

論文審査の結果の要旨

氏名 並木 俊樹

本論文は 8 章からなり、第 1 章では本論文の目的、昆虫の脱皮・変態の制御機構に関する研究の現状が述べられている。

第 2 章では、カイコの成長に応じて前胸腺中で発現量の変化する遺伝子のスクリーニングを行うため、異なる成長段階のカイコ前胸腺に対して蛍光 Differential Display を行い、次に、発現量に変化が見られるバンドを PCR で増幅して、cDNA マイクロアレイを作成した。このアレイを用いて、1) 5 齢初期カイコ前胸腺と 5 齢初期カイコ唾液腺、2) 5 齢初期カイコ前胸腺と 5 齢 Wandering 期カイコ前胸腺、3) 5 齢 Wandering 期カイコ前胸腺と 5 齢 Wandering 期カイコ唾液腺、の三通りの組み合わせについて、各組織由来の RNA を DNA アレイとハイブリダイゼーションさせ、Wandering 期の前胸腺特異的に発現量が上昇する遺伝子のスクリーニングを行った。その結果、チトクローム P450 モノオキシゲナーゼの *Cyp307a1* をクローニングすることに成功した。

カイコ *Cyp307a1* の発現パターンを解析すると、5 齢幼虫の前胸腺特異的に発現すること、また、時期別ではエクジソンを大量に合成する脱皮直前と Wandering 期において発現量が上昇することを示し、エクジソン合成にかかわると予想した。

次に、*Cyp307a1* の機能解析を行うためにショウジョウバエを用い、その相同遺伝子の解析を行った。まず、*Cyp307a1* の染色体上の位置の近くに変異を持ち、エクジソン合成に異常をきたす変異系統を探した。その結果、エクジソン合成量減少の表現型を示す Halloween mutant family に属する *spook* という遺伝子座が *Cyp307a1-Dm* に近いことを見いだした。さらに、*spook* 変異系統が持つ *Cyp307a1* の塩基配列を解析し、*spook* 変異系統の *Cyp307a1* は、P450 の酵素反応に必須のドメインである heme 結合モチーフ中にアミノ酸置換を起こす変異が入っていることが明らかにするとともに、ショウジョウバエのトランスジェニック系統を作成してレスキュー実験を行い、*spook* と *Cyp307a1* が同一遺伝子であると結論した。

また、ショウジョウバエ *Cyp307a1* をクローニングし、*in situ* ハイブリダイゼーションで発現を確認したところ、エクジソンを合成する組織と考えられる初期胚の羊漿膜と成虫の卵巣での発現が見られた。ところが、予想に反して、胚期と 3 齢幼虫の前胸腺細胞では予想に反して発現が見られなかった。この結果からカイコとショウジョウバエでは幼虫期においてエクジソンを合成する経路が一部異なると予想している。

第 3 章では、カイコ組織別 EST データベースを検索することで、前胸腺特異的に発現していると考えられる EST をスクリーニングした。その結果、prgv0048 と呼ばれる EST が前胸腺特異的に発現していることを示した。prgv0048 の全長を決定し、bHLH 型の転写因子をコードしていることを明らかにした。この分子のアミノ酸配列をショウジョウバエデータベースで検索し、ショウジョウバエの bHLH 型転写因子である *HLH54F* と相同

性が比較的高いことを明らかにした。そこで、*in situ* ハイブリダイゼーションで発現部位を調べ、*HLH54F* が 3 齢幼虫の前胸腺細胞では発現が見られないが、胚期の前胸腺細胞と腸で特異的な発現が見られることを明らかにした。さらに遺伝学的な解析を行うため、Gal4/UAS 系を用いて野生型 *HLH54F* を胚の前胸腺細胞で過剰発現させたところ、孵化後 48 時間から 120 時間の間に致死の表現型を示した。また *HLH54F* を過剰発現させた系統はコントロールの系統と比べて幼虫期のエクジソン合成量が減少することを示した。

第 4 章は本研究の総括、第 5 章は図表、第 6 章は材料と方法、第 7 章は参考文献、第 8 章は謝辞となっている。

以上、本論文は、昆虫の脱皮・変態に関与する新規遺伝子 2 種類を明らかにしたもので、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。