

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 船隈 俊介

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。カイコでは、卵原細胞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 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。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未だ不明な点が多い。本研究では、この分化過程に関与する遺伝子群を探索し、それらの機能を解析した。

第一章では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 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た。ライブラリー 1 と 2 を比較して前者に多く出現する SAGE タグを探索した結果、シストサイトの分化に関与する遺伝子の候補として ATP synthase subunit d (3.1 倍) や ATP synthase coupling factor 6 (9.1 倍) などの遺伝子が発見された。また、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。RACE により完全長 cDNA を取得したところ、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。

第二章では *ovacham* RNA の機能解析を試みた。*ovacham* RNA に対する RNAi を行なったところ、シストサイトの分化異常や、卵管の分枝、卵胞同士の融合が高頻度に観察された。*ovacham*

RNA はカイコ卵形成に欠かせない 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。雌外部生殖器では *ovacham* RNA の発現は観察されないため、卵巣より分泌されている物質が外部生殖器の性分化に関与していると考えられる。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。やはり *ovacham* RNA は非コード RNA である可能性が高い。

第三章ではカイコ卵巣に多量に存在する低分子 RNA を解析した。10152 クローン (8053 種類) の塩基配列を決定した。その内の 2 種類は miRNA であった。また 1992 種類 (24.7%) については、カイコゲノムスキヤフォールドに多数回 (5 回以上) ヒットしたので、*rasiRNA* 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* も同様の機能を有していると考えられる。卵巣の低分子 RNA には、miRNA や *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た。それら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、*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。

以上本論文は、カイコの卵形成初期に関与する遺伝子の候補を新たに同定し、特に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もので、学術上、応用上貢献することが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。