

氏 名	た の うえ しん た ろ う 田 ノ 上 信 太 郎
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1223 号
学位授与の日付	平 成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	農 学 研 究 科 応 用 生 物 科 学 専 攻
学位論文題目	カイコガ受容体型グアニル酸シクラーゼの性フェロモン受容と羽化リズム発現における生理機能

論文調査委員 (主 査) 教 授 西 岡 孝 明 教 授 奥 野 哲 郎 教 授 泉 井 桂

論 文 内 容 の 要 旨

cGMP を介した細胞内シグナル伝達が動物の光受容に関与していることはよく知られている。また、昆虫において cGMP は性フェロモン受容をはじめ脱皮、羽化、利尿、神経発生、採餌行動などにも関与していると考えられているが、cGMP の生成機構や機能をはじめ、組織における分布、細胞内シグナル伝達の機構などについてはほとんど研究されていない。本論文はカイコガを用いて性フェロモン受容と羽化概日リズムの細胞内シグナル伝達機構を cGMP 合成酵素であるグアニル酸シクラーゼと cGMP 依存性蛋白質リン酸化酵素を同定し、その性質を調べることによって解明しようとしたものである。本論文の成果の主要な点を以下に示す。

1. カイコガオスに性フェロモン (ボンビコール) を暴露すると性フェロモンの濃度に依存して触角の cGMP 濃度が上昇したが、メスの触角では変化がなかった。また、この曝露によって、触角に存在する複数の蛋白質のセリン残基やトレオニン残基がリン酸化を受けていることを確認した。同様の蛋白質リン酸化は触角を cGMP 溶液に浸すことによっても再現することができた。
2. カイコガオス触角の cDNA ライブラリーからグアニル酸シクラーゼ遺伝子 *BmGC-1* をクローニングした。遺伝子 DNA 塩基配列から推定したアミノ酸配列はラット由来の心房性利尿ペプチドホルモン受容体と高い配列の類似性があり、*BmGC-1* 蛋白質は膜外ドメイン、1 回膜貫通部位、キナーゼ様ドメイン、グアニル酸シクラーゼドメインから構成される受容体型蛋白質であると推定した。
3. カイコガ触角の cDNA ライブラリーから cGMP 依存性蛋白質リン酸化酵素遺伝子 *BmPKG-1a*, *1b* をクローニングした。遺伝子 DNA 塩基配列から推定したアミノ酸配列はウシ由来の蛋白質リン酸化酵素 PKG-1b と高い配列の類似性を示し、*BmPKG* 蛋白質は 2 量体形成に関わるロイシンジッパー領域、cGMP 結合ドメイン、蛋白質リン酸化ドメインから構成されていると推定した。Sf9 培養細胞で発現させた *BmPKG-1a* 蛋白質の蛋白質リン酸化活性は cGMP 濃度に依存した。1, 2 の結果と併せて *BmPKG-1* は性フェロモン受容の cGMP を介したシグナル伝達に関与していると推定した。
4. 免疫組織化学染色法を用いて *BmGC-1* 蛋白質の組織分布を調べたところ、オスの神経細胞体と脳触角葉の糸球体に局在することを見出した。また、*BmGC-1* 遺伝子は触角以外に複数の組織で発現していた。
5. 飛翔筋において *BmGC-1* 遺伝子は明期の中期から暗期の中期に発現した。*BmGC-1* 蛋白質は遺伝子の発現から 4 時間ほど遅れて (夜明けに) 発現し、それと同期して cGMP 濃度や羽化率も上昇した。これらの発現や濃度変化は概日リズムとしての特徴を示したことから、*BmGC-1* 蛋白質は羽化概日リズムのシグナル伝達に介在していると推定した。

以上の成果は、カイコガ触角において性フェロモンを受容すると受容体型グアニル酸シクラーゼが cGMP を誘導し、cGMP は蛋白質リン酸化酵素を活性化し、さらにある種の蛋白質がリン酸化されるというシグナル伝達ネットワークが存在していることや、受容体型グアニル酸シクラーゼが末梢組織における概日リズムのシグナル伝達にも介在していることをはじめて示したことになる。

論文審査の結果の要旨

動物は嗅覚や味覚、視覚によって外界からの情報を受容し、これらの情報をホルモンや神経伝達によって組織間に伝達している。cGMP はこのような受容、伝達にかかわる細胞内 2 次シグナル伝達物質の 1 つであり、哺乳動物の光受容はそのよく知られた例である。また、cGMP は昆虫の性フェロモン受容をはじめ脱皮、羽化、利尿、神経発生、採餌行動などに関与していると推定されているが、cGMP の生成機構や機能をはじめ、組織における分布、細胞内シグナル伝達の機構などについてはほとんど研究されていない。本論文はカイコガを用いて性フェロモン受容と羽化概日リズムにおける細胞内シグナル伝達機構を、cGMP 合成酵素であるグアニル酸シクラーゼと cGMP 依存性蛋白質リン酸化酵素の活性変動や発現から解明しようとしたものである。本論文の評価すべき点は次のとおりである。

1. カイコガ触角に性フェロモン（ボンビコール）を暴露すると性フェロモンの濃度に依存して、オス蛾の触角特異的に cGMP 濃度が上昇することや、cGMP による蛋白質のリン酸化が生ずることを明らかにした。
2. カイコガオス触角の cDNA ライブラリーから、ラット由来の心房性利尿ペプチドホルモン受容体と高い配列の類似性を示すグアニル酸シクラーゼ遺伝子 *BmGC-1* をクローニングした。*BmGC-1* 蛋白質は膜外ドメイン、1 回膜貫通部位、キナーゼ様ドメイン、グアニル酸シクラーゼドメインから構成される受容体型蛋白質であると推定した。
3. カイコガ触角の cDNA ライブラリーからウシ由来の蛋白質リン酸化酵素 PKG-Ib と配列の類似性を示す cGMP 依存性蛋白質リン酸化酵素遺伝子 *BmPKG-1a, 1b* をクローニングした。*BmPKG* 蛋白質は 2 量体形成に関わるロイシンジッパー領域、cGMP 結合ドメイン、蛋白質リン酸化ドメインから構成されていると推定した。Sf9 培養細胞で発現させた *BmPKG-1a* 蛋白質は cGMP 濃度に依存した蛋白質リン酸化活性を示すことを明らかにした。
4. *BmGC-1* 蛋白質は触角の神経細胞体と脳触角葉の糸球体に局在することや、*BmGC-1* 遺伝子は触角以外にも複数の組織で発現していることを明らかにした。
5. 飛翔筋において *BmGC-1* 遺伝子は明期中期から暗期中期に発現することと、それに対して、*BmGC-1* 蛋白質は遺伝子の発現から 4 時間ほど遅れて（夜明けに）発現し、これと同期して cGMP 濃度や羽化率も上昇することを明らかにした。さらに、これらの発現や濃度変化は概日リズムとしての特徴があることを明らかにした。これらの結果から、*BmGC-1* 蛋白質は末梢組織における概日リズムのシグナル伝達に介在していると推定している。

以上のように昆虫において cGMP 依存型細胞内シグナル伝達系が存在し、フェロモン受容や羽化概日リズムにおいて関与をしていることをはじめて明らかにしたものであり、昆虫生理学、昆虫生態学、応用昆虫学、動物行動学、細胞生化学などに寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成14年1月17日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。