九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

Identification and characterization of lepidopteran-specific genes involved in spermatogenesis using the silkworm, Bombyx mori.

柿野, 耕平

https://hdl.handle.net/2324/7182525

出版情報：Kyushu University, 2023, 博士（農学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (2)

KYUSHU UNIVERSITY

氏　　名　　：柿野　耕平

論文題名　：Identification and characterization of lepidopteran-specific genes involved in spermatogenesis using the silkworm, *Bombyx mori*.
（カイコ *Bombyx mori* を用いた精子形成に関与する鱗翅目特異的遺伝子の同定と機能解析）

区　　分　　：甲

論　文　内　容　の　要　旨

配偶子形成や受精機構は、種の維持にとって重要なプロセスである。これらに関与する遺伝子の異常は系統の崩壊を引き起こす可能性があり、重要な突然変異は自然淘汰により排除される傾向にある。結果として、配偶子形成と受精機構の基本的な構造や機能は、共通の祖先から派生した生物間で保存されがちである。しかし、特定の分類群や種においては、ユニークな精子形成機構が存在することも確認されている。例えば、鱗翅目昆虫（カイコ *Bombyx mori* を含む）では、核を持つ有核精子と核を持たない無核精子を生成する（精子の二型性）ことが知られている。特にカイコでは、受精には有核精子だけでなく無核精子も必要であることが確認されている。この精子の二型性は 1894 年に初めて報告されたが、その分子機構の多くは未だに解明されていない。

近年の次世代シーケンサー技術の発展により、分類群特異的遺伝子（Taxonomically Restricted Genes、TRGs）の存在が明らかになってきた。これらの TRGs の中には、特定の分類群の生物に重要な機能を持つ遺伝子も含まれているが、機能解析が難しく、未研究の遺伝子も多い。カイコにおいては、TRGs の配列情報が判明しているものの、その機能はほとんどが未知のままである。鱗翅目昆虫に特有な TRGs は、進化の観点から重要な役割を果たす可能性があるが、精子形成に関してはほとんど報告されていない。

本研究では、鱗翅目昆虫特有の精子形成メカニズムを明らかにするため、精巣におけるトランスクリプトームの包括的な特徴付けと、発見された TRGs の機能解析を行った。

最初に、カイコ精巣のトランスクリプトームを詳細に解析し、その特徴を明らかにした。その結果、精巣にはカイコ全遺伝子の 86.5%が発現しており、1705 の精巣特異的遺伝子が確認された。さらに、未分化の生殖細胞が集まる stem-region と分化細胞が集まる differentiated-region の間のトランスクリプトームを比較したところ、それぞれ特異的に発現する 4554 遺伝子と 3980 遺伝子が検出された。また、ショウジョウバエの精巣トランスクリプトームとの比較から、stem-region に特異的な 1,204 遺伝子と differentiated-region に特異的な 314 遺伝子がショウジョウバエでも同様に発現していることがわかった。

このトランスクリプトーム解析により、鱗翅目昆虫特有かつ機能未知の 47 の TRGs が精巣で特異的に発現していることが判明した。これらの中の一つ、*KWMTBOMO08400* は、M 期における中心体の数や配置の異常を引き起こすことが培養細胞でのノックダウン実験で確認されていた。この遺伝子のノックアウト系統では、雌雄ともに次世代の卵の孵化率が低下し、稔性に影響があることが明らかになった。有核精子束の観察から、ノックアウト雄では精核の整列が不規則であることが判明した。また、無核精子の異常の有無を調べるために、異常な無核精子を産生する SxlIn3 系統との交配実験を行ったところ、SxlIn3 の不稔性は改善され、*KWMTBOMO08400* ノックアウト系統が機能的に正常な無核精子を産生していることが確認された。これにより、*KWMTBOMO08400* が有核精子型の

精子形成に関与することが示唆された。

さらに、カイコ-バキュロウイルス発現系を用いて、ミスマッチ DNA やヘテロ二本鎖 DNA を切断する T7 Endonuclease I の生産を行った。ゲノム編集技術を用いたカイコの品種改良には、変異が導入された個体の正確な選抜が必要である。T7 Endonuclease I は通常、大腸菌で生産されるが、その過剰発現は宿主に毒性を持つため、生産が難しい。そこで、カイコ-バキュロウイルス発現系を用いた T7 Endonuclease I の簡便な生産方法を確立し、ゲノム編集カイコの変異検出に成功した。

本研究では、カイコの精子形成に関する基盤データとして、精巣のトランスクリプトームの特徴をプロファイリングし、鱗翅目昆虫特有の TRGs のうち精子形成に関与する *KWMTBOMO08400* 遺伝子を同定した。これらの成果は、鱗翅目昆虫に特有な精子形成の分子機構解明への新たな糸口を提供するものである。