

1-7 総合文化研究室研究活動報告

- 学 科 総合文化研究室
- 学科専任教員 飯野熙彦（教授）
澤田博司（教授）
外川 徹（助教）

【研究の概要および結果】

研究課題：生物における環境適応に関する研究

目的および概要：総合文化研究室所属の3名の理系（生命科学系）教員は、生物における環境適応の分子機構の解明を目的として、ほ乳類や昆虫類などを材料に用いてさまざまな実験手法を駆使して、多面的に研究を進めている。以下に当該年度での研究1～3についての概要および結果を報告する。

研究1. ヒトSPR欠損患者のプテリジン代謝について

目的および概要：従来知られていたBH4合成系とは異なる新たなヒトでの合成系をすでに明らかにした。新たな合成系では、ヒトAldo-keto還元酵素であるAKR1C3とAKR1B1が関与してBH4合成が行われる。ヒトのBH4欠損症やSPR欠損症と脳内での両酵素によるBH4合成能の関連は、この遺伝病の基礎的理解および治療に対して、重要な情報をもたらすことが期待されるため、両酵素の抗体を用いたヒトでの免疫組織科学的検討による発現部位解析を行い、病態との関連を解明する。

結果：マウスとヒトの肝臓および脳の Homogenate に対して、抗 AKR1B1, 1C3 抗体を用いた Western blot 解析と Immunohistochemical 解析を行った。マウスの場合肝臓ではAKR1C3の強い発現が見られたが脳では見られなかった。一方AKR1B1の発現は脳で顕著であったが肝臓では見られなかった。ヒトの場合、肝臓ではAKR1B1, 1C3の両者の発現が見られたが、脳では、AKR1B1の発現しか見られなかった。

考察・反省：BH4合成に必須のセピアプテリン還元酵素（SPR）の代替えとして働くAKR1B1, 1C3は、両者が共同でBH4を合成することがすでに我々によって見いだされている。SPR欠損マウスでは、肝臓中にフェニルアラニンの代謝異常が見られるがヒトのSPR欠損症患者では肝臓中のフェニルアラニンの代謝異常は見られない。この理由は不明であったが、本研究により、AKR1B1,1C3の発現の違いに寄ることが明らかにされ、ヒトSPR欠損患者に対する臨床的見地に多くの進展が見られた。

研究2. 昆虫の胚子活性化時における新規一酸化窒素合成酵素スプライシングバリエーションの役割

目的および概要：本研究は昆虫の休眠・非休眠機構解明の一環であり、本年度は昆虫（カイコガ）の胚子発生に関与している一酸化窒素合成酵素（NOS）の新規スプライシングバリエーション（NovNOS-V）の役割の解明を目的として研究を遂行した。具体的には、NOSとNovNOS-V遺伝子の発現と構造の解析、胚子発生時のNOSの活性測定を行った。

結果：NovNOS-VとNOSのプロープを用いたゲノムサザンプロット解析を用いた予備実験により、NovNOS-VとNOSをコードする遺伝子（ゲノムDNA）は共通で、しかもゲノム（この場合、全染色体を意味する）中でシングルコピーであることが明らかとなった。そこで、NOSとNovNOS-VのcDNAの塩基配列を基にしてカイコのゲノムデータベースを使って解析を行った。その結果、NOS遺伝子は21のエキソンと20のイントロンに分かれていた（この知見はカイコでは初である）。また、NovNOS-Vは、その中の1つのエキソンが選択的スプライシングにより除かれて合成されることが判明した。一方、NovNOS-VとNOS遺伝子発現解析をRT-PCRにより行った結果、NovNOS-V遺伝子は休眠卵を人為的に発生を進める処理（浸酸）を施した直後に特異的に発現されることが明らかとなった。更に、

NOSの酵素活性を測定したところ、浸酸処理後に酵素活性が高くなる事が確認できた。

考察・反省：NOS遺伝子の構造は、21のエキソンと20のイントロンに分かれていたが、このようにエキソンが多くのイントロンにより分断されていることは、ショウジョウバエやヒトのNOSでの報告と一致していたので、このような構造はNOS遺伝子に特有なものであることが考えられる。また、NovNOS-V遺伝子の浸酸処理直後の特異的な発現は、NovNOS-Vがカイコの初期発生において細胞をG2期でストップ（休眠）させないように何らかの重要な役割を担っている可能性が考察される。NovNOS-VとNOSの発現解析において、更に多くの発生ステージにおいて解析を行う必要があると思われる。また、NOSの活性測定においては、NOSが可溶性画分か不溶性画分のどちらに存在するかを検討して詳細にNOS活性の検討を行わなければならないことが、今後の課題であると思われる。

研究3. JH誘導性bHLH転写因子群の機能解析

目的および概要：昆虫の変態は体の構造や生理機能が短期間に劇的に変化する現象であり、このメカニズムの解明は生物学的に非常に重要である。変態現象は主に脱皮ホルモン（エクダイソン）と幼若ホルモン（JH）により制御されている。エクダイソンのシグナル伝達における分子基盤については多くの知見が蓄積しつつあるが、それに対しJHの分子作用機構はほとんど解明されていない。本研究は、このJHシグナル伝達経路の全貌解明を目標とした研究の一部である。

JHシグナル伝達におけるメディエーター分子を同定する目的で、カイコ培養細胞においてJHにより誘導される遺伝子群を、DNAマイクロアレイにより網羅的に探索した。その結果、3種のbHLHファミリー転写因子 (*BmH*, *BmCwo*, *BmMnt*) を同定した。本年度は、これらの転写因子のJHによる誘導における基礎的データの取得を行った。

結果：カイコ培養細胞*aff3*をJHで処理した後の、*BmH*, *BmCwo*, *BmMnt*の発現の経時変化をreal-time RT-PCRで解析した。*BmH*はJH処理後1時間後には最大の発現量に達し、その後減少した。それに対し、*BmCwo*と*BmMnt*の発現はJH処理後4時間で最大になった。また、これらの転写因子のJHによる誘導における用量-反応関係を解析したところ、3つの転写因子とも非常に低濃度のJHで誘導され、ED₅₀は10⁻¹⁰ Mほどであることが明らかになった。

次に、これらの転写因子の組織特異性を知るために、4齢幼虫2日目の組織（脳、アラタ体、前胸腺、だ液腺、脂肪体、中腸、マルピーギ管、表皮）における発現をDNAマイクロアレイを用いて解析した。*BmH*の発現は非常に低レベルであったが、解析した組織では脂肪体で比較的高い発現が見られた。*BmCwo*と*BmMnt*は解析した全ての組織で発現が認められたが、その中でも*BmCwo*は前胸腺で、*BmMnt*は中腸とマルピーギ管で特に強い発現が見られた。

考察・反省：*BmH*と*BmCwo/BmMnt*ではJHにより誘導されるタイミングが異なった。おそらく*BmH*はJHの一次応答遺伝子、*BmCwo*と*BmMnt*は二次応答遺伝子として機能しているのではないかと推測される。また、これらの遺伝子のJHに対するED₅₀は10⁻¹⁰ Mであった。これはピーク時のJHの体液濃度である34nMより十分低い。そのため、これらの遺伝子は生理濃度のJHで十分発現誘導され得ると言える。組織分布を解析したところ、3つの遺伝子はそれぞれに異なる特徴を示した。このことから、これらの遺伝子がJHシグナルの異なる局面で機能している可能性が考えられる。次に、各組織でのJHに対する応答を明確にするために、各組織における経時変化を詳細に解析する必要がある。

〈研究発表・研究成果物〉

BH₄合成に関与するAldo-keto還元酵素の発現解析。

JPC・JNCP第5回合同研究発表会 2009年8月29日（東京）

カイコの初期発生における一酸化窒素合成酵素（NOS）について。

日本動物学会第80回大会2009年9月19日(静岡)

カイコ胚子発生初期におけるグリコーゲンシンターゼキナーゼ3 β の機能解析。

日本動物学会第80回大会2009年9月19日(静岡)

Why so many cuticular protein genes? Insight from expression analysis of CPR genes in *Anopheles*

The 57th Annual Meeting of the Entomological Society of America, Program Symposia; Insect Molecular Physiology: Basic Science to Applications. 2009年12月15日(アメリカ合衆国インディアナポリス)

ゲノミクスから見えてきたクチクラタンパク質の遺伝子構成と発現パターン

昆虫ワークショップ09福. 2009年10月29日(福津)

Expression analysis of the aldo-keto reductases involved in the novel biosynthetic pathway of tetrahydrobiopterin in human and mouse tissues.

The Journal of Biochemistry 146, 51-60, 2009.