

【学位論文審査の要旨】

1 研究の目的

モデル生物であるキイロショウジョウバエの自然集団内に見られる体色の濃淡の変異は、昆虫における野外の自然集団内の個体間差異が生じる背景にある、環境などの外的要因、及び分子レベルのメカニズムを統括的に捉えるための材料として適している。キイロショウジョウバエの体色変異は、メラニン生合成系遺伝子である *ebony* の *cis* 遺伝子発現制御領域内の DNA 塩基配列の変異によって大部分説明できることが知られている。メラニンの生合成は、羽化前後の体表に色素沈着が進行する時間帯に起こり、その時間帯における表皮細胞での *ebony* の発現量が暗色色素と明色色素のバランスに関わり、発現量が低いと体色は全体に暗くなることがわかっている。また、*ebony* の発現を制御する複数の *cis* 発現調節領域が、遺伝子上流及び第一イントロン内の DNA 断片と蛍光タンパク質をコードする塩基配列をつなぎ、ゲノム内に挿入した系統を用いたレポーターアッセイで明らかとなってきた。しかしこのような方法で明らかとなってきたモジュール状の *cis* 発現調節領域内の DNA 塩基多型のみでは自然集団内で見られる体色変異を完全には説明できないことから、生体内のゲノムの中では、複数の調節因子による複雑な発現制御が行われていることが予想されている。

一方、*ebony* はグリア細胞や気管を形成する細胞での多面発現も確認されており、多くの形質に対する多面的効果を持つことが知られている。また、キイロショウジョウバエの体色変異は、世界中の多くの地域における自然集団間で、標高や緯度に対する傾斜状の分布を示すことから、環境要因やストレス耐性との関連性が議論されてきた。しかし、その適応的意義については明確な結論は得られていない。

本研究では、以下二つの点を目的とした。(1)レポーターアッセイとは異なるアプローチである、ゲノム編集による遺伝学的方法を用いて *ebony* の *cis* 発現調節因子のノックアウトを行い、羽化直後の表皮細胞における転写促進因子及び抑制因子による制御機構を明らかにする。(2)成虫体色の濃淡と相関のある *ebony* の発現量変異の多面的効果の一端を明らかにするため、これまで着目されてこなかった生理的形質としてクチクラ炭化水素の組成と乾燥耐性との関連性を明らかにする。

2 研究の方法と結果

(1) *ebony* の *cis* 発現調節因子による表皮での転写促進及び抑制機構に関する研究

表皮における *cis* 発現制御機構の詳細を明らかにするため、ゲノム編集技術の一つである CRISPR-Cas9 システムを用いてレポーターアッセイにより表皮での発現を促進することが知られている約 900 bp の *cis* 発現調節領域をノックアウトした。その結果、対照実験群であるもとの系統と比べて、雌成虫の胸部や腹部における体色に大きな変化が生じなかつ

た。また、*ebony*の下流に蛍光タグをノックインした系統でもノックアウトによる羽化直後の表皮における蛍光強度の差はわずかであったため、羽化直後の表皮での発現を誘発する発現促進因子（エンハンサー）が既知の配列以外にも存在し、それらが冗長に機能している可能性が示唆された。また、ノックアウト個体は腹部背側の正中線にある黒い着色が観察されなかったため、ノックアウトした発現調節領域内に発現を抑制する調節因子（サイレンサー）も含まれていることが示唆された。

そこでゲノム中の *ebony* の下流に蛍光タグをノックインして融合タンパク質を発現する系統を作成し、その発現パターンを蛍光顕微鏡にて観察したところ、ノックアウト個体では腹部背側正中線に *ebony* の発現を示す蛍光シグナルが確認できた。従って、この部位で作用するサイレンサーの存在が初めて明らかになった。更に、CRISPR-Cas9 に用いるガイド RNA を複数作用させ、より狭い領域のノックアウトを行った結果、サイレンサーが含まれる領域の範囲を 351 bp まで絞り込むことに成功した。

これらの結果により、*ebony* の表皮での発現が複数の *cis* 発現調節因子の組み合わせによって制御されていることが示唆された。またサイレンサーは抑制的な性質上、レポーターアッセイでは発見が難しい。本研究の手法は、転写の促進と抑制が複雑に作用する *cis* 発現制御機構を理解するために有効であることが示された。

(2) *ebony* の発現量変異がクチクラ関連形質に与える多面的効果の解析

ショウジョウバエの色素形成に必要な遺伝子の多くは、概日リズム、視力、交尾行動などの形質にも影響を与えることは知られているが、本研究により *ebony* の羽化直後の表皮での発現量が、成虫雌のクチクラ炭化水素(CHC)組成にも影響を与えることが示された。羽化直後の *ebony* 発現量と CHC 組成の関連性について、北米の自然集団由来の近交系統 23 系統を用いて検証したところ、*ebony* の発現量が低い系統では長鎖(>25C) CHC に偏った CHC プロファイルを持つこと、逆にその発現量が低い系統では短鎖(<25C) CHC に偏った CHC プロファイルを持つことが明らかとなった。

次に CHC 組成の影響を受けると考えられる乾燥耐性について、遺伝学的手法により *ebony* の発現量を下げる操作及び発現量を上げる操作をすると、いずれも乾燥条件下での水分蒸散速度は低下した。しかし上記と同じ自然集団由来の 23 系統を用いて比較したところ、羽化直後の表皮における *ebony* の発現量と乾燥条件下での水分蒸散速度の間には、統計的に有意な関連性は検出されなかった。よって自然集団内の *ebony* の発現量変異は、乾燥条件下での水分蒸散速度の変異を説明する強力な要因ではないことが示された。これらの結果は、*ebony* の多面的効果のうちこれまで明らかでなかった、クチクラの性質に関わる形質への影響についての新たな知見を含んでいる。

3 審査の結果

本研究は、世界中の多くの地域に生息するキイロショウジョウバエの自然集団における体色変異の主要原因遺伝子である *ebony* の発現制御機構について、既知の調節因子の他にも調節因子が存在すること、またサイレンサーによる発現抑制など、複雑な遺伝子発現制御機構の一端を明らかにしたことは高く評価できる。また遺伝子の発現制御機構を解析する上で、CRISPR-Cas9によるノックアウトが有効であることを最新の遺伝学的手法を用いて示した点も評価できる。本研究成果は、学位申請者が第一著者となる論文 1 報及び第二著者となる論文が 3 報、いずれも遺伝学分野の国際誌にて既に発表されている。

Akiyama, N., Sato, S., Tanaka, K. M., Sakai, T., Takahashi, A. (2022) The role of the epidermis enhancer element in positive and negative transcriptional regulation of *ebony* in *Drosophila melanogaster*. **G3 Genes | Genomes | Genetics** jkac010

Massey, J. H., Akiyama, N., Bien, T., Dreisewerd, K., Wittkopp, P. J., Yew, J. Y., Takahashi, A. (2019) Pleiotropic effects of *ebony* and *tan* on pigmentation and cuticular hydrocarbon composition in *Drosophila melanogaster*. **Front. Physiol.** 10: 518.

Sunaga, S., Akiyama, N., Miyagi, R., and Takahashi, A. (2016) Factors underlying natural variation in body pigmentation of *Drosophila melanogaster*. **Genes Genet. Syst.** 91: 127-137.

Miyagi, R., Akiyama, N., Osada, N., and Takahashi, A. (2015) Complex patterns of *cis*-regulatory polymorphisms in *ebony* underlie standing pigmentation variation in *Drosophila melanogaster*. **Mol. Ecol.** 24: 5829-5841.

(下線：学位申請者)

以上を総合的に鑑み、本研究は本学の博士(理学)の学位に十分値するものと判断した。

4 最終試験の結果

本学の学位規定に従って、試験および試問を行った。公開の席上で論文発表を行い、生命科学専攻の教員による質疑応答をもって試験にあてた。また、論文審査委員が本論文および関連分野について試問を行った。その結果、専門科目および外国語について十分な学力があることを認め、合格と判定した。