

論文内容の要旨

論文題目

Molecular genetic studies on the formation of diverse larval pigmentation patterns caused by the *p* multiple alleles in the silkworm.

(カイコ *p* 複対立遺伝子座によって生じる多様な幼虫斑紋形成に関する分子遺伝学的研究)

氏名

依田 真一

【序論】

目玉模様や枝型擬態に代表されるように、チョウやガなどの鱗翅目昆虫には、その体表に生息環境に高度に適応したさまざまな紋様が見られる。鱗翅目昆虫に存在する紋様は、異種間だけでなく、同種内においても驚くほどバリエーションに富んでいる。例えば、アフリカのアゲハチョウの一種 *Papilio dardanus* では、成虫翅に少なくとも 10 以上の紋様多型が存在するが、興味深いことにその原因はたったひとつの遺伝子座に起因することが知られている。このように、単一の遺伝子座によって多様な紋様を作り出される現象の背景には、紋様の多様性の進化に関わる重要な分子基盤が存在している可能性が高い。

カイコ *Bombyx mori* の幼虫斑紋遺伝子座 *p* (*p* locus) は、昆虫遺伝学の分野では非常に有名な突然変異体であり、100 年以上も昔から様々な側面で研究されてきた。興味深いことに、*p* locus には少なくとも 15 もの alleles が存在し、古典的な連鎖解析の結果から、その原因は一つの遺伝子座 (第 2 染色体、3.0 cM) に起因すると考えられている。alleles の中には、目玉模様 (眼状紋) をもつ形蚕 ($+^p$; normal pattern) や枝型擬態を示すクワコ *Bombyx mandarina* に体色が類似する暗色 (p^M ; Moricaud) など、生態学的に重要な形質も含まれる (図 1)。さらに、全身が白い姫蚕 (p ; plain) や、逆に全身が真っ黒になる黒縞 (p^S ; Striped)、皮膚の黒色化が強く、内臓が透けて見える黒色蚕 (p^B ; Black) など、その斑紋にはバリエーションが見られる。*p* locus の各 allele は遺伝学上の優劣関係が明確であり、基本的に体色の濃い allele

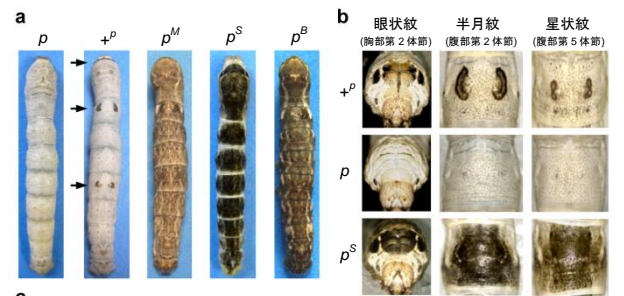


図 1. カイコ *p* locus の幼虫斑紋 (a, b) と原種クワコ (c) の枝型擬態

(a) 5 alleles の表現型。 $+^p$ の斑紋は特定の体節で出現する (矢印)。(b) p には $+^p$ の斑紋が見られない一方、 p^S では $+^p$ の斑紋が確認される。

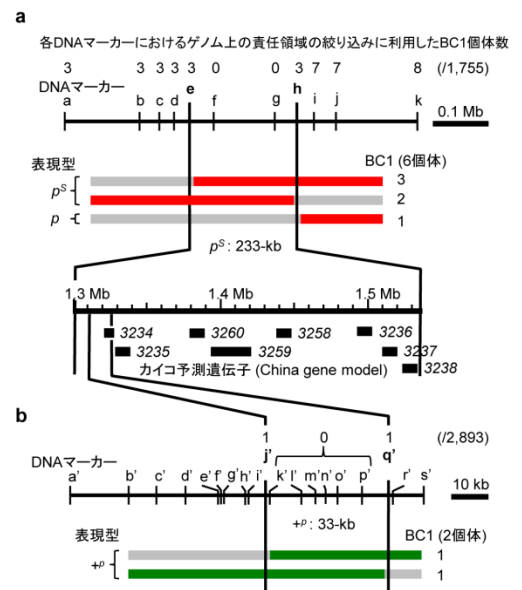


図 2. *p* locus のポジショナルクローニング

(a) p^S のポジショナルクローニングによって絞りこまれたゲノム上の責任領域 233 kb と 8 つの予測遺伝子。(b) $+^p$ のポジショナルクローニングによって絞りこまれた責任領域 33 kb。

が優性を示す。例えば、 p locus の代表的な 5 つの alleles では、 $p^B > p^S > p^M > +^p > p$ という優劣関係を示す。体色は黒色を呈し、その色素はメラニン顆粒から構成されることが知られている。

本研究では、表現型が明確に異なる p^S 、 $+^p$ 、 p を主な材料とし、ポジショナルクローニング、遺伝子発現解析や機能解析によって、 p locus の表現型の原因となる遺伝子を同定することを主目的とした。

【結果・考察】

p alleles のポジショナルクローニング

p alleles のゲノム上の責任領域を絞り込むために、 p^S と p を用いて 1,755 個体の規模でポジショナルクローニングを行った。その結果、 p^S の責任領域が第 2 染色体上の 233 kb の範囲に絞りこまれ、この領域内には 8 つの予測遺伝子 (China gene model) が存在していた (3234、3235、3236、3237、3238、3258、3259、3260) (図 2a)。カイコ EST データベースを調べた結果、3234 は隣接する 3235 と共に転写される遺伝子であることが判明したため、新たに 3234/5 遺伝子と名づけることにした。先行研究 (岡本俊、修士論文) において、 $+^p$ と p を用いて 2,893 個体の規模で同様に解析を行った結果、 $+^p$ の責任領域が 33 kb に絞りこまれ、この領域内には 3234/5 遺伝子のみが含まれていた (図 2b)。 p^S の責任領域内にも 3234/5 遺伝子が含まれていたことから、 p locus の形質はこの遺伝子によって作り出されている可能性が高いと考え、解析を進めることにした。

3234/5 遺伝子のゲノム構造

3234/5 遺伝子の ORF 全長を取得するために、RACE 法と RT-PCR を行ったところ、 p^S 、 $+^p$ 、 p の ORF 全長はいずれも 951 bp であり、317 のアミノ酸残基からなるタンパク質をコードしていた。ORF 全長を 3 alleles 間で比較した結果、 p^S では $+^p$ と p に対して一つのアミノ酸置換が存在していた (図 3a)。3234/5 遺伝子の機能を推定するために相同性検索を行った結果、ショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* において同定された転写因子 Apontic (Apt) と配列に類似性が見られた。*apt* は胚発生において頭部形成や気管形成などさまざまな発生現象に関与することが知られているが、これまでに皮膚の着色に関与するという報告はない。*apt* は DNA 結合モチーフである Myb/SANT motif とタンパク質間相互作用に関与する Leucine zipper motif をコードするが、モチーフ検索の結果、3234/5 遺伝子にも 2 つの同様のモチーフが予測されたため、この遺伝子は転写因子をコードする可能性が高いと考えられた (図 3a)。以上の結果から、3234/5 遺伝子を *apontic-like* (*apt-like*) と命名することにした。昆虫種間で *apt* と *apt-like* の系統関係を調べたところ、*apt* は双翅目昆虫と膜翅目昆虫において高度に保存されている一方、*apt-like* は鱗翅目昆虫のみで高い保存性が見られることが示唆された (図 3b)。

apt-like の定量的発現解析

p^S 、 $+^p$ 、 p の表現型の違いが *apt-like* の発現量の違いによるものかを検証するために、カイコ 4 令幼虫の腹部第 2 体節の皮膚 ($+^p$ において斑紋が存在) からステージごとに cDNA を調製し、

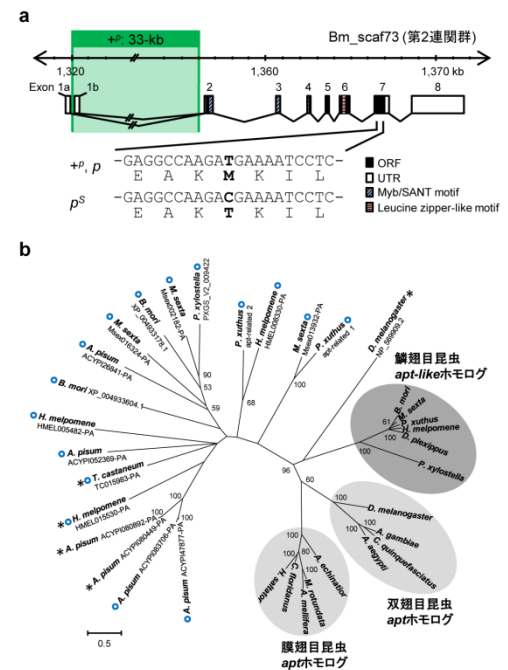


図 3. *apt-like* (3234/5 遺伝子) のゲノム構造と系統解析

(a) *apt-like* のゲノム構造と 3 alleles に存在するアミノ酸置換。(b) 昆虫種間の *apt-like* と *apt* の無根系統樹。塩基配列をもとに最尤法によって構築した。枝の数字は 50% 以上のブートストラップ値を示す (1,000 replicates)。各遺伝子に付随する * と ○ の記号は、それぞれ Blastp 検索した際に *Apt-like* または *Apt* をクエリーにしてヒットした配列を示す (E -value $< 10^{-4}$)。これらの配列は Myb/SANT motif を有するが、Leucine zipper motif は欠く。

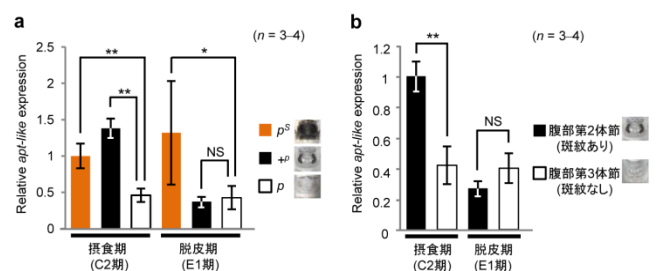


図 4. p^S 、 $+^p$ 、 p における *apt-like* の発現定量

(a) p^S 、 $+^p$ 、 p の 4 令幼虫の腹部第 2 体節皮膚における発現。(b) $+^p$ の 4 令幼虫の腹部第 2・3 体節皮膚における発現。** $P < 0.01$ 、* $P < 0.05$ 、Student's t -test (NS, not significant)。

定量的 RT-PCR を行った。皮膚のサンプリングは、摂食期 (C2 期)、及び皮膚に着色が生じる直前の脱皮期 (E1 期) に行った。その結果、 p^S では p と比べて摂食期、脱皮期ともに有意に高発現が見られた一方、 $+^p$ では p に対して摂食期においてのみ高発現が見られた (図 4a)。以上の結果から、*apt-like* は模様のある体節で発現上昇する可能性が示唆された。この可能性をさらに検証するために、 $+^p$ の腹部第 2 体節 (斑紋あり) と腹部第 3 体節 (斑紋なし) において同様に解析を行った結果、腹部第 2 体節では腹部第 3 体節と比べて摂食期において高発現が確認された (図 4b)。 p^S と $+^p$ では、*apt-like* の発現パターンが異なっていたが、この違いが両者の表現型の違いに起因している可能性もある。

apt-like の機能解析—強制発現

apt-like の皮膚における発現上昇が着色の原因であるかどうかを調べるために、*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て (Ando, T. & Fujiwara, H. 2013)、全身が白い p の皮膚細胞で *apt-like* の ORF 全長の導入を試みた。2 つのカイコ *actin A3* プロモーターの下流にそれぞれ、*apt-like* と *EGFP*

をつないだ *piggyBac* コンストラクトを作製し、 p の 2 令幼虫に *transposase* をコードする helper プラスミドと共導入した (図 5a)。その結果、次令以降より *EGFP* のシグナルが見られる領域でのみ皮膚の黒色化が観察された (図 5b)。この黒色化は、 p^S と p のいずれの全長タンパク質においても確認されたことから、3 alleles 間に存在したアミノ酸置換はタンパク質の機能にほとんど影響を与えないことが示唆された。一方で、ネガティブコントロールとして *apt-like* の代わりに *DsRed2* を導入した場合は、皮膚の黒色化は生じなかった。さらに、着色領域と *apt-like* の発現領域との対応関係を調べるために、黒色化が見られた皮膚を解剖し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察したところ、着色領域と *apt-like* の発現領域は一致していた (図 5c)。以上の結果から、*apt-like* の強制発現によって皮膚の黒色化が誘導されることが示された。

apt-like の機能解析—RNAi

in vivo エレクトロポレーション法を用いた siRNA の局所的導入により、皮膚における *apt-like* のノックダウンを試みた。 p^S または $+^p$ の 4 令脱皮直後の幼虫の左半身に siRNA を導入した結果、次令において黒色化が顕著に阻害された (図 6)。黒色化の阻害は、 p^M や p^B においても同様に観察された。一方で、どの遺伝子もターゲットとしないネガティブコントロール siRNA を導入した場合は、いずれの allele においても皮膚の着色に影響は見られなかった。以上の結果から、*apt-like* の発現上昇が p^S と $+^p$ だけでなく、 p^M と p^B の表現型を作り出す上でも必須であることが示された。以上、強制発現と RNAi の結果から、 p locus の原因遺伝子は *apt-like* であると結論づけた。

apt-like と *Wnt1* シグナリングの遺伝的制御関係：特定の体節に斑紋を作り出す分子メカニズム

カイコの幼虫には 100 以上の突然変異体が存在するが、 p locus の影響を受けることによって、表現型が著しく変化する形質も少なくない。例えば、第 4 染色体上の褐円 (L ; *Multilunar*) と呼ばれる変異体は、幼

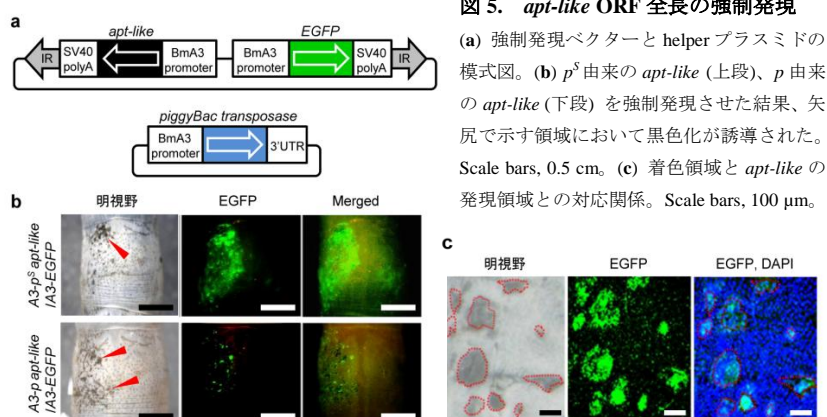


図 5. *apt-like* ORF 全長の強制発現

(a) 強制発現ベクターと helper プラスミドの模式図。(b) p^S 由来の *apt-like* (上段)、 p 由来の *apt-like* (下段) を強制発現させた結果、矢尻で示す領域において黒色化が誘導された。Scale bars, 0.5 cm. (c) 着色領域と *apt-like* の発現領域との対応関係。Scale bars, 100 μ m.

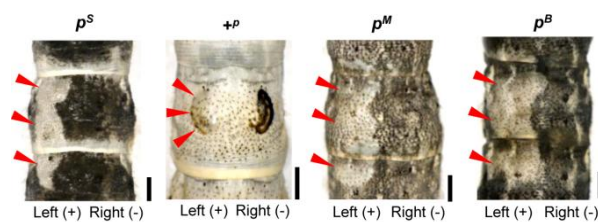


図 6. *apt-like* の siRNA の導入による着色への影響

apt-like をノックダウンした結果、矢尻で示す領域において、 p^S 、 $+^p$ 、 p^M 、 p^B の着色が阻害された。+、- の表記はそれぞれエレクトロポレーション時における電流の向きを表す。Scale bars, 1 mm.



図 7. 幼虫紋様変異体 L と p locus の遺伝学的関係

L は p locus が $+^p$ の場合は各体節にスポット模様を生じるが (上)、 p の場合は黒い着色が生じない (下)。写真はいずれも 5 令幼虫を示す。

虫の各体節に一对のスポット模様が生じる優性の変異体であるが、近年その原因遺伝子として *Wnt1* が同定された (Yamaguchi, J. *et al.* 2013)。興味深いことに、*L* のスポット模様は *p* locus が $+^p$ の場合のみ出現し、*p* の場合は出現しない (図 7)。この遺伝学的な特徴は、*apt-like* と *Wnt1* との間に何らかの遺伝子間相互作用が存在することを示唆している。

apt-like と *Wnt1* の遺伝的制御関係を明らかにするために、*in vivo* エレクトロポレーション法を用いて機能検証を行った。*Wnt1* を $+^p$ の 2 令幼虫の皮膚に導入した場合、次令以降で着色が観察されたものの (図 8a)、*Wnt1* を *p* の 2 令幼虫の皮膚に導入した場合は、黒色化は誘導されなかった (図 8c)。*Wnt1* が導入された左半身の皮膚と、導入されていない右半身の皮膚を切り分けて cDNA 調製し、定量的 RT-PCR を行ったところ、興味深いことに $+^p$ では *Wnt1* の発現領域で *apt-like* が有意に高発現していたが (図 8b)、*p* では *apt-like* に発現変動は見られなかった (図 8d)。この結果から、*L* のスポット模様は、*Wnt1* によって *apt-like* が発現誘導されるために生じると考えられる。一方で、*p* の 2 令幼虫に *apt-like* を強制発現させ、同様に *apt-like* の導入領域と非導入領域において *Wnt1* を発現定量したが、両者の間で *Wnt1* の発現に有意な差は見られなかった (図

8e, f)。先行研究において、 $+^p$ では斑紋が存在する体節 (腹部第 2・第 5) で *Wnt1* の発現が見られる一方、斑紋が存在しない体節 (腹部第 3・第 4) では発現が見られない (Yamaguchi, J. *et al.* 2013)。これは *p* の場合も同様であり、 $+^p$ において斑紋が生じる体節と同じ領域だけで *Wnt1* の発現が確認される。以上の知見と機能検証の結果は、 $+^p$ と *p* の間に見られる斑紋の有無、すなわち、特定の体節に斑紋を作り出す分子メカニズムを考察する上で重要なヒントを与える。 $+^p$ の場合、斑紋が存在する体節で発現した *Wnt1* によって *apt-like* が発現誘導され、皮膚に着色が生じると考えられるが、*p* の場合は *Wnt1* によって *apt-like* が発現誘導されないために着色が生じないと予想される。すなわち、 $+^p$ と *p* の表現型の違いは、*apt-like* の *Wnt1* に対する応答性の違いに起因すると考えられる。具体的には、 $+^p$ では *Wnt1* シグナリング経路に参与する因子が *apt-like* の cis element と相互作用できるため、*apt-like* が発現誘導されるのに対し、*p* では cis element に変異が生じているため、*Wnt1* シグナリング経路に対して応答できないものと推定される。

【結論】

本研究から、*p* locus の表現型の原因は転写因子 *Apt-like* であることが明らかとなった。さらに今回、 $+^p$ と *p* の表現型の違いが *apt-like* の *Wnt1* に対する応答性の違いに起因する可能性を見出した。

p locus には少なくとも 15 もの alleles が存在するが、どのようにして一つの遺伝子が多様な斑紋を制御しているのだろうか。例えば、 p^S は全身が黒い表現型を示すが、 $+^p$ の斑紋も同時に観察されることから、 p^S では $+^p$ の表現型を作り出すメカニズムに加え、全身を黒くするメカニズムも存在すると思われる。

Apt-like はカイコにおいて目玉模様や枝型擬態をはじめとした擬態形質に関与するだけでなく、実際に自然界の鱗翅目昆虫においても高度に保存されている新規転写因子である。*apt-like* の制御機構の詳細をさらに探求することによって、紋様の多様性の進化を探る上で重要な知見をもたらすことができると期待される。

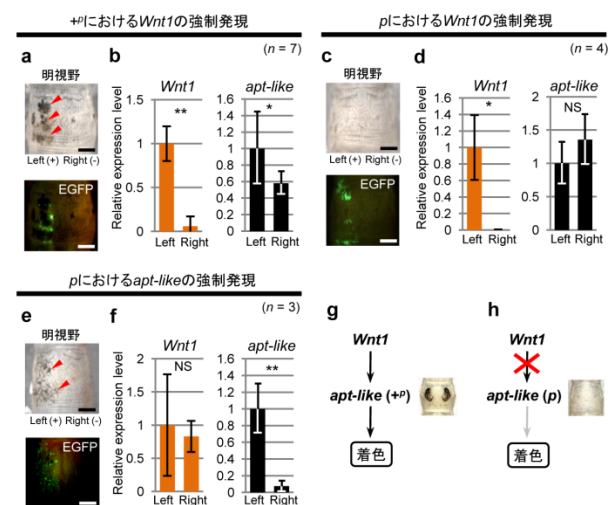


図 8. *apt-like* と *Wnt1* の遺伝的制御関係

(a, b) $+^p$ の皮膚における *Wnt1* の強制発現。皮膚に着色が生じ、その領域で *apt-like* の高発現が見られる。(c, d) *p* における *Wnt1* の強制発現。皮膚に着色は生じず、*apt-like* の発現変動も見られない。(e, f) $+^p$ における *apt-like* の強制発現。(g, h) $+^p$ と *p* それぞれにおける *Wnt1* と *apt-like* の遺伝的制御関係のモデル図。** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, one-tailed paired Student's *t*-test (NS, not significant)。Scale bars, 0.5 cm。