氏　　名	こう　しゅんいつ **黄　俊　逸**
学位(専攻分野)	博　士（学術）
学位記番号	博甲第 373 号
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規程第 3 条第 3 項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科　機能科学専攻
学位論文題目	Properties and Localization of Trehalase in Embryo of the Silkworm, *Bombyx mori* （家蚕胚のトレハラーゼの特性と局在性に関する研究）
審査委員	(主査) 教授　古澤壽治 教授　遠藤泰久 教授　杉村順夫

論文内容の要旨

本研究では、カイコの胚期における炭水化物代謝、特にトレハロ - ス代謝機能をトレハラーゼの酵素学的性状と胚における局在性から検討した。

本論文は以下の 4 章から構成されている。

第 1 章では、二糖トレハロースの発見からそれを分解するトレハラーゼの各種生物からの精製とその機能に関するこれまでの研究を取りまとめ、カイコの胚期におけるトレハラーゼの機能を研究する目的と昆虫生理学における位置づけを述べている。

第 2 章では、胚からトレハラーゼを精製し、その性状を明らかにするため、胚発育に伴うトレハラーゼ活性の変動について検討した。その結果、トレハラーゼ活性は胚発育期の中期、すなわち産卵 6 日後の器官形成期から急激に増大し、全活性の約 90%が 15,000*g* 上清に回収され、胚に存在するトレハラーゼは、幼虫期の中腸で見られるトレハラーゼとは異なり、可溶性であることを推察した。

これを踏まえ、産卵 9 日目の卵磨砕液 15,000*g* 上清を出発材料とし、Sephacryl S-300, DEAE-cellulofine, ConA-Sepharose affinity および調製用電気泳動を用いることにより胚からのトレハラーゼ精製を行い、胚には 73kDa（PI）と 140kDa（PII）の二種類のトレハラーゼが存在することを明らかにした。そして、PI と PII はそれぞれトレハロースに対して 1.56mM、0.44mM の *Km* 値、最適 pH は、6.5（PI）、5.5（PII）， 活性化エネルギーは、11.03kCa/mol(PI), 5.92kCa/mol(PII)であった。また、いずれも可溶性トレハラーゼであることを確認した。

第 3 章では、トレハラーゼ遺伝子発現、トレハラーゼ蛋白質の合成について検討した。その結果、産卵 6 日目からトレハラーゼ遺伝子が発現し、これに伴ってトレハラーゼ蛋白質が合成された。この結果から、トレハラーゼ活性の上昇は *de novo* に合成されるトレハラーゼ蛋白質の量的な増大に起因することを明らかにした。さらに、このトレハラーゼの胚における局在性

について免疫組織化学的手法を用いて検討しところ、産卵後の卵黄にトレハラーゼが検出され、しかも器官形成後の中腸内容物からも検出された。このことから、胚閉鎖の際に卵黄トレハラーゼは中腸内に取り込まれると推察した。これに加え、中腸皮膜基底膜からもトレハラーゼが検出され、本酵素は胚閉鎖後に新たに合成されると推察した。

第 4 章の総合考察では、カイコの胚発生におけるトレハラーゼの機能について考察している。すなわち、これまで幼虫期中腸組織や筋肉には可溶性と膜結合型のトレハラーゼが存在するのに反し、胚に存在するトレハラーゼのほとんどは可溶性であること、そしてこのトレハラーゼは胚閉鎖後の中腸基底膜で合成され、トレハラーゼ活性を上昇させると考察している。さらに、胚発生初期の卵黄中にトレハラーゼが存在することに、形態形成と炭水化物代謝との関連を明らかにできるなど、今後の展望をのべている。

論文審査の結果の要旨

トレハロースは、酵母、糸状菌で見出され、グルコ－スが 2 分子α，α－1.6 結合した二糖である。昆虫ではトレハロースは血糖として働き、筋肉、中腸皮膜、卵巣に存在するトレハラーゼによってグルコースに分解され、エネルギー源として利用されている。特に幼虫期から蛹期への変態時における可溶性（70kDa）ならびに膜結合型トレハラーゼ(140kDa)の機能、および蛹期における卵巣トレハラーゼに対する休眠ホルモンの作用との関連などの生理作用との関連で研究されてきた。しかし、胚期においてもトレハロースの蓄積ならびにトレハラーゼ活性がみられ、本酵素の性状ならびにその生理学機能は未開拓の領域であった。

本論文では産卵 6 日後の器官形成期から急激に活性が上昇するトレハラーゼに注目し、本酵素を精製することによって胚には 73kDa（PI）と 140kDa（PII）の二種類のトレハラーゼが存在し、PI と PII それぞれの *Km* 値、最適 pH、活性化エネルギーが異なるが、いずれも可溶性トレハラーゼであることを明らかにした。

そして、トレハラーゼ遺伝子発現、トレハラーゼ蛋白質の合成は、いずれも胚閉鎖後の中腸基底膜（産卵 6 日目）で始まり、トレハラーゼは *de novo* に合成によって胚期のトレハラーゼ活性を上昇させることを明らかにした。これに加え、産卵後の卵黄にトレハラーゼが検出され、これは卵黄が単なる蛋白質やグリコーゲンの貯蔵機能を果たすだけでなくトレハロースを代謝する機能もあることを示唆している。

以上の結果は、昆虫の分化と形態形成におけるトレハロースとトレハラーゼの機能ならびに代謝の局在性を明らかにし、昆虫発生学に新たな知見を加えた。

本論文の内容は、以下の学術雑誌に発表されている。

1. Junyi Huang, Toshiharu Furusawa, Keiko Sadakane and Yukio Sugimura.: Purification and properties of soluble trehalase from embryonic larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. Journal of Insect Biotechnology and Sericology (accepted).
2. Junyi Huang, Yuji Arimatsu, Keiko Sadakane, Yasuhisa Endo and Toshiharu Furusawa: Gene Expression and localization of trehalase during embryonic development of the silkworm, *Bombyx mori*. International Journal of Wild Silkmoth and Silk (accepted).