

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22440

研究課題名（和文）コガネムシの構造色を生み出す分子メカニズムとその進化様式の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms underlying structural color of scarab beetles and its evolution

研究代表者

神村 学（Kamimura, Manabu）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・グループ長

研究者番号：60370649

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：コガネムシの1種ナミハナムグリの構造色発色に必須の遺伝子として同定したLCP1は、調べた全ての昆虫がよく似た配列の遺伝子を持っていた。LCP1のRNAiを蛹期に行ったところ、コガネムシ科では広く構造色発色に必須であるが、他の甲虫類では構造色に関係しないことがわかった。一方、ハムシ科、ゴミムシダマシ科など複数の科の種で、LCP1が大顎の着色に関与していることが分かり、元来は大顎の発育などに関わる遺伝子であるLCP1が、進化の過程でコガネムシでのみ構造色発色構造の構築という新規機能を獲得した可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

構造色はテレビの自然番組などでもよく紹介されるように幅広い興味を持たれている現象であるが、いまだにわかっていることは非常に少ない。本研究により、世界で初めて、生物がどのような遺伝子を使ってどのように構造色発色構造を作り、その構造色機構がどのように進化してきたかを明らかにする事ができた。本研究の成果は、安価で環境にやさしい生物材料を使い低エネルギー、CO2フリーで構造色素材や光学補償板などの光学素子を作製する新規の生物模倣技術の開発につながることも期待される。

研究成果の概要（英文）：All the insect species had the homolog of the LCP1 gene, which has been identified as the gene necessary for structural coloration in the flower chafer *Cetonia pilifera*. RNAi knockdown of LCP1 widely abolished the structural color of scarab beetles, but not in beetles of other families. On the other hand, LCP1 RNAi suppressed the coloration of the mandibles of various beetles. These results suggest scarab beetles coopted the LCP1 gene, which is originally involved in the developmental regulation of the mandibles, for the structural coloration.

研究分野：昆虫分子生物学

キーワード：構造色 コガネムシ 円偏光 進化 天然変成タンパク質

1. 研究開始当初の背景

構造色は光の波長程度のサイズの微細構造が作り出す色である。1990年代以降、様々な生物の構造色の物理的な特性が次々に明らかにされてきたが、構造色を作り出す分子生物学的機構、すなわちどの遺伝子にコードされるどんな構造・機能を持つタンパク質が働くことで発色に関わる微細構造が作られるかはほとんど分かっていない。

昆虫は構造色の宝庫であるが、中でもコガネムシは左円偏光のみからなる非常に珍しい構造色を持つ。申請者は最近になり、ハナムグリ亜科に属すコガネムシの1種ナミハナムグリの構造色発色に必須の遺伝子を発見し *LCP1* (*Left Circular Polarized Light 1*) と命名した。近縁の他のハナムグリ類でも *LCP1* の発現を抑えると構造色が完全に無くなることから、*LCP1* は少なくともハナムグリでは構造色発色するための鍵となる機能を担っていると考えられる。これは、全真核生物を通してはじめての構造色の生成そのものに関わる遺伝子の発見である。

2. 研究の目的

本研究では *LCP1* 遺伝子に注目し、様々な種類のコガネムシや他の昆虫で *LCP1* 遺伝子の有無や構造、機能を調べることにより、コガネムシの構造色を生み出す分子メカニズムを解明するとともに、その進化の道筋も探る。本研で得られる成果は、常温で安価にフォトニック結晶を合成する方法の開発などの応用研究につながることも期待できる。

3. 研究の方法

(1) 様々な虫からの *LCP1* cDNA 単離、構造比較

構造色を持たない種を含めて様々なコガネムシやコガネムシに近縁な甲虫類、さらに他目の昆虫で、*LCP1* ホモログ遺伝子を探索し、コードするタンパク質の構造を比較する。

(2) *LCP1* タンパク質の立体構造予測と機能解析

1) で得られた *LCP1* cDNA 情報に基づき、*LCP1* タンパク質のモチーフ探索、二次構造予測、立体構造予測などを行い、構造と機能を予測する。また、大腸菌などを用いて *LCP1* タンパク質を発現させ、キチン結合能について調べる。

(3) *LCP1* mRNA の発現動態の解析、RNAi による発現抑制の解析

1) で *LCP1* の cDNA が得られた虫について RNAi を行い、構造色や皮膚の構築への影響に注目しながら表現型を観察し、1)、2) の結果を考え合わせて、*LCP1* の分子進化がコガネムシの構造色の獲得にどう関係しているかを考察する。また、二本鎖 RNA の注射量を変えた RNAi により、構造色の波長特性や強度がどのように変化するかを調べる。

(4) RNAi により *LCP1* 遺伝子の発現を抑制した個体の組織学的解析

3) で作出した構造色を改変した虫の表皮の透過型電子顕微鏡観察により、構造色発色に関わる微細構造を同定するとともに、*LCP1* がその構造の構築にどのように関わるかを明らかにする。

4. 研究成果

(1) 様々な虫からの *LCP1* cDNA 単離、構造比較

コガネムシ類を含む各種の甲虫の蛹から RNA を抽出して RNA-seq 解析を行い、Trinity により得られたリードデータを de novo アセンブルして各種甲虫の蛹の時期の mRNA のレファレンス配列を得た。これらのレファレンス配列に対して、ナミハナムグリ *LCP1* タンパク質の全長配列を query にした Blast 解析 (tblastn) により *LCP1* 相同 cDNA 配列を探索したところ、調べた全ての甲虫から *LCP1* cDNA を見いだすことができた。さらに、NCBI に登録されている各種昆虫の TSA (Transcriptome Shotgun Assembly) や RNA-seq 解析の SRA (Sequence Read Archive) をダウンロードして、SRA については Trinity で de novo アセンブルした後に、Blast 解析を行うことにより、コウチュウ目以外の多くの昆虫からも *LCP1* によく似た cDNA 配列を得ることができた (図 1)。

ナミハナムグリの *LCP1* タンパク質配列は 706 アミノ酸からなり、4 残基のシステインを含む 3 つのリピートを持っていた。他の甲虫由来の *LCP1* 様タンパク質もほぼ同じサイズで、ナミハナムグリ *LCP1* 同様に 4 残基のシステインを含む 3 つのリピートを持っていた。これらのリピート配列間の相同性は高かったが、それ以外の領域の保存性は低かった。

コウチュウ目以外の完全変態昆虫の *LCP1* 様タンパク質の多くも、4 残基のシステインを含む 3 つのリピートを持っていたが、ハチ目ではリピートが 5 個、チョウ目とハエ目ではリピートが 2 個と、目によりリピート数に違いが見られた。不完全変態昆虫から同定された *LCP1* 様タンパク質のリピート数は全て 3 個であった。

以上の結果から、コガネムシ類のみならず調べた全ての昆虫が *LCP1* そのもの、もしくは *LCP1* とよく似た配列のタンパク質を持つこと、*LCP1* (様) タンパク質に含まれる 4 残基のシステインを含むリピートの数はデフォルトは 3 個であるが、進化の過程でハチ目では 5 個、チョウ目とハエ目では 2 個に変化したこと、リピート配列はよく保存されているが、それ以外の

領域の保存性は低いことが明らかになった。

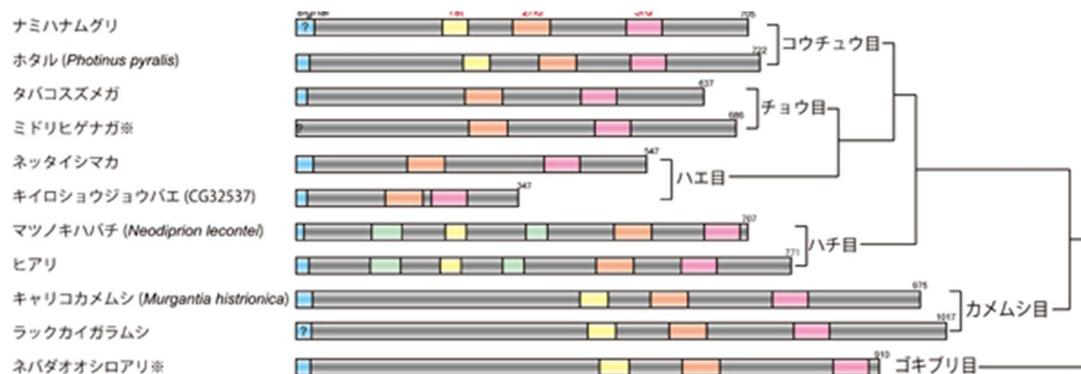


図1 様々な昆虫のLCP1タンパク質配列の模式図

(2) LCP1タンパク質の立体構造予測と機能解析

ナミハナムグリを含む様々な昆虫のLCP1(様)タンパク質配列がはっきりした構造を持つ(ordered)か持たない(disordered)かを、SPOT-DisorderやRaptorX Propertyなどのプログラムを使って調べたところ、調べた全てのプログラムが、N末端および4残基のシステインを含むリピート部位のみが構造を持ち、それ以外の領域は構造を持たないことを予測した。N末端領域は、SignalPによる解析から、分泌シグナルであることが予想された。

同様に、AlphaFold2プログラムで立体構造を予測したところ、リピート部位は3~4つストランドからなるシートで、4つのシステイン残基が2つのS-S結合を作ってストランド間を結びつける形になっていたが、リピート以外の部分についてははっきりした構造を予測しなかった。以上の結果から、LCP1(様)タンパク質は、大部分の領域がはっきりした構造を持たない分泌性の天然変性タンパク質(intrinsically disordered protein: IDP)であることが示唆された。

ナミハナムグリLCP1を大腸菌およびバキュロウイルスの系(AcNPVとSf21細胞を使用)で発現することを試みた。大腸菌による発現は難航したが、最終的に数個のリピートを含む部分配列を発現することに成功した。一般にIDPは大腸菌での発現が難しいことが知られており、この結果は、上述のLCP1がIDPという予想と符合する。また、この発現した組換えLCP1タンパク質をエピトープに使用してモルモットに免疫し、抗LCP1抗体を作成した。今後、この抗LCP1抗体はLCP1の機能や発現動態を解析するにあたり、力を発揮すると期待される。さらに、濃縮、精製した部分LCP1タンパク質をキチンと反応させたが、結合は観察されなかった。LCP1は他のタンパク質と相互作用することで機能を発揮するものと考えられる。

バキュロウイルス発現系では、発現量は多くものの、比較的長いタンパク質を培養上清中に発現することでできた。この結果は、LCP1が分泌タンパク質という予想と一致する。

(3) LCP1遺伝子のRNAi

ナミハナムグリを含む様々なコガネムシでRNAiによりLCP1 mRNAの発現を抑制したところ、調べた全てのコガネムシで構造色が消失した。この構造色の消失はハナムグリ亜科だけでなく、系統的に離れたヒメコガネやアオドウガネなどのスジコガネ亜科のコガネムシでも観察されたことから、LCP1遺伝子はハナムグリ類だけでなく、コガネムシ科で広く構造色を作り出すのに必要であることが確認できた。

LCP1遺伝子の発現量と構造色の強度や波長との関係性を調べるために、注射する2本鎖RNAの量を段階的に減らしながらナミハナムグリでRNAiを行った。ナミハナムグリの上面の色彩は、RNAiを行わない無処理個体では鮮やかな緑色であり、500 ng/個体程度の多量の2本鎖RNAを注射すると構造色が完全に消えてメラニンによる焦げ茶~黒色になるが、500 ng/個体から段階的に注射する量を減らすと、部分的に緑色をした部分が出現するようになった。この結果から、LCP1は構造色の波長特性には影響を与えず構造色の強度を制御する機能を持つことが示唆された。

また、構造色を持つ型(金緑色もしくは茶金色)と構造色を持たない型(黒色)の構造色多型を持つリュウキュウツヤハナムグリ奄美亜種でLCP1 mRNAの発現を調べたところ、構造色を持つ型では金緑色型でも茶金色型でも同様に強くLCP1を発現するのに対し、黒色型ではほとんど発現していなかった(図2)。また、LCP1のRNAiを行ったところ全ての個体で構造色がなくなり黒色型と同様に真っ黒になった(図2)。これらの結果より、黒色型ではLCP1遺伝子の発現が抑えられることにより構造色が現れないことが強く示唆されると同時に、LCP1は構造色の強度の制御には関わりますが、波長特性の制御には関係していないことが再び示唆された。これらの結果から、“強度波長独立制御モデル”と呼ぶべき構造色の多様性創出の新モデルを提案した。

LCP1遺伝子のRNAiを構造色を持つコガネムシ科以外の様々な甲虫で行ったが、構造色が影

響を受ける種はいなかった。この結果から、*LCP1*はコガネムシのみで構造色発色に関わる遺伝子であると考えられる。さらに、構造色以外の形質への影響についても調べたところ、ハムシ科、ゴミムシダマシ科など複数の科の種で、*LCP1*のRNAiにより大顎の着色が抑制されることが分かった。この結果から、*LCP1*は元来、大顎の発育などに関わる遺伝子であり、コガネムシの仲間でのみ、構造色発色構造の構築という新規機能を獲得した可能性が示唆された。

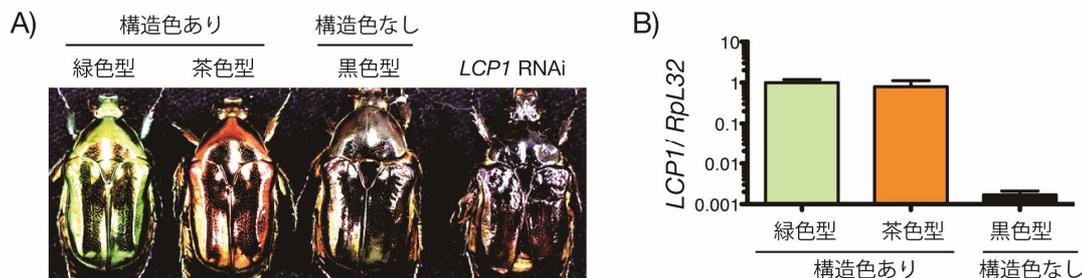


図2 リュウキュウツヤハナムグリ奄美亜種の構造色多型と *LCP1* 遺伝子発現の関係

A) 構造色を持つ型と持たない型が存在するが、*LCP1*のRNAiを行うと全ての個体で構造が消失する。B) 構造色が出現する直前の蛹の前翅からRNAを抽出してqRT-PCRを行い、*LCP1*遺伝子の発現を比較したところ、構造色を持つ型では強い発現が見られたが、持たない型ではほとんど発現していなかった。

(4) RNAiにより *LCP1* 遺伝子の発現を抑制した個体の組織学的解析

*LCP1*のRNAiを行い構造色を消失させたナミハナムグリの表皮の断面の微細構造を透過電子顕微鏡により観察したところ、通常構造色を持つコガネムシの表皮で観察される外原表皮(exocuticle)の微細な縞模様が消失していた。この縞模様はキチンのナノフィブリル層がらせん状に重層することにより生じるものと考えられており、また、コガネムシではこのナノフィブリルの左向きらせんにより左円偏光のみからなる構造色が生じると考えられている。本研究から、このらせん層が実際に構造色発色に関与していることが示されるとともに、*LCP1*タンパク質が構造色発色構造(らせん層)の形成に関わっていることが確認できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 神村 学
2. 発表標題 昆虫の構造色の研究：発色機構の解明と利用を目指して
3. 学会等名 令和 3 度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会：特別シンポジウム「データ解析を駆使した新しい昆虫研究展開」（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神村 学
2. 発表標題 コガネムシの円偏光選択的構造色：発色機構とその進化の解明を目指して
3. 学会等名 日本甲虫学会 2019年第3回例会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神村 学、伊藤 由果、和泉 隆誠、瀬筒 秀樹
2. 発表標題 様々な昆虫の表皮中メラニンの構造色増強機能 - 黒くなることでより鮮やかに
3. 学会等名 第64会日本応用動物昆虫学会大会
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	鈴木 倫太郎 (Suzuki Rintaro) (00399429)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・高度分析研究センター・上級研究員 (82111)	

6. 研究組織（つづき）

	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	石川 謙 (Ishikawa Ken) (10176159)	東京工業大学・物質理工学院・准教授 (12608)	
研究分担者	安藤 俊哉 (Ando Toshiya) (10709744)	基礎生物学研究所・進化発生研究部門・助教 (63904)	

	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
研究協力者	瀬筒 秀樹 (Sezutsu Hiedeki)		
研究協力者	横井 翔 (Yokoi Kakeru)		

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