

## 論文内容の要旨

論文題目 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

(Identification and expression control of *wnt1* as the responsible gene for a larval marking mutant *L* in *Bombyx mori*.)

氏名 山口 淳一

自然界の生物、特に昆虫には、巧みな環境適応能力や外見の多様性を獲得した種が多く存在する。正常な生存能力を維持したまま新しい遺伝形質を獲得するメカニズムの解明は重要なテーマである。鱗翅目昆虫の幼虫の体表に見られる多様な紋様や毛状構造は、外皮（クチクラ）を裏打ちする一層の真皮細胞が作り出す。本研究では、幼虫体表の紋様に関して多数の突然変異系統が存在するカイコに着目した(図1)。図1にはその一部を示したが、それぞれ別の一遺伝子座に支配される優性の遺伝形質であり、菱の実型褐円 (L<sup>c</sup>) を除き、ホモ・ヘテロ個体ともに標準型と同等の成長・繁殖が行える。さらに、野外に生息する昆虫にも類似した紋様や外皮構造がみられることから、このようなカイコの変異体の原因遺伝子の解明は、昆虫の外皮構造の多様化のメカニズム解明に大きなヒントを与えると考えた。

本研究では「褐円 (L)」に着目し、原因遺伝子として *wnt1* (*wingless*) を同定し、発現解析・機能解析から、この遺伝子が広く紋様形成に関与している可能性を示した。

また、「褐円(L)」は「コブ (K)」の形質に影響を与えることが古くから知られている。Kは、真









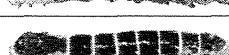


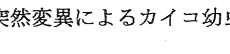
名称	写真	斑紋の形状	遺伝子座
野生型 (+P)			-
褐円(L)			Chr4 -15.3
菱の実型褐円 (L <sup>c</sup> )			Chr4 -15.3
コブ(K)			Chr11 -25.4
褐円 × コブ			-
黒縞(p <sup>5</sup> )		-	Chr2 -3.0
ゼブラ (Ze)		-	Chr3 -20.8

図1 突然変異によるカイコ幼虫の外見の多様化

皮細胞の異常増殖により特定の体節がコブ状に隆起するが、Lと共存することで複数の体節のL斑紋領域にコブが生じる(図1)。反対に、全身の外皮を黒色にする「黒縞(p<sup>S</sup>)」はKの発現を抑制する。このような現象は、昆虫の真皮細胞では外皮の着色と細胞増殖に密接な関係が有ることを示唆している。本研究で明らかになった *wnt1* の機能を中心に、他の形質との関係性などを参考にして、真皮細胞が外皮構造を多様化させるメカニズムを考察した。

## 【結果と考察】

### 1. 変異系統「褐円(L)」の原因遺伝子の同定

褐円(L)の原因遺伝子同定のために、連鎖解析をベースとしたポジショナルクローニングを行った。褐円(L)と標準型(+)を交配させ、褐円(L)の形質をもつF1個体に、さらに標準型を交配させて得られる個体(BC1)のジェノタイプングを行った。褐円(L)の形質は優性なので、表現型と、マーカーの位置での遺伝型(褐円の親由来のゲノムが含まれるか否か)の連関を個体ごとに検査した(図1a)。2000匹以上のBC1個体を解析し、最終的には34kbpの領域が、褐円(L)の斑紋を出現させる必要かつ十分なゲノム領域であることを明らかにした(図2b)

この領域内には、*wnt1*のエキソン1・2がコードされていたが、褐円(L)と標準型(+)の配列を比較しても、アミノ酸レベルでの変異は見つからなかった。そこで、34kbp内部及び周辺にコードされている遺伝子(6145、*wnt1*、*wnt6*)の発現量を標準型と比較したところ、褐円(L)の真皮細胞で*wnt1*が標準型と比べ、顕著に異なる発現をしていることが分かった(図3a)。そこで、ホルマウント *in situ* ハイブリダイゼーション法によって、褐円(L)における*wnt1*の空間的な発現パターンを調べたところ、紋様が発現する予定領域

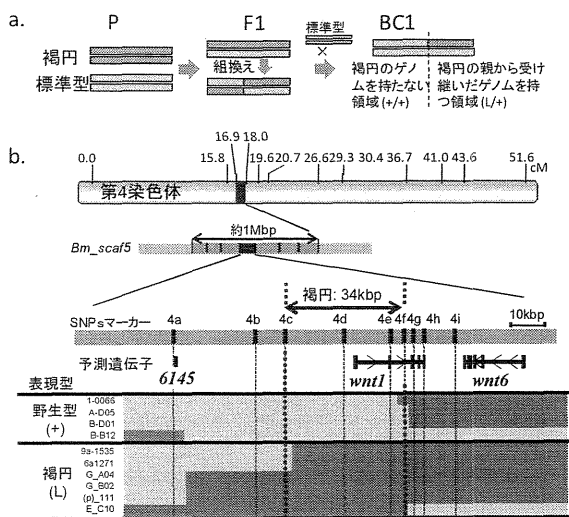


図2 連鎖解析による責任領域の決定

a.連鎖解析のためにBC1個体を得るための交配方法の概要。b.概要マッピング及び詳細マッピングの結果。2000個体以上のBC1のうち、より内側で組み換えが起きていた個体のジェノタイプングの結果を抜粋して示した。茶色は褐円の親由来のゲノムを受け継ぐ領域を示し、「褐円:34kbp」は、最終的に絞り込まれた責任領域を示す。

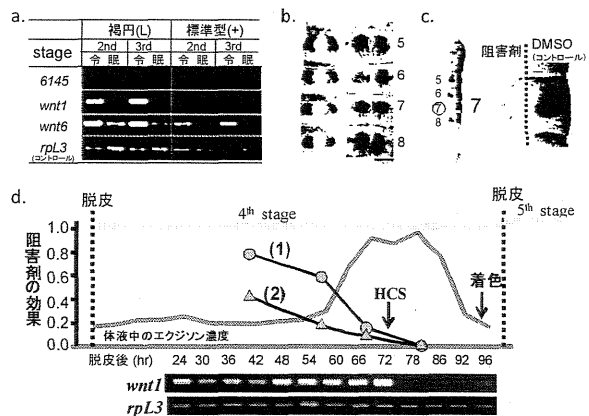


図3 褐円(L)での *wnt1* の発現解析と機能解析

a. L: 34kbp 周辺にコードされる遺伝子の発現量を半定量的RT-PCRで比較した結果。b. *wnt1* をプローブとしたホルマウント *in situ* ハイブリダイゼーション(WMISH)の結果。幼虫外皮の斑紋(左)の位置に一致したシグナル(右)がみられる。スケールバー;1mm。c. WNTシグナル伝達系の阻害剤(ケルセチン)を第7体節の左側に投与したとき斑紋形成が阻害された様子。同体節の右側にはコントロールとして同量のDMSOを投与した。d. ケルセチンの投与時期と阻害効率の関係。(1),(2)は2回の独立した実験の結果を示す。*wnt1* の発現量の変動を半定量的RT-PCRで調べた結果を下に並べて示した。

によく一致していた(図 3b)。この異常発現している *wnt1* 転写産物が未知のプロモータやスプライシングバリエーションの結果生じたものでないことは、5'-RACE と RT-PCR により確認した。このことから、褐円(L)の斑紋が出現する原因は、*wnt1* の異所的な発現が原因であることが強く示唆された。

*wnt1* は WNT シグナル伝達系の主要なリガンドとして知られている。そこで WNT シグナル伝達系の阻害剤であるケルセチンの局部投与を行ったところ、脱皮後 72 時間までは、再現性よく斑紋形成が阻害されることが明らかになった(図 3c)。投与する時期を変えて阻害効率を見ると、時期のマーカーとなるヘッドカプセルスリッページ(HCS)を境に、阻害効果が全く見られなくなることがわかった。斑紋部での *wnt1* の発現量も HCS を境に激減していることがわかり(図 3d)、これらのことから、褐円斑形成のためには、脱皮後 72~78 時間の HCS までに、*wnt1* の異所的な発現による WNT シグナル伝達系の活性化が必要であることが示唆された。それによって着色される予定領域が決まり、その後、24 時間は *wnt1* の発現がない状態でも、決められた領域の外皮への着色が起こると考えられる。このように *wnt1* が真皮細胞において斑紋形成のプレパターンを担っている可能性を示したことは初めてであり、*wnt1* 遺伝子の機能的保存性から、昆虫全般における斑紋形成のメカニズム解明に重要な手がかりを与えたと考えている。

## 2. 褐円系統における *wnt1* の発現制御機構

突然変異が起きた褐円(L)のゲノムが、どのようにして *wnt1* の異常発現を誘導しているかを検証するために、標準型(+p)を交配させたヘテロ個体(L/+)を用意した。L と +p の *wnt1* の配列には 7 つの SNPs (1 塩基多型) が存在するので、*wnt1* 転写産物をシーケンスすることで、どちらのゲノムが活性化されているかをモニターできる。もし、褐円(L)のゲノム由来の産物しか検出されなければ、突然変異の実体は cis エLEMENT の変化であるために同一ゲノムだけが活性化された結果であり(図 4 a)、両方の産物が混在していることを示す重複波形が見られれば、突然変異の実態は両方のゲノムに影響を与えるトランス因子(例えば siRNA など)であると判断できる。

配列解析の結果、斑紋部の真皮細胞では、褐円(L)のゲノム由来の *wnt1* 転写産物しか検出されなかった(図 4 b,c “皮膚”)。このことから、褐円(L)における斑紋特異的な *wnt1* の発現制御は、cis エLEMENT の変化によるものであることが明らかになった。

一方で、*wnt1* は初期・後期発生において細胞の運命を決定する大きな影響力をもつ遺伝子として知られている。もし、褐円(L)において、突然変異による cis エLEMENT の変化が、皮膚以外の組織での発現をも変化させてしまえば、形態や生存に致命的なダメージを与えることが予想される。そこで、同様の方法で、他の組織(中腸、翅原基、精巣、気管)における褐円(L)ゲ

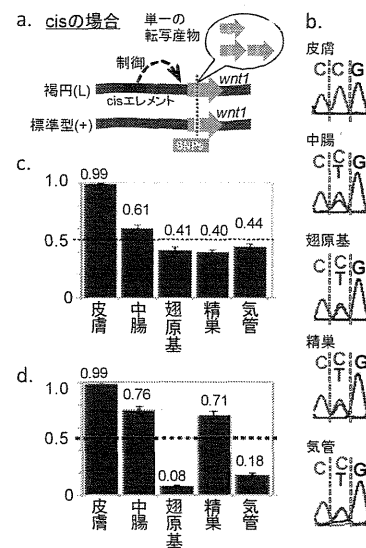


図 4 褐円アルル特異的な *wnt1* の発現  
a. cis エLEMENT によって *wnt1* の斑紋特異的な発現が制御される場合の模式図。  
b. ヘテロ個体(L/+)における各組織の *wnt1* 転写産物の SNPs のシーケンス波形。C: 褐円(L)由来、T: 標準型由来。  
c. シーケンスの波形の高さから、褐円(L)ゲノム由来の *wnt1* 転写産物が占める割合を 7 つの SNPs から各組織ごとに定量化したもの。  
d. 菱の実型褐円(L)と標準型のヘテロ個体(L/+)における解析結果。

ノムの *wnt1* の転写調節を標準型のそれと比較した(図 4b,c)。その結果、皮膚とは異なり、他の組織では L・+ の両ゲノムからほぼ均等に *wnt1* が転写されていることが明らかになった。これに対し、ホモ致死のアリルである菱の実型褐円(L<sup>c</sup>)について同様の解析を行うと、L<sup>c</sup> ゲノムの転写制御は皮膚以外の組織でも標準型の制御と大きく異なっていることがわかった(図 4 d)。L がホモ個体でも正常に生存できるのは、L の新規の cis エlement が、本来の *wnt1* の発現制御には大きな影響を与えず、皮膚特異的・斑紋特異的な発現をもたらした結果と考えられ、自然突然変異にも関わらずこのような厳密な制御が行われることは興味深い。

前述のポジショナルクローニングから、褐円(L)における斑紋特異的な *wnt1* の cis エlement は、褐円:34kb 内に存在していることが分かっている。そこで、その配列を同定するために、L を含む 4 系統について、*wnt1* の開始コドンから上流全域(19kbp)の非コード領域の配列解析を行った。その結果、褐円(L)系統に変異がある場所は 4 箇所のみで、そのうち 2 箇所は一塩基置換であった。残りは数百 bp のトランスポゾンの挿入箇所とその周辺の複数の塩基置換で、これらの領域に *wnt1* の発現を制御するシス因子が存在する可能性が高い。この可能性を検証するために、さらに L<sup>c</sup> などの上流領域の配列解析を進めている。

### 3. コブ(K)と褐円(L)の関係性

WNT シグナル伝達系については、活性化によって細胞の異常増殖を誘導する事例が多く報告されている。前述したように「褐円 L」と「コブ K」が共存すると褐円の斑紋箇所がすべてコブになることから、真皮細胞における WNT シグナルは、着色・細胞増殖の両方へ関与している可能性が考えられ、コブ(K)は、WNT 依存的に外形を変化させる因子ととらえることができる。そこで、褐円(L)で行ったのと同様の方法で、原因遺伝子の同定を試みたところ、責任領域は 440kbp に絞り込まれた。内部には予測遺伝子として 20 の遺伝子がコードされていたが、マイクロアレイによる解析から、どれもが、コブが形成される部位で細胞増殖が起こる時期に変動していないことが明らかになった。

### 4. まとめ

カイコ褐円(L)の原因遺伝子の同定から、(1)*wnt1* という本来はボディープラン全般に関わる重要な遺伝子が斑紋のプレパターン形成に働いていること、(2)*wnt1* 遺伝子は新規 cis 因子の獲得によって皮膚だけで斑紋特異的な発現が可能となったことが明らかになった。WNT シグナル伝達系の紋様形成への関与は、チョウの翅の紋様での発現パターンなどからある程度示唆されていた。しかし、紋様形成変異体の原因遺伝子を同定し、*wnt1* 遺伝子が単独で斑紋形成の ON/OFF を決定しうることを示したのは本研究が初めてである。褐円(L)は体節ごとに一對の斑紋を形成するが、多くの昆虫の体表にも同様の斑紋パターンが観察される。他の生物種でも *wnt1* の発現変動により、新規の斑紋を生み出してきたのかもしれない。

さらに、コブ(K)のように WNT シグナル依存的に、外皮の外形をかえるように働く遺伝子と黒縞(p<sup>s</sup>)のように変化を抑制するのに働く因子の存在が示唆される。これらは外見の多様化に関して、斑紋以外に、「形」を変える WNT の機能的側面を示すものであり、原因遺伝子の同定から、カイコや他の生物種における機能を明らかにしていくことは外見の多様化のメカニズムを知る上で重要であると考えられる。