N-3

カイコガ *Bombyx mori* の精巣 D-セリンレベルとリン酸化 ERK 量

The effect of D-serine level on phosphorylation of ERK in the silkworm, *Bombyx mori* testes

○鈴木 千尋[1]，小山 雄一[2]，関谷 麻衣[2]，堀 弘樹[2]，谷川 実[3]，長田 洋子[3]
*Chihiro Suzuki[1]，Yuuichi Koyama[2]，Mai Sekiya[2]，Hiroki Hori[2]，
Minoru Tanigawa[3]，Yoko Nagata[3]

Our previous studies showed that D-serine content in the silkworm, *Bombyx mori* and the growth rate revealed a significant correlation. In this study, we investigate the relationship between D-serine level and phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in the silkworm reproductive organs, since it is reported that both ecdysteroidgenesis and ERK phosphorylation and stimulated by prothoracicotropic hormone (PTTH), and that ecdysteroids regulate insect molting and metamorphosis. The results clearly showed D-serine stimulated ERK phosphorylation. Therfore, it is suggested that D-serine stimulates metamorphosis through ERK phosphorylation.

１．序論

カイコガ *Bombyx mori* には遊離型 D-セリンが多量に含まれているが，その生体内の機能に関する知見は少ない．我々は D-セリン含有量と成長の関係を検討し，D-セリンがカイコガの成長と変態に関係している可能性を明らかにした（Hasegawa et al.，*J. Insect Biotechnol. Sericol.*，2009）．細胞内シグナル伝達において，リン酸化タンパク質は，細胞増殖，分化，アポトーシス，形態形成（カイコでは脱皮や蛹・成虫への変態）などの生命現象において重要な役割を果たしている．カイコの変態は前胸腺より分泌されるホルモンであるエクジステロイド量によりコントロールされているが，その分泌量は細胞増殖に関わるタンパク質 ERK のリン酸化量と相関する（Ju-Ling et al.，*J Insect Physiol.*，2007）．そこで本研究では D-セリンとカイコガ変態との関係を証明するために，D-セリンレベルと ERK リン酸化の関係を検討した．

２．方法

《材料》N4 株を人工飼料 Silkmate 2S（日本農産）を用いて，23～26℃，8～20 時明／20～8 時暗で飼育した．

《L-，D-セリンの定量法》幼虫，蛹，成虫より各器官を摘出し，それらのホモジネートを遠心分離を行い，上澄みに 5%になるようにトリクロロ酢酸（TCA）を加えてタンパク質を除去後，Dowex 50W-X8 カラムを用いたイオン交換クロマトグラフィーにより遊離アミノ酸を回収した．これらのアミノ酸を 1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-alanine amide（FDAA）を用いてジアステレオマー化した後，薄層プレート上で各種アミノ酸に分離した．FDAA-セリンを回収し Nova Pak C18（Waters）逆相カラム（φ3.9 mm × ℓ150 mm）を用いた高速液体クロマトグラフィーにより FDAA-L-，FDAA-D-セリンを定量した．

《D-セリン取り込み速度測定》5 齢 3 日目幼虫の体液，精巣，消化管を測定対象として，生体の尾角に D-セリンを注射する方法，または各器官を 24well プレートに入れ，そこに D-セリンを添加する方法により，時間毎に各器官内の D-セリン濃度を測定した．

《リン酸化 ERK と全 ERK の定量法》5 齢 3 日目幼虫の精巣ホモジネートをリン酸化 ERK 測定用サンプルとした．このホモジネートに D-セリンレベルを変化させるために，D-セリン，L-セリン，または D-セリン脱水酵素（DSD，ニワトリ由来，Tanaka et al.，*J. Biochem.*，2008）を添加した．37℃で 10 min 間反応後 SDS-PAGE により ERK タンパク質を他のタンパク質より分離し PVDF 膜へ転写した．抗 p-ERK（リン酸化 ERK）抗体または抗 ERK 抗体を，4℃で over night 結合させることにより，リン酸化 ERK または ERK タンパク質を検出・定量した．

３．結果・考察

カイコガ緒齢の体内 D-セリンレベル変動を測定した結果，幼虫期は低く成長していくにしたがって徐々に増加し，吐糸期を経て蛹期後半に最高値を示した（Fig. 1）．

1: 日大理工・院後・応化　2: 日大理工・学部・応化　3: 日大理工・教員・応化

カイコガ D-セリンの局在性を各組織につき調べた結果，体液，消化管についで精巣に高濃度存在した（Fig. 2）．そこで成虫になるまで成長していく器官である精巣に着目した．緒齢の幼虫，蛹，成虫より精巣を摘出し，それらのホモジネートについてリン酸化 ERK と全 ERK を定量した．その結果，リン酸化 ERK／全 ERK 比（P-E/T-E）は 5 齢 3 日目の幼虫において最高値が示された（Fig. 3）．ついで，5 齢 3 日目幼虫の D-セリンレベルの変化がリン酸化におよぼす影響を検討した（Fig. 4）．

リン酸化 ERK 量は D-セリンの添加により増加し，DSD 添加により減少した．DSD の阻害剤であるヒドロキシルアミンを DSD と共に添加した場合，リン酸化 ERK 値はコントロール（生理食塩水添加）値と同レベルになった．また L-セリン添加による影響は見られなかった（Fig. 4）．これらの結果より，D-セリンレベルの上昇が ERK リン酸化を引き起こしていることが示された．したがって D-セリンが，ERK リン酸化により誘導されるエクジステロイドによる変態調節を上流でコントロールしている可能性が示唆された．

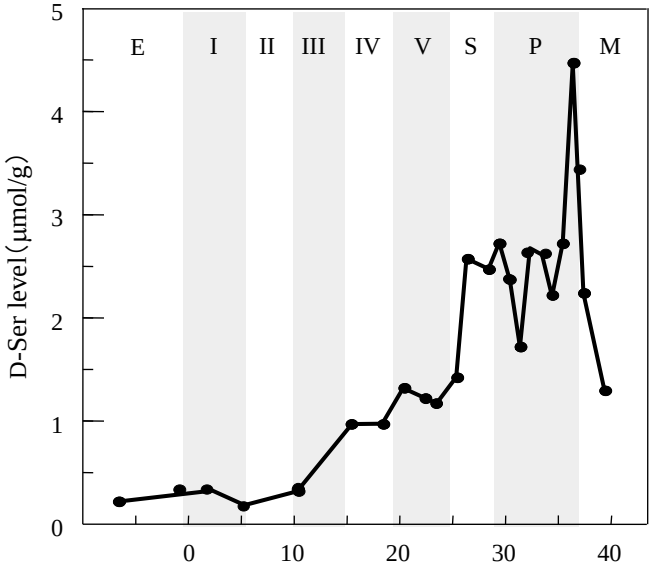

Fig. 1.　D-Serine concentration with growth of silkworm.
E : egg, I ～V: 1～5 th instar, S: spinning larvae,
P : pupae, M : imagoes

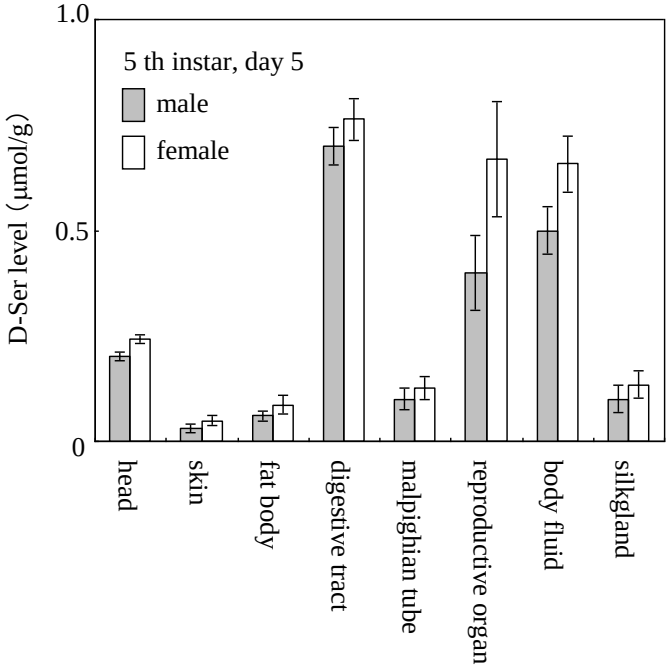

Fig. 2.　D-Serine contents in various organs from the silkworm.　(mean±S.D., n=5)

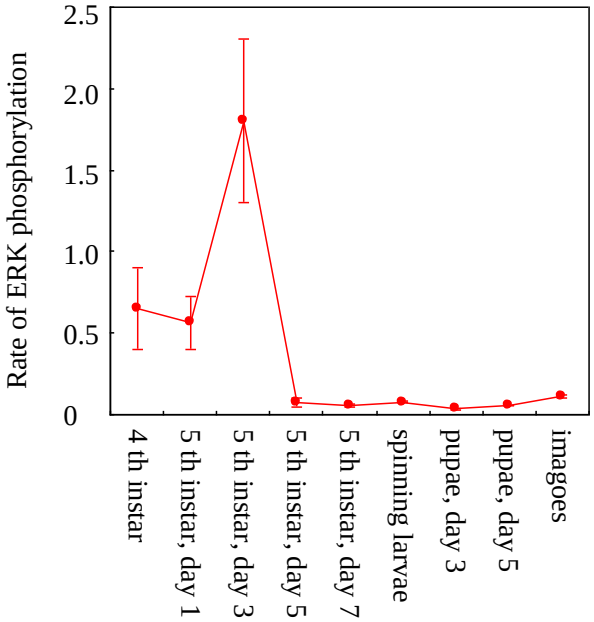

Fig. 3.　Rate of ERK phosphorylation in testes from silkworms at various developmental stages.
(mean±S.D., n=6)

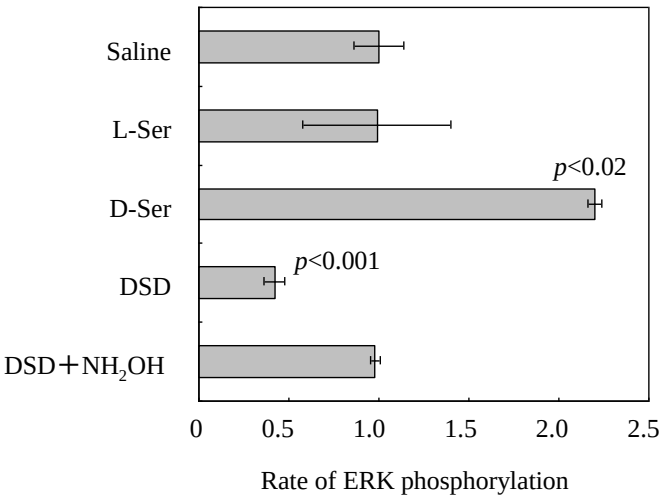

Fig. 4.　Effect of D-serine and D-serine dehydratase on rate of ERK phosphorylation in silkworm at 5-3 testes.　(mean±S.E., n=12)