

論文内容の要旨

論文題目

カイコ無翅突然変異体 *flügellos* の原因遺伝子の同定と解析 (Identification and functional analyses of the responsible gene for a wing-deficient mutant, *flügellos* (*fl*) of the silkworm, *Bombyx mori*)

氏名 佐藤 薫

序論

完全変態昆虫の翅は、幼虫の間は翅原基という未分化な組織として体内に存在し、脱皮・変態の際に昆虫ホルモンであるエクジソンに反応して組織分化が進行し、翅が形づくられていく。昆虫の翅形成の分子機構に関してはショウジョウバエを中心に研究が進められてきたが、パターン形成機構のみに着目したものが多く、昆虫ホルモンとパターン形成との関連はほとんど明らかになっていない。

本研究で用いた、カイコ無翅突然変異体 *flügellos* (*fl*) は、カイコ連鎖地図の第 10 連鎖群 13.0 にマップされる劣性の自然突然変異体で、4 つの複対立形質が報告されている。*fl* (劣性ホモ個体) の翅原基は 4 齢幼虫時まではほぼ正常に発生するが、5 齢(終齢)期に入ると本来起こるべき形態形成が進行せず、*fl* の蛹と成虫には翅が生じない[図 1, 図 2A]。一方、*fl* は翅以外には目立った異常は見られない。*fl* では、エクジソンに



図 1. 野生型カイコ(Wild Type)と *fl* 変異体(*fl*)の成虫

反応して発現誘導される初期後期遺伝子 *BHR3* や後期遺伝子 *Urban* の発現が翅原基特異的に低下するなど、変態時のエクジソン応答に異常がみられ、このため、翅原基の組織分化が進行せず、翅が形成されないことが示唆されている。この *fl* の原因遺伝子と機能が明らかになれば、昆虫ホルモンと翅のパターン形成との接点を見出すことができるとともに、昆虫の翅形成機構について進化発生学的に重要な知見が得られると期待される。そこで、本研究ではまず *fl* の原因遺伝子を同定することにした。

[1]. *fl* の原因遺伝子の同定

fl は独立に 4 つの変異系統(*fl*, *fl^k*, *fl^o*, *fl^p*)が得られている。先行研究で、*fl^k* では *fl* 遺伝子座と同一染色体上に存在する遺伝子 *Annexin B13* (*AnxB13*) を含む 200 kb 以上のゲノム領域が欠失していることが示唆されていたが、その欠失範囲は決定されていなかった。また、カイコ BAC ライブラリーを利用して、*AnxB13* を起点とした

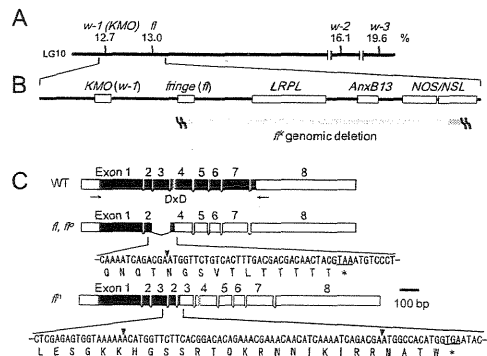


図 2. *fl* 遺伝子座のゲノム構造と各 *fl* 系統における *Bmfng* 遺伝子の変異 A. カイコ連鎖地図第 10 連鎖群。B. *fl* 遺伝子座のゲノム構造。灰色は *fl* ゲノムの欠失範囲を示す。C. *fl*, *fl^k*, *fl^p* における *Bmfng* の変異。*fl*, *fl^p* は exon 3 に相当する領域が欠失しており、*fl^k* は exon 2-3 が重複していることでフレームシフトが生じる。黒域は ORF を示し、▼はエクソンジャンクション、*はストップコドンを示す。

ゲノムウォーキングが途中まで進められており、その過程で、*AnxB13* 近傍には *LRPL*、*NOS*、*NSL* の3つの遺伝子が存在していることが示唆されていた[図 2B]。

私は、まず、これら3つの遺伝子に着目し、*f^k* ゲノムでの欠失や他の *f^l* 系統での変異を解析した。その結果、いずれも *f^k* ゲノムでの欠失がみられたが、*f^l* や *f^o* 系統では欠失やナンセンス変異などの目立った変異がみられなかった。そこで、これまで同定していない欠失範囲内に真の *f^l* の原因遺伝子があるのではないかと考え、*w-1* 遺伝子(*KMO*)までの BAC クローンを新たに単離して配列解析を行った[図 2A,B]。その結果、*f^k* の欠失領域の左端に相当する箇所に、Notch シグナルの制御に関わるショウジョウバエ *fringe* (*fng*) のオースログ(*Bombyx mori fng*, 以下 *Bmfng*)が存在することを見出した[図 2B]。それぞれの *f^l* 系統について、*Bmfng* の変異を明らかにしたところ、*f^k* はゲノム中から *Bmfng* の一部を含む領域が欠失した変異体であった[図 2B]。また、*f^l*、*f^o*、*f^p* の転写産物を RT-PCR で調べた結果、いずれも欠失や挿入によるフレームシフト突然変異が生じていることが判明した[図 2C]。*fng* は、糖転移酵素をコードし、*f^l*、*f^o*、*f^p* などのフレームシフト突然変異体ではこの酵素の機能に重要とされる DxD モチーフを含む前に翻訳終結してしまうため、分子的な機能を完全に欠損していると考えられる。これらの結果から、*Bmfng* が *f^l* の原因遺伝子であることが強く示唆された。

Bmfng の各組織での発現を半定量 RT-PCR 法で解析したところ、翅原基で特に強い発現がみられ、さらにホルマウント *in situ* hybridization (WMISH)法で発現パターンを調べたところ、翅原基の背側領域で特異的に発現していることが明らかとなった[図 3A]。ショウジョウバエ翅原基の背腹区画境界での Notch シグナルの下流にある *wingless* (*wg*)の誘導には *fng* が必要であることが知られている。そこで、*wg* のオースログ(*Bmwnt1*)の発現を WMISH 法により野生型と *f^l* の翅原基で比較した結果、野生型カイコでは *Bmwnt1* が背腹区画境界で発現していたが、*f^l* ではほとんど検出されなかった[図 3B]。このことから、カイコ翅形成においても *Bmfng* が Notch シグナルによる *Bmwnt1* の誘導に必要で、*f^l* の翅原基では Notch シグナルが正常に活性化されておらず、翅の背腹軸形成とそれに続く組織分化が正常に進行していないと考えられた。

[2]. *Bmfng* のエクジソン応答性の解析

f^l の翅はエクジソンに応答して発生しないことから、その原因遺伝子はエクジソン応答カスケードと何らかの関連性をもつと考えた。そこで、野生型カイコの翅原基をエクジソン添加(+20E)・無添加培地(-20E)で *in vitro* 培養し、*Bmfng* の発現を半定量 RT-PCR を用いて調べた。その結果、*Bmfng* がエクジソンによって発現誘導されることがわかった[図 4A]。さらに、タンパク質合成阻害剤(シクロヘキシミド)存在下では、この誘導が抑制されることから、*Bmfng* の発現誘導はエクジソンによる間接的な制御によることがわかった[図 4B]。

f^l で *BHR3* の発現が翅特異的に低下していることは以前から示されていたが、経時的な発現変動については詳細に解析されていなかった。そこで、*in*

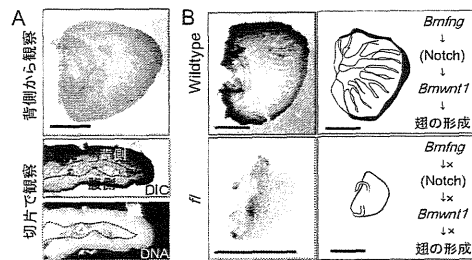


図 3. カイコ翅原基における *Bmfng* と *Bmwnt1* の発現パターン(WMISH) A. 野生型カイコ翅原基での *Bmfng* の発現パターン 切片で観察したところ、背側領域での *Bmfng* の発現がみられた。B. 野生型カイコ(Wildtype)、*f^l* 変異体 (*f^l*) 翅原基での *Bmwnt1* の発現 それぞれの発現パターンを右に図示した。*f^l* では背腹区画境界での *Bmwnt1* の発現がみられなかった。

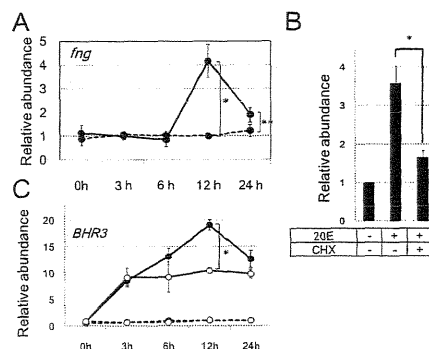


図 4. カイコ翅原基における *Bmfng* のエクジソン(20E)応答性 (半定量 RT-PCR) A. カイコ翅原基の *in vitro* 培養系を用いた *Bmfng* の 20E 応答解析 B. シクロヘキシミド (CHX, 10 μ g/ml) 存在下におけるカイコ翅原基の *in vitro* 培養系を用いた *fng* の 20E 応答解析 C. カイコ翅原基の *in vitro* 培養系を用いた *BHR3* の 20E 応答解析 ●, 野生型カイコ; ○, *f^l* 変異体; 直線, +20E (2 μ g/ml); 点線, -20E; * P <0.005; ** P <0.05; n=3-5.

in vitro 培養した *fl* 翅原基で *BHR3* の経時的な発現誘導パターンを調べた結果、エクジソン添加後 3 時間程度でみられる発現誘導は野生型カイコとほぼ同じだったが、その後の発現上昇が起こらないことが明らかになった[図 4C]。エクジソンによる *Bmfng* の発現誘導が、*BHR3* などの初期後期遺伝子の発現上昇にとって重要である可能性が考えられる。本研究により、エクジソンによる *Bmfng* の発現制御を介して、翅のパターン形成に重要な Notch シグナル経路とエクジソン応答カスケードが関連している可能性が示された。

[3]. カイコの組織分化における *fng* 依存的 Notch シグナル

Notch シグナルは生物種を越えて保存された細胞間シグナル伝達系であり、様々な組織の発生過程で重要な役割を果たしている。*fng* は Notch タンパク質の細胞外ドメイン内 O-フコース型糖鎖をグリコシル化することで、Notch のリガンド分子との結合性を変化させ、最終的に Notch シグナルの下流に影響を及ぼす。ショウジョウバエでは *fng* 依存的な Notch シグナルが様々な組織の正常な発生分化に必須で、機能欠損型の *fng* 変異体は致死になる。上述したようにカイコの *fl* では *Bmfng* は機能欠損しているにも関わらず、翅の発生のみが異常となる。両者の違いはどのように生じるのだろうか？

一つの可能性として、カイコでは翅原基以外の組織でもショウジョウバエと同様の発生機構が働いているが、翅原基以外の組織では *Bmfng* 以外の遺伝子が Notch の O-フコース型糖鎖修飾を行っているということが考えられる。この可能性を検証するために以下の実験を行った。まず、RT-PCR 法により

翅原基以外の組織での *Bmfng* の発現を解析したところ、脳や脚、触角原基、精巣、卵巢でも翅原基と同様強く発現していた。次に、糖鎖構造が明らかとなっている哺乳動物の Notch オートログである Notch1 の O-フコース型糖鎖構造[図 5A]を参考に、その糖鎖を特異的に認識するいくつかのレクチンを用いて、カイコの Notch タンパク質の糖鎖構造を解析した。その結果、野生型カイコの翅原基において、Notch タンパク質と思われる約 300kDa のタンパク質が糖鎖修飾を受けていることが示唆された[図 5B]。これに対し、*fl* では、この糖鎖修飾を表すシグナルがほとんど検出されなかった。さらに、翅原基と同様 *Bmfng* の強い発現がみられた脳・脚・触角原基・精巣・卵巢の解析したすべての組織においても、野生型カイコではシグナルが検出されたのに対し、*fl* ではシグナルがほとんど検出されず、これらの組織すべてにおいて Notch の O-フコース型糖鎖修飾が少なくとも大幅に減少していることが示された[図 5C]。以上の結果から、*fng* は翅原基以外の組織においても発現し、Notch の O-フコース型糖鎖修飾に関して主要な役割を果たしていること、さらに、*fng* の機能を代替する機能をもつ因子が存在する可能性が低いことが示唆された。また、カイコゲノムデータベース上でも、*BmFng* タンパク質と相溶性の高いタンパク質をコードする遺伝子は見つからない事実は、上記の結果と一致する。

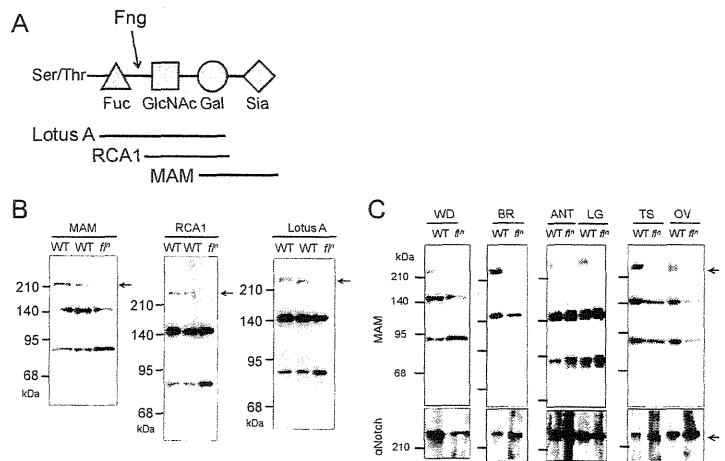


図 5. レクチンを用いた *fl* 個体における糖鎖上の検出 A. 哺乳動物 Notch1 の O-フコース 4 糖構造と MAM, RCA1, Lotus A レクチンの認識部位。Sia, シアル酸; Gal, ガラクトース; GlcNAc, N-アセチルグルコサミン; Fuc, フコースを示す。Fng は Fuc に β 1,3 結合で GlcNAc を付加する。B. MAM, RCA1, Lotus A のレクチンを用いて解析したとき、*fl* 変異体 (*fl*) では約 300 kDa のタンパク質 (Notch) に糖鎖異常が検出された (矢印)。C. 翅原基を含むいくつかの組織における MAM レクチンプロット及び抗 Notch 抗体 (α Notch) を用いたウエスタンプロット。*fl* 変異体 (*fl*) では翅原基以外の組織でも Notch の糖鎖に異常が生じている (矢印)。WD, 翅原基; BR, 脳; LG, 脚; ANT, 触角; TS, 精巣; OV, 卵巢。

第二の可能性として、カイコでは翅原基以外の組織の発生分化がショウジョウバエとは大きく異なり、翅以外の組織では Notch シグナルが働いていない、あるいは、*fng* 依存的な Notch シグナルの代わりに *fng* の機能に依存しない Notch シグナルが使われていることが考えられる。この可能性を検証するために、様々な組織における Notch シグナルの活性化の状況を解析した。ショウジョウバエでは、Enhancer of split [*E(spl)*] 遺伝子群の発現が Notch シグナルによって直接制御されており、Notch シグナルが活性化されると、様々な組織で少なくともいくつかの *E(spl)* 遺伝子の転写が誘導されることが知られている。

カイコゲノムデータベースを検索したところ、4 つの *E(spl)* 遺伝子が存在することがわかった。まず初めに、これらの *E(spl)* が Notch シグナルによって発現制御されているかを検証するために、Notch シグナル阻害剤 (DAPT) の存在・非存在下で翅、脳、脚を *in vitro* 培養し、半定量 RT-PCR 法により *E(spl)* 遺伝子群の発現を解析した。その結果、DAPT 存在下では *E(spl)* 遺伝子群の発現が抑制されており、カイコにおいても *E(spl)* 遺伝子群が Notch シグナルの活性化によって発現誘導されることが示唆された。次に、翅原基や脳、脚に加え、触角原基、精巣、卵巣における *E(spl)* 遺伝子群の発現を半定量 RT-PCR 法により解析し、野生型カイコ (+/ff) と *fl* 個体 (*fl/fl*) で比較した。その結果、野生型カイコでは解析したすべての組織において *E(spl)* 遺伝子群の発現がみられたのに対し、*fl* では、翅原基 (WD) における *E(spl)* 遺伝子群の発現がほとんどみられなかったが、それ以外の組織においては野生型と同様の発現がみられた [図 6]。以上の結果から、翅原基を含むすべての組織で Notch シグナルが活性化されているが、翅原基では *fng* 依存的な Notch シグナルが主要な Notch シグナルであるのに対し、それ以外の組織では *fng* 非依存的な Notch シグナルが主要な Notch シグナルであることが示唆された。このことが、*fl* で翅以外に目立った異常がみられないことの大きな要因となっていると考えられ、翅以外の組織については、カイコとショウジョウバエで異なる機構によって発生することを示唆している。

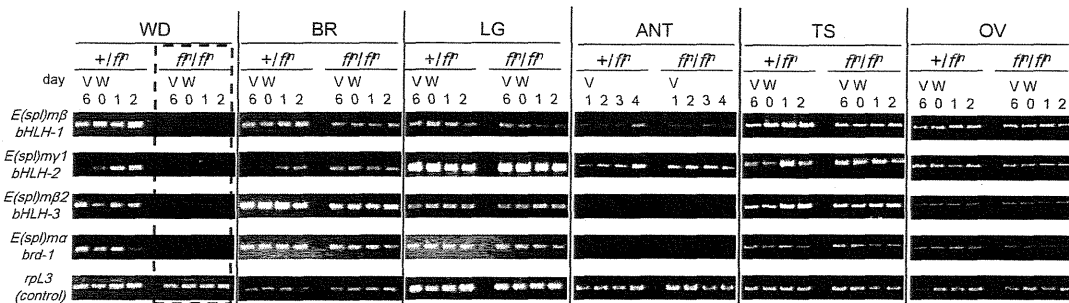


図 6. Notch シグナルの標的遺伝子 *E(spl)* の発現解析 (半定量 RT-PCR) 翅原基を含むいくつかの組織における *E(spl)* の発現を野生型 (+/ff)、*fl* 変異体 (*fl/fl*) でそれぞれ解析した。翅原基以外の組織では *fl* 変異体 (*fl/fl*) でも Notch シグナルの活性化が起きている。WD, 翅原基; BR, 脳; LG, 脚; ANT, 触角; TS, 精巣; OV, 卵巣

結論

本研究において、私は、*fl* の原因遺伝子として *Bmfng* を同定した。さらに *Bmfng* の発現がエクジソンで誘導されることを見出し、*Bmfng* の発現制御を介して、Notch シグナルとエクジソン応答カスケードがクロストークしている可能性を初めて示した。一方、翅の発生機構がショウジョウバエとカイコである程度保存されていることが示された。しかし、翅以外の組織分化においては両者で異なる機構が介在している可能性が高い。ショウジョウバエでは成虫組織は幼虫期に imaginal disc として存在するが、カイコを含む多くの完全変態昆虫の幼虫では翅が wing disc として存在する以外、他の組織は幼虫組織の primordia として発生分化する。このような発生様式の違いと Notch シグナルの活性化機構になんらかの関連があるとすれば興味深い。本研究により得られた結果は、昆虫類における組織の発生機構の保存性と多様化を考える上で、非常に重要な足がかりとなる。