

平成30年6月6日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18825

研究課題名(和文) 昆虫翅獲得の鍵となった発生機構変化の解明

研究課題名(英文) Identification of key developmental changes for insect wing evolution

研究代表者

大出 高弘 (Ohde, Takahiro)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：60742111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、進化学における大きな謎である昆虫の翅の進化的起源を明らかにするために行われました。ショウジョウバエの研究から明らかになっていた翅形成遺伝子群の役割を、より祖先的な形づくりの特徴を示すフタホシコオロギやマダラシミで調べることで、昆虫の翅は祖先昆虫の背板が変形して形成されたものであることが示唆されました。この研究の過程で、無翅昆虫マダラシミの遺伝子ノックアウトに世界で初めて成功しました。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is understanding the evolutionary origin of insect wing. We studied orthologs of genes that are important for Drosophila wing development in basally branching insects, the two-spotted cricket and the firebrat. Our results suggest that insect wing originates from tergal margin of a wingless ancestor. Through this study, we succeeded the first targeted gene knockout in the firebrat.

研究分野：進化発生学、昆虫発生学

キーワード：形態進化 新奇形質 エボデボ CRISPR/Cas9

## 1. 研究開始当初の背景

昆虫は現在地球上の全動物の70%以上を占めるほどの繁栄を収めている。そのような多様な昆虫の99%は翅を獲得した後に分岐した有翅昆虫である。これらの数字は、端的に、現在の昆虫の繁栄における翅進化の重要性を示している。このように昆虫の成功に貢献した昆虫の翅であるが、どのような起源構造から、いかにして進化してきたかという点は、今だに謎に包まれている。

昆虫の翅は鳥やコウモリのように肢が変化した器官ではなく、歩行用の付属肢とは独立して存在するユニークな新奇形質である。従来の翅の起源構造に関する仮説は大きく分けて側背板説と鰓説の2つに分類できる。側背板説では、背板側縁部が伸長した後に可動性を獲得して飛行に用いられるようになったとする。一方鰓説では、元々可動性を有した側板由来の付属肢が背板側縁部に移動して翅へと形を変えたとする。両仮説とも古生物学や形態学、古生態学などの観点から多角的な検証が行われてきたものの、いずれか一方の仮説を支持する決定的な証拠は得られていないのが現状である。さらに近年、背板由来、側板由来の二つの構造が合わさって翅が進化したとする複合起源説が提唱され、広く受け入れられ始めている。

進化的起源の解明を妨げている主たる原因は、進化の中間段階を示すような化石が発見されていないことにある。化石証拠に頼ることのできない現状にあっては、現存する生物の比較発生学を基礎とする進化発生学的なアプローチが有効となる。我々のグループは、以前に、ショウジョウバエで同定された翅領域のセクター遺伝子である vestigial (vg) をマーカー遺伝子として用いることで、甲虫の無翅体節に形成される翅に対応した構造物(翅系列相同物)が体壁の突出構造であることを明らかにした。このことは、昆虫の翅はそもそも体壁の突出構造に起源することを示唆する。しかしながら、当時実験動物として利用した甲虫は幼虫から成虫へと大きく形を変化させる完全変態昆虫であったため、翅系列相同物の発生学的起源を同定するには至らなかった。そこで本研究では、より祖先的な発生様式を示す不完全変態昆虫であるフタホシコオロギを用いて翅形成遺伝子の解析を行うことにより、翅の発生学的起源を明らかにすることを目指した。さらに、翅が進化する以前に分岐した系統であるシミ目昆虫であるマダラシミを用いて同様の遺伝子解析を行うことによって、昆虫の翅の進化的起源解明を試みた。

## 2. 研究の目的

本研究は、フタホシコオロギおよびマダラシミで発生過程における翅形成遺伝子群の発現細胞群の動向・機能を調査することにより、昆虫翅の進化をもたらした発生機構の変化を特定し、独自の翅の進化を可能にした昆虫ボディプランの特性を明らかにすると共に、新奇形質進化に関する新たな原理の解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究ではまず、フタホシコオロギおよびマダラシミの両昆虫より、ショウジョウバエの翅形成遺伝子群の相同遺伝子の塩基配列を同定し、in situ hybridization 法による mRNA の発現パターン解析を行った。フタホシコオロギについては、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集による遺伝子機能阻害を行い、処理した世代で表現型への影響を評価した。また、CRISPR/Cas9 システムを利用したレポーターカセットのノックインにより、エンハンサートラップが可能であることがフタホシコオロギで示されている。この方法を利用して、翅形成遺伝子タンパク質コード領域の上流域にレポーターカセットを挿入した系統を作成した。作成したエンハンサートラップシステムを利用して発生後期での翅形成遺伝子発現の調査を行った。マダラシミについては CRISPR/Cas9 システムを利用した遺伝子ノックアウトは成功例が報告されていない。そのため、ノックアウト表現型が明瞭な遺伝子を標的として、手法の確立を行い、その後翅形成遺伝子のノックアウトを試みた。

## 4. 研究成果

(1) フタホシコオロギの翅形成遺伝子群は背板形成に機能する

フタホシコオロギにおいて翅形成遺伝子群の発現を調査した結果、胚期には背板領域と側板領域の二箇所ですべて独立に発現を示すことが明らかとなった。これは以前に完全変態昆虫であるコクヌストモドキで報告された発現パターンに類似する。しかし、これらの翅形成遺伝子発現細胞集団の発生運命については未解明であった。

昆虫胚が卵中で分泌するクチクラに非特異的に RNA プローブが吸着するため、固定した胚を用いた whole mount in situ hybridization 法では mRNA の発現パターンを観察できる発生段階が、胚発生の早期に限定されてしまう。フタホシコオロギでは CRISPR/Cas9 システムを利用したレポーターカセットのノックインにより、カセットが挿入されたゲノム領域の発現パターンに従ってレポーター遺伝子が発現するエンハンサ

ートラップが可能であることが示されている。我々は、フタホシコオロギの翅形成遺伝子についてこのエンハンサートラップシステムの作出に成功した。このシステムを利用してフタホシコオロギ発生後期における発現パターンを調査した。背板領域の細胞群は各体節の背板縁表皮細胞で発現が維持され、さらには幼虫期に形成される翅原基組織である翅芽の周縁部でも胸部背板と「繋がった」連続的な発現を示すことが明らかとなった。この胸部背板と翅芽での連続的な翅形成遺伝子の発現は、背板縁に翅が発生学的に起源することを強く示唆する。一方で、側板領域での発現細胞は、胚発生後期には繊維状の形状へと変化し、さらに、孵化後には胸部の筋肉で発現することが明らかとなった。このエンハンサートラップシステムを利用した翅形成遺伝子の発現解析の結果から、フタホシコオロギの翅は、胚期に背板領域で翅形成遺伝子を発現する細胞集団に由来しており、側板領域で翅形成遺伝子群を発現する細胞集団は、翅を形成する細胞ではなく、筋肉へと分化する中胚葉細胞であることが示唆された。

続いて、フタホシコオロギの翅形成遺伝子の機能を明らかにするため、CRISPR/Cas9 システムを利用した遺伝子ノックアウトを行った。標的とする遺伝子の塩基配列特異的なガイドRNAと、Cas9タンパク質を共注射した卵から孵化したニフの表現型を観察したところ、背板領域の一部が形成されずに欠損した個体が現れた。これらの個体は成虫まで発育させることが可能であり、成虫では翅組織の一部が欠損することが明らかとなった。このようなニフにおける背板の欠損を示す個体は複数の翅形成遺伝子のモザイクノックアウト個体で観察された。

以上、フタホシコオロギの翅形成遺伝子群の発現と機能の調査結果より、不完全変態昆虫の翅は胚期に形成される背板縁細胞に由来することが明らかとなった。昆虫の翅の進化的起源については、長きに渡って、二つの仮説が対立した状態が続いている。祖先無翅昆虫の背板が変形して翅へと進化したとする側背板説と、側板に由来する可動性の分岐物が翅へと進化したとする鰓説だ。さらに近年、第三の仮説として、背板由来、側板由来の両構造物が合わさって翅が進化したとする複合起源説が提唱され、広く支持され始めている。本研究から明らかとなったフタホシコオロギの翅形成遺伝子の発現・機能からは、翅は背板から形成されるとする側背板説が支持された。しかし、側板由来の細胞が翅形成に寄与する可能性を否定するものではなく、今後さらなる調査が必要である。

## (2) マダラシミにおける翅形成遺伝子群の発現調査

翅が進化するより以前に分岐した昆虫（ここでは無翅昆虫とよぶ）のゲノムにも翅形成

遺伝子の相同遺伝子がコードされている。このことは、昆虫の翅の進化が、新たな遺伝子の獲得によるのではなく、すでに存在していた遺伝子群の使い回しによって起きたことを示唆する。無翅昆虫における翅形成遺伝子群が発現し、機能する場所を明らかにすることは、翅の進化的起源に対する洞察を与えることと期待される。本研究では、有翅昆虫の姉妹群であるシミ目に属するマダラシミを材料として、無翅昆虫の翅形成遺伝子群の発現および機能の解明を目指した。

マダラシミ胚での翅形成遺伝子群の発現パターンを *in situ hybridization* 法によって調査した結果、背板と側板の二つの領域で発現が観察された。この発現パターンは翅を形成する完全変態昆虫であるコクヌストモドキおよび不完全変態であるフタホシコオロギで見られるパターンと類似している。従って、(1)の結果と合わせて考えると、無翅昆虫の時点ですでにこれらの遺伝子群は背板縁形成に関わっていたと推測できる。

## (3) CRISPR/Cas9 システムを利用した標的変異導入法の確立（論文投稿済み）

マダラシミでの翅形成遺伝子群の発現パターン解析の結果を受け、その機能を明らかにすることを目的として、フタホシコオロギと同様に CRISPR/Cas9 システムを利用することとした。しかしながら、マダラシミについてはこれまで成功例が報告されていなかったため、まずはノックアウト表現型が見た目に明らかである ATP 結合カセット輸送体である *white* 遺伝子を標的とした。他の昆虫において、*white* の変異体では複眼の着色が失われた白眼の表現型を示す。マダラシミより *white* の相同遺伝子を同定し、CRISPR/Cas9 システムによってターゲティングしたところ、複眼および体壁の着色が失われた個体が現れた。さらに、野生型と交配させた次世代 (G1) の遺伝子型を検査すると、標的とした塩基配列近傍に挿入や欠損が見られた。G1 同士を掛け合わせて得られた、変異アリルをホモ接合でもつ個体は、ニフで複眼や体壁の着色が失われ、成虫でさらに付属肢の着色が失われた表現型を示した。以上の結果から、マダラシミで CRISPR/Cas9 システムを利用した標的遺伝子のノックアウト法が確立できたと言える。

## (4) マダラシミにおける翅形成遺伝子群の機能解析

(3) で確立した手法を利用してマダラシミの翅形成遺伝子群のノックアウトを行った。二つの遺伝子について変異が導入されたシステムを確立することに成功したが、野生型と比較して表現型に大きな変化は見られなかった。この原因として、変異を導入した位置が、両遺伝子ともタンパク質コード領域の 5' 近

傍であったため、より 3' 側の領域から翻訳された不完全なタンパク質が機能した可能性が考えられた。そのため、まだマダラシミにおける翅形成遺伝子の機能に関しては結論が得られていない。上述の問題点を改善するため、より 3' 側を標的としたガイド RNA を用いて同様の実験を行うことにより、結論が得られると期待される。

#### 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 2 件)

- (1) 大出高弘・新美輝幸 (2016) 昆虫の翅の起源はどこか? 昆虫と自然、査読無、51 巻、2016、4-7.
- (2) Tomoyasu, Y., Ohde, T. and Clark-Hachtel, C. (2017) What serial homologs can tell us about the origin of insect wings. F1000Research, 査読有, 6, 1-11.  
DOI:10.12688/f1000research.10285.1

[学会発表] (計 9 件)

- (1) 大出高弘、新美輝幸 「翅と翅連続相同物間における遺伝子発現の保存性について」第 52 回日本節足動物発生学会、湘南国際村センター、横須賀市、2016 年 6 月 11 日
- (2) 大出高弘 「昆虫の翅は作れるのか?」第 9 回 Evo-Devo 青年の会、岡崎コンファレンスセンター、岡崎市、2016 年 6 月 25 日
- (3) 大出高弘、新美輝幸 「昆虫形態進化研究におけるボトムアップデザインアプローチ」昆虫デザイン研究会、岡崎コンファレンスセンター、岡崎市、2016 年 7 月 7 日
- (4) Takahiro Ohde and Teruyuki Niimi “Evo-devo study of insect wing and its serial homologs: from apterygotes to pterygotes.” XXV International Congress of Entomology 2016, Orange County Convention Center, Orlando, FL, USA, Sep 25-30, 2016.
- (5) Takahiro Ohde and Teruyuki Niimi “The role of wing formation genes in non-wing developmental contexts.” The joint meeting of the 22<sup>nd</sup> International Congress of Zoology and the Meeting of the Zoological Society of Japan, Okinawa Convention Center, Okinawa, Japan, Nov 17-18, 2016.

(6) Takahiro Ohde, Taro Mito and Teruyuki Niimi. What is the key developmental change for insect wing evolution? 2nd Biennial Meeting Pan-American Society for Evolutionary Developmental Biology. Aug 19-23, 2017, University of Calgary, Calgary, Canada (Poster presentation).

(7) 峯村俊儀、大出高弘、新美輝幸、塩月孝博、大門高明「無変態昆虫マダラシミの胚発生期では、幼若ホルモン関連遺伝子群はどのように発現しているのか」平成 30 年度 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 日本蚕糸学会第 88 回大会 名古屋大学農学部 平成 30 年 3 月 19-20 日、愛知県名古屋市千種区

(8) 峯村俊儀、大出高弘、新美輝幸、塩月孝博、大門高明「マダラシミの胚発生期における幼若ホルモン関連遺伝子群の発現解析」第 62 回日本応用動物昆虫学会大会 鹿児島大学群元キャンパス 2018 年 3 月 25-27 日、鹿児島県鹿児島市

(9) 大出高弘、三戸太郎、新美輝幸「翅形成遺伝子群は昆虫の背板縁形成に機能する」第 62 回日本応用動物昆虫学会大会 鹿児島大学群元キャンパス 2018 年 3 月 25-27 日、鹿児島県鹿児島市

[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

<https://sites.google.com/site/kulip2016/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

大出 高弘 (OHDE, Takahiro)  
京都大学・大学院農学研究科・助教  
研究者番号：6 0 7 4 2 1 1 1

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

三戸 太郎 (MITO, Taro)  
徳島大学・大学院生物資源産業学研究所・准教授  
研究者番号：8 0 3 2 2 2 5 4

(4) 研究協力者

なし