

論文審査の結果の要旨

氏名 五十嵐 史彦

本論文の題目は「昆虫ステロイドホルモン生合成器官におけるコレステロール取り込みの分子機構」で、序章と本編が第1～3章から、総括の章、実験材料と方法の章、参考文献の章、の7つの章から構成されている。

本編の第1章から第3章の内容は、以下のとおりである。

まず、第1章では、APCI-LC-MS/MSにより微量のステロール化合物の定量系を確立した。まず、様々なステロール標品を用いて、APCI-MSおよびAPCI-MS/MSスペクトルにて分析し、そこで得られた分析結果、特にスペクトルに関して、ステロール化合物で認められる特異性を検証した。次に、ステロイド化合物に特徴的に認められた脱水ピークおよび開裂イオンピークをもとに、高感度の検出系を確立し、さらにスペクトルのイオンピークから作成した検量線を作成した。

このAPCI-LC-MS/MSを用いたステロール化合物の定量系を用いて、カイコの食餌(桑および人工試料)のステロール組成、およびカイコ幼虫の体液中に含まれるリポフォリンが抱合しているステロール化合物の組成を分析した。さらに、カイコ幼虫の前胸腺をはじめとする各器官(中腸、脂肪体、マルピーギ管、脳)のステロール組成、およびその含有量を比較した。また、この定量系の応用として、前胸腺のステロール含有量と血中エクジソン濃度の経時変動も解析した。

第2章では、第1章でのステロール化合物の定量分析結果を、さらに生理学および生化学的に研究を進展させ、カイコ幼虫の前胸腺におけるリポフォリン由来コレステロール取り込み活性を解析した。ここでは、昆虫の脱皮ホルモンであるエクジソンを前胸腺から分泌させるホルモン前胸腺刺激ホルモン(PTTH)の前胸腺へのコレステロール取り込みに関する実験を行った。まず、PTTH刺激によるリポフォリン受容体(LpR)の転写活性が上昇していることを示した。同様に、PTTH刺激により、リポフォリン由来のコレステロールが前胸腺内に蓄積し、その量が増加していることを見出した。この増加量が取り込みによるものかどうかを培養時間の検討や、安定同位体標識のコレステロールを用いたトレーサー実験により、リポフォリンが抱合しているコレステロールが前胸腺へと取り込まれることを培養前胸腺を用いて示した。

第3章では、第2章で示した、前胸腺へのコレステロール取り込みをさらに分子レベルでのメカニズムを明らかにするため、リポフォリン、リポフォリン受容体以外にも、近年哺乳類でステロール輸送体として同定されたNiemann Pick type C disease-1a(NPC1a)を同定し、その機能解析を試みた。本章全体では、前胸腺へのコレステロールの取り込み機構がどのようになっているかを検討したものである。まず、LpR発現細胞におけるリポフォリン由来コレステロールの蓄積を分析した。一方、コレステロールの蓄積時に

おける LpR とリポフォリンの細胞内局在を、免疫組織化学的・細胞生化学的に解析した。また、前胸腺細胞内で発現しているコレステロール輸送体 Npc1a の発現を解析し、生体内におけるリポフォリン、LpR、Npc1a の関係を解析した。Npc1a に関しては、キイロシヨウジョウバエ *Drosophila melanogaster* のみであるため、CHO 細胞を用いた発現系を用いて、Npc1a の機能解析を試みた。ここでは、Npc1a の発現産物が LpR と協調的に前胸腺細胞内へのコレステロール輸送を担っていることを強く示唆したデータが得られている。このことを、さらに遺伝学的に確かめるために、キイロシヨウジョウバエの Npc1a の発現低下個体が、どのような表現型として認められるかを検討した。結果は、さらなる詳細な生化学的同定は必要であるものの、Npc1a が体内にコレステロールを取り込みに寄与していることを強く示唆するものであった。

本編の記述後は、本研究の総括の章で、本論文における統合的な考察が議論されている。すなわち、カイコ幼虫における前胸腺のコレステロール取り込み機構において、LpR と Npc1a が関わっていることが示されていた。

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、昆虫ステロイドホルモン生合成器官におけるコレステロール取り込みの分子機構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。