

和文要旨

アセチルコリンを利用する神経をコリン作動性神経と呼ぶ。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。アセチルコリンの合成酵素であるコリンアセチル基転移酵素 (choline acetyltransferase; ChAT) はコリン作動性神経に特異的なマーカー遺伝子であり、この分子を指標としてコリン作動性神経は同定される。また、ChAT および小胞アセチルコリン輸送体 (vesicular acetylcholine transporter; VAcHT) をコードするコリン作動性遺伝子座の構造は生物種間で保存されていることも良く知られている。昆虫におけるコリン作動性神経の研究はショウジョウバエ *D. melanogaster* で势力的に進められており、神経分布や *ChAT* 遺伝子の発現動態が詳細に報告されている。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、古くよりホルモン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、特定されたホルモンの産生細胞について局在解析も行われている。一方で、コリン作動性神経については、その局在をはじめ、コリン作動性神経の特徴付けとして最も支持される *ChAT* 遺伝子についての報告がない。本研究ではカイコガコリン作動性神経遺伝子座の構造を決定し、*ChAT* 遺伝子に注目して発現局在を解析し、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変化について明らかにした。

キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* の情報を基にカイコゲノムデータベースからカイコガ *ChAT* (*BmChAT*) 遺伝子及びカイコガ *VAcHT* (*BmVAcHT*) 遺伝子の候補を探索した。候補遺伝子の全塩基配列を RT-PCR 及び RACE 法により決定した。

カイコガの幼虫期の組織を摘出し、それらにおける *BmChAT* 遺伝子および *BmVAcHT* 遺伝子の発現を RT-PCR により解析した。脳、食道下神経節、各体節神経節での *BmChAT* 遺伝子の発現を RT-qPCR により解析した。カイコガの卵、1 齢幼虫、5 齢幼虫、蛹、成虫を 24 時間間隔で回収し、*BmChAT* 遺伝子の発生段階別発現を RT-qPCR により解析した。

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するために、コリン作動性神経遺伝子座のプロモーター領域 (-2000 ~ +30) に 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。組換えバキュロウイルスを幼虫および蛹へ投与し、組織を共焦点蛍光顕微鏡で観察した。

カイコガゲノムデータベースより *BmChAT* 遺伝子および *BmVAcHT* 遺伝子の候補を選抜し、塩基配列を決定した結果、両候補遺伝子は 5' 末端側 498 bp が共通していることを見出した。またゲノム配列と照合したところ、共通配列は第 1 および第 2 エクソンに相当していること、*BmChAT* 遺伝子の第 2 インtron 内に *BmVAcHT* 遺伝子のエクソンが入り子となっていることが明らかとなった。このような構造は、既知生物種の cholinergic locus で高度に保存されている。一方で、共有するエクソン数が 2 つである点は、カイコガ特有の特徴であった。*BmChAT* 遺伝子および *BmVAcHT* 遺伝子を演繹し、コードされたポリペプチドの相同性について他生物種 *ChAT* と比較した。その結果、*BmChAT* は Choline/Carnitine o-acyltransferase 族に見られるドメイン構造を持ち、酵素触媒に関与する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。また *BmVAcHT* でも他生物との高い相同性が確認された。これらの結果から、候補遺伝子を *BmChAT* 遺伝子および *BmVAcHT* とした。

BmChAT 遺伝子の発現パターンを組織別、発生段階別に PCR 法により解析した。その結果、*BmChAT* 遺伝子は脳や体節神経節で特異的に発現すること、産卵後 3 日目の胚から発現が開始されること、蛹化直後に一時減少するが発生の進行とともに発現量が増加することを明らかにした。発現の低下が見られた変態期においては神経のリモデリングが生じている。これには脱皮ホルモンが影響することが知られて

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。次いで、コリン作動神経の局在を細胞レベルで明らかにするため、レポーター遺伝子系による解析を行った。*cholinergic locus* の上流域(-2000 ~ +30)をプロモーターとし、高感度緑色蛍光蛋白質 (EGFP)を連結させた遺伝子コンストラクトを含む組換えバキュロウイルスを作製した。この組換えウイルスを幼虫及び蛹へ投与した。投与個体の組織を観察した結果、幼虫期の脳及び食道下神経節に存在する神経分泌細胞でEGFP 蛍光が観察された。また、脳皮層に局在する複数の神経細胞でも蛍光は観察され、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。各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と考えられる。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が示唆された。