

# 論文の内容の要旨

## 論文題目 鱗翅目昆虫幼虫の突起形成に関する分子生物学的研究

氏名 枝吉 美奈

### 序論

鱗翅目昆虫の幼虫には多様な外皮構造が見られ、その多くは捕食者を欺く生存戦略に利用されている。中でも突起構造は様々な幼虫の体表に存在し、紋様などと共に外敵に対する擬態や警告的な効果を持つと考えられる (図 1 A、B)。一般に鱗翅目昆虫幼虫の外皮 (クチクラ) は平面に整列した一層の真皮細胞から作りだされるが、どのようにして立体的な突起構造が形成されるのか、その分子メカニズムはほとんど知られていない。興味深いことに、鱗翅目幼虫の突起の形や本数などは種によって様々であるものの、突起が形成される位置はほぼ決まっている。

鱗翅目昆虫のモデル生物として知られるカイコには、コブ (*K*) と呼ばれる自然突然変異系統が存在する (図 1 C、D)。*K* は一遺伝子座 (*ch11-25.4*) によって支配される優性形質であり、真皮細胞の過剰増殖により幼虫期の特定の体節に一对のコブ状の隆起物を形成する (Shimura, S. *et al.* 2009)。そこで、カイコ *K* の原因遺伝子を同定し、幼虫外皮の隆起構造形成に果たす役割を明らかにすれば、鱗翅目昆虫全般における突起構造形成の分子機構や進化プロセスを解明する手がかりが得られるのではないかと考えた。本研究に先立ち、山口 (博士論文, 2009) は連鎖解析により *K* のゲノム上の責任領域を第 11 染色体上の 440 kbp の領域 (*K*:440 kbp) に絞り込んだが、周辺の組み換え率が低くそれ以上の解析は困難となっていた。一方、*K* は全ての体節に一对の斑紋が生じる突然変異体、褐円 (*L*) と共存することで、斑紋の生じる全ての体節にコブ状の隆起物が出現するようになる (図 1 E)。

*L* の原因遺伝子は *Wntl* である (Yamaguchi, J. *et al.* 2013) ことから、私は *Wntl* と *K* の原因遺伝子との相互作用を調べ、コブ形成の背景にある分子機構を探ろうと考えた。また、*K*:440 kbp 上に存在する 21 個の候補遺伝子 (図 5A) の詳細な解析によって *K* の原因遺伝子を特定し、コブ形成の分子メカニズムを明らかにしようと試みた。

さらにジャコウアゲハの幼虫突起形成における細胞の挙動や突起形成に関わる遺伝子を解析し、カイコの *K* と比較することにより、*K* で得られた知見が野生の鱗翅目昆虫幼虫の外皮の突起形成においてどの程度保存されているか検証しようと考えた。

### 結果、考察

#### カイコのコブ領域における真皮細胞の増殖

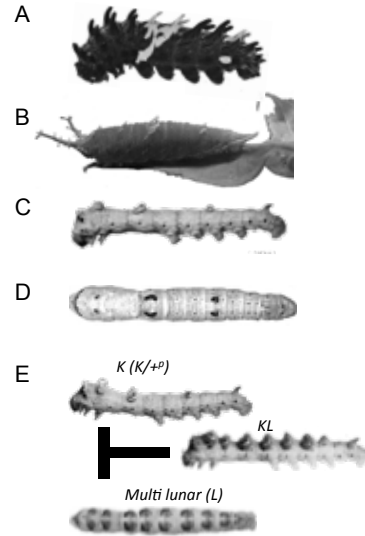


図1. 鱗翅目の幼虫が持つ多様な外皮構造  
A)ジャコウアゲハ幼虫 B)ゴマダラチョウ幼虫  
C)カイコの変異体コブ(K) D)カイコの標準系統(p50)  
E)コブ(K)と褐円(L)の交配個体は斑紋全てがコブになる。

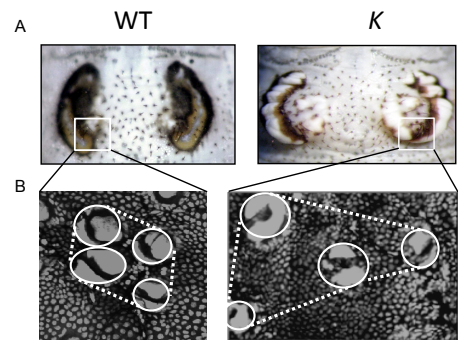


図2. カイコ *K* の突起を形成する真皮細胞  
A)カイコ幼虫の第5体節を拡大した。(左:WTのコブ相当領域、右: *K* のコブ領域)  
B)A)の白四角で示した範囲の真皮細胞の核をDAPIで染色し、4本の剛毛(白実線)に囲まれたWTと*K*で相同な領域(白点線)の真皮細胞の数を比較した。その結果、WTでは細胞数71個、*K*では418個観察された。

コブの形成過程に関する細胞の動態を明確にするために、*K* (コブ) 系統のコブ領域と WT のコブ相当領域における真皮細胞を DAPI で染色し共焦点顕微鏡を用いて観察した。WT とコブで相同な領域内の細胞数を比較した結果、WT では 71 個、*K* では 418 個検出され、*K* の幼虫突起構造が細胞の過剰増殖により形成されていることが確認された (図 2)。

### コブの突出領域を決定する因子 *Wnt1*

前述したようにコブ系統は斑紋の形成と関係し、また斑紋の形成には *Wnt1* が関与していることが示唆されている。そこで、コブ形成、斑紋形成、*Wnt1* の発現、の 3 者の関係を明らかにするために、第 2、3、5、8 体節に斑紋とコブがあるコブ系統ホモ (*K<sup>p</sup>/K<sup>p</sup>*)、斑紋のみが見られる WT (*+<sup>K</sup><sup>p</sup>/+<sup>K</sup><sup>p</sup>*)、斑紋が生じない N4 系統 (*+<sup>K</sup><sup>p</sup>/+<sup>K</sup><sup>p</sup>*) の 3 系統において、第 2 から第 8 の各体節の真皮細胞で *Wnt1* の発現量を比較した。その結果、3 系統全てにおいて第 2、3、5、8 体節で *Wnt1* が強く発現していた (図 3)。つまり、*Wnt1* が強く発現した体節でのみ、コブか斑紋が生じていた。この結果から、コブを生じさせる異常な細胞増殖の領域自体は *Wnt1* の領域特異的な発現によって決まり、コブの形成はコブ系統個体における *K* 原因遺伝子の発現の変化によって生じているのではないかと考えられた。この仮説を検証するため、コブ系統において本来コブが生じない体節に *Wnt1* を強制発現させ、異所的にコブが生じるか否かを確かめた。*Wnt1* の異所的な発現には、*in vivo* エレクトロポレーション法による外来遺伝子の安定な強制発現系を用いた (Ando, T. & Fujiwara, H. 2013, 図 4A)。その結果、第 6、7 体節においても、*Wnt1* の異所的発現によりコブ状の隆起が再現性良く出現した (図 4B、C)。さらに同様の方法で、コブ系統の左半身のコブ領域に *Wnt1* に対する siRNA を局所的に導入したところ、コブの形成が抑制された (図 4D、E)。これらの結果により、コブ系統におけるコブの形成には *Wnt1* の領域特異的な発現が必要十分な条件であることが機能的に証明された。

### コブ系統の原因領域内におけるゲノム重複部位の発見

K:440 kbp に存在する 21 個の候補遺伝子について、コブ系統とコブの無い系統で ORF の塩基配列を比較した結果、いずれもタンパク質構造を変えると予想される変異は見つからなかった。そこで、コブ系統でのみ発現している特異的なアイソフォームがないか、また各遺伝子の正確な構造を確認するために、4 齢幼虫のコブ系統 (*K/K*) のコブ領域と WT (*+/+*) のコブ相当領域の真皮細胞をサンプルとし RNA sequencing を行った。その結果、011822 遺伝子の転写産物の構造がコブ系統と WT では異なっており、前者では 250 Kbp 以上離れた場所に位置している別の遺伝子のエキソンをファーストエキソンとして転写されていた。さらに詳細な構造解析を行ったところ、011822 遺伝子付近のゲノム領

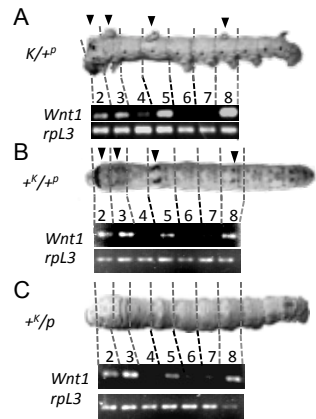


図3. 各体節における*Wnt1*の発現  
第2から第8体節の真皮細胞における*Wnt1*の発現量を半定量的RT-PCRで比較した。  
A)コブ系統ホモ (*K<sup>p</sup>/K<sup>p</sup>*) B) WT (*+<sup>K</sup><sup>p</sup>/+<sup>K</sup><sup>p</sup>*)  
C) N4系統 (*+<sup>K</sup><sup>p</sup>/+<sup>K</sup><sup>p</sup>*) rpL3; 内部標準。

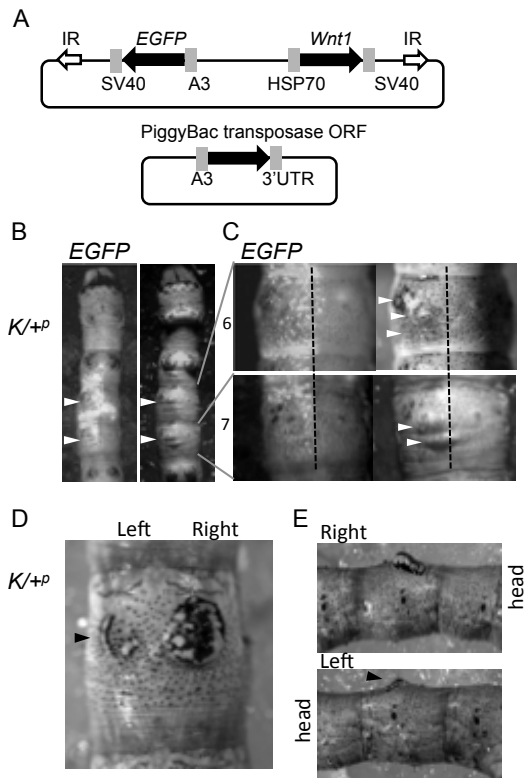


図4. コブにおける*Wnt1*の機能解析

A) 強制発現ベクターと helper プラスミド B) *Wnt1* をコブ系統で強制発現させた結果、矢じりで示した領域に異所的な突起が形成された。C) B の拡大図 D) コブ系統における *Wnt1* の siRNA の結果、コブの形成が抑制された (矢じり)。E) D を側方から見た図

域が重複していることが予測された。これを検証するため 011822 遺伝子近傍に設計したプライマーを用いてコブ系統ホモ (K/K)、ヘテロ (K/+), WT (+/+) のゲノムをテンプレートとして定量的 PCR を行い相対的な増幅量を比較した。その結果、この領域はコブ系統ホモでは WT に対して約 2 倍、ヘテロでは WT に対して約 1.5 倍増幅された。さらに、同様の方法を用いてどの範囲がコブ系統で重複しているのかを K:440 kbp 領域全体に亘って調べた(図 5A の 1~16)。その結果、11 遺伝子を含む約 150 kbp の領域 (図 5A の b~l) がコブ系統のゲノムでのみ重複している可能性が強く示唆された (図 5B)。

コブの原因は何なのか? コブの表現型は 2 齢幼虫では WT と大きな違いは見られないが、3 齢になると顕著な差が見られるようになる。このことから、コブの突起形成に関わる遺伝子の変化は 2 齢で見られるのではないかと予想し、2 齢幼虫での各遺伝子の発現量をコブ系統(K/K)と WT で比較した。その結果、重複している可能性が示唆された範囲の遺伝子は WT と比較して発現が高い傾向が見られた。中でも重複領域の片側の端にある 011653、011825 遺伝子 (図 5A の b、c) は WT に比べてそれぞれ約 35、20 倍発現が上昇していた (図 5C)。逆に、*pipe* (図 5A の s) の発現はコブ系統で 1/30 程度に抑制されていた。これらの発現の変化はコブ系統における約 150 kbp の重複が原因で引き起こされている可能性が高い。しかし、複数の遺伝子がコブの表現型に影響を及ぼしているのか、もしくは原因遺伝子は一つなのかはまだ明確にはなっていない。011653、011825 遺伝子の機能はわかっていない。*pipe* はモルフォゲンなどのシグナル伝達の活性化に必要な遺伝子であることが知られている。コブの原因遺伝子は Wnt シグナルと相互作用していることが予想されるため、*pipe* の発現がコブの形成に重要な時期に極端に抑制されることで *Wnt1* の拡散が異常になり細胞増殖に影響を与える可能性も考えられる。

### ジャコウアゲハ幼虫突起の発生過程の観察

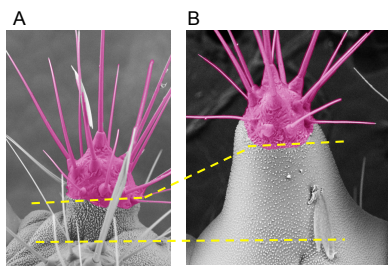


図6. ジャコウアゲハの1齢幼虫の突起  
A) 孵化直後の突起 B) 孵化後1日の突起。剛毛の多数生えた構造の下の皮膚が急激に伸長する様子。Scale bar, 100um.

次に、カイコのコブ系統で分かった突起形成に関わる細胞の挙動や分子メカニズムが、野外の鱗翅目昆虫のジャコウアゲハ幼虫突起においても使われているのかを調べることにした。まず、ジャコウアゲハの突起形成がどの時期に行われるのか観察した。その結果、剛毛の多数生えた膨らみのある構造 (図 6A) が発生初期から存在し、孵化後にその直下の外皮が1日で急激に伸長し、突起構造が形成されることが判った (図 6B)。

この時期の真皮細胞の核を DAPI で染色し共焦点顕微鏡で観察すると、突起の細胞では孵化後に細胞周期の S 期を経た後、急激に細

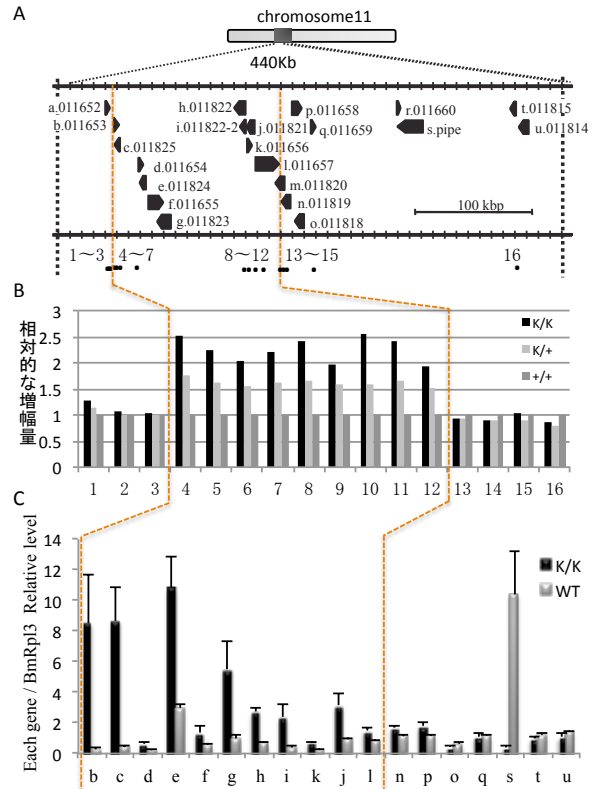


図5. 候補遺伝子の遺伝子量と発現量の比較

A) K:440 kbp上に存在する21個の候補遺伝子と重複の範囲を調べるために増幅した16個の配列の位置(黒点)。B) Aで示した16個の配列についてコブ系統ホモ (K/K)、ヘテロ (K/+), WT (+/+)ゲノムをテンプレートとして定量的リアルタイムPCRを行った。各配列の増幅量はゲノム上に1コピーしかない *Dll* の増幅量でノーマライズした。C) 2 齢におけるコブ系統ホモ (K/K)、WT (+/+) の相対的な発現量の平均値。 *rpL3*; 内部標準。点線は重複の範囲を示している。



胞質が大きくなり、細胞が分裂している様子が見られた。孵化後 20 時間の細胞を M 期の指標である抗  $\alpha$  PH3 抗体で免疫染色し観察したところ、突起部特異的にシグナルが多数検出され、細胞分裂が突起部特異的に起きていることが示唆された (図 7 A、B)。一方、非突起領域では突起と同様に S 期を経るものの、細胞は突起と比べゆっくりと成長し、1 齢の間には細胞分裂は見られなかった。これらの結果からジャコウアゲハの突起形成は 1 齢期から始まり、突起部特異的に細胞の成長が促進されることで伸長し、引き続き起こる細胞分裂によって突起部における細胞数が増加することが示唆された。

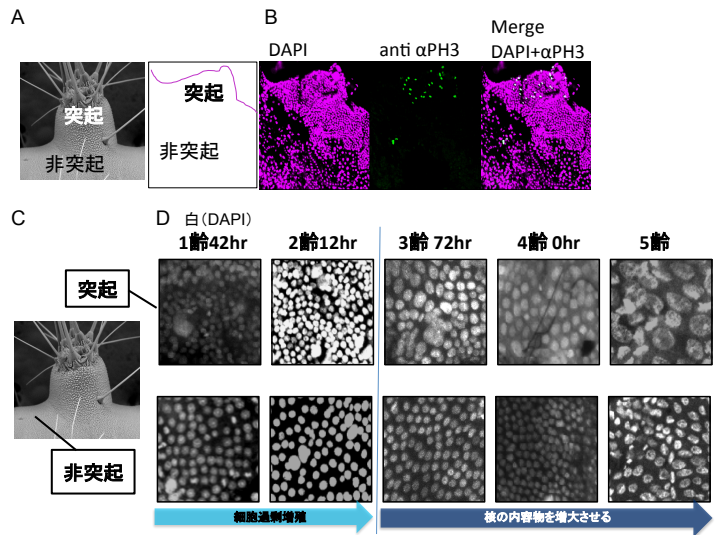


図7. ジャコウアゲハの突起を形成する真皮細胞

A) 1齢幼虫の突起と模式図 B) 1齢幼虫孵化後20時間の真皮細胞を細胞増殖の指標となる $\alpha$ PH3抗体で染色した。突起部のみで増殖のシグナルが多数検出された。(核はDAPIで染色)  
C) 1齢幼虫の突起 D) 1~5齢の突起(上段)、非突起(下段)の真皮細胞の核を同倍率で比較した。(核はDAPIで染色)

2 齢以降のステージについても観察を行ったところ、3 齢から 5 齢にかけて突起では非突起に比べ徐々に大きな核が検出されるようになった (図 7 C、D)。以上の観察からジャコウアゲハでは 3 齢以前ではカイコのコブと同様に突起は細胞の過剰増殖によって、一方 3 齢以降ではカイコのコブでは見られなかった核の内容物を増やして個々の細胞のサイズを拡大して突起を作り、突起伸長の方法を発生ステージによって変化させている可能性が示唆された。

### ジャコウアゲハ幼虫突起形成に関与する遺伝子の探索

ジャコウアゲハの突起形成に関連する遺伝子を網羅的に解析するために、突起が伸長する前の孵化後 0 時間、伸長している最中の孵化後 15 時間の突起、非突起部の真皮細胞をサンプルとして RNA sequencing を行い、発現変動遺伝子を探索した。その結果、発現変動遺伝子の中には、*FoxG1* などの転写因子、クチクラタンパク質関連遺伝子、メラニン合成系遺伝子などに加え、カイコのコブ形成に重要な *Wnt1* が含まれていた。さらに定量 PCR 法で調べたところ、1、4、5 齢期で *Wnt1* は突起領域で特異的に発現していた (図 8)。以上の結果からカイコのコブだけでなくジャコウアゲハの突起においても *Wnt1* が突起形成に関わる遺伝子である可能性が示唆された。

### 結論

本研究では鱗翅目昆虫の幼虫に広く見られる突起形成の分子機構を調べるモデルとしてカイコ *K* 変異体を詳細に調べた。その結果、連鎖解析によって絞り込まれたコブの責任領域内において 11 遺伝子を含む約 150 kbp のゲノム領域の重複が生じていることを発見し、これによって形質が生じている可能性を見出した。また、コブの形成には *Wnt1* の発現が必要十分であることを機能的に証明した。さらに、ジャコウアゲハ幼虫の突起形成を解析し、カイコのコブと同様に細胞の過剰増殖が突起形成に大きく関わっていること、また *Wnt1* が突起領域でのみ強く発現していることを見出し、幼虫体表の突起形成メカニズムが鱗翅目昆虫で広く保存されている可能性が示された。

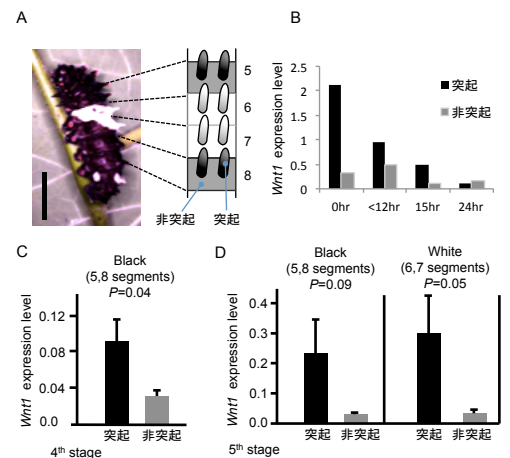


図8. ジャコウアゲハにおける *Wnt1* の発現解析

A) ジャコウアゲハ幼虫と突起の模式図 B) 1 齢期における *Wnt1* の発現 C) 4 齢期における *Wnt1* の発現 D) 5 齢期における *Wnt1* の発現。ジャコウアゲハでは幼虫期を通して *Wnt1* の発現が突起で高い。Scale bar, 10mm.