

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22128005

研究課題名（和文）昆虫の擬態紋様形成の分子機構と進化プロセスの解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms and evolutionary processes of mimicry pattern formation in insects

研究代表者

藤原 晴彦（Fujiwara, Haruhiko）

東京大学・新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：40183933

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 100,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では鱗翅目昆虫の4つの擬態紋様システムに着目し、擬態の責任遺伝子と制御機構、さらには擬態の成立・進化機構を明らかにした。シロオビアゲハが毒蝶ベニモンアゲハに紋様を似せる原因領域はdoublesexを含む130kbにあること、またこの領域が逆位で安定化され、超遺伝子構造をとっていることなどを発見した。また、カイコの幼虫斑紋変異体pS、msの原因遺伝子を同定するとともに、鱗翅目幼虫のスポット紋様形成がWntシグナルによって制御されることを見出した。さらに、アゲハ幼虫が幼若ホルモンによって切り替わる機構、アゲハの蛹が幼虫時の環境に応答して保護色を切替える機構の分子的背景を明らかにした。

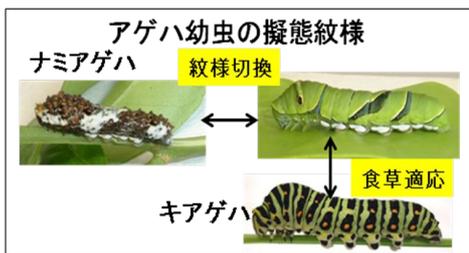
研究成果の概要（英文）：In this study, we focus four mimicry systems in Lepidoptera, and clarified their responsible genes, regulation mechanisms, and evolutionary processes. Females of *Papilio polytes* mimics unpalatable butterfly *P. aristolochiae*. We found with linkage analysis and whole genome sequencing that this female-limited Batesian mimicry is caused by about 130kb autosomal region including doublesex, and that this region constitutes supergene structure and is produced and fixed by chromosomal inversion. In addition, we here revealed the responsible gene for larval pigmentation mutants of *B. mori*, pS and ms, respectively and that the Wnt signaling pathway regulates the larval spot pattern formation in Lepidoptera. We also clarified the molecular backgrounds underlying the larval pattern switch by juvenile hormone and the switch of pupal protective colors in response to larval environment in *Papilio* species.

研究分野：分子生物学

キーワード：擬態 紋様形成 シロオビアゲハ カイコ変異体 ベイツ型擬態 ゲノム解析 幼虫斑紋 蛹保護色

1. 研究開始当初の背景

昆虫の擬態は、環境や捕食圧に高度に適応した複合的形質としてダーウィンの時代から注目を集めてきた。例えば、ダーウィンと同時代のベイツは無毒な蝶が有毒な蝶に似せることで捕食者から逃れるベイツ型擬態を提唱し、さらにミュラーは系統的に離れた異種の毒蝶が収斂的な紋様を示すミュラー型擬態を発見した。生態学・動物行動学など多様な側面から擬態形質の適応的意味の理解は進んだが、擬態を成立させる紋様や体色の形成機構はほとんどわかっていない。申請者は、数十種類の幼虫斑紋の変異系統が存在するカイコを、擬態紋様の「モデル種」と考え約 20 年前に研究に着手し、カイコの複数の体色変異体の原因遺伝子を同定した。また、隠蔽的形質が明瞭なアゲハの幼虫を用いて、鳥のフン紋様を柑橘葉紋様にスイッチする制御機構を明らかにし (*Science* 319,1061(2008))(下図)、世界的にも高い注目と評価を得ていた。国内では、カイコ幼虫斑紋の遺伝学、アゲハの蛹体色に関する生理学、シロオビアゲハのベイツ型擬態に関する生態学の知見が蓄積されているが、紋様・体色形成を制御する遺伝子はほとんど解析されていない状況だった。



2. 研究の目的

体表の紋様や体色によって捕食者を攪乱する擬態は広範な生物種に認められるが、その形成メカニズムはほとんどわかっていない。アゲハは幼虫・蛹・成虫の各ステージで複雑な擬態紋様を示し、さらに近縁種間で環境に高度に適応した斑紋が見られる。アゲハは、多様な擬態紋様形成メカニズムとその進化的成立過程を解析するのに最適な素材である。一方、カイコには数十種類に及ぶ幼虫斑紋の変異系統があり、紋様形成にかかわる最上位の責任遺伝子や制御領域を同定することが可能な「擬態紋様形成研究のモデル種」である。そこで鱗翅目昆虫の 4 つの擬態紋様システム (アゲハ科幼虫の斑紋形成・切替えと食草適応、アゲハ蛹体色の環境応答的变化、シロオビアゲハのベイツ型擬態、カイコ幼虫斑紋変異系統) に着目し、次世代ゲノム解析技術と分子遺伝学的手法を組み合わせ、擬態の責任遺伝子と制御機構、さらには擬態の成立・進化機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 擬態紋様形成の原因遺伝子の特定:

無毒なシロオビアゲハ♀が有毒なベニモンア

ゲハに擬態する最上位の原因遺伝子 (遺伝学的解析から 1 遺伝子と判明している)、カイコの幼虫斑紋変異遺伝子座 (p^S , ms) の責任遺伝子を、次世代シーケンサーを用いた網羅的な SNP 解析法などにより同定する。また、鱗翅目幼虫の斑紋形成における *Wnt1* 遺伝子などのシス制御領域の変化の詳細とモルフォゲン分子を同定し、斑紋形成上位遺伝子の Co-option 機構と斑紋形成機構の基本原則を構築する。また、アゲハにおける解析全般を支える基盤情報として、シロオビアゲハのゲノム概要配列を決定し、参照配列 (Reference sequence) とする。

(2) 擬態紋様形成を制御する遺伝子ネットワークの解明:

ナミアゲハ幼虫が幼若ホルモン (JH) によって斑紋を切替える現象、アゲハ類の蛹の体色が背景色に合わせて環境応答的に切替わる現象の背景となっている遺伝子ネットワークを、マイクロアレイ法や次世代シーケンサーを用いた網羅的な cDNA 配列解析法などにより解明する。

(3) 擬態紋様の成立と進化プロセスの理解:

皮膚特異的遺伝子の発現パターンを RNA-seq や定量 PCR などにより網羅的に比較解析し、擬態種であるシロオビアゲハの翅とモデル種であるベニモンアゲハの翅の紋様形成の収斂的進化の適応プロセスを探る。

4. 研究成果

(1) 擬態紋様形成の原因遺伝子の特定:

シロオビアゲハベイツ型擬態の原因遺伝子 H の特定:

シロオビアゲハのゲノム配列 (下記を参照) をもとに詳細な SNP を設計し、各個体における表現型とゲノムの配列多型性 (SNP) との連関解析を行った。その結果、第 25 染色体の *doublesex* (*dsx*) 遺伝子近傍に責任遺伝子領域があることを見出した。一方、シロオビアゲハの概要ゲノム配列には、100kb 以上に亘って相同染色体間で配列の異なる領域が 15 箇所含まれていることがわかった。そのうち 14 箇所は性染色体 ZW (鱗翅目昆虫は雌ヘテロ) にマップされたが、1 箇所だけ常染色体 25 番の *dsx* 近傍にマップされた。ゲノム配列から得られた長大なヘテロ領域の情報が、連鎖解析で得られた H 遺伝子座と完全に一致したのは予想外の結果だった。そこで、*dsx* 領域の構造を詳細に調べたところ、H (擬態型) の第 25 番染色体 (以下 H 染色体) 由来の配列と、h (非擬態型) の第 25 番染色体 (以下 h 染色体) 由来の配列の 2 種類が存在することがわかった。H 染色体と h 染色体では *dsx* 遺伝子と近傍領域 130kb が完全に逆向きになり、染色体逆位構造をとっていることが判明した。染色体逆位領域では一般に組換えが抑制されることから、H 染色体と h 染色体には長期に亘る進化の過程で大量の変異が導

入・蓄積して、組換え抑制により互いに分化した可能性が考えられる。H染色体の逆位領域内部の遺伝子に蓄積された変異によって擬態形質が生み出され、組換え抑制により自然集団内で安定に保持されてきたと類推される。

また、シロオビアゲハのRNA-seqの情報を元に、H染色体の逆位領域130kbに含まれる遺伝子を推定した結果、*dsx*以外に未知の遺伝子U3Xと、動物全般で広く保存されている転写調節因子UXTが含まれていた。複雑な適応形質の原因は、染色体の1箇所に局在する複数の遺伝子群によって制御されるという仮説が古くから提唱されており、そのような遺伝子群はsupergene(スーパーゼーン)と呼ばれている(Schwander et al (2014) Current Biol.24,R288)。シロオビアゲハのH遺伝子座もその候補の一つとして挙げられてきたが、本研究によりその可能性が強く示された。

H染色体上の*dsx*(以下*H_{dsx}*)とh染色体上の*dsx*(以下*h_{dsx}*)では、アミノ酸レベルで15箇所の変異が見られた。*dsx*は雌雄の性分化を制御する極めて重要な転写因子であるにも関わらず、これほど大量の変異が同じ生物種のゲノム中に蓄積しているのは極めて特異である。大量のアミノ酸変異の蓄積は、染色体逆位で変異が固定されてきたという上述の仮説を支持する。また、*H_{dsx}*で変化したアミノ酸配列の一部が下流の遺伝子ネットワークの変更を可能とし、擬態形質を生み出すようになった可能性が示唆された。

本研究では、蛹脱皮直後の翅にsiRNAをガラスキャピラリーで注入後、electroporationによって翅の真皮細胞にsiRNAを効率的に導入するシステムを構築することができた。この新たな手法を用いて、H染色体由来の*dsx*(*H_{dsx}*)の発現のみをノックダウンするsiRNAを設計し、擬態型となる雌の後翅1枚へ導入したところ、擬態型に特徴的な辺縁部の赤いスポットの形成が抑制され、さらに非擬態型に特徴的な白い帯状の紋様があらわれた。一方、h染色体由来の*dsx*(*h_{dsx}*)のみをノックダウンするsiRNAを設計し、擬態型雌の翅に導入したが、何の変化も見られなかった(下図参照:Nishikawa et al. (2015) Nat Genetを一部改変)。



参考図: Electroporationを用いたsiRNAによる機能解析

これらの結果は、*H_{dsx}*のみが擬態紋様形成に関与し、*h_{dsx}*にはそのような能力がない可能性を示唆する。*H_{dsx}*は擬態型形質を誘導すると同時に、非擬態型形質の発現を抑制する働きをしていることが示された。

カイコ斑紋変異体の原因遺伝子の同定: カイコの斑紋変異*p*遺伝子座には*p^S*(黒縞)など10を超える遺伝子座が存在し、古くから着目されてきた。連鎖解析とElectroporationを利用した新たな機能解析法により、当該遺伝子が新規の転写因子*Apt-like*であることを明らかにした。*Apt-like*は下位のメラニン合成系遺伝子群の発現を誘導して着色を引き起こす。また、*Apt-like*は斑紋のない*p*系統(姫蚕)では発現せず、斑紋のある*+^p*系統(形蚕)では強く発現していた。機能解析から、上位の*Wnt1*遺伝子(もしくは*Wnt*シグナル経路)が*Apt-like*の発現を制御している可能性が示唆された。一方、各体節にスポット紋様が生じる変異体*L*(褐円)では、*Wnt1*のcis-制御領域がエクジソンにตอบสนองするように変化したためスポット紋様が生じることが機能解析によって示された。また、野生種であるキアゲハのスポット紋様においても*Wnt1*の発現が有意に上昇していた。さらに、*L*(褐円)系統と同様の幼虫紋様を示す*ms*(多星紋)でも、*Wnt*シグナル経路の因子が紋様形成を制御していることが示された。これらの結果から、鱗翅目幼虫のスポット紋様が主に*Wnt*で制御されており、*Wnt*シグナル経路の一部を進化の過程でCo-optionされることにより幼虫のスポット紋様が生じたと推測された。

アゲハゲノムの概要配列の解読:

ドラフトゲノム配列解析結果より、シロオビアゲハゲノムは227Mb、ナミアゲハゲノムは244Mbのゲノムサイズを持つことが類推された。一方、シロオビアゲハ、ナミアゲハのScaffoldN50はそれぞれ3.67Mbp、6.20Mbpと十分に長く、今後の研究に有用な2種類の全ゲノムシーケンスデータベースが構築できた(Nishikawa et al. (2015) Nat Genetに詳細を記載)。

(2) 擬態紋様形成を制御する遺伝子ネットワークの解明:

ナミアゲハ幼虫のJHによる斑紋切替え: ナミアゲハの斑紋切替えは4齢幼虫初期(JH感受期)のJH濃度の低下によってもたらされる(Futahashi & Fujiwara, 2008)。マイクロアレイ法とRNA-seq法を用いて、発現変動遺伝子を網羅的に探索した結果、紋様形成に関与する新規の体色遺伝子、クチクラタンパク質遺伝子のほかに、上位で紋様を制御するエクジソン応答遺伝子などが同定された。また、JHにตอบสนองして発現が抑制される転写因子が複数見つかった。実際に4齢幼虫の体表にJHを塗布して発現変動を確かめると、これらの遺伝子はJH上昇によって発現が抑制される

ことが判明した。また、これらの遺伝子に対する siRNA を Electroporation によって 4 齢幼虫の真皮細胞に導入すると、5 齢時の紋様形成が阻害された。これらの結果は、JH によって発現制御される複数の転写因子が紋様切替えを担っていることを示唆する。

アゲハ蛹の環境応答的な体色切替え：
アゲハ類の多くは柑橘類を食草とするが、終齢幼虫時に幹などを這ったものは茶色になり、葉などを這ったものは緑色となる。発生段階における体色切替え過程を明らかにするとともに、RNA-seq や定量的 PCR により体色に関わる遺伝子の変動を解析した。その結果、緑色蛹では青色、黄色に関与する遺伝子の発現が誘導されるのに対し、茶色蛹では、青色遺伝子が抑制され、メラニン合成遺伝子の一部、赤色に関与する ebony 遺伝子の発現が誘導された。茶色蛹では粗粒面の触覚刺激が脳・神経系で神経ペプチドの分泌を促し、そのペプチドが体表の真皮細胞で上記のような色素形成遺伝子の発現誘導と抑制を引き起こすと考えられた。

(3) 擬態紋様の成立と進化プロセスの理解：
無毒なシロオビアゲハの雌がモデルの毒蝶であるベニモンアゲハにどのような仕組みで紋様を似せるのかについては、それぞれの紋様や色素の形成過程を比較する必要がある。RNA-seq の情報をもとに、シロオビアゲハの翅の擬態型と非擬態型の各領域で発現している遺伝子を RNA-seq 法により比較した。その結果、擬態型で翅の中心部に存在する白斑と非擬態型で翅全体に広がる白い帯は異なる色素（色素合成系）によって生じていることがわかった。非擬態型の翅の白い帯はキヌレニンと N-beta acetyl dopamine が結合して生じるのに対し、擬態型の白斑ではキヌレニン合成系が関与しないことが示された。一方、擬態型の翅辺縁部に見られる赤いスポットだけで顕著に発現している遺伝子として、Toll シグナル経路の snake, spätzle、メラニン形成経路の ProPO, yellow, NBAD とキヌレニン合成経路の遺伝子などが同定された。この結果は、通常は自然免疫系で機能している Toll シグナル経路の一部を紋様形成に転用し、NBAD とキヌレニンを基質としてメラニン合成系を利用して酸化・架橋して赤色を作り出している可能性を示す。シロオビアゲハでは、ベニモンアゲハの翅の赤色色素とは異なる経路で赤色を作り出している可能性があり、収斂的な形質が生み出されるメカニズムを解明する上で興味深い。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 39 件)

Nishikawa, H., Iijima, T., Kajitani, R., et al. (Fujiwara, H. は 18 番目責任著者、研究分担

者 Hori, H. は 16 番目): A genetic mechanism for female-limited Batesian mimicry in Papilio butterfly. *Nature Genetics* 47, 405-409 (2015) doi:10.1038/ng.3241. 査読有

Edayoshi, M., Yamaguchi, J. and Fujiwara, H.: Protruding structures on caterpillar are controlled by ectopic Wnt1 expression. *PLoS One*, e0121736 (2015) 査読有

藤原晴彦: アゲハチョウの擬態のどのように進化したか、進化の謎をゲノムで解く (細胞工学別冊) 106-113、秀潤社 (2015) 査読無

藤原晴彦: 雌だけが擬態するアゲハチョウの謎を探る、現代化学、533、29 - 32 (2015) 査読無

藤原晴彦: アゲハの擬態紋様、生体の科学「進化と発生からみた生命科学」66 (No3) 267-271 (2015) 査読無

Yoda, S., Yamaguchi, J., Mita, K., Yamamoto, K., Banno, Y., Ando, T., Daimon, T. and Fujiwara, H.: The transcription factor apontic-like controls diverse coloration pattern in caterpillars. *Nat. Commun.* 5, 4936 (2014) doi: 10.1038/ncomms5936 査読有

Nishikawa, H., Iga, M., Yamaguchi, J., Saito, K., Kataoka, H., Suzuki, Y., Sugano, S. and Fujiwara, H.: Molecular Basis of the wing coloration in a Batesian mimic butterfly, *Papilio polytes*. *Sci. Rep.* 3, e3184 (2013). doi: 10.1038/srep03184. 査読有

Suetsugu, Y., Futahashi, R., Kanamori, H. et al. (Fujiwara, H. は 26 番目): Large Scale Full-Length cDNA Sequencing Reveals a Unique Genomic Landscape in a Lepidopteran Model Insect, *Bombyx mori*. *G3* 3, 1481-1492 (2013) doi: g3.113.006239v1. 10.1534/g3.113.006239. 査読有

Yamaguchi, J., Yamamoto, K., Mita, K., Banno, Y., Ando, T. and Fujiwara, H.: Periodic Wnt expression in response to ecdysteroid generates twin-spot markings on caterpillars. *Nat. Commun.* 4, e1857 (2013) doi: 10.1038/ncomms2778. 査読有

Ando, T. and Fujiwara, H.: Electroporation mediated somatic transgenesis for rapid functional analysis in insects. *Development*, 140, 454-458 (2013) doi: 10.1242/dev.085241. 査読有

藤原晴彦: ホルモン応答を介した昆虫擬態

紋様の進化、遺伝、67、216-221 (2013)
査読無

Futahashi, R., Shirataki, H., Narita, T., Mita, K. and Fujiwara, H.: Microarray-based Comprehensive Analysis for Stage-specific Larval Camouflage Pattern-associated Genes in the Swallowtail Butterfly, *Papilio xuthus*. *BMC Biol.* 10, e46 (2012) doi:10.1186/1741-7007-10-46. 査読有

Yamaguchi, J. Mizoguchi, T. and Fujiwara, H.: siRNAs induce efficient RNAi response in *Bombyx mori* embryos. *PLoS One*, 6(2), e25469 (2011). 査読有

Terenius, O. et al (Fujiwara, H.は21番目): RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. *J. Insect Physiol*, 57, 231-245 (2011) 査読有

Shirataki, H. Futahashi, R. and Fujiwara, H.: Species-specific coordinated gene expression and *trans*-regulation of larval color pattern in three swallowtail butterflies. *Evolution and Development*, 12, 305-314 (2010) 査読有

Futahashi, R., Banno Y. and Fujiwara, H.: Caterpillar color patterns are determined by a two-phase melanin gene pre-patterning process: new evidence from *tan* and *laccase2*. *Evolution and Development*, 12, 157-167 (2010) 査読有

藤原晴彦、山口淳一：擬態の一面をさぐる - 昆虫の体表紋様形成の分子機構 (生き物の不思議) 遺伝、64, 11-16(2010)査読無

藤原晴彦：体表の紋様がまだらになるカイコ(1枚の写真館)細胞工学、29、415(2010) 査読無

[学会発表](計93件)

Fujiwara, H. et al.: A genetic mechanism for Batesian mimicry in swallowtail butterfly, Symposium IS15「Genomics and Epigenomics in Development and Evolution」, 第38回日本分子生物学会・第88回日本生化学会合同大会、2015年12月1~4日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

Fujiwara, H. et al.: Molecular mechanism and evolution of Batesian mimicry in *Papilio* butterfly. The 2nd International Conference on Insect Genomics, 2015年9月18 - 20日、重慶、中国

藤原晴彦、飯島拓郎、西川英輝：シロオビアゲハのベイツ型擬態の分子メカニズムと進化、第17回日本進化学会大会、2015年8月22日、中央大学(東京都文京区)

Fujiwara, H.: *Papilio* genome projects reveal molecular mechanisms and evolutionary processes for mimicry. International Symposium on Genome Science 2015 "Expanding Frontiers of Genome Science II", J, 2015年1月21日、一ツ橋講堂(東京都千代田区)

藤原晴彦：擬態の不思議な世界、日本皮膚科学会・中部支部学術大会、2014年10月25日、グランフロント大阪(大阪府大阪市)

藤原晴彦：アゲハチョウゲノムから探る擬態の進化プロセス、がん・ゲノム・脳支援活動合同シンポジウム、2014年5月27日、一橋講堂学術総合センター2F(東京都千代田区)

藤原晴彦他：ベイツ型擬態の分子的背景を探る、ワークショップ「ゲノムワイドアプローチを利用した進化研究」、第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3-6日、神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)

藤原晴彦、山口淳一、二橋亮、安藤俊哉、関拓実：ホルモン応答を介した昆虫擬態紋様の形成と進化、シンポジウム「紋様・体色形成研究の新たな展開」(オーガナイザー藤原晴彦) 第84回日本動物学会年会、2013年9月26 - 28日、岡山大学(岡山県岡山市)

藤原晴彦他：ベイツ型擬態を分子から解く、シンポジウム「マイクロ進化とマクロ進化のギャップをどう埋めるのか」、第85回日本遺伝学会、2013年9月19日、慶応大学、(神奈川県横浜市)

藤原晴彦他：昆虫の擬態紋様形成の分子機構と進化プロセスの解明、新学術領域「複合適応形質の遺伝子基盤」平成24年度公開シンポジウム、2012年9月26日、東京大学農学部弥生講堂(東京都文京区)

藤原晴彦：蝶のゲノムサイエンスから探る環境適応、日本学術会議公開シンポジウム「環境変動と昆虫科学」、2012年3月4日、琉球大学(沖縄県那覇市)

藤原晴彦：昆虫の擬態 - だましのテクニックの進化、第114回東大公開講座、「だます」人・自然・技術の嘘と方便、2011年10月15日、東京大学・安田講堂(東京都文京区)

Fujiwara, H., Yamaguchi, J., Shirataki, H., Futahashi, R. and Mizoguchi, T.: Molecular Mechanisms of Pigmentation Pattern Formation in Lepidopteran Larva. The 20th CDB Meeting “Molecular bases for evolution of complex traits” 2011年2月23 - 24日、理研 CDB (兵庫県神戸市)

[図書](計7件)

藤原晴彦:だましのテクニックの進化 昆虫の擬態の不思議、206 ページ (2015) オーム社、

藤原晴彦:昆虫の新生 - 変態と擬態、生命の教養学X「新生」, 51-74. (2014)慶応義塾大学出版会

[その他]

ホームページ等

<http://www.idensystem.k.u-tokyo.ac.jp/index.htm>

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤原 晴彦 (FUJIWARA, Haruhiko)
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号: 4 0 1 8 3 9 3 3

(2)研究分担者

堀 寛 (HORI Hiroshi)
名古屋大学・遺伝子実験施設・名誉教授
研究者番号: 6 0 1 1 6 6 6 3