博士論文(要約)

鱗翅目昆虫幼虫の突起形成に関する分子生物学的研究

枝吉美奈

博士論文

鱗翅目昆虫幼虫の突起形成に関する
分子生物学的研究

平成 28 年　6 月　博士（生命科学）

東京大学大学院　新領域創成科学研究科

先端生命科学専攻　遺伝システム革新学分野

枝吉美奈

1章　序論

地球上の生物は周囲の環境に適応するため、生存に有利な形質を獲得してきた。中でも地球上で最大の種数を誇る昆虫は体の外皮構造を多様に変化させることで、外敵や獲物を欺く多様な生存戦略を可能にしている。例えば、ゴマダラチョウ（*Hestina assimilis*)の幼虫は特定の体節に突起構造を作ることで植物の新芽に擬態し、捕食者の目を逃れることが知られている（Fig. 1A)。一方で、同じ突起構造でもジャコウアゲハ（*Byasa alcinous*)の幼虫では全身に赤や白の目立つトゲ状の突起を生やすことで、捕食者に自らが毒を持つことを警告しているといわれている（Fig. 1B)。また、シンジュサン（*Samia cynthia pryeri*)）も背面部にトゲ状の突起を多数形成することで捕食者から身を守っていると考えられる（Fig. 1C)。飛翔能力のある成虫や硬い外皮や繭に覆われている蛹などに比べると、鱗翅目昆虫の幼虫は捕食圧が高いと考えられ、色と突起を組み合わせることで巧みに周囲の環境に溶け込むように擬態したり、毒々しい色彩や棘状の突起などを作ることで捕食者を威嚇する例が多く見られる（Sherratt and Beatty, 2003、Prudic, 2007)。このような生存戦略にとって重要で、また多様な外皮構造が生じた理由としては、外皮形態の変化そのものは生存に対し深刻な影響を及ぼさないために形態・色彩のバリエーションが生じても許容されやすかったためなのかもしれない。昆虫が色彩や紋様を変化させる機能的な役割や分子的背景は調べられているものの（Wiklund and Sillen-Tullberg, 1985、Grant, 2007、Futahashi and Fujiwara, 2008a,b、Futahashi *et al.*, 2012）、現存する著しい外皮形態のバリエーションがどのように獲得されてきたのか、またその獲得にどのような遺伝子が関わるのかについてほとんど明らかになっていない。鱗翅目昆虫の幼虫の表皮は外皮（クチクラ）とこれを裏打ちするように整然と並んだ一層の真皮細胞により構成されるが（Goldsmith and Wilkins, 1995、Fig. 2)、特定の領域が隆起し立体的な突起構造がどのように形成されるかは、ほとんどわかっていない。興味深いことに、鱗翅目幼虫の突起の形

状や本数、またそれらがどの体節に形成されるかは種によってさまざまであるものの、突起が形成される位置はほぼ決まっている（Fig. 1)。また、キアゲハ（*Papilio machaon*)の幼虫など突起を形成しない種でも、突起が形成される同じ位置にスポット状の斑紋が生じる例が多数見られる（Yamaguchi *et al*., 2013)。このことから、鱗翅目昆虫の幼虫では突起ができる領域の真皮細胞には突起や斑紋を形成しやすい性質があり、個体発生の上で何らかの保存されたメカニズムがある可能性が考えられ興味が持たれた。

このような鱗翅目昆虫幼虫の外皮構造の進化に関わる遺伝子の手掛かりを得るモデルとして、私はカイコ突然変異体コブ（*K: Knobbed*）に着目した。カイコ（*Bombyx mori*)は5000年以上前に野生種であるクワコ（*Bombyx mandarina*）から家畜化されたと推定される昆虫であり、絹糸の生産のために人によって飼育されてきた長い歴史を持つ(村上, 1992)。長年に渡る飼育や品種改良の結果、他の鱗翅目昆虫には見られない多数の突然変異体が単離され現在まで系統維持されてきた。古くから行われてきた遺伝学的研究から、大部分のカイコの変異系統は連鎖地図上の一遺伝子座に支配される形質としてマップされている（http://shigen.nig.ac.jp/silkwormbase/linkage_map.jsp)。一方、2008年にカイコの全ゲノム解析のデータが公開され(The International Silkworm Genome Consortium, 2008)、ポジショナルクローニングによりこれら突然変異体の原因遺伝子を特定することが容易となった。近年ではトランスジェニック系統作成手法の確立など遺伝子工学的手法も整備され、これらを利用することでカイコ幼虫の豊富な突然変異系統の原因遺伝子が次々と明らかとなり、新規遺伝子（もしくは既知の遺伝子）の機能が報告されている（Futahashi *et al*., 2008c、 Fujii *et al*., 2012、Ito *et al*., 2012、Wang *et al*., 2013、Yamaguchi *et al*., 2013、Yoda *et al* ., 2014、Yuasa *et al*., 2016)。*K*は中国由来の一化性品種である龍角を起源とするカイコの突然変異体の一つである（平塚, 1965)。*K*は幼虫の外皮構造のみに異常が見られる変異体で、幼虫の第2，3，5，8体節の背面部にコブ状の突起を生じる（Fig. 1D)。ま

た、*K*遺伝子は第 11 染色体の一遺伝子座、25.4 cM に位置する優性の遺伝形質であることが知られている（田中, 1952）。*K*における突起は自然界で見られる突起より大きく丸い特殊な形状をしているものの、突起を生じる位置は自然界で多く見られる突起とほぼ同じ場所である。このことから、*K*の原因遺伝子(*K*遺伝子)の同定によって、鱗翅目昆虫の幼虫皮膚の突起構造の形成・進化に関わる分子的背景の情報やヒントが得られると期待された。一方、*K* 遺伝子は体色に関する他の変異系統と相互作用することが知られる。*K* を体の各体節に一対ずつ褐色斑紋を生じる変異体褐円（*L*）と交配すると、次世代の幼虫個体の斑紋部全てがコブ状に隆起する（Fig. 1E)。一方、外皮全体が黒く着色する変異体黒縞（p^s）と交配するとコブの隆起が抑制される。これらの着色に関する遺伝子に関しても、近年解析が進められた結果、褐円（*L*）に関しては、その原因遺伝子が Wnt シグナルのリガンドをコードする *Wnt-1* であることが明らかとなっている（Yamaguchi *et al*., 2013）。また黒縞（p^s）に関しても、新規の転写因子 Apt-like が原因遺伝子であることが示されている（Yoda *et al*., 2014）。一見無関係と思われるこれらの変異体が相互に影響しあっている分子的背景についてはこれまでほとんどわかっていないが、*K*遺伝子を明らかにすることにより、形（突起）と斑紋（スポット斑紋）の発生上の関係が明瞭になると期待される。また、*Wnt-1*や *apt-like* の関与する遺伝子ネットワークに *K* 遺伝子がどのように関与するのかに興味がもたれる。一方、カイコの *K* と *L* の関係は、野生におけるジャコウアゲハとキアゲハの幼虫の警告的な突起や色の相同なパターンを想起させる。つまり、ジャコウアゲハの幼虫では各体節に複数の毒々しい突起構造が見られるのに対し、キアゲハではほぼ同じ位置に黄色いスポット紋様が見られるのである。自然界に存在する幼虫の突起は構造だけでなく色を同時に変化させることも多く、突然変異体 *K*、*L*、p^s をモデルとするシステムは、このような適応進化のメカニズムを解明するのに大きなヒントを与えると思われる。

先行研究（山口　博士論文, 2009）において、カイコ 1477 個体を用いて連鎖解析をベ

ースとしたポジショナルクローニングが行われ、*K*のゲノム上の責任領域は第 11 染色体の約 440 kb の領域に絞り込まれたが（Fig. 3)、これよりも責任領域を内側に絞り込むことができなかった。この原因を検証したところ、*K* の責任領域付近では遺伝距離当たりの物理距離が他の第 11 染色体上の領域と比べ大きいため、組み換えが起こりにくい領域であることがわかった。このことから、連鎖解析によるこれ以上の責任領域の絞り込みは困難なため、私はこの 440 kb 上に存在する 21 個の遺伝子の中から、配列解析・発現解析・機能解析を行うことで原因遺伝子を 1 つに絞り込もうと考えた。鱗翅目昆虫幼虫の皮膚構造は詳細に解析されているが、幼虫の突起構造が生じる際の真皮細胞の動態に関する知見は極めて乏しい。*K* 変異体においては、コブが生じる領域の電子顕微鏡や共焦点顕微鏡を用いた観察が行われており、コブの形成には真皮細胞の異常増殖と形態異常が深く関与している可能性があることが報告されている（芦野, 1940、 長島ら, 1959、Shimura *et al.*, 2009b、2011、2012)。しかし、なぜ特定の体節や体節内の領域だけでコブが形成されるのか、この現象に真皮細胞がどのように関わっているのかは全くわかっていない。また、隆起が形成される領域において細胞数がどう変化しているのかについても詳細はわかっていない。現時点では、*K* 系統の突出構造形成のメカニズムは、包括的に理解するに至っていない。そこで、コブにおける細胞の増殖頻度に関しても解析し、スクリーニングの結果により得られた*K*の原因遺伝子や､褐円(*L*)の原因遺伝子である *Wnt1* との関係性を明確にすることで、一様な構造の真皮細胞に隆起を形成するメカニズムを明らかにしていきたいと考えた。

さらに本研究では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も適用できるかを検証しようと考えた。これまで、ジャコウアゲハ幼虫の突起がどのように形成れるのかは全く知られていなかった。そこで、まずジャコウアゲハにおける突起の発生過程を詳細に調べた。さらに RNA sequencing 解

析を行い突起形成に関わる遺伝子を探索し、Kにおける解析結果と比較検証した。

2章　材料と方法

実験材料と飼育

カイコの系統

カイコ *Bombyx mori* の標準系統（野生型：WT）として、姫蚕（*p*: ひめこ）のN4系統および、形蚕（*+p*: かたこ）のp50系統を用いた。N4系統は当研究室で継代飼育しているものを用い、p50系統は東京大学大学院農学生命科学研究科の嶋田透先生よりご提供いただいた。また、コブ(*K*)と褐円(*L*)の表現型を有する系統としてそれぞれn51系統、g01系統を、九州大学大学院農学研究院遺伝子資源開発研究センターの伴野豊先生よりご提供いただいた。本研究ではn51系統の*K*遺伝子座以外の遺伝的背景を変えた2種類の系統を用いた。一つは、n51系統の*K*の表現型を有する雄個体と、N4系統の雌個体を掛け合わせる方法で16世代以上交配させた集団であり、もう一方は、n51系統とpSm872系統（東京農工大学、蜷木先生）を交配させ、この集団内でコブの大きな個体を選抜し継代飼育したもの（E001系統）である。幼虫は室温25 ºC、長日条件下（16時間明期・8時間暗期）で、人工飼料（Silkmate, NOSAN, シルクメイト原種1-3s）を与え継代飼育した。

ジャコウアゲハ

ジャコウアゲハ *Byasa alcinous* は東京大学本郷キャンパス内（卵～5齢幼虫）で採集したのもの、もしくは蝶館カビラ（沖縄）から購入した成虫を研究室内で継代飼育して用いた。幼虫は室温25 ºC、長日条件下（16時間明期・8時間暗期）で、東京大学柏キャンパス内で採取したウマノスズクサ（*Aristolochia debilis*）及び、蝶館カビラ（沖縄）から購入したオオバウマノスズクサ（*Aristolochia kaempferi*）を餌として与えた。

カイコ幼虫のステージング

ステージングは、脱皮期における気門の変化を指標化した Spiracle Index（Kiguchi and Agui, 1981）に基づいて行った。気門の変化（spiracle change）は、鱗翅目昆虫幼虫の脱皮期の各時期に応じて目に見える変化であり（Truman *et al.*, 1973)、古いクチクラを通して見える新しい気門の形態により、一ステージ（脱皮から次の脱皮まで）を 10 個（A, B, C1, C2, D1, D2, D3, E1, E2, F ）に分けることができる(Fig. 4)。この指標に従ってサンプリングすることで、わずかな時間変化で体内環境が大きく変化する脱皮期直前、及び、脱皮期の個体差を最小限にとどめることが期待できる。

カイコの幼虫は孵化後（1 齢）から 4 度の脱皮を経て、終齢（5 齢）になる。各ステージは餌を食べて動き回る時期（「令」または、「Inter-molt」）と、脱皮の準備をする時期（「眠」または、「Molt」)に分けられる。脱皮期の初めには、Head Capsule Slippage（HCS）と呼ばれ、新しく形成された頭部が旧頭部の外皮を押し下げるために外部から観察できるようになる時期がある。この HCS を脱皮期初期の形態マーカーに用いて令と眠を識別した。HCS は、Spiracle Index における D2 期後期から D3 初期の間に相当する。

真皮細胞の観察

個体の解剖は、氷上に置いた解剖台（パラフィンをシャーレ中に固めて作成したもの）に個体の腹部を上にして針で固定後、Phosphate Buffered Saline (PBS ;10 mM phosphate buffer, 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4)で満たし実体顕微鏡下（Leica, M165 FC）で

行った。個体は予め氷上に置き冷温麻酔しておいた。腹部の表皮を解剖用ハサミで切開した後、ピンセットで中腸、気管、絹糸腺、生殖腺等の器官を除去し、ピンセットを用いて真皮細胞を極力傷つけないように、真皮細胞に付着している脂肪体と筋肉は可能な限り取り除いた。皮膚組織は PBS で 1 度洗浄した後、4% paraformaldehyde（PFA）で 2 時間固定した。その後、サンプルは PBS で 3 回洗浄し、終濃度が 1 μg/ml になるように PBS で希釈した 4',6-Diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI, Wako, 28718-90-3) を添加して核を染色し、再び PBS で 3 回洗浄した。そして、皮膚組織はスライドガラス上でグリセロール溶液（80% Glycerol with 2% n-propyl gallate）でマウントし、共焦点レーザー顕微鏡システム（OLYMPUS, Fluoview FV1000）を用いて蛍光画像を取得した。

<u>免疫組織化学（免疫染色、IHC)</u>

1 次抗体は Anti-phospho-Histon H3 (Serin10), mitosis marker (rabbit polyclonal IgG) (Merck Millipore, 06-570)、2 次抗体は Alexa 488 conjugated anti-rabbit (Invitrogen, A-11034)を使用した。

幼虫の皮膚組織は上述と同様の手順で解剖した後、PBS で洗浄し、4%PFA を用いて室温にて 10－30 分間固定した後、0.5% TritonX に浸し 30 分間静置して透過処理をした。次に、Blocking Solution 中（5% Goat Normal Serum（GNS）を含む PBS）で 30 分間静置した。その後、PBSS(0.01% Saponin を含む PBS)で 10 分 3 回洗浄し、1% GNS を含む PBSS に一次抗体を添加して 1 時間以上室温に静置した。その後、組織を PBSS で 10 分 3 回洗浄し、二次抗体（5% GNS を含む PBSS）を添加して 1 時間静置した。細胞骨格を染色する場合には二次抗体と同時に Alexa 555 conjugated phalloidin(Invitrogen, A34055)を終濃度が

0.02 U/μl となるように加えた。再び、組織を PBSS で 10 分 3 回洗浄し、上述と同様に、DAPI で核染色した。皮膚組織はスライドガラス上でグリセロール溶液（80% Glycerol, 2% n-proxylgallate）でマウントし、共焦点レーザー顕微鏡を用いて 2 次抗体の Alexa488 と DAPI の 2 色同時観察または 2 次抗体の Alexa488 と phalloidin の Alexa555、DAPI の 3 色同時観察を行った。

<u>細胞周期 S 期の検出</u>

真皮細胞の S 期の検出は、カイコでは 4 齢、ジャコウアゲハでは 1 齢の幼虫個体において、チミジンアナログであるエチニルウリジン（EdU）の取り込みを指標に行った。カイコの幼虫個体は 10 分間氷上で冷温麻酔し、背側の皮膚に傷をつけないようにするため、第 6 体節と第 7 体節の腹側の節間膜からマイクロシリンジを使用して、濃度 1 mM の EdU 溶液を一個体につき 5 μl ずつ体液中にインジェクションした。インジェクションの後、個体には餌を自由に食べさせ、3 時間後に解剖した。ジャコウアゲハの個体ではカイコ同様に氷上麻酔後、第 6 体節と第 7 体節の腹側の節間膜からマイクロインジェクター FemtoJet (Eppendorf) で、EdU 溶液(1 mM)を 0.5 μl 程度を体液中にインジェクションした。ガラス針は、芯入りガラス管（NARISHIGE, G-1）を、プーラー（NARISHIGE, PP-830）を用いて加工した。インジェクション後の個体には餌を自由に食べさせ 14、24 時間後に解剖した。

上述と同様に解剖した後、PBS 中で摘出した皮膚組織を洗浄し、4% PFA 溶液中で 4 ℃下に置き、一晩固定した。さらに室温で 15 分間固定し、3% Albumin, from bovine serum (BSA) で 2 回洗浄し、0.5% TritonX 中で 20 分間静置し透過処理を行った。EdU の検出には Click-iT EdU Alexa Fluor 488 imaging Kit (Life Technologies, C10083)の添付のプロト

コルに従って Click-iT 反応を行った。その後、皮膚組織を 3% BSA、及び、PBS で洗浄し、上述のと同様に、DAPI を用いて核染色し、EdU に共有結合した Alexa 488 と DAPI の蛍光を共焦点レーザー顕微鏡で 2 色同時観察を行った。

<u>コブの大きさ及び体の大きさの測定</u>

K 系統ホモ（*K*/*K*）、*K* 系統ヘテロ（*K*/+）、WT（+/+）が混在する同じ親を持つ集団（同一の蛾区）の中から同じ発生ステージの個体を無作為に選んで-80 ºC で保存した。全ての個体について、Figure 9 C で示したように横方向の同じ角度から写真撮影した。撮影した画像はプリンターで印刷し、紙面上で、コブの最も高いところから気門の中心までの距離を定規で測定し、コブの大きさの指標とした。体の大きさの指標としては体重を用いた。

<u>塩基配列の解読</u>

候補遺伝子の塩基配列は、PCR により適切なプライマーを用いて増幅した産物を、ダイレクトシーケンスを行って解読した。外来遺伝子の強制発現系等に使用したプラスミドは、精製したプラスミドを 20－50 ng 使用し配列確認した。シーケンス反応には、BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI, 433745) を使用し、ジェネティックアナライザ（ABI, 3130xl）で塩基配列を決定した。得られた配列データは、VectorNTI Contig Express (InforMax) または Demo version Sequencher 4.8 (Gene Codes Corp)を用いて解析した。

ゲノム DNA の抽出

ジェノタイピングに使用したゲノムは以下の手順で調製した。カイコ幼虫の 4 齢個体を氷上に置き PBS で満たした解剖皿に針で固定した後、腹部の表皮を解剖用ハサミで切開し、ピンセットで中腸を除去し、腹脚を含む腹部の皮膚組織を 3－5 体節分摘出した。摘出した皮膚組織に DNA 抽出バッファー（150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 0.1% SDS, 100 µg/ml Proteinase K (MERCK, 1.24568.0100))を 500 µl 添加して、1.5 ml のサンプルチューブ内で火を使って先を溶かして丸めたブルーチップを使用して組織を十分にホモジナイズした。次に、50 ºC で一晩放置し、9100 g、5 分間、4 ºC で遠心分離し未消化の組織を沈殿させて除去し、上清を新しい 1.5 ml チューブに移した。そこに等量の Tris 飽和フェノール（pH 8.5）を添加して、2 時間から一晩、室温でゆっくりと転倒混和させた。その後、2300 g、15 分間、4 ºC で遠心分離し、上層を新しい 1.5 ml チューブに移した後、等量の phenol chloroform (phenol：chloroform、1：1)を添加し、20~40 分間反転させながら攪拌した。その後、20400 g、15 分間、4 ºC で遠心分離し、上層を新しい 1.5 ml チューブに移した。そこに等量のイソプロパノールを加え攪拌した後、室温で 10 分間静置し、5800 g、5 分、室温で遠心分離した。沈殿物は 70%エタノールで洗浄し、乾燥させた後、50 µl の TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH8.0)に溶かし 4 ºC にて保存した。

遺伝型の決定（ジェノタイピング）

先行研究（山口　博士論文, 2009）で、*K* の責任領域 440 kb 内に存在する候補遺伝子のひとつである *pipe* のイントロン内において *K* 系統特異的に 100 bp の挿入が見つけられた。

この挿入配列を挟むように設計したプライマーセットを PCR マーカーとして利用した。PCR のテンプレートには上述の方法に従い調製したゲノム DNA を用いた。PCR 反応は、Ex Taq(TaKaRa, PR001)を用いて各 10 µl のスケールで行った。プライマーはフォワードおよびリバースプライマーを各 1 µM、テンプレート DNA を 1 µl 加え、添付のプロトコルに従って酵素およびバッファーを加えた。95ºC 2 分、95 ºC 15 秒 55 ºC 30 秒 72 ºC 1 分間を 30 サイクル、72 ºC 4 分間の反応を、サーマルサイクラー（TaKaRa, DICE）で行った。各反応液から等量（3 µl)を 2%アガロースゲル電気泳動で分離し、エチヂウムブロマイド染色し可視化した。PCR 産物のバンド形成のパターンにより、*K* 系統ホモ(*K/K*)かヘテロ(*K*/+)かを判断した。ホモ（*K/K*）ならば単一のバンドが、ヘテロ(*K* / +)ならばホモ(*K* / *K*)と同じ分子量のバンドおよび、100 bp 小さいバンドの二種類が検出されることで区別した。

RNA 抽出・cDNA 合成

幼虫の解剖は実体顕微鏡下で行った。幼虫個体を氷上に置き PBS で満たした解剖皿に針で固定した後、腹部の表皮を解剖用ハサミで切開し、目的の皮膚組織を摘出した。皮膚組織を摘出する際は真皮細胞を傷つけないように注意し、筋肉、脂肪体をできる限り除去した。摘出した皮膚組織は PBS で洗浄した後 1.5 ml チューブに移し、400 µl の TRI reagent (Sigma, T9424)中で先を丸めたブルーチップを用いてホモジナイズした。その後ホモジナイズされた組織は、添付のプロトコルに従い、5 分、室温で静置し、1/5 量の chloroform を添加して 15 秒間ボルテックスし、20400 g、10 分、4 ºC にて遠心し、上層を新しい 1.5 ml チューブに移した。そこへ、等量の isopropyl alcohol を添加して転倒混和し、10 分間室温に置いた。その後、20400 g、20 分、4 ºC にて遠心し、沈殿物を 70% ethanol で洗浄し、10 µl の Nuclease Free Water (Ambion, AM9932)に溶解した。混入している DNA を除去

するため、DNaseI (TaKaRa, 2270)を 2.5 unit 添加し、37 ºC で 15 分間反応させて消化した。次に、反応液に 100 µl の phenol chloroform (phenol：chloroform、1：1）を加え、1 分間ボルテックスし、20400 g、5 分、4 ºC にて遠心し、上清を新しい 1.5 ml チューブに移した。その後、上清を ethanol 沈殿し、沈殿物を 70% ethanol で洗浄した後、11.5 µl の Nuclease Free Water に溶解し RNA 溶液とした。このうち 1.5 µl を用いて分光光度計 NanoDrop D-1000 (Thermo Scientific)で RNA の濃度を計測した。

抽出した RNA 溶液 （Total RNA）を鋳型として First-Strand cDNA Synthesis Kit (GE ヘルスケア, 27-9261-01)を用いて付属のプロトコルに従い cDNA を合成した。cDNA 合成は、1 µg 分の Total RNA にキットに付属の N6 ランダムプライマーを添加して 37 ºC、1 時間の条件で逆転写反応を行った。そして、90 ºC、5 分で逆転写酵素を失活させ、150 µl の DDW（deionized distilled water）を用いて希釈し-20 ºC で保存した。

<u>RNA-sequencing</u>

目的の領域からサンプリングした RNA は上述の方法で精製し、さらに RNA に phenol の混入を防止するために、RNeasy® Mini Kit（QIAGEN, 74104）を用いてクリーンアップした。200 ng から１µg の total RNA から TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation Kit（Illumina,RS-122-2101）を用いて RNA-sequence 用のライブラリーの作成を行った。方法は TruSeq RNA sample preparation, the low throughput protocol, Illumina に従って作成した。ライブラリーの作製手順は以下に示した。

まず total RNA から mRNA を精製するために、poly T オリゴヌクレオチドが付加されたキットに付属のマグネットビーズを用い、polyA を保持した mRNA を特異的に精製した。

polyA mRNA に Fragment, Prime, Finish Mix (FPF、キットに付属)を加え、加熱により300bp ほどの長さになるようにフラグメント化した。フラグメント化した mRNA をテンプレートとしてキットに付属の逆転写酵素とランダムプライマー（ヘキサマー、dN6）を用いて、サーマルサイクラーで逆転写反応を行い first strand cDNA を合成した。次にRNaseH、DNA polymerase、DNA Ligase を用いて RNA を分解後、相補鎖 DNA を合成し、cDNA とした。必要な長さの cDNA を選別するため、cDNA は AMPure XP beads（キットに付属） を用いて精製した。end repair と A-tailing を行い、続いて両末端にアダプターを結合させた。インデックス付きのアダプターを付加することにより各サンプルを区別できるようにした。その後、AMPure XP beads による精製を二度行った後、98 ºC, 10 秒, 60 ºC, 30 秒, 72 ºC, 30 秒で 10 サイクル PCR 反応を行い、DNA 断片を増幅した。Agilent 2100 bioanalyzer and Agilent High Sensitivity DNA kit (Agilent Technologies, 5067-4626)を用いてサンプルが増幅・断片化できているかを評価した。cDNA は、KAPA SYBR Fast qPCR Kit (Nippon Genetics, KK4600)を用いて定量的 RT-PCR を行い、希釈系列を用いることによって正確な濃度を測定し、シーケンス用のライブラリーとした。それぞれのライブラリーは、定量結果をもとに 2 nM となるように濃度を揃えた。カイコの解析では n=1 で合計 4 ライブラリー作成した（4 齢脱皮後 0、15 時間の *K* 系統のコブを含む領域、N4 系統の相当領域)。また、ジャコウアゲハの解析ではライブラリーはそれぞれの条件で n=3（各 10 個体以上）となる様に、合計 12 ライブラリー作製した（1 齢孵化後 0、15 時間の突起部、非突起部を 1 サンプルあたり 10 個体以上混合した)。ライブラリーのシーケンスには Illumina HiSeq 2000 のプラットフォームを用いた。シーケンスはカイコのサンプルでは single-read で、ジャコウアゲハでは paired-end で 101 bp をシーケンスした。1 レーン当たり 8 から 9 ライブラリーを一緒にシーケンスを行った。

カイコサンプルをシーケンスしたリードは Tophat v1.4.0 を用いてカイコゲノム

RAMEN assemble scaffolds and contigs(2008.4) (http://sgp.dna.affrc.go.jp/pubdata/genomicsequences.html)に mapping した。Cufflinks v2.2.1(http://cole-trapnell-lab.github.io/cufflinks/)を用いてエキソンイントロン構造を抽出した。得られたデータは IGV (https://www.broadinstitute.org/software/igv/log-in)を用いて解析した。

ジャコウアゲハサンプルをシーケンスしたリードは Trinity *de novo* transcriptome assembly software packages (http://trinityrnaseq.sourceforge.net/) （Grabherr *et al*., 2011）を用いてアセンブルし、transcriptome 配列を構築した。得られた contigs は NCBI nonredundant protein sequence database に対して BLASTX 検索を行うことによってアノテーションした。また、構築した transcriptome 配列をレファレンスとしてサンプルごとに Bowtie 0.12.8 (http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml)を用いて mapping し（Langmead and Salzberg, 2012）、mapping されたリード数をもとに発現量の算出を行った。発現量は RPKM value（Reads Per Kilobase of exon Model per million mapped reads）として算出した。また、突起部と非突起部で発現が変動している遺伝子を統計解析ソフト R version 3.0.1 と解析パッケージ DESeq (Anders and Huber, 2010)を用いて抽出した（FDR<0.05）。さらに注目すべき遺伝子を絞り込むために、Reciprocal Blast Best Hit 法(Posnien *et al*., 2014)によって既知の遺伝子を抽出した。ジャコウアゲハの transcriptome 配列と、詳細にアノテーションがなされている三種のデータベース（ショウジョウバエ (dmel-all-gene-r5.52.fasta.gz)、カイコ (Geneset-A FASTA file (Nucleotide) (http://sgp.dna.affrc.go.jp/ComprehensiveGeneSet/))、アゲハ (Pxuthus.v1.0.0.transcriptome.fa (http://papilio.bio.titech.ac.jp/genome-browser/cgi-bin/index.cgi?org=px)) を使って双方向に BLAST 検索を行い、相互に最上位に来る組を選択した。

定量的 PCR

PCR のテンプレートには上述の通りに調製したゲノム DNA を用いた。定量的 PCR には、StepOne™ Real-Time PCR System（ABI, 01-SP1）を使用し、添付の解析ソフト StepOne™ Software v2.1 に従って、相対標準曲線法により解析を行った。PCR 反応には、Power SYBR Green PCR Master Mix (ABI, 4367659) を使用し、95 ℃ 10 分、95 ℃ 15 秒 60 ℃ 1 分間を 40 サイクル、95 ℃ 15 秒 60 ℃ 1 分間 95 ℃ 15 秒間の条件で行った。カイコゲノムに 1 コピーしか存在しないことが知られる遺伝子 *Distalless*（*Dll*）の配列の増幅量を用いて各配列の増幅量をノーマライズした。定量的 PCR に用いたプライマーは、ゲノム上の約 100 bp の範囲を挟むように設計した。用いたプライマーセットのリストを Supplementary Table. 1 に示した。

定量的 RT-PCR

上述の方法に従い、皮膚組織から cDNA を調製し、これをテンプレートに用いた。定量的 RT-PCR には、StepOne™ Real-Time PCR System (ABI, 01-SP1) を使用し、添付の解析ソフト StepOne™ Software v2.1 に従って、相対標準曲線法をにより解析を行った。PCR 反応には、Power SYBR Green PCR Master Mix (ABI, 4367659) を使用し、95 ℃ 10 分、95 ℃ 15 秒 60 ℃ 1 分間を 40 サイクル、95 ℃ 15 秒 60 ℃ 1 分間 95 ℃ 15 秒間の条件で行った。内部標準としてカイコ *Ribosomal protein L3*（*BmRpL3*）を用いた。定量的 RT-PCR に用いたプライマーは、複数のエキソンにより構成される遺伝子の場合はイントロンをまたぐ二つのエキソン領域内に設計し、プライマーが結合する塩基配列が n51 系統

と N4 系統間で同一であることを確認して使用した（単行本または雑誌掲載等の形で刊行される予定のためインターネット公表できません。）。定量的 RT-PCR に用いたプライマーは Supplementary Table. 2、3 に示した。

半定量的な RT-PCR 法

目的の遺伝子の発現量が低く、定量的 RT-PCR による検出が困難な場合には、適切なサイクル数で Ex Taq（TaKaRa, PR001）による PCR 反応を行い、発現量を半定量的に相対比較した。cDNA は上述のとおり調製した。PCR 反応は、各 10 µl のスケールで行った。プライマーは、フォワードおよびリバースプライマーを各 1 µM ずつ、テンプレート cDNA を 1 µl 加え、添付のプロトコルに従って酵素、バッファーを添加し、95 ºC 2 分、95 ºC 15 秒 55 ºC 30 秒 72 ºC 1 分間を 20, 23, 35 サイクル、72 ºC 4 分間の反応を、サーマルサイクラー（TaKaRa, DICE）で行った。各反応液から等量（3 µl）を 2%アガロースゲル電気泳動で分離し、エチヂウムブロマイド染色で可視化したとき PCR 産物が単一バンドとして増幅されていることを確認し、それぞれの増幅産物がプラトーに達しない適切なサイクルで比較した。解析に用いたテンプレートの RNA 濃度は、内部標準である *BmRpL3* のバンドの濃度を指標にし、それに対する目的遺伝子の *Wnt1* のバンドの濃度から、発現量の相対比較を行った。ここで使ったプライマーは Supplementary Table. 2 に示した。

piggyBac による外来遺伝子の強制発現

piggyBac により体細胞で遺伝子組み換えを行い、カイコ A3 promoter で目的の遺伝子

のタンパク質を真皮細胞で発現させるためのベクタープラスミド「pPIG A3;（各遺伝子） A3;GFP」は以下の手順で作成した。

まず、ベクターに挿入する各遺伝子の ORF 全長を PCR で増幅した。PCR 反応のテンプレートには n51 系統由来のカイコ（*K*/*K*）幼虫の皮膚組織から合成した cDNA を用いた。ここで使ったプライマーは Supplementary Table. 4 に示した。PCR 反応は、iProof™ High-Fidelity DNA Polymerase（Bio-Rad, 172-5300）を用いて各 50 µl のスケールで行った。プライマーは、フォワードおよびリバースプライマーを各 0.5 µM、テンプレートを 15µl 加え、添付のプロトコルに従って酵素とバッファーを添加し、98 ℃ 3 分、98 ℃ 10 秒、55 ℃ 30 秒、72 ℃ 40 秒を 32 サイクル、72 ℃ 10 分の反応をサーマルサイクラー（TaKaRa, DICE）で行った。PCR 産物は、GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma, NA1020-1KT）を用いてプロトコルに従って、精製した。

田村俊樹博士（独立行政法人農業生物資源研究所）からご供与いただいた pPIGA3GFP (Tamura *et al.*, 2000）を基に作製されたプラスミド pPIG A3;DsRed A3;GFP (Ando and Fujiwara, 2013）上の DsRed を、上のように増幅した目的遺伝子の ORF 断片に置換するために、プラスミドベクターを BglⅡ と NotⅠ で切断した。その後、0.8% アガロース電気泳動によって DsRed とそれ以外のベクター部分を分離させ、ベクター部分を切り出し精製した。そして、精製したベクター部分とインサートとなる遺伝子の ORF 断片を In-Fusion™ Advantage PCR Cloning Kit (Clontech, 639616）を使用し連結した。このようにして DsRed の代わりに目的遺伝子の ORF 全長が挿入された *piggyBac* 用のプラスミド「pPIG A3;（各遺伝子） A3;GFP」を作出した。大腸菌に形質転換後、アンピシリンを加えた LB プレートで候補プラスミドをクローン化した。さらにコロニーPCR により、目的のプラスミドを持つコロニーを選別し、ダイレクトシーケンス法により挿入された遺伝子の ORF 全長の配列が正しいことを確認した。

得られた単一コロニーを、30 ml の培地で一晩培養し、QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN, 12125) を用いて、添付のプロトコルに従ってプラスミドを精製した。得られたプラスミドを、70% ethanol で洗浄し、濃度が 4 μg/μl になるように DDW を加え保存した。

幼虫へのインジェクションには、精製したプラスミド「pPIG A3;（各遺伝子）A3;GFP」と *piggyBac* のヘルパープラスミド（pHA3PIG、独立行政法人農業生物資源研究所 田村俊樹博士）を混合して、それぞれの終濃度が 2 μg/μl になるように調製して使用した。インジェクションにはマイクロインジェクター FemtoJet (Eppendorf) を用いた。ガラス針は、芯入りガラス管（NARISHIGE, G-1）を、プーラー（NARISHIGE, PP-830）を用いて加工した。上記のプラスミド混合液をガラス針に充填し、ガラス針を実体顕微鏡下にセットしたマイクロマニピュレーター M401 (SURUGASEIKI) にセットし、幼虫の節間膜から 0.5-1.0 μl 程度体液中に注入した。インジェクションの後（3 分以内に）安藤博士が作成したエレクトロポレーター(Ando and Fujiwara, 2013)を用いて電気刺激をかけて幼虫皮膚にプラスミドを導入した（5 square pulses of 20-25V, 280 ms width）。その際、緩衝液として幼虫と電極の間には PBS の水滴を置いた。詳細な方法は Figure 17. に示した。

RNA interference

カイコ幼虫へインジェクションする siRNA は、siRNA 設計支援ソフト siDirect version 2.0 (http://sidirect2.rnai.jp/) を用いて設計した(Ui-Tei *et al.*, 2004、Yamaguchi *et al.*, 2011)。n51 系統および N4 系統における目的の遺伝子の ORF 領域の配列を取得し、この配列情報をもとに siDirect で候補となる配列を検索した。候補配列の中から、n51 系統および N4 系統で共通の塩基配列を持つものを選択した。さらに、オフターゲット効果を少な

くするために、KAIKO base の BLAST 検索機能を利用して、設計した配列のターゲット遺伝子への特異性を調べた。RNA の合成は、株式会社ファスマックに依頼した。

siRNA は、500 μM になるように Annealing Buffer (100 mM KOAc, 2 mM MgOAc, 30 mM HEPES-KOH pH 7.4) で溶解し、これをさらに 250 μMに希釈してインジェクションに用いた。カイコ幼虫へのインジェクション及びエレクトロポレーションを用いた導入方法は上述と同様である。

ジャコウアゲハ 1 齢幼虫突起の走査型電子顕微鏡を用いた観察

ジャコウアゲハ卵が孵化した瞬間を正確にとらえ、孵化後の経過時間を記録した。孵化した幼虫には餌を与え、個体を 3 時間おきにデスクトップ型走査型電子顕微鏡 Miniscope TM-1000 (HITACHI) にて観察した。幼虫は同じ角度になるようにセロハンテープで検出台に固定し、第 6 体節の突起が伸長していく様子を撮影した。その後取得した画像を解析し、突起を上から 3 つのパート (膨らみ構造、膨らみ構造～ランドマークとなる毛、毛～突起の下) に分けて長さを測定した (Fig. 25A)。

3 章　結果と考察

1 節　カイコ変異体 *K* における突起形成に関わる細胞の動態

背景

カイコ突然変異体 *K* は幼虫の第 2，3，5，8 体節の皮膚に一対のコブ状の隆起物を生じるが、各体節のコブの形は異なっている。もともと、コブの生じるこれらの体節には標準系統 (形蚕$+^p$: 以下 WT とする) で紋様があり、それぞれの紋様はその形状から第 2 体節では眼状紋、第 5 体節では半月紋、第 8 体節では星状紋と呼ばれている。コブの形成はこれらの幼虫斑紋と強く関係しており、WT の第 2，3，5，8 体節に存在する紋様部分が隆起したものと思われる(Tanaka, 1916)。過去の半月紋形成に関する研究の中で、「半月紋は半月形の特殊な原基（anlage）をもとに形成され、第 5 体節のコブに関して、*K* 遺伝子がこの原基に作用してそれを誇張させることにより生じる」と報告されている（有賀ら, 1954)。つまり、コブは異なる紋様の形をした原基をもとに形成されるため、各体節のコブは異なった形状となると考えられている。このような「紋様原基」からどのようなメカニズムでコブ状の突起が生じるのだろう？その分子機構を探るためには、まずコブを形成する細胞の動態を調べる必要がある。

一般に、皮膚の一部が異常に隆起しコブ状になる要因としては、1) コブ部で細胞増殖が過剰に起こるために細胞数が多くなる、2) 細胞増殖は正常だが個々の細胞が異常に大きくなる、もしくは 1)、2) の両方が起きるためであると考えられる。古い報告によると、コブはコブ部における細胞増殖の過多によって生じると記載されているが (芦野, 1940、長島ら,

1959)、顕微鏡写真が無いことや増殖過程についての記述が明確ではないことなどから、コブ形成時の真皮細胞の動態に関する十分な情報とは言えない。最近、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、核染色、抗リン酸化ヒストン H3 抗体による染色により、コブ部の真皮細胞の形態が観察された（Shimura *et al*., 2009b, 2011, 2012）。増殖頻度と細胞形態の関係を調べた結果、細胞の過剰な増殖がコブ部で起きている可能性が示唆された。そこで本研究では、*K* の原因遺伝子の同定に先駆けて、コブ部の真皮細胞の増殖の過程についてより詳しい情報を得ようと考えた。まず、Shimura の観察方法を参考にして、コブの外部形態と細胞増殖を解析・比較し、最終的な突起構造がどのように形成されるのかを知る手がかりを得ることにした。一方、カイコや同じ鱗翅目昆虫のタバコスズメガでは、幼虫の真皮細胞の多くは倍数化した核相をもっていることが知られているが（Kawasaki *et al*., 2001、Kato *et al*., 1987、Shimura *et al*., 2009a）、*K* 変異体のコブ部の細胞核が倍数化されているかどうかについては知られていない。そこで、S 期のマーカーを用いた観察を行い、より詳細にコブの形成過程を明らかにしたいと考えた。

結果

<u>コブの外部形態の観察</u>

前述のように、コブは第 2, 3, 5, 8 体節に見られるが、ここでは隆起が最も大きい第 5 体節のコブを観察に用いた（Fig. 5）。通常、幼虫の斑紋部以外のクチクラそのものは透明だが、尿酸が真皮細胞中に蓄積しているために体表は白く見える（Ito *et al.*, 2009)。WT の半月紋ではクチクラ部分がメラニン色素によって半月様に黒く着色される（Fig. 5B 右）。また、黒い領域にはさまれた部分には白い領域が観察できる。一方、コブにもこのような半

月紋状の黒と白の領域が見られ、さらに黒い着色部の内側に沿うようにして茶色の色素沈着が見られる（Fig. 5B)。白い領域をよく観察すると、通常の皮膚と比べ少し半透明な白色に見える。

この白い部分の面積が *K* では最も増大する。黒色部の内側の茶色の部分は WT ではわずかに見える程度だが、*K* でははっきりと観察されるまで面積が増大し、茶色部と白色部では多数のしわ状の構造物が観察された。一方、黒の着色部ではしわ状構造物は観察されなかった。また、隆起の程度については、コブの頭部側（体節の前方側）と尾部側で異なっており、尾部側になるほど垂直方向に大きく盛り上がっている（Fig. 5C)。

以上の観察から、第 5 体節のコブでは半月紋を構成している黒、茶、白色の三種類の領域のそれぞれで細胞増殖の頻度が異なる可能性が考えられた。黒色部は WT と *K* でほとんど違いが見られないことから、黒色部はコブと正常な皮膚領域との境界になっており、黒色部より内側では真皮細胞の増殖が過剰に起こり、外側は WT と同様の正常な真皮細胞で構成されている可能性が考えられた。また、コブの茶色部と白色部において多数観察されたしわ状構造物は、茶色部や白色部での過剰な細胞増殖が何らかの物理的なひずみを生み、その結果生じたのではないかと推測する。

以上の結果から、コブの外形は紋様の形状や体節内の位置による影響を受けながら、領域によって異なる複雑な細胞増殖プロセスを経て形成されている可能性が示唆された。そこで、次にコブ領域における真皮細胞の形状や動態を詳しく調べた。

真皮細胞の観察

終齢（5 齢）の真皮細胞の観察

5 齢幼虫の *K* 系統と WT の皮膚組織を摘出し、DAPI で真皮細胞の核を染色して共焦点顕微鏡を用いてその数や形状を観察した。観察は *K* のコブ部とそれに対応する WT の相当領域との比較を行った。

カイコの幼虫皮膚の各体節の中央付近（半月紋に相同な位置）には、特徴的な剛毛が数本生える領域が一対存在する(Fig. 6A : 第 5 体節を示す)。これらの剛毛はコブが形成される体節においても同様に存在しており、その位置はコブの中心付近に相当する。剛毛の根元の細胞（核）は大きいため周辺の真皮細胞（核）と見分けることができる。そこで、これらの剛毛を指標にして、*K* と WT でそれぞれ相当する領域における細胞数をカウントし比較した。その結果、WT では剛毛の間には真皮細胞があまり存在しない（71 個 : 5 齢幼虫の第 5 体節）のに対し、コブ領域では数多くの細胞（418 個 : 5 齢幼虫の第 5 体節）が観察された(Fig. 6B)。この結果は、コブ領域での盛んな細胞増殖を示唆する。

細胞周期 M 期の検出

ヒストン H3 の 10 番目のセリン残基（Ser10）のリン酸化は染色体凝集の開始と正確に関連して開始され、脱リン酸化は分裂終期の直前に完了されるため、細胞周期の M 期のマーカーとしてよく用いられる (Hendzel *et al.*, 1997)。抗リン酸化 H3 抗体 （抗 PH3 抗体）は、H3 の Ser10 のリン酸化を極めて特異的に検出することができる。そこで、抗 PH3 抗体を用いてコブ領域における M 期の細胞を検出した。

非コブ領域と比較して、コブ領域では細胞分裂する細胞が長時間にわたり多数観察される

ことが抗 PH3 抗体を用いた実験により示されている（Shimura *et al.*, 2009b）。これを確認するため、コブで最も顕著に細胞分裂が観察されていた 4 齢・24 時間の真皮細胞を同様の手法で観察した。サンプルには *K* 系統ホモ（*K/K*）を使った。

その結果、過去の報告と一致して、非コブ領域では抗 PH3 抗体ポジティブな細胞はほとんど見られなかったのに対し、コブ領域で多数観察された(Fig. 7B)。また、明視野の画像と合わせて解析すると(Fig. 7A)、抗 PH3 抗体ポジティブな細胞は、コブで皮膚の領域が最も増大して見える斑紋部の中心の白い領域（Fig. 5B 参照）に集中して検出された。一方、斑紋部の黒い領域ではシグナルは検出されなかった。

<u>細胞周期 S 期の検出</u>

EdU（5-ethynil-2'-deoxyuridine）はチミジンのアルキン修飾ヌクレオチドアナログで、DNA 合成が活発な期間に DNA 鎖に取り込まれ、銅が触媒するアルキンとアジドの共有結合反応であるクリック反応により検出できる（Kaiser, *et al.*, 2009）。ここでは、この EdU を使用し細胞周期の S 期の細胞の検出を試みた。S 期の観察には、EdU(C10337、invitrogen)を幼虫個体にインジェクションし、3 時間後に皮膚組織を摘出し、核に取り込まれた EdU を検出する方法を用いた。詳細な方法は「材料と方法」で述べた。また、インジェクションによるダメージを最小限にするために比較的個体が大きい 4 齢幼虫を用いて解析した。

K 系統ヘテロ（*K/+*）の 4 齢脱皮後 24 時間、48 時間（共に盛食期（spiracle index A 期）に相当（Fig. 3 参照））、72 時間後（脱皮期直前）の個体を用い、コブ部と非コブ部の真皮細胞を比較した。

結果はFigure 8.に示した。4齢への脱皮後、72時間までは個体が餌を食べ大きくなるが、その成長にともない、S期の細胞の頻度も増加していることが分かった。しかし、調べたどの時間においてもコブ部と非コブ部でS期細胞の頻度の差はほとんど見られなかった。

また、各時間における真皮細胞の核の大きさをコブ部と非コブ部で比較したところ、4齢では少なくとも24時間から72時間まででは大きな差は見られなかった。

<u>コブの大きさと幼虫個体の大きさの関係性</u>

コブが真皮細胞の過剰増殖により生じることはこれまでも示されてきたが、*K* の個体がコブ部でのみ細胞増殖が過剰になっているのか、もしくはコブ以外の皮膚でも同様に過剰増殖しているかは明確ではなかった。例えば、コブ（*K*）と交配させたF1は幼虫個体が標準型よりも大きくなる傾向があるという報告がある（有賀ら, 1965)。しかし、*K*の体の大きさに関しては議論があり、餌が桑葉か人工飼料かに依存する、また交配する個体の系統差によってその傾向が異なるという報告もあり（榎島・山本, 1983)、この問題に関して明瞭な結論は得られていない。そこで、本研究の *K* 系統には、*K* の原因領域近傍以外の遺伝的背景をWT（上述したときに斑紋のある+*p* をWTとしたがここでは斑紋のない *p* のN4系統を用いた）のN4系統（+/+）との戻し交配を16回以上繰り返すことにより、原因領域以外を出来る限りWT（+/+）に置き換えたcongenic系統を使用した。この系統とWTのN4系統（+/+）を比較することにより *K* 遺伝子による個体の表現型への純粋な影響を評価できると考えた。*K* 系統におけるコブの大きさと体の大きさを定量化し、*K* 遺伝子がコブ部のみに影響しているのか、それとも体全体に影響しているのかを検証することにした。

そこで、*K*系統ホモ（*K*/*K*)、*K*系統ヘテロ（*K*/+)、WT（+/+）の同時期の個体について

それぞれ 12～22 個体ずつサンプリングしコブの大きさおよび体の大きさを比較した。蛾区の違いや飼育環境の影響による個体差を最小限にするために、測定に使用する幼虫個体は、*K* 系統ヘテロ（*K*/+）同士を交配した同じ親をもつ集団（同一の蛾区）のものを使用し、個体の大きさの時間的変動が比較的少ないと考えられる 4 眠の E1 期に合わせた。同一蛾区から無作為に選出した個体について、遺伝型（*K* に関してホモかヘテロか）は PCR マーカーを用いたジェノタイピングで判断した(Fig. 9B)。ここでは、*pipe* のイントロン中に *K* 系統特異的に 100 bp の挿入が存在することを利用して、この領域を挟むようにプライマーを設計し PCR を行った（Fig. 9B)。詳細については「材料と方法」で述べた。コブの大きさについては、第 5 体節のコブの最も高いところから気門の中心までの距離を測定し、その数値を指標とした(Fig. 9C)。体の大きさの指標には体重を用いた。詳細については「材料と方法」で述べた。

結果は Figure 9.に示した。コブの大きさは *K* 系統のホモ個体（*K*/*K*）は WT と比較し 1.43 倍、*K* 系統ヘテロ（*K*/+）は WT（+/+）の 1.26 倍、*K* 系統のホモ個体（*K*/*K*）は *K* 系統ヘテロ（*K*/+）の 1.14 倍であった（ホモ（*K*/*K*）＞ヘテロ（*K*/+）＞WT（+/+））。これらの差は、ステューデントの t 検定において統計的に有意であった(Fig. 9D)。一方、体の大きさは *K* 系統のホモ個体（*K*/*K*）は WT（+/+）と比較し 1.02 倍、*K* 系統ヘテロ（*K*/+）は WT（+/+）の 0.96 倍、*K* 系統のホモ個体（*K*/*K*）は *K* 系統ヘテロ（*K*/+）の 1.07 倍であった(Fig. 9E)。体の大きさについても t 検定を行ったが、*K* 系統ホモ（*K*/*K*)、*K* 系統ヘテロ（*K*/+)、WT（+/+）のどの間でも有意な差は見られなかった。

考察

コブを形成する細胞の異常増殖について

コブ部の真皮細胞は 5 齢（終齢）では、剛毛をランドマークにした比較から、細胞数の顕著な増加が確認された（Fig. 6)。また、4 齢の脱皮後 24 時間のコブ部の M 期の細胞頻度の観察から、コブ部では周りの非コブ部の真皮細胞と比べ細胞分裂の頻度が高いことが示唆された（Fig. 7)。これらの結果は過去の報告とも合致しており、コブの形成はコブ領域での細胞が過剰に分裂・増殖するという説が支持された。コブ領域の周囲の細胞数がそれほど変わらない一方で、コブ領域の細胞数が極端に多くなって皮膚の一部が隆起すると考えられる。

コブの外部形態の観察から、コブでは斑紋の中心にある白い領域が最も増大して見られるが、同じ領域において細胞増殖が盛んに行われていることが示された（Fig. 7)。逆に黒い斑紋が見られる領域では細胞増殖は見られなかった。このことから、コブの隆起した外形は細胞増殖の盛んな領域のすぐ周囲に増殖をほとんど行わない領域が存在することで、隆起した部分にシワの多数よる構造ができるのではないかと考えられた。上記の観察は、メラニン合成系と *K* 遺伝子の相互作用を示唆する。つまり、メラニンが合成される黒色領域では細胞増殖が抑制される可能性が考えられる。実際に、幼虫全身が黒色でメラニン合成が盛んな p^S 系統と *K* 系統を掛け合わせるとコブの形成が抑制されることが知られている（有賀, 1943a、b)。

一般に鱗翅目昆虫の幼虫の真皮細胞は G2 期で停止していることが多く、脱皮するとしばらくして M 期を迎えその後 S 期を経るというサイクルを脱皮の度に繰り返していることが知られている（Kato and Oba, 1977、本田・加藤, 2005)。また、カイコの *K* ではコブ部で

非コブ部と比べて細胞分裂の M 期が WT よりも高頻度かつ長時間に亘り起こるために突起ができていることが示唆されている（Shimura *et al*., 2009b）。3 齢から 5 齢までコブ部の真皮細胞の核を観察した結果、非コブ部と比べ同じ大きさの核が主に検出され、少なくともコブ部で半分より小さな核が観察されることはなかった。もし、コブ部で細胞分裂の M 期のみが過剰に生じているとするならば、コブ部の細胞は非コブ部の細胞より分裂のたびに小さくなっていくと考えられ、このことは実際の細胞観察結果とは一致しない。このことから、*K* では細胞周期の M 期だけが過剰に多くなっているのではなく、おそらく S 期も非コブ部に比べ過剰になっているのではないかと予想される。しかし、4 齢において細胞周期の S 期の細胞の検出を行った結果、コブ部と非コブ部で S 期の細胞の頻度に大きな差は見られなかった（Fig. 8)。これは、*K* 系統のヘテロで実験を行ったために顕著な違いが見られなかった可能性が考えられ、よりコブの大きい *K* 系統ホモで同様の実験を行えば違いが見られる可能性が考えられる。また、EdU を取り込ませる時間が長いために領域特異的な違いが見られなくなってしまう可能性も考えられた。条件を変えて観察することでコブ部において S 期の細胞の頻度が増加している様子が見られるかもしれない。

<u>コブの大きさと幼虫個体の大きさ</u>

コブの大きさを調べると、ホモ(*K/K*)＞ヘテロ(*K*/+)＞WT(+/+)となっており、*K* のコブに関する表現型は原因遺伝子の数に依存して生じる量的形質である可能性が示唆された。コブ部真皮細胞における細胞増殖の頻度は *K* のホモとヘテロで比較はしていないが、コブの大きさの違いは細胞増殖の頻度に関連がありホモではヘテロよりも細胞増殖は過剰になっていると推測される。一方、*K* の幼虫個体の大きさは WT とほとんど変わりがなく、*K* 遺伝子は体の大きさにはほとんど影響を与えないことが今回示された。これにより *K* では幼

虫の皮膚全体ではなく、コブ部のみで細胞増殖が過剰になっている可能性が示唆された。

単行本または雑誌掲載等の形で刊行される予定のためインターネット公表できません。

２節　*K* 原因領域における染色体構造の異常

単行本または雑誌掲載等の形で刊行される予定のためインターネット公表できません。

3節　コブの突出領域を決定する *Wnt1*

背景

カイコの突然変異体に関する研究の歴史は古く、特に異なる遺伝子座が協調的に働いて表現型を作り出す現象は「遺伝子間の相互作用」と呼ばれ複雑で興味深い現象として注目されてきた（有賀ら, 1965）。コブ（*K*）もその一つで、第4染色体にマップされる褐円（*L*）との相互作用を持つことが知られている。褐円（*L*）は複数の体節において一対の褐色斑紋が生じる遺伝形質であり、コブ（*K*）と共存すると褐色斑紋部の全てがコブ状に隆起するようになる（Fig. 20D）。1節で述べたようにコブはWTにおいて斑紋がある体節にのみ出現する形質であり、この現象はコブと幼虫斑紋の強い関係性をさらに支持するものと捉えることができる。現在ではゲノム解読が終了し、原因遺伝子の同定が可能になり、このような「遺伝子間の相互作用」は現象の複雑さに関する興味というより、表現型を生じるための一連のプロセスにおける原因遺伝子の役割を明らかにするための良い手がかりとして注目されている。最近の研究により、褐円（*L*）の原因遺伝子は*Wnt1*であることが明らかになっており、斑紋のある各体節において*Wnt1*が高発現していることが示唆されている（Yamaguchi *et al.*, 2013）。ここでは、褐円（*L*）の原因遺伝子である*Wnt1*とコブ（*K*）の候補遺伝子との関係に焦点を当て、これまで解決されてこなかった細胞増殖異常が特定の領域のみで起きるメカニズムに迫った。

結果・考察

<u>*K*候補遺伝子の発現領域の特異性</u>

単行本または雑誌掲載等の形で刊行される予定のためインターネット公表できません。

各体節における *Wnt1* の発現

上述したようにコブ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、斑紋形成と *Wnt1* の発現、の三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 *K* 系統ホモ（*K*/*K*, $+^p/+^p$）、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から cDNA を合成し RT-PCR を行い、*Wnt1* の発現量を体節間で相対的に比較した。

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（Fig. 20)。*Wnt1* が強く発現した体節でのみ、コブもしくは斑紋が生じる一方、斑紋もコブも生じない N4 系統（$+^K/+^K$, *p* / *p*)においても *Wnt1* が発現していることが示された。Yoda (2014)は、転写因子の一つ *apt-like* が *p* 遺伝子座の原因遺伝子であることを明らかにしたが、斑紋のない *p* 系統（N4）では *Wnt1* が *apt-like* を制御できないため、下流のメラニン合成系が駆動せずに斑紋が生じないことを見出した。

このことを考え合わせると、コブの形成位置そのものは、*K* 遺伝子ではなく *Wnt1* が制御している可能性が高いと考えた。つまり、コブを生じさせる異常な細胞増殖の領域自体は *Wnt1* の領域特異的発現によって決まり、コブの形成は *K* 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。そこで、この仮説を検証するため、*K* 系統において本来はコブが生じない体節に *Wnt1* を強制発現させることによって、コブを異所的に形成できるか否かを確かめる実験を次に行った。

K 系統における *Wnt1* の異所的な発現

K 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、最近になって確立された *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. and Fujiwara, 2013、Fig. 17）。この方法では、まず目的の遺伝子を *EGFP* と同じプラスミドに入れ、その両側に *piggyBac* トランスポゼースが認識する配列（IR）を付加しておく。このプラスミドと *piggyBac* トランスポゼースのみを含むヘルパープラスミドが同時に入った細胞では、目的の遺伝子がゲノム内に組み込まれる。この方法を使うことで、幼虫個体の真皮細胞で目的遺伝子をプロモーターを介して異所的かつ恒常的に発現させることが可能になる。本研究では、HSP70 プロモーターに *Wnt1* 遺伝子を、カイコ *actin 3* プロモーターに *EGFP* 遺伝子をつないだプラスミドを作成し、*EGFP* の蛍光が見られた細胞で *Wnt1* を発現するようにした（Fig. 21A）。このプラスミドと、*piggyBac* ヘルパープラスミドを同時に 2 齢 2 日目の幼虫の体液中にインジェクションし、エレクトロポレーションで左半身の真皮細胞にプラスミドを導入した。プラスミド（もしくは後述する siRNA）は負に荷電しているため、正の電極が触れた体表に近い箇所の真皮細胞にほとんどは導入される。詳細な条件については「材料と方法」に記載した。

上記の実験の結果、本来 *K* 系統でコブが存在しない第 6, 7 体節において、EGFP の強い蛍光が複数の箇所で見られ、その場所でコブ状の隆起が 80%の確率（8/10 頭）で出現した (Fig. 21B,C)。蛍光とコブの隆起が見られた場所では、同時に黒色色素の沈着が観察された（Fig. 21E）が、これは異所的に強制発現した *Wnt1* が *apt-like* 遺伝子の発現を誘導し、さらにその下流のメラニン合成系が駆動したためと考えられる (Yoda *et al.*, 2014)。また、

蛍光は比較的少数の細胞で観察されるが、隆起や着色はその周りでも起こっているように見える（Fig. 21D,E)。これは、*Wnt1* が発現した細胞（EGFP の蛍光が見える細胞）から細胞外に分泌され、モルフォゲンとして周囲の細胞へも non-cell autonomous に働きかけた結果（Yamaguchi *et al.*, 2013）と考えられる。

一方、*K* ではない系統（$+^K/+^K$）に同様に *Wnt1* とヘルパープラスミドを導入してもコブの形成は見られなかった(Fig. 21F,G)。蛍光が見られる細胞やその周囲で黒色化が起こっているのは、上述したとおりである。従って、今回の結果から *Wnt1* は WT（$+^p$）における幼虫の斑紋の位置を決定するだけでなく、*K* 系統におけるコブの形成場所を決定していることが示された。単行本または雑誌掲載等の形で刊行される予定のためインターネット公表できません。

<u>*K* 系統における *Wnt1* のノックダウン</u>

さらに *K* 系統におけるコブの形成には *Wnt1* の発現が必要な条件であるのか否か RNAi を用いて検証した。導入には、カイコ幼虫において効率的に RNAi を行うことが可能な新規に確立されたエレクトロポーレーション法（Ando and Fujiwara, 2013、2 章参照）を使った。

K 系統の左半身のコブ領域に *Wnt1* に対する siRNA をエレクトロポレーションにより局所的に導入した。その結果、実験を行ったすべての個体（n=4）において、siRNA が導入されていない右半身（負の電極を当てた）のコブには影響は見られなかったが、siRNA が導入された左半身（正の電極を当てた）のコブの形成が抑制された(Fig. 22A)。側方部から観察しても、右半身コブと比較して左半身コブの大きさが極端に小さくなっている様子が

見られた(Fig. 22B)。また、これらの個体では、コブだけでなく同様に右半身と比較し左半身の斑紋の着色形成も抑制されていた。これは、上述したように *Wnt1* によって誘導される斑紋形成が *Wnt1* の発現抑制によって消失したためと考えられる。ただし、エレクトロポレーションを用いたノックダウンでは、siRNA は体細胞にモザイク状に導入されるため、着色の一部は残って観察された（Fig. 22A)。

一方、ネガティブコントロールとして、Universal Negative Control siRNA を同様の方法で *K* 系統の左半身のコブ領域に導入したが、実験を行ったすべての個体（n=11）においてコブの形成には影響は見られなかった(Fig. 22 C, D)。

結論として、*Wnt1* の異所的な強制発現と *Wnt1* のノックダウンの二つの実験結果から、*K* 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。

以上の結果から、コブの形成メカニズムについて考察した(Fig. 23)。*K* の原因はおそらく領域特異性がなく *K* 系統の皮膚組織全体で発現が変化している。また、20E によって発現が誘導された *Wnt1* は体節の特定の領域（第 2、3、5、8 体節）で発現している。そして、*K* と *Wnt1* の両方の発現が重なったところで細胞周期の変化がもたらされ DNA 合成、細胞の成長が促進されることで突起が形成され、脱皮後の次の齢において過剰な細胞分裂を引き起こしているのではないかと考えられた。今後、*K* の原因が明らかになることで、*K* 遺伝子と Wnt シグナルがどのようにして相互作用し細胞周期を変化させるのかが解明されることが期待される。

4節　ジャコウアゲハ幼虫の突起形成

単行本または雑誌掲載等の形で刊行される予定のためインターネット公表できません。

4章　総括

単行本または雑誌掲載等の形で刊行される予定のためインターネット公表できません。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究の場を与えてくださるとともに熱心にご指導いただいた、藤原晴彦教授、小嶋徹也准教授に心から御礼申し上げます。次世代シーケンサーを使った遺伝子発現解析においてサンプルのシーケンスをしてくださったメディカルゲノム専攻ゲノム制御医科学分野の菅野純夫教授、情報生命学専攻の鈴木穣教授、基礎生物学研究所生物機能解析センターの重信秀治特任准教授に感謝いたします。また次世代シーケンサー用のライブラリー作製の際にご指導下さった基礎生物学研究所進化多様性生物学領域生物進化研究部門の柴田朋子博士に感謝いたします。幼虫の飼育や実験の補助をしていただいた、黒川李奈氏、茶木京子氏、近藤勇介博士に感謝いたします。終始快くご指導してくださった山口淳一博士に感謝いたします。また、これまでお世話になった遺伝システム革新学分野の皆様に感謝いたします。最後にこれまで応援してくれた家族に心から感謝いたします。ありがとうございました。

参考文献

Anders S, Huber W. (2010) Differential expression analysis for sequence count data. Genome Biol 11: R106.

Ando T, Fujiwara H (2013) Electroporation-mediated somatic transgenesis for rapid functional analysis in insects. Development 140: 454-458.

Ahmad KF, Engel CK, Privé GG (1998) Crystal structure of the BTB domain from PLZF. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 12123-12128.

Bhat KM, van Beers EH, Bhat P (2000) Sloppy paired acts as the downstream target of wingless in the Drosophila CNS and interaction between sloppy paired and gooseberry inhibits sloppy paired during neurogenesis. Development 127: 655-665.

Dichtel-Danjoy ML, Ma D, Dourlen P, Chatelain G, Napoletano F *et al.* (2013) *Drosophila* p53 isoforms differentially regulate apoptosis and apoptosis-induced proliferation. Cell Death Differ 20: 108-116.

Fujii T, Banno Y, Abe H, Katsuma S, Shimada T (2012) A homolog of the human Hermansky-Pudluck syndrome-5 (HPS5) gene is responsible for the *oa* larval translucent mutants in the silkworm, *Bombyx mori*. Genetica 140: 463-8.

Furukawa M, He YJ, Borchers C, Xiong Y (2003) Targeting of protein ubiquitination by BTB-Cullin 3-Roc1 ubiquitin ligases. Nat Cell Biol 5: 1001-1007.

Futahashi R, Fujiwara H (2008a) Juvenile hormone regulates butterfly larval pattern switches. Science 319: 1061.

Futahashi R, Fujiwara H (2008b) Identification of stage-specific larval camouflage associated genes in the swallowtail butterfly, *Papilio xuthus*. Dev Genes Evol 218: 491-504.

Futahashi R, Sato J, Meng Y, Okamoto S, Daimon T, Yamamoto K *et al.* (2008c) *yellow* and *ebony* are the responsible genes for the larval color mutants of the silkworm *Bombyx mori*. Genetics 180: 1995-2005.

Futahashi R, Shirataki H, Narita T, Mita K, Fujiwara H (2012) Comprehensive microarray-based analysis for stage-specific larval camouflage pattern-associated genes in the swallowtail butterfly, *Papilio xuthus*. BMC Biol 10: 46.

Geyer R, Wee S, Anderson S, Yates J, Wolf DA (2003) BTB/POZ domain proteins are putative substrate adaptors for cullin 3 ubiquitin ligases. Mol Cell 12: 783-790.

Giraldez AJ, Cohen SM (2003) Wingless and Notch signaling provide cell survival cues and control cell proliferation during wing development. Development 130:

6533-6543.

Goldsmith MR, Wilkins AS (1995) Molecular model systems in the Lepidoptera. New York, NY: Cambridge University Press. 299-301 p.

Grant JB (2007) Ontogenetic colour change and the evolution of aposematism: a case study in panic moth caterpillars. J Anim Ecol 76: 439-447.

Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I *et al.* (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. Nat Biotechnol 29: 644-652.

Hendzel MJ, Wei Y, Mancini MA, Hooser VA, Ranalli T, Brinkley BR *et al.* (1997) Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. Chromosoma 106: 348-360.

Ito K, Katsuma S, Yamamoto K, Kadono-Okuda K, Mita K, Shimada T. (2009) A 25bp-long insertional mutation in the *BmVarp* gene causes the waxy translucent skin of the silkworm, *Bombyx mori.* Insect Biochem Mol Biol 39: 287-293.

Ito K, Kidokoro K, Katsuma S, Shimada T, Yamamoto K, Mita K *et al.* (2012) Positional cloning of a gene responsible for the *cts* mutation of the silkworm, *Bombyx mori.* Genome 55: 493-504.

Kaiser CL, Kamien AJ, Shah PA, Chapman BJ, Cotanche DA (2009) EdU labeling detects proliferating cells in the regenerating avian cochlea. Laryngoscope 119: 1770-1775.

Kato Y, Oba T (1977) Temporal pattern of changes in mitotic frequency in the epidermis and other larval tissues of *Bombyx mori*. J Insect Physiol 23: 1095 - 1098.

Kato Y, Nair KK, Dyer A, Riddiford LM (1987) Changed in ploidy level of epidermal cells during last larval instar of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Development 99: 137-143.

Kawasaki H, Nishida S, Kanke E (2001) Fluctuation of the ploidy level in the epidermis of *Bombyx mori* during the penultimate and ultimate larval instars. Invertebr Reprod Dev 40: 109-116.

Kigoshi Y, Tsuruta F, Chiba T (2011) Ubiquitin ligase activity of Cul3-KLHL7 protein is attenuated by autosomal dominant retinitis pigmentosa causative mutation. J Biol Chem 286: 33613-33621.

Kiguchi K, Agui N (1981) Ecdysteroid levels and developmental events during larval moulting in the silkworm, *Bombyx mori*. J.Insect Physiol 27: 805-812.

Kronforst MR, Young LG, Kapan DD, McNeely C, O'Neill RJ *et al.* (2006) Linkage of butterfly mate preference and wing color preference cue at the genomic location of wingless. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 6575-6580.

Langmead B, Salzberg SL (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nat Methods 9: 357-359.

Lee HH, Frasch M (2000) Wingless effects mesoderm patterning and ectoderm segmentation events via induction of its downstream target *sloppy paired*. Development 127: 5497-5508.

Logan CY, Nusse R (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. Annu Rev Cell Dev Biol 20: 781-810.

Monteiro A, Glaser G, Stockslager S, Glansdorp N, Ramos D (2006) Comparative insights into questions of lepidopteran wing pattern homology. BMC Dev Biol 6: 52.

Nakato H, Futch TA, Selleck SB (1995) The division abnormally delayed (*dally*) gene: a putative integral membrane proteoglycan required for cell division patterning during postembryonic development of the nervous system in *Drosophila*. Development 121: 3687-702.

Nusse R, van Ooyen A, Cox D, Fung YK, Varmus H (1984) Mode of proviral activation of a putative mammary oncogene (*int-1*) on mouse chromosome 15. Nature 307: 131-136.

Pintard L, Willis J, Willems A, Johnson J, Srayko M, Kurz, T *et al.* (2003) The BTB protein MEL-26 is a substrate-specific adaptor of the CUL-3 ubiquitin-ligase. Nature 425: 311-316.

Posnien N, Zeng V, Schwager EE, Pechmann M, Hilbrant M, Keefe JD *et al.*, (2014) A comprehensive reference transcriptome resource for the common house spider *Parasteatoda tepidariorum*. PLoS One 9: e104885.

Prudic KL, Oliver JC, Sperling FA (2007) The signal environment is more important than diet or chemical specialization in the evolution of warning coloration. Proc Natl Acad Sci U S A 104: 19381-19386.

Reichsman F, Smith L, Cumberledge S. (1996) Glycosaminoglycans can modulate extracellular localization of the wingless protein and promote signal transduction. J Cell Biol 135: 819-827.

Selleck SB (2009) Shedding light on the distinct functions of proteoglycans. Sci STKE. 2006: pe17.

Stogios PJ, Privé GG (2004) The BACK domain in BTB-kelch proteins. Trends

Biochem Sci 29: 634-636.

Sherratt TN, Beatty CD (2003) The evolution of warning signals as reliable indicators of prey defense. Am Nat 162: 377-389.

Shimura S, Kiuchi M, Kiguchi K (2009a) Spatial and temporal changes of mitotic activity in the epidermis during larval development of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Biotechnol. Sericology 78(3): 155-163.

Shimura S, Kiuchi M, Kiguchi K (2009b) Epidermal mitotic activity associated with knob formation in the "*Knobbed*" mutant of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Biotechnol. Sericology 78(3): 165-171.

Shimura S, Kiuchi M, Kiguchi K (2011) Characteristics of epidermal cells associated with knob formation in the *Knobbed* mutant of the silkworm, *Bombyx mori*. Int. J. Wild Silkmoth & Silk 16: 77-87.

Shimura S, Kiuchi M, Kiguchi K (2012) Epidermal mitosis associated with knob formation in the fifth instar larva of the *Knobbed* mutant of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Biotechnol. Sericology 81: 69-73.

Tamura T, Thibert C, Royer C, Kanda T, Abraham E, Kamba M *et al*. (2000) Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a *piggyBac* transposon-derived vector. Nat Biotechnol 18: 81-84.

Tanaka Y (1916) Genetic studies on the silkworm. Jour. of the College of Agr., Tohoku Imp. Univ., Sapporo, Japan 7: 129-255.

Tazima Y (1964) The genetics of the silkworm. London: Logos Press and Prentice Hall.

The International Silkworm Genome Consortium (2009) The genome of a lepidopteran model insect, the silkworm *Bombyx mori*. Insect Biochem Mol Biol 38: 1036-1045.

Truman JW, Riddiford LM, Safranek L (1973) Hormonal control of cuticle coloration in the tobacco hornworm, *Munduca sexta*: Basis of an ultrasensitivebioassay for juvenile hormone. J. Insect Physiol 19: 195-203.

Ui-Tei K, Naito Y, Takahashi F, Haraguchi T, Ohki-Hamazaki H, Juni A *et al.* (2004) Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. Nucleic Acids Res 32: 936-948.

Wang L, Kiuchi T, Fujii T, Daimon T, Li M, Banno Y *et al.* (2013) Mutation of a novel ABC transporter gene is responsible for the failure to incorporate uric acid in the epidermis of *ok* mutants of the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochem Mol Biol 43: 562-571.

Werner T, Koshikawa S, Williams TM, Carroll SB (2010) Generation of a novel wing colour pattern by the Wingless morphogen. Nature 464: 1143-1148.

Wiklund C, Sillen-Tullberg B (1985) Why distasteful butterflies have aposematic larvae and adults, but cryptic pupae: evidence from predation experiments on the monarch and the European swallowtail. Evolution 39: 1155-1158.

Wodarz A, Nusse R (1998) Mechanisms of Wnt signaling in development. Annu Rev Cell Dev Biol 14: 59-88.

Xu L, Wei Y, Reboul J, Vaglio P, Shin T, Vidal M *et al.* (2003) BTB proteins are substrate-specific adaptors in an SCF-like modular ubiquitin ligase containing CUL-3. Nature 425: 316-321.

Yamaguchi J, Mizoguchi T, Fujiwara H (2011) siRNAs Induce Efficient RNAi Response in *Bombyx mori* Embryos. PLoS ONE 6: e25469.

Yamaguchi J, Banno Y, Mita K, Yamamoto K, Ando T, Fujiwara H (2013) Periodic Wnt1 expression in response to ecdysteroid generates twin-spot markings on caterpillars. Nat Commun 4: 1857.

Yoda S, Yamaguchi J, Mita K, Yamamoto K, Banno Y *et al.* (2014) The transcription factor Apontic-like controls diverse colouration pattern in caterpillars. Nat Commun 5: 4936.

Yuasa M, Kiuchi T, Banno Y, Katsuma S, Shimada T. (2016) Identification of the silkworm *quail* gene reveals a crucial role of a receptor guanylyl cyclase in larval pigmentation. Insect Biochem Mol Biol 68:33-40.

芦野道夫 (1940) 『蚕児における有瘤因子の発現に関する形態学的研究 』 日蚕雑 11: 209-210.

有賀久雄（1943a）家蠶の斑紋に關する突然變異の組織學的研究.蚕糸試験場報告 11: 387-439.

有賀久雄（1943b）X線照射の場合に現れたる蠶の突然變異に關する遺伝学的研究 XI 濃黒縞(4). 蚕糸試験場報告 11: 513-517.

有賀久雄、吉武成美、長島栄一（1954)『家蚕幼虫の半月紋の発現機構について』日本蚕糸学雑誌 23: 19-26.

有賀久雄、川瀬茂実、長島栄一、渡部仁、吉武成美（1965）『昆虫遺伝学』 アヅミ書房.

上村望（2015）東京大学大学院・新領域創成科学研究科先端生命科学専攻・修士論文『カイコ紋様突然変異体多星紋 *multistars*（*ms*）の紋様形成メカニズムの解析』.

榎島守利、山本俊雄（1983）『人工飼料育蚕における食下量,消化量,繭重および繭層重に及ぼすコブ遺伝子の影響』 日蚕雑 53: 241-244.

白瀧紘子（2007）東京大学大学院・新領域創成科学研究科先端生命科学専攻・修士論文『3種のアゲハチョウ科幼虫の色素・紋様形成の比較解析』.

田中義麿（1952a）蚕における褐円と多星紋とこぶとの発現部位の相互関係. 遺伝研年報 2: 8-9.

田中義麿（1952b）『家蚕遺伝学』，裳華房.

長島栄一、田中茂光（1956）『家蚕における瘤(*K*)の発現に関する研究(Ⅰ)瘤の発現と各種突然変異との関係』 信州大学繊維学部研究報告 6: 51-54.

長島栄一、清水隆三、柳沢俊男（1959）『家蚕における瘤(*K*)の発現に関する研究(Ⅱ)：瘤部位真皮細胞の増殖について』 信州大学繊維学部研究報告 9: 74-77.

本田計一、加藤義臣編 （2005） 『チョウの生物学』東京大学出版会.

平塚栄吉（1965) 4. 明治時代の支那種及び欧州種品種別記録(1)支那種. 平塚栄吉(編)日本蚕品種実用系譜. 大日本蚕糸会蚕糸科学研究所 東京 ：48-49.

村上毅（1992) 蚕糸業の概要.日本蚕糸学会(編)蚕糸学入門. 大日本蚕糸会 東京 ：1-20.

森精 編（1970）『カイコによる新生物実験 生物化学の展開』三省堂.

山口淳一（2009）東京大学大学院・新領域創成科学研究科先端生命科学専攻・博士論文『カイコ幼虫斑紋変異 *L* の原因遺伝子 *wnt1* の同定と発現制御機構』.

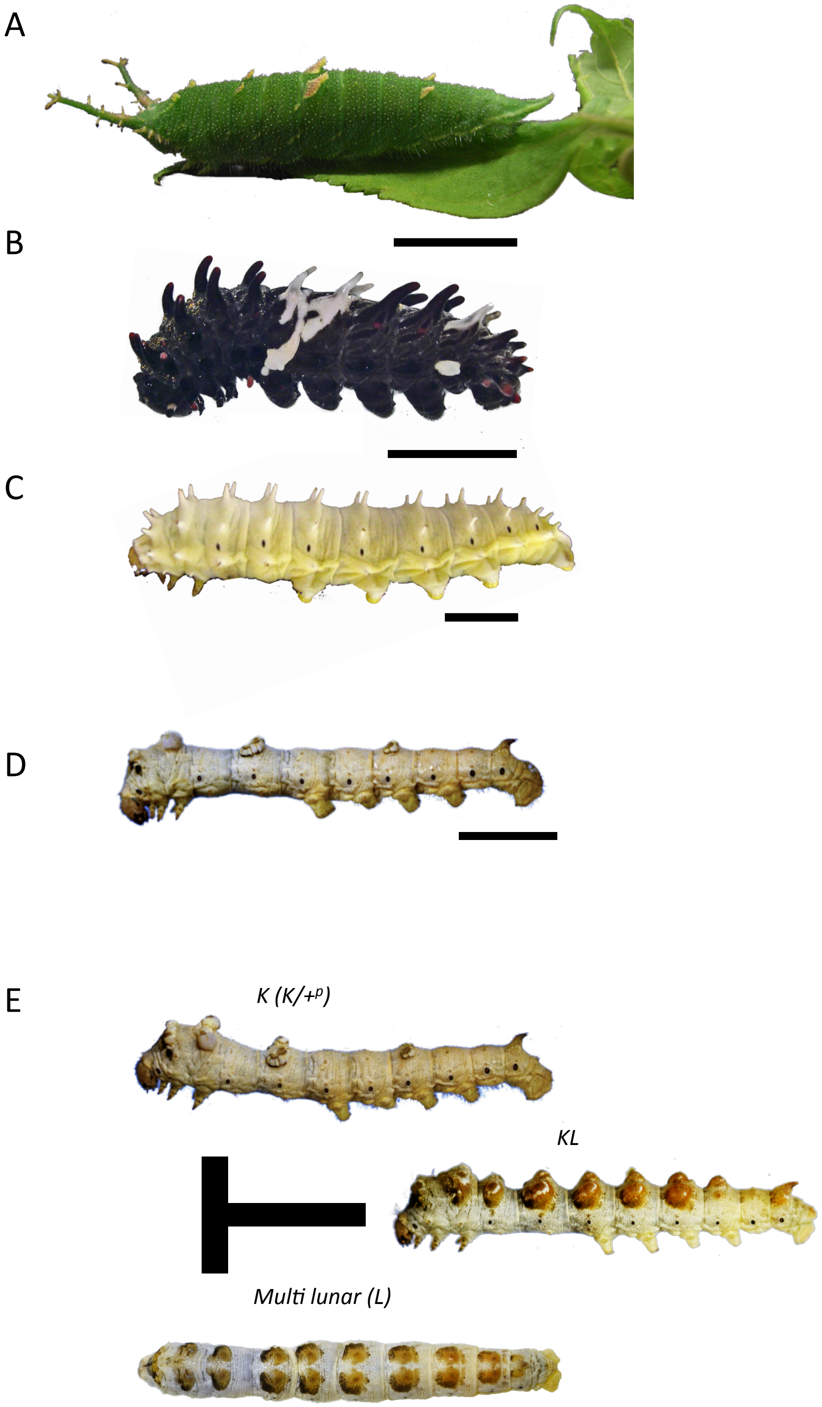

Figure 1.　突起を持つ鱗翅目昆虫の幼虫
A) ゴマダラチョウ B) ジャコウアゲハ C) シンジュサン D) カイコ突然変異体*Knobbed*（*K*） E) カイコの変異体 *K* と *Multi lunar* (*L*) の交配個体は*L*の斑紋部にコブを生じる。A～Dのスケールバーは10mmを示している。

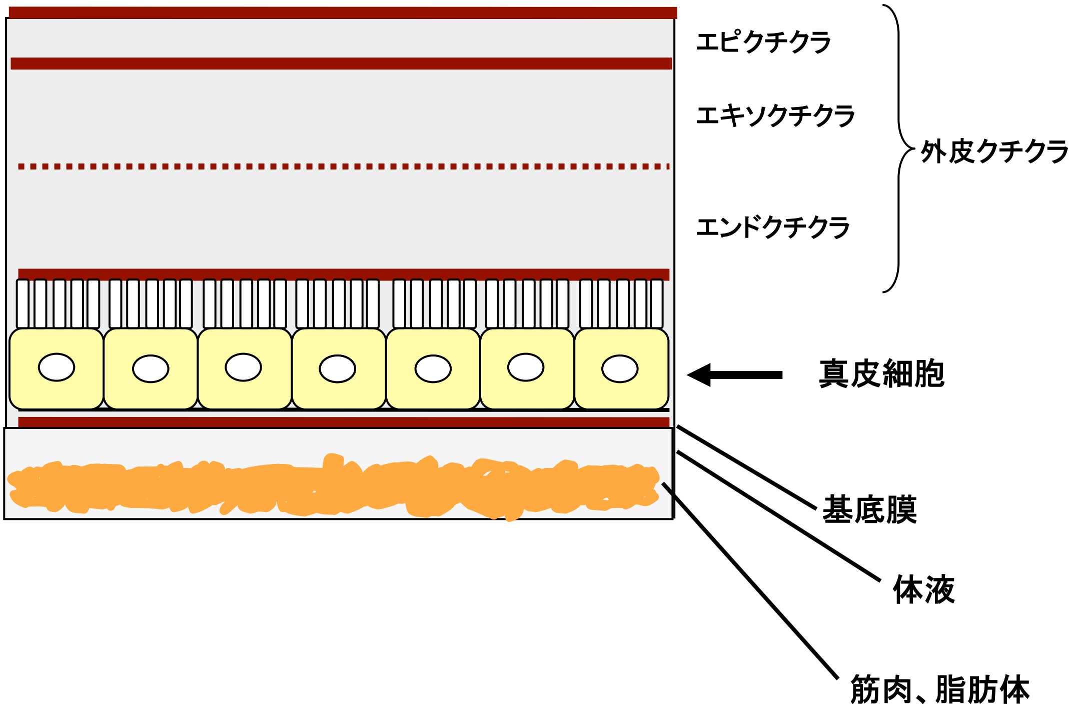

Figure 2.　カイコ皮膚組織の模式図
外皮クチクラは、体腔側からエンドクチクラ、エキソクチクラ、エピクチクラの3層構造からなり、それらは内部にさらに層構造を形成している。カイコの幼虫の真皮細胞は一層のシート状に整列しており外皮クチクラを裏打ちしている。また、真皮細胞の中には尿酸（白色）が蓄積している。白瀧修氏論文, 2007より抜粋、一部改変した。

Figure 3.
単行本または雑誌掲載等の形で刊行される予定のためインターネット公表できません。

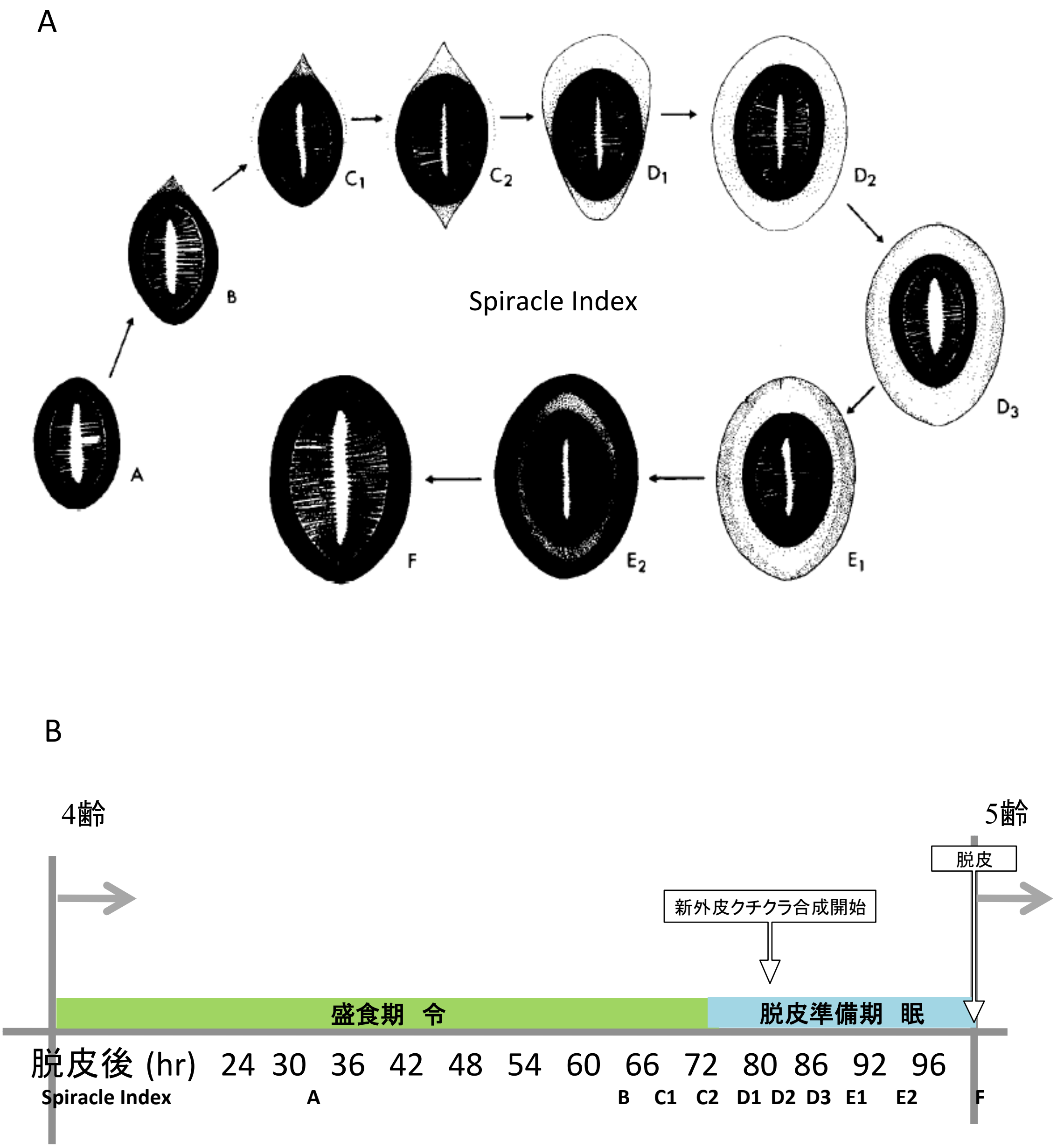

Figure 4. Spiracle Index
A) Spiracle Indexの模式図。カイコの幼虫では脱皮期に次の令の気門の成長が観察でき、これをステージングの際のマーカーとして用いることができる。B) カイコ4齢幼虫における脱皮後の時間とSpiracle Indexの関係。Kiguchi *et al*., 1981 より抜粋、一部改変した。

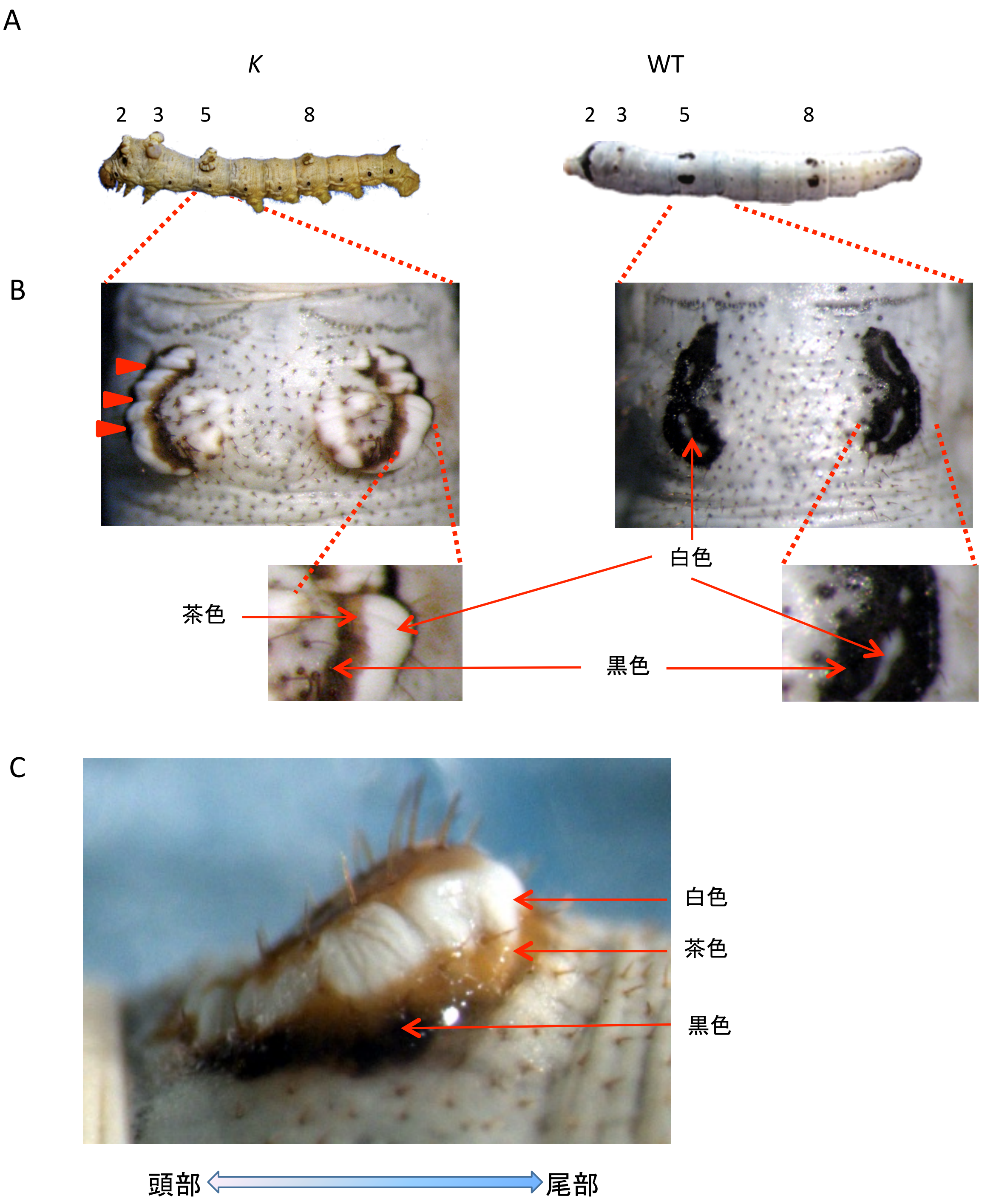

Figure 5.　*K* と WT の外形
A) 左はカイコ突然変異体 *K*(*K/K*) 、右はWT (+*p*) の5齢幼虫全体写真。数字は体節番号を示している。B) 幼虫の第5体節を背面部から撮影した写真。コブは WT の半月紋の模様が生じる領域に対応して形成される。赤の矢尻はしわ状構造物を示している。拡大写真を下に載せた。白色領域はWTでは非常に細いが、*K* 系統ではかなり増大している。茶色領域は WT でほとんど見られないが、*K* 系統でははっきり観察される程に増大する。一方黒色領域は *K* 系統と WT でほとんど変化していない。C) 第5体節のコブを側方部から撮影した写真。左側が頭部、右側が尾部。コブは頭部側より尾部側が垂直方向に盛り上がっている。

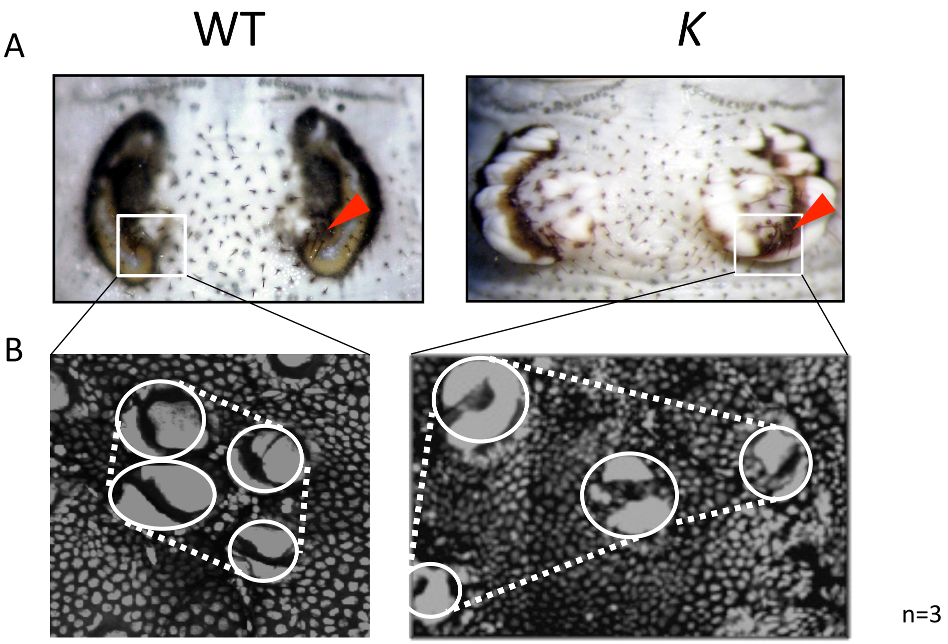

Figure 6. カイコ *K* の突起を形成する真皮細胞
A) 左は *K* 系統ホモ (*K/K*) 5齢24時間、右は WT 5齢24時間の第5体節を背面部から撮影した写真。赤の矢尻は数本の剛毛を指している。B) 核を DAPI で染色し、*K* とWTそれぞれの剛毛の生えている領域を共焦点顕微鏡を用いて観察した。白は DAPI（核）、白実線は剛毛をそれぞれ表している。剛毛と剛毛の間を白点線で囲い、*K* と WT で相同な領域にある核の数を数えた。その結果、WT では剛毛の間に71個、*K* では418個の細胞が観察された。

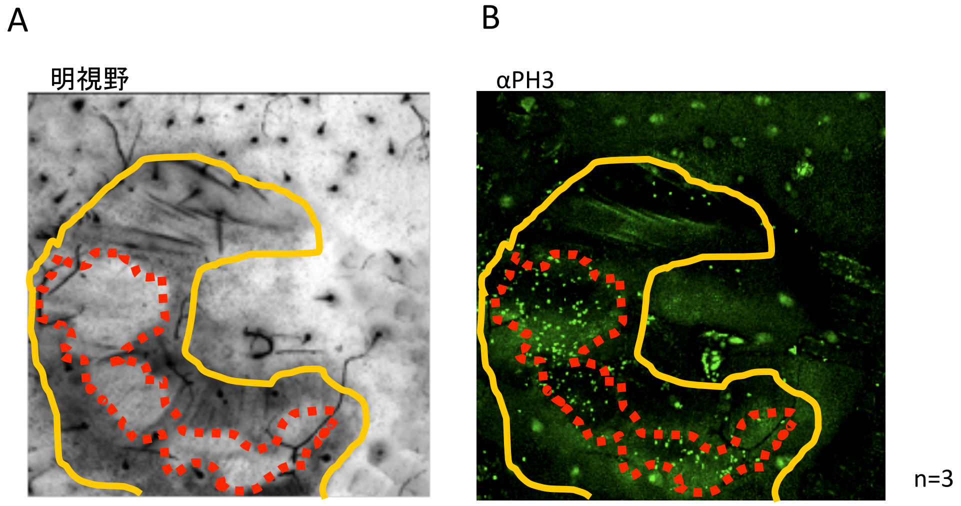

Figure 7. **コブ領域における細胞周期M期細胞の検出**
K 系統 E001の4齢24時間の幼虫の第5体節のコブを含む領域の真皮細胞をαPH3抗体で免疫染色し共焦点顕微鏡を用いて観察した。A) 明視野。B) 黄色く囲った範囲がコブ領域、赤点線はコブで最も膨らんで見られる白い領域を示している。赤点線で囲った白い領域に集中して多数のM期の細胞が検出された。

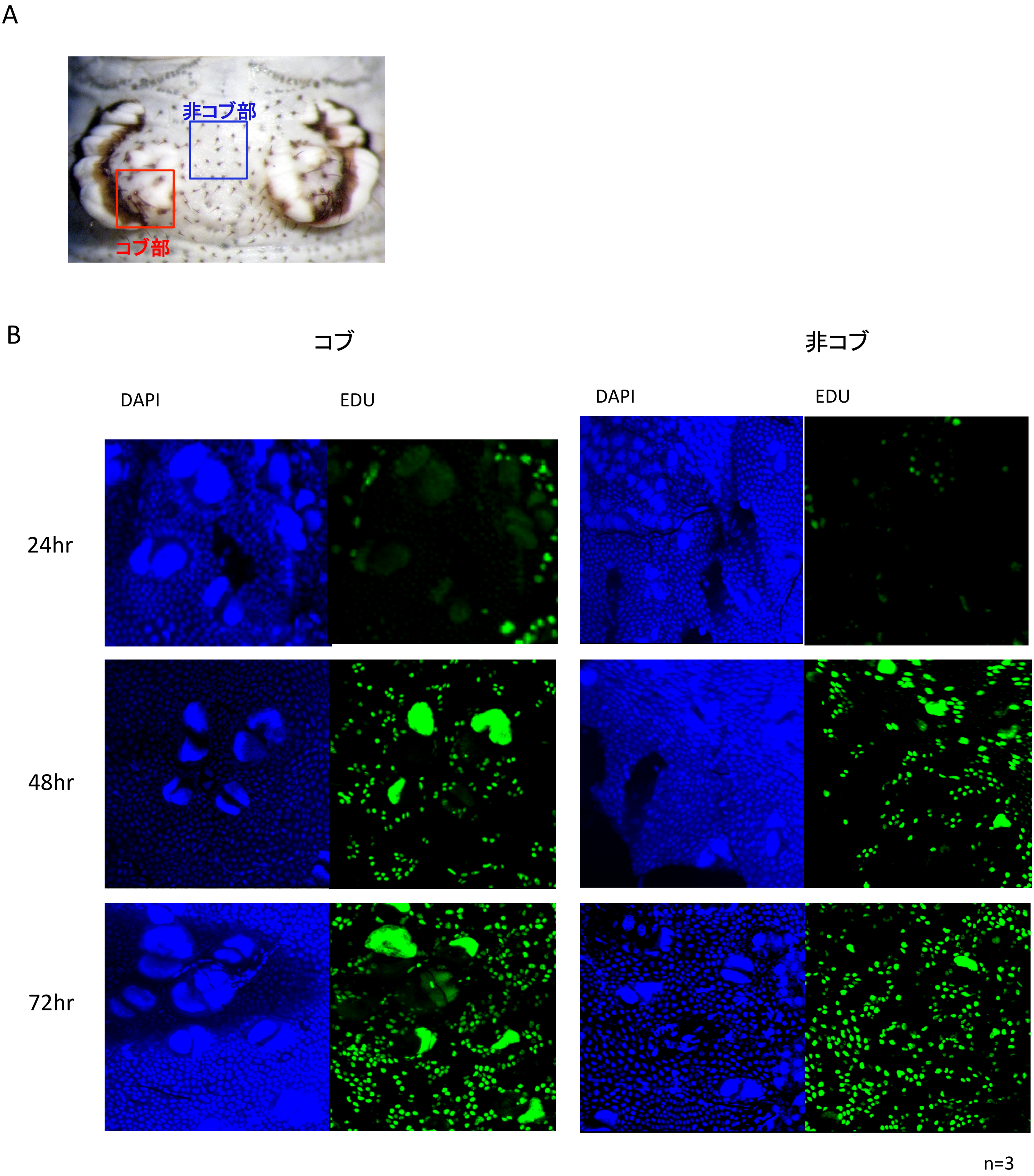

Figure 8.　EdUによる細胞周期S期の検出
A) Bで観察した相当領域を枠(コブ部：赤、非コブ部：青)でそれぞれ示した。写真は*K*系統ホモ(*K/K*)の5齢幼虫。B) *K*系統ヘテロ(*K*/+) 4齢24時間、48時間、72時間後の個体を用い、細胞周期の S 期の指標であるEdU（青）を取り込ませ、真皮細胞を同じ倍率で焦点顕微鏡を用いて観察し比較した。核はDAPI（緑）で染色した。コブ部、非コブ部においても脱皮後の時間の経過とともにS 期の細胞数は増加する傾向が見られた。しかし、コブ部と非コブ部でS 期の細胞の頻度に大きな差は見られなかった。

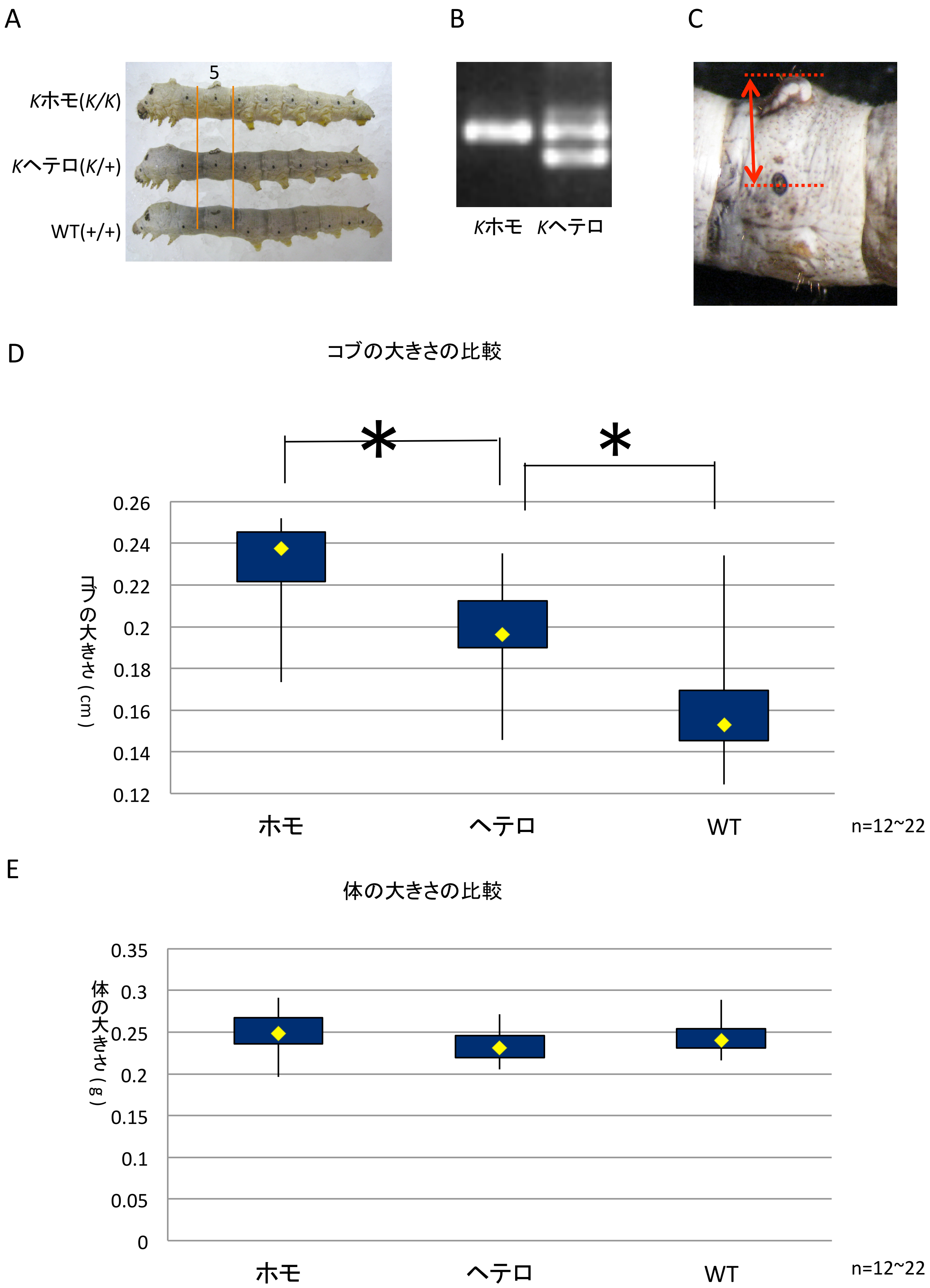

Figure 9. コブの大きさと体の大きさの比較
A) 上から*K*系統ホモ(*K/K*) 、ヘテロ(*K/*+) 、WT(+/+) の5齢幼虫の写真。オレンジ線で囲われた範囲は幼虫の第5体節を示している。B) *K*系統特異的に*pipe*のイントロン中に存在する100 bpの挿入を利用して*K*に関してホモかヘテロかPCRを行いジェノタイピングした。*K*系統ホモでは1本、*K*系統ヘテロでは*K*系統ホモと同じ大きさのPCRバンドと100 bp 分低い位置にPCRバンドが検出された。C) コブの高さとして、第5体節の赤点線で示したコブの最も高いところから気門までの長さ(赤の矢印)を測定した。D) *K* 系統ヘテロ (*K/*+) 同士をかけ合わせた同じ親の集団 (同一の蛾区)の*K*系統ホモ、*K*系統ヘテロ (*K/*+) 、WT (+/+) の4眠の E1 期の幼虫のコブの大きさを比較した。コブの大きさは*K*系統ホモ(*K/K*)＞*K*系統ヘテロ(*K/*+)＞WT(+/+) の関係にあった(有意差あり(ステューデントの t 検定))。E) Dと同個体の体の大きさ(体重を測定)を比較したところ、体の大きさにはほとんど差がなかった。

Figure 10~16.
単行本または雑誌掲載等の形で刊行される予定のためインターネット公表できません。

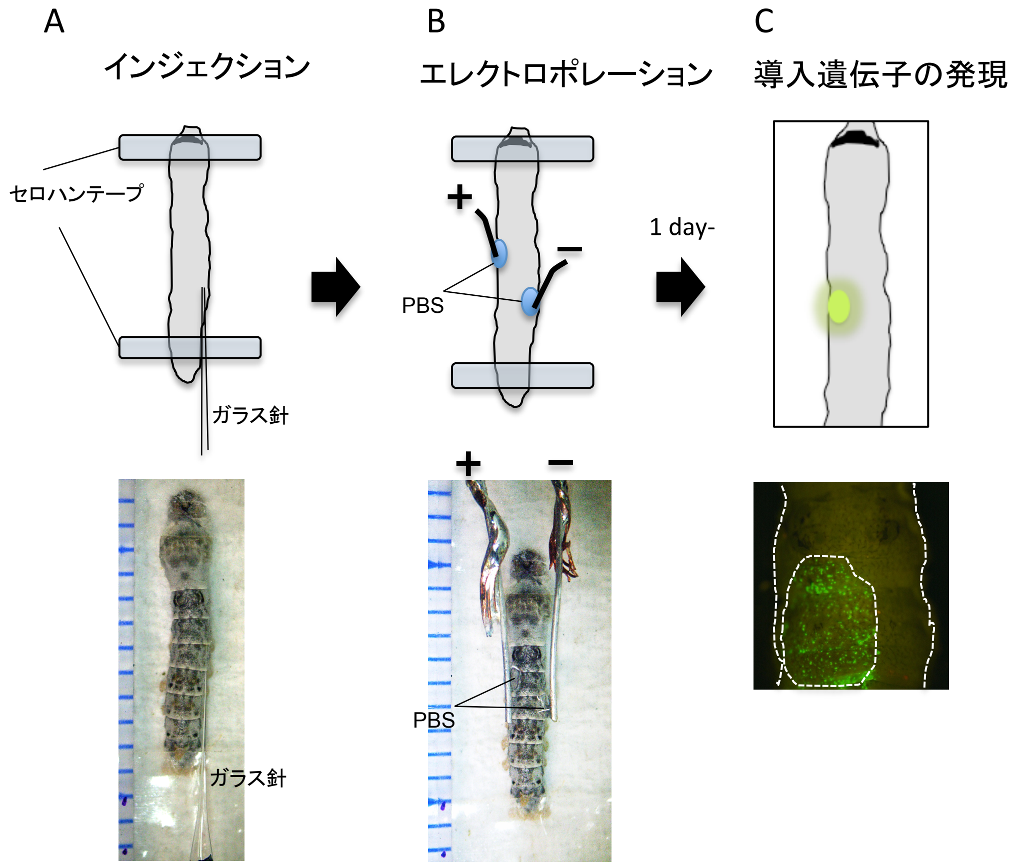

Figure 17. ***in vivo*** **エレクトロポレーションの手順**
模式図と対応する写真を示した。A) 幼虫は紙の上にセロハンテープで頭部と尾部を固定し動かないようにした。DNA 溶液 (2 μg/μl)はマイクロインジェクターと先端を折ったガラス針を用いて体液中にインジェクションした。針はダメージを避けるため目的の領域と離れた場所から皮膚に挿入した。B) インジェクションの直後(約3分以内に), PBS の水滴を白金電極と幼虫の体との間に置き、適当な電圧を与えた。C) 導入遺伝子の発現のマーカーであるEGFPの蛍光がほぼプラス電極側のPBSの水滴を置いた位置と一致して観察された。

Figure 18, 19.
単行本または雑誌掲載等の形で刊行される予定のためインターネット公表できません。

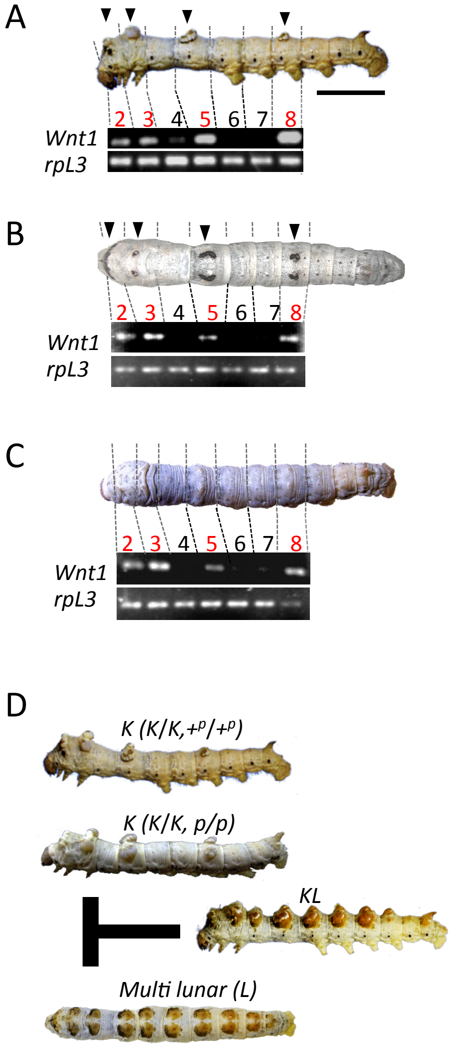

Figure 20.　カイコ変異体の表現型と各体節における*Wnt1*の発現
カイコ変異体およびWTの幼虫の写真は5齢で撮影した。A) 斑紋を持つ*K*系統ホモ (*K*/*K*, $+^p/+^p$)、B) 斑紋を持つWT (${+^K}/{+^K}$, $+^p/+^p$)、C) 斑紋を持たないN4系統 (${+^K}/{+^K}$,*p*/*p*)の3系統の4齢幼虫において、それぞれの第2から第8体節の真皮細胞からcDNAを合成し、RT-PCRにより *Wnt1* の発現量を体節間で相対的に比較した。内部標準には*BmRpL3*を用いた。*Wnt1* の発現は、3系統全てにおいて第2、3、5、8体節で特異的に高いことが明らかになった。D) *K*系統(*K*/*K*, $+^p/+^p$ 、*K*/*K*, *p*/*p*)に変異体褐円 (*L*) を交配させた次の世代は褐円の斑紋部がすべてコブ状に隆起する。Aにおけるスケールバーは10mmを示している。

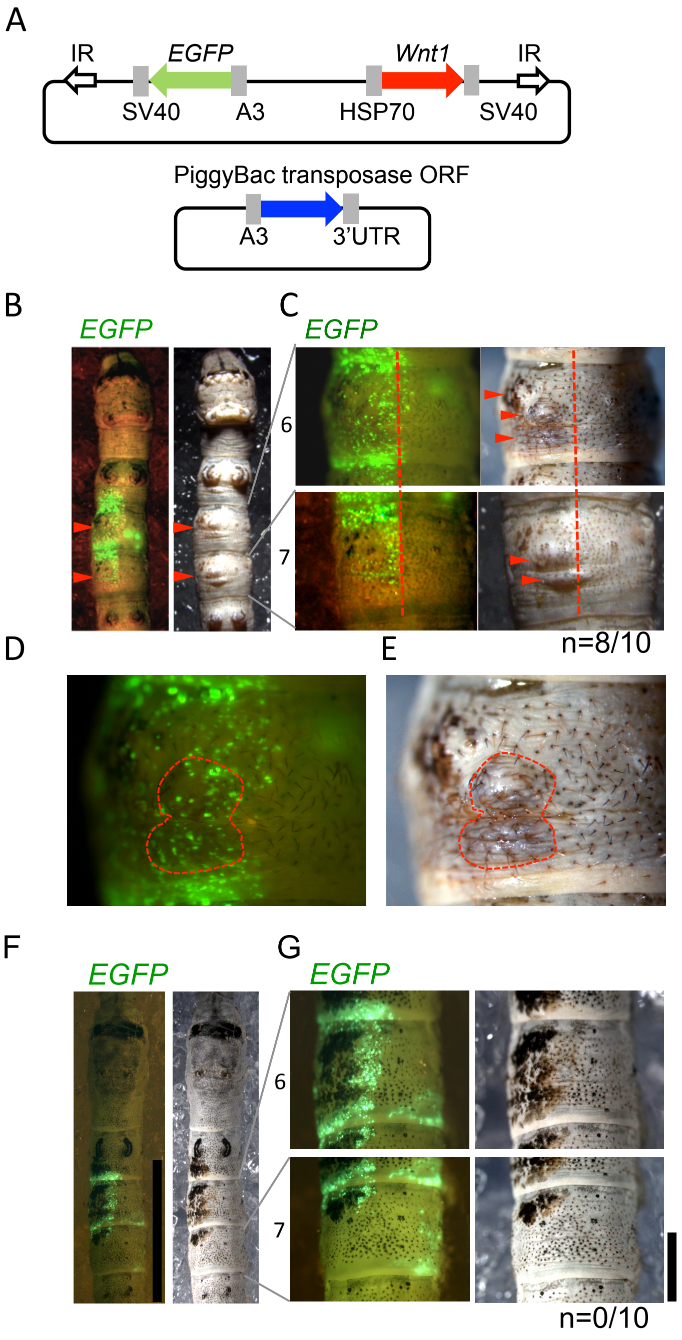

Figure 21. ***K*系統における*Wnt1* の異所的な強制発現**
A) *Wnt1*の強制発現実験に用いたベクターの模式図。上が*EGFP*と*Wnt1*を発現させるためのベクター、下が*piggyBac* transposase helper プラスミド。*K* 系統 E001ホモ (*K/K*, $+^{p}/+^{p}$)の2齢幼虫の体液中に、外来遺伝子 (*EGFP*および *Wnt1*) を挿入したプラスミドを注入し、エレクトロポレーション法により真皮細胞内へ取り込ませ、5齢幼虫において、EGFPの蛍光が見られた領域での皮膚の外部形態の観察を行った。B) EGFPの蛍光が見られた本来はコブの生じない第6体節、第7体節においてコブ状の膨らみ（赤の矢尻）が見られた。C) Bの第6体節、第7体節を拡大した。幼虫左半身に複数のコブ状の膨らみが確認できた。赤の矢尻の先にできたコブはその下の緑の矢尻の先にできたコブよりも高く隆起が形成される傾向が見られた。D),E) Cをさらに拡大して観察した。異所的なコブを赤点線で示した。F) WT($+^{K}/+^{K}$, $+^{p}/+^{p}$)において同様に*Wnt1*を強制発現した。その結果コブは生じず、黒や茶色の斑紋が生じた。G) Fの第6体節、第7体節を拡大した。EGFPの蛍光が見られた左半身で着色が見られたが、コブの形成は確認されなかった。F,Gにおけるスケールバーはそれぞれ10mm, 2mmを示している。

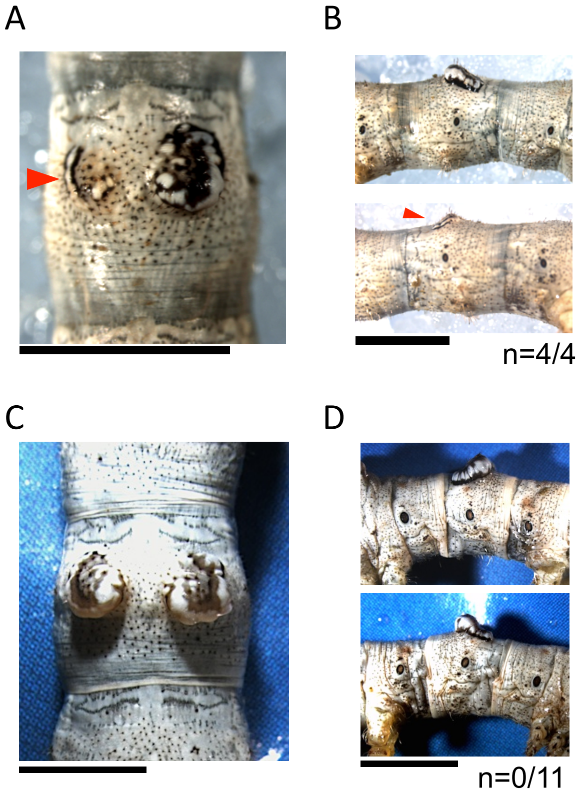

Figure 22. ***K*系統における*Wnt1* のノックダウン**
*K*系統E001の2齢幼虫の体液中に*Wnt1*のsiRNAを注入し、エレクトロポレーション法により第5体節の左半身のコブに導入し5齢幼虫において観察を行った。ネガティブコントロールにはUniversal Negative Control siRNAを用いた。A) 第5体節の背面側から撮影した写真。左半身コブには影響がないが赤矢尻で示した左半身コブの形成が抑制されている。B) 側方部から撮影した写真。上が右半身、下が左半身。赤矢尻で示した左半身のコブは抑制されている。C) ネガティブコントロールではコブの形成に影響は見られなかった。D) 側方部から観察しても左右のコブに違いは見られない。スケールバーは全て5mmを示している。

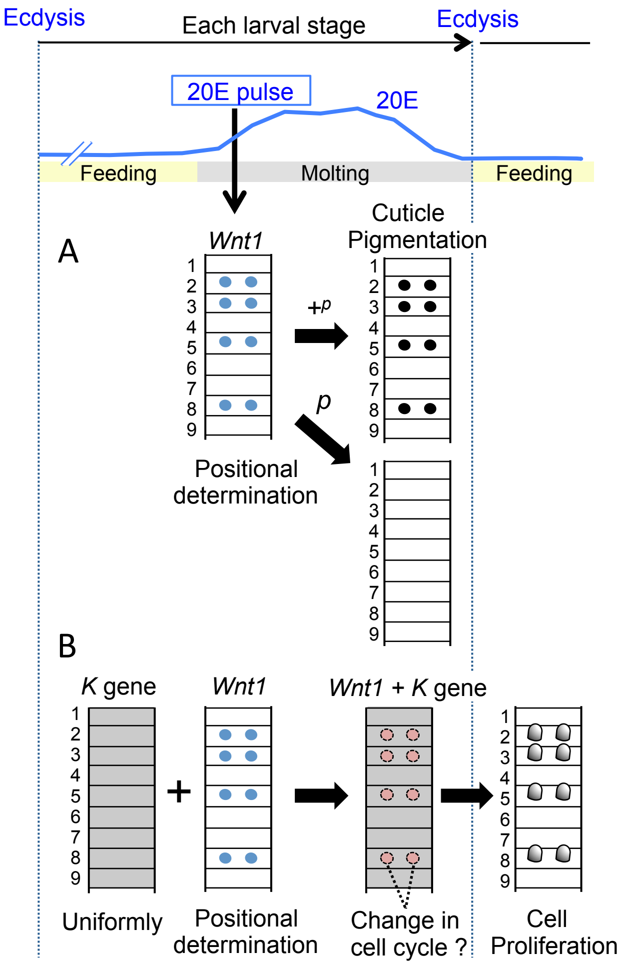

Figure 23.　*K*系統におけるコブ形成メカニズム
A) 20Eのパルスによって誘導される*Wnt1*の空間的発現パターンがカイコ幼虫の各ステージにおける斑紋の着色の場所を決定している（Yamaguchi *et al.*, 2013）。クチクラへの色素沈着は*p* locusの$+^p$アリルを介して脱皮直前に起き、*p*では色素は色素沈着しない (Yoda *et al.*, 2014)。
B) *K*原因遺伝子はおそらく領域特異性がなく皮膚全体で発現が変化しており、20Eによって誘導された*Wnt1*が領域特異的に発現することでコブ形成の領域を決定しており、両方の発現が重なる領域で細胞のサイクルが変化し細胞の成長が促進されることで突起が形成され、脱皮後の次の齢において過剰に細胞分裂するのではないかと考えられる。青線で示した20Eのタイターは Kiguchi *et al.*, 1981 を転載、改変したものである。

Figure .24~32
単行本または雑誌掲載等の形で刊行される予定のためインターネット公表できません。

Supplementary Table . 1~4
単行本または雑誌掲載等の形で刊行される予定のためインターネット公表できません。

Supplementary Figure

単行本または雑誌掲載等の形で刊行される予定のためインターネット公表できません。