

論文の内容の要旨

論文題目

RNA 干渉法によるセンチニクバエ蛹体液細胞特異的な
スカベンジャー受容体の解析

氏 名 西川 毅

1. 序論

マクロファージは、すべての多細胞動物に存在する免疫細胞である。マクロファージは、生体防御に重要な役割を担う一方、個体発生でも不要組織の崩壊や細胞死を誘導するという極めて重要な機能を担うことが近年、明らかにされてきている。しかし、マクロファージが発生過程のある時期に、なぜ特定の自己組織を崩壊することができるのか、その分子機構はよくわかっていない。

マクロファージが自己組織を崩壊し、排除するという現象が最も顕著に見られる例として完全変態昆虫の変態がある。変態期に崩壊する幼虫組織に脂肪体がある。センチニクバエを用いた解析から、脂肪体の崩壊は、昆虫のマクロファージである蛹体液細胞により引き起こされることが示されている。幼虫体液細胞が、脂肪体を崩壊させることはないので、脂肪体の崩壊は、変態期における体液細胞の機能変化により説明できると考えられる。脂肪体の崩壊には、脂肪体と蛹体液細胞の接触が必要なことから、脂肪体崩壊に関わる候補分子として幼虫体液細胞と比較して、蛹体液細胞で特異的に発現する膜蛋白の検索がおこなわれた。

その結果、同定されたのが、p120 である。p120 は、新規な I 型膜貫通蛋白で、18 個の EGF 様繰り返し配列をもつ細胞外領域、47 個のアミノ酸からなる細胞内領域からなっている。こ

れまでに、p120 はアセチル化低密度リポ蛋白質（アセチル化 LDL）の取り込みに関わることが示唆されている。アセチル化 LDL を取り込む活性は、さまざまな異物や老廃物を取り込むスカベンジャー受容体の特徴であり、p120 はスカベンジャー受容体であると考えられた。

しかし、p120 の生体内における機能は不明だった。私は、p120 の生体内機能を知る目的で二本鎖 RNA による RNA 干渉（RNAi）により、センチクバエで p120 の発現の抑制を試みた。その結果、蛹体液細胞における p120 の発現を特異的に抑制した個体の作出に成功した。このような個体の解析から、p120 は脂肪体崩壊や変態に必須ではないものの、脂肪体崩壊に関与するプロテアーゼであるカテプシン B の発現量を制御する可能性が示された。

2. センチクバエにおける RNAi

蛹体液細胞の p120 の発現を抑制するために、幼虫の体腔中に p120 の二本鎖 RNA を注入した。そして、p120 の発現が抑制されているか否かは、抗 p120 抗体による蛍光抗体法で検討した。

通常 70%以上の蛹体液細胞が、抗 p120 抗体により染色されるが、p120 RNAi をおこなった蛹体液細胞は、全く染色されなかった。一方、コントロールとして、カテプシン B RNAi をおこなったが、p120 は正常と同様に検出された。したがって、RNAi の効果は、配列特異的であると考えられた。

次に、p120 RNAi により、p120 の蛋白発現が抑制されているかどうかを、イムノプロットで確認した。その結果、p120 RNAi をおこなった蛹体液細胞で、p120 の蛋白発現は検出されなかった。さらに、p120 RNAi が他の蛋白の発現を抑制していないことを確認する目的で、体液細胞で恒常的に発現している cathepsin B mRNA 3'-untranslated-region-binding protein の発現をイムノプロットにより調べた。p120 RNAi は、この蛋白の発現には影響を与えないことがわかった。

以上の結果から、幼虫の体腔中に p120 の二本鎖 RNA を注入することで、蛹体液細胞の p120 の発現を特異的に抑制できることが示された。

3. RNAi による p120 の機能解析

1) p120 欠損蛹体液細胞のアセチル化 LDL の取り込み

p120 に対するモノクローナル抗体がアセチル化 LDL の取り込みを阻害することから、p120 がスカベンジャー受容体であることが示唆されていた。そこで、RNAi により、p120 を欠損

した蛹体液細胞で、アセチル化 LDL の取り込みが減少しているか否かを調べた。

体液細胞を、蛍光標識したアセチル化 LDL 存在下で培養し、細胞が取り込んだ蛍光強度を定量した。幼虫から蛹で体液細胞のアセチル化 LDL の取り込みは増加するが、p120 を欠損した蛹体液細胞では、アセチル化 LDL の取り込みが、幼虫体液細胞レベルにとどまっていることがわかった。したがって、p120 は蛹体液細胞特異的なスカベンジャー受容体であることが明らかになった。一方、p120 を欠損しても、幼虫体液細胞レベルのスカベンジャー受容体活性が残っており、蛹体液細胞には p120 以外のスカベンジャー受容体の存在が示唆された。

2) p120 欠損蛹体液細胞のカテプシン B の発現

カテプシン B は、蛹体液細胞が発現、放出するプロテアーゼで、脂肪体の基底膜を分解することで、脂肪体の崩壊を引き起こすと考えられている。p120 蛋白とカテプシン B 蛋白の発現時期が一致することから、私は、p120 がカテプシン B の発現に関与するのではないかと考えた。そこで、RNAi により p120 を欠損した蛹体液細胞でカテプシン B 蛋白の発現をイムノブロットにより調べた。

その結果、p120 を欠損した蛹体液細胞でカテプシン B 蛋白の発現量が、著明に減少していることを見出した。さらに、この減少が、カテプシン B mRNA の発現量の減少によるのか否かをノザンブロットにより調べた。その結果、p120 を欠損した蛹体液細胞では、正常蛹体液細胞と比較してカテプシン B mRNA の発現量の減少は見られなかった。

p120 を欠損させると、カテプシン B mRNA の発現量が変わらず、カテプシン B 蛋白の発現量が減少することから、p120 は、カテプシン B mRNA の翻訳を促進する、または翻訳されたカテプシン B の安定性を高めていると思われる。p120 が、一回膜貫通型のスカベンジャー受容体であることを考えると、p120 が取り込むリガンド、または p120 の細胞内領域が細胞内にシグナルを伝え、カテプシン B の発現量を制御していると考えられる。

また、スカベンジャー受容体が、さまざまな分子を結合し、取り込むことを考えると、p120 はカテプシン B 自体を結合し、取り込むことで、カテプシン B の細胞内の発現量を調節している可能性も考えられる。

3) p120 RNAi をおこなった個体の解析

RNAi により p120 を欠損させた蛹体液細胞の形態、個体あたりの数について、正常個体と比較して異常はみられなかった。さらに、p120 RNAi をおこなった個体は、正常個体と同様

に蛹化し、脂肪体の崩壊もみられた。そして、成虫も正常に羽化してきた。したがって、p120 は、脂肪体の崩壊、変態に必須ではないと考えられた。

p120 を欠損しても、個体レベルで異常が見られない原因として、p120 の機能を相補する分子の存在が考えられる。p120 を欠損した蛹体液細胞でも幼虫体液細胞レベルのスカベンジャー受容体活性が残っていたことから、蛹体液細胞に p120 以外のスカベンジャー受容体の存在が示唆されている。このスカベンジャー受容体が p120 の活性を相補している可能性も考えられる。

4. 総括

本研究で私は、センチクバエ幼虫の体腔中に二本鎖 RNA を注入することにより、蛹体液細胞で RNAi が起きることをはじめて示した。また、RNAi により、p120 は変態期における脂肪体崩壊に必須ではないが、脂肪体崩壊に関与するプロテアーゼであるカテプシン B の発現を転写後制御する可能性を示した。これまでに、このようなスカベンジャー受容体の機能は報告されていない。

蛹体液細胞は、変態期における幼虫組織の崩壊、排除に重要な役割を果たしていると考えられているが、その分子機構はほとんどわかっていない。今後、本研究で示した RNAi を利用し、蛹体液細胞で発現し、組織崩壊に関わる遺伝子を個体レベルでスクリーニングすることで、変態期における組織崩壊、排除の分子機構が解明されることが期待される。また、p120 を介した、カテプシン B の発現制御機構の解明も課題であると考えている。