

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 浅妻 英章

甲殻類の眼柄を切除すると、体色が変化し、脱皮が誘導され、卵巣が急速に成熟し、血糖値が低下する。これらの変化の原因は、眼柄内で産生される様々なペプチドホルモンが、眼柄切除により失われるためである。眼柄内で産生されている主要なペプチドホルモンは、甲殻類血糖上昇ホルモン (CHH)、脱皮抑制ホルモン (MIH)、卵黄形成抑制ホルモン (VIH) などであり、これらは類似の一次構造を有することから、CHH 族ペプチドと呼ばれている。これまでに数多くの甲殻類から CHH 族ペプチドが同定されてきた。しかし、CHH 族ペプチドの受容体は未だに同定されていない。また、受容体から下流の細胞内シグナル伝達経路に関する報告は、いくつかあるものの、種間で異なる結果が得られている。さらにこのシグナルに応答する分子は同定されていない。本論文は、以上の点を明らかにすることを目的にして、クルマエビ (*Marsupenaeus japonicus*) の MIH を対象として行ったもので、3章からなる。

まず、序論で、背景を述べた後、第1章では発現クローニング法を用いた MIH 受容体遺伝子のクローニングを試みている。Y 器官由来 cDNA ライブラリーを作製し、COS7 細胞を用いた発現クローニングにより、パニング法および FACS を用いて MIH 受容体をコードする cDNA のクローニングを試みた。その結果、前者の方法では、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 III の形成に必須なシャペロンタンパク質 BCS1 に相同性を示すクローンが得られたが、ミトコンドリア内膜への局在が予想されたため、MIH 受容体ではないと判断された。また、後者の方法では、RING-finger ドメインを有するクローンが得られたが、配列中に膜貫通領域を有していないため、MIH 受容体ではないと考えられた。これまでのところ、MIH 受容体をコードする候補遺伝子を得るには至っていない。

第2章では、MIH によって活性化される Y 器官細胞内シグナル伝達経路を解析している。まず、MIH 刺激による Y 器官細胞内の cAMP、cGMP 濃度を測定した結果、cAMP 濃度は変化しなかったが、cGMP 濃度は MIH 濃度依存的に上昇した。このことから、MIH シグナル伝達経路にはグアニル酸シクラーゼ (GC) の関与が予想された。一般に、GC は細胞膜上に存在する膜型 GC (mGC) と、細胞質中に存在する可溶性 GC (sGC) に大別される。sGC 特異的阻害剤 ODQ が MIH シグナルへ及ぼさなかったことから、MIH のシグナル伝達に関与する GC は、sGC ではなく mGC であることが示唆された。

MIH のシグナル伝達に関与する GC を同定するため、クルマエビの Y 器官から GC をコードする cDNA をクローニングし、*MjGC1* を得た。組織別発現解析の結果、*MjGC1* mRNA は全身で発現が確認されたことから、*MjGC1* は MIH 受容体ではないと予想された。

第3章では、Y 器官における脱皮抑制機構の解析を行っている。近年、昆虫においてエクジステロイド生合成経路の解明が進められ、20-ヒドロキシエクジソンの生合成のうち、最

終 4 反応を触媒する生合成酵素をコードする Halloween 遺伝子群が同定された。甲殻類と昆虫は、同じエクジステロイドを脱皮ホルモンとすることから、クルマエビ Y 器官より Halloween 遺伝子のホモログをクローニングし、発現解析を行った。その結果、25-hydroxylase である Cyp306a1 (*phantom*) に相同性を有する cDNA、*MjPhm* を得た。発現解析の結果、*MjPhm* mRNA は Y 器官特異的に、脱皮前期にのみ高い発現が見られたことから、*MjPhm* のエクジステロイド生合成への関与が強く示唆された。

血中のエクジステロイド濃度は脱皮前期に増加するが、脱皮直前に急激に減少する。このような濃度制御機構には、Y 器官におけるエクジステロイドの負のフィードバック機構によると予想された。そこで、クルマエビのエクジソン受容体 (EcR) とその共役受容体分子であるレチノイド X 受容体 (RXR) の cDNA をクローニングし、脱皮周期間における発現解析を行った。その結果、Y 器官では脱皮前期に向かい発現量は上昇傾向を示したが、顕著な発現変化は見られなかった。このことから、脱皮直前のエクジステロイド濃度減少は EcR の発現量ではなく、転写活性化能の変化によって生じるのではないかと考えられた。

以上、本論文は甲殻類における脱皮の内分泌制御機構の一端を明らかにしたもので、学術上、また水産増養殖の応用上の観点から貢献するところが大きい。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。