

令和 4 年 5 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15536

研究課題名(和文) 無翅昆虫から紐解く昆虫翅の分子基盤の獲得起源

研究課題名(英文) The molecular basis of insect wing origin

研究代表者

竹中 將起 (Takenaka, Masaki)

筑波大学・生命環境系・特任助教

研究者番号：00854465

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)：「昆虫翅」は昆虫進化で重要な新奇形質であるが、昆虫翅の獲得起源に関しては未解決の課題である。本申請課題では翅獲得以前の系統群であるシミ類に着目し、有翅昆虫の翅形成に関わる分子基盤の存在やその機能について追究した。本年度はvestigialやnubbinの遺伝子の機能を破壊することで、そのような形態変化が生じるかを確かめるために、CRISPR/Cas9を用いたノックアウト個体の作出を実施した。また、翅形成マスター遺伝子vestigialの発現を確認するために、VGタンパク質の抗体をマダラシミにおいて作製し、初期発生における発現パターンを調べた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、昆虫の翅の起源に迫るために、翅を獲得する以前の系統群であるシミ目に着目した。無翅昆虫類であるマダラシミにおける翅形成に重要な遺伝子の機能解析を実施し、またそれらの遺伝子の発現パターンを調べた。翅の獲得における進化を解き明かす上で、欠かせない系統群ではあるが、非モデル生物であるマダラシミにおいて、機能解析などの知見は乏しい。そんな中、世界に先駆けて無翅昆虫類における遺伝子の機能解析や抗体染色による発現パターンの解析を実施し、有翅昆虫と比べることで、昆虫翅の起源を考える上で鍵となる重要な研究である。

研究成果の概要(英文)："Insect wings" is an important evolutionary novelty in insect evolution, but the origin of insect wing is unsolved. In this study, we focus on apterygote (wingless insect) which are a group before the acquisition of wings, and investigated the existence and function of the mechanism of wing development. We conducted CRISPR / Cas9 in order to confirm the functions of vestigial and nubbin. In addition, We examined the expression patterns of VG protein in order to confirm the expression of the wing formation master gene in early stage embryo.

研究分野：発生遺伝学

キーワード：無翅昆虫 昆虫の翅

## 1. 研究開始当初の背景

地球上で最も繁栄したグループである昆虫は、4億年以上前には「翅」を獲得している。昆虫翅の獲得進化は短い期間に起こり、その後の昆虫類の多様化に大きく貢献したとされ、「翅の獲得」は昆虫の多様化してきた最大の進化イベントの一つである。加えて、昆虫類は、翅を獲得後に、極めて多様な翅が進化し、更なる多様化を促した。

しかし、昆虫翅は付属肢などとは独立した「進化的新奇性 evolutionary novelty」と呼ばれる他の分類群にはない固有の形態である。これまでに形態学的アプローチに基づいて提唱され「付属肢器官(鰓)起源説」(Kukalova-Peck, 1983, 2008)と「側背板起源説」(Rasnitsyn, 1981; Hamilton, 1971)が提唱されている。また、これらの仮説の矛盾点を統合する「dual origin 仮説」(Niwa et al., 2010; Clark-Hachtel et al., 2013)が提唱されている。しかし、未だにそのコンセンサスは得られていない。

現存する昆虫の翅は中胸と後胸にのみ存在しているが、前胸に翅様構造をもつ昆虫の化石が記録されている (Handlirsch, 1925)。さらに、現存する昆虫にも翅の連続相同体の存在が示唆されている。例えば、コクヌストモドキの前胸の前胸保護構造 hypomerone が挙げられる。コクヌストモドキを用いて *Sex combs reduced* という前胸特異的な形態形成に重要な遺伝子を RNA 干渉によりノックダウンすると、前胸保護構造が翅様構造に形成される。これは、進化の過程で失われたと考えられてきた翅が形を変えて存在したことを示唆している (Ohde et al., 2013)。また、蛹期の腹部にも腹部突出構造 denticular outgrowth やショウジョウバエの後翅にある平均棍などいくつか知られている (Lewis, 1978; Ohde et al., 2013)。これは、*Ultra-bithorax* は後胸に重要な遺伝子で、ショウジョウバエで遺伝子を RNA 干渉によりノックダウンすると、平均棍が翅のような構造に変化する。

翅連続相同体は、翅と同様の形成メカニズムをもつだけでなく、翅獲得における前適応形質の可能性もあり、シミ類での翅連続相同体の追究は極めて重要である。マダラシミの側背板は、体壁から突出しており、「側背板起源説」で唱えられている側方に伸張する形態であると示唆される。「翅の起源」に関しては翅を獲得した最初期の系統群や翅を獲得する以前の分類群を扱うことで非モデル生物だからこそ解明できると期待される (Niwa et al., 2010; Ohde et al., 2021)。

## 2. 研究の目的

昆虫類の多様化の鍵を握る「翅の獲得」は、昆虫類が大繁栄に成功した重要な進化イベントであるが、「翅の起源」は未だ解決に至っていない。これまでに、ショウジョウバエなどのモデル生物を中心に、翅形成機構が解明されてきた。その中で、翅形成に関わる重要な遺伝子として翅形成のマスター遺伝子である *vestigial (vg)* や *nubbin (nub)*, *apterous (ap)* に着目した。本課題では翅獲得以前の分類群であるシミ類を対象に、翅形成遺伝子の存在や機能について追究することを目的とする。

## 3. 研究の方法

- ・発現変動解析

無翅昆虫であるマダラシミにおいても翅マスター遺伝子がゲノム上に存在している。そこで、*vg* や、翅形成に重要な *nub* が胸部背板において発現しているかについて qPCR を用いて解析した。マダラシミの 3 齢、4 齢、そして 5 齢幼虫の背板を解剖し、RNA 抽出した。そのサンプルを用いて、qPCR を実施した。

#### ・機能解析

マダラシミの 4 齢幼虫に関して、脱皮から 24 時間以内に合成した遺伝子 (*vg*, *nub*, *ap*, *white*) の二本鎖 RNA を作製し、インジェクションした。インジェクションした個体を 5 齢幼虫に脱皮した時に、側背板の形態を測定した。測定する形態は、背板の長さ、頭幅の長さを測定した。また、より確実にノックダウンした形態変化を確認するために、マダラシミの 4 齢幼虫にインジェクションした後に、5 齢幼虫に脱皮した際にも再びインジェクションし、6 齢幼虫の形態を観察した。

#### ・抗体染色

マダラシミにおいて、翅形成のマスター遺伝子に関してどのように発現しているかを解析するために、抗体染色の抗体を作製した。初めに、マダラシミのゲノム情報から *vg* 配列を抜き出し、抗原を作成し外部委託に送った。その後、ギニアピッグに免疫し、ポリクローナル抗体作製を実施した。

得られた抗体を用いて、条件検討を実施しマダラシミの VG タンパク質の発現パターンを解析した。

## 4. 研究成果

これまでに、マダラシミのゲノム情報は解読され、翅形成に重要な遺伝子である *vg* や *nub*, *ap* などは、既にゲノム内に存在している。

#### ・発現変動解析

qPCR を用いて、翅形成に重要な遺伝子である *vg* と *nub* の発現変動を明らかにしてきた。マダラシミの 3 齢から 5 齢幼虫の背板域において、RNA 抽出を実施し、qPCR を実施した。その結果、明確な発現上昇が確認できた。これは、無翅昆虫類であるマダラシミの背板域において、翅形成遺伝子は何かしらの昨日を果たしていると推測できる。一方で、*ap* に関してはより追加実験が必要ではあるが、本研究における実験では明確な発現変動は確認できなかった。

#### ・機能解析

発現変動が見られた遺伝子である *vg* の機能解析を行うために、RNAi を用いてノックダウンを実施した。*vg* 遺伝子の二本鎖 RNA を作製し、マダラシミの 4 齢幼虫にインジェクションした。しかし、マダラシミの背板域における形態的な変化は見られなかった (n=15)。また、これまでの qPCR 結果から 3 齢幼虫から 4 齢、5 齢にかけて遺伝子の発現上昇が観察できているため、4 齢と 5 齢の 2 回インジェクションを実施したが、同様に明確な形態変化は見られなかった。

そこで、遺伝子の機能を破壊することで、そのような形態変化が生じるかを確かめる

ために、CRISPR/Cas9 を用いたノックアウト個体の作出を実施した。in vitro において、翅形成に重要な遺伝子である *vg*, *nub*, *ap* と変異体の眼が白くなることが知られている *white* の各遺伝子の切断チェックを確認した。その内の *vg* と *nub*, *white* に関して、マダラシミの卵にインジェクションした。その結果、*white* に関しては、ノックアウト個体の作出に成功し、眼の白いマダラシミを系統化することができた。続いて、*vg* の 1 系統と *nub* の 1 系統において G0 世代での遺伝子編集に成功した。しかし、G0 世代のインジェクション個体に関しては、明確な形態変化は確認できなかった。しかし、G0 世代の個体は遺伝子がヘテロで存在しているため、ホモ化させたノックアウト個体の作製を進めており、その形態変化を観察する予定である。また、外部形態に差異が認められなかった際には、内部構造に関して切片を作成して観察を予定している。

#### ・抗体染色

さらに、翅形成マスター遺伝子である *vg* の発現パターンを確認するために、VG タンパク質の抗体をマダラシミにおいて作製し、初期発生における VG タンパク質の発現パターンを調べた。現在、抗体染色に関しては条件検討の段階ではあるが、+初期発生においては有翅昆虫類と類似した発現パターンを示している。そのため、すでに翅形成に重要な遺伝子は、昆虫翅が形成される位置において何かしらの機能を有している可能性を示唆しており、前適応形質として側背板、もしくはその周辺の形態が昆虫翅の進化に重要であることを示唆する結果を得ることができた。

これらの成果により、翅を獲得する以前の系統であるマダラシミにおいても翅形成に重要な遺伝子は既に何かしらの機能を果たしている可能性が示唆された。また、これらの課題において発生遺伝学的手法を確立することに成功した。今後、「翅の起源」研究におけるモデル生物として研究を展開していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 竹中將起・千頭康彦（編）	4. 発行年 2021年
2. 出版社 北隆館 / ニュー・サイエンス社	5. 総ページ数 21
3. 書名 昆虫と自然	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------