

氏名（本籍）	塩谷 天		
学位の種類	博 士（ 理 学 ）		
学位記番号	博 甲 第	7318	号
学位授与年月日	平成 27 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Studies on the Glutathione S-Transferase Noppera-bo and its Role in Insect Ecdysteroid Biosynthesis (昆虫のエクジステロイド生合成を制御するグルタチオンS-転移酵素Noppera-boの研究)		
主査	筑波大学准教授	博士（理学）	丹羽 隆介
副査	筑波大学教授	理学博士	古久保・徳永克男
副査	筑波大学教授	博士（理学）	笹倉 靖徳
副査	筑波大学教授	博士（理学）	中田 和人

論 文 の 要 旨

ステロイドホルモンは多細胞生物の代謝、恒常性の維持、そして発生に關与する重要な生体内分子の一つである。昆虫においては、脱皮ホルモンとして知られるエクジステロイドが、発生過程における脱皮、変態、そして羽化の誘導に必須である。エクジステロイドは、餌から取り込んだコレステロールを材料として、前胸腺などの生合成器官において複数の変換反応を経て生合成される。過去 15 年間に、主にショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* を用いた分子遺伝学的解析から、複数のエクジステロイド生合成酵素遺伝子が同定されてきた。しかし、エクジステロイド生合成過程でのコレステロールの前胸腺への取り込みや細胞内輸送に關わる分子、あるいは中途の未知反応に關わる酵素など、未同定の制御因子の存在が予想されている。本論文において著者は、ショウジョウバエの新規遺伝子 *noppera-bo* (*nobo*) の機能解析を通じて、エクジステロイド生合成の調節機構に關わる新しい分子の発掘と機能解明を目指した。

著者は、共同研究者の実施したショウジョウバエ組織別遺伝子発現プロファイリングのデータを分析した結果、グルタチオン S-転移酵素 (GST) をコードした機能未知の遺伝子 *CG4688/nobo* が前胸腺で特異的に高発現していることを見出した。著者は、定量逆転写 PCR 法、*in situ* ハイブリダイゼーション法、そして免疫組織化学染色法によるそれぞれの実験を実施し、幼虫期における *nobo* の前胸腺特異的発現を確認した。

次に著者は、*nobo* の生体内機能を調べるために、相同組換えによる遺伝子破壊法を用いて *nobo* ノックアウト (*nobo*^{KO}) 系統を作製した。*nobo*^{KO} ホモ接合個体は、胚発生の途中で上皮の形態形成が停止して、胚表面構造が分化しない表現型を伴って胚性致死となった。また、*nobo*^{KO} ホモ接合個体においては、エクジステロイド応答遺伝子の発現が顕著に低下していた。さらに、胚性致死になる前の *nobo*^{KO} ホモ接合個体に外部から活性型エクジソン (20-ヒドロキシエクジソン; 20E) を投与したところ、胚性致死の表現型は回復し、1 齢幼虫まで発生が進行した。*nobo* の機能的意義を調べるための別の実験アプローチとして著者は、幼虫期に前胸腺特異的に二重鎖 RNA 干渉

(RNAi) を誘導する手法を用いた実験も実施した。この *nobo* RNAi 個体は、対照群の個体と同様に正常に孵化して 1 齢幼虫になったが、その後 90% 以上の個体が 2 齢幼虫で発育が停止した。*nobo* RNAi 個体内の 20E 量を質量分析法によって調べた結果、対照群の個体からは 20E が検出されたが、*nobo* RNAi 個体からは検出されなかった。また、*nobo* RNAi 個体の餌に 20E を混ぜて摂食させた結果、2 齢幼虫での発育停止が回復し、成虫まで生育する個体が見られた。以上の結果は、*nobo* が胚期と幼虫期のいずれにおいてもエクジステロイド生合成に必須の役割を担うことを示唆する。

続いて著者は、*Nobo* がエクジステロイド生合成のどの段階に作用するのかを調べる目的で、エクジステロイドの前駆体化合物によるレスキュー実験を行った。*nobo* RNAi の幼虫に様々な前駆体化合物を摂食させ、どの前駆体化合物が *nobo* RNAi の発育停止を回復させるかを調べることで、*Nobo* が関わる反応段階を推測できる。この実験で著者は、*nobo* RNAi 個体の致死性は、エクジステロイド生合成の出発材料であるコレステロールを摂食させることで回復することを見出した。また、*nobo*^{KO}ヘテロ接合メス成虫にコレステロールを摂食させた際、子として生まれてくる *nobo*^{KO}ホモ接合個体の胚性致死が認められなくなり、この *nobo*^{KO}ホモ接合個体は 1 齢幼虫まで生育した。以上の結果から著者は、*Nobo* はエクジステロイド合成過程の触媒反応ではなく、原材料であるコレステロールの細胞内動態の調節に関与すると予想した。この予想と一致して、*nobo* RNAi 個体の前胸腺を含む組織の中においては、対照群に比べてコレステロールの有意な蓄積が認められた。さらに、*nobo* RNAi 個体から摘出した前胸腺を蛍光標識コレステロール存在下で組織培養した結果、対照群の前胸腺に比べて蛍光シグナルの優位な増加が認められた。これらの結果は、*Nobo* が前胸腺内でのコレステロール動態調節に必須の機能を担うことを強く示唆する。

著者はさらに、ショウジョウバエ以外の昆虫種にも *nobo* のオーソログが存在するのかを検証するために、昆虫 11 種の遺伝子データベースに登録された 277 個の GST のアミノ酸配列を用いた分子系統解析を行った。その結果、*nobo* のオーソログはハエ目昆虫だけでなくチョウ目昆虫にも見出された。また、チョウ目昆虫であるカイコガ *Bombyx mori* から見出された *nobo* オーソログ (*nobo-Bm*) をショウジョウバエ *nobo*^{KO}ホモ接合個体で強制発現させたところ、*nobo*^{KO}ホモ接合個体の致死性は回復して成虫まで成育した。これらの結果は、チョウ目昆虫の *Nobo* がハエ目昆虫の *Nobo* の機能を補完したことを意味し、*nobo* が昆虫種を超えて保存された必須の遺伝子であることを示唆する。

審 査 の 要 旨

ステロイドホルモンの生合成調節の分子メカニズムの理解は、基礎科学の側面のみならず医学などの応用的側面からも本質的な課題である。今回の著者の研究によって、昆虫のステロイドホルモン生合成を制御する新規 GST 遺伝子が同定された。GST の機能として、細胞内に入った毒物に対する解毒代謝の役割がよく調べられているが、生体内在性分子を生合成あるいは代謝する役割はあまり知られていない。また、ステロイドホルモン産生器官におけるコレステロール動態調節の重要性は以前から指摘されていたが、その制御に GST というまったく予想されてこなかった遺伝子ファミリーが関与することを明らかにした点でも、著者の研究は新規性が高い。*Nobo* の基質が未解明なのは残念であるが、本論文で記載された今回の成果は発生生物学、細胞生物学、そして生化学などの広い分野に十二分に意義のある新知見をもたらしたと評価した。

平成 27 年 2 月 3 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。