

論文審査の結果の要旨

氏名 山中 直岐

本論文は 11 章からなり、第 1 章で昆虫の脱皮・変態とその内分泌制御に関する研究の現状ならびに本研究の目的が述べられている。

第 2 章では、まず、昆虫の脱皮・変態を制御する前胸腺からのエクジステロイド分泌促進の際にセカンドメッセンジャーとしてはたらく cAMP に着目して、前胸腺培養系と HPLC による cAMP 定量系とを組み合わせた検定法 (cAMP 法) を考案した。この cAMP 法を前胸腺調節活性の検定系としてカイコ脳約 1 万 2 千個を出発材料に精製を行い、4 段階の HPLC 精製によって 1 つの活性物質を精製した。次に、質量分析による解析の結果、単離された物質は myosuppressin と呼ばれるペプチドに共通するアミノ酸配列を有していることから、これをカイコ myosuppressin (BMS) と命名した。

第 3 章では、前胸腺培養系での機能解析を行い、BMS が cAMP 蓄積のみならず前胸腺からのエクジステロイド分泌も抑制すること、その抑制作用は既に知られていた前胸腺抑制因子である前胸腺抑制ペプチド (PTSP) よりも強く、PTTH や PTSP とは異なる経路で前胸腺に作用すること、をそれぞれ明らかにした。また、*in situ* ハイブリダイゼーションと免疫染色による解析の結果、BMS は脳の 2 対の神経分泌細胞で産生され、脳に付随する内分泌器官から体液中に分泌されるホルモンであることを示した。

第 4 章では、前胸腺 cDNA ライブラリーから構築した EST データベースを利用し、BMS 受容体 (BMSR) を同定した。発現解析の結果、*BMSR* は予想通り前胸腺において強く発現していた。また HEK293 培養細胞を用いた発現系により、BMSR が高い特異性で BMS を受容することを明らかにした。

第 5 章では、myosuppressin が FMRFamide-related peptide (FaRP) と呼ばれる、C 末側に共通配列を有するペプチドファミリーに属しており、BMS 以外のカイコ内在性 FaRP が、BMSR を介して前胸腺を抑制している可能性が考えられたことから、FaRP を高感度に認識する ELISA 系を構築し、これをアッセイ系として新たなカイコ FaRP の精製・単離を行った。質量分析による解析の結果、単離した FaRP の一つは FMRFamide と呼ばれるペプチドに相同性があり、ゲノム情報から同定した遺伝子 (*Bommo-FMRFamide*; *BRFa*) はさらに 3 つの FaRP をコードしていた。これら 4 種類のペプチドは予想通り BMSR をマイクロ M レベルで活性化し、前胸腺培養系でもエクジステロイド分泌抑制作用をもつことを確認した。マイクロ M レベルという高濃度での抑制活性は、BRFa が体液を介してではなく、神経投射などによって局所的な高濃度で前胸腺に作用していることを予想させた。そこで *BRFa* の発現パターンを確認すると、中枢神経系特異的に、特に前胸腺に近接する胸部神経節において高い発現が見られた。そこでさらに *in situ* ハイブリダイゼーションと免疫染色により、胸部神経節の神経分泌細胞が *BRFa* を産生し、軸索を直接前胸腺に投射していることを確認した。また、この前胸腺上の軸索を摘出して TOF MS 測定用プレート

に乗せ、レーザーを直接照射して TOF MS を測定すること (Direct MS) に成功し、遺伝子配列から予測した 4 種類の BRFa ペプチド全てが前胸腺表面に運ばれていることを明らかにした。

この前胸腺投射 BRFa 神経の生理作用をさらに検証するため、電気生理学的な手法を用いて、5 齢幼虫の成長過程における神経発火頻度の変化と、体液中のエクジステロイド濃度変動との関連を調べた。その結果、前胸腺のはたらきが抑制されている 5 齢前半には BRFa 神経は頻繁に発火しているのに対して、前胸腺が活性化する 5 齢後期には、BRFa 神経の発火が抑制されていることが確認できた。これらの結果から、前胸腺投射 BRFa 神経は PTH などのホルモンと協調しながら、抑制性のシグナルを伝達することで前胸腺のはたらきを調節していると考えられている。

第 6 章および第 7 章では、ゲノムデータベースを用いた G タンパク質共役型神経ペプチド受容体の網羅的同定とその発現解析の結果をまとめ、前胸腺に時期特異的に発現する受容体を見いだすとともに、幼若ホルモンの生合成を調節する神経ペプチド類の受容体を同定した結果について述べられている。

第 8 章は本研究の総括、第 9 章は材料と方法、第 10 章は謝辞、第 11 章は参考文献となっている。

なお、本論文の一部は共同研究による実験結果も含まれているが、いずれも論文提出者が主体となって行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

以上、本論文は、昆虫の脱皮・変態に関与する新規神経ペプチドおよび受容体、さらにその機能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。