

令和元年6月10日現在

機関番号：63904

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15070

研究課題名（和文）キリギリス翅の左右非対称性を生み出す仕組みの解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms underlying the left-right asymmetry of the forewing in the Japanese katydid

研究代表者

新美 輝幸 (Niimi, Teruyuki)

基礎生物学研究所・進化発生研究部門・教授

研究者番号：00293712

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、キリギリスの発音器である翅の左右非対称性に着目し、左右相称動物に普遍的な1対の器官に生じる左右非対称性の分子基盤の解明に挑戦した。

その結果、これまで困難とされていたキリギリスの飼育法を確立し、キリギリスにおけるRNAシーケンシング法を用いた比較トランスクリプトーム解析を行うと共に、試行錯誤のうえキリギリスに適した遺伝子機能解析法を確立した。本研究により、1対の器官に生じる左右非対称性の分子基盤の解明に向けた基盤整備を進めることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国には鳴く虫を愛でる伝統的な文化が存在するが、鳴く虫の翅に生じる左右非対称を対象とする遺伝子レベルの研究は皆無であった。本研究では、キリギリスの発音器である翅の左右非対称性に着目した。従来の研究では、体に1つだけ存在する器官を対象にしてきたが、翅は対で存在し左右で独立に形成されることから、その非対称性は全く異なる原理によって生じるものと考えられる。本研究は、次世代シーケンシング解析及び遺伝子機能解析法を駆使して、左右相称動物に普遍的な1対の器官に生じる左右非対称性の分子基盤の解明に挑戦した。

研究成果の概要（英文）： In this study, we focused on the left-right asymmetry of the forewing, which is the sound generator of the Japanese katydid, and embarked on the task of elucidating the molecular basis of left-right asymmetry that occurs in pairs of universal organs found in bilateral animals.

As a result, we established a breeding method which was considered difficult to conduct until now, performed comparative transcriptome analysis using RNA sequencing method. Through trial and error, we also established a gene function analysis method suitable for the katydid. Through this research, we succeeded in developing the basis for elucidating the molecular mechanisms of left-right asymmetry that occurs in bilaterian pairs of organs.

研究分野：分子昆虫学

キーワード：キリギリス 翅 左右非対称性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 我が国では鳴く虫の音を愛でる伝統的な文化が古より存在するが、発音器の発生の分子基盤は全く不明である。大変興味深いことに、コオロギ類の発音器である前翅は左右対称であるのに対し、キリギリス類では左右非対称である。前翅の左右非対称性は、雄に特異的な形質であり、発音しない雌では左右対称である(図1)。

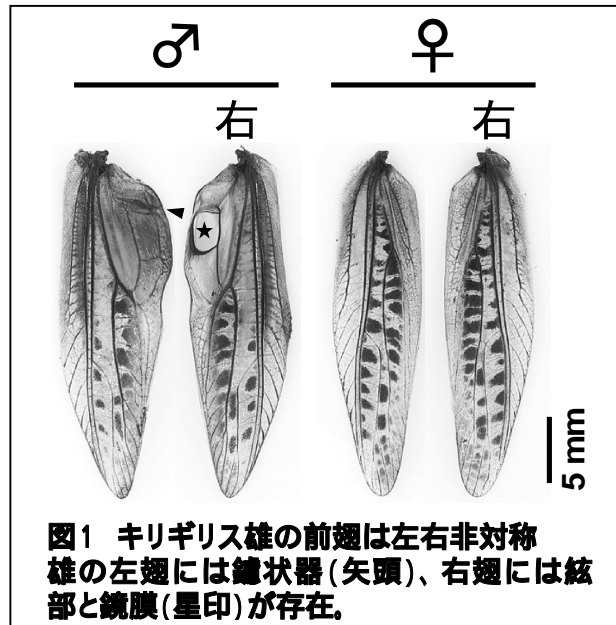


図1 キリギリス雄の前翅は左右非対称雄の左翅には鐘状器(矢頭)、右翅には絨部と鏡膜(星印)が存在。

(2) 体軸(前後・左右・背腹)の形成メカニズムは発生生物学の中心的課題であり、左右軸の形成メカニズムは哺乳類を中心に進められ、左右非対称性をもたらす基本原理が明らかにされた(Nakamura and Hamada, 2012)。近年、ショウジョウバエにおいて消化管の左右非対称性が形成される分子メカニズムが進展し、ショウジョウバエの左右非

対称性は哺乳類とは全く異なる原理に基づくことが判明した(Okumura et al., 2008)。哺乳類とショウジョウバエの左右非対称性に関する従来の研究は、体に1つしか存在しない器官が対象であり、キリギリスの翅のように1対存在する器官の非対称性に関する研究は殆ど進んでいない。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、キリギリスの発音器である翅の左右非対称性に着目する。従来の左右非対称性の研究は体に1つだけ存在する器官を対象にしてきたが、翅は1対存在し左右で独立に形成されることから、その非対称性は全く異なる原理によって生じるものと考えられる。

(2) 本研究は、研究代表者が既に確立した遺伝子機能解析法および次世代シーケンシング解析を駆使して、左右で非対称に発現する遺伝子を網羅的にリストアップする。さらに、申請者は簡便な larval RNA interference (RNAi) 法(二本鎖 RNA を幼虫の体腔に注射する RNA 干渉法)を種々の非モデル昆虫において既に確立しており(Niimi et al., 2005; Ohde et al., 2009; Ohde et al., 2011; Ohde et al., 2013; Ito et al., 2013; Gotoh et al., 2016; Sota et al., 2018) larval RNAi 法を用いた迅速な機能解析スクリーニングを行うことが可能である。本研究ではこれら最新技術を駆使することにより、左右で非対称に発現する遺伝子を同定し、左右相称動物に普遍的な1対の器官に生じる左右非対称性の分子基盤の解明に挑戦する。

(3) 哺乳類とショウジョウバエの左右非対称性に関する従来の研究は、体に1つしか存在しない器官が対象であり、キリギリスの翅のように左右で独立に発生する1対存在する器官の非対称性に関する研究は殆ど進んでいない。左右で独立に形成される器官に左右非対称性が生じる仕組みは、左右相称動物に共通する最も根本的な問題の一つであり、全く前例のない普遍的な原理の発見につながることで大いに期待される。

3. 研究の方法

(1) 供試昆虫

不完全変態昆虫 ヒガシキリギリス (*Gampsocleis mikado*; 直翅目)

(2) RNA シーケンシング (RNA-seq) 解析

total RNA 抽出

ヒガシキリギリスの雄において4齢、5齢、6齢幼虫の各4個体からそれぞれ左右の前翅原基を解剖抽出し、サンプルに使用した(合計24サンプル)。QIAcube (Qiagen) を用いて total RNA を抽出し、RNA-seq 解析のライブラリー調整に用いた。

RNA-seq 解析

上記(2)の合計24サンプルについて、HiSeq 4000 を用いて 150 bp Pair End でシーケンシングを行った。

(3) 遺伝子クローニング

ヒガシキリギリスの雄の6齢幼虫1個体から前翅原基を解剖抽出したものをサンプルに使用

した。RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて total RNA 抽出を行った。つぎに、SMART rapid amplification of cDNA ends (RACE) 法 (Clontech) に従い、ファーストストランド cDNA を合成し、PCR 法のテンプレートに用いた。目的の遺伝子は、前述の RNA-seq 法により得られた配列を検索して同定した。この配列が目的の遺伝子であることの確認は、Blast 検索および他種昆虫において同定された既知の配列を Clustal W 解析を用いてアライメント解析することにより行った。つぎに、遺伝子特異的プライマーを合成して、RT-PCR 法により目的とする遺伝子の部分配列を得た。

(4) nymphal RNAi 法を用いた遺伝子機能解析 二本鎖 RNA の合成

上記(3)の方法により得られた PCR 断片を TOPO® TA Cloning Kit for Sequencing (Thermo Fisher Scientific) を用いてクローニングして、二本鎖 RNA 合成用のテンプレートとした。AmpliScribe™ T7-Flash™ Transcription Kit (Epicentre Technologies) を用いて、キットのプロトコルに従い二本鎖 RNA を合成した。

マイクロインジェクション

ヒガシキリギリスの雄の 4 齢あるいは 5 齢の幼虫を使用した。インジェクター (FemtoJet; Eppendorf) を用いて、二本鎖 RNA をマイクロインジェクションした。なお、コントロールには EGFP の二本鎖 RNA を使用した。

(5) 遺伝子の発現解析

PCR テンプレートの調整

本発現解析には、上記(4)の nymphal RNAi 処理個体から 1 本の中肢をサンプルとして使用した。上述(2)の方法と同様に、total RNA を抽出した。ファーストストランド cDNA は、SuperScript III Reverse Transcriptase (Life Technologies Japan Ltd.) を用いて合成した。

リアルタイム定量 PCR 法

上記(3)により得られた遺伝子の塩基配列情報に基づき、Primer3Plus program (<http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>) を用いてセンスプライマー、アンチセンスプライマーを設計し、上記(5)のファーストストランド cDNA をテンプレートに用い、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を用いてリアルタイム定量 PCR を行った。内部標準コントロールには、ヒガシキリギリスの *ribosomal protein 49* 遺伝子を用いた。

4. 研究成果

(1) ヒガシキリギリスの飼育法の確立

キリギリスはこれまで実験昆虫としてあまり使用されることがなかった。その理由は、飼育の困難さにあり、「1 容器に 100 匹の孵化幼虫を入れても、共食いのため成虫になるのはわずか 2、3 匹です。」(安藤、1987) と言われていた。そこでまず、ヒガシキリギリスの新規モデル化に向け、飼育法の検討を行った。その結果、非常に効率よく若齢幼虫から成虫まで飼育する条件を確立した。また、キリギリスの効率のよい採卵法および卵の保護法を検討し、周年飼育法を確立した。

(2) ヒガシキリギリスにおける RNA シークエンシング (RNA-seq) 法を用いた比較トランスクリプトーム解析

ヒガシキリギリス前翅の左右非対称性は主に翅脈のパターンに由来する。したがって、左右非対称性が現れる初期過程のサンプリングを行うため、翅脈形成に着目した。幼虫の翅原基を観察したところ、終齢幼虫 (7 齢) では明確な翅脈パターンが観察され、左右で非対称なパターンを示すことが明らかとなった。そこで、4 齢、5 齢、6 齢の 3 ステージの左右それぞれの前翅原基を total RNA 抽出のサンプルに用いた。統計的に発現量に有意差のある遺伝子を正確にリストアップするため、biological replicate は 4 サンプル準備した。従って、合計 24 のライブラリーを作製し、次世代シークエンサーを用いて解析した。その結果、1 サンプル当たり 15 M~21 M リード数が得られ、発現量の少ない転写因子も網羅的に同定するのに十分な総リード数が得られた。共同研究により、インフォマティクス解析を行い、左右の翅で発現差を示す遺伝子の同定を試みている。

(3) ヒガシキリギリスにおける nymphal RNAi 解析

本研究の実験材料であるヒガシキリギリス (*Gampsocleis mikado*) は、直翅目 (バッタ、キリギリス、コオロギなどの仲間) 昆虫のキリギリス亜目キリギリス上科に属する昆虫である。直翅目昆虫では、フタホシコオロギ (*Gryllus bimaculatus*) やサバクトビバッタ (*Schistocerca gregaria*) において nymphal RNAi (不完全変態昆虫の幼生期に行う RNA 干渉) 法が有効であることが知られている。フタホシコオロギはキリギリス亜目コオロギ上科に、サバクトビバッタはバッタ亜目バッタ上科に属しており、直翅目昆虫の系統関係から、ヒガシキリギリスにおいても nymphal RNAi 法が有効であると予想された。

そこで、ヒガシキリギリスにおいて nymphal RNAi 法の有効性を検証するため、進化的に保存性が高く、RNAi による表現型が明確な 2 つの遺伝子に着目した。まず、前述したヒガシキリギリスの RNA-seq 法によって得られたデータから目的の遺伝子配列を検索し、プライマーを設計してそれぞれの遺伝子をクローニングした。得られた遺伝子の部分配列に対する二本鎖 RNA を合成して、ヒガシキリギリスの若齢幼虫に注射した。その結果、いずれの遺伝子においても表現型を観察することはできなかった。そこで、nymphal RNAi による遺伝子発現への影響を調査するため、リアルタイム定量 PCR 法を行った。その結果、遺伝子発現の減少は認められなかった。したがって、ヒガシキリギリスにおいては、当初の予想に反して nymphal RNAi 法が有効でないことが明らかとなった。

つぎに、この問題点を解決するため、種々の方法について条件検討を行った結果、ヒガシキリギリスにおいても有効な RNAi 法の条件を見出すことに成功した。今後は、ヒガシキリギリスにおいて有効な条件の RNAi 法を用いて、翅の左右非対称性をもたらず遺伝子候補の機能解析を行う予定である。

<引用文献>

- 安藤 喜一 (1987) キリギリスの生物学. *インセクトリウム*, **24**, 300-304.
- Gotoh, H., Ishiguro, M., Nishikawa, H., Morita, S., Okada, K., Miyatake, T., Yaginuma T. and Niimi, T. (2016) Molecular cloning and functional characterization of the sex-determination gene *doublesex* in the sexually dimorphic broad-horned beetle *Gnatocerus cornutus* (Coleoptera, Tenebrionidae). *Sci. Rep.*, **6**, 29337.
- Ito, Y., Harigai, A., Nakata, M., Hosoya, T., Araya, K., Oba, Y., Ito, A., Ohde, T., Yaginuma, T. and Niimi, T. (2013) The role of *doublesex* in the evolution of exaggerated horns in the Japanese rhinoceros beetle. *EMBO Rep.*, **14**, 561-567.
- Nakamura, T. and Hamada, H. (2012) Left-right patterning: conserved and divergent mechanisms. *Development*, **139**, 3257-3262.
- Niimi, T., Kuwayama, H. and Yaginuma, T. (2005) Larval RNAi applied to the analysis of postembryonic development in the ladybird beetle, *Harmonia axyridis*. *J. Insect Biotechnol. Sericol.*, **74**, 95-102.
- Ohde, T., Masumoto, M., Morita-Miwa, M., Matsuura, H., Yoshioka, H., Yaginuma, T. and Niimi, T. (2009) *Vestigial* and *scalloped* in the ladybird beetle: a conserved function in wing development and a novel function in pupal ecdysis. *Insect Mol. Biol.*, **18**, 571-581.
- Ohde, T., Yaginuma, T. and Niimi, T. (2011) Nymphal RNAi analysis reveals novel function of *scalloped* in antenna, cercus and caudal filament formation in the firebrat, *Thermobia domestica*. *J. Insect Biotechnol. Sericol.*, **80**, 101-108.
- Ohde, T., Yaginuma, T. and Niimi, T. (2013) Insect morphological diversification through the modification of wing serial homologs. *Science*, **340**, 495-498.
- Okumura, T., Utsuno, H., Kuroda, J., Gittenberger, E., Asami, T. and Matsuno, K. (2008) The development and evolution of left-right asymmetry in invertebrates: lessons from *Drosophila* and snails. *Dev. Dyn.*, **237**, 3497-3515.
- Sota, T., Sugawara, H., Fujisawa, T., Fujimaki, K. and Niimi, T. (2018) Knockdown of *rotund* gene through larval RNA interference affects genital and elytral morphology in the ground beetle *Carabus maiyasanus* (Coleoptera: Carabidae). *Entomol. Sci.*, **21**, 469-474.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

新美輝幸：はじめました！翅の左右の違いのできかた。昆虫ポストゲノム研究会 2017 年 in つくば, 2017 年 .

新美輝幸:非モデル昆虫のエボデボ研究. 日本進化学会第 19 回大会 シンポジウム “エボデボから見る非モデル生物研究の魅力”, 2017 年.

新美輝幸:はじめに. 日本進化学会第 19 回大会 シンポジウム “エボデボから見る非モデル生物研究の魅力”, 2017 年.

新美輝幸：キリギリス翅の左右非対称性を生み出す仕組みの解明をめざして. 第二回 ユニークな少数派実験動物を扱う若手が最先端アプローチを勉強する会, 2016 年 .

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

http://www.nibb.ac.jp/sections/evolutionary_biology_and_biodiversity/niimi/

<http://www.nibb.ac.jp/niimilab/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：中村 太郎

ローマ字氏名（Nakamura, Taro）

研究協力者氏名：大出 高弘

ローマ字氏名（Ohde, Takahiro）

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。