

氏名 檜尾 宗志朗

本論文は、組織修復に寄与する体内環境制御機構の一端を、ショウジョウバエ幼虫を用いて明らかにしたものである。体の損傷や欠損は、創傷部位からの体液の流出や感染、組織の機能不全などを引き起こし、個体死を誘引する一因となりうる。組織修復は個体が損傷した際に発動される生体防御システムの一つであり、個体の生存において不可欠な恒常性維持機構と言える。傷害部位における様々な分子メカニズムが解明されてきたが、近年の研究によって局所的な応答のみならず全身性応答の重要性も示されるようになった。しかしながら、組織自律的な分子機構の解析と比較して、組織非自律的な因子や体内環境については不明な点が多く残されている。学位申請者は、修復時に組織間を繋ぐ媒介として体液に着目した。代謝産物は菌や植物において、細胞間コミュニケーションを担う媒介因子としても用いられており、体液中に含まれる代謝産物は体内環境の理解において重要な指標になると期待される。だが、組織修復を全身性の代謝という切り口から捉えた研究はほとんどなく、その全貌は未だ明らかになっていない。申請者は、ショウジョウバエにおける組織修復の系、および代謝産物の解析と遺伝学とを組み合わせることによって、全身性の代謝変動が組織修復に寄与する分子機構の解明に着手した。

組織傷害と独立した非傷害組織特異的な機能解析が、組織非自律的な分子メカニズムの解明において求められる。申請者は本学修士課程において温度感受性ジフテリア毒素 A ドメイン(DtA<sup>ts</sup>)とショウジョウバエ翅成虫原基を用い、温度変化による一過的な組織傷害の系を確立した。幼虫に存在する翅成虫原基は再性能を持つ事が古くから知られ、組織修復の研究に用いられてきた上皮組織である。翅成虫原基は変態を経て成虫における翅となり、修復の度合いを原基や翅の形態を指標に簡便に検討できる利点が存在する。QF/QUAS システムによって遺伝学的傷害を翅成虫原基において誘導し、Gal4/UAS システムによる非傷害組織特異的な遺伝学的解析を組み合わせることで、遠隔的な組織修復に寄与する組織と遺伝子の機能解析を可能とした。

さらに申請者は、修復初期の個体から体液を回収し、CE-TOF-MS によるメタボロミクス解析によって組織修復に寄与する体液性因子の同定を試みた。その結果 192 の代謝産物が検出されたが特にアミノ酸に着目したところ、必須アミノ酸の一種であるトリプトファン(Trp)の量が傷害を受けた個体の体液中で高く、1.7 倍の差を示していることが判明した。哺乳類において Trp の多くは肝臓でキヌレニン(Kyn)に代謝され、キヌレン酸(KynA)やヒドロキシキヌレニン(3-HK)を産生する。Trp-Kyn 代謝経路の産物は神経や免疫の制御をはじめとして、様々な生命現象に寄与

することが報告されているが、その組織修復に対する影響は不明であった。ショウジョウバエにおいて、Trp-Kyn 代謝の律速酵素である *vermilion* の遺伝子発現は、脂肪体と呼ばれる肝臓と白色脂肪組織と同様の役割を担っている組織において高く検出されている。*vermilion* の発現量を脂肪体内で調べたところ、傷害後 6 時間において傷害を受けた個体で高いレベルを示した。これらの結果より、体液中の Trp レベルと脂肪体 Trp-Kyn 代謝の状態が翅成虫原基における修復初期の段階で変化していることを明らかにした。

続いて申請者は、脂肪体における *vermilion* の発現量差の生理的な意義を検証するために、脂肪体特異的なノックダウンを組織傷害と並行して行った。その結果、*vermilion* のノックダウンは翅の正常発生に影響を与えなかった一方、傷害を受けた個体では *vermilion* のノックダウンによって翅の異常な表現型が見られた。加えて翅成虫原基を観察したところ、傷害直後においては顕著な差は見られなかったものの、30 時間後には脂肪体特異的な *vermilion* のノックダウンによって翅成虫原基のモルフォゲン Wingless (Wg) の再構築の不全が誘引された。さらに死細胞や細胞骨格について観察を行った結果、活性型実行カスパーゼ Dcp-1 によって標識される死細胞が基底側から排除されることなく、翅成虫原基内に蓄積することが判明した。さらに修復不全が見られる翅成虫原基において、F-actin で示される上皮組織の湾曲などの形態異常が見られた。以上より、脂肪体特異的な Trp-Kyn 代謝の制御が遠隔的に組織のリモデリングまたは死細胞の排除を介して、翅成虫原基の修復に寄与することが明らかになった。

最後に申請者は、組織修復における責任因子の同定のために、LC-MS/MS を用いて体液中の Trp-Kyn 代謝産物を測定した。結果、傷害後 6 時間で体液中の KynA の量が高くなっていることが判明した。KynA は Trp-Kyn 代謝の最終産物の一つであり、哺乳類では神経活動の抑制や免疫細胞の機能に影響を与える因子として知られている。KynA の修復への寄与を検証するために、脂肪体特異的な KynA の産生抑制を産生酵素である CG6950 遺伝子のノックダウンによって行ったところ、*vermilion* のノックダウン同様に Wg の再構築に異常が見られた。これにより、KynA による修復制御が組織非自律的になされていることが見出された。

以上、本論文で申請者は翅成虫原基の修復において脂肪体から産生された KynA が関与することを示した。KynA が制御する具体的な分子メカニズムは未だ同定されていないが、今後受容体を中心とした研究によって解明されることが期待される。以上の成果は、体内環境が組織修復に寄与する分子機構の一端を解き明かしたものであり、修復に寄与する普遍的な全身性制御機構の解明のみならず、創薬への応用につながる基盤となるものであると考えられる。

よって本論文は博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。