

論文審査の結果の要旨

氏名 枝吉 美奈

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。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こなかった。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。本研究はこのような鱗翅目昆虫の幼虫に広く見られる突起形成の分子機構や進化プロセスを解明する手がかりとしてモデル生物であるカイコの自然突然変異系統コブ（*K*）に着目し、そのメカニズムの一端を解明した。

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。先行研究において連鎖解析により *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**）に絞り込まれたが、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。**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、**K:440 kbp** 内に存在する 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、これをきっかけに *K* のゲノムを詳細に解析したところ、11 遺伝子を含む約 150 kbp の領域がコブ系統のゲノムでのみ重複していることを発見した。

また、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 齢幼虫での各候補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 遺伝子は WT に比べてそれぞれ約 35、20 倍発現が上昇していた。逆に、*pipe* 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が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おり、コブの形質に影響を与えている可能性

が高いことを示した。

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。*L* の原因遺伝子は *Wnt1* であることから、私は *Wnt1* 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追求した。まず、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 (*KK, +p/+p*)、斑紋のみが見られる WT (*+K/+K, +p/+p*)、斑紋が生じない N4 系統 (*+K/+K, p/p*) 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。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認した。*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。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。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。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を機能的に証明した。

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た。その結果、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を示した。

以上 1,973 字