

## 審査の結果の要旨

氏名 マリオム

アコヤガイ *Pinctada fucata* は、高品質の真珠を生産する代表的な真珠貝である。真珠は、貝が異物の侵入による外套膜組織の損傷に応答して、異物の周囲に貝殻様のバイオミネラルを生産することにより形成される。真珠養殖ではこれを利用し、アコヤガイ（ドナー）の外套膜の組織片を核と共に別のアコヤガイ（ホスト）に同種移植する。ホスト体内で、移植片の外側上皮細胞は増殖して核を覆う真珠袋を形成し、真珠袋の上皮細胞は、核に様々な貝殻基質タンパク質を分泌し、炭酸カルシウム結晶をたい積させる。これが真珠である。この一連の過程については、これまで全体的かつ網羅的な遺伝子発現解析は行われておらず、特に、真珠袋形成後については、単層のドナー由来細胞からなる真珠袋をホストの組織から完全に分離することは困難なことから、詳細な解析は不十分であった。

本学位論文では、外套膜片の移植から真珠袋形成、さらには真珠形成に至る一連の過程におけるトランスクリプトーム解析から、真珠袋および真珠の形成に関与する遺伝子をスクリーニングすると共に、既報の貝殻基質タンパク質の発現パターンの詳細をホスト由来の遺伝子産物の混入率の解析から明らかにすると共に、真珠構造の経時的变化の比較解析から、それらの真珠形成への寄与を検討した。さらに、こうした遺伝子の機能解析州法の確立のため、CRISPR / Cas9 によるゲノム編集のアコヤガイへの適用を検討したもので、これまでにない精度で真珠形成の一連の過程を記述することに成功している。

本学位論文では、3ヶ月間の移植実験を行い、RNA-seq により得られた遺伝子発現情報のエンリッチメント解析から、移植後 24 時間にドナー依存的に、移植後 48 時間にホスト依存的に免疫関連のカスケードが変動することが示された。上皮細胞の増殖に関わる様々な遺伝子の発現が移植後 2 週間まで続いており、この時期までに真珠袋が形成されると考えられた。複数の幹細胞マーカー遺伝子も同定され、定量的 PCR の結果、これらは外套膜組織で高度に発現することから、移植された外套膜上皮の増殖におけるそれらの役割に興味を持たれた。

また、貝殻や真珠形成に関わる既報の遺伝子群の発現パターンについても解析した。これらについては、既存の研究においても真珠形成過程での発現パターンが解析されているが、そうした解析では、ドナー由来の真珠袋組織とその周囲にあるホストの組織が混在した状態で行われていた。本研究では、それらを分けることを試み、インフォマティクスの

に宿主由来の転写産物の混入率を計算することで、ドナー由来転写産物の量を補正することに成功した。その結果、これまでにない精度での解析を実現し、既報の真珠形成関連遺伝子群の発現は、真珠形成の初期と後期で明確に異なること、特に、貝殻基質タンパク質遺伝子群については、稜柱層形成タンパク質が最初に強く発現した後徐々に低下すること、真珠層形成タンパク質は一度発現が減少した後増加し、真珠囊の形成後 1 ヶ月で発現がピークに達することを示した。さらに、本論文では移植後 1 ヶ月および 3 ヶ月の真珠の表面構造および断面の走査型電子顕微鏡観察を行い、真珠の層構造は貝殻の層構造を模倣するものの、カルサイトで構成される貝殻の稜柱層と異なり、真珠の稜柱層はアラゴナイト、カルサイト、有機物、およびいくつかの未知の化合物の混合であることが示された。一方で、有機層の蓄積、稜柱層と真珠層を含む異質層の形成、真珠層の蓄積、の順に進む真珠形成は、真珠形成タンパク質や稜柱層形成タンパク質の遺伝子発現パターンの変化とよく一致した。

また、本研究では、アコヤガイのゲノム編集も試みている。CRISPR / Cas9 システムを用い、成体の閉殻筋への Cas9 タンパク質および sgRNA の直接注入というユニークな方法を行い、特定の遺伝子における突然変異を検出することに成功した。未だ予備的検討ではあるが、本手法が確立できれば、アコヤガイでのノックアウトやトランスジェニック作成など、アコヤガイを使ったバイオミネラル研究の技術基盤として極めて有用である。今後の発展が大いに期待される成果である。

以上、本研究から得られた真珠袋および真珠の形成の根底にある分子メカニズムの理解の向上は、真珠養殖の実践および真珠品質の向上に向けた将来の研究の基礎を提供するであろう。本研究はまた真珠囊形成に関与する新規機能的遺伝子を同定するための貴重な情報を提供するものである。アコヤガイへのゲノム編集の試みと併せ、これらの研究成果は、学術上応用上資するところが大きい。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。