

論文審査の結果の要旨

氏名 吉山 拓志

本論文は 6 章からなり、第 1 章で昆虫の発生を制御する内分泌機構に関する研究の現状や、本研究を行うに至った背景ならびに本研究の目的が述べられている。

第 2 章では、昆虫前胸腺におけるエクジソン生合成に関与する遺伝子の網羅的な探索と同定の過程について述べられている。カイコ DNA マイクロアレイを用いた網羅的な発現解析およびカイコにおける組織別の発現解析により、カイコ前胸腺で特異的に発現する遺伝子を 6 つ見出した。5'RACE 法により、そのうち 4 つの遺伝子についてタンパク質をコードする読み枠の全長を決定した。本論文では、そのうちの一つである *neverland* (*nvd*) に着目した解析について主に述べられている。アミノ酸配列解析から、*nvd* は原生動物、節足動物、棘皮動物、脊椎動物のうちの魚類、両生類、鳥類を含む動物界に広く保存された、新規 Rieske 型酸化酵素であることを明らかにした。

第 3 章では、ショウジョウバエ個体を用いた *nvd* の遺伝学的な機能解析について述べられている。in situ ハイブリダイゼーション法により、ショウジョウバエにおいて *nvd* は胚期および幼虫期の前胸腺で特異的に発現していることを明らかにした。さらに、定量的 RT-PCR によって前胸腺細胞における発育段階に沿った発現量の変動を解析し、エクジソン分泌活性に沿って発現量が変動していることを明らかにした。続いて、遺伝学的な手法によりショウジョウバエの前胸腺細胞における *nvd* の RNAi を誘導し、*nvd* の機能をノックダウンした際の表現型を解析した。前胸腺における *nvd* の機能をノックダウンさせた個体は、脱皮ができずに 1 齢幼虫で致死となることを明らかにした。続いて、ラジオイムノアッセイ法によってノックダウン個体において体液中のエクジソン分泌量が低下していることを明らかにし、*nvd* が前胸腺におけるエクジソン生合成に関与することを示した。さらに、ノックダウン個体の表現型が活性型エクジソンである 20-ヒドロキシエクジソンおよびエクジソン生合成経路の前駆体である 7-デヒドロコレステロールでは回復するが、コレステロールでは回復しないことを明らかにし、*nvd* が前胸腺のエクジソン生合成においてコレステロールを 7-デヒドロコレステロールに変換する段階に関与することを示した。

第 4 章では、ショウジョウバエの培養細胞である S2 細胞を用いた Nvd の生化学的な機能解析について述べられている。S2 細胞を用いたコレステロール代謝活性測定系を確立し、その系を用いてカイコ Nvd の酵素活性を検証し、培養時間依存的なコレステロール由来の代謝産物の生成が認められることを示した。この代謝産物の誘導体を ESI-MS/MS 法により分析し、代謝産物が 7-デヒドロコレステロールであることを示した。次いで、ショウジョウバエ Nvd、線虫 Nvd (DAF-36)、ゼブラフィッシュ Nvd も、S2 細胞系においてコレステロールを 7-デヒドロコレステロールへと変換する活性を持っていることを示

し、Nvd のコレステロール代謝活性が動物界に保存されていることを示した。また、Rieske 型酸化酵素ファミリーにおいて保存性の高いアミノ酸に点変異を導入した Nvd 分子の酵素活性を解析し、Rieske 型 [2Fe-2S] 領域および非ヘム鉄結合領域のいずれもが酵素活性の発揮に必須であることを示した。

免疫細胞染色により Nvd の細胞内局在を調べ、Nvd はミトコンドリアへ局在することを明らかにした。以上の結果は、前胸腺細胞においてコレステロールから 7-デヒドロコレステロールへの変換は、小胞体に局在する P450 酸化酵素によって担われているとされる従来の仮説を、覆すものであった。

第 5 章では、本研究の結論が述べられている。Nvd の作用機序や基質特異性、生理的機能、および本研究の意義について考察されている。

第 6 章は材料と方法となっている。第 6 章に続き、謝辞、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、昆虫におけるエクジソン生合成およびコレステロール代謝に関与する新規 Rieske 型酸化酵素 Neverland 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。