京都工芸繊維大学

氏　　名	らい　ぴん　いん LYE PING YING
学位(専攻分野)	博　士（学術）
学位記番号	博甲第 1108 号
学位授与の日付	令和 6 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科　バイオテクノロジー専攻
学位論文題目	Utilization of cytotoxin-mediated tissue dysfunction approach to explore the potentials of silkworm silk fibroin and pupae for biomedical and biotechnological applications （細胞障害性タンパク質の異所発現によるカイコフィブロイン及び蛹のバイオメディカル応用に関する研究）
審査委員	(主査)教授　小谷　英治 教授　井上 喜博 教授　亀井加恵子 准教授　加藤 容子

論文内容の要旨

カイコの繭糸タンパク質は、後部絹糸腺でつくられる内層の絹フィブロインと、中部絹糸腺でつくられる外層のセリシンから構成される。繭タンパク質の組成を変える人工的な操作は致死性を伴うため、これまで非常に困難とされてきた。近年、モンシロチョウ由来の細胞障害性タンパク質であるピエリシン-1Aを後部絹糸腺特異的に異所発現させることで、フィブロイン産生の機能不全化を人為的に誘発し、フィブロインを含まずセリシンだけでできた繭を作る遺伝子組換えカイコが得られた。このセリシン繭を導入した新たな細胞培養の方法も開発されている。すなわち、繭タンパク質の人為的な産生制御が新たなバイオテクノロジー技術を生み出す可能性があることを意味しているが、絹糸腺内の他のタイプの細胞・組織の機能不全化の有効性は明らかでない。そこで本研究では、カイコの機能改変を目指し、細胞障害性タンパク質利用によるセリシン産生不全を導入する遺伝子操作を進めた。本学位論文では、第一章諸論において、カイコを用いた遺伝子組換え技術の現状に加え、絹糸腺機能の操作の原理とその利用可能性について述べた。

第二章では、細胞障害性タンパク質のセリシン産生器官である中部絹糸腺での発現について言及した。遺伝子組換えにより、中部絹糸腺の機能不全化に成功し、セリシンをつくらず、概ねフィブロインだけでできた高フィブロイン繭をつくるカイコが得られた。したがって、細胞障害性タンパク質遺伝子によるタンパク質発現機能の不全化は、さまざまな細胞・組織でも有効であると考えられる。得られる高フィブロイン繭からは精練後の分解フィブロインとは異なり、非晶部の多いタンパク質成分が保持され、軟骨分化細胞の初期分化を有利に起こせる細胞増殖足場に利用できることもわかった。

第三章では、中部と後部両方の絹糸腺における細胞障害性タンパク質の発現と、同一個体内での両器官の機能不全化に言及した。すでに得られていたセリシン繭産生系統と高フィブロイン繭産生系統とを交配させたところ、繭タンパク質をつくらず繭を形成しない不営繭カイコ系統が得られた。不営繭系統の蛹では、非遺伝子組換え系統と比べ、脂肪体の栄養素とともに血液中の繭

成分アミノ酸含有量が上昇した。また、脂肪体でのインスリンシグナル経路・TOR シグナル経路の活性化と翻訳関連因子タンパク質（リン酸化された S6K および 4EBP）の増加が見られ、このことは、翻訳機能の向上を意味していた。実際、バキュロウイルス発現系によるレポータータンパク質の生産量も不営繭系統蛹体内で上昇した。一方、脂肪体における翻訳機能の向上は、卵栄養タンパク質の増大をもたらし、卵数の増加を示した。本成果は、繭形成に消費されるはずだった栄養が卵形成に効果的に利用される仕組みの存在を示唆するものである。したがって、不営繭系統では大規模タンパク質発現システムの構築のための個体数確保にも貢献すると考えられる。

第四章では、得られた知見を統合的に検証し、これらをもとに繭成分を改変する遺伝子組換え技術の意義と応用性に関して統合的に考察した。通常の絹糸フィブロインは製糸の過程で個体由来の残留成分のアレルギー誘発性が絹アレルギーの原因であるが、高フィブロイン繭は精練工程を割愛し、アレルギー誘発性の少ない加工フィブロイン材料を生み出す上で有効である。すなわち、高フィブロイン繭を用いて生体利用可能な医療材料の開発につながるものと考えられる。繊維としての絹需要は低迷を続けているが、不営繭カイコ系統では繭糸タンパク質成分を別の目的、すなわちウイルスベクターによるワクチンなどの医療応用可能なタンパク質を効率的に生産するカイコへと改変できることが示唆される。

論文審査の結果の要旨

本博士論文は、繭成分改変を実現する遺伝子組換えの効果について言及し、その応用性に関して論じたものである。国内外におけるさまざまな手法を用いた繭成分の改変に関する研究の中でも、特に、健康障害を伴わないセリシン産生阻害の遺伝子操作は類例が乏しく、したがって本研究成果に高い新規性を認めるところである。高フィブロイン繭を用いることで、フィブロインの非晶部分を障害する除セリシンのためのアルカリ精練処理が不要となり、未分解フィブロインの加工の有効性を明らかにした。また、ほぼ全ての繭タンパク質の生産機能を喪失した不営繭形質を持つカイコの作出に関してもこれまでに類例がない。繭をつくるための栄養素が脂肪体のタンパク質生産機能を向上させ、卵形成を促進することを見出しており、このことは、絹糸昆虫の繭形成と繁殖の間にトレードオフのバランス関係があることを示す重要な知見と言える。さらに、これらの研究成果の意義を探究し、将来のカイコのバイオテクノロジー利用の可能性に関して統合的に考察している。本研究の成果として創出された二つの系統のカイコは、将来にわたり継続的に維持できる遺伝的形質を持ち、ともに医療応用に貢献する特性を持つ生物資源であることを示しており、学術的価値が高いものと評価できる。

なお、当該申請者は、本研究に関連して以下の三報の主たる論文を査読制度のある雑誌に発表し、このうち二報において筆頭著者である。また、以下の参考論文も発表しており、十分な業績を有している。

（主たる論文）

1. Ping Ying Lye, Suriani Mohd Noor, Syamsiah Aini Shohaimi, Niny Fariza Junoh, Soo Choon Tan, Shinichi Iwamoto, Eiji Kotani, Mohd Nor Norazmi, Toshihiro Nagamine, Hajime Mori, Mervyn Wing On Liew. Process

development for quantitation and vaccine efficacy assessment of recombinant hemagglutinin-neuraminidase. *Process Biochemistry*, 2020, *90*, 204-214.

2. Mana Yamano, Ryoko Hirose, Ping Ying Lye, Keiko Takaki, Rina Maruta, Mervyn Wing On Liew, Shinichi Sakurai, Hajime Mori and Eiji Kotani. Bioengineered silkworm for producing cocoons with high fibroin content for regenerated fibroin biomaterial-based applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, *23*, 7433.

3. Ping Ying Lye, Chika Shiraki, Yuta Fukushima, Keiko Takaki, Mervyn Wing On Liew, Masafumi Yamamoto, Keiji Wakabayashi, Hajime Mori, Eiji Kotani. Cytotoxin-mediated silk gland organ dysfunction diverts resources to enhance silkworm fecundity by potentiating nutrient-sensing IIS/TOR pathways. *iScience*., 2024, *27*, 108853.

（参考論文）

1. Takumi Ibuki, Satoshi Iwasawa, Ai Ai Lian, Ping Ying Lye, Rina Maruta, Shin-Ichiro Asano, Eiji Kotani, Hajime Mori. Development of a cypovirus protein microcrystal-encapsulated *Bacillus thuringiensis* UV-tolerant and mosquitocidal δ-endotoxin. *Biology Open*, 2022, *15*, bio059363.

2. Ping Ying Lye, Eiji Kotani, Mervyn Wing On Liew. Progress and challenges in production of recombinant Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase subunit vaccine. *Process Biochemistry*, 2023, *132*, 263-277.