論文審査の結果の要旨

氏名　依田　真一

本論文では、カイコの幼虫斑紋遺伝子座 *p* (*p* locus) の多様な斑紋形質の原因が、新規転写因子 Apontic-like (Apt-like) であること、さらに幼虫皮膚での *apt-like* の発現上昇によってメラニン色素合成が誘導されることを明らかにしている。

カイコの *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 年以上も昔からさまざまな側面で研究されてきた。*p* locus には少なくとも 15 種類もの斑紋形質が存在し、その原因は単一の遺伝子座（第 2 染色体、3.0 cM）に起因するが、その実体は全く不明であった。目玉模様や枝型擬態など、生態学的に重要な擬態形質もこの遺伝子座に含まれること、さらに一つの遺伝子座から多様な形質が作り出される現象には新規の形質制御機構が内在している可能性が高いと考えられるため、その解明は大きなインパクトをもたらすと期待される。

論文提出者は、主な研究対象として、表現型が明確に異なる 3 つのアレル（全身が黒い黒縞 p^S、特定の体節に斑紋が形成される形蚕$+^p$、全身が白い *p*）に着目している。まず、原因遺伝子が含まれるゲノム上の領域を特定するために、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い、p^S の責任領域を 233-kb に絞り込むことに成功している。この領域には先行研究で明らかとなった$+^p$ の機能未知の候補遺伝子 *3234/5* が含まれており、この遺伝子が *p* locus の多様な形質を制御する最有力候補であると想定した。相同性検索により、ショウジョウバエの胚期で顎形成、気管形成などさまざまな発生現象に関与する転写因子 Apontic と遺伝子構造に類似性が見られており、*3234/5* 遺伝子を Apontic-like (Apt-like) と命名している。*apt-like* の ORF 全長の配列比較により、p^S では$+^p$ と *p* には見られないアミノ酸置換が 1 ヶ所見つかっている。発現量の違いが斑紋の違いに起因するかどうかを調べるために *apt-like* の発現を定量すると、p^S と$+^p$ では、将来の黒色となる皮膚領域で高発現が見られる一方、*p* では発現が抑制されていることが明らかにされている。

apt-like の発現上昇が黒色化の原因であることを、*in vivo* エレクトロポレーション法を用いて機能証明している。具体的には、真っ白な *p* の皮膚に *apt-like* と *EGFP* がコードされた *piggyBac* コンストラクトを、*transposase* をコードする helper プラスミドと共導入すると、*apt-like* の発現領域で黒色のメラニン色素が誘導された。さらに、この黒色化は p^S、*p* 由来のいずれの *apt-like* でも同様に誘導されており、3 アレル間に存在するアミノ酸置換がタンパク質の機能にほとんど影響を与えないことを見出している。強制発現の結果に対して確証を得るため、*in vivo* エレクトロポレーション法を用いた RNAi も行っている。p^S と$+^p$、さらに *p* locus の別のアレルである p^M と p^B の皮膚に siRNA を導入し *apt-like* の発現を抑制すると、次令で着色が著しく阻害された表現型が得られ

ている。これにより、*apt-like* の発現上昇によって着色が誘導されること、さらに *apt-like* が p^S と $+^p$ だけでなく、p^M と p^B の形質も制御していることを明らかにしている。さらに、RNAi の結果に対して再現性を得るために、TALEN 法によるノックアウトも試みており、p^S の embryo に TALEN mRNA のペアをインジェクションした結果、当世代で体細胞モザイクが得られている。以上、強制発現、RNAi、ノックアウトによる機能解析の結果から、*p* locus の多様な形質の原因は *apt-like* であると結論づけている。

さらに論文提出者は、*apt-like* の発現制御機構の一端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た強制発現によって、$+^p$ と *p* の斑紋形質の違いが *Wnt1* に対する *apt-like* の応答性の有無に起因することを見出している。

本研究から、*p* locus の多様な斑紋形質の原因が明らかになり、昆虫遺伝学の歴史に多大な貢献を果たしている。*apt-like* はカイコ以外の鱗翅目昆虫種間でも高度に保存されており、この遺伝子が幼虫斑紋の多様性を担ってきた可能性を期待させる。

なお、本論文は、山口淳一氏、三田和英氏、山本公子氏、伴野豊氏、安藤俊哉氏、大門高明氏、藤原晴彦氏との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。

以上 1,941 字