

学 位 論 文 題 名

Studies on the mechanism of larval color pattern formation
in the armyworm, *Pseudaletia separate*

(アワヨトウ幼虫における体表縞模様形成機構の研究)

学位論文内容の要旨

昆虫幼虫は、それぞれの種で特有の体色や模様を持っている。一般的に、黒い縞模様の形成に関与する主要成分は、ドーパミンから合成されるドーパミンメラニンと考えられている。しかし、そのメラニン合成の分子メカニズム、さらには縞模様の発育に伴う形態形成メカニズムに関しては、未だ解明されていない。そこで、私はドーパからドーパミンへの反応を触媒し、メラニン形成におけるキーエンザイムと考えられているチロシン水酸化酵素(TH)とドーパ脱炭酸酵素(DDC)に着目し、縞模様形成のメカニズムについて解析を行った。

本研究で用いるアワヨトウ幼虫の体表には、頭部から尾部に沿って黒色縦縞模様が、左右三対存在する。この縞模様は、亜終齢から終齢への脱皮時に、黒色が増強し、さらにその線幅も顕著に拡大する。この黒色の主成分であるドーパミンメラニンの基質であるドーパとドーパミンの終齢幼虫表皮における含有量を比較したところ、ドーパの含有量に部位依存的な違いはなかった。しかし、ドーパミンに関しては、腹側よりも縞模様のある背側において高濃度に存在することがわかった。またTH、DDC両活性とも腹側よりも背側においてはるかに高い値を示した。さらに抗TH、DDC抗体を用いた免疫組織染色、そしてTH、DDC mRNAプローブを用いた *in situ* hybridization を行ったところ、両者とも黒色縞模様直下の真皮細胞において強いシグナルを検出した。これは黒色縞模様直下の真皮細胞がTH、DDC mRNAを局所的に発現し、その結果としてTH、DDCタンパクの局在がおこったものだと考えられる。さらに、黒色縞模様形成に対するTHとDDCの関与を生体内で実証するため、TH 阻害剤、DDC 阻害剤を脱皮24時間前の亜終齢幼虫に注射した。両阻害剤とも顕著な効果を示したが、特に、TH阻害剤注射個体の終齢脱皮後の幼虫では、黒色縞模様がほとんど無くなり、アルビノ個体のような様相を呈した。つまり、阻害剤影響下での低TH、DDC活性により、ドーパミン産生量が激減し、黒色縞模様形成が阻害されたものと考えられる。また、透過型電子顕微鏡による真皮細胞の観察によって、白色縞模様直下の真皮細胞に数多くの尿酸小胞が存在していることを発見した。一方、黒色縞模様直下の真皮細胞には尿酸小胞は全く存在していなかった。したがって、白色縞模様直下の真皮細胞の尿酸小胞によって皮膚が白く見えることが、明らかになった。

このようなメラニン形成に関与するTH、DDC遺伝子の部位特異的発現機構を解明するため、両遺伝子をクローニングし、そのプロモーター領域の解析を行った。その結果、TH、

DDC遺伝子共に、細胞内カルシウムイオン濃度の変化によって調節を受ける転写調節因子が結合し得るシスエレメントを複数持っていることが判明した。すなわち、真皮細胞の細胞質内カルシウムイオン濃度によって両遺伝子の転写調節がなされているものと予想された。そこで細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させるカルシウムイオノフォアを用いて *in vitro* 皮膚培養実験を行ったところ、TH、DDC mRNAともに発現が上昇した。先行研究によって昆虫サイトカイン Growth-blocking peptide (GBP) が神経細胞において、カルシウムイオン濃度を上昇させることが報告されていたことから、GBP を用いた *in vitro* / *in vivo* 条件下における皮膚TH、DDC遺伝子の発現誘導を解析した。両条件下とも、GBP によって皮膚TH、DDC mRNA発現は上昇したが、*in vitro* 条件下において培地中のカルシウムイオンをキレート剤によって取り除くと、GBP による発現誘導は観察されなかった。これは、TH、DDC遺伝子発現上昇には、細胞外からのカルシウムイオンの流入が重要であることを示唆している。さらに、GBP によるカルシウムイオン流入の部位を特定するため、カルシウムイオンの蛍光指示薬を用いた皮膚の観察を行った。黒色縞模様域では蛍光強度の増強が観察されるが、白色縞模様域では観察されなかったことから、GBP による細胞内カルシウムイオン濃度の上昇は黒色縞模様域でのみ起きていると考えられる。白色縞模様直下の真皮細胞で細胞内カルシウムイオン上昇が起きない理由については、この細胞内に多量に存在する尿酸によって説明がついた。すなわち、*in vitro* での実験によって、尿酸はカルシウムイオンと速やかに結合し溶液中の遊離のカルシウムイオン濃度を極度に低下させることを証明した。したがって皮膚におけるTH、DDC遺伝子の発現調節は、GBP による細胞内カルシウムイオン濃度上昇の誘導と、尿酸によるその阻害によって調節されている可能性が証明された。

さらに GBP によるTH、DDC遺伝子の発現調節を詳細に解明していく為、培養細胞 MaBr4 を用いた解析を行った。MaBr4 では皮膚と同じく、様々な遺伝子の転写調節に関与する細胞外シグナル調節キナーゼ (extracellular signal-regulated kinase : ERK) が、GBP によって活性化されていた。しかし、この ERK 経路の活性化は細胞外カルシウムイオンの流入を必要とせず、GBP によるTH、DDC遺伝子発現上昇にも ERK 経路の活性化は必要がなかった。これはショウジョウバエ胚で報告されている、創傷治癒機構に関係する ERK 活性化を介したDDC遺伝子発現上昇と全く異なる注目すべき現象であることを明確に証明したことになる。

以上の結果は、TH、DDCがアワヨトウ幼虫の黒色縞模様形成においてキーエンザイムとして働いていることを証明し、また、これまで一様と考えられていた昆虫幼虫の真皮細胞が性質の異なる細胞から成っており、その細胞の不均一性が、昆虫サイトカイン GBP による複雑なTH、DDC遺伝子発現調節を介して種々の体表縞模様を形成し得ることを明確に示した。さらに、本研究は、GBP による真皮細胞のTH、DDC遺伝子発現上昇は、細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させることによって誘導され、ERK-MAPK 経路を介さない新規な経路によるものであることを明確に証明した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 木 村 正 人

副 査 教 授 戸 田 正 憲

副 査 助 教 授 三 浦 徹

副 査 教 授 早 川 洋 一 (佐賀大学大学院農学

研究科)

学 位 論 文 題 名

Studies on the mechanism of larval color pattern formation in the armyworm, *Pseudaletia separate*

(アワヨトウ幼虫における体表縞模様形成機構の研究)

現存する昆虫幼虫体表に見られる種特有の様々な体色や模様が、彼らの生存戦略上不可欠なものであるという点については異論の余地はない。多様な色彩や模様の中で進化的に最も普遍的なものが黒色模様であり、その主要成分はドーパミンから合成されるドーパミンメラニンと考えられている。しかし、そのメラニン合成の分子機構や模様形成のメカニズムに関しては、多くの未解明な点が残されている。こうしたメラニン由来の模様形成の分子機構を解明するため、申請者はメラニン合成反応のキーエンザイムと考えられているチロシン水酸化酵素 (TH) とドーパ脱炭酸酵素 (DDC) に着目し、一連の解析を行った。

本研究で用いるアワヨトウ幼虫の体表には、頭部から尾部に沿って黒色縦縞模様が三対存在する。この縞模様は、亜終齢から終齢への脱皮時に、黒色が増強し、さらに、その線幅も拡大する。申請者は、まず、この黒色の主成分であるドーパミンメラニンの合成基質であるドーパとドーパミンの終齢幼虫表皮における含有量を測定し、ドーパミンが腹側よりも(縞模様が存在する)背側において高濃度に存在することを明らかにした。さらに、TH、DDC両活性とも腹側よりも背側においてはるかに高いことを証明した。次に、免疫組織染色、そして、*in situ* hybridizationによって、TH、DDCタンパク質、mRNAとも黒色縞模様直下の真皮細胞に局在することを明確に証明した。さらに、TH阻害剤、DDC阻害剤を脱皮24時間前の亜終齢幼虫に注射し、黒色縞模様形成におけるTHとDDCの関与を生体内で実証した。また、透過型電子顕微鏡による真皮細胞の観察によって、白色縞模様直下の真皮細胞に数多くの尿酸小胞が存在することを発見し、これにより、皮膚が白く見える原因となっていることを明らかにした。

次に、申請者は、メラニン形成に関与するTH、DDC遺伝子の部位特異的発現機構を解明するため、両遺伝子をクローニングし、そのプロモーター領域の解析を行った。その結果、TH、DDC遺伝子ともに、細胞内カルシウムイオン濃度の変化によって調節を受ける転写調節因子が結合し得るシスエレメントを複数持っていることを明らかにした。これにより、真皮細胞の細胞質内カルシウムイオン濃度によって両遺伝子の転写調節がなされているものと予想した。この仮説を証明すべく、細胞内カルシウムイオ

ン濃度を上昇させるカルシウムイオノフォアを用いて in vitro 皮膚培養実験を行い、TH、DDC mRNAともに発現が上昇することを証明した。先行研究によって昆虫サイトカイン Growth-blocking peptide (GBP) が神経細胞において、カルシウムイオン濃度を上昇させることが明らかになっていたので、GBP を用いた in vitro / in vivo 条件下における皮膚TH、DDC遺伝子の発現誘導を解析した。両条件下とも、GBPによって皮膚TH、DDC mRNA発現は上昇したが、in vitro 条件下において培地中のカルシウムイオンをキレート剤によって除去すると、GBPによる発現誘導は観察されないことを確認した。さらに、GBPによるカルシウムイオン流入の部位を特定するため、カルシウムイオンの蛍光指示薬を用いた皮膚の形態観察を行い、黒色縞模様域では蛍光強度の増強が観察されるが、白色縞模様域では観察されないことを確かめ、GBPによる細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が黒色縞模様直下の真皮細胞でのみ起きていることを証明した。白色縞模様直下の真皮細胞で細胞内カルシウムイオン上昇が起きない理由については、この細胞内に多量に存在する尿酸によって説明した。すなわち、in vitro での実験によって、尿酸はカルシウムイオンと速やかに結合し溶液中の遊離のカルシウムイオン濃度を極度に低下させることを証明した。したがってこれらの実験結果によって、皮膚におけるTH、DDC遺伝子の発現調節は、GBPによる細胞内カルシウムイオン濃度上昇の誘導と、尿酸によるその阻害によって調節されている可能性が明確に示唆されたことになる。

さらに、申請者は、GBPによるTH、DDC遺伝子の発現調節を詳細に解明するため、培養細胞 MaBr4 を用いた解析を行った。MaBr4 では皮膚と同じく、様々な遺伝子の転写調節に関与する細胞外シグナル調節キナーゼ (extracellular signal-regulated kinase : ERK) が、GBPによって活性化されることを明らかにした。また、このERK経路の活性化は細胞外カルシウムイオンの流入を必要とせず、GBPによるTH、DDC遺伝子発現上昇にもERK経路の活性化は必要がないことを実証した。これはショウジョウバエ胚で報告されている創傷治癒機構に関係するERK活性化を介したDDC遺伝子発現上昇と全く異なる注目すべき現象であることを明確に証明したことになる。

以上の結果は、TH、DDCがアワヨトウ幼虫の黒色縞模様形成においてキーエンザイムとして働いていることを証明し、また、これまで一様と考えられていた昆虫幼虫の真皮細胞が性質の異なる細胞から成っており、その細胞の不均一性が、昆虫サイトカインGBPによる複雑なTH、DDC遺伝子発現調節を介して種々の体表縞模様を形成し得ることを明確に示した。さらに、本研究は、GBPによる真皮細胞のTH、DDC遺伝子発現上昇は、細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させることによって誘導され、ERK-MAPK経路を介さない新規な経路によるものであることを明確に証明した。審査員一同は、これらの成果は、昆虫の生存戦略上不可欠な幼虫体表縞模様形成の分子機構を解明した重要な研究であることを認めるとともに、申請者は研究者として誠実かつ熱心であること、また、申請者の大学院課程における研鑽や取得単位なども併せて考慮し、申請者が博士(地球環境科学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。