

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 SAPIN Gelyn Danglay

論 文 題 目

Studies on the transcriptional regulation of genes involved in adult development in insects

(昆虫の成虫化に関わる遺伝子の発現制御機構に関する研究)

論文審査担当者

主 査	名古屋大学講師	水口 智江可
委 員	名古屋大学教授	池田 素子
委 員	名古屋大学教授	山本 直之
委 員	名古屋大学准教授	三浦 健

論文審査の結果の要旨

昆虫の脱皮・変態は、脱皮ホルモンと幼若ホルモン (juvenile hormone, JH) によって厳密な制御を受けている。このうち脱皮ホルモンが脱皮を誘導する作用を有するのに対し、JH は現状維持作用を有し、脱皮の性質を決定する。すなわち、血中 JH 濃度が高い若齢幼虫期には脱皮ホルモンによって現状維持の脱皮 (幼虫→幼虫) が引き起こされるが、幼虫期の終わりに一定の体重に到達し血中 JH 濃度が低下すると、脱皮ホルモンにより変態脱皮 (幼虫→蛹、蛹→成虫) が誘導される。

昆虫類は外骨格により体が成り立っており、クチクラと呼ばれる丈夫な表皮によって体が包まれて保護されている。このクチクラは強固であるが伸縮性に乏しいため、大きく成長してゆくためには古い表皮を脱ぎ捨て、より表面積の広い新しい表皮に包まれる必要がある。このように古い表皮を脱ぎ捨てて新しい表皮へに置き換わる現象が、いわゆる脱皮である。脱皮直後の昆虫の表皮は色が薄く柔らかいが、時間の経過と共に着色し、かつ硬くなる。これは、脱皮後の表皮クチクラにおいてタンニング (硬化と色素沈着) が進行するためであり、クチクラの成分であるキチンとクチクラタンパク質との間で架橋が形成され、メラニン合成経路により合成されたメラニン類が色素として沈着する。種々の昆虫においてクチクラタンパク質およびメラニン合成経路の酵素をコードする遺伝子が同定されてきたが、それらの転写がホルモンにより制御される機構についてはほとんど調べられていない。昆虫の表皮クチクラは、殺虫剤などの化学物質や病原微生物に対するバリアとして機能する重要な存在であることから、表皮クチクラ形成機構に関する基礎研究は、害虫防除および植物保護という応用面において大きく貢献すると期待される。

一般に昆虫の蛹期には、血中 JH 濃度が極めて低い状態で成虫の形態形成が進行する。この時期に JH 様活性化合物 (JH ミミック) を投与すると、成虫への変態が抑制され、成虫への脱皮が不完全な状態のまま死に至る。この性質を利用して、JH ミミックは昆虫の発育を標的とする殺虫剤として利用されてきた。当研究室の先行研究で、コクヌストモドキ *Tribolium castaneum* の蛹への脱皮時に JH ミミックを投与すると、成虫への変態が抑制されて死に至るが、口器や脚など一部の組織においては成虫クチクラが通常より早く形成されるという興味深い現象が見出された。そこで本研究では、成虫クチクラの形成のホルモンによる制御機構について、より詳細な知見を得ることを目的とした。

本論文の第 2 章では、コクヌストモドキシの成虫クチクラの形成がホルモンによって制御されるメカニズムの解明を試みた。コクヌストモドキシの蛹への脱皮直後に、天然型の JH および種々の JH ミミックを投与すると、口器や脚における成虫クチクラの色素沈着が早まることが再確認された。JH ミミック投与後の蛹における遺伝子発現プロファイルを定量 RT-PCR で調べたところ、成虫クチクラタンパク質遺伝子の発現抑制、メラニン合成経路酵素遺伝子の発現誘導、および脱皮ホルモンの初期応答遺伝子の 1 つで

ある核内受容体 *E75* の発現抑制がみられた。*RNAi* 法により *E75* のノックダウンを実施することによっても、同様の表現型と遺伝子発現変化がみられたことから、シグナル伝達に *E75* が関わることが示された。これらの結果から、コクヌストモドキの成虫クチクラ形成について以下のような仮説が立てられた：

- ① 通常の蛹では血中 *JH* 濃度が極めて低く、脱皮ホルモンによる *E75* の転写が続いている。*E75* は、下流のクチクラタンパク質およびメラニン合成経路酵素が適切な時期に発現するように制御している。
- ② *JH* ミミック投与を受けた蛹では *E75* の発現が抑制される。*E75* の発現制御を受けていたメラニン合成経路酵素の発現時期が早まり、口器や脚のクチクラ色素沈着が早く生じる。一方で *E75* の発現制御を受けていたクチクラタンパク質の発現は *JH* ミミックによって抑制され、十分なクチクラタンパク質が合成されないため、脱皮不完全となる。

このように本研究では、成虫クチクラの形成に関わる遺伝子の発現制御に *E75* が関与することを示すと同時に、*JH* ミミックが致死効果をもたらすメカニズムに関して詳細な知見を得ることができた。

第3章ではネバダオオシロアリ *Zootermopsis nevadensis* を対象として、クチクラの形成に関わる因子の発現解析および機能解析を行うことにした。この昆虫種を対象として選んだ理由は、申請者である Ms. Sapin が自国の所属機関（フィリピン大学ロスバニョス校）における業務で、農業害虫に加えてシロアリなどの衛生害虫も対象としてきたためである。ネバダオオシロアリについてはゲノム解析が実施されており、発育に関わる主要因子の cDNA 塩基配列もデータベースに数多く登録されている。一般に *E75* には、異なるプロモーターの利用と選択的スプライシングによって生じる複数のアイソフォームが存在し、キイロショウジョウバエの突然変異体を用いた研究において各アイソフォームが異なった機能を有することが示されている。本研究ではネバダオオシロアリの *E75* について、発育に伴う発現変動を定量 RT-PCR により調査し、アイソフォーム間で発現パターンが異なることを明らかにした。今年度は COVID-19 の影響で研究活動に大きな制約が生じ、残念ながらこれ以上研究を進めることができなかった。しかし今後は *RNAi* 法による機能解析を実施することによって、このシロアリにおける個々の *E75* アイソフォームの機能を解明し、さらにはその下流の遺伝子発現についても調べることで、クチクラ形成の制御機構が解明されると期待される。

このように本研究は、応用昆虫学および植物保護学の分野において高度の学術的価値を有し、当該分野に関する学術研究に大きく貢献した。したがって学位審査委員会は、本論文が博士（農学）の学位を授与するに十分な価値を有するものと認め、博士論文として合格と判定した。