

論文審査の結果の要旨

氏名 二橋 亮

本論文は5章からなり、第1章は cDNA サブトラクション法によるアゲハ幼虫皮膚で齢特異的に発現する遺伝子の同定について、第2章はメラニン合成酵素とクチクラ紋様との関係について、第3章はメラニン合成に間接的に関与する GTPCHI の isoform 特異的な発現について、第4章はエクジステロイドが色素合成に与える影響について、第5章は幼虫の紋様決定における JH の役割について述べられている。

論文提出者は、第1章において、紋様形成に関わる新規遺伝子を得るため、cDNA サブトラクション法により、4回目の脱皮（4眠）時に発現の変化する遺伝子を探索した。終齢候補遺伝子、若齢候補遺伝子のスクリーニングをそれぞれ 1,044 および 1,028 クローンから行い、終齢特異的遺伝子、若齢特異的遺伝子の候補として、それぞれ 31 種、64 種の遺伝子を得ている。その中には、RT-PCR および *in situ* hybridization を用いた発現解析の結果から、終齢幼虫の緑色部になる部分で特異的に発現している遺伝子や、若齢幼虫のイボ状突起の部分で特異的な発現の見られたクチクラ蛋白質が、複数含まれている。このように、実際に齢特異的に、アゲハ幼虫の体色や形態の変化に関わる遺伝子を複数得ることに成功した点は、高く評価できる。

第2章では、クチクラ表面の紋様形成に關与するメカニズムの解明を目的に、クチクラ上の色素を産生すると考えられるメラニン合成酵素の発現と、培養皮膚を用いたメラニン前駆体の皮膚への取り込みについて解析している。メラニン合成酵素のうち、*TH, DDC* は黒色部に、*ebony* は赤色部と一致した発現が確認されている。また、培養実験の結果から、メラニン前駆体の皮膚への取り込みは一樣であることが示されている。酵素の発現解析と、前駆体の取り込みの両方の面から、メラニン合成酵素の局在が、幼虫クチクラの色素の分布を制御することを初めて示した点は評価に値する。

第3章では、メラニン合成酵素のうち、紋様特異的に発現する *TH* と、全体で発現する *PAH* に必要な補因子 BH_4 を産生する *GTPCHI* の紋様との関わりについて考察している。*GTPCHI* の発現が、黒色紋様に關連することを具体的に示した例は本研究が初めてであると同時に、*isoform* 特異的に紋様形成に關連が見られたこと、色素を直接合成する酵素以外のステップでも紋様形成は制御されていることを示した点は、紋様形成の制御機構を考える上で大きな意義がある。

第4章では、エクジステロイドによる色素合成遺伝子の転写制御について解析している。論文提出者は、個体に局所的にエクジステロイドの影響を与える系を構築し、エクジステロイドが実際に色素合成に影響を及ぼすことを調べた上で、1~3章で得られた色素合成に關わる遺伝子の発現とエクジステロイドとの關連を解析している。エクジステロイドのパルスによって、色

色素合成に関わる複数の遺伝子の発現が誘導されるという結果は、脱皮直前に色素合成がなされるという現象を矛盾なく説明できるものであり、ホルモンと紋様形成の関連をつなぐ有用な情報が得られたといえよう。

第5章では、幼若ホルモンによる紋様形成を調べるために、幼若ホルモン投与による紋様の変化について解析している。本章の結果は、紋様パターンの決定が幼若ホルモン依存的であることを示唆している。また、幼若ホルモン投与によって色素合成遺伝子の発現パターンが変化するという結果は、紋様のパターン形成を担う遺伝子が、幼若ホルモンによって制御されていることを示す興味深いものである。

紋様形成など後期発生を制御する分子機構は研究が遅れていたが、本論文は幼虫紋様に関わる具体的な遺伝子を多数明らかにした点と、ホルモンによる紋様形成の制御機構に対する新知見を与えた点が高く評価される。本論文の結果から、これまで謎につつまれていたホルモンによる紋様形成の制御機構、さらに紋様のパターン形成と色素合成を結びつけるメカニズムが、今後明らかにされることが期待される。

なお、本論文は藤原晴彦氏との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析および検証を行ったもので、論文提出者の寄与が充分であったと判断する。

従って、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。