京都工芸繊維大学

氏　　名	ふしき　だいすけ **伏木　大輔**
学位(専攻分野)	博　士（学術）
学位記番号	博甲第　553　号
学位授与の日付	平成 22 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	工芸科学研究科　生命物質科学専攻
学位論文題目	**昆虫におけるギャップ結合関連蛋白質 innexin の研究**
審査委員	(主査)教授　遠藤 泰久 教授　山岡亮平 教授　森　肇

論文内容の要旨

申請論文は次の５章、第１章序論、第２章光学顕微鏡を用いた免疫組織化学的検討、第３章電子顕微鏡を用いた免疫組織化学的検討、第４章 innexin のアミノ酸配列のバイオインフォマティックス的検討、第５章総合考察から構成されている。

第１章では本論文の背景と目的が述べられている。ヒドラから人間に至る全ての多細胞動物において、隣接するほとんどの細胞が gap 結合によって直接的な連絡を行っている。脊椎動物の gap 結合は connexin ファミリーによって構成される。connexin は 4 回膜貫通構造でドーナツ状に 6 量体を形成し、隣接する細胞間に架橋することでイオンや小さな分子を交換し、代謝の恒常性や筋組織の同調的な収縮、シナプスのインパルスの伝達等に関与しているとされている。無脊椎動物には connexin の遺伝子や蛋白質は発見されておらず、電気的シナプスの欠損した変異体の研究からから innexin と呼ばれる蛋白質ファミリーが gap 結合を構成しているとされている。innexin をアフリカツメガエル卵母細胞系で強制発現させると電気電導性を有する gap 結合が形成されることや、線虫やキイロショウジョウバエにおいて innexin の変異体や過剰発現・異所発現は致命的な形態形成不全を引き起こすことが明らかになっている。しかしながら innexin の細胞生物学的な研究は in situ hybridization が主で蛋白質レベルでの局在の検討はいまだ十分ではない。そこで本研究では innexin2 のアミノ酸配列から二種類の特異抗体を作製し innexin の局在を組織レベル、細胞レベル、微細構造レベルで明らかにすることを試みた。また、innexin のアミノ酸配列の系統解析を行い、その機能分化と進化の過程について検討した。

第２章では、カイコガの innexin2 のアミノ酸配列から二種類の特異抗体を作成し、ウエスタンブロットと免疫組織化学的手法を用いてワモンゴキブリにおける innexin の組織レベル・細胞レベルでの局在について述べている。ウエスタンブロットでは異なる二箇所の抗原認識部位を認識する抗体で同一の結果が得られる事を示し、抗体の特異性を確認すると共に、innexin2 が中脚や前胃、胸部飛翔筋等の筋組織に主に局在することを明らかにした。免疫組織化学では innexin2 の免疫陽性反応が筋繊維の細胞膜上に斑点状に局在することを明らかにした。これらの結果から innexin2 が筋組織の細胞間連絡や同期的収縮に関与している可能性を示した

第３章では、作製した innexin2 の特異抗体と免疫電顕的手法を用いてワモンゴキブリ組織とヒトスジシマカ培養細胞における微細構造レベルでの innexin2 の局在について述べている。通常の

透過型電子顕微鏡の他に超高圧電子顕微鏡を用いて観察を行い、撮影像の立体再構築も試みた結果、innexin が細胞間結合部に存在する他、自由表面にも存在することも明らかにした。innexin が環状構造で凝集する超高圧電子顕微鏡画像は、innexin2 が connexin と同様に環状に集合してチャネルを構成することを強く示唆した。

第４章では、innexin、connexin の他、脊椎動物において innexin のホモログとして発見された pannexin、他の細胞間結合に関わる四回膜貫通型蛋白質を含めてアミノ酸配列の系統樹解析を行い、これらの関係についてバイオインフォーマティック的に検討を進めた。その結果、pannexin は脊椎動物が分化する以前から存在した可能性や、gap 結合関連蛋白質の中でも innexin と pannexn が特にアミノ酸配列の類似性を持ち共通の祖先を持っていることが強く示唆された。一方 connexin と innexin の間には他の四回膜貫通型蛋白質と比較して特にアミノ酸配列に類似性は見られないことが明らかとなった。

第５章では、以上の細胞生物学的、バイオインフォマティックス的研究から innexin2 が筋組織の細胞膜に局在すること、無脊椎動物の innexin が脊椎動物の pannexin と強い関連性を有すること、細胞膜の自由表面にも存在し環状の構造を有する可能性を示すことについて総合的に考察を加えた。既に pannexin は gap 結合だけではなく細胞の内外を繋ぐヘミチャネルとして機能することが脊椎動物の血球の研究で示されており、innexin も同様の環状構造を構成しヘミチャネルとしても機能し神経の補佐的な役割を果たしている可能性が考えられた。また、innexin を新たな殺虫剤の標的として応用する可能性について論じた。

論文審査の結果の要旨

gap 結合はヒドラから人間に至る全ての多細胞動物に存在し、細胞間の直接的な連絡を行っている重要な構造のひとつである。脊椎動物の gap 結合を構成する connexin ファミリーについては細胞生物学的にも生理学的にもかなり詳細な研究が進められていて、代謝の恒常性や筋組織の同調的な収縮、シナプスのインパルスの伝達等に関与していることが知られている。一方、無脊椎動物には connexin の遺伝子や蛋白質は発見されておらず、電気的シナプスの欠損したショウジョウバエ変異体の研究から innexin と命名された蛋白質ファミリーが構成要素の候補とされているが細胞生物学的な検討は十分ではなかった。本論文で申請者はカイコガ innexin2 のアミノ酸配列から二種類の特異抗体を作製し、innexin の局在をゴキブリの組織細胞レベル、蚊の培養細胞レベル、超高圧電子顕微鏡の微細構造レベルで明らかにすることができた。また innexin のアミノ酸配列について他の四回膜貫通型蛋白質と系統解析を行い、それらの機能分化と進化の過程についても考察を加えている。

申請者はウエスタンブロットにより組織レベルでの innexin2 の発現を調べた結果、ゴキブリ中脚や前胃、胸部飛翔筋等の筋組織に主に局在することを明らかにしている。免疫組織化学により筋繊維の細胞膜上に斑点状に局在することを明らかにし、innexin2 が筋組織の細胞間連絡や同期的収縮に関与している可能性を示唆した。申請者はさらに免疫電顕的手法を用いてワモンゴキブリ組織とヒトスジシマカ培養細胞における微細構造レベルでの innexin2 の局在について検討し、innexin2 が細胞間結合部に局在する他、自由表面にも環状構造の集団として存在することを明らかにした。これは innexin2 が connexin と同様に環状に集合しチャネルを構成すること、細胞間

結合だけでなくヘミチャネルとして機能する可能性を強く示唆している。

申請者はバイオインフォーマティック的に innexin、connexin の他、脊椎動物において innexin のホモログとして最近発見された pannexin、その他の細胞間結合に関わる四回膜貫通型蛋白質を含めてアミノ酸配列の系統樹解析を行った結果、pannexin は脊椎動物が分化する以前から存在した可能性や、gap 結合関連蛋白質の中でも innexin と pannexn が特にアミノ酸配列の類似性を持ち共通の祖先を持っていることを強く示唆した。一方 connexin と innexin の間には他の四回膜貫通型蛋白質と比較して特にアミノ酸配列に類似性が見られないことを明らかにしている。

これらの研究は、innexin の細胞生物学的な理解を深めるだけでなく、新たな殺虫剤開発の標的としての可能性を示すものであり、その学問的意義は高く評価できる。本論文の内容は、申請者を筆頭著者とする下記の２編の論文を基礎としており、査読制のある学術誌に掲載予定である。

1. **Fushiki D**, Yoshimura R, Endo Y. Immunocytochemical study of gap junction-related protein, innexin 2, in *Periplaneta americana* (Blattodea: Blattidae). *Applied Entomology and Zoology*. Vol. 45, No.2 (2010) 掲載予定.
2. **Fushiki D**, Hamada Y, Yoshimura R, Endo Y. Phylogenetic and bioinformatic analysis of gap junction-related proteins, innexins, pannexins and connexins. *Biomedical research*, vol.31, No.2 (2010) 掲載予定.