

(続紙 1)

京都大学	博士 (理 学)	氏名	董 笠
論文題目	ホソヘリカメムシにおける <i>Krüppel homolog 1</i> 遺伝子の発現と機能に関する研究		
(論文内容の要旨)			
<p>幼若ホルモン(JH)は昆虫の発育と変態を司るホルモンの一種であり、主な機能は幼虫の変態抑制と成虫の生殖促進である。<i>Krüppel homolog 1</i> (<i>Kr-h1</i>) 遺伝子はC₂H₂ジンクフィンガータイプ転写因子をコードしており、いくつかの昆虫でJHの早期下流遺伝子としてJH受容体の下流で働くことが知られている。本研究の対象であるホソヘリカメムシ<i>Riptortus pedestris</i>は明瞭な光周性を示し、メス成虫は長日条件で卵巣が発達するが、短日条件で卵巣は発達せず生殖休眠に入る。本種の卵巣発達にはJHに誘導される。本研究では、幼虫の変態抑制と成虫の生殖促進の両方の観点から、ホソヘリカメムシにおける<i>Kr-h1</i>遺伝子の発現と機能を検討した。</p> <p>第1章では、まずメス成虫における<i>Kr-h1</i>の発現パターンを調べた。成虫を短日条件から長日条件に移すと、日の経過と共に<i>Kr-h1</i>の発現量が上昇した。一方、短日条件では<i>Kr-h1</i>の発現量は低く一定であった。メス成虫にJH類縁物質を塗布すると、短日条件でもほとんどの個体が卵巣を発達させ、<i>Kr-h1</i>の発現量が上昇した。以上より、<i>Kr-h1</i>の発現はJHに誘導されると考えられる。また、卵巣発達との時間経過の比較により、JHは卵巣が発達し始める数日前に分泌されていると考えられた。昆虫の光周性には、概日時計が関与しており、ホソヘリカメムシにおいても卵巣発達を司る光周性に時計遺伝子が関与していることが報告されている。そこで、時計遺伝子<i>Clock</i> (<i>Clk</i>) と<i>cryptochrome-m</i> (<i>cry-m</i>) が卵巣発達と<i>Kr-h1</i>発現量に及ぼす影響を、これらの遺伝子の二本鎖RNAを注射するRNA干渉により発現抑制を行って調べた。<i>Clk</i>の発現を抑制すると卵巣発達が長日条件で抑制され、<i>Kr-h1</i>の発現量が低下した。一方、<i>cry-m</i>の発現を抑制すると短日条件で卵巣が発達し、<i>Kr-h1</i>の発現量が上昇した。したがって、<i>Kr-h1</i>の発現は光周性の結果としてもたらされるJH分泌によって誘導されることが示された。</p> <p>第2章では、まずメス成虫に<i>Kr-h1</i>の二本鎖RNAを注射し、長日条件で<i>Kr-h1</i>発現量と卵巣発達を調べた。<i>Kr-h1</i>発現量は頭部では変化しなかったが、腹部では著しく低下していた。そして、卵巣発達率は統計的に有意な差はないものの、コントロールに比べ低下した。したがって、ホソヘリカメムシの卵巣発達に<i>Kr-h1</i>が必要と結論できなかったが、何らかの役割を果たしている可能性はある。次に、<i>Kr-h1</i>がJHのもう一つの</p>			

機能である幼虫形態の維持に関与しているかどうかを調べるため、4齢幼虫に*Kr-h1*の発現抑制を試み、その後の発育を調べた。その結果、*Kr-h1*の二本鎖RNAを注射した幼虫では、*Kr-h1*発現量は低下しており、5齢脱皮後、約85%の個体において、翅芽の形が正常な5齢幼虫と異なっていた。この翅芽に異常が見られた幼虫は、以後脱皮しなかった。また、これらの幼虫では単眼、結合板および交尾器の存在や、腹部背面が黄色みがかっているという成虫の形態的特徴が見られた。これらの結果から、ホソヘリカメムシの*Kr-h1*は幼虫形態の維持に必要と考えられる。

以上の研究により、ホソヘリカメムシの*Kr-h1*発現は成虫期に光周性の結果としてもたらされるJH分泌に誘導されており、JHによる幼虫形態の維持に関与していることが明らかになった。

(論文審査の結果の要旨)

幼若ホルモン(JH)は、セスキテルペンという珍しい化学構造の昆虫ホルモンで、幼虫期には幼虫形質を維持して変態を抑制するはたらきを持ち、成虫期には卵巣を発達させるなど生殖機能の促進にはたらいっている。ペプチドやステロイドなど広く動物界に存在するホルモンとは異なり、その分子レベルの作用機構は長らく不明であった。近年になってJH受容体が特定され、受容体に結合したJHが作用を発揮する際に、*Krüppel homolog 1 (Kr-h1)*という転写因子が介在することがいくつかの昆虫において報告された。しかし、この*Kr-h1*が関係するJHの作用機構のモデルが昆虫一般に適用されるには至っていない。本研究は、卵巣の発達に明瞭な光周性を示すホソヘリカメムシにおいて、*Kr-h1*の光周期による発現調節と、その幼虫期、成虫期における機能を検討したものである。

第1章では、申請者は、まずメス成虫における*Kr-h1*の発現が光周期によって支配されており、卵巣の発達する長日条件に移されると発現量が上昇することを示した。次にJH類縁物質を塗布することで、*Kr-h1*の発現量の上昇と卵巣の発達がもたらされることを示した。さらに、2種類の時計遺伝子*Clock (Clk)*と*cryptochrome-m (cry-m)*の二本鎖RNAを注射するRNA干渉によって、これらの遺伝子の発現抑制を行い、*Clk*を抑制すると卵巣発達と*Kr-h1*の発現が抑制され、*cry-m*を抑制すると卵巣発達と*Kr-h1*の発現が促進されることを示した。この結果から、*Clk*と*cry-m*を構成要素とする光周時計が長日と判定した場合に、JHが分泌されることで*Kr-h1*が誘導され、それにより卵巣が発達すると結論された。

第2章で申請者は、メス成虫と4齢幼虫に*Kr-h1*の二本鎖RNAを注射することによってその発現抑制を行い、成虫と幼虫における*Kr-h1*の機能を推定することを試みた。*Kr-h1*の発現抑制により成虫の卵巣発達率は若干低下したものの、顕著な影響は見られず、他の昆虫で知られているように、成虫期にJHが卵巣発達をもたらす際に関与するとは結論できなかった。一方、幼虫では、*Kr-h1*の発現抑制により明瞭な成虫の形態的特徴が誘導されたことから、*Kr-h1*はJHが幼虫形質を維持する際に、その作用を仲介することが明らかになった。形態観察においては、全体として成虫らしいというようなあいまいな見方ではなく、体の各部分を詳細に比較し、成虫の形態的な特徴が表れていることを明示したという点で、これまでの*Kr-h1*の研究にはない厳密さを示した。

本研究によって、ホソヘリカメムシの*Kr-h1*の発現調節と機能が明らかになり、光周性の研究の進んでいるこの種において、光受容から日長の判定、卵巣発達に至る経路にさらなる知見が追加された。さらに、本研究は他の昆虫の実験結果に基づいて提

案されたJH作用機構のモデルが適用できる場合と必ずしも適用できない場合があることを示した。昆虫ホルモンの作用機構は普遍性が強調されてきたが、申請者の研究は多様性に注意を払う比較内分泌学的なアプローチの重要性を再認識させた。その成果は昆虫の生理学・内分泌学の今後の発展に大きく寄与すると考えられる。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。また、令和3年1月8日に論文内容とそれに関連した口頭試問をおこなった結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： _____ 年 _____ 月 _____ 日以降