

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25440220

研究課題名(和文) 昆虫腹脚の多様性と進化の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanisms for the evolution of insect prolegs

研究代表者

富田 秀一郎 (Tomita, Shuichiro)

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 新産業開拓研究領域・ユニット長

研究者番号：30360457

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：カイコを材料にして、これまでabd-Aの発現が腹脚の発生に必要であることを示した。本研究でカイコ胚でのDIIの発現を調べたところ、腹脚原基の先端部で発現していることを確認した。これはabd-Aによる抑制は受けないものの、DIIが発現することにより腹脚の発生が誘導される、というこれまでの説をおおむね裏付けているように思われた。そこで、腹脚形成へのDIIの関与を検討するために、DIIのノックダウンを行ったところ、正常な腹脚が発生し、先端構造が欠損することはなかった。これらの結果より腹脚の形成においても胸部体節同様の位置情報分子メカニズムを利用していると考えられ、腹脚は付属肢であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Proleg is abdominal appendage that develops in the larval abdomen of Lepidoptera, Mecoptera and Symphyta of Hymenoptera. The limited distribution of proleg-bearing species raises the question whether prolegs are homologous structures or convergent traits. To address this issue we analyzed the molecular mechanisms underlying the proleg development. DII expression is detected at their tips during embryonic development in *Bombyx mori*. The development of appendages in abdominal segments are suppressed by the expression of Ubx, abd-A and Abd-B. Strange enough, the abd-A null mutant strain of *Bombyx* fail to develop prolegs. Moreover, knocking-down DII made no effects on proleg development while gnathal appendages and thoracic legs are greatly reduced. Prolegs of *Athalia rosae* (Hymenoptera) are also segmented but lack crochets or any distal-most structures and no DII expression was detected. These results suggest prolegs of Lepidoptera and Hymenoptera are of different origin.

研究分野：発生生物学

キーワード：連続相同 カイコ カブラハバチ

1. 研究開始当初の背景

昆虫は節足動物を構成する綱の中でも最も成功した最大のグループであり、体制上の共通点として、胸部に3対の脚を持ち、腹部は無肢である。したがって、昆虫の付属肢の研究は専ら胸脚と翅に焦点を当てて行われてきた。その結果今日までに、付属肢の形成のためには、その原基の将来先端部になる領域での *Distal-less (Dll)* の発現が必要であることや、*Ubx*, *abd-A* といった腹部を規定するホメオティック遺伝子が *Dll* の発現に抑制的に働くことが知られている。また、付属肢の遠近軸に沿って *Dll*, *extradenticle (exd)*, *dachshund (dac)* が発現することが位置情報を与え、正しい構造が形成される¹⁾。一方、一部の昆虫は腹部にも付属肢を持つ。代表的なものは鱗翅目や長翅目それに膜翅目広腰亜目の幼虫であり、これらの芋虫型幼虫の腹部には腹脚と呼ばれる付属肢がある。鱗翅目では通常腹部第3～6体節に1対ずつ4対が標準的であり、膜翅目広腰亜目では腹部第2～9体節にわたって5対以上の腹脚を有するのが普通である。腹脚形成にどのような遺伝子がいかなる役割を果たしているのかについてはこれまでの研究は数少なく、鱗翅目では *abd-A* による *Dll* の抑制が解除されることにより、腹脚が形成されたと考えられてきた。しかし、研究代表者は *abd-A* はカイコ腹脚の発生にはむしろ必要であり、*Abd-B* が腹脚を抑制する機能を持っていることを示した²⁾。これらの遺伝子以外の、付属肢形成に通常重要な役割を果たす他の遺伝子群については、腹脚形成における機能やそもそも関与の有無でさえ明らかになっていないものがほとんどである。一方膜翅目では腹脚原基の先端部において *Dll* は発現しておらず、*decapentaplegic (dpp)* の発現が腹脚原基の近傍で誘導されることが研究分担者によって示唆されたのみであった³⁾。腹脚の構造は胸脚とは全く異なるため、その起源については古くから議論があり、付属肢とは異なる腹板からの二次的な伸長であるという説も有力であった。近年では腹脚は付属肢の原基に由来することにはほぼ異論が無いが、形態的には長翅目や膜翅目広腰亜目の腹脚は主脚でないことが示唆されているが^{4) 5)}、その精密な由来は依然謎のままである。また、3目の腹脚はそれぞれの系統で独立に獲得されたものと考えられている。このように節足動物の多様な付属肢がいかなる分子メカニズムに裏付けられつつ進化してきたのかを探るのには、昆虫の腹脚は好適な研究材料である。

2. 研究の目的

本研究は昆虫の基本体制を逸脱する腹脚の発生や形態形成の分子機構を解析することにより、付属肢の獲得および退化といった現象が、進化の過程でどのように起こったのかを明らかにすることを目的とする。実験材料

として、鱗翅目と膜翅目という系統上離れた関係にある、カイコおよびカブラハバチを使用し、付属肢形成に関与していると思われる候補遺伝子群の機能解析を自らが開発した最新の分子遺伝学ツールを駆使して遂行するとともに、新規遺伝子の単離も試みる。胸脚形成の分子メカニズムと比較することにより、腹脚形成の分子的基盤が、いかなる進化上のプロセスを経て確立されたのかという疑問に迫り、胸脚との連続相同性の検証を含め、その起源を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では腹脚の形成に関わる遺伝子群の同定とその役割の解明を目的としている。そのためまず、*Antp*, *Ubx*, *abd-A*, *Abd-B* などのホメオティック遺伝子やその下流で働き、腹脚形成により直接的に関与すると考えられる *Dll*, *exd*, *dac*, *dpp* などの候補遺伝子を同定し、発現パターンを *in situ* ハイブリダイゼーションおよび免疫組織化学法により、カイコ、カブラハバチの両種について明らかにした。また、腹脚形成が異常となるカイコ突然変異体を用いた解析を通じてホメオティック遺伝子の役割を明らかにした。これら遺伝子の腹脚形成に関わる機能解析は、*dsRNA* を注射する RNAi 法によるノックダウン、遺伝子組換えによる強制発現の双方の手法を用いて、もたらされる表現型および他の遺伝子発現への影響を解析した。

4. 研究成果

鱗翅目幼虫の腹部には腹脚と呼ばれる付属肢が存在しており、これは胸部に3対6本の脚を有するという昆虫の基本体制を逸脱している。一般的に昆虫の腹部に付属肢が存在しないのは、*Ubx* および *abd-A* が発現して *Distal-less (Dll)* の発現を抑制しているためだ、と考えられている。

(1) カイコにおける腹脚形成への *Dll* の関与

カイコ胚での *Dll* の発現を調べたところ、腹脚原基の先端部で発現していることを確認した。また、*wg* および *dpp* も胸脚と類似した空間的発現パターンを示し、両者の発現の重なる領域で *Dll* が誘導されていると考えられた。すなわち腹部体節においても胸部体節同様の位置情報分子メカニズムを利用して腹脚が形成されていると考えられ、腹脚は付属肢であることが示唆される (図1、2)。



図1 *Dll* の発現領域

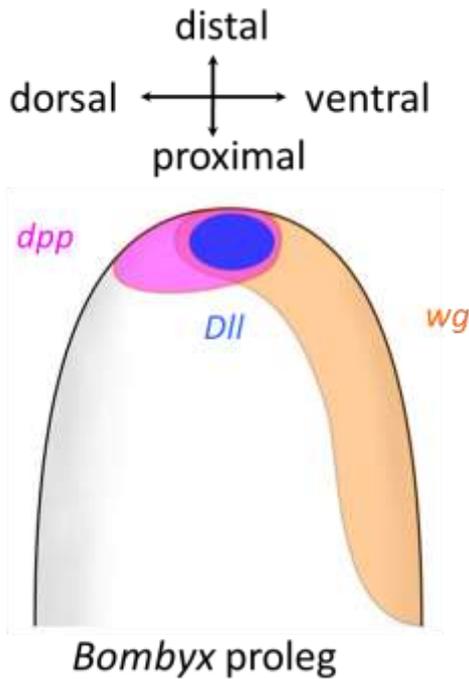


図2 *Dll*, *dpp*, *wg* の発現領域

また、腹脚形成への *Dll* の関与を検討するために、*Dll* のノックダウンを行ったところ、正常な腹脚が発生し、先端構造が欠損することはなかった（図3）。これらの結果より、*Dll* は腹脚原基で発現してはいるが腹脚の形成には必要ないことが示唆された。また、*Dll* の発現誘導はこの位置情報により行われるが、実際の腹脚形成には寄与していないと思われた。一方胸脚や顎部付属肢の形成不全といった *Dll* ノックダウンに特異的な表現型を示した個体においても *Dll* の発現が完全にはなくなっていないことから、腹脚形成への影響が見られなかったのは dsRNA 注射によるノックダウン効果が時間とともに弱くなることと、腹脚は頭部や胸部の付属肢よりは遅れて形成されるヘテロクロニーとの組み合わせで起こっている可能性が捨てきれないことが分かった。



図3 *Dll* ノックダウンの表現型

(2) カイコ腹脚形成におけるホメオティック遺伝子群の機能解析

カイコ腹脚の形成過程におけるホメオティック遺伝子群の発現を観察するため、付属肢原基が出現する前後の発生ステージの胚を材料として、*Antp*, *Ubx*, *Abd-A*, *Abd-B* に対する特異抗体による免疫組織化学染色により、これらの発現を調査した。その結果、*Ubx* タンパク質と *Abd-A* タンパク質は排他的に発現すること、腹脚原基領域で *Abd-A* タンパク質が強く発現することが明らかとなった。カイコにおいては腹脚の形成が異常になるホメオティック突然変異系統が数多く知られており、そのほとんどが第6連関群の *E* 偽対立遺伝子群に属する。これらの変異体のうち、腹部第2体節(A2)に過剰腹脚を発現する *E^{Nc}*, *E^{Kp}*, *SI-V* 系統について、同様に免疫組織化学染色を行ったところ、A2の付属肢原基領域において *Abd-A* タンパク質の異常な発現が見られ、同領域で正常系統では発現している *Ubx* タンパク質の発現が抑制されていた（図4 A, B, C）。このことより、腹脚の形成は *Abd-A* の発現によって進行することが明らかとなった。

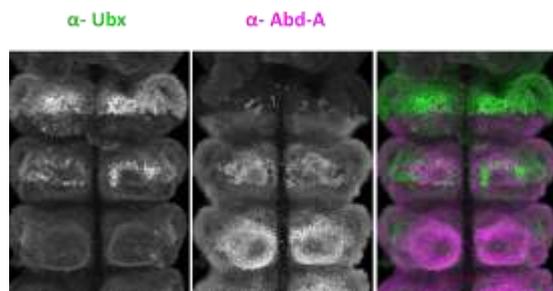


図4 A *E^{Nc}* 胚における *Ubx*, *Abd-A* タンパク質の分布

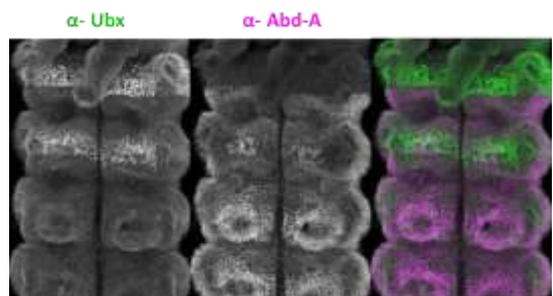


図4 B *E^{Kp}* 胚における *Ubx*, *Abd-A* タンパク質の分布

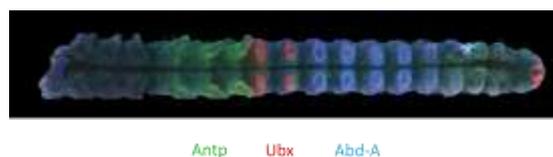


図4 C 正常胚におけるホメオティック遺伝子産物の分布

カイコ腹脚形成に関する遺伝子の機能解析を行うために上述の遺伝子群について単

独の RNAi に加え、*Ubx* と *abd-A* の 2 種同時注射によるダブルノックダウンを行った。その結果すべての腹部体節に脚様の構造が現れた。第 1～6 体節には胸脚様の構造が、第 7 節以降には胸脚と腹脚の中間的な構造が観察された。また、この処理によって *Abd-B* の発現は影響を受けなかった。これは *abd-A* が胸脚様の構造の抑制と腹脚の発生という 2 つの役割を持つことを示唆する。

(3) カブラハバチ腹脚形成の分子機構

カブラハバチでは RNA-Seq のデータを元に *Antp*, *Ubx*, *abd-A* の遺伝子配列を取得し、これらの cDNA をクローン化した。それらを利用して *in situ* ハイブリダイゼーションにより、個々の遺伝子の発現パターンを発生ステージを追って明らかにした。

これ遺伝子の腹脚形成への関与を調査するため、*abd-A* の発現を RNAi でノックダウンしたところ、腹脚形成が抑制されカイコの *abd-A* ノックダウンと同様の表現型となった。また *Dll* のノックダウンでは、これもカイコと同様に腹脚形成に影響はなかった。

<引用文献>

- 1) Kojima, T. (2004) The mechanism of *Drosophila* leg development along the proximodistal axis. *Develop. Growth Differ.* **46**, 115-129.
- 2) Tomita, S. and Kikuchi, A. (2009) *Abd-B* suppresses lepidopteran proleg development in posterior abdomen. *Dev. Biol.* **328**, 403-409.
- 3) Oka, K., Yoshiyama, N., Tojo, K., Machida, R. and Hatakeyama, M. (2010) Characterization of abdominal appendages in the sawfly, *Athalia rosae* (Hymenoptera), by morphological and gene expression analyses. *Dev. Genes Evol.* **220**, 53-59.
- 4) Yue, C. and Hua, B. (2010) Are abdominal prolegs serially homologous with the thoracic legs in panorpidae (Insecta: Mecoptera)? embryological evidence. *J. Morphol.* **271**: 1366-1373.
- 5) Bitsch, J. (2012) The controversial origin of the abdominal appendage-like processes in immature insects: Are they true segmental appendages or secondary outgrowths? *J. Morphol.* **273**: 919-931

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 4 件)

- ① Tomita S. Regulatory Role of Homeotic Genes in Lepidopteran Proleg Development. 51st Annual Meeting of The Arthropodan Embryological Society of Japan. 2015. 6. 13 Fukushima (Japan)

- ② Hatakeyama M. Roles of homeobox genes in proleg development in the sawfly, *Athalia rosae ruficornis*. 51st Annual Meeting of The Arthropodan Embryological Society of Japan. 2015. 6. 13 Fukushima (Japan)

- ③ Tomita S. and Hatakeyama M. Developmental and evolutionary origin of lepidopteran proleg. 9th International Workshop on the Molecular Biology and Genetics of the Lepidoptera. 2014. 8. 20 Kolimpali Kolympari (Greece)

- ④ 富田秀一郎. 鱗翅目幼虫の腹脚はどこから来たか. 日本進化学会第 15 回大会シンポジウム (招待講演) 2013. 8. 28 筑波大学 (茨城県・つくば市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富田 秀一郎 (Tomita, Shuichiro)

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 新産業開拓研究領域・ユニット長

研究者番号：30360457

(2) 研究分担者

畠山正統 (Hatakeyama, Masatsugu)

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 遺伝子利用基盤研究領域・上級研究員

研究者番号：50281142

(平成 26 年度まで研究分担者)