

論文の内容の要旨

カイコの卵形成のトランスクリプトーム解析

生産・環境生物学専攻

平成 16 年度博士課程入学 船隈俊介

指導教員 東京大学教授 嶋田 透

昆虫の卵巣には、栄養細胞の有無や卵胞の構造によって区別される無栄養室型、多栄養室型、および端栄養室型の三つのタイプがある。カイコをはじめとする鱗翅目昆虫やショウジョウバエなどの双翅目昆虫の卵巣は多栄養室型 (panoistic type) であり、栄養細胞と卵母細胞が隣接して卵胞を形成する。カイコの卵巣に存在する雌性生殖細胞は、卵原細胞はからシストブラストという段階を経て 3 回の不完全な体細胞分裂を行い、シストサイトと呼ばれる状態になる。シストサイトは、互いに連結された 8 つの娘細胞から成る。この娘細胞の内の 1 つだけが卵母細胞へ分化し、残りの 7 つは栄養細胞となる。これら 8 個の細胞は、それらの周囲を取りまく濾胞細胞とともに卵胞を形成する。カイコの卵母細胞は、第一減数分裂の中期で細胞周期を停止させ、新規な転写をほとんど行なわない。一方、栄養細胞は核内有糸分裂へと移行し活発に遺伝子の転写を行なう。

昆虫の卵形成の分子機構のうち、卵黄形成期のビテロジェニン合成や卵殻形成期のコリオン遺伝子の発現などについては多くの研究があるが、シストサイトの分化をはじめとする卵形成初期の機構については不明の点が多い。キイロショウジョウバエでは、卵原細胞からシストサイトへの分化を誘導する重要な遺伝子として *bag-of-marbles* (*bam*) が発見されている。しかし、カイコを含め、

他の生物に *bam* のオーソログは発見されていない。また、カイコの卵母細胞には、キイロショウジョウバエと異なり減数分裂時に相同染色体間の交叉がまったく起こらず、結果として遺伝子の組み換えが起きないというショウジョウバエに見られない特徴がある。本研究では、カイコの雌性生殖細胞の分化機構を解明する目的で、卵形成初期において特異的に機能する遺伝子群を探索し、それらの機能を解析した。

1. SAGE によるカイコ卵巣小管のトランスクリプトーム解析

シストサイトの分化に関与する遺伝子群を探索するために、3' Long SAGE (3' Long Serial Analysis of Gene Expression) ライブラリーを構築した。カイコの卵胞の発育段階は細かく 12 段階に分けられているが、シストサイトが栄養細胞と卵母細胞へ分化するのはステージ 1 である。ライブラリー1 (ステージ1-3)、ライブラリー 2 (ステージ2-3) の二つのライブラリーを作成し、ライブラリー1 より 122060、ライブラリー2 より 37073 の SAGE タグをそれぞれ得た。ライブラリー1、2 のいずれにおいても、最も出現頻度の高かった SAGE タグは同一だった。5'-,3'-RACE により完全長 cDNA を取得したところ、この SAGE タグに対応する RNA には、3' 末端の poly(A) が付加される位置の差異により 3 種類のアイソフォームが存在することが判明した。いずれのアイソフォームからも 100 アミノ酸残基以上の ORF は見出されず、既知の転写産物に相同性を示さなかった。またノザンプロットの結果、この転写産物は卵巣特異的に、特に生殖細胞に多量に存在することが明らかとなった。そこでこの転写産物を *ovary champion* RNA (*ovacham* RNA) と名付けた。*ovacham* RNA は新規の非コード RNA であり、カイコ卵形成において重要な役割を果たしている可能性がある。さらに、ライブラリー1と2を比較して前者に多く出現する SAGE タグを探索したところ、 $p < 0.05$ かつ頻度 2 倍以上という条件で 272 種類のタグが同定された。それらに対応する遺伝子の中には、ATP synthase subunit d (3.1 倍) や ATP synthase coupling factor 6 (9.1 倍) をコードするものが含まれていた。キイロショウジョウバエにおいて cytochrome c oxidase subunit Va (CoVa) の欠失変異体では、Cyclin E の量が減少し細胞周期の進行が停止することや、栄養細胞における核内有糸分裂が Cyclin E の増減によって調節されていることが知られている。ATP synthase subunit d, ATP synthase coupling factor 6, cytochrome c oxidase subunit Va (CoVa) はいずれも酸化的リン酸化を担っているという共通性がある。前 2 者の遺伝子は、ショウ

ジョウバエ *CoVa* と同様の機構で、カイコの卵形成における細胞周期を調節している可能性がある。

2. *ovary champion (ovacham)* RNA の機能解析

上述のように *ovacham* RNA がカイコ卵形成において重要な役割を担っている可能性がある。そこで、カイコ蛹個体での RNAi による機能解析を試みた。*ovacham* RNA に該当する2本鎖 RNA(dsRNA)を血体腔中に注射したところ、栄養細胞と卵母細胞の分化に異常を示す卵胞や、卵管の分枝、卵胞同士の融合が高頻度に観察された。一方、EGFP dsRNA を注射した個体からは同様の異常を示す個体は出現しなかった。卵巢の形態異常を示した個体では、EGFP dsRNA を注射した個体に比べて *ovacham* RNA の量が減少していたため、観察された卵巢の異常は *ovacham* RNA のノックダウンによるものと考えられた。*ovacham* RNA はカイコ卵巢小管において、生殖細胞(栄養細胞及び卵母細胞)や体細胞(卵管)の様々な発生段階に欠かせない RNA であると考えられる。加えて、一部のノックダウン個体では雌蛾の外部生殖器の一部が雄様の形態を示した。*ovacham* RNA の発現は卵巢特異的であり雌外部生殖器では観察されないため、卵巢より分泌されている何らかの物質が外部生殖器の性分化に関与している可能性がある。そこで、MALDI-TOF/MS を用いて *ovacham* RNA から短いペプチドが翻訳されている可能性を検証したが、該当するペプチドは検出されなかった。*ovacham* RNA 由来のペプチドが修飾を受けている場合、実際に卵巢内に存在しても MALDI-TOF/MS による検出は困難であるため、*ovacham* RNA から短いペプチドが翻訳されている可能性を完全に排除することはできない。しかし以上の実験より、*ovacham* RNA が卵形成に必要な転写産物であることが判明し、卵巢より分泌されている何らかの物質が雌個体において外部生殖器の性分化に関与している可能性が示唆された。

3. 卵巢特異的に多量に存在する small RNA の解析

カイコ卵巢から調製した total RNA を変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、EtBr で染色したところ、30 塩基付近に強く染色されるバンドが観察された。このバンドは卵巢からのみ検出されたので、クローニングして 10152 クローンの塩基配列を決定したところ、8053 種類の配列が得

られた。その内の2種類は miRNA (micro RNA)であった。また 1992 種類 (24.7%)については、カイコゲノムの全ゲノムショットガン配列のアセンブリーで得られたスキヤフォールドに多数回(5回以上)ヒットしたので、rasiRNA (repeat-associated small interfering RNA)であると考えた。rasiRNA はショウジョウバエの生殖細胞系列で反復配列の発現を抑制することが知られているので、カイコ卵巣の rasiRNA も、トランスポゾンの転写や転移を抑制することによってゲノムを保護する機能を有している可能性がある。

卵巣の低分子 RNA には、miRNA、rasiRNA 以外にも、スキヤフォールド配列に1-4回ヒットする RNA が 3285 種類 (40.8%)あり、それらを BmsmRNA と名付けた。BmsmRNA は、ゲノム上に複数のクラスターを形成し、それらクラスターの多くはスキヤフォールドの両端付近に存在することが明らかとなった。また、スキヤフォールドにヒットしなかった 2774 種類の低分子 RNA のうち、約半数に相当する 1385 種類が、カイコの全ゲノムショットガンでアセンブリーできなかった反復配列に対してヒットした。したがって卵巣に多量に存在する低分子 RNA には、スキヤフォールド間の反復配列に富む領域や、その近傍の領域に由来するものが多いことがわかった。さらに、BmsmRNA クラスター内では卵巣の SAGE タグに相当する配列が疎であったので、卵巣で発現する遺伝子が少ない領域に相当することが明らかになった。また、雄の減数分裂における SNP マーカー間の組み換え価と BmsmRNA の分布を重ね合わせてみたところ、BmsmRNA クラスター領域では組み換え価が低いことも判明した。したがって、BmsmRNA は何らかの機構で卵巣におけるジーンサイレンシングを行なっているものと推察された。

以上本研究では、カイコの卵巣におけるシストサイトの分化をはじめとして、卵形成初期に関与する遺伝子の候補を SAGE 解析を通して新たに同定し、特に新規な非コード RNA である *ovacham* RNA の機能を解明した。また、卵母細胞の分化または保護に一役買っていると考えられる多数の低分子 RNA を発見した。これらの結果にもとづき、カイコの卵形成において従来あまり着目されてこなかった非コード RNA や低分子 RNA など機能性 RNA の重要性を指摘した。