

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14443

研究課題名(和文) 武器甲虫をモデルとした表現型可塑性のエピゲノム制御機構の解析

研究課題名(英文) Control of phenotypic plasticity in armed hone beetle.

研究代表者

太田 邦史(OHTA, Kunihiro)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号：90211789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：同じゲノムの個体が種々の表現型を示す表現型の可塑性は、生物全体に見られる現象であるが、その機構はわかっていない。本研究では、表現型可塑性が武器形質に見られる昆虫オオツノコクヌストモドキを用いて、発生時の栄養と武器形質を結びつけるエピゲノム分子機構を明らかにした。RNA-seqにより未同定のエピゲノム因子を多数同定し、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)などの遺伝子をノックダウンしたところ、大顎形質が特異的にHDAC摂動の影響を受けることを見出した。また、HDAC摂動により翅では大顎と反対方向にサイズ変化が生じることも明らかになった。以上から表現型可塑性にはエピゲノム制御が重要なことがわかった。

研究成果の概要(英文)：Nutritional conditions during early development influence the plastic expression of adult phenotypes. Because heightened nutrition sensitivity often characterizes the development of exaggerated traits, there should be molecular mechanisms underlying trait-specific variability. This study reveals the molecular mechanisms underlying the expression of nutrition-sensitive mandibles in the beetle *Gnatocerus cornutus*. We found that epigenetic regulators, such as histone deacetylases (HDACs) and polycomb group (PcG) proteins, contribute specifically to the plastic expression of male mandibles, with little contribution to other body modules. In addition, HDAC1 and HDAC3 perturbation resulted in opposite phenotypic effects on mandible and wing modules. Our findings provide molecular evidence of a link between distinct epigenetic modifications and module-specific phenotypic plasticity of exaggerated traits.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：エピゲノム 栄養 表現型可塑性 形態形成

1. 研究開始当初の背景

同一種の個体は、ほぼ同一の DNA を持ちながらも、環境に応じて多様な表現型を示す(表現型の可塑性)。これにより集団として環境変動に対する頑強性(ロバストネス)を獲得し、適応度を高めると考えられる。クワガタなどの武器甲虫も、表現型の可塑性が顕著に現れ、幼虫時に栄養環境が良いと、大顎のサイズが相対的に大きくなる(Emlen et al., *Science* 2012) (図 1)。



図 1 甲虫の表現型可塑性(右ほど高栄養)

大顎サイズの決定機構はよくわかっていないが、エピゲノム制御が重要であると考えられる。エピゲノムを介した形態形成に対する後成的な影響は哺乳類にも見られ、雄マウスでメチル基供与体である葉酸が不足すると、精子の DNA メチル化異常を介して児の形態形成に影響が生じる(Lambrot et al., *Nature Com.* 2013)。

太田らは、エピゲノム修飾と非コード RNA・ゲノム動態に関する研究を行ってきた(Hirota et al., *Nature* 2008 など)。岡田らはかねてから昆虫の武器形成に関する表現型の可塑性に着目し、小型武器昆虫オオツノコクヌストモドキを用いた独自の実験系を構築してきた(Okada et al. *Evol. & Dev.* 2012; *Anim Behav.* 2012)。

2. 研究の目的

発生時の栄養の後成的な影響は、成人後の疾患リスクなど近年医学的にも重要性が指摘されている(DOHaD 仮説)。本研究では、武器甲虫をモデルとして、発生期の栄養と成長後の表現型を結びつけるエピゲノム因子と、その上流・下流因子の探索を目標とした。これにより、複雑で多様な表現型の獲得にエピゲノム制御がどのように関わるのか、明らかにしようといわれた。

3. 研究の方法

小型武器昆虫であるオオツノコクヌストモドキを用いて、エピゲノムと表現可塑性の関係を解析する。まず、幼虫期、蛹期、成虫期の個体から RNA を抽出し、*de novo* RNA-Seq を実施する。得られた配列をもとに既存の配列情報に対して相同性検索を行い、ヒストン脱アセチル化酵素や DNA メチル化酵素、ポリコーム群因子等のエピゲノム関連遺伝子やインスリン経路関連遺伝子を網羅的に同定する。また、新規にゲノム配列のドラフトを作成する。候補遺伝子について幼虫個体への微量注入により RNAi を実施する。遺伝子発現に対するノ

ックダウン効果を確認するとともに、走査型電子顕微鏡や測定顕微鏡を用いて成虫の形態(大顎の体幅に対する相対的な比率など)を定量的に解析する。効果が見られた場合は、RNAi 効果の発生時期依存性などを調べ、それら因子の作用順序や経路を明らかにする。

4. 研究成果

(1) *de novo* RNA-Seq による発現遺伝子群のリストアップ

幼虫期、蛹期、成虫期の個体頭部から全 RNA を抽出し、polyA⁺RNA を精製してライブラリを作製し、illumina HiSeq による *de novo* RNA-Seq を実施した。得られたリード(43.5Gbp)をアッセンブルして contig を作製し、最終的に 4,287 遺伝子に注釈情報を付加した。さらに、類縁種コクヌストモドキの既存のゲノムデータベース(*Nature* 2008)を用いて相同性検索を行い、ヒストン脱アセチル化酵素、DNA メチル化酵素、ポリコーム群など、60 個以上のエピゲノム関連遺伝子の同定に成功した。

(2) 網羅的 RNAi による表現型解析

上記で抽出されたエピゲノム関連遺伝子について、幼虫への dsRNA の顕微注射による網羅的 RNAi ノックダウン実験を実施した。その結果、適量の dsRNA を注入した場合、ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC1 または HDAC3 のノックダウンにより、蛹または成虫における大顎が、それぞれ矮小化または肥大することがわかった(図 2)。また、抑制的発現状態を維持するエピゲノム固定化因子であるポリコーム群因子や、多細胞生物で共通する上流栄養シグナル経路の主要因子とされるインスリン様成長因子受容体のノックダウンでも、大顎の矮小化が確認された(図 2)。一方で DNA メチル化酵素などのノックダウンの影響は見られなかった。

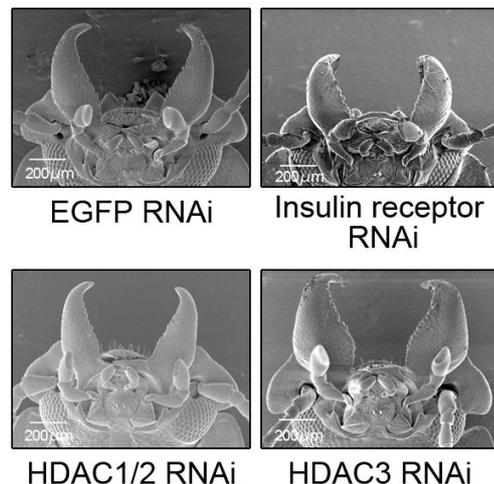


図 2 RNAi ノックダウン実験

さらに、より初期の幼虫期での HDAC1 と HDAC3 の RNAi 実験を行ったところ、やはり大顎に特異的に効果が生じることが確認された。すなわち、エピゲノム制御の影響は、栄養依存的な表現型可塑性が最も強く表れる武器形質において、最も顕著に生じることが明らかになった。

次に、大顎だけでなく、生殖器や翅、脚などのボディーパーツの計測を行い、共分散解析、主成分分析などの多変量統計的解析を実施した。その結果、HDAC 活性の摂動により、最も大顎に大きな変動が生じること、また翅のサイズに関しては大顎の変化と逆相関する方向に変化が生じることが明らかになった(図 3)。

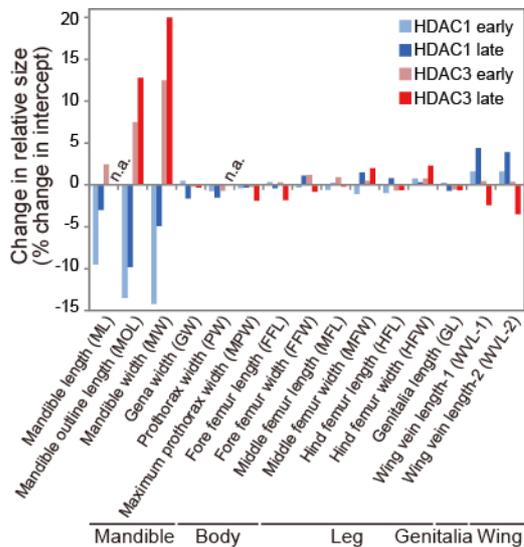


図 3 HDAC 活性の摂動によるボディーパーツのサイズ変化

一般的に甲虫の翅のサイズ決定については、幼虫期の栄養依存性が大顎と逆であることが明らかになっているが、本研究ではこれとよく合致した観察結果が得られたことになる。つまり、栄養依存性の強い器官の形態形成は、エピゲノム制御によって支配されている可能性が強く示唆された(図 4)。

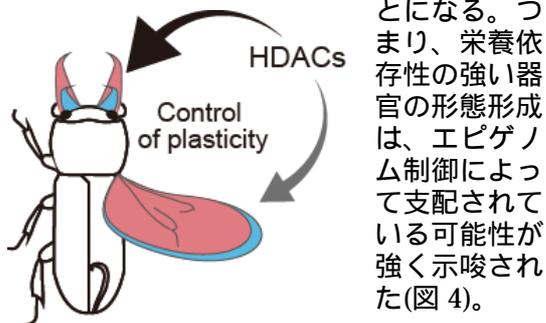


図 4 栄養依存的器官形成とエピゲノム制御

(3) まとめ

本研究の成果により、発生期の栄養環境に依存して大きく表現型が変化する形質では、異なる HDAC 分子の分業により、正負両方向に表現型のゆらぎが生じていることがはじめて明らかになった。生物個体の幹細胞などでも、エピゲノムや発現状態の振動やゆらぎが存在し、これにより多様な

表現型が発現することが示唆されている。これらの事例でも、HDAC などのエピゲノム因子により、可塑的な遺伝子調節が維持されている可能性がある。

近年、発生初期の栄養状態が、成長後の疾患リスクに深刻な影響を及ぼすことが、欧州で行われたヒトのコホート解析で明らかにされている。発生期の栄養がエピゲノムを介して、成長後の個体表現型に影響を及ぼす機構についてはまだよくわかっていないが、本研究により分子レベルの解明の糸口がつかめるのではないかと期待される。

なお、この研究成果は米国アカデミー紀要 *PNAS* 誌 (Ozawa et al., 2016) で発表され、発表内容は新聞等や *Science* 誌でもハイライトされ、社会的にも関心を集めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 15 件)

- Ozawa T., Mizuhara T., Arata M., Shimada M., Niimi T., Okada K., Okada Y., Ohta K. Histone deacetylases control module-specific phenotypic plasticity in beetle weapons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 113(52): 15042-15047 (2016) (査読有)
- Hashimoto K., Kurosawa K., Murayama A., Seo H., Ohta K. B cell-based seamless engineering of antibody Fc domains. *PLoS One*, 11: e0167232. (2016) doi:10.1371/journal.pone.0167232 (査読有)
- Takemata N., Ohta K. Role of non-coding RNA transcription around gene regulatory elements in transcription factor recruitment. *RNA Biology*, 14:1-5 (2016) (査読有)
- Hirata Y., Oda A., Ohta K., Aihara K. Three-dimensional reconstruction of single-cell chromosome structure using recurrence plots. *Scientific Reports*, 6: 34982 (2016) (査読有)
- Miki A., Galipon J., Sawai S., Inada T., Ohta K. RNA decay systems enhance reciprocal switching of sense and antisense transcripts in response to glucose starvation. *Genes Cells*, 21: 1276-1289 doi: 10.1111/gtc.12443 (2016) (査読有)
- Kumakura N., Otsuki H., Ito M., Nomoto M., Tada Y., Ohta K., Watanabe Y. Arabidopsis AtRRP44 has ribonuclease activity that is required for cell viability. *Plant Biotechnol.* 33: 77-85 (2016) (査読有)
- Takemata N., Oda A., Yamada T., et al.

- (Ohta K., 10 名中 10 番目) Local potentiation of stress-responsive genes by upstream noncoding transcription. **Nucleic Acids Res.** 印刷中 (2016) doi: 10.1093/nar/gkw142 (査読有)
8. Mitsumori R., Ohashi T., Kugou K., Ichino A., Taniguchi K., Ohta K., Uchida H., Oki M. Analysis of novel Sir3 binding regions in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biochem.** 160:11-17 (2016) doi:10.1093/jb/mvw021 (査読有)
9. Tashiro S. *et al.* (Ohta K., 12 名中 9 番目), Shugoshin forms a specialized chromatin domain at subtelomeres that regulates transcription and replication timing. **Nature Commun.** (2016) 10393 doi: 10.1038/ncomms10393 (査読有)
10. Guy AT. *et al.* (Ohta K., 14 名中 10 番目) Glycerophospholipid regulation of modality-specific sensory axon guidance in the spinal cord. **Science** (2015) 349:974-977, doi: 10.1126/science.aab3516 (査読有)
11. Oda A., Takemata N., Hirata Y., Miyoshi T., Suzuki Y., Sugano S., Ohta K. Dynamic transition of transcription and chromatin landscape during fission yeast adaptation to glucose starvation. **Genes Cells.** (2015) 20: 392-407, doi: 10.1111/gtc.1222 (査読有)
12. Asada R., Takemata N., Hoffman C., Ohta K., Hirota K. Antagonistic controls of chromatin and mRNA start site selection by Tup family corepressors and the CCAAT-binding factor. **Mol. Cell. Biol.** (2015) 35: 847-855, doi: 10.1128/MCB.00924-14. (査読有)
13. Okada Y., Sasaki K, Miyazaki S, Shimoji H, Tsuji K, Miura T. Social dominance and reproductive differentiation mediated by the dopaminergic signaling in a queenless ant. **J. Exp. Biol.** (2015) 218: 1091-1098 doi:10.1242/jeb.118414 (査読有)
14. Ozawa T, Ohta K., Shimada M, Okada K, Okada Y. Environmental factors that affect pupation decision in the horned flour beetle *Gnatocerus cornutus*. **Zool. Sci.** (2015) 32: 183-187 doi: 10.2108/zs140203. (査読有)
15. Suzaki Y, Katsuki M, Miyatake T, Okada Y. Relationships among male sexually selected traits in the bean bug *Riptortus pedestris* (Heteroptera: Alydidae). **Entom. Sci.** (2015) 18: 278-282. doi:10.1111/ens.12114(査読有)
- 〔学会発表〕(計 4 件)
1. 岡田泰和ら 武器サイズ変異を生み出すゲノム機構 第 64 回日本生態学会大会 2017 年 3 月 14 日~2017 年 3 月 19 日 早稲田大学(東京都新宿区)
 2. 小澤高嶺ら HDAC を介した甲虫武器形質の表現型 第 34 回染色体ワークショップ・第 15 回核ダイナミクス研究会 2017 年 1 月 11 日~2017 年 1 月 13 日かずさアカデミアホール(千葉県木更津市)
 3. Yasukazu Okada Epigenetic regulation controls the developmental plasticity of ornaments in a broad-horned flour beetle. The 22nd International Congress of Zoology (国際学会) 2016 年 11 月 14 日~2016 年 11 月 19 日 OIST Conference Center (沖縄県国頭郡)(招待講演)
 4. 太田邦史 そっくりな親子と似ていない親子、その分かれ目は ~ 人類の成長と繁栄はその多様性のなかにある ~ 公益財団法人日本包装技術協会中部支部第 53 回定時総会、記念講演会 2016 年 6 月 10 日ホテルキャッスルプラザ(愛知県名古屋市)(招待講演)
- 〔図書〕(計 1 件)
1. 小川(西秋)葉子、太田邦史「生命デザイン学入門」岩波ジュニア新書 224 (2016)
- 〔その他〕
ホームページ等
<http://www.ohta-lab.c.u-tokyo.ac.jp/>
6. 研究組織
- (1)研究代表者
太田 邦史 (OHTA, Kunihiro)
東京大学・大学院総合文化研究科・教授
研究者番号: 90211789
 - (2)研究分担者
岡田 泰和 (OKADA, Yasukazu)
東京大学・大学院総合文化研究科・助教
研究者番号: 10638597