

論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻

平成24年度博士課程進学

氏名 湯浅正志

指導教員 嶋田透

論文題目

カイコの「かすり」変異体に関する分子遺伝学的研究

生物には多様な色彩パターンが存在する。それら色彩パターンはカモフラージュや警告色、擬態、同種の認識、配偶相手の選択、体温の調節、紫外線の防御などに役立ち、生物が生存する上で重要な働きをしている。昆虫は特に多様な色彩パターンを示し、その多様性は種間のみならず種内でも観察でき、また、発育段階に応じて色彩パターンが変化する種も少なくない。このような多様性は様々な環境に対する適応の結果であると考えられており、昆虫の色彩パターン形成のメカニズムを理解することは、適応進化の分子基盤を理解する上で重要な足がかりとなる。

昆虫の成虫における紋様形成はショウジョウバエやチョウ目昆虫において広く研究されている一方で、幼虫における紋様形成についてはあまり研究が進んでいない。1つの理由は、モデル生物であるキロシショウジョウバエでは幼虫がほとんど色彩紋様をもたないことである。チョウ目昆虫のモデルであるカイコは、幼虫の色彩パターン形成のメカニズムを理解する上で大きな利点をもっている。すなわち、色彩パターンに変異や異常をもつ品種および突然変異系統が多数保存されていること、および、ゲノム情報が利用できることなどである。カイコの色彩パターンはメラニン、プテリジン、オモクローム色素により構成されるが、この充実した遺伝資源を利用して、ショウジョウバエの翅形成に関わる *wingless* ファミリー遺伝子のカイコホモログである *Wnt1* の発現がカイコの黒色斑紋の形成に関与することが分かっている。また、*Wnt1* の下流で働くと考えられる転写因子の *Apt-like* の発現制御の変化によっても、多様な黒色の斑紋が形成されることが示唆されている。しかし、このようにメラニン色素による斑紋パタ

ーンを制御する遺伝子が明らかになってきている一方で、プテリジンやオモクロームによる色彩を制御する因子についての情報がいまだほとんどない。

本研究では色素パターン変異体の一つである「かすり」変異体に着目して分子遺伝学的解析を行った。かすり (*quail*, *q*)は、発育、生殖には問題がないが、幼虫が特徴的な色彩パターンを示す変異体である。すなわち幼虫の皮膚が複数の色素合成経路に異常を示し、メラニン、プテリジン、オモクローム色素の増加により、幼虫体色がピンク色になるとともに、背面部に擦ったような不規則な黒色の紋様を表出する。このことから、特に、プテリジンやオモクロームを含む色彩パターンを制御する因子の同定を行うことができるかと期待された。かすりの形質はカイコの第7染色体の0.0 cMに占座する単一の劣性遺伝子に支配されることが分かっているが、その原因遺伝子は明らかになっていない。

1. *q* 変異体のポジショナルクローニング

q/q の遺伝子型をもつ *c55* 系統と正常系統 *p50T* を交配し、ポジショナルクローニング法によって、かすりの原因遺伝子の同定を試みた。*q* 遺伝子の座乗している第7染色体上のPCR多型マーカーを利用し、531個体の戻し交配世代を用いてマッピングを行った。その結果、かすりの責任領域を約1.1 Mbの範囲に絞り込んだ。この領域には11個のタンパク質コード遺伝子が予測されていたので、これらをかすりの候補遺伝子とした。次に、*p50T* とかすり系統 (*c55*) の皮膚における候補遺伝子の発現をRT-PCRによって調べ、発現が検出できた遺伝子のcDNA配列の比較を行った。その結果、かすり系統は2つの候補遺伝子、すなわち膜受容体型のグアニル酸シクラーゼをコードする *BmGC-I* とグルタチオン-S-トランスフェラーゼをコードする *BmGSTe4* に変異をもつことが分かった。*BmGC-I* ではフレームシフトを起こす16-bpの欠失が検出され、*BmGSTe4* ではエクソン2と3を欠如したエクソンスキッピングが起きていることが分かった。どちらの突然変異も遺伝子の機能を欠損させていることが予想されたが、2つの遺伝子のどちらかがかすりの原因遺伝子であるかは分からなかった。しかし、かすり形質を有する11つの系統を比較した結果、10系統で同じ16-bpの欠失変異が見つかり、1系統 (*p54*) では別のミスセンス変異が存在していた。一方、9系統は *BmGSTe4* でエクソンスキッピングを起こしており、*p54* でもミスセンス変異が存在したが、*d33q* においては *BmGSTe4* に変異は見つからなかった。かすり形質を持つすべての系統が *BmGC-I* に変異を有していたことから、*BmGC-I* がかすりの原因遺伝子であることが推測された。そこで *c55* と *d33q* を掛合わせ *BmGC-I* にのみ変異をもつ F1 雑種を作出した結果、F1 雑種 (*BmGC-I*⁺; *BmGSTe4*⁺) のすべての個体がかすり形質を示したので、*BmGC-I* がかすりの原因遺伝子であることが示された。

2. CRISPR/Cas9 システムによる *BmGC-I* のノックアウト

ポジショナルクローニングの結果からは *BmGC-I* がかすりの原因遺伝子であることが示されたが、この遺伝子単独でかすり形質を支配しているかどうかは慎重に検討する必要がある。そこで、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集を行うことで、*BmGC-I* および *BmGSTe4* の影響を評価することにした。*BmGC-I* の2つの標的配列に対して CRISPR/Cas9 によってノックアウトを行い、複数のノックアウト系統を作出した。その結果、すべての *BmGC-I* ノックアウトカイコでかすり様の形質、すなわちピンク色の皮膚と特有の黒色素のパターンを観察することができた。一方で、*BmGSTe4* のノックアウトカイコでは、フレームシフトを起こす変異をもっているにもかかわらず、かすりの様な異常な色素パターンは観察されなかった。これらの結果はポジショナルクローニングの結果と一致し、*BmGC-I* のみがかすりの原因遺伝子であることを証明している。

3. *BmGC-I* 遺伝子の解析

BmGC-I の働きを調べるために、関連する遺伝子の解析を行った。まず、*BmGC-I* ノックアウト系統を用いて、色素合成遺伝子の発現が変化しているかどうかを調べた。その結果、プテリジン合成に関わる *GTP cyclohydrolase Ia* やメラニン合成に関わると考えられる *yellow-h2*, *yellow-f4-2* といった色素合成遺伝子の変動が検出され、*BmGC-I* が少なくともいくつかの色素合成遺伝子の発現に影響を与えることが明らかになった。また、皮膚における *BmGC-I* の経時的な発現変動についても調べた結果、*BmGC-I* mRNA の量は4齢幼虫2日目から4眠期にかけて上昇していることが分かった。この発現の上昇は、かすりの形質が5齢0日目から明瞭になることと一致しており、*BmGC-I* が4齢中期から後期にかけて色彩パターンの形成に関わっていることを示唆している。一方で、*BmGC-I* は皮膚以外にも様々な組織で発現しているため、皮膚以外の組織がかすりの形質へ影響を及ぼしている可能性が考えられた。しかし、*in vivo* エレクトロポレーション法によって *BmGC-I* を幼虫の皮膚に強制発現させると、かすり系統の色素パターンが消失した。これにより、真皮細胞自身における *BmGC-I* の発現が、色彩パターンを制御していると推定された。

本研究ではカイコの色彩パターン変異体であるかすりの解析を通して、膜受容体型のグアニル酸シクラーゼである *BmGC-I* が色彩パターン形成に関連していることを明らかにした。これは昆虫の色彩パターンとグアニル酸シクラーゼの関連を示した初めての報告である。*BmGC-I* は皮膚において重要な働きをしており、おそらく cGMP 経路を介して、パターンを規定する因子および色素の生合成に関わる遺伝子に影響を与えることが考えられた。本研究ではこれまでほとんど情報のなかったプテリジンやオモク

ローム色素による色彩パターンを制御する遺伝子の同定を行えたことも重要である。*BmGC-I*は、これまで知られていた *Wnt1* による斑紋形成の制御機構とは独立に幼虫の色彩パターンに作用していると考えられ、今後、*BmGC-I* の機能の詳細が明らかになれば、色彩パターン形成の新規な経路の理解につながると思われる。