

## 論文の内容の要旨

論文題目 Molecular Mechanism of Wing Development in the Wingless Mutant  
(*flügellos*) of the Silkworm, *Bombyx mori*

(カイコ無翅突然変異体 *flügellos* における翅形成の分子機構)

氏名 松岡 朋子

昆虫の変態は、幼虫から成虫への生活スタイルの変化に伴う体制の転換現象である。変態期には幼虫組織の退化・神経系の再構築など様々な現象が見られるが、中でも翅の劇的な変化は古くから注目されてきた。翅原基は幼虫期には胸部体節に小さな袋状の扁平な組織として存在し、終齢幼虫期から蛹期にかけて、体内のホルモン濃度の変化に伴って急激に形態が変化する。ショウジョウバエでは、体全体のパターン形成に関わる遺伝子の多くが翅の形態に異常をきたす突然変異として発見された経緯があり、翅形成の機構は発生遺伝学的研究の格好の対象となってきた。しかし、位置情報を担う遺伝子群が変態期にホルモンとどのように関わって形態形成を行うのか、その分子機構はほとんど未解明のまま残されている。また、昆虫の変態を促す脱皮ホルモン（エクダイソン）が種々の遺伝子の転写を誘導する経路については、情報伝達に関わる数多くの核内レセプターが単離されつつあるが（図1）、その複雑な遺伝子のネットワークが組織特異的な変化を引き起こすメカニズムの詳細はわかっていない。

カイコの無翅突然変異体 *flügellos* (*fl*) は、4 齢幼虫時まではほぼ正常な形態の翅原基を持つが、5 齢（終齢）で原基の伸長、翅脈の形成といった分化が進行せず、蛹と成虫で無翅となる。しかし、他の組織に関しては野生型（WT）と形態的に大きな違いは見られないため、*fl* では変態時に翅だけで形態形成の進行が阻害されると考えられる。本研究の目的は *fl* と WT の幼虫の翅原基での遺伝子発現を体系的に比較することによって、変態期の翅形成の分子機構を解明することである。

まず第1部では、WT と *fl* の翅原基の培養実験を行い、エクダイソンによって誘導される遺伝子群の発現を定量的に比較し、*fl* で発現量が低下する遺伝子を解析した。第2部では、WT と *fl* の翅原基で mRNA ディファレンシャル・ディスプレイ法を行い、*fl* において異常な発現パターンを示す遺伝子を探索した。得られた遺伝子群の中で、特に *fl* で全く発現が見られない新規アネキシン遺伝子（アネキシンFと命名）が *fl* の原因遺伝子そのものであるという可能性が考えられたため、第3部ではその検証を試みた。

### 第1部 *fl* 翅原基におけるエクダイソン応答性遺伝子群の発現解析

これまでの研究によって、ホルモンのような体液性因子が *fl* の翅の異常の原因ではないこと、*fl* 翅原基をエクダイソンを含む溶液中で培養しても WT のような形態変化が起こらないことが示されていた。従って、*fl* の翅原基はエクダイソンに対する応答性を失っているのではないかと想定された。この仮説を実証するために、エクダイソンレセプター（EcR）を始め、段階的に発現していく early gene、early-late gene と呼ばれる転写因子、また、最終的に誘導される作動遺伝子、late gene の発現量を定量的 RT-PCR によって WT と *fl* で比較した。

エクダイソンの影響を直接、同条件で比較するために、5 齢初期の WT と *fl* のカイコから翅原基を単離し、エクダイソンの濃度を变化させた Grace's medium 中で培養した。その結果、エクダイソンレセプターの構成成分である EcR や USP、比較的早い段階で誘導される E75 といった、転写活性化経路の上流の転写因子の発現量は *fl* 翅原基においてもほぼ正常だった。これに対して、early-late gene である BHR3、late gene に属する Urbain は、*fl* では WT と比較して有意に発現量が低下していた（図2）。BHR3 はショウジョウバエの核内レセプター、DHR3 のオースロガス遺伝子である。ショウジョウバエでは DHR3 が EcR の負のフィードバック制御を行うという報告があり（図1）、*fl* でも BHR3 の低下に起因すると思われる EcR-B1 の高発現が観察された。また、Urbain は高濃度のエクダイソンによって誘導され、翅特異的な発現を示すことから翅の形成に関わる作動遺伝子だと考えられている。

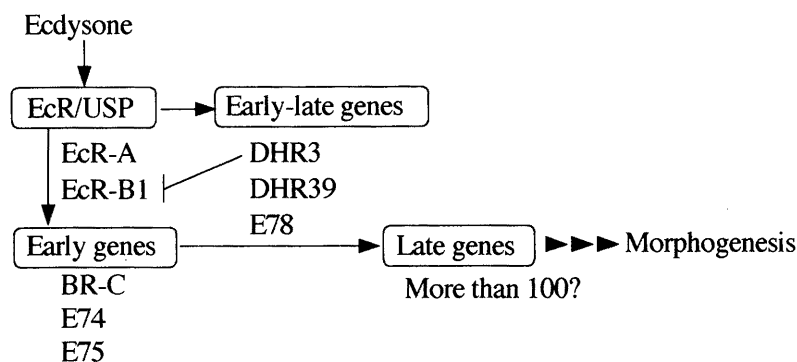


図1 ショウジョウバエにおけるエクダイソンによる転写誘導カスケードのモデル

→: 誘導    —|: 抑制

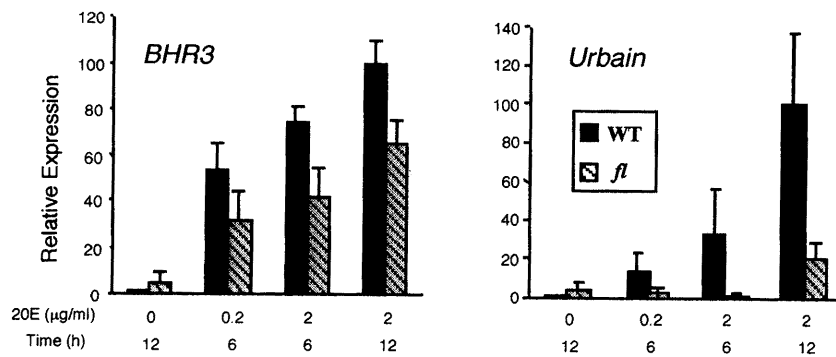


図2 翅原基におけるエクダイソンによる転写誘導。5齢2日目の翅原基をエクダイソン(20E)存在下で培養し、mRNAを定量的RT-PCRによって測定した。(N=4-5)

さらに、アクチンを含む4種類のハウスキーピング遺伝子は *fl* においても正常に発現しており、*fl* の翅原基では組織崩壊などによって遺伝子発現が全体的に抑制されているのではなく、BHR3・Urbainの発現量が特異的に低下していることが明らかになった。in vivoの翅原基でも同様の結果が得られたが、同じステージの脂肪体・精巢を用いたノーザンブロットングでは、BHR3は *fl* の組織においても正常に発現していた。以上の結果から、*fl* の翅原基ではエクダイソンによる情報伝達系の上流ではなく、early-late gene以降の遺伝子発現に異常があり、しかもそれが翅原基特異的であるため、翅の欠損という表現形に結びついたと考えられる。

## 第2部 *fl*の翅原基で発現に異常をきたしている遺伝子の探索

第1部では、*fl*における遺伝子発現の低下が翅原基特異的であることが示された。このような異常は、*fl*遺伝子の機能欠損のために引き起こされたと考えられる。そこで *fl*翅原基で発現パターンが異常になっている遺伝子を解析することによって変態期の翅の分化に関わる遺伝子を探索するとともに、*fl*遺伝子自体の機能を知る手がかりを得ようと考えた。5齢初期から前蛹期のWTと *fl*の翅原基を用いてmRNAディファレンシャル・ディスプレイ法を行った。発現量に差の見られた10本のバンドを解析した結果、*fl*の翅原基では、成虫原基の細胞増殖制御に関わると考えられているribosome-associated protein P40や、5齢期に翅原基特異的に発現する未知遺伝子などが過剰発現していることが明らかになった。特にP40は、WTでは4齢・5齢期を通してほぼ一定に発現しているのに対し、*fl*翅原基では前蛹期0日目にWTの10倍以上の鋭いピークが見られる。P40の過剰発現は翅原基の増殖を抑制すると考えられるので、この発現パターンは *fl*の翅原基における細胞分裂の減少とよく合致するものである。また、細胞外マトリクスの成分であるクチクラタンパク質、LCPI8も蛹化直前に過剰に発現していた。*fl*で発現量が増加するのは翅原基の形態異常によると考えられるが、LCPI8は皮膚では幼虫脱皮時に発現する遺伝子として知られており、組織によって転写調節の異なる例として興味深い。さらに、*fl*で発現量が低下している遺伝子を探索する過程で、Ca<sup>2+</sup>/リン脂質結合タンパク質、アネキシンの一種と考えられる遺伝子が *fl*の翅原基で全く発現していないことを発見した。この新規に

発見されたアネキシン（アネキシンF）は翅で他の組織よりも強く発現しており、翅の形成に重要な働きを持つことが推測される。

### 第3部 *fl*の原因遺伝子としてのアネキシンFの解析

アネキシンファミリーは10種類以上のメンバーからなり、植物から哺乳類に至るまで広く分布している。膜輸送、細胞増殖、アポトーシスなど、様々な生理現象とアネキシンとの関連が示唆されているが、生体内における正確な役割についてはほとんど知られていない。第2部で得られたアネキシンFは、N末端にこれまでに報告されているアネキシンには見られない特徴的なリピート構造を持つことから、新規のメンバーであると考えられる（図3）。

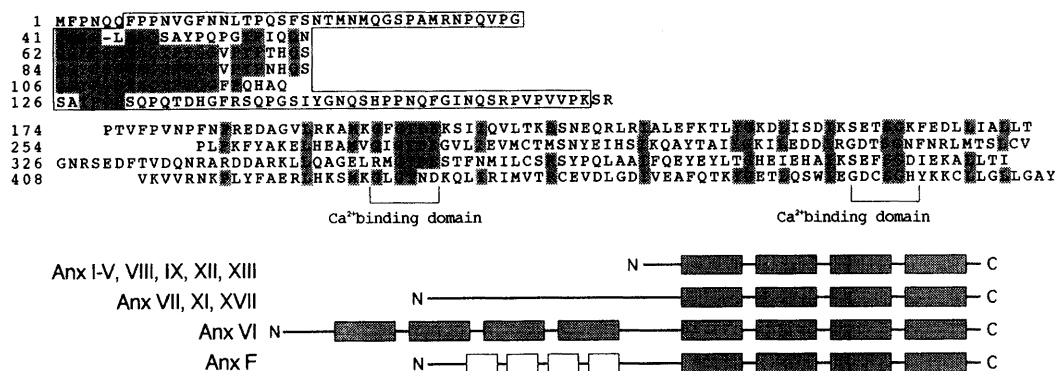


図3 アネキシンFの構造（上）とアネキシンファミリーのドメイン構造（下）。（上）網掛けはリピート構造内の保存されたアミノ酸を示す。枠内は long-isoform 特異的配列。（下）灰色のボックスは Ca<sup>2+</sup>結合部位を持つC末端リピートの単位、白いボックスはアネキシンFに特異的なN末端リピートの単位を表す。

アネキシンFにはN末端の長さの異なる2つのアイソフォームが存在し、翅では両方が同程度発現するが脂肪体では短いアイソフォームが強く発現するなどの違いが見られた。アネキシンF遺伝子の様々な部位をプローブとしてWTと*fl*でサザンハイブリダイゼーションを行い、*fl*ホモ個体のゲノム上では全領域が欠失していることを確認した。また、*fl*遺伝子は第10染色体13.0にマップされているが、この染色体上の9個のDNAマーカーについて45個体のF2 intercrossを用いた連鎖解析を行ったところ、うち一つがアネキシンFと連鎖した。すなわち、アネキシンFは*fl*遺伝子と同じ染色体にあり、2つが同一の遺伝子である可能性が強まった。さらに、ここまで*fl*として用いていた*fl*系統ではなく、同じ遺伝子座位にあることがわかっている*fl*, *fl*系統についてアネキシンF遺伝子を調べたところ、N末端領域にアミノ酸置換が見られた。これらの結果はアネキシンFが*fl*遺伝子そのものである可能性を強く示唆する。

以上に示した一連の結果から、*fl*の翅原基ではアネキシンFの機能欠損がエクダイソンによる転写誘導経路の阻害、さらに細胞増殖制御の異常を引き起こしたと考えられる。アネキシンF自体にはエクダイソン応答性は見られなかったが、今後の研究の進展によって、Ca<sup>2+</sup>による情報伝達経路とエクダイソンとの接点など、形態形成の分子機構に新たなカテゴリーを加えるものと期待される。