

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19770201
 研究課題名 (和文) Wg 発現の再配置による形態進化：付属肢から新奇形質が生じる機構の
 解明
 研究課題名 (英文) Morphological evolution by re-arrangement of wg expression:
 Mechanisms of novelty development in protostome appendages.
 研究代表者
 丹羽 尚 (NIWA NAO)
 独立行政法人理化学研究所・形態形成シグナル研究グループ・研究員
 研究者番号：50373345

研究成果の概要：生物形態の多様化機構の一端を解明する目的で、前口動物の付属肢に生じる新奇形質の形成について解析を行なった。原始的昆虫類および環形動物ゴカイ類を用いた解析の結果、前口動物の付属肢の基部背側には *wingless* 遺伝子が再発現することで新たな器官を作り出す機構が進化的に保存されており、昆虫類では、その器官形成機構に加え、背板に既存する伸展機構が合わさったことによって、新奇形質のひとつである翅が急速に生じた可能性を見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	450,000	3,750,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：前口動物，昆虫，ゴカイ，付属肢，発生進化，新奇性，*wingless* 遺伝子，翅

1. 研究開始当初の背景

(1) . 形態進化研究について

動物の進化過程では、それまでにない全く新しい機能を担う形質が誕生し、その動物種の飛躍的な繁栄をもたらす場合がある。そのような形質を「新奇形質」と呼び、その獲得は生物の形態進化や多様化の重要なプロセスの

一つと考えられている。しかしほとんどの場合、新奇形質はその斬新な機能と形態の為に、系統をさかのぼって起源や相同関係を類推することが困難であり、獲得メカニズムについての理解はきわめて乏しい状態であった。

(2) . 付属肢研究について

節足動物などが属する前口動物群において、各体節に一对生じる付属肢（脚や触角など）は、発生学的には相同器官でありながら形態と機能が多様化することが知られていた。さらに、ショウジョウバエをはじめとしたいくつかの昆虫種での解析から、すでに付属肢の基本的な形成機構が分子レベルで明らかにされつつあった。このような状況から、付属肢は生物の形態進化機構を分子レベルで解析できる最適のモデルであると考えられた。特に、昆虫類の大繁栄をもたらした「翅」は、付属肢の一部から生じた新奇形質のひとつであると予想されていた。そのため、この翅の獲得機構の解明を通して、付属肢から新奇形質が誕生する機構、しいては付属肢の形態進化機構を明らかにする研究が展開できると考えられた。

(3) . 本研究の開始に至った経緯

先行研究として、付属肢進化過程の重要な段階にある3種類の動物種（ゴカイ類、イシノミ類、カゲロウ類）を実験材料として選択し（研究の方法の項を参照）、各付属肢の解剖学的、組織学的解析、さらに付属肢形成遺伝子の発現解析を行なった。その結果、新奇形質に関する以下の4つの知見が得られた。

a) 付属肢に関連する新奇形質は「基部背側」より生じる：節足動物の付属肢形態は多様であるが、甲殻類の鰓（呼吸器官）など機能的に分化し自律的に可動な新奇形質に限ると、付属肢の基部環節の背側という特定の部位から生じている。

b) 基部背側には進化的に保存された共通の筋肉系が発達する：環形動物と原始昆虫類の付属肢には、基部背側に共通の筋肉系が発達しており、かつそれは昆虫類にみられる新奇形質（翅など）を制御する直接筋と相同である可能性が高い。

c) 基部背側の上皮は他の付属肢上皮と組織学的に異なる：環形動物および原始昆虫類のいずれにおいても、発生段階にある付属肢では基部背側の上皮が他の領域に比べ、より肥厚するという特徴をもつ。

d) 基部背側および新奇形質の前駆細胞には *wingless* (*wg*) 遺伝子が発現する：様々な器官形成においてオーガナイザー的な活性を担う *wg* 遺伝子が、昆虫類、環形動物の付属肢の基部背側にも共通して発現する。さらに翅原基だけでなく、昆虫類の付属肢から生じる他の新奇形質である気管鰓（カゲロウ類）の前駆細胞にも *wg* 発現がみられる。

以上の結果から「付属肢進化過程で生じる新奇形質は、付属肢の基部背側という特定の位置に再配置されるようになった *wg* 活性によって形成誘導される」という仮説に至り、このことを系統に沿って検証する必要性が生じた。

2. 研究の目的

本研究では、より原始的な環形動物から有翅昆虫類までの複数の材料を用い、先行研究によって得られた仮説：「新奇形質は、付属肢の基部背側という特定の位置に再配置されるようになった *wg* 活性によって形成誘導される」を検証する。具体的には次の2点を明らかにすることを目標とした。（1）発生過程で *wg* 遺伝子発現が付属肢の基部背側に再配置される過程とその分子基盤、（2）各付属肢の基部背側の *wg* 活性の新奇形質形成への関与、である。最終的には、これらの分子レベルの結果と先行研究で得られた形態学的知見とを系統関係を加味しながら統合し、新奇形質の誕生と *wg* 発現の再配置の関係について、その進化的な保存性と変容を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) . 材料

前口動物の付属肢進化過程の重要な段階にある次の3種類の動物種を実験材料とした。すなわち、前口動物の系統で初めて付属肢が生じた環形動物(ゴカイ類, *Perinereis nuntia*), 新奇形質である翅が獲得される前段階の原始無翅昆虫(イシノミ類, *Pedetontus unimaculatus*), そして翅が獲得された直後の原始的有翅昆虫(カゲロウ類, *Ephoron eophilum*)である。当初これらの種はいずれも実験材料として確立されていなかったため、それぞれの室内飼育法を確立した。

(2) . 遺伝子クローニング

解析にもちいた遺伝子はすべて各材料種の受精卵より抽出したmRNAからRT-PCR法によって単離した。各材料の卵は異なる状態であるため、それぞれにおいて独自の前処理を行なうmRNA抽出法を確立した。PCRに用いるprimerは、各遺伝子において進化的に保存された領域を対象に設計した。

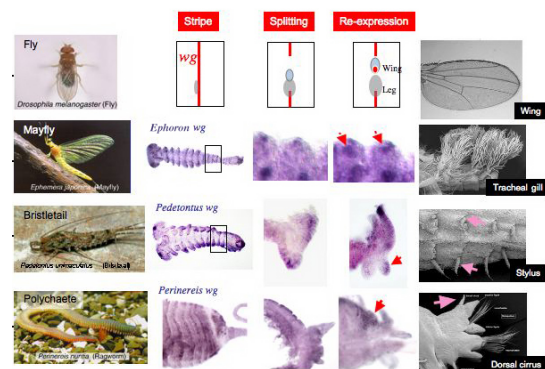
(3) . 遺伝子発現解析

遺伝子発現は whole-mount in situ hybridization 法によって解析した。ゴカイ類は軟体動物で用いられる手法を、昆虫類はコオロギ類で用いられている手法をそれぞれ改変し、適切な条件を決定した。主に、固定, Proteinase-K 処理, ハイブリ温度, ハイブリ後の洗浄について条件検討を行なった。

4. 研究成果

(1) . 発生過程で *wg* 遺伝子発現が付属肢の基部背側に再配置される過程とその分子基盤。

各材料種の付属肢では、*wg* 遺伝子が発現する基部背側に独自の器官が形成される。ゴカイ類では「背触糸 (感覚器官)」, イシノミ類では「脚基突起 (腹部の支持器官)」, カゲロウ類では「気管鰓 (若虫の呼吸器官)」がこれにあたる (下図)。そこで、これらの器官の形成過程における *wg* 発現プロセスを解析した。その結果、昆虫類の背部器官、すなわち気管鰓と脚基突起のいずれの形成過程には、類似の *wg* 発現パターンの変化を伴うことが明らかとなった。すなわち、*wg* は発生初期には各体節の前後区画境界に線状に発現し、その後背側と腹側に発現を残し、側方部分 (付属肢の背側と側板領域に相当) でのみ発現が消失する。発生後期に入り付属肢が伸長してくると、その側方部分に再度 *wg* が発現する。この再発現は付属肢の基部背側に位置し、そこから各器官の原基が形成誘導される。この *wg* 発現プロセスは、ショウジョウバエの翅形成にも類似していた (下図)。ゴカイ類においては、体節での *wg* の線状発現が背腹方向に分離することはみられないが、背側基部特異的に *wg* 発現が拡張することが見出された。



これらの結果は、付属肢由来の新奇形質の形成は、形態的機能的な相違に関わらず共通の分子的基盤によって誘導されている可能性を示唆した。この分子基盤をより具体的に解明するため、再発現した *wg* 遺伝子によって誘導され、かつ翅特異的に発現する

vestigial (*vg*) 遺伝子を各種から単離し、その発現を解析したところ、脚基突起、気管鰓においても再発現した *wg* との共発現が確認された。これらの結果は、すくなくとも昆虫類においては、付属肢の基部背側で再発現する *wg* が *vg* 発現を誘導することが新奇形質創出の共通基盤として考えられた。

(2) . 各付属肢の基部背側の *wg* 発現が実際に新奇形質の形成にどのように関与するか。

4- (1) の解析結果、3つの器官、翅(ショウジョウバエ)、気管鰓(カゲロウ類)、脚基突起(イシノミ類)は、いずれも発生過程の付属肢の基部背側において *wg*- *vg* シグナルが活性化することで形成誘導されるという共通基盤が明らかになった。

しかし、これらの器官が共通基盤を持ちながらどのように形態的差異(多様化)が生じるのかについては不明であった。実際、これらの器官は付属肢基部背側領域内でも形成部位が背腹方向で違うこと、より背側に形成される器官はより扁平になる傾向があること、などの形態学的差異から、各昆虫の背側領域に特に着目して解析を行なった。その結果、原始的無翅昆虫であるイシノミ類では、*apterous* (*ap*) 遺伝子が背板と付属肢の境界近傍にも発現することを見出した。*ap* 発現には明瞭な発現境界があり、そこには *wg*, *vg* が発現することも明らかとなった。この発現境界は側方に伸展する背板縁と一致し、かつ *ap*, *wg*, *vg* の発現様式はショウジョウバエの翅原基における翅辺縁部のものと酷似していた。このことから、付属肢の最も背側に形成される翅の場合、その扁平な形状は原始昆虫の背板に由来する伸長機構を用いて形成されていることが示唆された。一方、付属肢の基部背側領域のうち最も腹側(下方)に形

成される脚基突起の伸長過程では *Distal-less* 遺伝子が先端部に発現しており、より腹側に位置する脚の伸長と類似の機構が用いられていることを示唆した。以上をこれまでの研究結果と合わせると、昆虫類の付属肢に生じる新奇形質は基部背側領域で再発現する *wg* 遺伝子によって形成誘導されるが、その発現部位は領域内において背腹方向に変化する自由度があり、発現部位依存的に異なる伸長機構を選択することで形態的な多様性が生じていると考えられた。昆虫の翅の場合は、付属肢の基部背側における器官形成活性と背板における伸長機構が、付属肢一背板の境界領域で組み合わせることで急速に発達したものであると考えられた。

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)

[学会発表] (計9件)

1. 丹羽尚, 秋元-加藤 愛, 林茂生

Conserved proximo-dorsal expression of *wg* in insect appendages: Possible origin of evolutionary novelties such as wing and tracheal gill.

第40回日本発生生物学会, 第59回日本細胞生物学会 合同大会

2007年5月30日, 福岡

2. Niwa, N., Akimoto, A., Hayashi, S.

Wg expression at proximo-dorsal region in Protostome appendages: Common basis for generation of evolutionary novelties such as insect wing and tracheal gill

The 8th Japanese Drosophila Research Conference.

2007年7月2日, 兵庫

3. 丹羽尚

新奇形質を創出する分子基盤：前口動物の
付属肢を例に

第1164回 国立遺伝学研究所バイオロジカ
ルシンポジウム

2007年7月19日，静岡

4. Niwa, N.

Reevaluation of the tracheal gill -
stylus theory for the origin of
insect wing: Conserved expression of
wing-related genes in limb branches and
terga of basal insects.

第2回昆虫ゲノム研究会

2008年3月6日，東京

5. 中垣裕貴，佐久間将，丹羽尚，

林茂生，町田龍一郎

ヒトツモンイシノミ *Pedetontus*

unimaculatus Machida のengrailed 相同遺
伝子の発現解析（六脚類：イシノミ目）

第44回日本節足動物発生学会

2008年5月22日，長野

6. Niwa, N., Akimoto-Kato, A., Hayashi, S.

Reevaluation of the tracheal gill - stylus
theory for the insect wing origin by
comparing the expression of wing-related
genes in basal insects.

41st Annual meeting for the Japanese society
of developmental biologists.

2008年5月29日，徳島

7. Niwa, N., Akimoto-Kato, A., Hayashi, S.

An embryological ground plan for rapid
evolution of insect wing.

The 16th CDB Meeting: Cis sequence
regulation and its evolution.

2008年9月29日，兵庫

8. 丹羽尚

翅の誕生：昆虫の体にある2つの仕組み

JT生命誌研究館 2008年度第3回外部研究者
セミナー

2008年11月26日，大阪

9. Niwa, N., Akimoto-Kato, A., Hayashi, S.

Comparison of the limb development between
insects and polychaetes to understand a
ground plan of protostome limbs.

The 3rd insect genomes research meeting.

2009年3月11日，兵庫

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丹羽 尚 (NIWA NAO)

独立行政法人理化学研究所・形態形成シグ
ナル研究グループ・研究員

研究者番号：50373345