

## 論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 北 條 優

高等シロアリの兵隊では、形態的、機能的に特殊化した額腺を保有し、天敵が忌避する物質を放出して化学的防衛を行う。このような分泌物質の成分としてテルペン類が多く知られており、それらは外敵に対する防衛物質としてだけでなく、コロニーの社会性制御のためのフェロモン物質としても重要であると考えられている。しかし、それらの生合成の経路に関してはほとんど未解明であり、シロアリの化学的防衛に関する分子生物学的な研究も皆無である。

そこで、本論文では、テングシロアリ亜科・タカサゴシロアリの兵隊カーストにおける額腺分泌物に関わった遺伝子を特定する事に焦点をあて、頭部におけるタンパク質および mRNA を調べ、兵隊頭部で特異的に発現する遺伝子の同定を試みている。本論文は3章から構成されている。

第1章では、額腺の貯蔵嚢に含まれるタンパク質を詳しく調べるために、兵隊およびワーカーの頭部からタンパク質を抽出し、SDS-PAGE 法により分離、比較を行っている。いくつかの兵隊特異的バンドを検出していて、その内、最も存在量の多かった約 26kDa のバンドを切り出し、プロテインシーケンサーにてN末の部分アミノ酸配列を決定している。さらに、RACE 法により、このタンパク質をコードする遺伝子のクローニングを行っている。その結果、このタンパク質はN末端に 20 残基の疎水性のシグナルペプチドと思われる配列がついており、幼若ホルモン結合タンパク質など、昆虫の疎水性のリガンドに結合し輸送するタンパク質などと配列の類似性が見られた。また、同定された遺伝子はノーザンハイブリダイゼーションでも兵隊特異的に強く発現していることを認めている。さらに、兵隊頭部を、額腺を含む頭部背側、脳、食道下神経節を含む頭部腹側、および触角の4つの部位に分け、それぞれから抽出したタンパク質を SDS-PAGE で分離、比較を行っている。その結果、目的のタンパク質は額腺を含む頭部背側のみに含まれていることを明らかにしている。また、*in situ* ハイブリダイゼーションにより mRNA の局在を調べ、額腺分泌物質の貯蔵嚢を形成しているクラス 1 の腺細胞で構成された一層の分泌上皮でシグナルを検出していて、これらの細胞で樹脂性のジテルペンが合成されていると考察している。

第2章では、兵隊およびワーカーの頭部から RNA を抽出し、それをもとに cDNA を合成し、ディファレンシャルディスプレイ法 (DD 法) を用いて、兵隊頭部で特異的に発現する遺伝子のスクリーニングを行っている。20 プライマーセットで PCR を行い、兵隊とワーカーで電気泳動パターンを比較した結果、兵隊の全バンド数のうち約7%のバンドが兵隊特異的であり、大顎型の兵隊を持つオオシロアリでの結果(約1%)よりも大きい値であった。その後、切り出し可能な兵隊特異的バンドから DNA 断片を抽出し、サブクローニングし塩基配列の決定を行い、21 候補の配列を得ている。それらについて定量的 RT-PCR により DD 法の擬陽性の確認を行い、8候補のみで明確な差が認められている。額腺型兵隊を持つタカサゴシロアリが、大顎型兵隊を持つオオシロアリに比べて兵隊特異的に発現する遺伝子が多かったことから、化学的防衛を行うタカサゴシロアリの兵隊は、ワーカーと比べて、形態のみならず遺伝子発現レベルでも特殊化していると考察している。

第3章では、DD 法で得られた兵隊特異的に発現する遺伝子候補のうち、定量的 RT-PCR で最も差が大きかった候補について、RACE 法により遺伝子の全長配列の決定を行っている。結果として、2種類の選択的スプライシングによって得られた転写産物と考えられる配列を得ている。さらに、この両転写産物の共通配列部分を用いてプローブを作製し、ノーザンハイブリダイゼーションを行い、兵隊頭部のみで2本のバンドを得ている。この遺伝子がコードするタンパク質は、一部の

動物や多くの植物に見られるゲラニルゲラニル2リン酸合成酵素(GGPPS)と高い相同性を得ている。動物ではジテルペン合成に関わる GGPPS の報告は今までになく、合成された GGPP は細胞増殖や分化、細胞骨格形成などに重要なプレニル化タンパク質を合成するのに用いられているので、重要な発見である。

植物においては防衛物質として様々なテルペン類を合成する事が知られており、それに関する様々な遺伝子が同定され、生合成経路も明らかにされている。しかし動物においては、キクイムシが集合フェロモンの成分として、モノテルペンを合成しているという報告があるのみで、防衛物質としてのテルペン合成の報告は今までなく、本論文での、額腺分泌物に関わる分子生物学的な研究により、シロアリ自身がテルペン類を合成しているという証拠を得る事ができ、重要な発見である。

したがって、博士(学術)の学位を授与できると認める。