

機関番号：12601

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570198

研究課題名 (和文) 付属肢の進化・多様性の分子メカニズム

研究課題名 (英文) Evolution and diversity of insect appendages

研究代表者

小嶋 徹也 (TETSUYA KOJIMA)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号：80262153

研究成果の概要 (和文)：

ショウジョウバエ成虫肢の付節形成過程では、3 齢幼虫初期には転写因子 Bar と Dac が隣り合って発現するが、その後、Nub や Rn、Ap といった転写因子のタイムリーな発現により Bar と Dac の発現が変化することで 5 つの付節が形成されることが明らかになった。さらに、カイコ幼虫肢の形成過程では、Nub、Rn、Ap などの転写因子が発現せず、Bar と Dac の発現が発生初期から変化しないことで付節は 1 つしかできないことも明らかとなった。これらのことから、上記転写因子の発現のタイミングにより様々な種での付節の数が決定されると考えられる。

研究成果の概要 (英文)：

In *Drosophila*, five tarsal segments are created by changes in expression patterns of two transcription factors, Bar and Dac, by timely expression and function of several other transcription factors, such as Nub, Rn and Ap. On the other hand, during development of larval legs in *Bombyx*, Nub, Rn and Ap are not expressed and expression of Bar and Dac does not change from the early pattern, and only one tarsal segment is formed. Thus, the difference in the timing of transcription factors expression appears to be one basis for the difference in the numbers of tarsal segments among various insect species.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

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：進化・昆虫・付属肢・発生分化・発現制御

## 1. 研究開始当初の背景

現在までに、ショウジョウバエなどのモデル生物については、その形作りについての遺伝子レベルでの理解が著しく進んできた。その結果、*Hox* 遺伝子や主要なシグナル伝達系などは生物種間で非常によく保存されており、様々な生物種は、遺伝子レベルでみれば

それほど違いはないことがわかってきた。しかし一方で、地球上に存在する様々な生物種は、それぞれ変化に富む多種多様な形態を有することで、それぞれの生活環境に適応している。生物共通の基本的メカニズムについての研究が高い注目を集め著しい理解の向上を果たす一方で、様々な生物種の多様性やそ

の進化に関する遺伝子レベルでの研究はそれほど進んでおらず、これからの生物学における重要な課題の1つである。

節足動物は起源も古く、全生物種の3/4を占めるとも言われるほど著しく多様化したグループである。節足動物は鋏角類、多足類、甲殻類、そしてショウジョウバエを含む昆虫類（正確には六脚類）の4つのグループから構成される。節足動物の共通点は、その名の通り付属肢が分節化されていることである。節足動物の中でも昆虫類は特に種数が多く、その形態を様々に進化・多様化させてきた。

触角、口器、歩脚、生殖器等の付属肢は、昆虫の生存に重要な意味を持つ器官であり、昆虫はそれらを変化させることによって、様々な生活環境に適応してきた。また、その形態は種の区別にも利用されるように、種毎に正確に決められている。歩脚は、色や形は多様化していても、基本的には、胴体に近い側から順に、基節、転節、腿節、脛節、付節、先付節といった分節から構成される。しかし、付節だけはさらに分節化されることが多く、種毎に1-5節とその分節数に多様性が見られる。さらに、ショウジョウバエの付属肢においてすべての *Hox* 遺伝子の機能を無くすと、基節から脛節は融合しているがほぼ正常な付節をもつ付属肢が分化することが報告されており、付節は付属肢の基本形の一部であると考えられる様になっている。したがって、昆虫類の付節の多様性を実現する分子メカニズムを明らかにすることで、生物の進化・多様化についての的確な知見が得られると期待される。

昆虫肢の形成過程については、我々のこれまでの研究を始めとして、ショウジョウバエにおいて研究が進んでおり、正常な付節の形成に必要ないくつかの転写因子が知られている。しかしながら、これらの転写因子が総合的にどの様に働くことで5つの付節が形成されるのかについては、ショウジョウバエにおいてすらよく分かっていない。したがって、ショウジョウバエでそのメカニズムを明らかにし、他の昆虫種における発生過程と比較することで、付節の多様性を実現するメカニズムに迫ることができると期待される。

## 2. 研究の目的

これまでの研究から、ショウジョウバエ成虫肢の付節形成過程について、以下のことが明らかとなっている（図1）。3齢幼虫初期には、将来の付節領域付近で転写因子 BarH1 および BarH2（これらは機能的に互いに冗長に働くため、まとめて Bar と記す）と Dachshund (Dac) が隣り合って発現しており、この時点では付節領域には1つまたは2つの領域しか存在しない。その後、肢の前駆組織（肢原基）の成長に伴い、Bar と Dac の発現領域の間に

どちらも発現しない領域が形成され、Bar の発現領域のすぐ外側で将来の第2付節と第3付節の間に相当する溝が形成される。溝の遠位側ではさらに Bar を発現しない領域が形成され、Bar を発現している領域も、強く発現する領域と弱く発現する領域に分けられる。溝の近位側の Bar も Dac も発現していなかった領域では、Dac が弱く発現し始める。結果として、3齢幼虫後期には、Dac が強く発現する領域（第1付節）、弱く発現する領域（第2付節）、どちらも発現しない領域（第3付節）、Bar を弱く発現する領域（第4付節）、強く発現する領域（第5付節）の5つの領域が付節領域に形成される。このように、Bar や Dac の発現変化が5つの付節が形成されるのに重要であると考えられるため、その発現変化、特に Bar の発現変化メカニズムを明らかにする。また、ここで明らかとなったメカニズムを基に、他の種の昆虫での付節形成過程を解析することで、付節の分節数に違いを生むメカニズムを明らかにする。

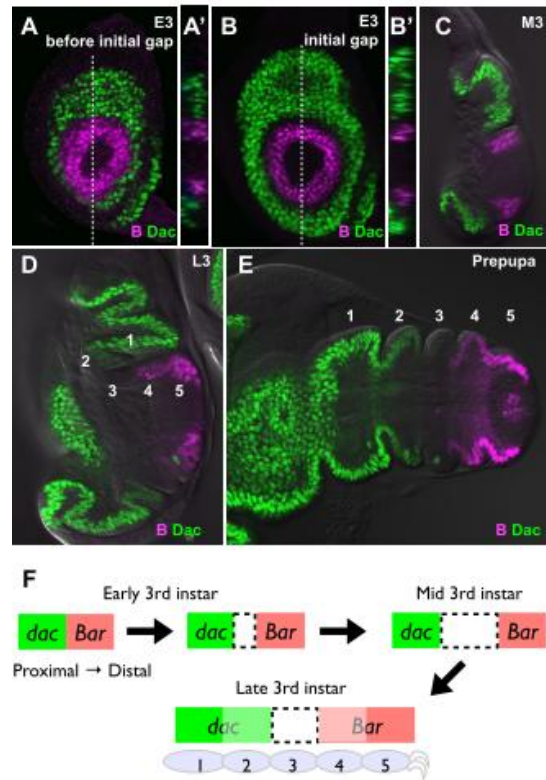


図1. Bar と Dac の発現領域の変化。

A. 3齢初期には Bar（紫）と Dac（緑）の発現領域は隣接している。B-C. 3齢初期から中期にかけて Bar と Dac の発現領域の間にギャップが生じ、その後、Bar の発現しない領域はさらに拡大する。D-E. 3齢後期から前蛹期には第1付節での強い Dac の発現、第2付節での弱い Dac の発現、どちらも発現していない第3付節、第4付節での弱い Bar の発現、第5付節での強い Bar の発現が見られ、各付節と Bar、Dac の発現による領域が対応している。F. Bar と Dac の発現変化のモデル図

### 3. 研究の方法

ショウジョウバエの付節形成過程については、Bar や Dac の他に、3 齢幼虫後期に第 5 付節で発現する Nubbin (Nub)、第 4 付節で発現する Apterous (Ap)、3 齢幼虫中期に第 1-第 4 付節で発現する Rotund (Rn) が知られている。これらの突然変異体では、付節形成が異常になるので、これらの転写因子と Bar の発現変化の間には、密接な関係があると考えられる。まず、これらの転写因子の詳細な発現パターンを、Bar や Dac の発現パターンとの関係に注目しながら解析する。その後、これらの転写因子の突然変異体や強制発現系を用いた分子遺伝学的解析により、Bar の発現変化に対するこれらの転写因子の機能を解析する。

次に、付節が 1 つしかないカイコ幼虫肢の発生過程において、上記転写因子の発現パターンを解析することにより、付節の数とこれらの転写因子の機能との関係を明らかにする。

### 4. 研究成果

Rn の発現パターンを詳細に解析したところ、Rn は Bar と Dac の発現領域の間に両者を発現しない領域（ギャップ領域）が形成し始めると、その領域で発現し始め、ギャップ領域が広がるにつれ、Rn の発現領域も拡大していくことが分かった。Rn の突然変異体では、将来の第 3 付節での Bar の発現消失が起らず、Rn の異所発現によって Bar の発現が抑制された。これらのことから、Rn の発現によって Bar の第 3 付節での発現が抑制されることで、第 3 付節領域が形成されることが示唆された。

Nub の発現パターンを詳細に解析したところ、3 齢幼虫初期には、付節全体を含む広い領域で発現しており、徐々に付節領域の近位側での発現が消失していき、最終的に第 5 付節に限局して発現するようになることが分かった。また、Rn の発現パターンとの比較では、Nub の発現が消失するとそこで Rn の発現が現れ、Nub の発現変化にあわせて Rn の発現領域が拡大することが分かった。Nub の突然変異体を用いた解析では、Nub の活性がなくなると Rn が異所的に発現し Bar の発現が抑制されることが、Nub の異所発現実験では Rn の発現が抑制されることが、Rn と Nub の二重変異体では Bar の発現に変化が見られないことが分かった。また、Rn の発現は、Tarsal-less (Tal) という 11 アミノ酸から成る短いペプチドによって正に制御されていることが報告されているが、Tal の突然変異体では Nub の発現は変化しないこと、Tal と Nub の二重変異体では Tal の変異体と同様に Rn の発現がみられないことから、Rn の発現は Tal による正の制御と Nub による負の制御

という独立の 2 つの制御を受けていることが明らかとなった。これらのことから、Nub の発現が消失する領域が拡大することで、Nub による抑制が解除されて Rn が発現する領域が拡大し、それによって Bar が抑制される領域が形成され、第 3 付節が形成されることが明らかとなった。

ショウジョウバエの付節形成過程においては、最も遠位側の部分から上皮細胞増殖因子受容体 (Epidermal Growth Factor Receptor: EGFR) のリガンドが分泌されて濃度勾配を形成しており、それらがモルフォゲンとして機能していることが知られている。EGFR シグナルと Nub の発現の関係を解析したところ、EGFR の恒常的活性化型を発現させた時には Nub の発現消失が起らなくなり、EGFR のドミナント・ネガティブ型を発現させると Nub の発現が抑制された。これらのことから、Nub の発現は EGFR シグナルの制御下であり、肢原基の成長に伴い、付節の近位側で EGFR のリガンドが十分に届かない領域が生じ、そのために Nub を発現しない領域が形成されることが示唆された。

上記の通り、Bar の発現は Rn により抑制されるにもかかわらず、3 齢幼虫中期以降では、Rn と Bar の発現領域は第 4 付節で重なっている。Ap の発現パターンを詳細に解析したところ、Ap の発現が開始すると、その細胞で Bar と Rn の発現が重なるようになることが分かった。Ap の機能を RNAi により阻害すると第 4 付節での Bar の発現が消失し、Ap を異所発現すると Bar の発現が抑制されなくなることが分かった。これらのことから、3 齢幼虫中期になると Ap が発現し、Rn が Bar を抑制するのを阻害することで、Bar が発現したままとなり、第 4 付節が形成されることが示唆された (図 2)。

また、以上の解析の過程で、将来の第 2 付節領域は、当初 Bar を発現している領域が一旦 Bar の発現を停止し、その後、Dac を弱く発現することで形成されることも示唆され、その過程には Spineless (Ss) という別の転写因子が必要であることも示唆された。

以上のことより、付節領域はその発生初期には Bar と Dac により 1 つもしくは 2 つの領域にしか分割されていないが、肢原基の成長に伴う Nub の発現変化とそれによる Rn の発現、Rn による Bar の発現抑制、発生中期での Ap の発現による Rn の機能阻害によって、さらに分割されていくことが明らかとなった。このことは、5 つの付節領域の形成にはこれら転写因子のタイムリーな発現変化と機能が重要であり、それらが変化することで、付節の分節数は容易に変化することを示唆している。

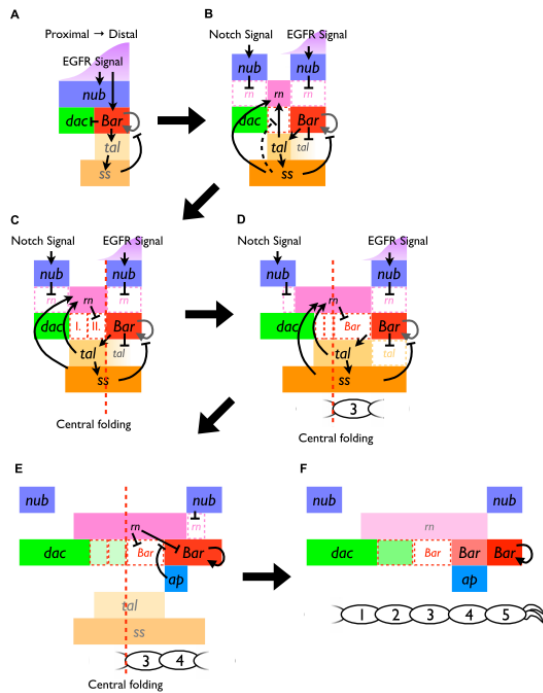


図2. 付節形成過程における転写因子の相互作用.

ショウジョウバエでの上記の結果を踏まえ、上記転写因子の相同遺伝子をカイコゲノムからクローニングし、付節が1つしかないカイコの幼虫肢の発生過程における発現パターンを解析した。幼虫肢発生初期には、Nubは付節全体を含む広い領域で発現し、BarとDacは隣り合って発現しており、ショウジョウバエと同様の発現パターンが見られた。発生が進むと、Nubの発現はショウジョウバエと同様に付節の遠位側に徐々に限局していったが、BarとDacの発現パターンはほとんど変化せず、隣り合ったままであった。一方、ショウジョウバエの成虫肢形成過程でBarの発現変化に重要な役割を果たしていたRn、Ap、Ssについては、カイコ幼虫肢形成過程では発現が認められなかった。これらのことから、カイコ幼虫肢形成過程では、発生初期にはショウジョウバエの成虫肢形成過程と同じであるが、その後のカスケードが動かないことで、付節領域がさらに分割されることがなく、1つの付節しか形成されないことが示唆された。

上記のように、ショウジョウバエにおける付節形成過程の解析とカイコ幼虫肢における付節形成過程の解析から、複数の転写因子のタイムリーな発現と機能が多様化することが、付節の数の多様性を実現するメカニズムの1つであると考えられる。

## 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 Natori, K., Tajiri, R., Furukawa, S., and Kojima, T. (2012) Progressive tarsal patterning in the *Drosophila* by temporally dynamic regulation of transcription factor genes. *Developmental Biology* 361, 450-462, 査読有.
- ② Ando, T., Kojima, T. and Fujiwara, H. (2011) Dramatic changes in patterning gene expression during metamorphosis are associated with the formation of a feather-like antenna by the silk moth, *Bombyx mori*. *Developmental Biology* 357, 53-63, 査読有.

[学会発表] (計4件)

- ① 名取 恒平, 田尻 怜子, 古川 史織, 小嶋 徹也, Temporally dynamic regulation of transcription factor genes controls progressive tarsal patterning in the *Drosophila* leg. 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月13日, 横浜
- ② Natori, K. and Kojima, T., Formation of Tarsal Segments by the Temporal Regulation of Transcription Factor Genes during Leg Development., 1st Asia-Pacific *Drosophila* Research Conference., 2011年5月23日, 台湾
- ③ Natori, K. and Kojima, T., Formation of Tarsal Segments in the *Drosophila* Leg by the Temporal Regulation of Transcription Factor Gene., The 20th CDB Meeting, 2011年2月24日, 神戸
- ④ 小嶋 徹也, 西郷 薫, 坪田 拓也, 異なる Hox 遺伝子による異なるメカニズムを介した複数の体節間で共通する特長の制御, 第31回日本分子生物学会年会, 2008年12月9日, 神戸

[その他]

ホームページ等

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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小嶋 徹也 (KOJIMA TETSUYA)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号: 80262153