

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H01004

研究課題名(和文) 擬態斑紋の進化プロセスの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the evolutionary process of mimetic wing color patterns

研究代表者

新美 輝幸 (Niimi, Teruyuki)

基礎生物学研究所・進化発生研究部門・教授

研究者番号：00293712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、系統的に遠い関係にあるにも関わらず、類似した擬態斑紋が形成されるメカニズムを解明するため、テントウムシに関連した擬態斑紋に着目し、材料に用いる昆虫の利点や研究代表者らがこれまでに確立した遺伝子機能解析法を活かし、次世代シーケンサーなどの最新技術を駆使して、擬態斑紋がもたらされた進化プロセスの理解を目指した。その結果、ヘリグロテントウノミハムシのドラフトゲノム解読に成功した。さらに、ヘリグロテントウノミハムシの斑紋形成において重要な役割を果たす遺伝子を複数同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

テントウムシの赤色と黒色からなる目立つ斑紋は、苦くて食べられないことを捕食者にアピールする警告色であることが知られています。テントウムシを好んで捕食する天敵は多くないため、テントウムシに擬態して捕食を免れる昆虫が数多くいます。チョウの擬態の分子メカニズムはよく研究されていますが、テントウムシに関連した擬態の分子メカニズムは全く不明です。本研究では、テントウムシとは遠い系統関係にあるヘリグロテントウノミハムシにおいて、ゲノム情報の解読、および斑紋形成において重要な役割を果たす遺伝子の同定に成功しました。

研究成果の概要(英文)：To explore how similar mimetic wing color patterns arise among phylogenetically distant species, this study focused on the mimetic wing color patterns associated with ladybird beetles. The aim was to understand the evolutionary process behind these patterns by leveraging the benefits of the insects used as material, the gene function analysis methods established by the principal investigators, and cutting-edge technologies like next-generation sequencing. As a result, we successfully sequenced the draft genome of the flea beetle, *Argopistes coccinelliformis*, and identified several genes that play a critical role in the development of these wing color patterns.

研究分野：分子昆虫学

キーワード：テントウムシ 擬態斑紋 斑紋プレパターン遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) テントウムシの赤色と黒色からなる目立つ斑紋は、捕食者に対し警告色として機能する。従って、捕食を回避するためテントウムシに類似した擬態斑紋をもつ昆虫が多く観察される。テントウムシ科内での類似した斑紋はミユラー型擬態(有害なもの同士が似る擬態)として機能し、系統的に遠い昆虫における類似した斑紋はベーツ型擬態(無害なものが有害なものに似る擬態)として機能することが知られている。

(2) これまで、擬態現象については、チョウを実験材料に用いて擬態斑紋形成に関与する遺伝子が同定されてきた。ミユラー型擬態を示す *Heliconius* 属内のドクチョウ数種を用いた遺伝学的な解析の結果、擬態斑紋を担う主要な遺伝子座は複数存在し、これらの遺伝子座は種が異なっても同様のゲノム領域に位置することが明らかにされた。さらに、ドクチョウの擬態斑紋の中で、赤色と黒色の部分的な領域を担う遺伝子座の原因遺伝子として、*Optix*、*WntA*、*cortex* が同定された。また、アゲハチョウ亜科内においてベーツ型擬態が観察されるシロオビアゲハの擬態斑紋を司る原因遺伝子として *doublesex* が同定された。

(3) 研究代表者らは、ナミテントウの斑紋パターンを決定する転写因子をコードする斑紋プレパターン遺伝子として *pannier (pnr)* を同定した。*pnr* 遺伝子は、斑紋のプレパターンに一致した発現を示し、メラニン化の誘導とカロテノイド着色の阻害を同時に行うことにより、翅全体のパターンを決定することが判明した。また、*pnr* 遺伝子は、巨大化した第 1 イントロン(約 100 kb) に生じた複数回の逆位により、斑紋の多様性がもたらされたことが示唆された。

(4) 研究代表者らは、様々な非モデル昆虫において、ゲノムや遺伝子の機能解析に必要不可欠な遺伝子組換え体、ゲノム編集や larval RNAi 法(幼虫体への二本鎖 RNA の注射により成虫形成過程で発現する遺伝子の機能を効率よく阻害する)を用いた遺伝子機能解析系を既に確立している。非モデル昆虫では困難な遺伝子機能解析ツールが整っているのは、本研究の有利な点である。

(5) 擬態現象は多くの生物種において観察されるが、科を超える系統的に遠い関係にあるにも関わらず、類似した擬態斑紋が形成されるメカニズムは全く謎のままである。本研究では、これまで擬態研究の対象とされていなかったテントウムシに関連した擬態斑紋に焦点を当て、テントウムシ上科テントウムシ科の各種テントウムシやハムシ上科のヘリグロテントウノミハムシなどユニークな材料を研究対象とする。

2. 研究の目的

本研究は、系統的に遠い関係にあるにも関わらず、類似した擬態斑紋が形成されるメカニズムを解明するため、テントウムシに関連した擬態斑紋に着目する。研究材料には、各種テントウムシおよびテントウムシとは独立に擬態斑紋を獲得した上科レベルで異なるヘリグロテントウノミハムシを用いる。これら材料に用いる昆虫の利点や研究代表者らがこれまでに確立した遺伝子機能解析法を活かし、次世代シーケンサーなどの最新技術を駆使して、擬態斑紋がもたらされた進化プロセスの理解を目指す。

3. 研究の方法

(1) 供試昆虫

- ・ナミテントウ *Harmonia axyridis*
- ・ヒメカノコテントウ *Propylea japonica*
- ・ヘリグロテントウノミハムシ *Argopistes coccinelliformis*

(2) larval RNAi 法を用いた遺伝子機能解析

二本鎖(ds)RNAの合成

標的とする遺伝子配列にアダプター配列を付加した dsDNA を IDT eBlocks の DNA 合成サービスを利用して合成した。この dsDNA をテンプレートに用い、アダプター配列に T7 プロモーター配列を付加したプライマーを用いて PCR 反応を行い、dsRNA 合成用のテンプレートを調整した。AmpliScribe T7-Flash Transcription Kit (Epicentre Technologies) を用いて、キットのプロトコルに従い dsRNA を合成した。

マイクロインジェクション

合成した dsRNA をインジェクター(FemtoJet 4i; Eppendorf)を用いて、各種昆虫の終齢幼虫にマイクロインジェクションした。なお、コントロールには EGFP の dsRNA を使用した。

4. 研究成果

(1) ヒメカメノコテントウの斑紋多型の原因遺伝子の同定の試み

テントウムシ科内での類似した斑紋はミュー型擬態(有害なもの同士が似る擬態)として機能することが知られている。ミュー型擬態を示すテントウムシの斑紋には、黒地や赤地など様々な斑紋パターンが存在する。ヒメカメノコテントウやダンダラテントウ *Cheilomenes sexmaculata* には、同種でありながら黒地と赤地の斑紋多型が観察される。興味深いことに、これら 2 種の斑紋多型には、ナミテントウとは異なり少なくとも 2 つの遺伝子座が関与することが知られている。従って、これら 2 種において斑紋制御遺伝子が同定されれば、ナミテントウにおいて同定した斑紋プレパターン遺伝子である *pannier* 遺伝子以外に斑紋パターンを形成する上で重要な役割を果たす遺伝子の同定に繋がることが期待される。

まずヒメカメノコテントウを材料に Chromium Controller を利用した仮想的なロングリード解析を進めることで、これまでショートリード配列を元にアセンブルを行ってきたゲノムのアセンブリを改善するとともに、ヒメカメノコテントウのドラフトゲノム配列をリファレンス配列として flexible ddRAD-seq 法を用いた連鎖解析を行い、斑紋多型に関与する斑紋形成遺伝子座を同定することを目指した。その結果、ヒメカメノコテントウの斑紋型についてヘテロ個体を用いたところ、Scaffold の一部が繋がる結果が得られたものの、ホモ個体についてさらなる解析が必要となることが判明した。さらに、連鎖解析により絞り込んだ責任遺伝子座周辺に存在する遺伝子を標的とした larval RNAi スクリーニングを行った。しかしながら、現在までのところ、斑紋形成に影響を及ぼす遺伝子の同定には至っていない。

(2) ヘリグロテントウノミハムシのドラフトゲノム解読

テントウムシ上科のテントウムシとは上科レベルで異なるハムシ上科に属するヘリグロテントウノミハムシは、ナミテントウの二紋型(黒地に 2 つの赤紋)に極めて類似した斑紋パターンをもつことから、テントウムシに擬態していると考えられている。ヘリグロテントウノミハムシはテントウムシとは全く異なる系統であることから、ヘリグロテントウノミハムシがもつ類似した斑紋は、テントウムシとは独立に獲得されたものと考えられている。従って、ヘリグロテントウノミハムシは、テントウムシとは独立に獲得された擬態斑紋のモデルとして極めて有望である。

本研究課題の迅速な遂行にはゲノム情報が不可欠である。特筆すべき成果として、ヘリグロテントウノミハムシのドラフトゲノム解読に世界で初めて成功した。研究代表者と共同研究者らにより、ヘリグロテントウノミハムシ 1 匹から抽出した高分子ゲノムを用いて Chromium genome library (10x Genomics 社) を作製し、HiSeqX を利用することでシーケンシングデータを取得した。アセンブルの結果、スキマホール長やコンティグ長の N50 は比較的良好な結果が得られ、ゲノムサイズはおよそ約 382 Mb と推定された。しかしながら、フローサイトメトリーを用いてヘリグロテントウノミハムシのゲノムサイズを推定したところ約 720 Mb であることが判明した。したがって、Chromium によるドラフトゲノム解読は不完全である可能性が危惧されたため、Sequel IIe (PacBio 社) を用いて HiFi long read による高精度なゲノム解読を行った。その結果、N50 scaffold は 4.17 Mb と向上し、ゲノムサイズは 658 Mb と推定された。今後は、今回得られたゲノム情報をもとに、ヘリグロテントウノミハムシのドラフトゲノム解読に関する論文を纏める予定である。

また、ヘリグロテントウノミハムシゲノムに対して詳細なアノテーションデータを付与するため、胚、各幼虫期、各蛹期、および各蛹期の前翅、後翅、脚を材料に RNA-seq 解析を行った。その結果、網羅的な遺伝子探索に資する十分な総リード数が得られた。これらゲノムデータとトランスクリプトームデータを利用することで、擬態斑紋が形成される分子基盤の共通性・多様性を解明することを目指す。

(3) ヘリグロテントウノミハムシの斑紋形成遺伝子の同定

ヘリグロテントウノミハムシの前翅において斑紋形成に関与する遺伝子を網羅的に同定するため、次世代シーケンサーを用いた比較トランスクリプトーム解析を行った。材料には、ゲノムのアノテーション用に準備した蛹の前期、中期、後期の前翅原基と後翅原基を用いた。その結果、FDR 0.05 以下の条件で発現差のある遺伝子をリストアップすることに成功した。これら遺伝子について larval RNAi 法による機能解析スクリーニングを行ったところ、斑紋形成において重要な役割を果たす遺伝子を複数同定することに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Niimi, T. and Ando, T.	4. 巻 69
2. 論文標題 Evo-devo of wing colour patterns in beetles	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Curr. Opin. Genet. Dev.	6. 最初と最後の頁 97-102
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.gde.2021.02.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 新美輝幸	4. 巻 55
2. 論文標題 総論 テントウムシ研究の最前線	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 昆虫と自然	6. 最初と最後の頁 2-4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 安藤俊哉・新美輝幸	4. 巻 55
2. 論文標題 ナミテントウの斑紋形成メカニズム	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 昆虫と自然	6. 最初と最後の頁 5-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 新美輝幸・安藤俊哉・森田慎一	4. 巻 44
2. 論文標題 RNAi法で探る非モデル昆虫の形作りの仕組み	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本農薬学会誌	6. 最初と最後の頁 219-225
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ando, T., Nakamura, T. and 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
4. 発表年 2021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 2022年

1. 発表者名 新美輝幸
2. 発表標題 Evo-Devoで探る昆虫の多様性：テントウムシの斑紋とカブトムシの角
3. 学会等名 佐々木卓治先生 文化功労者顕彰記念オンライン講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ando T, Nakamura T, Niimi T
2. 発表標題 Phenotypic diversification through repeated chromosomal inversions at the key locus of color pattern formation in the harlequin ladybug
3. 学会等名 The 43rd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 新美輝幸
2. 発表標題 テントウムシの斑紋とカブトムシの角について
3. 学会等名 第7回コオロギ・オンライン研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ando, T. and Niimi, T.
2. 発表標題 Color pattern diversification through a 100 kb-scale pannier intron in ladybird beetles
3. 学会等名 52nd Annual meeting of Japanese Society of Developmental Biology (Sponsored by Asia Pacific Developmental Biology Network)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新美輝幸・安藤俊哉・森田慎一
2. 発表標題 昆虫の多様な形質をもたらす分子メカニズムを探る
3. 学会等名 第31回 高遠・分子細胞生物学シンポジウム「微生物・植物・動物・ヒトをつらぬくバイオロジー」（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新美輝幸・安藤俊哉・森田慎一
2. 発表標題 昆虫の模様と形の進化発生生物学
3. 学会等名 2019年度昆虫DNA研究会第16回研究集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Niimi, T.
2. 発表標題 Wing color prepattern gene in ladybird beetles
3. 学会等名 Memorial Conference for Dr. Goro Eguchi in Kumamoto (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新美輝幸
2. 発表標題 RNAi法を用いた非モデル昆虫研究の新展開
3. 学会等名 第31回 生物学技術研究会・第42回 生理学技術研究会 研修講演 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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
研究 分担者	安藤 俊哉 (Ando Toshiya) (10709744)	京都大学・白眉センター・特定准教授 (14301)	
研究 分担者	中村 太郎 (Nakamura Taro) (80548834)	基礎生物学研究所・進化発生研究部門・助教 (63904)	

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