

論文審査の要旨及び担当者

論文題名

ショウジョウバエの中腸ホルモン Dh31 抑制による附属腺の早期老化のメカニズム

論文審査の要旨

①論文の概要 ヒトを初めとした多くの動物種には種特異的な寿命が存在し、また各個体の体内では、様々な組織器官の老化進行がある程度同調化するものと予想される。ショウジョウバエのペプチド性脳腸ホルモンの一つ DH31 は、そのような恒常性維持に関与する因子の一つで、中腸内分泌細胞におけるその遺伝子機能をロックダウンすると、消化管の老化は遅延するが附属腺（前立腺）の老化は加速する。一方、老化を制御するホルモンとしては、これまでインスリンの関与が動物種を問わず広く知られてきた。培養細胞でインスリンシグナル強度の変化を検出するには、インスリン受容体（InR）の自己リン酸化を特異抗体で検出する方法が最も一般的だったが、生体組織における InR 発現は普遍的かつ低レベルなので、その検出は必ずしも容易なものではなかった。そのため従来は、InR シグナル経路上の因子 PI3K や Akt の活性を検出することにより InR シグナルの強度とみなしていたが、それぞれ低感度または InR 経路特異的応答に限らないため、必ずしも正しい結論を得られなかった。様々な傍証から、上記の DH31 による老化制御はその直接作用によらず InR を介する可能性が疑われたため、InR 活性の確実な可視化の必要性に迫られた。InR は、その活性化に伴い細胞膜上から細胞内にエンドサイトーシスによって取り込まれ、多数の膜小胞に乗って細胞内に広がることが知られていたため、その過程を観察できる方法を、次のように計画した。CRISPR/Cas9 ゲノム編集法により、蛍光タンパク質(mCherry または EYFP)のコード領域を内在性 InR 遺伝子の終止コドン直前にロックインし、そのホモ接合体を作出した。哺乳動物培養細胞を用いた過去の研究では、内在性 InR も発現する状況下で蛍光タンパク質標識 InR を強制発現させた例があるが、内在性 InR 全分子を標識するケースは今回が初めてである。ヘテロ接合細胞の体細胞組換えによって同時に生じる変異型ホモ接合細胞と野生型ホモ接合細胞を比較する Twin-spot 解析では、両者が変わらない健常状態にあることが示され、蛍光タンパク質標識 InR が正常な InR と同等に機能することが示された。一方、InR が細胞膜上にある時は、細胞間結合の一種セプテートジャンクションより基底側の細胞の周囲に、その局在が限られるという予想外の発見ももたらされた。また、InR シグナルが活性化する細胞成長に応じて、InR 蛍光が細胞膜上から細胞内に移行する期待通りの局在性変化が観察されたため、この蛍光標識 InR 対立遺伝子を DH31 突然変異体と組み合わせた観察が行われた。その結果、DH31 突然変異体の附属腺では、細胞内膜小胞に移行する InR の数が野生型より有意に上昇したため、附属腺における老化加速に InR が関与することが確実となった。

以上の内容は、以下の4つの観点から独創性が高いものとみなされる。

- 1) 内在性 InR を蛍光タンパク質標識しその機能が正常 InR と変わらないことを示したこと。
- 2) 附属腺の InR 膜局在がセプテートジャンクションより基底側の細胞周囲に限られること。
- 3) 従来観察困難であった内在性 InR の信頼度の高い観察が多くの組織で可能となったこと。
- 4) DH31 による各器官の老化バランス制御は、InR を介することを証明したこと。

②審査の方法

まず、自然科学研究科生命科学専攻で設けられている申合せ事項に基づき、学位申請者の筆頭著者としての原著論文が、英文国際誌へ受理されている必要があるとする条件が満たされた（令和5年12月19日）。これに基づき、従来より錬られていた邦文による博士論文が教務課へ提出された（令和5年12月22日）。また主査1名と副査2名が自然科学研究科委員

会で承認された後、公聴会が実施され（令和 6 年 1 月 16 日）、質疑応答を含む口頭発表（計 60 分）を経て、以下のように評価された。

③内容の評価

本研究は、学位申請者の学部 4 年生時より現在までの 6 年に渡って進められた研究であり、従来から所属研究室で取り組まれていた中腸ホルモン DH31 による老化制御について、より精密なメカニズムを明らかにしたものである。特に、従来その関与がないと予測されていたインスリンシグナルによる影響が、実際には重要な貢献をしていることを、従来法では困難であった高感度のリサイクリングエンドソーム検出ができる遺伝系統（CRISPR/Cas9 ゲノム編集法による InR::mCherry または InR::EYFP ノックイン系統）を作出することによって、明確に証明した。研究を進めるには多くの障壁があり、途中段階で得られた様々に解釈可能な実験結果を、その都度適切な対照実験と慎重に比較することにより、地道に真実を探っていた徹底した研究姿勢は高く評価できる。また、本研究により確立された上記の遺伝系統（InR::mCherry および InR::EYFP）は、内在性のインスリン受容体ならびにその活性化に応答するリサイクリングエンドソームを初めて確実に可視化したツールとして、今後の様々なインスリンシグナル研究において、広く用いられる可能性が展望される。

④結論

本論文は、着想、実験方法、研究期間、論理展開、考察、結論、今後の展望のあらゆる観点から、博士の学位論文として十分な内容であり、博士の学位を授与するにふさわしいとみなされる。

論文審査主査	安達 卓	教授
	嶋田 透	教授
	柳 茂	教授