

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 大手 学

完全変態昆虫の翅は、幼虫体内において成虫原基として発達し、蛹化に際して急激に細胞分裂を行い、体外への外転、クチクラの分泌などの過程を経て成長する。この過程には、エクダイソンレセプター、エクダイソンカスケードに属する転写因子、および転写因子の標的となるクチクラタンパク質などの遺伝子群が関与する。本論文は、変態期における翅発達のメカニズムの解明を目指し、完全変態昆虫であるカイコの蛹脱皮期の翅原基において発現量の変動する遺伝子群を探索し機能を解析した結果を纏めたもので、3章からなる。

第1章 カイコ蛹脱皮期の翅原基における遺伝子発現プロファイルの解析

カイコ EST データベース上の独立な 4992 の cDNA クローンから作製した cDNA マイクロアレイを用いて、5 齢 4 日から蛹化 0 日の翅原基の遺伝子発現パターンを反復観察した。その結果、有意な蛍光シグナルが検出された EST 1069 個の内、発現量に変動したものが 687 個得られ、その半数以上が蛹化直前の翅原基の外転期以降に発現量が大きく変動していた。

5 齢 6 日目～吐糸 1 日目に発現量が増加する EST は 34 個同定され、細胞外マトリックスの構築や脂質の輸送に関わるものが含まれていたことから、この時期の翅原基は細胞外の構造を再構築し、外転などのダイナミックな形態の変化に備えていることが推測された。

吐糸 3 日前後の体液中エクジステロイド濃度のピーク時に発現量のピークをむかえる EST は 24 個同定され、アミノ酸代謝酵素などをコードしていたことから、この時期以降のエネルギー生産やクチクラの構築への準備がなされていると考えられた。

翅原基の外転期以降に発現量が増加する EST の分析から、この時期の翅原基は活発にエネルギーを生産し、細胞外へクチクラタンパク質などの物質を輸送してクチクラを構築していることが伺われた。

第2章 カイコ翅原基におけるエクジステロイド応答遺伝子群の探索

5 齢 5 日目の幼虫より取り出した前翅の原基をグレース培地で 4 時間培養した後、20-hydroxyecdysone(20E) (濃度 $5 \mu\text{g/ml}$) を含む培地と、含まない培地で 6 時間培養し、それぞれの遺伝子発現プロファイルを cDNA マイクロアレイを用いて比較した。その結果、全 3 回の実験の 2 回以上で 20E の添加により 3 倍以上に発現が誘導されていた遺伝子を 62 個、逆に 1/3 以下に抑制されていた遺伝子を 31 個同定した。その解析により 20E で発現が制御される未報告の多数の遺伝子の存在を明らかにした。また、生体内の翅原基で、

蛹脱皮期のエクジステロイドの濃度上昇と共に発現量が増加していた 24 個の EST のほとんどが、エクジステロイドの直接作用により発現制御されていることを明らかにした。

第 3 章 蛹脱皮期に翅原基において発現が誘導される 3 つのプロテアーゼの解析

変態期には細胞外マトリックスの構成と分解、および幼虫組織の分解と再利用が活発に行われる。そこで、変態期に 20E により発現が誘導された 3 つのプロテアーゼ遺伝子の解析を行ったところ、2 つは、ラット ADAMTS (A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs)-4 およびヒト ADAMTS-3 とそれぞれ高い相同性を示し、もう 1 つはヒトのカルボキシペプチダーゼ A4 (CPA4) と高い相同性を示していた。これらの遺伝子のコードするタンパク質を BMADAMTS-1、BMADAMTS-2、BMCPA と名づけ、解析を進めた。

ADAMTS はヒト、ショウジョウバエ、線虫などで見つかっているプロテアーゼファミリーで、アグリカン、プレビカン、プロコラーゲンの分解に関わっていることから、BMADAMTS は細胞外の構造を再構築し外転などのダイナミックな形態変化に関わっていることが推測された。また、BMADAMTS-1 と BMADAMTS-2 は、いずれもメタロプロテアーゼとしての活性に必要な亜鉛結合ドメインや、furin により切断される配列を持っていた。BMADAMTS-1 は、グリコサミノグリカンに結合する thrombospondin type 1 (TSP-1) モチーフを持ち、AcNPV をベクターとして昆虫細胞 High Five に発現させると細胞外マトリックスに分泌・貯留されていた。BMADAMTS-2 は他の多くの ADAMTS ファミリーとは異なり、TSP-1 モチーフを持っていなかったため、昆虫細胞で発現させた場合、細胞外マトリックスには留まらずに培地中へ分泌された。抗体を作製してウェスタン解析を行った結果、furin により取り除かれると考えられる prodomain を持つものは細胞内で、持たないものは培地中で観察された。

CPA4 は、未だ機能が解明されていないが、食物の消化に働く酵素と同じサブグループに属していることから、BMCPA は、分解された幼虫組織由来のタンパク質の消化に関与することが考えられた。昆虫細胞で発現させた BMCPA タンパク質は培養液に分泌され、CPA 活性を持っていた。生体内では BMCPA は、幼虫脱皮、蛹脱皮および成虫脱皮期の脱皮液中に発現が見られた。BMCPA は、脱皮液中に存在するプロテアーゼとしてはアミノ酸配列まで同定された初めての例である。

以上要するに本論文は、変態期に翅原基において発現量が変動する遺伝子群を自分で作製した cDNA マイクロアレイを用いて同定し、エクジステロイドにより発現が誘導される 3 つのプロテアーゼの性質と機能を組換えタンパク質等の技術を用いて解析したもので、昆虫の脱皮変態期の遺伝子発現の全体像の解明と新規のプロテアーゼの発見など、学術上、応用上、有意義な知見を得ている。よって、審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。

