【67】

氏名（本　籍）	古川誠一（千葉県）
学位の種類	博　士（農　学）
学位記番号	博甲第2,024号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	カイコ抗菌性ペプチド遺伝子の発現と構造解析
主　査	筑波大学教授　農学博士　正野俊夫
副　査	筑波大学教授　農学博士　柿嶌眞
副　査	筑波大学教授　農学博士　祥雲弘文
副　査	蚕糸・昆虫農業技術研究所 生体防御研究室長　理学博士　山川稔
副　査	筑波大学助教授　農学博士　本田洋

論文の内容の要旨

昆虫は脊椎動物の抗原体反応のような獲得抗性免疫機構をもっていない。その反面，先天性免疫をより進化させることによって多くの病原体などの外敵の攻撃に対処し，脊椎動物に劣らない生体防御系を獲得している。昆虫のもつ液性防御反応の1つとして，細菌の侵入によって遺伝子の発現が誘導され抗菌性ペプチド等が合成され分泌される反応がある。そこでカイコにおける抗菌性ペプチド遺伝子の発現と構造解析について研究を行い，以下の事項が明らかとなった。

カイコ抗菌性ペプチド遺伝子の発現誘導に関わる因子を特定するために，グラム陰性菌細胞壁構成成分であるLPSやリピドA及びカイコ表皮のクチクラ層を構成するキチンのオリゴマーを接種したときの，抗菌性ペプチド遺伝子の発現をノーザンブロッティングを行い検討した結果，セクロピン B，アタシン及びレボシンという3種類のカイコ抗菌性ペプチド遺伝子発現が誘導された。また，リピド Aや6量体のキチンをカイコ幼虫に注射した結果誘導されるセクロピン B，アタシン及びレボシン遺伝子の発現の組織特異性の検定を行った結果，これらの遺伝子発現は主に脂肪体や血球で見られた。しかし，他の組織における発現やその強弱は遺伝子によって異なっていた。

レボシン遺伝子の発現誘導機構を明らかにするために，カイコゲノム DNAライブラリーよりレボシン遺伝子をコードする領域をクローニングし，塩基配列を決定した。その結果，レボシン3とレボシン4と命名した新規のレボシンをコードした遺伝子のクローンが得られた。これらレボシン遺伝子の5’上流の塩基配列を調べた結果，TATA-boxやCAAT-box，またNF-κB結合様配列やGATAモチーフが見られた。またNF-IL6結合様配列はレボシン3遺伝子に存在し，レボシン4遺伝子は1塩基不足した不完全な配列が存在していた。レボシン3，4両遺伝子間で－250bpまでは配列が保存されていたが，それより上流は全く異なっていた。これらの遺伝子の発現様式をノーザンブロッティング及びRT-PCRを用いて検討した結果，レボシン両遺伝子はLPSによる刺激によって脂肪体や血球で発現が誘導され，その発現量は3遺伝子の方が4遺伝子よりも多かった。

レボシン同様カイコでのみ発見され，現在までに遺伝子解析の行われていないモリシンのcDNAのクローニングを行い，塩基配列を決定した結果，シグナルペプチドと推定されるアミノ酸配列の1残基のみが異なる2種類のモリシン（モリシン1と2）が得られた。そしてモリシン遺伝子は，大腸菌の注射によって脂肪体で特に多く発現し，血球やマルピーギ管でも発現が誘導されることが明らかになった。またモリシン遺伝子発現の誘導の経

時的変化を追ったところ，大腸菌注射後１時間で見られ，８時間後に最大量に達し48時間後においても発現の持続が確認された。モリシン遺伝子は大腸菌以外でもLPSやリピド A によっても発現が誘導され，モリシン２遺伝子の方がモリシン１遺伝子よりもより多く発現誘導がされることが明らかになった。モリシン遺伝子についてもゲノムDNAのクローニングを行い，モリシン２遺伝子をコードする領域の塩基配列を決定した。この遺伝子の５’上流の塩基配列を調べた結果，TATA-boxやNF-κB結合様配列そしてNF-IL6結合様配列が見つかった。

レボシン３，４遺伝子及びモリシン２遺伝子の転写活性を制御する核タンパク質の結合部位を明らかにするために，まずNF-κB結合様配列及びNF-IL6結合様配列についてプローブを作成しゲルシフトアッセイを行った結果，全ての遺伝子においてNF-κB結合様配列に結合するタンパク質の存在が認められた。そして競合試験の結果，これらのNF-κB結合様配列に結合するタンパク質は同じ性質を有するものであることが示唆された。さらに他の領域にも核タンパク質結合部位が存在しているかを調べるために，レボシン３，４遺伝子及びモリシン２遺伝子のプロモーター領域より50～300bpのフラグメントを作製しこれらをプローブとしてゲルシフトアッセイを行った結果，NF-κB結合様配列以外の配列にも結合するタンパク質が存在することが判明した。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究はカイコの持つ抗菌性ペプチドの遺伝子の発現誘導機構を解明し，さらにその遺伝子の構造を決定する目的で行われた。カイコ幼虫にLPSやキチンのオリゴマーを接種した結果，抗菌性ペプチドであるセクロピン B，アタシン及びレボシン遺伝子の発現が誘導され，これらの遺伝子発現は脂肪体や血球で見られることを示した。レボシン３及び４遺伝子のクローニングを行い，その発現量を調べた結果，３遺伝子の方が４遺伝子よりも多いことを明らかにした。次いで，モリシン遺伝子のクローニングを行い，モリシン１と２の構造を決定した。モリシン遺伝子は，脂肪体，血球そしてマルピーギ管で発現が誘導され，２遺伝子の方が１遺伝子よりも発現量が多いことを示した。これらの抗菌性ペプチドについて，その遺伝子の構造を決定し，遺伝子の各組織での発現を確認したことは高く評価される。

さらに，レボシン３，４遺伝子及びモリシン２遺伝子のプロモーター領域についてゲルシフトアッセイを行い，それぞれのNF-κB結合様配列に結合するタンパク質の存在を確認し，またNF-κB結合様配列以外の配列にも結合するタンパク質が存在することを証明したことは注目に値する。

以上，カイコの抗菌性ペプチド遺伝子であるレボシン３，４並びにモリシン１，２遺伝子の構造を決定し，これら遺伝子のカイコ各組織での発現を確認し，さらに，レボシン，モリシン遺伝子のプロモーター領域のNF-κB結合様配列などに結合するタンパク質の存在を証明したことは，基礎，応用の両面から高く評価される。

よって，著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。