貯蔵される。そして、脳内の概日時計からの指令によって体液中に放出され、羽化行動を引き起こす。

今後、神経化学的、或いは、免疫組織化学的解析により、上記のような内分泌制御系のモデルが、より詳細に解明されて行くことが期待される。

## 総括

昆虫は、胚期終了後の個体発生に於いて、胚が直接成体の形をとらず、変態、脱皮を経て成長して行く。変態の過程には、前胸腺刺激ホルモン、エクジソン、幼若ホルモンなどが重要な役割を果たしていることが知られているが、これらのホルモンの作用により変態が進み、脱皮、羽化の準備が完了した時点で、脱皮、羽化の行動を引き起こす液性因子として、羽化ホルモン(Ecdysis Hormone、以下EHと略す)が見出された。EHは、昆虫の脳の神経分泌細胞で生産されるペプチドホルモンの一種であり、脱皮、羽化に先立って体液中に放出され、神経系に直接作用して脱皮、羽化の行動を引き起こす生理活性を持つ。またその他にも、羽化直後に、翅を伸展させるための可塑性促進や不要になった蛹の筋肉の崩壊促進など、脱皮、羽化に関連した複数の作用を示すことも知られている。また、羽化の際のEH放出時刻は、脳内の概日時計に支配されており、概日時計による内分泌器官の制御という面に於いても、興味深いホルモンである。一方、このEHに関する分子レベルでの研究は、昆虫に含まれるその量が僅かであることなどから、進展していなかった。そこで、EHの精製単離を行い、その情報をもとにさらに遺伝子構造等を解明することを目的として、研究を行った。

EHの精製は、脳内のEH量が最も多くなる羽化直前の蛹頭部、18万頭分を抽出材料に用いて試みた。即ち、生物検定に用いるカイコ蛹を、16時間明期—8時間暗期の光周期に置いて概日時計を同調させた後、羽化予定時刻の約6時間前の蛹に試料を注射し、早期羽化誘導活性を検定した。検定には、1区4~10頭の蛹を用い、検定区の蛹の50%を羽化させる活性量を、1EH unitと定義した。精製試料は、生物検定による活性測定を行った。精

製の初めの8段階は、各種の沈澱法と溶媒抽出を組み合わせを行い、続いて、ゲルろ過、イオン交換、逆相、のカラムクロマトグラフィーを組み合わせ、た6段階の精製を行って、比活性 112ng/EH unitの部分精製物を得た。次に、イオン交換、逆相の2段階のHPLCによる精製を行って合計16段階の単離工程を確立した。この精製により、18万頭分のカイコ蛹頭部から10 $\mu$ gのEHが単離された。回収率は3.3%、約2.0 $\times 10^6$ 倍の精製となり、このEHは、0.83ng、1.0 $\times 10^{-13}$ molで1EH unitの活性を示した。単離したEHは、極めて微量であったが、アミノ末端から13残基のアミノ酸配列を、決定した。

その後、筆者の研究を引き継いだ高野らによって、さらに大量のカイコ蛹頭部からの精製が行われ、単離したEHから、アミノ酸61残基の配列が明らかにされた。しかし、まだ充分量のEHが得られなかったため、C-末端の構造など、アミノ酸配列の一部に不確実な部分が残された。そこで、シグナルペプチド部分を含めたEHの全構造を明らかにし、また、発現調節機構などの情報を得るために、遺伝子構造の解析を行った。

遺伝子構造の研究は、まず初めにcDNAの単離、解析を行った。カイコ4令、5令幼虫の脳から、 $\lambda$ gt10ファージをベクターに用いてcDNAライブラリーを作製し、それを、ゲノムDNAの部分配列を参考に合成した、アンチセンスの17mer、36mer、54merの3種類のオリゴヌクレオチドをプローブに用いてスクリーニングした。1.5 $\times 10^4$ クローンをスクリーニングしたところ、EH遺伝子を含むクローン $\lambda$ EHC01を得、その解析により、EH分子本体をコードする部分の塩基配列が明らかになった。しかし、 $\lambda$ EHC01は遺伝子cDNAの全長を含んでいなかった。そこで次に、 $\lambda$ EHC01の解析で明らかになったシグナルペプチドの一部をコードする配列に基づいて合成した、アンチセンス、42merのオリゴヌクレオチドをプローブに用いて、カイコ5令幼虫の脳から調製した $\lambda$ gt11ライブラリーをスクリーニングした。

2.5x10<sup>5</sup> クローンをスクリーニングしたところ、42merプローブとハイブリダイズする、14のクローンを得た。この14クローンの中で最も長い挿入断片を持つクローン、λEH11の挿入断片を polymerase chain reaction法 (PCR法)を用いて増幅し、pUC118プラスミドにサブクローニングして解析した。その結果、cDNAの717塩基の配列が明らかになった。さらに、λEH11に含まれていなかったmRNAの5'末端領域については、cDNAにpoly(G)配列を付加した後、アンカーとなるプライマーを用いるPCR法(アンカーPCR法)で解析した。

以上の解析により、779塩基のEHcDNAの全長の配列が明らかになった。その結果、カイコEHは、アミノ酸26残基のシグナルペプチドを持ち、EH本体は、ペプチドの分析で明らかになったものより1残基長いアミノ酸62残基からなっていることが示された。267塩基の読み取り枠の両端には、72塩基の5'非翻訳領域と、440塩基の3'非翻訳領域を持つ構造をとっていた。5'末端の配列は、昆虫の転写開始部位のコンセンサス配列と一致した。

次に、得られたcDNAをプローブにして、ゲノムDNAライブラリーから得られたクローン、λEH201について分析を行った。各種制限酵素で消化したλEH201を、上記の42merのプローブで、サザンハイブリダイゼーション分析を行い、さらに、ハイブリダイズしたフラグメントをサブクローニングして、配列を分析した。その結果、EH遺伝子のコード領域の構造が明らかになった。EH遺伝子は、シグナルペプチドからアミノ末端4残基目のアミノ酸までをコードするエクソンの下流に4.7kbのイントロンがあり、さらにEHのアミノ酸、Ala<sup>5</sup>~Leu<sup>62</sup>をコードするエクソンが存在する構造をとっていた。この構造は、最近ワシントン大学のHorodyskiらによって報告された、分類上異なる科に属する昆虫、タバコスズメガのE

H遺伝子の構造と類似しており、アミノ酸配列のみならず、遺伝子構造のレベルまで良く保存されていることがはじめて明らかになった。これは、昆虫の生活環に於けるEHの重要性を、改めて示唆するものといえる。

次に、遺伝子に関する情報を基礎に、生体内での遺伝子の発現について、ノーザンハイブリダイゼーション、in situ ハイブリダイゼーション、及び、免疫組織化学分析の手法を用いて解析を行った。

まず、カイコの幼虫、蛹の各種組織のノーザンハイブリダイゼーションを行ったところ、5令幼虫と蛹の脳で、0.9kbのEH mRNAが転写されていることが明らかになった。また、分析した脳以外の組織には、EH mRNAは認められず、EHは、脳で特異的に発現していることが示唆された。

次に、カイコ5令幼虫、蛹の脳で、ジゴキシゲニン標識したDNAプローブを用いて、ホールマウント in situ ハイブリダイゼーションを行った。その結果、幼虫、蛹いずれの脳に於いても、脳間部の4個の神経分泌細胞が、プローブとハイブリダイズするmRNAを生産しており、その細胞でEH遺伝子が発現されていることが明らかになった。また、蛹では、試料としたものの中の約4割の脳で、5~6個の細胞にEH mRNAが検出され、後胚発生の過程に於いて、EH産生細胞の数が変化する可能性が考えられた。

EH特異的モノクロナル抗体を用いた免疫組織化学的な解析では、4令・5令幼虫、及び蛹の脳に於いて4個のEH産生細胞が同定された。また、5令幼虫の胸部神経節に至る神経軸索、及び、羽化直前の蛹皮内成虫の側心体、アラタ体にEHが見出された。幼虫の側心体、アラタ体には、EHは認められず、蛹皮内成虫に於いても、アラタ体に認められた量は極めて僅かであった。カイコでは、従来、アラタ体がEHの貯蔵分泌器官と考えられてきたが、幼虫期には、これらの器官はEHを貯蔵しておらず、蛹期に於いては、側心体が主要な貯蔵器官であることが明らかになった。

以上の解析、及び、現在まで知られている実験事実を合わせて考えると、カイコEHは、幼虫期、蛹期共に脳間部の4~6個の大型の神経分泌細胞でのみ生産され、幼虫期では、軸索を経由して中央神経索へ輸送され、蛹期では、主に側心体に貯蔵され、放出されるという内分泌系の存在が予想された。

現在までに、遺伝子の解析が行われている昆虫ホルモンは、EHの他に、カイコの前胸腺刺激ホルモン(PTTH)<sup>77)</sup>とbombyxin<sup>64) 66) 107)</sup>、2種類のシヨウジョウバエからとられたFMRFamide<sup>125) 126)</sup>、そして、タバコスズメガの脂質動員ホルモン(AKH)<sup>127)</sup>、の5つがある。いずれもここ数年間に構造決定されたもので、昆虫ホルモンの遺伝子の研究は、まだ緒についたばかりといえる。しかし、良く知られているように、シヨウジョウバエでは、遺伝子の発現調節、発生・分化の機構などに関して膨大な研究がなされている。これらの研究状況を考慮すると、今後、昆虫のペプチドホルモンに関する、遺伝子レベルでの発現調節機構などの解析が、急速に進展するものと考えられ、本研究も、その一端に寄与するものと考えている。

## 実験

実験の項では次のように試薬、溶媒等を略記した。

- EH : 羽化ホルモン                      酢安 : 酢酸アンモニウム  
BuOH : 1-ブタノール                    TFA : トリフルオロ酢酸  
DTT : ジチオスレイトール  
PITC : フェニルイソチオシアネート  
PTH : フェニルチオヒダントイン  
X-gal : 5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-ガラクトシド  
IPTG : イソプロピル- $\beta$ -チオガラクトピラノシド  
DEPC : ジエチルピロ炭酸  
EDTA : エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム  
SDS : ラウリル硫酸ナトリウム  
HPLC : 高速液体クロマトグラフィー  
PEG : ポリエチレングリコール(#6000)

試料の重量は試料の紫外吸収強度を同じ吸収強度のウシ血清アルブミン(BSA)相当量に換算して算出した。BSAの紫外吸収強度は、280 nmで1 mg/ml=0.68、225 nmで1 mg/ml=6.8、220 nmで1 mg/ml=9.1とした。

### 第一章

#### [1-2]

#### ◎生物検定法

試料は、原則として1頭当り約4  $\mu$ gの注射量になるようにBSAを加えた後、凍結乾燥を行った。検定蛹に注射する直前に、蛹1頭当り10  $\mu$ lの注射量になるように0.1Mトリス-塩酸緩衝液(pH 7.8)を加えて溶解した。試料溶液は、注射器(ハミルトン社、1710SW)を用いて検定蛹の胸部から腹部体腔内に注射した。注射時刻、室温、及び、蛹の平均体重を記録し、30~60分毎に観察して羽化行動の有無を記録した。羽化行動は、活性のある試料を注射した場合、約10分後に、腹部を頻繁に回転させる腹部運動期があり、約10分間続く。その後徐々に蛹皮内の脱皮液が吸収され、触角、胸部の翅の部分などから、鱗粉の乾燥化に伴う変色が始まり、やがて全身に及ぶ。注射後、40~50分ほど経つと、腹部の蠕動運動が始まって、頭部から蛹皮を脱出する。試料の活性が弱い場合など、脱出行動に到らず前羽化行動で休止してしまう個体もあるため、記録にあたっては、なるべく一連の前羽化行動を、記録して判定の補助材料とした。

検定蛹は、桑葉の入手が容易な期間(5月~11月)は、主に自然日長下、 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ の飼育室で1日2回の給桑で幼虫を飼育し、化蛹後16L-8D、 $25^\circ\text{C}$ 恒温条件下に移した。また、桑葉の入手が困難な期間(12月~4月)については幼虫期間は16L-8D、 $25^\circ\text{C}$ 恒温室内で人工飼料(稚蚕飼料「タケダ」、グンゼ<sup>株</sup>など)を用いて飼育した。品種は、J106xDaizo種の雄及び雌と、若干のN4、Daizo種の雄を用いた。桑葉飼育の蛹は、全て東京農工大学普後一助教授から御供与頂いた。

## [2-1]

### ◎EHの精製

材料に用いたカイコ蛹20万頭は、埼玉県、千葉県蚕業試験場から譲り受けた。譲り受けた蛹は発生段階に差があったので、一旦室温に放置し、その中から羽化の前日ないし前々日と思われる状態のものを触角の着色などを指標にして毎日選別し、ビニール袋に入れて $-20^\circ\text{C}$ に保存した。その後、カミソリで頭部を切り離し、集めた頭部は抽出するまで $-20^\circ\text{C}$ に保存した。

蛹頭部458g(1頭当り16mgとすると29,500頭分に相当)に $-20^\circ\text{C}$ に冷却したアセトン2.2 $\mu\text{l}$ を加え、ポリトロン超高速ホモジナイザー(キマネチカ社)を用いて磨砕した。この操作を4回行い、合計1,832g(118,000頭分)の蛹頭部を処理した。そしてここで生じた4回分のアセトン粉末を合わせたものにさらに2.2 $\mu\text{l}$ の冷アセトンを加え、同様の操作を再度行った。得られたアセトン粉末に2.2 $\mu\text{l}$ の80%エタノールを加え磨砕した後、吸引濾過をした。残渣についてさらに同様の操作を2回繰り返した。残渣に $4^\circ\text{C}$ に冷却した2%食塩水3.3 $\mu\text{l}$ を加え、時々攪拌しながら約1時間抽出した。抽出液を3,500 rpm、20分間遠心分離した。以降の遠心分離は全て同じ条件で行った。食塩水抽出の際の沈澱物について、さらに2回、同様に抽出、及び、遠心分離を行った。得られた抽出液上清を沸騰水中10分間加熱し、水中で冷却した後、生じた沈澱物を遠心分離により除いた。上清に、1 $\mu\text{l}$ 当り500gの割合で固体硫酸アンモニウムの微細粒を加え、80%飽和溶液として $4^\circ\text{C}$ に一晚以上放置した。硫酸沈澱物を遠心分離により集め、800 mlの冷水に溶かし、430 mlの冷アセトンを加えてよく攪拌し、約1時間放置した後、遠心分離した。上清にさらに冷アセトン370 mlを加えて攪拌し、50%アセトン溶液とした。同様に上清を分離し、冷アセトン1,610 mlを加え、75%アセトン溶液とした。次に、遠心分離して50~75%アセトン沈澱を集め、180 mlの冷水に溶かし、それに1,620 mlの飽和ピクリン酸溶液を加えた。約1時間放置後、遠心分離により90%飽和ピクリン酸沈澱を得た。これを600 mlの0.1Mトリス-塩酸緩衝液(pH 7.8)に溶かした後、2,400mlの冷アセトンを加え、80%ア

セトン溶液とした。遠心分離により得られた沈澱を“Crude EH”と名付けた。これは、35 mlの0.2Mトリス塩酸緩衝液(pH 7.8)に溶かし、-20°Cで保存した。82,000頭のロットに対して上記の8段階の精製を繰り返し、合計20万頭分の“Crude EH”を得た。

“Crude EH”を用いて、さらに6段階のオープンカラムを組み合わせた精製を行った。まず、0.2M酢安/2%B<sub>u</sub>OHで平衡化した Sephadex G-50 (fine) (65 x 830 mm)に、各ロットの“Crude EH”溶液約40 mlを展開した。流速250 ml/hrで1分画20gとした。活性は毎回ほぼ同じ位置に検出された。できるだけ活性の損失を抑えるため、0.025 EH unit/head以上の力価を持つ分画を全て活性区として扱うことにし、通常57~84番目の分画を併せて活性区とした。また、この段階で、2つのロットを併せ、20万頭の1ロットとして以後の精製を行った。

次に、活性分画を、あらかじめ0.15M 酢安/2% B<sub>u</sub>OH で平衡化したDEAE-Sephacrose CL-6B (25 x 160 mm)に流した。流速は70 ml/hrとし、試料を流した後2%B<sub>u</sub>OHを含む0.2M(200 ml)、0.4M(250 ml)の酢安及び1M酢酸(300ml)の順に溶出を行った。活性の約9割は非吸着区と0.2M酢安/2%B<sub>u</sub>OHに回収された。

次にこの活性分画約1,700 mlを、酢酸でpH 4.0に合わせた後、蒸留水で2倍に希釈し、0.1M酢安緩衝液(pH 4.2)で平衡化したSP-Sephadex C-25 (26 x 170 mm)に展開し、吸着させた。その後、pH 4.2 (150 ml)、pH 4.7 (150 ml)、pH 7.0 (150 ml)、pH 9.0(200 ml)の0.1M酢安緩衝液を流した。流速は100 ml/hr、1分画10gとした。活性は、pH 7.0の0.1M酢安緩衝液溶出区に溶出された。

この活性区を、アンモニア水でpH 8.1とし、蒸留水で2倍に希釈して酢安濃度が0.05Mとなるようにした。そして0.05 M酢安緩衝液(pH 8.5)で平衡化したQAE-Sephadex A-25(16 x 230 mm)に展開した。0.05M酢安 (pH 8.5) 200 ml、0.1M酢安(pH 8.5) 400 ml、0.2M酢安 (pH 8.1) 400 ml、0.5M酢安(pH 8.1) 300 ml、0.5M酢安(pH 7.0) 300 mlにて順次溶出したところ、活性は0.2M酢安 (pH 8.1)、0.5M酢安 (pH 8.1)区に溶出された。0.5M酢安 (pH 8.1)溶出区約140mlは、蒸留水で1gに希釈し、0.05M 酢安緩衝液(pH 8.5)で平衡化したQAE-Sephadex A-25 (28 x 170 mm) に流して吸着させ、0.1M酢安(pH 8.5) 100 ml、0.2M酢安(pH 7.8) 100 ml、0.5M酢安(pH 8.5) 100ml、0.5M酢安(pH 7.0) 100 mlにて順次段階的に溶出させた。1回目の0.2M酢安 (pH 8.1)溶出区、2回目0.2M酢安(pH 7.8)溶出区を併せて、活性区とした。

次にこの活性区に固体酢安を加え、溶液中の酢安濃度が3Mになるように

調製した後、3M酢安溶液で平衡化したOctyl-Sepharose CL-4B (26x100 mm) にかけて。流速をペリスタポンプで約4.5 ml/hr となるように調節した。3M(30ml)、2M(50ml)、0.5M(100ml)酢安を流し、続いて、0.1M酢安/50%アセトニトリル10%、15%、20%アセトニトリルを含む0.1M酢安 (150ml)と、0.1M酢安/50%アセトニトリル(150ml)をグラジエンターに入れ、リニアグラジエント溶出を行った。溶出液は、0.5M溶出区までは90分(6.8ml)毎、グラジエント溶出区では、60分(4.5ml)毎に分画した。この活性溶出区は、有機溶媒留去後、凍結乾燥した。

## [ 2 - 2 ]

### ◎HPLCによる精製

HPLC装置は、以下のものを使用した。送液系はTriroter III (日本分光)、検出器はUVIDEC 100-V (日本分光)、データ処理装置は833型クロマトプロセッサ (日立)。

用いた溶媒は全てHPLC用であり、蒸留水はナカライテスクから、アセトニトリルは関東化学から購入した。TFAはアミノ酸配列分析用(和光純薬)、他の試薬は全て特級のものを使用した。カラムオーブンは40℃とし、溶媒はヘリウムガスで脱気を行いながら使用した。分取した試料は、原則として40℃で加温しながら減圧濃縮し、有機溶媒留去後、凍結乾燥して-20℃に保存した。

カラムは、以下のものを用いた。

- Develosil-5 ODS (4.6 x 250 mm, 野村化学)
- Protesil-300 Octyl (4.6 x 250 mm, Whatman)
- Partisil-ODS3 (6 x 200 mm, whatman)
- Nucleosil-CN5 (4.6 x 250 mm, Nagel)
- Develosil-Phenyl (4.6 x 250 mm, 野村化学)
- TSK 120T ODS (4.6 x 250 mm, 東洋曹達)
- Hi-Pore RP304 (4.6 x 250 mm, Bio-Rad社)
- TSK DEAE-5PW (7.5 x 75 mm, 東洋曹達)

凍結乾燥した試料を、少量の0.01M酢安(pH 7.0)に溶かし、TSKgel DEAE-5PW カラムを用いてHPLCを行った。このカラムは、耐圧限界が12 kg/cm<sup>2</sup>と低いため流速を0.8 ml/minとし、0.01M酢安(pH 7.0)中、NaCl濃度を0から0.15Mまで20分で上げるグラジエント溶出を行った。なお、溶媒には逆相的吸着を抑えるためにアセトニトリルを終濃度10%となるように添加した。検出は280 nmで行い、ピーク毎に分取した。

次に、活性区を凍結乾燥した後少量の蒸留水に溶かし、Hi-Pore RP304

(Bio-Rad社、4.6 x 250 mm)で分離した。0.1% TFA / 10% アセトニトリルの展開溶媒で吸着させ、その後アセトニトリル濃度を50%まで60分で上昇させるグラジエント溶出を行った。流速は1 ml/min、検出は280 nmで行った。

### [ 2 - 3 ]

#### ◎アミノ酸配列分析

アミノ酸配列分析では、以下の試薬、溶媒を使用した。

酢酸エチル (アミノ酸配列分析用特製試薬、半井化学薬品)、エタノール (スペクトル用特製試薬、半井化学薬品)、TFA (アミノ酸配列分析用試薬、和光純薬)、ピリジン (アミノ酸配列分析用、東京化成)、PTH-アミノ酸標準試薬 (PIERCE)、水 (HPLC用、半井化学薬品)

HPLC活性区を凍結乾燥し、ギ酸15  $\mu$ l、水15  $\mu$ lを加え、攪拌して充分溶解させた後、15  $\mu$ l (EH5  $\mu$ g相当) を、ガラスサンプル管に分取した。これを減圧乾固してギ酸を除き、Edman分解の試料とした。

Edman分解は、まず試料乾固物に50%ピリジン15  $\mu$ l、PITC 0.2  $\mu$ lを加え、空気を窒素置換した後に良く攪拌し、58°C 15分間カップリング反応を行って、フェニルチオカルバミルペプチドを作った。反応中は、2~3分毎に攪拌し、PITCを溶液中に充分に分散させた。反応液は、約15分吸引して乾固させた後、残留するピリジンをよく除くため、エタノール10  $\mu$ lを加えて攪拌してから再び減圧乾固した。次に、TFA 15  $\mu$ lを加え、窒素置換後攪拌し、続いて58°C 15分間切断反応を行い、末端アミノ酸のチアゾリノン誘導体を生成させた。反応後減圧乾固し、水30  $\mu$ l、酢酸エチル50  $\mu$ lを加え、充分に攪拌して分配抽出を行った。配列分析の3段目以降では、試料ペプチドが酢酸エチル相に抽出されるのを抑えるために、ポリブレン溶液(1mg/ $\mu$ l)を2  $\mu$ l加えた。攪拌した抽出液は、2500rpm、5分遠心分離し、チアゾリノン誘導体が抽出された酢酸エチル層を、マイクロシリンジで吸い取り(40~45  $\mu$ l)、別のサンプル管に移して減圧乾固した。乾固物に、25%TFA 15  $\mu$ lを加え、窒素置換後良く攪拌し、58°C 10分間転換反応を行い、安定なPTH-アミノ酸を生成させた。反応液は減圧乾固し、HPLCのアミノ酸同定系で分析した。分配抽出の下層(水層)は、減圧乾固し、再び次の段のEdman分解を行った。

PTH-アミノ酸の同定は、前述のHPLC装置を用い、Ultrasphere カラム (4.6x250 mm, ALTEX) で分離し、265nmの紫外吸収で検出した。溶出条件は、10mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.5)、流速1ml/minで、アセトニトリル濃度18%で5分流した後、25分間で50%までアセトニトリル濃度を上げ、グラジエント溶出を行った。

Applied Biosystems社モデル470A気相式シーケンサーによるアミノ酸配列分析は、HPLCで分取したサンプルを遠心分離エバポレーター（佐久間製作所）で約50 $\mu$ lに濃縮した後、試料を分析した。得られたPTHアミノ酸は、上記の条件で、HPLCを用いて分析した。

## 第二章

本実験における操作のうち、フェノール抽出、クロロホルム抽出、エタノール沈殿、アガロースゲル電気泳動、制限酵素消化などの基本的な操作は文献(62)(63)に従った。

### ◎各種培地の組成

LB培地 : 1% Bacto-trypton  
0.5% Yeast extract  
1% NaCl

LB-Mg 培地 : 10mM MgSO<sub>4</sub>/LB

LB-Ampicilin : 50 $\mu$ g/ml ampicilin/LB

LB agar : 1.5% Bacto agar(Difco)/LB

LB-Amp-X-gal-IPTG plate : LB agar 滅菌後、1 $\ell$  あたり、  
2% X-gal/dimethyl formamide 2ml,  
10mM IPTG 5ml, 20mg/ml ampicilin 5ml  
を加える。

$\phi$  培地 : 2% Bacto-trypton  
0.5% Yeast extract  
1.02% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O  
KOH で pH7.5 に合わせる。

M9-plate (E. coli·JM109株保存用培地) :  
1.5% Bacto-agar  
10% 10xM9 salts\*  
0.2% glucose  
0.001% thiamine

\* 10x M9 : 6% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% NaCl,  
0.1% NH<sub>4</sub>Cl, 10mM MgSO<sub>4</sub>, 1mM CaCl<sub>2</sub>

◎各種溶液の組成

S M溶液 : 0.1M NaCl  
0.2% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O  
50mM Tris-HCl (pH 7.5)  
2% gelatin  
蒸留水で1ℓに合わせる

T E : 10mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) / 1mM EDTA

1 x S S C (Standard saline citrate) :  
0.15M NaCl  
0.015M Trisodium citrate  
HCl または NaOH で pH 7.0 に合わせる。

P B S (Phosphate-buffered saline) :  
137mM NaCl  
2.68mM KCl  
1.47mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
8.06mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

T F B (Transformation buffer) :  
30mM CH<sub>3</sub>COOK  
100mM RbCl  
50mM MnCl<sub>2</sub>  
10mM CaCl<sub>2</sub>  
15% glycerol  
0.2M CH<sub>3</sub>COOH で pH 5.8 に合わせ、0.22μm の除菌フィルターで滅菌。

F S B (Frozen storage buffer) :  
10mM MOPS\*  
10mM RbCl  
75mM CaCl<sub>2</sub>  
15% glycerol  
1M KOH で pH 6.5 に合わせ、0.22μm の除菌フィルターで滅菌。  
(\*MOPS : 3-[N-morpholino]propanesulfonic acid)

プレハイブリダイゼーション溶液、ハイブリダイゼーション溶液：

20x SSC	9ml
100x Denhardt's solution*	3ml
10% SDS	3ml
10mg/ml salmon germ DNA	0.3ml
H <sub>2</sub> O	14.7ml
全量	30ml

溶液は、メンブレン1cm<sup>2</sup>あたり、プレハイブリダイゼーションでは0.2ml、ハイブリダイゼーションでは0.05ml加えた。

\*100x Denhardt's : 2% 牛アルブミン Fraction V  
2% ポリビニルピロリドン-K-90  
2% Ficoll 400

## 第1節

### [1-1]

#### ◎mRNAの調製

mRNAの調製に用いた器具は、原則として0.1%DEPCに37°C15時間以上浸してRNase活性を除いた後、オートクレーブをかけてDEPCを分解した。ガラス器具は、原則として200°C、4時間以上の乾熱滅菌を行った。

カイコ4令眠、及び5令幼虫の脳2500個を顕微鏡下で摘出し、液体窒素中で凍結後、-80°Cに保存した。凍結した脳を、4M guanidinium isothiocyanate (GTC) 中で粉碎し、遠心管中の5.7M 塩化セシウム (CsCl) に重層した後、28,000rpm、50hr、20°Cで遠心分離し、RNAを沈澱させた。RNAの沈澱を、1% SDSを含むTEに溶解し、クロロホルム抽出で混入したタンパク質を除去した後、エタノール沈澱にてRNAを回収した。得られた全RNAは、260nmのUV吸収強度より、約550μgと計算された。この全RNAを、oligo dT-cellulose カラムを用いて精製し<sup>63)</sup>、12μgのpoly(A)<sup>+</sup> RNAを得た。

蛹のmRNAは、SDS-フェノール法<sup>65)</sup>で調製した。蛹化後2~5日目のカイコ蛹頭部から、顕微鏡下で脳を摘出し、直ちに液体窒素中、または、ドライアイス上で凍結後、-80°Cに保存した。凍結した脳535個を、液体窒素を加えた乳鉢中で良く磨砕し、1mlの30mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.5)/100mM NaCl/1mM EDTA/2% SDS/0.5% Sarcosyl に溶解してから、等量のフェノール、フェノール/クロロホルム=1:1で3回ずつ抽出してタンパク質を除いた。続いて水相に、終濃度2Mとなるように6M LiCl溶液を加え、4°Cに一晩置いてDNAとの分別沈澱を行った。1200rpm、15分遠心分離して上清を除き、

RNAの沈澱を700 $\mu$ lの30mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)/100mM NaCl/1mM EDTA/0.5% Sarcosyl に溶解し、再び、LiCl沈澱を行った。沈澱は3mlの上記緩衝液に溶解後、エタノール沈澱で回収した。この沈澱は、300 $\mu$ lの30mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.5)/100mM NaCl/1mM EDTA/2% SDS/0.5% Sarcosyl に溶解し、フェノール/クロロホルム=1:1で3回抽出してSDSを除き、エタノール沈澱で、全RNAを回収した。これは、260nmのUV吸収より、約650 $\mu$ gと定量された。

この全RNA試料を100 $\mu$ lの30mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.5)/100mM NaCl/1mM EDTA/0.5% Sarcosyl に溶解し、その半量 50 $\mu$ l(317 $\mu$ g)に、Oligotex-dT30を500 $\mu$ l(10mg)加え、66 $^{\circ}$ C、5分加熱後、氷上で急冷した。これに、0.1容(55 $\mu$ l)の5M NaClを加え、37 $^{\circ}$ C10分加温し、15,000rpm,10分遠心分離した。上清を除き、沈澱に400 $\mu$ lのDEPC処理水を加え、66 $^{\circ}$ C5分加熱した後、15,000rpm、10分遠心分離し、上清中にmRNAを溶離させた。上清は、フェノール/クロロホルム=1:1で抽出後、エタノール沈澱でmRNAを回収した。この精製で、11.7 $\mu$ gのpoly(A)<sup>+</sup>RNAを得た。脳からのRNA調製量は、全RNA 1.2  $\mu$ g/brain、poly(A)<sup>+</sup>RNA 45 ng/Br となった。

[1-2]

1-2-1

#### ◎ライブラリーの作製

カイコ4令眠、5令幼虫の脳から調製したmRNAを用いて、cDNA synthesis system plus (Amersham)、cDNA cloning system  $\lambda$ gt10(Amersham)を用い、マニュアルに従って、cDNAを合成した。即ち、mRNAに、12~18merのoligo dT をプライマーとして加え、逆転写酵素により1st strand cDNA を合成した。RNA鎖を、RNaseHで消化してニックを入れた後、E.coli DNA polymerase でRNAをDNAに置換し、続いて T4 DNA polymerase により、完全な2本鎖のcDNAを合成した。これを、EcoRI methylase でEcoRI切断部位をメチル化して保護した後、EcoRIリンカーを末端に付加し、EcoRIで消化した。この断片を、EcoRIで消化して脱リン酸化した $\lambda$ gt10 arm と混ぜ、T4 DNA ligase によってライゲーションさせた。これを、 $\lambda$ ファージが溶原化した E.coli の抽出物と混ぜ、in vitro packagingを行った。

#### ◎ $\lambda$ gt10ライブラリーの力価 (plaque formation unit = pfu) の測定

E.coli NM514株(hf1A, hsdRk)を、0.2% Maltose/10mM MgCl<sub>2</sub> を含むLB培地10mlで37 $^{\circ}$ C一晩振盪培養し、3000rpm、5分遠心分離し、SM溶液4mlに

懸濁する。この懸濁液100  $\mu$ lを、 $10^{-3}$ ~ $10^{-7}$ 程度の中でSM溶液で段階希釈したライブラリーのファージ液100  $\mu$ lと混和し、37°Cに15分置いて感染させた。その後、オートクレーブして溶解、滅菌した10mM MgCl<sub>2</sub> /0.8%  $\gamma$ -D-グルタミン酸を含むLB (Top Agar) を、45°Cに冷却し、その3mlと、ファージを感染させた菌液を混和して、すばやくLB-Amp<sup>r</sup>-IPTG-X-galプレートに重層した。Top Agr 固化後、37°Cで16時間培養し、各プレートに生じたプラーク数を計測した。一枚あたり $10^2$ ~ $10^3$ 程度のプラークの生じたプレートの計測数をもとに、希釈率を考慮して、ライブラリーの力価を算出した。

## 1-2-2

### ◎DNAの合成

オリゴヌクレオチドは、Applied Biosystems社のモデル380B DNA 合成機を用いて、ホスホアミダイト法により固相合成した。合成したDNAは、55°C16時間保温して脱保護した後、遠心分離エバポレーターを用いてアンモニアを除き、凍結乾燥した。凍結乾燥物をTEに溶かし、7M尿素を含む8%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。その後、0.5  $\mu$ g/mlエチジウムブロミド溶液に浸してから紫外線を照射してDNAのバンドを検出し、それを切り出した。切り出したゲルはマイクロ遠心分離管中、ガラス棒で破碎し、0.8mlの溶出緩衝液(500mM 酢酸アンモニウム(pH8.0)/1mM EDTA)を加え、42°C一晩保温した後エタノール沈澱を行い回収した。沈澱は、乾燥後TEに溶解し、260nmの吸光度からDNA量を計算した。

### ◎DNAプローブの<sup>32</sup>P標識

オリゴヌクレオチドの標識は、DNAプローブ 6 pmol (1~2  $\mu$ l)、10x kination buffer 1  $\mu$ l、T4-polynucleotide kinase 10unit (1  $\mu$ l)を混和し、蒸留水を加えて全量 6  $\mu$ lにする。これに、リン酸化基質として 20 pmol [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP\*\* (6  $\mu$ l)を加えて37°C 1時間、カイネーション反応を行った。次に、反応液に100  $\mu$ lのTEを加え、bed volume 0.2mlのDEAE-cellulose (DE-52) カラムにのせ、陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製を行った。すなわち、1ml TE、2.5ml (0.5ml x5) 0.2M NaCl/TEを順次流して未反応のATPを除いた後、1M NaCl/TEを100  $\mu$ lずつ分画して捕集し、ラベルされたDNAを溶出させた。各分画は、2  $\mu$ lに蒸留水18  $\mu$ lを加えた後、液体シンチレーションカウンターにかけ、<sup>3</sup>Hモードで水のチェレンコフ光をカウントし、カウントの強いフラクションを合わせて、ハイブリダイゼーション等の実験に用いた。通常、200~400  $\mu$ lの溶出区にラベルされたプローブが、回収された。

ランダムプライムによるDNAの標識は、ランダムヘキサマーのヌクレ

オチド (Amersham 等) をプライマーに用いて、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTP (3,000Ci/mM) を dATP, dGTP, dTTP と共に基質として加え、Klenow 酵素により DNA 合成反応を行って、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTP を取り込んだ DNA 断片を調製した。

#### ◎ $\lambda$ gt10 ライブラリーのスクリーニング

力価の測定と同様に、E. coli・NM514 株の菌液とファージ希釈液を Top Agar に加え、プレートに重層して 37°C で培養し、ブランクを生じさせた。但し、ファージ液は、ライブラリーの力価を元に、プレート一枚あたり  $1 \times 10^3 \sim 10^4$  ブランクとなるように希釈した。

ブランクの生じたプレートは、4°C に 60 分置き、上層寒天が剥離しないように固めた後、メンブレントランスファーを行なった。メンブレンは、ナイロンメンブレン Colony/Plaque Screen (NEN Research Products) を使用した。メンブレンをプレートに密着させてファージをメンブレンに転写させたが、その時間は 1 枚目は 2 分間とし、2 枚目以降は 2 分ずつ時間を長くした。ブランクを転写したメンブレンは、0.4M NaOH に 2 分間浸してファージタンパク、DNA を変性させ、次に 1M Tris-HCl (pH 7.4) に 2 分間浸して中和させた。これらの処理をそれぞれ 2 回ずつ行なった後、風乾させた。ファージ DNA を固定したメンブレンはハイブリダイゼーションを行なうまで 4°C で保存した。

得られたファージ DNA の固定されたメンブレンは、次項に述べる方法でオリゴヌクレオチドプローブとのハイブリダイゼーションを行なった。ハイブリダイゼーション後、増感紙を用いて -70°C で 20~40 時間オートラジオグラフィーを行なった。1 つのブランクから転写した 2 枚のメンブレンの両方にシグナルのあるものを陽性ブランクと判断し、上層寒天ごとブランクをとり、1 ml の SM 溶液に懸濁して、クロロホルム 50  $\mu$ l を加え、ファージ保存液とし、二次スクリーニングに供した。二次スクリーニングは、それぞれのファージ保存液から、約 1000 個のブランクができるように液を取り、上に述べたような操作でブランクハイブリダイゼーションを行なった。ここでも陽性と判断されたブランクを拾い、1 ml の SM 溶液に懸濁し、クロロホルム 50  $\mu$ l を加え、4°C に保存した。

#### ◎ ハイブリダイゼーション

DNA を固定したメンブレンをポリエチレン製の袋に入れ、プレハイブリダイゼーション溶液をメンブレン 1cm<sup>2</sup> あたり 0.2ml 加え、気泡をできるだけ取り除いて密封し、ハイブリダイゼーションと同温度で、6~18 時間保温した。次にメンブレンを新しいポリエチレンの袋に移し、ハイブリダイゼーション溶液を 1cm<sup>2</sup> あたり 0.05ml 入れ、さらに <sup>32</sup>P-標識したプローブ (6p mol; 終濃度 2~10ng/ml) を加えて密封して、恒温槽で 12~18 時間振盪した。

振盪後、メンブレンをタッパーウェアに移し、ハイブリダイゼーションと同温度で6×SSCで1時間洗浄を2回行った。風乾後、増感紙を入れてX線フィルムを-70℃で、12~36時間感光させた。

### 1-2-3

#### ◎ファージDNAの調製

ホストとなる大腸菌(NM514, P2 392株など)を0.2% Maltose/10mM MgCl<sub>2</sub>を含むLB培地10mlで37℃一晩振盪培養し、培養液のOD<sub>600nm</sub>を測定後、3000rpm, 5分遠心分離し、SM溶液6mlに懸濁する。600nmの吸光度から、吸光度  $1 = 8 \times 10^8$  cells/ml として懸濁液中の菌数を測定し、多重感染度0.01~0.03となるようにSM溶液で希釈したファージ溶菌液を加え、緩やかに振盪しながら37℃に20分間保持した。次に、10mM MgCl<sub>2</sub>を含むLB培地500ml (2ℓ 三角フラスコ)に添加し、37℃で一晩培養した。白い糸状の溶菌物が観察された時点で、培養液に1ml クロロホルムと14.6g NaClを加え、よく攪拌してから37℃10分間振盪培養し、さらに溶菌を進行させた。これを遠心分離管に移し、4℃で7,000rpm, 10分遠心分離した。上清に、PEGを終濃度10%w/vとなるように加え、0℃で1時間以上(〜一晩)静置し、ファージ粒子を沈殿させた。静置後、7,000rpm, 20分、4℃で遠心分離し、上清を除いた。沈殿を3mlのSM溶液に駒込ピペットを用いてよく懸濁し、等量のクロロホルムで3回抽出操作を行い、PEGを除いた。これに、溶液1mlあたり0.75gのCsClを加え、 $\rho = 1.45, 1.50, 1.70$  g/mlの各層のCsCl<sub>2</sub>密度勾配をつくった遠心管に重層した。これを、12℃で35,000rpm, 20時間、遠心分離した。 $\rho = 1.5$ 付近に形成されるファージの白く濁ったバンドを、注射針を刺して抜き取り、10mM NaCl/10mM MgSO<sub>4</sub>/50mM トリス-塩酸緩衝液(pH8.0) 1ℓ に対して3時間透析した。透析後、内液を20mM EDTA (pH8.0)/0.5% SDS 溶液とし、これに50μg/mlとなるようにプロテイナーゼKを添加し、60℃で1時間消化した。これを、等量のフェノール、及び等量のクロロホルムで、順次抽出し水相を回収した。水相は、1ℓのTEに対して、4℃で一晩透析し、内液をエタノール沈殿して、DNAを回収した。

#### ◎ライゲーション

ライゲーションは、T4 DNAリガーゼを用いた、DNAライゲーションキット(宝酒造)により、説明書に従って反応させた。反応時間は、通常、接着末端の場合は、16℃ 0.5~3時間、平滑末端、或いは、挿入断片が充分量無い場合は、16℃ 14時間(一晩)とした。

### ○DNA断片のリン酸化

DNA断片をリン酸化する必要がある場合は、50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.6)、10 mM  $MgCl_2$ 、5mM DTT、0.1 mM EDTA 中 A T P  $2\mu g$  (3nmol) と T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (宝酒造) を用いて37°C 60分反応させ5'端をリン酸化した。

### ○DNA断片の脱リン酸化

脱リン酸化する必要がある場合には、約5pmolのDNA断片に、0.5M トリス-塩酸緩衝液 (pH9.0)/10mM  $MgCl_2$ /1mM  $ZnCl_2$ /10mM スベルミジン 溶液 5 $\mu$ l、仔牛小腸アルカリフォスファターゼ20単位を加え、蒸留水を加えて50 $\mu$ lにし、37°C 1時間、反応させた。反応後、フェノール/クロロホルムで酵素を除き、エタノール沈澱でDNAを回収した。

### ◎Competent cell の作成 (R<sup>b+</sup>法)

*E. coli* JM109株 (*recA1 supE44 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 relA1  $\Delta$  (lac-proAB)*) を、保存継代用のM9-plateから白金耳で採り、LB培地10mlに植菌し、37°Cで一晩振盪培養した。その培養液100 $\mu$ lを、10mlの $\phi$ 培地に加え、 $OD_{600} = 0.3 \sim 0.4$  となるまで約3時間、37°Cで振盪培養し、遠心分離(5,000rpm, 4°C, 5分)により菌体を集めた。これを、20mlの氷冷したTSBに緩やかに懸濁し、氷中に15~30分置いた。遠心分離により集菌後、2mlのFSBに懸濁し、Competent cell とした。Competent cell は、0.2mlずつ分注し、-80°Cに保存した。

### ◎形質転換

プラスミド10 ng相当を含むライゲーション反応液をマイクロ遠心管内でコンピテントセル200 $\mu$ lと混合して氷中40分間置いた後42°C 60秒間置き、直ちに2分間氷冷した。これにLB培地1mlを加え、37°Cで60分間振盪した後、LB-Amp-X-gal-IPTGプレートにまき、37°Cでインキュベートした。非組換え体プラスミドを受容したものは青いコロニーを、組換え体プラスミドを受容したものは白いコロニーを生じた。

### ◎プラスミドの調製法

目的のコロニーを白金耳またはつまようじで拾い上げ、LB-Amp培地 (2~10ml) に植菌し、37°Cで一晩振盪培養した。培養液は、5,000rpmで5分遠心分離し、沈澱に25mM トリス-塩酸緩衝液 (pH8.0) 1mlを加えて懸濁し、1.5mlマイクロ遠心管に移し再度5,000rpm、5分遠心分離した。上清は殺菌後、廃棄した。沈澱に、100 $\mu$ lの50mM グルコース/10mM EDTA/25mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) を加え、緩やかに懸濁後、室温に5分間置いた。これに、200 $\mu$ lの0.2N NaOH/1% SDS を加え、緩やかに懸濁した後、氷中に5分間置いた。次に、150 $\mu$ lの5M 酢酸カリウム溶液を加えて良く混合して中和し、

水中に5分以上置いた。これを、16,000rpm、5分間遠心分離し、上清を別のチューブに移す。これに、等量のTE飽和フェノールを加え、よく攪拌した後16,000rpm、5分遠心分離した。界面の変性タンパク質が混入しないように注意して、水層(上層)を移し、等量のクロロホルムを加え、同様に抽出した。水層に、2~2.5倍容のエタノールを加え、混合した後、-80℃に20分以上置き、16,000rpmで、10分遠心分離した後、上清を捨て、70%エタノールを加えて再び16,000rpm、10分遠心分離する。上清を除いた後、デシケーター中で20分吸引して乾燥させた。乾固物に、TEを適量加え、各種の反応に用いた。

塩基配列解析の場合など、純度の高いプラスミドが必要な場合は、TE溶液に10 $\mu$ g/mlになるようRNase AまたはHを加え、37℃で1時間消化した後、60%容の20% PEG/2.5M NaCl 溶液を加え、水中に1時間以上置いた。その後、16,000rpm、20分遠心分離し、上清を除いた後、沈澱に相当量の70%エタノールを加え、再び16,000rpmで5分遠心分離した後、沈澱を減圧乾燥させた。

プラスミドは乾燥した後、TE 50 $\mu$ lに溶解し、その一部を取って電気泳動によりプラスミドの大きさを確認した。プラスミドの電気泳動は通常TAE (0.04M トリス-酢酸(pH 8.0) / 1mM EDTA) 中0.5%水平アガロースゲルで行った。マーカーとして、 $\lambda$ ファージのHindIIIまたは、HaeIII消化物を用いた。大量にプラスミドを調製する場合は、基本的上記の方法をスケールアップして行った。

#### ◎サザンハイブリダイゼーション

組み替え体ファージDNA、或いは、プラスミドDNAを、適当な制限酵素で消化し、生じたDNA断片の0.1~1.0 $\mu$ g相当を、0.5%アガロースゲルで、電気泳動を行なった。泳動後、ゲルをエチジウムブロミドで染色し、そのパターンを記録した。次に以下に述べるようにサザンプロットングを行ない、ゲルからナイロンメンブレン(Gene Screen Plus; NEN Research Products)にDNAを移し、固定した。泳動後、ゲルを0.25N HCl中で15分間、0.4N NaOH/0.6M NaCl中で30分間、及び、1.5M NaCl/0.5M トリス-塩酸緩衝液(pH7.5)中で30分間それぞれ室温でインキュベートした。トランスファーは常法<sup>3)</sup>に従って行なった。ナイロンメンブレンは、蒸留水に数秒間浸した後、20xSSCに15分間浸し、前処理を行なった後、使用した。トランスファー後、DNAを固定したメンブレンを0.4N NaOHに30秒間浸し、0.2M トリス-塩酸緩衝液(pH7.5) / 2xSSCで洗い、DNAを固定した後風乾した。ハイブリダイゼーションは、スクリーニングの項に述べたブランクハイブリダイゼーションの際の方法に準じて行なった。

## ◎塩基配列の決定

### ○プラスミドのアルカリ変性

2本鎖プラスミド $2\mu\text{g}/10\mu\text{l}$ TEに $2\text{N NaOH } 2\mu\text{l}$ 、 $2\text{mM EDTA } 2\mu\text{l}$ 、蒸留水 $6\mu\text{l}$ を加え、 $37^\circ\text{C}$ 5分間放置した。 $5\text{M}$ 酢安(pH 4.5) $8\mu\text{l}$ 、エタノール $100\mu\text{l}$ を加え、 $-70^\circ\text{C}$ 5分間置いた後、遠心分離した。ペレットを $70\%$ エタノールで洗った後、アニーリングに用いた。

### ○プライマーとのアニーリング及びポリメラーゼ反応

実験の操作はM13シーケンスキット(宝酒造)、及び、Sequenase (ver2.0)(東洋紡)の説明書に従った。アルカリ変性で得られたDNA  $0.5\text{ pmol}$ に対しプライマー $0.5\text{ pmol}$ を用いてアニーリングを行った。 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (NEMなど、 $400$  または  $800\text{ Ci/mmol}$ )  $0.5\sim 2\mu\text{l}$ とDNAポリメラーゼを加え、4種類のdNTP-d dNTP混合液に加えてポリメラーゼ反応を行い、ホルムアミド停止液(95%ホルムアミド、0.1%キシレンシアノール(XC)、0.1%プロムフェノールブルー(BPB))を加えて反応を停止した。

### ○ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)

40%アクリルアミド液は、38%アクリルアミド/2%ビスアクリルアミド溶液を調製し、イオン交換樹脂(AG 501-X8、Bio Rad社)で室温で1時間攪拌して脱イオン化して用いた。

次のような組成の8%ポリアクリルアミドゲルを作製した。まず、尿素 $24\text{g}$ 、 $10\times\text{TBE}$ ( $0.89\text{M}$ トリスホウ酸(pH 8.0)/ $0.02\text{M}$  EDTA)  $5\text{ml}$ 、40%アクリルアミド液 $10\text{ ml}$ を混合し、攪拌しながら尿素を溶かした。蒸留水で容量を $50\text{ ml}$ にし、滅菌フィルターを通して不溶物を除去した。 $10\%$ 過硫酸アンモニウム溶液 $300\mu\text{l}$ 、 $\text{N,N,N',N'}$ -tetramethyl-ethylenediamine (TEMED)  $15\mu\text{l}$ を加えてよく混合し、 $40\text{ cm}$ または $60\text{ cm}$ のガラスプレートの間に流し込み1時間以上静置して重合させ、厚さ $0.35\text{ mm}$ のゲルを作製した。ゲルを電気泳動装置にセットしてゲルの上部と下部を $1\times\text{TBE}$ で満たした。ゲルの上部に溶け出した尿素が残らないように注意し十分取り除いてから試料を各レーン $2\mu\text{l}$ ずつマイクロシリンジを用いてのせた。泳動は最高電圧 $2,000\text{ V}$ 、最高電流 $30\text{mA}$ 、最高電力 $50\text{W}$ の条件で行った。XC、及び、BPBの泳動位置から、適当な時間で泳動を止めた。泳動終了後、ゲルを濾紙(Whatman 3MM)に移してサララップで覆い、ゲル乾燥機を用いて $70^\circ\text{C}$ で40分間乾燥した。室温で増感紙なしでゲルのオートラジオグラフィーを一晩行った。

また、バイオイメージアナライザー(Fuji-Xerox社)を用いた場合は、イメージングプレートを、20分~5時間感光させた後、イメージスキャナー

で読みとり、解析した。感光時間は、オートラジオグラフィーの感光時間の約1/20を目安として設定した。

[1-3]

1-3-1

#### ◎λgt11ライブラリーのスクリーニング

λgt11ライブラリーの力価の検定、及び、スクリーニングは、基本的には、λgt10の場合と同様に行った。但し、λgt11の宿主には、*E. coli* Y1090株 [Δ*lacU169*, *proA*<sup>+</sup>, Δ*lon*, *araD139*, *strA*, *thi*, *supF*[*trpC22::Tn10*](*pMC9*)]を用いた。

1-3-2

#### ◎PCR法

PCR法は、基本的には、文献(76)(79)を参考に、条件を設定した。

酵素は、Recombinant *Taq* DNA polymerase (Perkin Elmer Cetus 社)250単位を用い、10mM トリス-塩酸緩衝液 (pH8.3)/50mM KCl/1.5mM MgCl<sub>2</sub>/0.01%ゼラチン 溶液中で、基質として4種類の10mM dNTPを加えて、100μlスケールでPCRを行った。プライマーは、通常、1μMとなるよう加えた。増幅反応には、プログラムを組んで複雑な温度制御が行える、サーマルサイクラー (AB-1800型:アトー社)を用いた。

#### ◎蛍光色素ラベルを用いた配列分析

蛍光色素ラベルによる配列分析は、Dye Deoxy™ Cycle シーケンシング・キット(Applied Biosystems 社)を用いて、シーケンス反応手順説明書に従って行った。即ち、*Taq* DNA polymerase (Perkin Elmer Cetus 社)を用い、蛍光色素を導入したddNTPを加えたダイデオキシ法により、伸長反応を行った。反応は、サーマルサイクラー中で、変性96℃30秒・アニール50℃15秒・伸長60℃4分・25cycleの条件で行った。反応液は、Sephadex G-50のミニカラム(Bio-Spin 30; Bio-Rad 社)で過剰な蛍光標識ddNTPを除いた。これを、373A型DNAシーケンサー (Applied Biosystems 社)で、泳動、検出、解析した。

[1-4]

#### ◎プライマー伸長法

poly(A)<sup>+</sup>RNA 1μgを含む14μl Hybridization buffer (HB)\*に、<sup>32</sup>P-標識したオリゴヌクレオチドプローブ1μlを加え、85℃、10分加熱して変性させた後、37℃に20時間置き、アニールさせた。エタノール沈殿でRNA-DNA断片を回収し、乾燥させた後、2mM dNTPs 5μl、逆転写酵素

を含む緩衝液(BE)\*\* 5 $\mu$ lを加え、42 $^{\circ}$ C1時間、逆転写反応を行った。70 $^{\circ}$ C 10分加熱した後、フェノール/クロホルムでタンパク質を抽出し、エタノール沈澱で、cDNAを含む核酸分画を回収した。乾燥させたcDNAに、グリセロールを含むPAGE用ローディングバッファー6 $\mu$ lを加え、数時間ボルテックスミキサーにかけて十分に溶解させた。この試料を、配列分析と同様に、PAGEで泳動した。

\* : HB

40mM PIPES buffer (pH 6.5)/1mM EDTA/400mM NaCl を、DEPC処理した後、formamide を final 80% となるように加えた。

\*\* : BE

25mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.5)/40mM KCl/5mM MgCl<sub>2</sub>/50mM DTT 上記溶液に、RNase inhibitor(宝酒造) 0.1volumeと、逆転写酵素(RAV-2;宝酒造) を final 4unit/ $\mu$ lとなるように加えた。

### [1-5]

#### ◎アンカードPCR法

カイコ蛹の脳から調製した全RNA 10 $\mu$ gに、oligo dT、または、36merのプライマーを300ng加え、65 $^{\circ}$ C5分加熱して変性させてから、ゆっくりと室温まで冷やしてアニールさせた。これに、Molony murine leukemia virus reverse transcriptase 10unitを加え、逆転写反応を行って1st strand cDNAを合成した。この反応には、1st strand synthesis kit (Stratagene)を用いた。cDNAはエタノール沈澱で回収し、TEに溶解した後、1mM dGTPを基質として、Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)を37 $^{\circ}$ C1時間反応させ、poly(G) tailを付加した。これを鋳型に、本文に述べた種々の条件でPCRを行った。

### 第2節

ゲノムDNAクローンの解析は、以下に述べるもの以外は、基本的に第1節に述べたcDNAの解析に用いた方法で行った。

### [2-3]

#### ◎カイコ染色体DNAの調製

カイコ5令幼虫の絹糸腺(約5g)をドライアイスで冷却しながら乳鉢、乳棒を用いて摩砕し、粉体化した。得られた粉体を、ガラスチューブに移し、緩衝液(0.5M EDTA/0.5% N-ラウリルサルコシル/0.05M Tris-HCl(pH 8.0)) 15mlを加え懸濁した。プロテイナーゼK水溶液(20mg/ml)を150 $\mu$ l加え、

50°C、5時間保温した。この間30分毎に反応容器を逆さにして反応液を混合した。保温後、CsClを反応液1mlに対し、0.75gの割合で加えた。これを、13.5ml容超高速遠心分離機用チューブ2本に移し、エチジウムブロミド水溶液(10mg/ml)100 $\mu$ lを加え、0.75mg/mlのCsCl水溶液をチューブ容量いっぱいまで加えた。超高速遠心分離機(コントロール社、CENTRIKON T-2060)でアングルローター(TFT65.13)を用いて、55,000rpmで20°C、20時間遠心分離し、遠心分離後、エチジウムブロミドによって染色されたDNAのバンドを抜き取った。このDNA溶液に、TEを加えて3mlとし、これにTE飽和イソプロピルアルコールを同量加え、エチジウムブロミドを抽出した。この抽出を3回繰り返した後、水層を透析チューブに移し、4 $\mu$ lのTE中、4°C、20時間透析した。この間、透析液は3回交換した。透析後、内液約5mlを遠心管に移し、エタノール沈殿を行なった。得られたDNAペレットを1mlのTEに溶解した。一部を取って、260nmにおける吸光度を測定し、DNA量を求めた。このDNAを、数種類の制限酵素で消化し、アガロースゲル電気泳動を行い、サザンハイブリダイゼーションで分析した。

### 第3節

#### [3-1]

##### ◎ノーザンハイブリダイゼーション

ノーザンハイブリダイゼーションは、文献(63)に従って行った。

全RNA、或いは、mRNAを1M glyoxal/50% DMSO/10mM リン酸二ナトリウム 中で50°C1時間変性させた。それを、10mM リン酸二ナトリウムを含む、1.4%アガロースゲルで、10mM リン酸二ナトリウムを泳動バッファーとして、電気泳動を行った。その際、ペリスタポンプを用いて、泳動バッファーを陰極から陽極へ循環させ、pHの変動を抑えた。

#### [3-2]

##### ◎in situ ハイブリダイゼーション

###### ○オリゴヌクレオチドプローブのジゴキシゲニンラベル

36merオリゴヌクレオチド(図2-1)100pmolに、ジゴキシゲニンでラベルしたダイデオキシUTP(DIG-ddUTP)を基質として加え、塩化コバルトを含む緩衝液中で37°C、15分間、ターミナル・トランスフェラーゼでヌクレオチド付加反応を行った。生成した3'-末端にDIG-ddUTPを一つ付加したプローブは、エタノール沈殿によって精製した。この反応には、DIG-3'エンドラベリングキット(ペーリンガー・マンハイム社)を用いた。

### ○組織の固定、前処理

カイコ幼虫、蛹、及び成虫の頭部を0.1%Tween20を含むPBS (=PBT)中で解剖し、脳、食道下神経節などの組織を取り出し、85%エタノール/5%酢酸/4%ホルムアルデヒド液に0°Cで30~45分浸して固定した。次に、15%サッカロース/PBT中に4°Cで数時間~一晩浸し固定液を除いた。

### ○ハイブリダイゼーション及び検出

固定した脳は、PBTに浸してから(5分X4回)、組織への浸透性を良くするためにプロテアーゼKを用いて、25°Cで30~60分消化した後、0.2%グリシンを含むPBSに2分間浸して反応を止め、さらにPBT(5分X2回)、3%バラホルムアルデヒド(20分)に浸した。次に、PBTに置換した後(10分X3回)、HB\*とPBTを1:1に混合した溶液に20分浸し、さらにHBに1時間浸した。次に、DIG-ddUTPラベルしたプローブをHBに浸した組織と混ぜ、37°Cで15時間以上ハイブリダイズさせた。その後、HB:PBT=4:1、3:2、2:3、1:4、100%PBT、の溶液にそれぞれ20分ずつ浸し、徐々にPBTに置換してから、2%ヤギ血清/PBTに30分浸して、抗体の非特異吸着を減少させるためのブロッキングを行った。これをPBTで洗浄(20分X2回)した後、アルカリホスファターゼでラベルした抗ジゴキシゲニン抗体を加えて37°C2時間保持し、再びPBTで洗浄(20分X4回)した。次に、100mM NaCl/50mM MgCl<sub>2</sub>/1mM レバミソールを含む100mM トリス-塩酸緩衝液(pH9.5)に浸した後(5分X3回)、5- $\beta$ -DE-4-クロロ-3-イソチアゾリル酸とニコチンテトラゾリウム塩を加えて、暗所で25°C、1時間発色反応を行った。これを、PBT(10分X2回)、蒸留水(3分)、70%エタノール(10分X2回)、90%エタノール(10分)、99%エタノール(10分)、50%サリチル酸/エタノール(10分)に順次浸した後、サリチル酸中に移し、顕微鏡を用いて観察した。

検出反応には、DIG-核酸検出キット(ペーリンガー・マンハイム社)を用いた。

\* HB (Hybridization buffer) :

5X SSC/5% 硫酸デキストラン/ 100  $\mu$ g/ml sssDNA  
/50% ホルムアミド\*

### [ 3-3 ]

### ◎免疫組織化学実験

カイコ幼虫、蛹、及び、成虫の脳を摘出し、ブーアン液\*に4時間以上浸して固定した。次に、2%Tween 20を含むTBS\*\*中で脱色し、蛹6日目以降の脳は、顕微鏡下で2本のピンセットを用いて組織を傷つけないように注

意を払いながら表面の殻を剥いた。幼虫、及び、蛹初期の脳は、殻が非常に薄く、除去する事が困難であった為、0.1%デオキシコール酸/2%Tween 20を含むTBSに4℃で一晩~3日浸し、抗体の透過性を向上させた。次に、TBSで適当に希釈した抗体液に4℃で一晩浸した後、25℃30分間TBS中に置いた。アルカリホスファターゼ標識した抗マウスIgG 二次抗体を加えて2時間反応させ、TBSで洗った後、発色を行った。発色の方法は、0.05% 3,3'-ジアミノベンチジン、0.1%過酸化水素水及び0.01Mイミダゾールを含むTBSに注意深く試料を観察しながら数分間浸し、組織が茶色く色付いた時点で速やかに溶液を除き、TBSで3回洗浄した。試料を70%エタノール、95%エタノール、100%エタノールの順にそれぞれ15分ずつ浸した後、サリチル酸メチルに浸し、顕微鏡下で観察した。

\*ブーアン液：飽和ピクリン酸水溶液:35%ホルムアルデヒド:酢酸=15:5:1

\*\*TBS (Tris-HCl buffered saline) :

50mM トリス-塩酸緩衝液(pH 7.4)/0.2M NaCl

## 謝 辞

本研究は、東京農工大学農学部環境資源学科、普後一助教授との共同研究で行われた。普後一助教授には、多くの検定蛹と卵を御供与頂き、また、主に生理学的な側面において貴重な御助言、御教示を賜りました。深く感謝の意を表します。

東京大学農学部農芸化学科生物有機化学研究室の鈴木昭憲教授、磯貝彰助教授、片岡宏誌助手、及び、東京大学海洋研究所助教授長澤寛道助教授には、日頃より数多くの御指導、御鞭撻を頂戴し、心より感謝いたします。特に、長澤寛道助教授には、生物有機化学研究室在任中から今日に到るまで、御自身の豊富な経験に基づく懇切丁寧な御指導を頂きました。厚く御礼申し上げます。

名古屋大学理学部生物学教室石崎宏矩教授、溝口明助教授、岩見雅史助手、安達卓博士、及び、分子生物学教室川上厚志助手には、分子生物学的手法、組織化学的手法について丁寧な御指導と、貴重な御助言を頂きました。また、本文に記したように、同教室で調製された試料も御供与頂き、実験に用いさせて頂きました。第2章に述べた研究の成果は、同教室で御指導頂いた実験技術に負うところが大きく、心から感謝申し上げます。

九州大学理学部市川敏夫博士には、カイコの神経組織化学的実験に関する貴重な資料を頂き、考察に役立てることが出来ました。厚く御礼申し上げます。

田中英夫氏（現 日本たばこ産業）、佐藤文治氏（現 藤沢製薬）、高野貴晴博士（現 三菱化成）には、分子生物学的手法について丁寧な御指導を頂き、研究成果の一部を本論文に加えさせて頂きました。深く感謝いたします。また、不幸にして一昨年逝去された故三木正司氏には、遺伝子工学

の基礎的な技術について、度々貴重な御助言を頂きました。ここに、感謝の意を表し、御冥福をお祈り申し上げます。

免疫組織化学的研究に際しては、国吉久人氏に助言を頂くと共に、同氏の調製した抗体を分与して頂きました。心から感謝します。

埼玉、千葉、茨城、栃木、山梨の各県の蚕業試験場、及び、群馬県是蚕種協同組合の方々には、材料収集において御協力頂き、深く感謝いたします。

第二章に述べた研究に用いた、mRNA抽出材料のカイコの脳の摘出には、片岡宏誌助手、有馬理香博士、河野強、石橋純、勝野健次の各氏にご協力頂きました。また、第一章に述べた抽出材料の蛹頭部の収集には、生物有機化学研究室の多くの方々に協力して頂きました。深く感謝いたします。

本研究を行うにあたっては、研究について、或いは、日常の事柄において、蔡晃植博士（現 理化学研究所）、中山二郎助手をはじめ、お名前を挙げられなかった生物有機化学研究室の多くの方々の有益な御助言、御協力を頂きました。心より感謝いたします。

### 参考文献

- 1) Suzuki, A., Mori, M., Sakagami, Y., Isogai, A., Fujino, M., Kitada, C., Craig, R. A. and Clewell, D. B. (1984) Isolation and structure of the bacterial sex pheromone, cPDI. Science, 226, 849-850.
- 2) Stotzler, D., Kiltz, H.-H. and Duntze, W. (1976) Primary structure of  $\alpha$ -factor peptides from Saccharomyces cerevisiae. Eur. J. Biochem., 69, 397.
- 3) Kopec, S. (1922) Studies on the necessity of the brain for the inception of insect metamorphosis. Biol. Bull., 42, 323-342.
- 4) Packard, A. S. (1914) Mem. Nat. Acad. Sci., 12(part 1), 1.
- 5) Truman, J. W. and Riddiford, L. M. (1970) Neuroendocrine control of ecdysis in silkworms. Science, 167, 1624-1626.
- 6) Truman, J. W. (1970) The eclosion hormone : its release by the brain and its action on the central nervous system of silkworms. Amer. Zool., 10, 511-512.
- 7) 坪井啓作 (1910) 蚕兒蚕蛾發生時刻一定ノ原因調査. 東京蚕業講習所蚕事報告, 39, 35-40.
- 8) 木村真作 (1952) 家蚕化蛾の周期性に関する実験生態学的研究(1). 日本蚕糸学雑誌, 21, 149-150.
- 9) Kobayashi, S. and Koyama, N. (1974) Photoperiod and emergence of the silkworm moth, Bombyx mori L. (Lepidoptera: Bombycidae). J. Fac. Text. Sci. Tech. Shinshu Univ. Ser. A-Biol., 17, 13-23.
- 10) 黄色俊一、渡辺四郎 (1978) カイコの羽化行動に関する研究 (I)、生物環境調節, 16、27-30.
- 11) 黄色俊一、渡辺四郎 (1978) カイコの羽化行動に関する研究 (II)、生物環境調節, 16、41-46.
- 12) Morohoshi, S. and Fugo, H. (1977) The control of growth and development in Bombyx mori. XXXVII. Proc. Japan. Acad., 53, 75-78.
- 13) Fugo, H. (1983) Induction of precocious adult eclosion by the eclosion hormone extracted from the heads of Bombyx mori (Lepidoptera : Bombycidae) and Samia cynthia ricini (Lepidoptera : Satoriidae). Appl. Ent. Zool., 18, 540-544.
- 14) Truman, J. W. (1971) Physiology of insect ecdysis. I. J. Exp. Biol., 54, 805-814.

- 15) 普後一 (1982) カイコガの羽化行動とそのホルモン制御、日蚕雑、51、523-527.
- 16) Truman, J. W. (1978) Hormonal release of stereotyped motor programs from the isolated nervous system of the *Cecropia* silkworm. J. Exp. Biol., 74, 151-173.
- 17) Truman, J. W. (1973) Physiology of insect ecdysis. II. The assay and occurrence of the eclosion hormone in the chinese oak silkworm, *Anthraea pernyi*. Biol. Bull., 144, 200-211.
- 18) Reynolds, S. E. and Truman, J. W. (1983) Eclosion hormone. "Endocrinology of insects" pp 217-233. Alan R. Liss, inc, New York.
- 19) 普後一、岩田裕子 (1983) 家蚕の蛹-成虫発育期間における羽化ホルモン活性の変動、日蚕雑、52、79-84.
- 20) Truman, J. W., Taghert, P. H., Copenhaver, P. F., Tublitz, N. J. and Schwartz, L. M. (1981) Eclosion hormone may control all ecdysis in insects. Nature, 291, 70-71.
- 21) Truman, J. W. and Copenhaver, P. F. (1989) The larval eclosion hormone neurons in *Manduca sexta*: identification of the brain-proctodeal neurosecretory system. J. exp. Biol., 147, 457-470.
- 22) Fugo, H., Saito, H., Nagasawa, H. and Suzuki, A. (1985) Eclosion hormone activity in developing embryos of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Physiol., 31, 293-298.
- 23) Truman, J. W. (1985) Hormonal control of ecdysis. "Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology" vol. 8. Endocrinology II, 12, 413-440.
- 24) Truman, J. W. (1973) How moths "turn on": A study of the action of hormones on the nervous system. Am. Sci., 61, 700-706.
- 25) 普後一 (1984) 羽化ホルモンによるカイコガ成虫行動の誘導、日蚕雑、53、489-495.
- 26) Truman, J. W. (1980) Eclosion hormone: its role in coordinating ecdysial events in insects. "Insect biology in the future" (ed. by Locke, M. and Smith, D. S.) Academic Press. pp. 385-401.
- 27) Truman, J. W., Mumby, S. M. and Welch, S. K. (1980) Involvement of cyclic GMP in the release of stereotyped behaviour patterns in moths by a peptide hormone. J. Exp. Biol., 84, 201-212.

- 28) Morton, D. B. and Truman, J. W. (1985) Steroid regulation of the peptide-mediated increase in cyclic GMP in the nervous system of the hawkmoth, Manduca sexta. J. Comp. Phys. A, 157, 423-432.
- 29) Truman, J. W., Rountree, D. B., Reiss, S. E. and Schwartz, L. M. (1983) Ecdysteroids regulate the release and action of eclosion hormone in the tobacco hornworm, Manduca sexta. J. Insect Physiol., 29, 895-900.
- 30) 普後一 (1986) 昆虫羽化ホルモンの作用機作、植物防疫、40、230-233.
- 31) 普後一、折笠千登世 (1987) カイコガの羽化行動に関する研究 V. カイコガ潜成虫の羽化ホルモンに対する反応性、応動昆、31、116-120.
- 32) Morton, D. B. and Truman, J. W. (1986) Substrate phosphoprotein availability regulates eclosion hormone sensitivity in an insect CNS. Nature, 323, 264-267.
- 33) Morton, D. B. and Truman, J. W. (1988) The EGPs : the eclosion hormone and cyclic GMP-regulated phosphoproteins. I. Appearance and partial characterization in the CNS of Manduca sexta. J. Neurosci., 8, 1326-1337.
- 34) Morton, D. B. and Truman, J. W. (1988) The EGPs : the eclosion hormone and cyclic GMP-regulated phosphoproteins. II. Regulation of appearance by the steroid hormone 20-hydroxyecdysone in Manduca sexta. J. Neurosci., 8, 1338-1345.
- 35) Truman, J. W. and Morton, D. B. (1987) The mechanism of steroid regulation of peptide action on the insect nervous system. Molecular Entomology, 165-177.
- 36) Reynolds, S. E. and Truman, J. W. (1980) "Neurohormonal Techniques in Insects" (ed. T. A. Miller) pp. 196-215, Springer-Verlag, New York.
- 37) 長澤寛道、鈴木昭憲、普後一 (1981) 日本農芸化学会、昭和56年度大会、講演要旨集。pp. 543.
- 38) Nagasawa, H., Fugo, H., Takahashi, S., Kamito, T., Isogai, A. and Suzuki, A. (1983) Purification and properties of eclosion hormone of the silkworm, Bombyx mori. Agric. Biol. Chem., 47, 1901-1906.
- 39) 上遠岳彦、(1984) カイコ羽化ホルモンの精製と単離、東京大学大学院修士論文

- 40) Nagasawa, H., Kamito, T., Takahashi, S., Isogai, A., Fugo, H. and Suzuki, A. (1985) Eclosion hormone of the silkworm, *Bombyx mori* : purification and determination of the N-terminal amino acid sequence. Insect Biochem., 15, 573-578.
- 41) Nagasawa, H., Kamito, T., Fugo, H. and Suzuki, A. (1985) Eclosion hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. "Neurosecretion and the biology of neuropeptides" (ed. Kobayashi, H. et al.) pp. 386-391. Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin.
- 42) Nagawawa, H., Mikogami, T., Kono, T., Fugo, H. and Suzuki, A. (1987) Molecular heterogeneity of eclosion hormone in adult heads of the silkworm, *Bombyx mori*. Agric. Biol. Chem., 51, 1741-1743.
- 43) Kono, T., Nagasawa, H., Isogai, A., Fugo, H. and Suzuki, A. (1987) Amino acid sequence of eclosion hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. Agric. Biol. Chem., 51, 2307-2308.
- 44) Marti, T., Takio, K., Walsh, K. A., Terzi, G. and Truman, J. W. (1987) Microanalysis of the amino acid sequence of the eclosion hormone from the tobacco hornworm *Manduca sexta*. FEBS lett., 219, 415-418.
- 45) Kataoka, H., Troetschler, R. G., Kramer, S. J., Cesarin, B. J. and Schooley, D. A. (1987) Isolation and primary structure of the eclosion hormone of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 146, 746-750.
- 46) Kono, T., Nagasawa, H., Isogai, A., Fugo, H. and Suzuki, A. (1991) Isolation and complete amino acid sequences of eclosion hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochem., 21, 185-195.
- 47) 佐藤文治、(1989) カイコ羽化ホルモン遺伝子のクローニング、東京大学大学院修士論文。
- 48) Suzuki A., Nagasawa H., Kono T., Sato B., Kamito T., Tanaka H., Sakagami Y., Mizoguchi A., Ishizaki H. and Hugo H. (1990) *Bombyx* eclosion hormone. "Insect neurochemistry and neurophysiology 1989", p. 211-214 The Humana Press, New Jersey.
- 49) Kamito, T., Tanaka, H., Sato, B., Nagasawa, H. and Suzuki, A. (1992) Nucleotide sequence of cDNA for the eclosion hormone of the silkworm, *Bombyx mori*, and expression in a brain. Biochem. Biophys. Res. Commun., in press.

- 50) Horodyski, F.M., Riddiford, L.M. and Truman, J.W. (1989) Isolation and expression of the eclosion hormone gene from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 8123-8127.
- 51) Truman J.W. (1991) Eclosion hormone ; From genes to behavior. "Insect neuropeptides chemistry, biology and action." (ed. J.J.Menn, T.J.kelly and E.P.Masler), American Chemical Society, pp. 95-98.
- 52) 普後一、岩田裕子 (1983) 家蚕脳ホルモン粗抽出物中の羽化ホルモン活性と検定法、日蚕雑、52、71-78.
- 53) 岩田裕子 (1982) 東京農工大学大学院修士論文.
- 54) 小出武比古 (1976) "生化学実験講座 1. タンパク質の化学II" (日本生化学会編) 東京化学同人、pp. 132-142.
- 55) Hunkapiller, M.W. and Hood, L.E. (1983) Protein sequence analysis : Automated microsequencing. *Science*, 219, 650-659.
- 56) 堀江保宏、井口民夫、渡辺喜二郎、柳川弘明 (1971) 家蚕の血液量について、日蚕雑、40、330-334.
- 57) Stone, J.V., Mordue, W., Batley, K.E. and Morris, H.R. (1976) Structure of locust adipokinetic hormone, a neurohormone that regulates lipid utilisation during flight. *Nature*, 263, 207-211.
- 58) Bauman, E. and Gersch, M. (1982) Purification and identification of neurohormone D, a heart accelerating peptide from the corpora cardiaca of the cockroach *Periplaneta americana*. *Insect Biochem.*, 12, 7-14.
- 59) Suzuki, A., Nagasawa, H., Kataoka, H., Hori, Y., Isogai, A., Tamura, S., Guo, F., Zhong, X.-C., Ishizaki, H., Fujishita, M. and Mizoguchi, A. (1982) Isolation and characterization of prothoracicotropic hormone from silkworm, *Bombyx mori*. *Agric. Biol. Chem.*, 46, 1107-1109.
- 60) Ullrich, A., Shine, J., Chirgwin, J., Pictet, R., Tischer, E., Rutter, W.J. and Goodman, H.M. (1977) Rat insulin genes: Construction of plasmids containing the coding sequence. *Science*, 196, 1313-.
- 61) Chomczynski, P. and Sacci, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162, 156-159.

- 62) "ラボマニュアル遺伝子工学" 村松正實 編 (1988) pp.70-72.丸善
- 63) Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982). "Molecular cloning : a laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- 64) Adachi, T., Takiya, S., Suzuki, Y., Iwami, M., Kawakami, A., Takahashi, S.Y., Ishizaki, H., Nagasawa, H. and Suzuki, A. (1989) cDNA structure and expression of bombyxin, an insulin-like brain secretory peptide of the silkworm *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.*, 264, 7681-7685.
- 65) Ohta, S., Suzuki, Y., Hara, W., Takiya, S. and Suzuki, T. (1988) Fibroin gene transcription in the embryonic stage of the silkworm, *Bombyx mori*. *Develop. Growth & Differ.*, 30, 293-299.
- 66) Kawakami, A., Iwami, M., Nagasawa, H., Suzuki, A. and Ishizaki, H. (1989) Structure and organization of four clustered genes that encode bombyxin, an insulin-like brain secretory peptide of the silkworm *Bombyx mori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 6843-4847.
- 67) 栗林恵子, 日方幹雄, 平岡修, 宮本力, 古市泰宏 (1988) オリゴ(dT)-ラテックスによるpoly(A)<sup>+</sup>mRNAの精製. *生化学*, 60, 967.
- 68) Beaucage, S. L. and Caruthers, M. H. (1981) Deoxynucleoside phosphoramidites - a new class of key intermediates for deoxy-polynucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett.*, 22, 1859-1862.
- 69) Matteucci, M. D. and Caruthers, M. H. (1981) Synthesis of deoxy-oligonucleotides on a polymer support. *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 3185-3191.
- 70) Wood, W. I. (1987) Gene cloning based on long oligonucleotide probes. *Methods in Enzymol.*, 152, 443-447.
- 71) Bolton, E. T. and McCarthy, B. J. (1962) A general method for the isolation of RNA complementary to DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 48, 1390-1397.
- 72) Vieira, J. and Messing, J. (1987) Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods in Enzymol.*, 153, 3-11.
- 73) Messing, J., Gronenborn, B., Muller-Hill, B. and Hofschneider, P. H. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71, 3642-3646.
- 74) 生化学辞典(第2版) (1990) 東京化学同人。
- 75) von Heijne, G. (1985) Signal sequence: The limit of variation. *J. Mol. Biol.*, 184, 99-105.

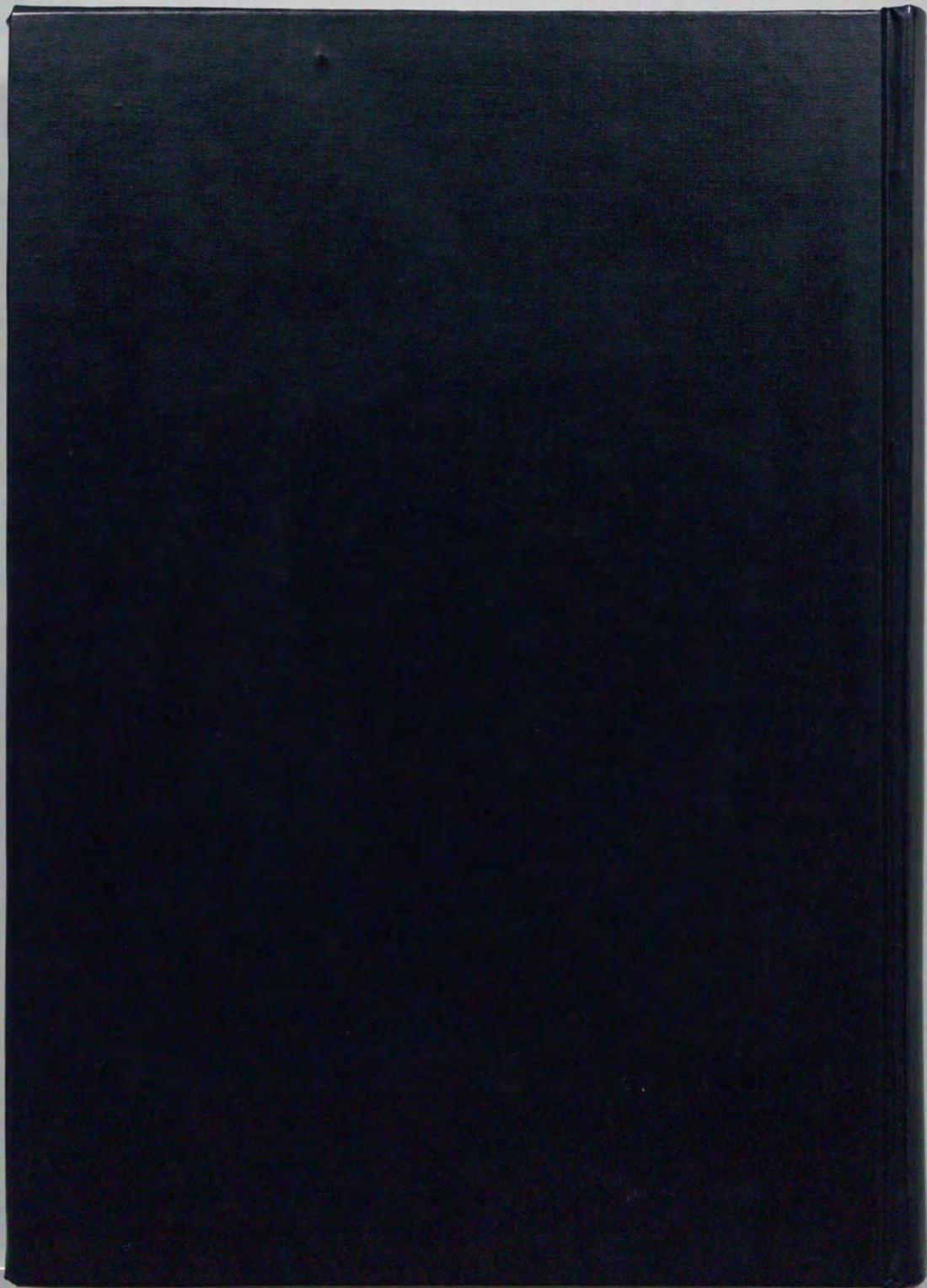
- 76) "PCR Technology ; Principles and Applications for DNA Amplification" (ed. Erlich, H.) (1989) pp.17-18, Stockton Press, New York.
- 77) Kawakami, A., Kataoka, H., Oka, T., Mizoguchi, A., Kawakami, M. K., Adachi, T., Iwami, M., Nagasawa, H., Suzuki, A. and Ishizaki, H. (1990) Molecular cloning of the *Bombyx mori* prothoracicotropic hormone. Science, 247, 1333-1335.
- 78) Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Erlich, H. and Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science, 230, 1350-1354.
- 79) "遺伝子増幅PCR法" (藤永けい 編) (1990) 蛋核酵, 35, 2957-2976.
- 80) Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci., 74, 5463-5467.
- 81) Tabor, S. and Richardson, C. (1987) DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci., 84, 4767-4771.
- 82) Mizusawa, S., Nishimura, S. and Seela, F. (1986) Improvement of the dideoxy chain termination method of DNA sequencing by use of deoxy-7-deazaguanosine triphosphate in place of dGTP. Nucl. Acids Res., 14, 1319-1324.
- 83) Innis, M. A., Myambo, K. B., Gelfand, D. H. and Brow, M. A. D. (1988) DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. Proc. Natl. Acad. Sci., 85, 9436-9440.
- 84) Loh, E. Y., Elliott, J. F., Cwiria, S., Lanier, L. L. and Davis, M. M. (1989) Polymerase chain reaction with single-sided specificity : analysis of T cell receptor  $\delta$  chain. Science, 243, 217-220.
- 85) Dotto, G. P., Horiuchi, K. and Zinger, N. D. (1984) The functional origin of bacteriophage  $\phi$ 1 DNA replication. J. Mol. Biol. 172, 507-521.
- 86) 岩見博史 私信
- 87) Hultmark, D., Klemenz, R. and Gehring, W. J. (1986) Translational and transcriptional control elements in the untranslated leader of the heat-shock gene *hsp22*. Cell, 44, 429-438.

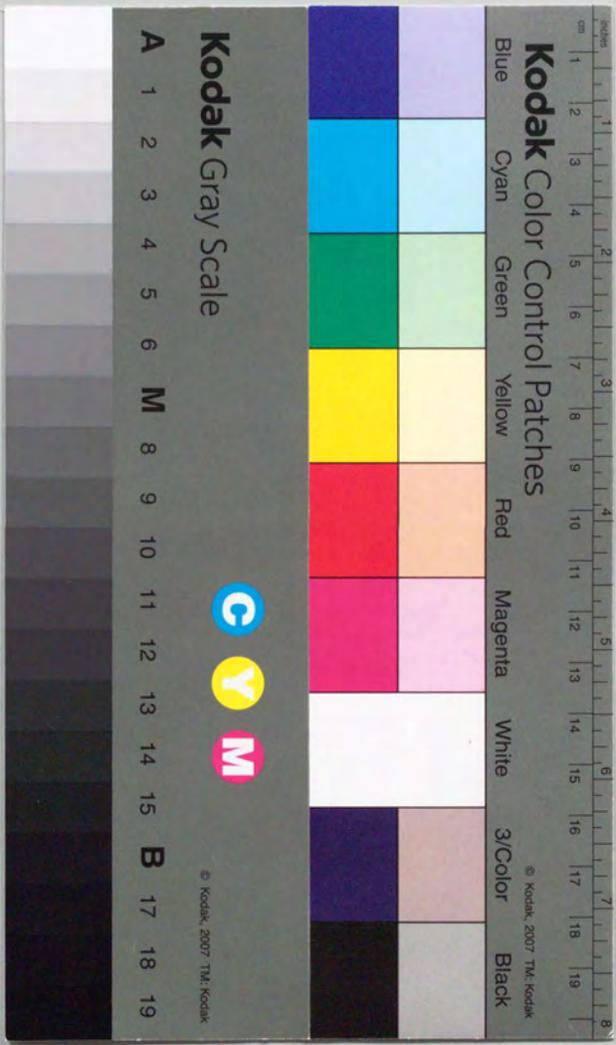
- 88) Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., Mullis, K. and Erlich, H. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. Science, 239, 487-491.
- 89) Krawczak, M., Reiss, J., Schmidtke, J. and Rosler, U. (1989) Polymerase chain reaction: replication errors and reliability of gene diagnosis. Nucl. Acids Res., 17, 2198-2201.
- 90) Gelfand, D.H. (1989) "PCR Technology ; Principles and Applications for DNA Amplification" (ed. Erlich, H.), pp. 17-18, Stockton Press, New York.
- 91) Kozak, M. (1984) Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. Nucl. Acids Res., 12, 857-872.
- 92) Kozak, M. (1986) Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. Cell, 44, 283-292.
- 93) Kozak, M. (1987) An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. Nucl. Acids Res., 15, 8125-8148.
- 94) Cavener, D.R. (1987) Comparison of the consensus sequence flanking translational start sites in *Drosophila* and vertebrates. Nucl. Acids Res., 15, 1353-1361.
- 95) von Heijne, G. (1986) A new method for predicting signal sequence cleavage sites. Nucl. Acids Res., 14, 4683-4690.
- 96) Manley, J.L. (1988) Polyadenylation of mRNA precursors. Biochim. Biophys. Acta, 950, 1-12.
- 97) Staden, R. (1982) An interactive program for comparing and aligning nucleic acid and amino acid sequence. Nucl. Acids Res., 10, 2951-2961.
- 98) Kono, T., Nagasawa, H., Kataoka, H., Isogai, A., Fugo, H. and Suzuki, A. (1991) Eclosion hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. Expression in *Escherichia coli* and location of disulfide bonds. FEBS letters, 263, 358-360.
- 99) Hayashi, H., Nakano, M., Shibana, Y. and Fujita, N. (1990) Expression of a silkworm eclosion hormone gene in yeast. Biochem. Biophys. Res. Commun., 173, 1065-1071.

- 100) Eldridge, R., Horodyski, F.M., Morton, D.B., O'Reilly, D.R., Truman, J.W., Riddiford, L.M. and Miller, L.K. (1991) Expression of an eclosion hormone gene in insect cells using baculovirus vectors. Insect Biochem., 21, 341-351.
- 101) Mount, S.M. (1982) A catalogue of splice junction sequences. Nucl. Acids Res., 10, 459-472.
- 102) Lathe, R. (1985) Synthetic oligonucleotide probes deduced from amino acid sequence data: Theoretical and practical considerations. J. Mol. Biol., 183, 1-12.
- 103) Grantham, R., Gautier, C., Gouy, M., Jacobzone, M. and Mercier, R. (1981) Codon catalog usage is a genome strategy modulated for gene expressivity. Nucl. Acids Res. 9, r43-74.
- 104) Maruyama, T., Gojobori, T., Aota, S. and Ikemura, T. (1986) Codon usage tabulated from the Genbank genetic sequence data. Nucl. Acids Res., 14 suppl. r151-197.
- 105) Jones, C.W., Rosenthal, N., Rodakis, G.C. and Kafatos, F.C. (1979) Evolution of two major chorion multigene families as inferred from cloned cDNA and protein sequences. Cell, 18, 1317-1332.
- 106) Sakai, N., Mori, S., Izumi, S., Fukushima, K.H., Ogura, T., Maekawa, H. and Tomino S. (1988) Structures and expression of mRNAs coding for major plasma proteins of Bombyx mori. Biochim. Biophys. Acta, 949, 224-232.
- 107) Iwami, M., Kawakami, A., Ishizaki, H., Takahashi, S.Y., Adachi, T., Suzuki, Y., Nagasawa, H. and Suzuki, A. (1989) Cloning of a gene encoding bombyxin, an insulin-like brain secretory peptide of the silkworm Bombyx mori with prothoracicotropic activity. Develop. Growth & Differ., 31, 31-37.
- 108) Henikoff, S. (1984) Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. Gene, 28, 351-359.
- 109) Breathnach, R. and Chambon, P. (1981) Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. Ann. Rev. Biochem., 50, 349-383.
- 110) Riddihough, G. and Pelham, R.B. (1987) An ecdysone response element in the Drosophila hsp27 promoter. EMBO J., 6, 3729-3734.

- 111) Burtis, K.C., Thunmmel, C.S., Jones, C.W., Karim, F.D. and Hogness, D.S. (1990) The *Drosophila* 74EF early puff contains E74, a complex ecdysone-inducible gene that encodes two ets-related proteins. Cell, 61, 85-99.
- 112) Lewin, B. (1990) "Genes IV", pp.484-485. Cell Press, Cambridge.
- 114) Schmitz, G.G. (1991) Nonradioactive labeling of oligo-nucleotides in vitro with the hapten digoxigenin by terminal transferase. Anal.Biochem., 192, 222-231.
- 115) Bandtlow, C.E., Heumann, R. and Schwab, M.E. (1987) Cellular localization of nerve growth factor synthesis by in situ hybridization. EMBO J., 6, 891-899.
- 116) Tautz, D. and Pfeifle, C. (1989) A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in Drosophila embryos reveals translational control of the segmentation gene hunchback. Chromosoma, 98, 81-85.
- 117) Kono T., Mizoguchi A., Nagasawa H., Ishizaki H., Fugo H. and Suzuki A. (1990) A monoclonal antibody against a synthetic carboxyl-terminal fragment of the eclosion hormone of the silkworm, Bombyx mori: characterization and application to immunohistochemistry and affinity chromatography. Zool.Sci., 7, 47-54.
- 118) Copenhaver, P.F. and Truman, J.W. (1986) Identification of the cerebral neurosecretory cells that contain eclosion hormone in the moth, Manduca sexta. J.Neurosci., 6, 1738-1747.
- 119) Copenhaver, P.F. and Truman, J.W. (1986) Metamorphosis of the cerebral neuroendocrine system in the moth, Manduca sexta. J.Comp.Neurol., 249, 186-204.
- 120) Ichikawa T. (1991) Architecture of cerebral neurosecretory cell systems in the silkworm Bombyx mori. J.Exp.Biol., 161, 217-237.
- 121) 市川敏夫 (1991) カイコガ羽化ホルモン分泌細胞の変態時における形態変化. 第62回日本動物学会大会講演予稿集. pp.171.
- 122) Mizoguchi, A., Ishizaki, H., Nagasawa, H., Kataoka, H., Isogai, A., Tamura, S., Suzuki, A., Fujino, M. and Kitada, C. (1987) A monoclonal antibody against a synthetic fragment of bombyxin (4K-prothoracicotropic hormone) from the silkworm, Bombyx mori: characterization and immunohistochemistry. Mol.Cell.Endocrinol., 51, 227-235.

- 123) Mizoguchi, A., Oka, T., Kataoka, H., Nagasawa, H., Suzuki, A. and Ishizaki, H. (1990) Immunohistochemical localization of pro-thoracicotropic hormone-producing neurosecretory cells in the brain of Bombyx mori. Develop. Growth & Differ., 32, 591-598.
- 124) 普後 一、私信
- 125) Schneider, L. E. and Taghert, P. H. (1990) Organization and expression of the Drosophila Phe-Met-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> neuropeptide gene. J. Biol. Chem., 265, 6890-6895.
- 126) Taghert, P. H. and Schneider, L. E. (1990) Interspecific comparison of Drosophila gene encoding FMRFamide-related neuropeptides. J. Neurosci., 10, 1929-1942.
- 127) Bradfield, J. Y. and Keeley, L. L. (1989) Adipokinetic hormone gene sequence from Manduca sexta. J. Biol. Chem., 264, 12791-12793.





**Kodak Color Control Patches**

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

**Kodak Gray Scale**

**A** 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

**C** **Y** **M**

© Kodak, 2007 TM: Kodak