

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03003

研究課題名(和文) 単一遺伝子内の染色体逆位がもたらすナミテントウの斑紋多様化の分子基盤

研究課題名(英文) Molecular basis underlying color pattern diversification through chromosomal inversions within a single gene

研究代表者

安藤 俊哉 (Ando, Toshiya)

京都大学・白眉センター・特定准教授

研究者番号：10709744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年のゲノム科学の発展により、複数の昆虫で種内の形態多型と関連する遺伝子座が同定されてきた。本研究ではナミテントウの斑紋多様化を題材に、染色体逆位を伴う塩基配列の多様化に伴う表現型多様化の分子基盤の解明を目指した。申請者らは、ナミテントウの200以上の斑紋多型の創出の際に生じた染色体逆位が影響を受けるのが単一遺伝子だという利点を活かして解析を進めた。具体的には、(1) pannierの転写制御に重要なエピゲノム情報の解析、(2) ゲノム編集による転写制御配列の機能解析、(3) pannierを中心とした遺伝子制御ネットワークの解析、3つの実験系を確立し、斑紋多様化の分子基盤の一端を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ナミテントウの染色体逆位をきっかけとした模様の多様化が、単一遺伝子pannierの「転写制御配列の不活化・獲得」によって生じたことが判明した。従来、逆位が引き起こす表現型進化は、内部の遺伝子群(超遺伝子)の複合的な変異蓄積により生じると考えられていたが、それが単一遺伝子の機能変遷により生じることが判明した。本研究は、表現型進化の新たな機構の一端を明らかにしたという学術的意義を有する。本研究で開発したゲノム編集技術は、非モデル昆虫であるナミテントウで確立できた技術であり、今後、害虫・益虫を含む他の非モデル昆虫に応用することで多様な表現型進化の理解と操作が可能になると期待される。

研究成果の概要(英文)：Recent advances in genomics have led to identifying loci associated with morphological polymorphism within species in several insects. In the present study, using the color pattern diversification of the harlequin ladybugs, we aimed to elucidate the molecular basis of phenotypic diversification associated with chromosomal inversions. We took advantage of the fact that only a single gene is affected by the chromosomal inversions that have resulted in more than 200 color pattern polymorphisms in the harlequin ladybugs. Specifically, we established three experimental systems: (1) analysis of epigenomic information crucial for transcriptional regulation of pannier, (2) functional analysis of transcriptional regulatory sequences by genome editing, and (3) analysis of gene regulatory networks centered on the pannier to elucidate the molecular basis of color pattern diversification.

研究分野：進化生物学

キーワード：ナミテントウ 染色体逆位 種内多型 エピジェネティクス ゲノム編集 形態進化 パターン形成

#### 1. 研究開始当初の背景

棲息環境に適した多様な形態を獲得してきた昆虫は、種内にも顕著な形態多型を有する。近年のゲノム科学の発展により、複数の昆虫で種内の形態多型と関連する遺伝子座が同定されてきた。そのほとんどが染色体逆位を伴う原因遺伝子座周辺の塩基配列の多様化と相関する。しかし、逆位内に複数の遺伝子が存在する為、どの遺伝子が、いかにして表現型を多様化させるのかは不明のままである。申請者らは、ナミテントウの200以上の斑紋多型が、単一の遺伝子「*pannier*」内部での染色体逆位と相関することを発見した。本研究では、染色体逆位の影響を受けるのが単一遺伝子だという利点を活かし、「染色体逆位がいかにして表現型を多様化させるのか」という問題を分子レベルで解明することを目指した。

#### 2. 研究の目的

本研究では先の「問い」に答えるために、以下の3点の解明を目的とした。

- (1) ナミテントウの主要4斑紋型の間で、*pannier*の転写制御に関与するエピゲノム情報を比較することで転写制御配列を推定し、*pannier*の発現の多様化を引き起こした制御配列を明らかにする。
  - (2) ゲノム編集によるエンハンサー領域の機能解析実験を通して、染色体逆位に伴うエンハンサー獲得が*pannier*の転写制御の多様化をどのように引き起こしたかを明らかにする。
  - (3) *pannier*のエンハンサーに入力を送る上流の遺伝子制御ネットワーク(GRN)を明らかにすることで、どのような遺伝子と関連して*pannier*の発現の多様化が生じたかを明らかにする。
- (1)~(3)を統合して、表現型の多様化を引き起こす分子基盤を解明する。

#### 3. 研究の方法

- (1) ナミテントウにおけるオープンクロマチンを指標としたエンハンサー推定法を活用し、蛹の翅での発現に関与する*pannier*のエンハンサーを推定する。
- (2) ゲノム編集によるエンハンサー領域の機能解析実験を通して、染色体逆位に伴うエンハンサー獲得が*pannier*の転写制御の多様化をどのように引き起こしたかを明らかにする。
- (3) *pannier*のエンハンサーに入力を送る上流の遺伝子制御ネットワーク(GRN)を明らかにすることで、どのような遺伝子と関連して*pannier*の発現の多様化が生じたかを明らかにする。

#### 4. 研究成果

- (1) ナミテントウにおけるオープンクロマチンを指標とした転写制御配列(エンハンサー)の推定法(Assay for Transposase-Accessible Chromatin-sequencing (ATAC-seq)法)を活用し、ナミテントウの主要な斑紋型である、紅型、二紋型、四班型、斑型の4系統において、蛹の翅での*pannier*の発現に関与する斑紋系統特有のエンハンサーを推定した。その結果、系統ごとにDNAの塩基配列が多様化した第一イントロン領域において、各系統7-10のオープンクロマチン領域を同定した。この中には、ナナホシテントウまで塩基配列が保存された領域を含んでおり、その他の領域は系統間で保存されていないものが多かった。これらの結果から、ナミテントウの主要な4つの斑紋の形成に関わる*pannier*の遺伝子発現制御の背景では、「系統間で保存された制御配列」と「系統ごとに獲得された制御配列」の両者を活用して形成されていることが明らかとなった。

さらに、以上の解析で同定したエンハンサー候補領域周辺のエピジェネティック情報（ヒストン修飾等）を取得することを目指した。ところが、テントウムシの色素細胞固有の核抽出の困難な状況が判明した。具体的には、テントウムシの蛹の組織には、油滴が多量に含まれており、核サンプルが抽出の過程で凝集してしまい、核の数の計測が不可能な点が問題となっていた。そこで、細胞核抽出のプロトコールの最適化に注力した。組織の破碎の際に加える力を最小限にする、核抽出緩衝液の浸透圧をサンプルの核膜の状況に合わせて塩濃度を適切に調製する、凝集を抑制するためにBSAでサンプルをブロッキングする、沈殿によるチューブ底での凝集を抑えるためにPercoll密度勾配遠心の積層数を増やす、サンプルが適切に中間層に積層するように核抽出液を積層前にリン酸緩液で希釈する、といった工夫を施すことで核の凝集を抑制することに成功した。結果として、ナミテントウ以外の昆虫を含めた多様な組織から効率的に細胞核抽出を可能にする技術の確立に成功し、品質の高いエピゲノム情報の取得が可能な細胞核の取得に成功した。本手法を用いて、転写制御に重要なクロマチン3次元構造（Topologically Associating Domain(TAD)）を紅型において*pannier*遺伝子座周囲で検出することに成功した。さらに、TADの中の広範囲において、*pannier*の特定の領域と結合する領域が見出された。

以上の結果は、各系統の翅の斑紋領域で発現するのに関連したエンハンサー及びクロマチン相互作用が存在することを意味し、系統特有のエンハンサーの獲得・消失が斑紋の多様化と関連することを見出した。

- (2) 次世代でノックインを誘発する高効率なゲノム編集技術を応用することで、設計通りに染色体操作を施した系統の作出する実験系を構築した。進化の鍵遺伝子が獲得した制御配列の機能解明が可能になり、オープンクロマチン領域を含む一部の領域を欠損させ、斑紋に異常を来す変異系統の樹立に成功した。具体的に、は、「系統固有の」オープンクロマチン領域、「系統間で保存された」オープンクロマチン領域をそれぞれ欠失した系統を比較して異なる表現型が出現した。これらの結果は、エンハンサーごとに固有の遺伝子発現制御機構が存在することが示唆された。さらに、変異体における斑紋パターンの変化の様子から、上流の制御因子の発現領域が推定され、上流の制御因子の探索の足がかりを見出した。今後更なる、Transcriptomeレベルでの解析を進めることで、転写制御に関連する分子基盤の詳細が明らかになることが期待される。

- (3) 蛹の翅の斑紋領域で*pannier*が発現を開始する前翅のRNA-seq解析をベースとしたRNA干渉スクリーニングを行い、3つのシグナル伝達経路に関わる因子を含む新規の*pannier*上流因子候補を同定した。また、候補遺伝子アプローチによって性分化制御遺伝子である*doublesex*が斑紋パターン形成制御因子であることを明らかとした。

*doublesex*遺伝子に関しては、特にナミテントウの系統の中で最も初期に分岐した、「紅型」にみられる斑紋パターンの性的二型を制御することを見出した。より詳細には、*doublesex*のオス特異的isoformが、黑色素細胞の分化誘導制御因子*pannier*の発現を負に制御することで、*pannier*の発現量が下がり、黒い斑紋が小さくなるという、制御機構を見出した。さらに、RNA干渉処理を施した*doublesex*変異体のTranscriptome解析から、*doublesex*は*pannier*に加えてTGF-シグナルの制御因子を制御することで、斑紋の性的二型を制御することを見出した。以上の結果から、最初期に分岐し祖先的な形質を残している「紅型」において、*doublesex*, *pannier*, TGF- からなる発生制御モジュールが存在することが見出された。一方で、この発生制御モジュールは、より最近分岐した斑紋系統（二紋型、四班型、斑型）には存在せず、新たな斑紋の出現に伴い創出したと推測される。今後、発生制御モジュールの喪失と、新たな斑紋多型の出現との関連性を、*doublesex*, *pannier*, TGF- の機能推移を追跡することで表現型進化機構の分子基盤が解明されることが来される。

以上(1)-(3)の解析から、*pannier*遺伝子の第一イントロン内の逆位領域周辺でのエンハンサーの獲得・喪失がナミテントウの斑紋進化と関連することが判明した。また、これまでナミテントウでの解析が困難だった転写制御配列の機能解析系が確立し、逆位領域周辺のエンハンサーが斑紋形成に重要であることを実証した。さらに、進化の鍵遺伝子座*pannier*の転写制御に関わる上流新規因子と、その機能変遷のきっかけとなる関連制御分子も見出され、今後*pannier*の逆位周辺のエンハンサーとの結合アッセイを進めることで、どのような遺伝子制御ネットワークの改変が斑紋進化を引き起こしたかが解明されることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Toshiya Ando
2. 発表標題 多細胞生物の表現型の進化方向性にエピジェネティック情報が与える影響の理解に向けて
3. 学会等名 The 15th Annual Meeting of the Japanese Society for Epigenetics (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toshiya Ando
2. 発表標題 Genetic tool development for understanding the molecular basis of intraspecific color pattern diversification in the ladybug
3. 学会等名 the 55th Annual Meeting of Japan Society of Developmental Biology (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toshiya Ando, Taro Nakamura, Teruyuki Niimi
2. 発表標題 Exploring the origin of wing color pattern diversification in the ladybugs by focusing on the key regulatory locus pannier
3. 学会等名 The 2nd AsiaEvo Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安藤俊哉・中村太郎・松岡佑児・新美輝幸
2. 発表標題 ナミテントウの斑紋多型と関連した染色体逆位の人為的再構成に向けて
3. 学会等名 日本蚕糸学会第92回大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都大学教育研究活動データベース：安藤 俊哉  
<https://kdb.iimc.kyoto-u.ac.jp/profile/ja.4fae8bdf113b300d.html>  
安藤俊哉の研究ページ  
<https://sites.google.com/view/toshiyaando/>  
テントウムシの完全変態を200時間見守る春の自由研究 基礎生物学研究所 x ニコニコ  
<https://chokaigi.jp/2021/plan/hentai.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	新美 輝幸  (Niimi Teruyuki)  (00293712)	基礎生物学研究所・進化発生研究部門・教授   (63904)	
研究分担者	藤本 章晃  (Fujimoto Toshiaki)  (10868102)	岩手大学・農学部・特任助教   (11201)	
研究分担者	佐原 健  (Sahara ken)  (30241368)	岩手大学・農学部・教授   (11201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------