

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21612

研究課題名(和文) 蝶・蛾の翅模様進化と基本発生プログラム - 複数種の蛾・蝶の比較発生学 -

研究課題名(英文) Evolutionary diversity and the ground plan in butterfly and moth wing patterns - comparative developmental biology of several species of butterflies and moths -

研究代表者

鈴木 誉保 (Suzuki, Takao)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・研究員

研究者番号：40442975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：蝶や蛾の翅の多様な模様は、種を越えて保存された基本プログラム(Nymphalid ground plan; NGP)をもとに進化してきたことが、表現型レベルの研究により示唆されている。しかしながら、その遺伝的・分子発生的な基盤は未解明である。本研究課題では模様形成の分子発生メカニズムを調べるための基本ツールの開発とそれらツールを利用した分子発生メカニズムの調査に取り組んだ。本研究の結果、NGPの形態学的基礎付けがなされ、また体色形成にかかわるシス制御領域を特定した。また、コノハチョウを含む複数種の比較トランスクリプトーム解析、翅模様を鮮明にもつカイコ系統でのゲノム編集技術を確立した。

研究成果の概要(英文)：Nymphalid ground plan (NGP) is a fundamental building logic in extraordinary diversity of butterfly and moth wing patterns. Previous studies revealed several phenotypic aspects of the NGP in divergence of lepidopteran insects. However, the molecular mechanisms of the NGP remains poorly understood. Here I investigated technical development of fundamental tools for studying molecular mechanisms and the application of them to examine developmental mechanisms of color and pattern formations. As a result, I explicitly conducted a morphological foundation of the NGP, and identified several cis-regulatory modules of a certain pigmentation gene. In addition, we established experimental systems of comparative transcriptomics among imaginal discs of several moths and butterflies, and a genome editing method in a wing-pattern strain of *Bombyx mori*.

研究分野：進化発生学

キーワード：グラウンドプラン 蝶と蛾 翅の模様

1. 研究開始当初の背景

蝶や蛾の翅の多様な模様は、グラウンドプラン (Nymphalid ground plan; NGP) とよばれる基本発生プログラムにしたがっていると提案されてきた (Nijhout, 1991)。実際に申請者は、NGP の性質を利用することで、枯葉に擬態した蝶 (コノハチョウ; *Kallima inachus*) の模様が、葉っぱに似てもつかない模様から進化してきたプロセスを世界で初めて解明した (Suzuki et al., 2014)。しかし、この研究では NGP を表現型レベル (比較形態学) でのみ解析し、その分子発生的な基盤については未解明のままであった。

NGP は 5 つの Symmetry Systems と 2 つの要素 (DS, EyeSpots) からなる。このうち、EyeSpots については分子発生メカニズムの研究がよく進んでいる (Beldade & Brakefield 2002; Monteiro, 2015)。EyeSpots は無視できない要素ではあるが、枯葉などの自然物擬態に主として貢献していない。自然物擬態に特に重要なものは Symmetry Systems である。しかし、この Symmetry Systems の分子発生メカニズムについては、わずか 2 つの論文報告しかなかった (Martin & Reed, 2010; Martin & Reed, 2014)。

2. 研究の目的

NGP の分子発生メカニズムを明らかにするためには、ゲノム解読・ゲノム編集・簡便に飼育できる実験系が必要であるが、蝶や蛾のモデル動物たるカイコ蛾 (*Bombyx mori*) はうってつけである。カイコ蛾の翅模様は NGP にしたがっているため、その模様形成メカニズムを調べることは NGP による基本発生プログラムの遺伝的基盤の解明につながる。

そこで、本研究課題では第一ステップとしてカイコ蛾の翅模様形成の分子発生メカニズムを調べるための基本ツールの開発とそれらツールを利用した分子発生メカニズムの調査に取り組んだ。また、第二ステップとして他の蛾や蝶の翅模様形成との比較分子発生的なアプローチにより翅模様形成に共通する遺伝子群を探った。

3. 研究の方法

(1) 形態学的な解析

形態学において一般的に利用されているレマネ規準を利用した。既に Suzuki et al. (2014) にて、枯葉に擬態した蝶 (コノハチョウ) の斑紋解析に利用したものである。

(2) RNA-seq

各発生ステージは、一眼レフによるインターバル撮影により幼虫ワンダリング期、蛹化期を正確に計測し同定した。翅原基は ISOGEN に溶解しディープフリーザーにて保存した。シークエンスは、Nova-seq6000 を利用し、ペアエンド 100 塩基、1 サンプルあたり 3Gb を

読んだ。

(3) *in situ* ハイブリダイゼーション

rpl, *wntA* 遺伝子の DIG 標識 RNA プローブを合成し利用した。*in situ* ハイブリダイゼーションの方法は、Martin & Reed (2010)、Sato et al. (1999) を参考に行った。論文を参考に翅原基の組織固定の PFA 濃度 (4%、9%) や、固定時間、固定温度等を振って条件検討をした。

(4) ゲノム編集

カイコ模様系統は休眠系統であるため、*injection* 後に孵化させるためには、休眠打破をする必要がある。*Injection* による卵へのダメージと休眠打破のダメージとを両立させる条件検討を詰めた。TALEN は、Takasu et al. (2013) を参考におこなった。Golden Gate TALEN assembly 法により作成した *w-1* プローブを利用した。

(5) カイコ遺伝子組換え

カイコの遺伝子組換え技術は、Tamura et al. (2000) を参考に行った。エンハンサー解析のための緑色蛍光タンパク質レポータープラスミドは、Tsubota, Uchino, Suzuki et al. (2014) で開発したものを利用した。

4. 研究成果

(1) グラウンドプランの形態学的基礎付け・一般的拡張への準備

蝶・蛾の翅模様のグラウンドプランは、脊椎動物と同様の形態学的な枠組みで理解できると考えられるが、その基礎付けはあいまいなままで明示的に定式化されていなかった。そこで、経験則的に利用されてきた蝶蛾のグラウンドプランの同定手続きが、一般的なレマネ規準と論理的に一致することを指摘し、概念・手順として整備し論文として発表した。また、グラウンドプランを一般概念へと拡張した多要素系の概念を提案し論文として発表した。

(2) 蝶・蛾の翅原基で共通して発現している遺伝子群のトランスクリプトーム解析

グラウンドプランの形成に関わる遺伝子群は、複数の蝶や蛾の翅原基で同じ発生ステージに共通して発現していると推察される。この遺伝子群を探索・同定するために、5 種の蝶 (コノハチョウ、カバタテハ) や蛾 (カイコ、クワコ、エリサン) の RNA-seq を行った。発生ステージは、5 齢幼虫期と蛹期を対象とした。カイコについて各発生ステージの遺伝子発現を比較し、統計的に有意に異なる発現をしめず遺伝子群を検出した。また、他の蝶や蛾については、研究が十分に進んでいる鱗翅目昆虫のデータを参照してアノテーションを進めている。今後、遺伝子発現の種間比較を行い、共通して発現している遺伝子群を絞り込む。

(3) 蝶・蛾の翅原基での遺伝子発現

翅原基での遺伝子発現を調べるために、カイ

この5 齡幼虫期の翅原基について *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) の立ち上げに取り組んだ。まずポジコンとして *rp13* 遺伝子を用いて実験に取り組み、発現をしめすシグナルを得た。次に、先行研究によりグラウンドプランの中央相称系と外縁紋に關与するとされるモルフォゲン遺伝子 (*wntA*) についても ISH に取り組んだが、良好なシグナルを得られなかった。今後、条件検討を改めて行う。

(4)ゲノム編集による機能解析手法の確立
遺伝子機能を調べるために、鮮明な翅模様をもつカイコ系統でのゲノム編集技術の構築に取り組んだ。通常の組換え実験で利用されているカイコは翅の模様を欠失している系統であり、本研究には利用できない。NBRP で維持されている系統より翅模様が鮮明なものを選び、*injection* のための条件検討を行った。最適条件下で眼の黒色形成遺伝子である *w-1* の欠失を TALEN により行った結果、*w-1* 遺伝子を欠失させ白眼の模様系統を作出することに成功した。翅模様カイコ系統でのゲノム編集を構築できたので、今後は模様形成遺伝子群の欠失等により機能解析 (loss-of-function) を進める。また、翅模様カイコでの白眼系統の確立により、カイコ遺伝子組換え技術を利用することで遺伝子強発現 (gain-of-function) 実験ができるようになった。

(5)カイコ遺伝子組換え技術による遺伝子制御解析系の構築
遺伝子制御を調べるために、カイコでのエンハンサー解析実験に取り組んだ。これまで蝶や蛾を使った研究で、遺伝子から遠位のシス制御が遺伝子組換え体の作成によって検証された例はない。対象とする遺伝子は、ショウジョウバエでよく研究の進んでいる体色形成遺伝子を対象とした (まだ論文投稿中のため詳細は伏せる)。当該遺伝子の 5' 領域とイントロン領域あわせて 22 kb を調べ、組織特異的に遺伝子発現を誘導する 3 つのシス制御エレメントの同定・単離に成功した。本内容について、論文を投稿中である。

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4件)

- (1) 鈴木 誉保 (2017) 3 章 基本プランという主題が奏でる擬態という変奏. In 関村, Nijhout (Eds), *チョウの斑紋多様性と進化 - 統合的アプローチ -*. 東京 :海遊舎, p 43-67.
- (2) Suzuki TK (2017) Camouflage variations on a theme of the Nymphalid ground plan. In T. Sekimura & H. F. Nijhout (Eds), *Diversity and*

Evolution of Butterfly Wing Patterns - An Integrative Approach. Singapore :Springer, p 39-58.

- (3) Suzuki TK (2017) On the origin of complex adaptive traits: progress since the Darwin vs. Mivart debate. *J Exp Zool B* 328:304-320.
- (4) 鈴木 誉保 (2016) 昆虫の科学(1) 蝶や蛾の擬態模様の遺伝的基盤とその進化. *化学と生物* 54(5):351-357.

[学会発表](計12件)

- (1) 鈴木 誉保, 越川 滋行, 小林 功, 内野 恵郎, 瀬筒 秀樹 「カイコ yellow 遺伝子の発現制御領域のエンハンサー解析とシスモジュール制御」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 (in Japanese) 2018年3月、名古屋
- (2) [招待講演] 鈴木 誉保 「複雑な形質のマクロ進化プロセス：多要素構造、系統比較法、進化順序推定」第65回日本生態学会大会 (in Japanese) 2018年3月、札幌
- (3) Suzuki TK “Component-based phylogenetic comparative methods reveal evolutionary pathways toward complex adaptive traits” The Society for Integrative & Comparative Biology (SICB) 2018, January, 2018, San Francisco, USA
- (4) 鈴木 誉保 「複合適応形質の起源について：ダーウィンとマイヴァートの議論からの進展」日本進化学会第19回大会 (in Japanese) 2017年8月、京都
- (5) [招待講演] 鈴木 誉保 「ベイズ統計モデリングで解き明かす複雑な構造の進化：枯葉に擬態した蝶を例に」生命の起源および進化学会 第42回学術講演会 (in Japanese) 2017年3月、飯塚
- (6) [招待講演] 鈴木 誉保 「活用事例：生物多様性情報から進化のダイナミクスをあぶりだす」第39回日本分子生物学会年会 (in Japanese) 2016年11月、横浜
- (7) [Invited talk] Suzuki TK “Building logic of complex animal structures: Lessons from butterfly and moth wing patterns” Exploring the Tree of Life: Messages from non-model animals, November, 2016, Tsukuba, Japan
- (8) [Invited talk] Suzuki TK “How complex wing patterns of butterflies and moths evolved?” International Congress of Zoology 2016, November, 2016, Ginowan, Japan
- (9) [招待講演] 鈴木 誉保 「コノハチョウの枯葉模様の進化とその背景に見えてきた基本法則」日本鱗翅学会第63回大会 (in Japanese) 2016年10月、藤沢

- (10) [招待講演] 鈴木誉保「Museomics が開く
新時代 Museomics の実践例(1)」第5
回生命医薬情報学連合大会 (in
Japanese) 2016年10月、東京
- (11) [Invited talk] Suzuki TK
“Morphometrics meets network theory:
Modularity and the origin of
camouflage patterns of butterfly and
moth wings” International Congress of
Entomology (ICE) 2016, September,
2016, Orlando, USA
- (12) Suzuki TK “Camouflage variations on
a theme of the Nymphalid ground plan”
International Meeting on Integrative
Approach to Understanding the
Diversity of Butterfly Wing Patterns,
August, 2016, Kasugai, Japan

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 誉保 (SUZUKI, Takao)
農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能
利用研究部門・研究員
研究者番号：40442975

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし