

氏名	坂西 綱太			
学位の種類	博士 (理学)			
学位記番号	博甲第 209 号			
学位授与の日付	2016 年 3 月 31 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
学位論文の題目	カイコガコリン作動性遺伝子座の構造および発現に関する研究			
論文審査委員	主査	神奈川大学	教授	泉 進
	副査	神奈川大学	教授	小笠原 強
	副査	神奈川大学	教授	井上 和 仁
	副査	神奈川大学	准教授	大 平 剛
	副査	日本大学	教授	澤 田 博 司

【論文内容の要旨】

アセチルコリンは生物種を超え広く保存されている神経伝達物質であり、脊椎動物では主に副交感神経や運動神経で、また昆虫では中枢神経系で機能するとされている。アセチルコリンを利用する神経はコリン作動性神経と呼ばれ、コリンとアセチル CoA を基質としてアセチルコリンを合成する酵素であるコリンアセチル基転移酵素 (choline acetyltransferase; ChAT) がこの神経を同定するための特異的指標蛋白質として知られている。多くの動物では ChAT と小胞アセチルコリン輸送体 (vesicular acetylcholine transporter; VAChT) は同一の遺伝子座であるコリン作動性遺伝子座に入れ子になってコードされている。VAChT は ChAT により合成されたアセチルコリンをシナプス小胞へ輸送する機能を担う蛋白質である。興味深いことに、これまでに報告された複数生物種のコリン作動性遺伝子座の構造は種間で高度に保存されている。昆虫におけるコリン作動性神経の研究はキイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* で势力的に進められ、その分布や ChAT 遺伝子の発現動態が詳細に報告されてきた。一方で、他の昆虫種での報告例は少ないのが現状である。昆虫の体制は分類学上目のレベルで変化が大きく、そのため神経系におけるコリン作動性神経の構造や連絡網も相関して変容している可能性が考えられる。鱗翅目昆虫に属するカイコガ *Bombyx mori* では、古くより内分泌を中心とした生理学的研究がなされ、多くの成果が報告されている。また、中枢神経系においてペプチドホルモン産生細胞の局在および形態が報告されている。一方で、コリン作動性神経については、局在をはじめ、コリン作動性神経の指標蛋白質である ChAT をコードする遺伝子に関わる報告は皆無である。本研究ではカイコガの ChAT および VAChT をコードする mRNA 配列 (cDNA) を単離してそれらの構造を明らかにした。更にその情報に基づきカイコガコリン作動性神経座の構造を明らかにした。次いで、主に ChAT 遺伝子に注目してコリン作動性遺伝子座の発現について解析し、生体内におけるコリン作動性神経の分布状況及び発生段階におけるコリン作動性神経細胞の変化について明らかにした。

【カイコガ cholinergic locus の構造解析】

カイコガ *ChAT* (*BmChAT*) およびカイコガ *VAcHT* (*BmVAcHT*) cDNA のクローニングは、キイロショウジョウバエ *ChAT* および *VAcHT* の情報に基づき、カイコゲノムデータベースから *BmChAT* 遺伝子及び *BmVAcHT* 遺伝子の候補を探索することから始めた。その結果、*BmChAT* 遺伝子の候補として BGMBG013468、*BmVAcHT* 遺伝子の候補として BGMBG013466 を得た。2つの候補遺伝子がコードするポリペプチドは、ショウジョウバエ *ChAT* および *VAcHT* とそれぞれ 46%、71%の相同性を示した。また、両遺伝子は同一染色体上の近位 (70 kb 以内) に存在していた。これらの結果から、得られた候補遺伝子を *BmChAT* 遺伝子および *BmVAcHT* 遺伝子の候補とした。候補遺伝子の塩基配列を RT-PCR 及び RACE 法により決定しアミノ酸配列を演繹してその相同性について他生物種の *ChAT* および *VAcHT* と比較した。その結果、*BmChAT* 候補の演繹アミノ酸配列は Choline/Carnitine *o*-acyltransferase ファミリーに見られるドメイン構造を持ち、酵素触媒に関与する保存されたヒスチジン残基が保存されていた。加えて、ヒト *ChAT* で報告された触媒反応関連アミノ酸残基についても保存されていることが明らかとなった。*BmVAcHT* 候補の演繹アミノ酸配列は Major Facilitator スーパーファミリーに見られるドメイン構造を持ち、10 の膜貫通ドメインも有することが明らかとなった。決定した *BmChAT* 候補遺伝子と *BmVAcHT* 候補遺伝子の塩基配列を比較した結果、5'末端側 498 bp が共通していることが明らかとなった。さらにゲノム配列と照合したところ、両候補遺伝子で共通した塩基配列は第 1 および第 2 エクソンに相当しており、*BmChAT* 候補遺伝子の第 2 イントロン内に *VAcHT* 候補遺伝子のエクソンが含まれるといった構造であることが明らかとなった。このような遺伝子構造は既知生物種の cholinergic locus でも観察される。ただし共通するエクソン数が 2 つである点は、他生物種で見られていないカイコガ特有の特徴であった。これらの結果を総合し、候補遺伝子を *BmChAT* 遺伝子および *BmVAcHT* とした。

【*BmChAT* 遺伝子および *BmVAcHT* 遺伝子の組織別、発生段階別発現解析】

BmChAT 遺伝子および *BmVAcHT* 遺伝子の発現パターンを組織別に解析した結果、両遺伝子とも脳で特異的に発現することが明らかとなった。カイコガの神経系は、最も前方に位置する脳のみでなく、各体節に存在する神経節から構成される。そこで *BmChAT* 遺伝子の発現について各神経節においても検討した。その結果、*BmChAT* 遺伝子の発現はすべての神経節で確認された。興味深いことに *BmChAT* 遺伝子の発現量は各神経節で一定ではなく、特に脳では有意に高いことが明らかとなった。この結果から、脳内には他の神経節より多くのコリン作動性神経が存在する可能性が示唆された。*BmChAT* 遺伝子の発現パターンを発生段階別に解析した結果、産卵後 3 日目から発現が開始されること、5 齢幼虫期はほとんど一定であること、蛹化直後に一時劇的に減少するが発生の進行とともに発現量が増加すること、成虫気では時間経過に伴い低下することが明らかとなった。*BmChAT* 遺伝子の発現低下が観察された変態期では、神経細胞のリモデリングが生じることが知られている。このリモデリングには脱皮ホルモンが影響しており、*BmChAT* 遺伝子の発現に対しても同ホルモンの影響が示唆される。

【カイコガにおけるコリン作動性神経の局在】

コリン作動神経の局在をレポーター遺伝子系により解析した。cholinergic locus の上流域(-2000 ~ +30)をプロモーターとし、EGFP を連結させた人工遺伝子を含む組換えバキュロウイルスを作出した。この組換えウイルスを個体へ投与し、組織を観察した。その結果、幼虫期では脳及び食道下神経節の細胞で EGFP 蛍光が観察された。特に脳では前方中央から側方に局在する多数の神経細胞で蛍光が観察された。このことから多種類の神経系へアセチルコリンが関与することが示唆された。

第3神経節以降の体節神経節では中央の背腹軸対称な細胞で蛍光が強く確認された。神経節でのパターンは類似していることから、アセチルコリンが同一の役割を担っていることが窺われる。蛹期では、脳の神経分泌細胞群、触角葉細胞群、視葉細胞群、キノコ体の傘部で蛍光細胞が認められた。食道下神経節では腹側全体にわたり蛍光細胞が、各神経節では幼虫期より多数の蛍光細胞が観察された。この結果から蛹期の脳では、幼虫期での機能に加えて視覚や嗅覚刺激の神経連絡にコリン作動性神経の関与することが示唆された。

【論文審査の結果の要旨】

本研究はカイコガ *B. mori* のコリン作動性遺伝子座の構造と発現について解析したものである。アセチルコリンは生物種を超え広く保存されている神経伝達物質である。昆虫では双翅目昆虫であるキイロショウジョウバエ *D. melanogaster* を実験材料とした研究から中枢神経系で機能するとされてきた。アセチルコリンを利用する神経はコリン作動性神経と呼ばれ、コリンアセチル基転移酵素 (choline acetyltransferase; ChAT) がこの神経を同定するための特異的指標蛋白質として知られている。多くの動物では ChAT と小胞アセチルコリン輸送体 (vesicular acetylcholine transporter; VAcHT) は同一の遺伝子座であるコリン作動性遺伝子座にコードされている。本研究ではカイコガを実験材料に用いて鱗翅目昆虫におけるコリン作動性神経系の詳細を明らかにすることを目的として実施された。まずカイコガの ChAT および VAcHT をコードする mRNA 配列 (cDNA) を単離しその構造を明らかにした。さらにカイコガのコリン作動性遺伝子座の構造を明らかにし、カイコガでは他の動物種とは異なり ChAT と VAcHT に共通するエクソンが二つに分離していることを明らかにした。次いでバキュロウィルスを利用したカイコガ個体への遺伝子再導入系を構築してコリン作動性神経遺伝子座の発現について解析し、生体内におけるコリン作動性神経の分布状況及び発生段階におけるコリン作動性神経細胞の変化について解析した。その結果、カイコガではコリン作動性遺伝子座は中枢神経系でのみ発現すること、さらに中枢神経系は主にコリン作動性神経により構成されていることを明らかにした。これらの結果は昆虫類の中枢神経系の研究に新たな知見を加えるとともに、今後の研究に有用な実験系をも提供するものである。以上の事由により、本論文は博士 (理学) の学位論文として十分に価値のあるものと認定した。