

研究種目：基盤研究（B）  
研究期間：2007～2009  
課題番号：19370095  
研究課題名（和文） 昆虫の初期形態形成システムにおけるギャップ遺伝子群の機能進化  
研究課題名（英文） Functional evolution of the gap gene group  
in early embryogenesis of the insect  
研究代表者 野地 澄晴 (NOJI SUMIHARE)  
徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・教授  
研究者番号：40156211

## 研究成果の概要（和文）：

コオロギの発生様式は中胚型であり、この発生様式はショウジョウバエの発生様式である長胚型とは異なる。しかし、どちらの形式においても共通な遺伝子群が使用されている。この謎を解明するために、GFP を発現するコオロギを用いて、コオロギの初期発生時の細胞の移動について詳細な解析を行った。その結果、細胞が形成される以前にすでに細胞に位置情報が付与されており、それを維持して細胞移動することがわかった。また、Otd が頭部の位置情報の付与に関与していることが示唆された。これらの結果から、ショウジョウバエとコオロギの発生様式の関係は、ヘテロクロニティー、つまり発生段階の時間的なずれによるものであると考えられた。

## 研究成果の概要（英文）：

Most insects develop as short or intermediate germ embryos, through an ancestral mode of segmentation wherein the anterior segments are specified at the blastoderm stage and the posterior segments form in an anterior to posterior succession from a posterior growth zone. By contrast, in derived long germ insects such as *Drosophila melanogaster*, all segments are specified during the syncytial blastoderm stage, and maternal and gap gene products can diffuse as morphogens. To clarify how maternal and gap gene products control positional specification in phylogenetically basal insects, we analyzed the dynamic segmentation process in transgenic embryos of a hemimetabolous, intermediate-germ insect species, the cricket *Gryllus bimaculatus*. Here we show, using live imaging of fluorescently labelled embryonic cells and nuclei, that the positional specification of the cellular blastoderm is established during syncytium, as it is in long germ insects, though cricket blastodermal cells move dynamically to form the germband in a small posterior region of the egg. We also find that the *G. bimaculatus orthodenticle* gene may provide positional information for aggregating germ-anlage cells through syncytial blastoderm stages. Our findings imply a heterochronic shift in the timing of the anterior (cephalic, gnathal and thoracic) gap gene actions during evolution of a derived mode of insect embryogenesis. Our work provides new insights into an evolutionary process of early developmental mode from intermediate- to long-germ insects.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
平成 20 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
平成 21 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

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：発生進化

1. 研究開始当初の背景

昆虫の初期発生過程は、ショウジョウバエにおいて詳細に研究されており、前部に局在するピコイドからの発生過程は非常に良く知られている。われわれは、ショウジョウバエとは異なる発生過程をとる、不完全変態類の昆虫であるコオロギに着目し、その発生システムについて、平成 13～17 年度の特設領域研究「発生システムのダイナミクス」において研究を行ってきた。その結果、ピコイドを用いた発生システムはショウジョウバエ特異的であり、決して昆虫一般にあてはまるものではないことを示してきた (Miyawaki et al., 2004; Shinmyo et al., 2005; Mito et al., 2005)。

興味あることに、コオロギにはピコイドが存在せず、むしろウイングレス(Wg)/コーダル(Cad)を中心とした後部からの発生過程が重要なことを示した。

さらに、興味あることに、コオロギの初期発生過程は、ショウジョウバエの研究成果では説明できない不思議な現象があることがわかった。ショウジョウバエの多核の卵内では、ギャップ遺伝子などの転写因子が拡散して濃度勾配を形成し、標的遺伝子の転写調節をする。ところが、コオロギの卵は多細胞化しており、転写因子は拡散できないにもかかわらず、発生にはショウジョウバエの遺伝子と相同な遺伝子がギャップ遺伝子として機能しているのである。つまり、拡散できない転写因子のタンパク質が細胞間を拡散しているような現象が生じているのである。

2. 研究の目的

そこで、前述の“不思議な現象”を解明することが、本研究の目的であった。本研究では、コオロギの初期発生におけるギャップ遺伝子に着目し、そのタンパク質分布およびその発現を調節する miRNA にも着目し、なぜ拡散できない転写因子がコオロギの多細胞系で機能しているのかを解明する事を目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、コオロギの初期胚発生に関与するギャップ遺伝子の機能を、遺伝子発現分布と miRNA に着目して研究を行った。

(1) miRNA の同定とその機能の解明を行った。特に体節など体のパターンの形成に関与する miRNA に着目して研究を進めた。さらに、それらの miRNA によって発現制御を受ける遺伝子の同定を行った。

(2) トランスジェニックコオロギを作製し、それを用いて、発生初期のギャップ遺伝子の機能を調べた。

4. 研究成果

(1) 発生初期に発現する miRNA の同定はできなかった

初期発生に miRNA が関与している可能性があることから、コオロギ胚から miRNA に対応する cDNA をクローニングすることを試みた。コントロール実験として、脳や肢に発現する miRNA についてもクローニングを行った。

その結果、脳などからはmiRNAのクローニングができたが、胚からは得られなかった。ショウジョウバエの胚で発現しているmiRNAに着目し、単離を試みたが成功しなかった。

## (2) トランスジェニックコオロギの作製とその解析

ショウジョウバエ (*Drosophila*) とコオロギ (*Gryllus*) のギャップ遺伝子 *hunchback* (*hb*) と *kruppel* (*kr*) の初期胚での発現を示した模式図を図1 (a) に示す。図1 (b) には、コオロギ初期胚における *hb* と *kr* の実際の発現を示している。卵内での発現位置は非常に異なっている。コオロギ胚では胚が形成された後に発現している。胚の形成過程を詳細に解析するために、トランスジェニックコオロギを作製し、世界初に成功した。図1 (c, c') に転移酵素である *piggyBac* を用いた GFP を発現するトランスジェニックコオロギを示した。\* は非形質転換体である。GFP 融合タンパク質の局在パターンを図1 (e-g) に示した。コオロギ細胞質アクチンプロモーターで発現した GFP は核、細胞質にその局在が認められた (図1 (e))。GFP 融合アクチン遺伝子において GFP は細胞質にのみ局在した (図1 (f))。GFP 融合ヒストン 2B 遺伝子では GFP の発現は核にのみ観察された (図1 (g))。

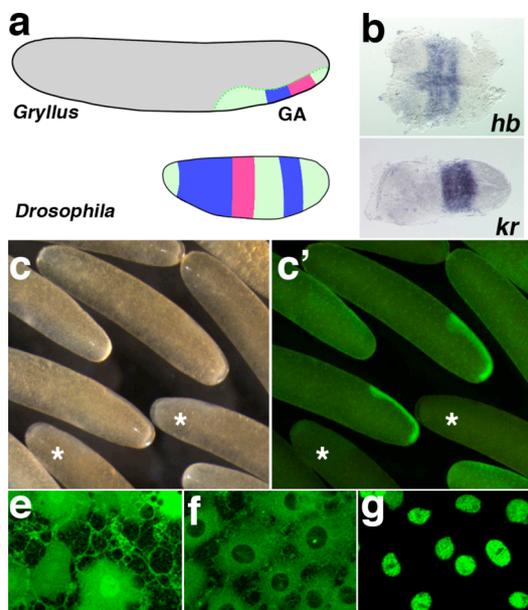


図1 ギャップ遺伝子の発現とトランスジェニックコオロギにおける GFP の発現。

このような GFP が発現するトランスジェニックコオロギにおいて、これら GFP 遺伝子が、

*piggyBac* の標的配列である TAA 配列に挿入されていることを実際に調べた。real-time PCR を用いてコピー数の定量を行い、コオロギゲノムには1-3 コピー挿入されていることがわかった。また、これらのコオロギを用いて、次にエネルギードや細胞の挙動をタイムラプス顕微鏡を用いて解析した。

形質転換コオロギを用いた初期胚形成時の細胞動態の観察結果を図2に示す。産卵後100時間程度で、分裂したエネルギードが卵の表面に移動し、分裂し増加する。増殖したエネルギードは細胞化し、胚を形成する。cortical cytoplasm の変化を図2 (i-m) に示している。エネルギードが卵表面に移動した直後では、cortical cytoplasm が多く観察されるが、次第に減少し、細胞化とともになくなるようである。その後細胞表面には filopodia が形成されていることがわかった。さらに、細胞の移動を調べると、図2 (n-q) に示すように、ランダムに移動するのではなく、すでに決められた領域でのみ移動していることがわかる。その様子を図2 (r, s) において、示している。さらに、移動の軌跡を記述すると図2 (t, u) のようになる。相対的な位置を維持しながら、細胞が移動しており、細胞はすでに何らかの前後軸などに関する位置情報を持っていることが示唆された。

次に、ギャップ遺伝子 *otd-1* の機能を解明するために、RNAi 法により *otd-1* 遺伝子発現をノックダウンして、その胚への影響を調べた。結果を図3に示す。頭部が欠損することから、頭部形成に関与していることが示唆された。コオロギ初期胚における *otd* の発現パターンを図4 (a) に示した。 *otd* mRNA は細胞化以前からコオロギ卵全体で発現している。その卵全体での発現は細胞化後も維持されている。しかし胚 (germband) 形成時において、 *otd* の発現は予定頭部領域に局在していた。コオロギ初期胚における *hb* の発現パターン 細胞化後に *hb* は発現し始め、胚原基形成時においてその発現は卵前方から胚形成領域の前方までの予定胚体外領域に観察された (図4 (b))。初期胚形成時において *hb* の発現はその胚でギャップ様の発現パターンと卵の予定胚体外領域に観察された。コオロギ初期胚形成時における *otd* RNAi 胚の表現型を調べたところ、 *otd* RNAi 胚では初期胚の頭部領域が欠損していた (図4 (c))。 *otd* RNAi 胚における *wingless* 遺伝子の発現パターン、体節のマーカ遺伝子である *wingless* (*wg*) の発現が頭部領域において *otd* RNAi 胚で大きく減少していることが分かった (図4 (d))。

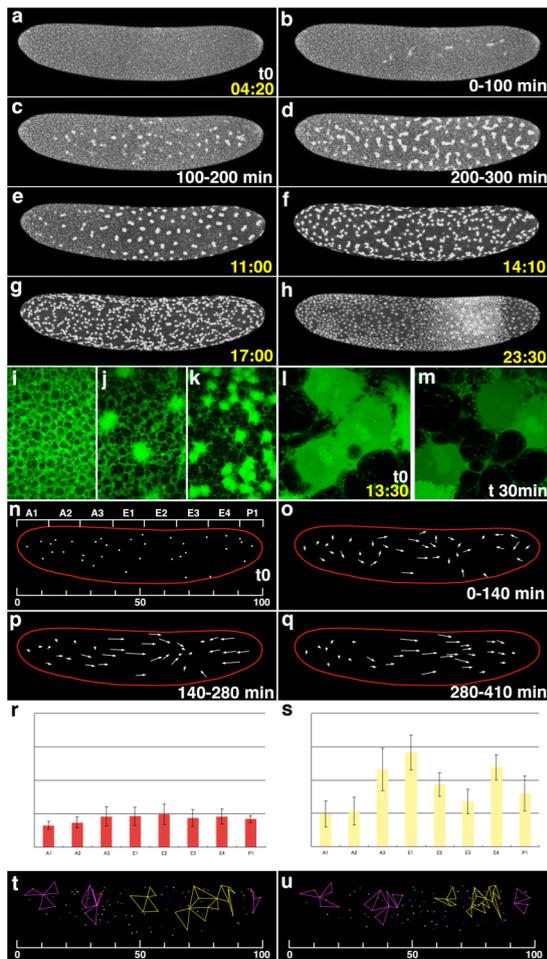


図2 エネルギーギャップと細胞の移動

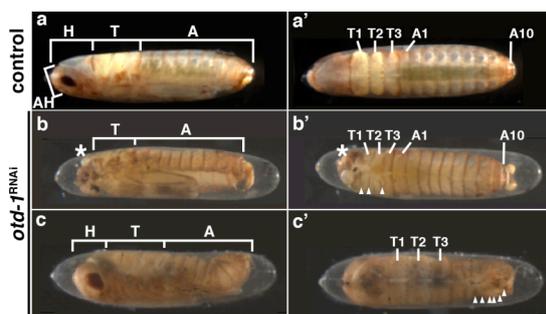


図3 a, a') コントロールとして外因性遺伝子の *DsRed2* を用いた. b-c') コオロギ *orthodenticle (otd)* RNAi 胚の表現型を示す. 頭部領域の欠損や減少、腹部体節の欠損を伴わない形成異常が観察された.

一方、後部増殖領域（腹部の発現を付加的に形成する領域）での *wg* の発現は維持されていた(図4 (d)).

図4 (e)に、コオロギとショウジョウバエの発生過程を模式的に示した。ショウジョウ

バエでは頭部と顎/胸部領域を決定する *otd*, *hb*, *kr* が多核性胞胚期にギャップ様に発現しそれら遺伝子の働きにより各体節が細胞化以前に決定するのに対し、コオロギでは細胞化後に頭部領域決定遺伝子である *otd* がギャップ様に発現し、その後引き続いて、顎部/胸部決定遺伝子である *hb*, *kr* がギャップ様に発現し各体節を決定する。*otd*, *hb*, *kr* により胚の頭部、顎部、胸部が決定した後、後部増殖領域により腹部領域が順次付加的に形成される。このことは、昆虫の発生様式の

進化の過程で、前方（頭部、顎部、胸部）を決定するギャップ遺伝子の活性のタイミングがヘテロクロニックにシフトしていることを示していると考えられた。

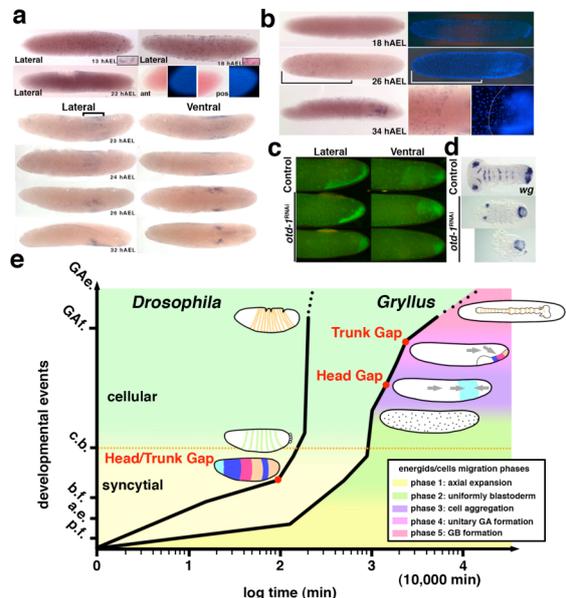


図4 *Otd-1* の発現とハエとコオロギの発生過程の比較。

### 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5件)

Mito T, Ronco M, Uda T, Nakamura T, Ohuchi H, Noji S.

Divergent and conserved roles of extradenticle in body segmentation and appendage formation, respectively, in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Dev Biol*. 2008; 313(1):67-79.

査読：有

Ronco M, Uda T, Mito T, Minelli A, Noji S, Klingler M.

Antenna and all gnathal appendages are similarly

transformed by homothorax knock-down in the cricket *Gryllus bimaculatus*.  
Dev Biol. 2008; 313(1):80-92.  
査読：有

Mito T, Nakamura T, Sarashina I, Chang CC, Ogawa S, Ohuchi H, Noji S.  
Dynamic expression patterns of vasa during embryogenesis in the cricket *Gryllus bimaculatus*.  
Dev Genes Evol. 2008; 218(7):381-387.  
査読：有

Urasaki A, Mito T, Noji S, Ueda R, Kawakami K.  
Transposition of the vertebrate Tol2 transposable element in *Drosophila melanogaster*.  
Gene. 2008; 425(1-2):64-68.  
査読：有

Hamada A, Miyawaki K, Honda-sumi E, Tomioka K, Mito T, Ohuchi H, Noji S.  
Loss-of-function analyses of the fragile X-related and dopamine receptor genes by RNA interference in the cricket *Gryllus bimaculatus*.  
Dev Dyn. 2009 Aug;238(8):2025-33.  
査読：有

[学会発表] (計 4 件)

三戸太郎、大内淑代、野地澄晴  
Gene regulatory networks for anterior-posterior patterning in a phylogenetically basal insect *Gryllus bimaculatus*, as revealed by RNAi  
第 40 回日本発生生物学会  
2007 年 5 月 28 日  
福岡市

三戸太郎、大内淑代、野地澄晴  
Molecular basis for proximodistal respecification in insect leg regeneration  
第 41 回日本発生生物学会  
2008 年 5 月 28 日  
徳島市

中村太郎、三戸太郎、大内淑代、野地澄晴  
Cellular dynamics during blastoderm stages and early embryogenesis, as revealed by transgenic cricket, *Gryllus bimaculatus*  
第 42 回日本発生生物学会大会  
2009 年 5 月 28 日～31 日  
新潟市

三戸太郎、中村太郎、大内淑代、野地澄晴  
Emerging model organism for development and regeneration biology: Cricket (*Gryllus bimaculatus*)  
第 32 回日本分子生物学会年会

2009 年 12 月 9 日 (水)  
横浜市

[図書] (計 1 件)  
Mito T and Noji S.  
The Two-Spotted Cricket *Gryllus bimaculatus*: An Emerging Model for Developmental and Regeneration Studies  
Cold Spring Harbor Laboratory  
331-346 (2008)

[産業財産権]  
○出願状況 (計 1 件)  
名称：トランスジェニック不完全変態昆虫の作製法  
発明者：野地澄晴、三戸太郎、中村太郎  
権利者：徳島大学、アロカ (株)  
種類：特許  
番号：特願 2009-238841  
出願年月日：2009 年 10 月 16 日  
国内外の別：国内

[その他] ホームページ等 該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

野地 澄晴 (NOJI SUMIHARE)  
徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・教授  
研究者番号：40156211

### (2) 研究分担者

大内 淑代 (OHUCHI HIDEYO)  
徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・准教授  
研究者番号：00253229

三戸 太郎 (MITO TARO)  
徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・助教  
研究者番号：80322254