	ありまつ　ゆうじ
氏　　名	**有　松　祐　治**
学位(専攻分野)	博　士（学術）
学位記番号	博甲第　４５２　号
学位授与の日付	平成 19 年 3 月 26 日
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 3 項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科　機能科学専攻
学位論文題目	**カイコ二本鎖 RNA 分解酵素の分子特性と遺伝子発現に関する研究**
	(主査)
審査委員	教授　古澤壽治
	教授　杉村順夫
	教授　山口政光

論文内容の要旨

カイコの消化液には細胞質多角体病ウィルスのゲノムである二本鎖 RNA（CPV-dsRNA）や合成二本鎖 RNA である Poly(I)・Poly(C)を分解する二本鎖 RNA 分解酵素（Bm-dsRNase）が存在することが明らかにされている。申請論文は 3 章から構成され、第 1 章では Bm-dsRNase の精製と酵素学的性状、第 2 章では Bm-dsRNase の遺伝子の解析と発現、第 3 章では Bm-dsRNase の消化管中腸での生合成とプロセッシングについて述べられている。これらの詳細は以下の通りである。

すなわち、第１章ではカイコの消化液から Bm-dsRNase をイオン交換（CM-Sepharose)、ゲルろ過（Superdex 75)、アフィニティー（Poly(I)・Poly(C)-agarose）の各種クロマトグラフィーを用いることによって精製した。その結果、Bm-dsRNase は 41kDa の単量体タンパク質で、その比活性は消化液の比活性の 227 倍であった。精製タンパク質を用いて Bm-dsRNase の酵素学的性質を解析した結果、活性は pH7 から pH 11 まで上昇するとともに、Mg^{2+}存在下において活性化された。Bm-dsRNase は天然二本鎖 RNA に対する親和性は DNA や一本鎖 RNA に比べて CPV-dsRNA に対して最も高い親和性を示し、次いでウシ胸腺 DNA、カイコ中腸 RNA、Poly(I)・Poly(C)の順であった。それぞれの核酸基質に対する親和性が異なっていることは、核酸の塩基配列の組成や、核酸の構造によって其質に対する親和性が変化する可能性が考えられた。

第２章においては Bm-dsRNase の遺伝子を単離した。Bm-dsRNase 遺伝子にコードされているタンパク質はデータベースに登録されているタンパク質の性質と比較した。さらに遺伝子より推定されるアミノ酸配列から Bm-dsRNase のプロセッシングについて検討した。

既知の二本鎖 RNA 分解酵素には *Escherichia coli* RNaseIII と *Serratia marcescens* dsRNase があり、これらのアミノ酸配列を Bm-dsRNase と比較すると、*Serratia* dsRNase の活性部位と高い相同性を示す配列が存在することが明らかになった。すなわち、これらの dsRNase が共通した核酸認識および核酸分解機構を持つことが推察された。しかし、Bm-dsRNase は *Serratia* dsRNase と比較すると塩基性アミノ酸である Arg 残基が高い割合で含まれており、高い等電点（pI 10）をもっていることから、アルカリ条件下では構造的に安定であると推察した。

Bm-dsRNase 遺伝子は 1350 の塩基対より成り、その ORF には 449 個のアミノ酸がコードされていた。Bm-dsRNase はアミノ酸配列の持つ特徴的な性質や、精製タンパク質の N 末端アミノ酸配列の結果と合わせて考察すると Signal peptide、N-terminal propeptide、Mature region の 3 つの

領域に分類することができた。このことはBm-dsRNaseが前駆体タンパク質として合成され、翻訳後プロセッシングにより、Signal peptide と N-ternimal peptide が内生的 Serine protease によって特異的に切断され、活性型 dsRNase へと変換されると推察した。
第３章では、5 齢期幼虫期における Bm-dsRNase の mRNA、およびタンパク質合成発現パターンを解析した。その結果、Bm-dsRNase はカイコ幼虫の中腸組織の中部および後部において局所的に合成されていることが明らかになった。すなわち、Bm-dsRNase の遺伝子発現は mRNA の経時的変動から推定して幼虫期の 5 齢 1 日目から開始され、3 日目にピークに達し、吐糸期開始時期には終了していた。一方、中腸組織中部における Bm-dsRNase タンパク質は 45 kDa と 41 kDa の 2 種類が検出された。このことから Bm-dsRNase は前駆体タンパク質（45 kDa）として合成され、翻訳後プロセッシングにより活性型の Bm-dsRNase（41 kDa）へと変換すると推測した。このことの確証を得るために Bm-dsRNase の N-terminal propeptide と Mature region の間の Arg-Ser サイトを標的に分解するトリプシンをプロセッシングプロテアーゼとして用いて、部分的に精製した 45 kDa タンパク質を処理した。その結果、dsRNase 活性の上昇が認められ、さらに 45 kDa タンパク質が 41 kDa タンパク質へと変換される過程を *in vitro* で証明した。これらの結果から Bm-dsRNase は中腸組織で特異的に合成された後、中腸組織内で翻訳後プロセッシングを受け、活性化したのち消化液へと分泌され、消化管内腔で核酸を分解することを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

二本鎖 RNA 分解酵素(dsRNase)は細胞内での rRNA のプロセッシング、mRNA の成熟化および RNA 干渉作用における *si*RMA(small interfering RNA)の生成に関与し、生理学的に機能を発揮する。また、カイコにおいて RNA 分解酵素に関する生化学的研究は数多く行われてきたが、性質や合成について混沌としていた。

しかし、本論文ではカイコの消化液から dsRNase を精製することによって、分子量ならびに基質特異性を明らかにし、これまで報告されてきたカイコの核酸分解酵素に関する研究に整理をつけた。特に中腸で増殖する細胞質多角体病ウイルスのゲノム二本鎖 RNA に対し高い親和性を示すことから新規な酵素であることを明らかにしている。このことは、その他の生物種から見出された dsRNase とは異なることを塩基配列、アミノ酸配列における相同性、類似性を本酵素のそれらと比較することによって明確にした。さらに、dsRNase のアミノ酸配列から三つの領域（Signal peptide, Propeptide および Mature protein の領域）からなる蛋白質として合成されることを推定し、dsRNase 前駆体を用い *in vitro* で検証した。その結果、中腸細胞では 45kDa の蛋白質が合成され、トリプシン様セリンプロテアーゼにより Agr-Ser 結合部位が切断されることによって 41kDa 蛋白質に変換され、dsRNase が活性上昇する。さらに生体内中腸において 5 齢 2 日に mRNA がピーク達した後、1 日遅れて活性が現れ、この dsRNase は中腸被膜微絨毛から消化管内腔に分泌されることを免疫組織化学的に証明した。

以上の研究は、これまで困難であった dsRNase の精製法を完成させ、遺伝子解析、アミノ酸解析から dsRNase が新規な酵素であること、しかも中腸細胞ではプロセッシングを受け、細胞外酵素として分泌されることを立証した。学位論文は過去の学術上の問題点を整理し、これを踏まえて昆虫生理学、昆虫生化学の潮流に立脚したものとしてまとめられている。さらに、これらの結

果は、J. Insect Biotechnology&Sericology に掲載されるとともに昆虫生化学分野で最もレベルの高い国際雑誌に、いずれも筆頭著者として公表し、昆虫生化学の細胞外消化酵素の生成機構に関する学術発展に大きな貢献をした。

I. 学位論文の公表

1) Arimatsu, Y., Furuno, T., Sugimura, Y., Togoh, M., Ishihara, R., Tokizane, M., Kotani, E., Hayashi, Y. and Furusawa, T. (2007): Purification and properties of double-stranded RNA-degrading nuclease, dsRNase, from the digestive juice of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Biotechnology and Sericology 76(1) 57-62.

2) Arimatsu, Y., Kotani, E., Sugimura, Y. and Furusawa, T. (2007): Molecular characterization of a cDNA encoding extracellular dsRNase and its expression in the sikworm, *Bombyx mori.* Insect Biochemistry and Molecular Biology 37, 176-183.

II.参考論文

1) Hang, J., Arimatsu,Y., Sadakane, K., Endo,Y. and Furusawa, T.(2005): Gene expression and localization of trehalase during embryonic development of the silkworm, *Bombyx mori*. Int. J. Wild Silkmoth& Silk 10, 17-26