

論文内容の要旨

申請者氏名 秋月 岳

カイコは、その産業的重要性から、育種法及び効率的な飼育法の研究が古くからなされてきた。その反面、カイコにおける生理学的研究の現状は *in vivo* 系が主流であり、ゲノム情報や遺伝子情報を取得し、それを活用するために有効な手法である *in vitro* 系の研究は、現時点ではあまり進んでいない。特に、細胞あるいは分子レベルでの知見を得る上で不可欠ともいえる培養細胞系が限られていることが *in vitro* 系を用いた研究の進展を図るうえで大きな制約となっている。本研究は、現時点で利用可能なカイコのゲノム情報を効率よく活用するためのシステムの構築に必要な手法及び実験系を明らかにするために、ゲノムデータを活用した多型解析と、組織培養及び培養細胞を用いた新たな *in vitro* モデル系の確立を目指した研究を行うことにより、モデル昆虫としてのカイコを評価することを目的としている。

まずカイコのゲノム及び cDNA データを用い、現在のカイコの *in silico* 系研究の評価を行った。*fibl* 及び *p25* の 5' フランキング領域と 5' 末端側における多形解析を行うとともに、特定のハプロタイプが繭表現型に影響を及ぼすかどうかを明らかにするために、これらの遺伝子の連鎖解析を行った。その結果、異なるカイコの系統における *fibl* と *p25* のプロモータ領域ではかなりの塩基配列の変異が見られた一方で、シスエレメントや転写開始点、第一エクソンは良く保存されており、両遺伝子の不一致塩基は概ねシスエレメントの上流域に制限されていた。塩基配列の違いを解析した結果、これらの遺伝子のプロモータ領域にはそれぞれ 7 つのハプロタイプが存在することが明らかになった。さらにそのハプロタイプ中に存在する散在反復配列の特徴付けが、カイコゲノム・データベースを用いることによって可能であることを示し、カイコにおいて *in silico* 系の研究が有効に機能することも明らかになった。

一方、カイコの初代培養系及び培養細胞系を用いてカイコ卵抽出物及び薬剤による脂肪細胞誘導系の構築を行うことで、カイコの *in vitro* 系を用いた研究の評価を行った。カイコ胚初代細胞とカイコ培養細胞 BmN4 を培養し、FBS を用いた培養系との比較を行った結果、卵抽出物の添加により、カイコ胚初代細胞の遊走および増殖が強く促進されることが確認出来た。また、カイコ卵抽出物中には昆虫のステロイドホルモンであるエクダイソンと主要な卵黄タンパク質であるビテリンが高濃度存在すること、培養条件温度で長期間置くことにより、エクダイソン濃度及びビテリンタンパク質の性状が変化することなどが明らかになった。このことに注目し、カイコの脂肪細胞分化誘導モデルの作成が可能かどうかを検討するために、BmN4 細胞を哺乳類における脂肪細胞分化条件下で培養したところ、卵抽出物存在下での培養と同様に脂肪細胞様の形態を示した。哺乳類の脂肪細胞分化誘導マーカーである aP2(FABP4) のホモログ BmFABP1 がカイコにも存在し、BmN4 細胞の脂肪分化において遺伝子の発現上昇が見られることから、BmFABP1 の発現がカイコ細胞における脂肪細胞分化誘導マーカーとして利用できることも明らかとなった。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 秋月 岳

カイコは古くから家畜として飼育されている唯一の昆虫であり、その産業的重要性から育種法及び効率的な飼育法の研究がなされてきた。育種研究の過程で多数の系統及び変異体が得られ遺伝学的研究が進むと共に、飼育法の研究の過程で幼若ホルモンや脱皮ホルモンの発見などの生理学的研究が進んだことから、カイコは昆虫に関する遺伝学的研究及び生理学的研究のモデル生物として良く用いられる。加えて、近年のカイコゲノム研究の進展に伴い、過去に蓄積された遺伝学的及び生理学的研究による知見を塩基配列レベルに還元することが容易になり、分子生物学や細胞生物学レベルの研究の進展が期待されている。しかしながら、カイコにおける生理学的研究の現状は *in vivo* 系が主流であり、ゲノム情報や遺伝子情報を取得し、それを活用するために有効な手法である *in vitro* 系の研究は、研究人口が哺乳類などに比べると少ないこともあって、現時点ではあまり進んでいない。特に、細胞あるいは分子レベルでの知見を得る上で不可欠ともいえる培養細胞系が限られていることが *in vitro* 系を用いた研究の進展を図るうえで大きな制約となっている。

申請者は、カイコが今後のモデル生物として十分その役割を果たす上で、*in vitro* 系と *in silico* 系の連携が重要であると考えている。そこで、本研究では、それらを可能にするためのシステムの構築ならびに必要な手法及び実験系を明らかにするために、ゲノムデータを活用した多型解析ならびに組織培養及び培養細胞を用いた新たな *in vitro* モデル系の確立を目指した研究を行うことにより、モデル昆虫としてのカイコを評価することを目的とした。

まずカイコのゲノム及び cDNA データを用い、塩基配列多型とそれにかかわるゲノム中の反復配列を分析することによって、現在のカイコの *in silico* 系におけるデータを利用した研究の評価を行った。カイコ絹低分子量タンパク質遺伝子は、その遺伝子型が絹糸または繭などに見られる特徴的な表現型へ及ぼす影響について興味深いモデルを提供すると思われることから、*fib1* 及び *p25* の 5' フランキンク領域と 5' 末端側における多形解析を行った。その結果、これらの遺伝子のプロモータ領域にはそれぞれ 7 つのハプロタイプが存在すること、さらにそのハプロタイプ中に存在する散在反復配列の特徴付けが、カイコゲノム・データベースを用いることによって可能であることを示し、カイコにおいても *in silico* 系の研究が有効に機能することを明らかにした。さらにカイコの初代培養系及び培養細胞系を用いてカイコ卵抽出物及び薬剤による脂肪細胞誘導系の構築を行うことで、カイコの *in vitro* 系を用いた研究の可能性とその評価を行った。その結果、従来法では対象とならなかった初代細胞の培養系、および新しく脂肪細胞分化系をそれぞれ確立することに成功した。

本研究の結果、カイコを材料として、カイコゲノム・データベースを用いた *in silico* 系の研究が有効に機能することを示すとともに、カイコの初代培養法、分化誘導法の技術を開発した。同時に、それらの研究を通じて、カイコにおける将来の *in vitro* 実験系の方向性を示した。これらの研究成果は「カイコを材料とする研究の現状と将来の方向性」を理解する上で大きな手がかりを与えるものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。