

審査の結果の要旨

氏名 湯浅 正志

カイコの幼虫体表の色彩や斑紋は、品種や系統によって大きく異なり、また突然変異として新たに発見される色彩や斑紋の形質も少なくない。これらの形質は品種や系統の識別に役立つほか、遺伝子を性染色体へ転座させて雌雄鑑別に用いるなど、産業的にも頻繁に利用されてきた。しかし、それら幼虫の色彩や斑紋を支配する遺伝子のうち、分子実体が解明されたものは姫蚕 (*p*) や褐円 (*L*) などごく少数であり、多くの遺伝子は未解明である。本研究は、色彩ターン変異体の一つである「かすり」 (*quail*, *q*) を、分子遺伝学的に解析したものである。かすり変異体は、オモクローム色素などの増加により幼虫の体色がピンク色を呈するとともに、背部に正常蚕にみられない複雑なメラニンの黒色紋様を発現する。*q* 遺伝子はカイコの第7染色体の末端付近に占座する単一の劣性遺伝子に支配されるが、原因遺伝子の実体は未解明であった。

1. 原因遺伝子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、戻し交配世代の形質と遺伝子型を対応づけた結果、かすりの責任領域が約 1.1 Mb の範囲に絞り込まれた。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。幼虫皮膚での発現が検出できた遺伝子について、cDNA の塩基配列を比較した結果、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 の欠如を起こすエクソンスキッピングが起きていることが分かった。多数のかすり変異系統を比較したり、相互交配したりする実験の結果、最終的に *BmGC-I* がかすりの原因遺伝子であると推定された。

2. CRSIPR/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逆遺伝学的に証明する必要がある。CRISPR/Cas9 システムを用い、*BmGC-I* の 2 つの標的配列に対してノックアウトを行い、複数の遺伝子破壊システムを作出した。その結果得られたすべての *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が観察された。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、かすりの形質は現れなかった。これらの結果は、*BmGC-I* のみがかすりの原因遺伝子であることを示している。

3. *BmGC-I* 遺伝子の機能の解析

BmGC-I ノックアウトシステムを用いて、幼虫皮膚の遺伝子の発現プロファイル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-CHI* やメラニン合成に関わる *yellow-h2* など、色素合成に関わる多数の遺伝子に発現変動が起きており、*BmGC-I* がこれら遺伝子の発現に影響することが明らかになった。また、皮膚における *BmGC-I* mRNA 量は、4 齢幼虫 2 日目から 4 眠期にかけて大きく上昇していた。この発現上昇の時期は、かすりの形質が顕著になる時期と一致しており、*BmGC-I* が時期特異的に色彩パターンの形成に関わることを示唆している。さらに *in vivo* エレクトロポレーション法で *BmGC-I* をかすり変異体の幼虫皮膚に導入し、強制発現させたところ、かすり斑紋が消失した。これにより、真皮細胞自身の *BmGC-I* の発現が、色彩パターンを制御していることが明らかになった。

以上、本研究では、かすり変異体の解析を通して、膜受容体型のグアニル酸シクラーゼである *BmGC-I* が、幼虫の色彩パターンを支配していることを明らかにした。*BmGC-I* は、褐円変異体などの先行研究で解明されている *Wnt1* による斑紋形成機構とは独立に、幼虫の色彩パターン全体に作用していると考えられる。このように、本研究はカイコ幼虫の色彩パターンを決定する新規な分子機構の存在を明らかにし、学術上も応用上も価値が高いことから、審査委員一同は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。