

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	喜多知
審査委員	<p>主査 尾添嘉久 (印)</p> <p>副査 池田泉 (印)</p> <p>副査 東政明 (印)</p> <p>副査 小林淳 (印)</p> <p>副査 河野強 (印)</p>
題目	Localization and functional characterization of glutamate-gated chloride channels in the housefly <i>Musca domestica</i> (イエバエにおけるグルタミン酸作動性クロルイオンチャネルの局在及び機能解析)
<p style="text-align: center;">審査結果の要旨 (2,000字以内)</p> <p>γ-グルタミン酸 (以下グルタミン酸) は代表的な神経伝達物質であり、5量体膜タンパク質であるリガンド作動性イオンチャネルに結合することによりその役割を達成する。本論文の主題であるグルタミン酸作動性クロルイオンチャネル (GluCl) は、無脊椎動物に特異的に発現する抑制性神経伝達物質受容体である。電気生理学的手法を用いた薬理学的解析によって、GluCl の駆虫薬や殺虫剤の作用点としての一定の知見も得られている。無脊椎動物の神経系にはγ-アミノ酪酸 (GABA) 作動性クロルイオンチャネル (GABAC1) も発現しているため、類似した構造や機能を有する2種のチャネルの生理学的な存在意義や薬理学的な違いに興味を持たれている。本研究では、両チャネルの生理学的役割の違いを解明するための基盤として、ハエ目昆虫であるイエバエ (<i>Musca domestica</i> L.) におけるチャネル遺伝子の発現レベルとその局在を調べた。さらにその過程で、遺伝子の選択的スプライシングによりバリエーション転写産物が生成することを見出したため、それらの発現部位や機能の違いについても研究を進めた。</p> <p>イエバエの GluCl サブユニット (MdGluCl) をコードする遺伝子 <i>MdGluCl</i> および GABAC1 サブユニット (MdRd1) をコードする遺伝子 <i>MdRd1</i> の発現レベルをリアルタイム PCR により調べた。その結果、(1) 両遺伝子はイエバエの成虫頭部において最も発現レベルが高いこと、(2) 成虫の脚における発現レベルは、<i>MdGluCl</i> が <i>MdRd1</i> より高いことなどが明らかになった。次いで、それぞれのサブユニットに対する特異的抗体を作製し、虫体内における両チャネルの局在を精査した。その結果、抗 MdGluCl 抗体による強い染色が、成虫頭部の視覚葉、特にラミナ、メダラ、網膜基底膜、色素細胞に見られた。これに対して、抗 MdRd1 抗体の反応は、成虫頭部の視覚葉のメダラ、小葉、小葉板などに見られただけでなく、アンテナ葉、キノコ体などの脳の広い領域に反応が見られた。さらに、抗 MdGluCl 抗体の反応は胸部神経節周辺の運動ニューロンの細胞体や脚に見られ、抗 MdRd1 抗体反応は胸部神経節の運動神経網において見られるという違いが認められた。</p> <p>本論文ではさらに研究を進め、(1) <i>MdGluCl</i> のエキソン3で選択的スプライシングが生じ、MdGluCl サブユニットに3種類のバリエーション (A、B、C) が存在すること、(2) <i>MdGluCl</i> の4箇所 RNA 編集部位が存在することを記載している。そこで、スプライズバリエーションに焦点を当て、イエバエにおけるバリエーション遺伝子の発現レベルおよびチャネルの薬理学的特性を調べた。その結果、<i>MdGluClA</i> と <i>B</i></p>	

は成虫頭部に主に発現しているのに対し、*MdGluC1C*は頭部だけでなく、脚や腹部などの末梢組織では優先的に発現していることが明らかになった。それぞれのバリエントチャンネルのリガンド応答を調べた結果、バリエントを単独発現および共発現させた場合、アゴニスト・グルタミン酸や活性薬・イベルメクチン  $B_{1a}$  に対する感受性に差は見られなかった。しかし、殺虫剤フィプロニル (Fip) やピクロトキシニン (PTX) に対する感受性は A と B ホモチャンネルの方が C ホモチャンネルより高いことが明らかにされた。これらの結果から、脳などの中枢神経系に分布している A および B バリエントによって構築されるチャンネルは Fip と PTX に対する感受性が高く、末梢系に分布している C バリエントチャンネルはこれらの薬剤に対する感受性が低いことが推察された。GluC1 の薬理学研究は、GABAC1 と比べて遅れており、GluC1 特異的薬剤は知られていない。本研究では、既存の GABA レセプター拮抗薬が GluC1 に対しても作用するかについても追究したが、調べた拮抗薬は MdGluC1 とほとんど交差しないことが分かった。

本研究では、(1) イエバエ体内で同じ抑制性神経伝達を行う MdGluC1 と MdGABAC1 の発現部位に違いがあること、(2) MdGluC1 には 3 種類のスプライスバリエントが存在し、その発現レベルや発現部位が異なっていることが明らかになった。これらのことから、昆虫における抑制性神経伝達は 2 種のチャンネルとそのバリエントによって微調整されていることが推察された。また、MdGluC1 バリエントチャンネル間での大きな薬理的な違いは見られなかったが、拮抗薬に対する感受性に違いが認められた。本論文に記載されている研究結果は、昆虫分子生物学および分子薬理学の発展に寄与する極めて重要な知見であり、本論文は博士 (農学) の学位論文に値するものであると認められる。