

論文審査の結果の要旨

氏名 渡邊 崇之

昆虫の脱皮・変態時の形態形成は脱皮ホルモン、エクダイソンによって協調的に制御される。エクダイソンは核内受容体であるエクダイソン受容体に受容され、多数の標的遺伝子の遺伝子発現を調節する。昆虫は、N-末端領域にアイソフォーム固有なAF-1転写活性化領域をもつ複数のEcRアイソフォームをもつ。核内受容体のAF-1領域はリン酸化などの翻訳後修飾や転写コファクターなどとのタンパク質-タンパク質相互作用の場として機能することが知られており、EcRアイソフォーム固有なAF-1領域の構造・機能的特徴が、アイソフォーム固有の転写調節能力や標的遺伝子の選択などに寄与することが想定される。本研究で論文提出者は、EcRアイソフォーム固有のAF-1領域の構造・機能的特徴を理解することを目的として、比較構造解析によるEcR-AとEcR-B1アイソフォームに固有なAF-1領域の基本構造の特徴付け、及び昆虫培養細胞系をもちいたAF-1領域の機能解析を行った。

本論文は2章立てで構成されている。第一章では、比較構造解析によるEcR-B1アイソフォームAF-1領域の特徴付けを行った。一般に核内受容体のAF-1領域は配列の保存性が低く、決まった立体構造をもたない天然変性タンパク質としての特徴をもつ。論文提出者はAF-1領域でも、その機能に重要な部分は進化の過程で保存されるのではないかとの作業仮説を立て、比較構造解析によって種間で保存性の高い配列を検索した。EcRの同定・機能解析はショウジョウバエやカイコなど、特定の完全変態昆虫で行われており、原始的な昆虫である不完全変態昆虫(バッタ・セミなど)や無変態昆虫(シミなど)からB1アイソフォームは同定されていなかった。本研究では不完全変態昆虫や無変態昆虫を含む51種の昆虫や節足動物より新たにB1アイソフォームを同定し、72種の昆虫や節足動物のB1アイソフォームAF-1領域のアライメント解析を行った。その結果、B1アイソフォーム固有なAF-1領域には全ての昆虫・節足動物で進化的に保存された2つのマイクロドメイン(S-richモチーフ、及びDL-richモチーフ)が存在すること、完全変態昆虫のEcR-B1アイソフォームがAF-1領域のN-末端部位に新規なマイクロドメイン、(K/R)RRWモチーフを獲得したことが明らかになった。またこれら3つの主要なマイクロドメインに加え、特定の系統・グループのみがもつマイクロドメインが存在することも明らかになった。

第二章では、ショウジョウバエの培養細胞を用いたショウジョウバエEcR-B1アイソフォームAF-1領域のマイクロドメインの機能解析を行った。ショウジョウバエEcR-B1アイソフォームのAF-1領域には(K/R)RRWモチーフ、S-richモチーフ、及びDL-richモチーフが存在する。これらのマイクロドメインがAF-1領域を介した転写調節機能に関与するか否かを検討するため、ルシフェラーゼアッセイによる転写活性化能の評価をおこなった。さらに、これらのマイクロドメインがタンパク質-タンパク質間相互作用に関与するか否かを検討するため、蛍光相関分光法(FCS)法を用いてタンパク質間相互作用を解析した。その結果、(K/R)RRWモチーフ、及びDL-richモチーフがAF-1領域を介した転写活性化能に寄与することが明らかになった。FCS法によりS2細胞細胞核で発現させたEcRの拡散速度を測定したところ、(K/R)RRWモチーフを欠いたコンストラクトで

有為に拡散速度が上昇した。このことは、核内を浮遊しているEcR-B1アイソフォームAF-1領域-EGFP融合タンパク質が (K/R)RRWモチーフを介して何らかのタンパク質と相互作用していることを示している。EcR-Aアイソフォームについては、C-末端領域に存在するS/P-richなマイクロドメインやN-末端領域に存在するSUMOylation部位がAF-1 領域を介した転写調節機能に関与することが明らかになった。

本研究で見出されたEcRアイソフォーム固有なAF-1領域のマイクロドメインは、EcRの転写調節や昆虫の系統・グループ固有の転写調節機能に関与すると考えられる。今後、各々のマイクロドメインと相互作用するタンパク質の同定・機能解析や相互作用様式の進化を研究することで、EcRアイソフォーム固有なAF-1領域の機能的特徴や、その進化の理解につながると期待される。本研究は昆虫分生物学や内分泌学の発展に寄与するものである。

なお本論文の研究は竹内秀明、久保健雄(東京大学)との共同研究であるが、論文提出者が主体となって実験を計画し、遂行したもので、論文提出者の寄与が十分であると判断できる。従って、博士(理学)の学位を授与できると認める。