

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H02596

研究課題名(和文) 昆虫翅の起源と多様化の進化機構の解明とその応用

研究課題名(英文) Elucidation of the evolutionary mechanism behind the origin and diversification of insect wings and its application

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) 31,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、世界に先駆けて同定した翅進化の鍵となる遺伝子を解析ツールとして、最新の遺伝子機能解析技術や次世代シーケンス技術の導入によるこれまでにないアプローチから、昆虫翅の多様性獲得に寄与した分子メカニズムの理解およびその応用を目指した。その結果、マダラシミのゲノム概要配列を解読し、無翅昆虫類において世界で初めてCRISPR/Cas9を利用したゲノム編集法の確立に成功した。さらに、生物農薬としてより有用と考えられる体の保護の役割を果たす鞘翅を保持したまま飛ぶことのできないナミントウの作出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって得られる成果から、昆虫の独自性の理解に留まらず、広い生物種で認められる共通したボディプランの分子機構からいかに多様な形態が形成されるかという一般生物学に還元できる根本的な問題について多くの理解が得られることが期待される。

本研究では、基礎的な研究にとどまらず、本研究から得られた知見を活用して、ゲノム編集やRNAi法を利用した新規天敵昆虫の開発に資する。この技術は、従来にはない新規の生物農薬の開発に有用な基盤となることにとどまらず、様々な人為的な改変有用昆虫への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：This research aims to understand the molecular mechanisms underlying insect wing diversity. This was done by utilizing a new approach of introducing the latest gene function analysis technology and next-generation sequencing technology, while using genes that are the key to wing evolution. We targeted its application based on the results of our research. As a result, we have succeeded in the draft genome sequencing, as well as in establishing CRISPR/Cas9-based heritable targeted mutagenesis in the firebrat, *Thermobia domestica*. In addition, we succeeded in producing a novel winged flightless ladybird beetle based on the RNAi method, which is considered to be more useful in the development of biopesticides.

研究分野：分子昆虫学

キーワード：翅 起源 多様性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 昆虫は様々な環境に適応し、極めて多様な翅を發展させてきた。翅の獲得および多様化は、昆虫がこの地球上で最も繁栄する生物群となる大きな要因となっている。手や足と独立に存在する翅は他の生物にはない昆虫固有の特徴であり、昆虫のみが進化の過程で独自に獲得した新奇形態である。昆虫は翅の獲得後、極めて多様性に富む翅を進化させてきた。翅形成の分子機構は、キイロショウジョウバエを用いた研究により詳細に解明されつつある。一方、多くの昆虫の翅は、ショウジョウバエにない興味深い形質をもつが、それら形質形成の分子機構に関してはほとんど不明である。

(2) 翅の起源に関する仮説は2世紀も前から様々なものが提唱されてきたが、翅がどのような構造・器官に由来するかについての統一見解は未だ得られていない。この難問にアプローチするために着目したのは、キイロショウジョウバエにおいて翅形成のマスター遺伝子として同定された *vestigial (vg)* である (Williams et al., 1991; Kim et al., 1996)。*vg* は驚くべきことに、ショウジョウバエ属内においてもアミノ酸配列の相同性が低く、他の昆虫からのクローニングは不可能とされていた。しかしながら研究代表者らは PCR 法の工夫により、世界で初めてショウジョウバエ以外の昆虫から *vg* のクローニングに成功した (Ohde et al., 2009)。さらに、進化の過程で翅を獲得することがなかった祖先的な無翅昆虫にも *vg* が存在することを明らかにした (Niwa et al., 2010)。

(3) 研究代表者らは、*vg* の予想外の機能を発見した。昆虫翅の進化のシナリオとして、全ての体節において翅様の体側方突出構造が獲得された後、中胸と後胸でのみ飛翔機能を有する翅へと進化し、その他の体節では翅形成が抑制されて、現存有翅昆虫へと進化したと従来考えられてきた。ところが、ゴミムシダマシを用い *vg* 及び *Hox* 遺伝子を詳細に解析することにより、上述の定説を覆し、前胸や腹部に翅の連続相同構造が存在することを世界で初めて示すことに成功した (Ohde et al., 2013)。この結果に基づき、翅連続相同構造の改変は昆虫の多様な形態を生み出すソースとなることを提案した。以上のように、*vg* は翅の起源を探るツールのみならず、翅の多様化に貢献した進化プロセスを理解するツールとしても有用であることが明らかとなった。

(4) 研究代表者らは、非モデル昆虫において分子レベルでの解析に必要な形質転換体 (Kuwayama et al., 2006, 2014; Hara et al., 2008, 2009; Masumoto et al., 2012) や larval RNAi 法 (幼虫体への二本鎖 RNA の注射による RNAi 法) を用いた遺伝子機能解析系を確立してきた (Niimi et al., 2005; Ohde et al., 2009a, 2011)。さらに、ナミテントウにおいてゲノム編集技術の確立に成功した (Hatakeyama et al., 2016)。従って、本研究ではこれまでに行われなかった斬新な切り口からの研究展開が可能になった。

(5) 環境に優しい生物農薬として天敵昆虫は世界各地で使用されているが、捕食性天敵昆虫としてテントウムシを利用する場合、飛翔による成虫の分散が害虫防除効果を減少させることが問題となっていた。研究代表者らは、larval RNAi 法を用いて翅形成マスター遺伝子の機能阻害を誘導することにより、翅形成のみが特異的に阻害された翅なしテントウムシの作出に成功した (Ohde et al., 2009a; 特許第 4911731 号)。さらに、二本鎖 RNA の摂食による RNAi 法を確立し、新規害虫防除法を開発した (特許第 5305489 号)。本研究では、得られた成果を新規天敵昆虫の開発に資する。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究は、研究代表者らが世界に先駆けて、非モデル昆虫において同定した翅形成マスター遺伝子及び鞘翅形成の鍵となる遺伝子をツールに、ゲノム編集や次世代シーケンス技術の導入によるこれまでにないアプローチから、昆虫翅の起源と多様性獲得に寄与した進化プロセスの理解とその応用を目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 供試昆虫

無変態昆虫：マダラシミ (*Thermobia domestica*; 総尾目)

完全変態昆虫：ナミテントウ (*Harmonia axyridis*; 鞘翅目)

#### (2) ゲノム DNA 抽出

#### (3) 遺伝子クローニング

#### (4) 胚へのマイクロインジェクション

#### (5) PCR 法を用いたジェノタイピング

#### (6) CRISPR/Cas9 を利用したゲノム編集法

#### (7) 比較トランスクリプトーム解析

#### (8) larval RNAi 法

### 4. 研究成果

(1) 本研究課題の迅速な遂行にはゲノム情報が不可欠であった。そこで、翅起源の解明のモデルとして有望な原始的な無翅昆虫であるマダラシミのドラフトゲノム情報を得るため、次世代シーケンサーを用いて解析した。その結果、マダラシミのゲノムは巨大であるにもかかわらず、スキャホールド長やコンティグ長の N50 は比較的良好な結果が得られ、ゲノム領域のクローニングが簡単に遂行できるようになった。さらに、今回得られたゲノム情報を利用することにより、マダラシミにおけるゲノム編集が大いに進展した。

(2) 本研究課題の迅速な遂行には CRISPR/Cas9 を利用したゲノム解析が不可欠である。そこで、翅起源の解明のモデルとして有望な原始的な無翅昆虫であるマダラシミにおいて、CRISPR/Cas9 を利用したゲノム編集法の確立を試みた。マダラシミの全発育ステージ（幼虫期および成虫期）にわたって表現型の観察が容易であり、かつ全身性の表現型が得られる候補遺伝子についてガイド RNA を作製し、細胞性胞胚期より以前の胚にマイクロインジェクションを行った。その結果、G0 世代において、比較的高い効率で表現型が観察された。つぎに、全身性の表現型が観察された個体から得られた G1 世代において、PCR 法を用いたジェノタイピングを行った。その結果、非常に高い効率で候補遺伝子のゲノムに変異が生じていることが明らかとなった。つづいて、候補遺伝子に変異が生じた G1 世代を交配したところ、G2 世代でロックアウト個体を得ることができた。したがって、無翅昆虫類において世界で初めて CRISPR/Cas9 を利用したゲノム編集法の確立に成功した。今後、今回確立したゲノム編集技術を用いて、CRISPR/Cas9 を利用した GFP ノックインにより翅形成のマスター遺伝子 *vestigial* のレポーター系統を作出して、エンハンサー解析を進める予定である。

(3) 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により、ナミテントウの鞘翅形成過程で高発現する転写因子およびシグナル伝達分子をコードする遺伝子をそれぞれ少なくとも 16 個と 7 個を見出すことに成功した。これら遺伝子は、鞘翅の進化を考える上で鍵となる重要な発見となることが大いに期待される。

(4) 研究代表者はこれまでに RNAi 法を利用した新規生物農薬の開発（特許第 4911731 号）を行ってきたが、ナミテントウにおいて前翅と後翅の差異をもたらす遺伝子に着目したことにより、生物農薬としてより有用と考えられる体の保護の役割を果たす鞘翅を保持したまま飛ぶことのできないナミテントウの作出に成功した。今後、ゲノム編集の利用により、安価で量産可能となる有用な生物農薬の系統の樹立への道が拓けた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Tsuji, T., Gotoh, H., Morita, S. Hirata, J., Minakuchi, Y., Yaginuma, T., Toyoda, A. and Niimi, T.	4. 巻 35
2. 論文標題 Molecular characterization of eye pigmentation-related ABC transporter genes in the ladybird beetle <i>Harmonia axyridis</i> reveals striking gene duplication of the white gene.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Zool. Sci.	6. 最初と最後の頁 260-267
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2108/zs170166	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 Kawaguchi, H. and Niimi, T.	4. 巻 87
2. 論文標題 A method for cryopreservation of ovaries of the ladybird beetle, <i>Harmonia axyridis</i> .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Insect Biotechnol. Sericol.	6. 最初と最後の頁 35-44
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11416/jibs.87.2_035	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 Ohde, T., Takehana, Y., Shiotsuki, T. and Niimi, T.	4. 巻 47
2. 論文標題 CRISPR/Cas9-based heritable targeted mutagenesis in <i>Thermobia domestica</i> : A genetic tool in an apterygote development model of wing evolution.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Arthropod Struct. Dev.	6. 最初と最後の頁 362-369
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.asd.2018.06.003	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 -

〔学会発表〕 計28件（うち招待講演 7件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 千頭康彦・新美輝幸	
2. 発表標題 マダラシミ <i>Thermobia domestica</i> における性決定関連遺伝子 <i>doublesex</i> , <i>transformer</i> の遺伝子構造	
3. 学会等名 日本節足動物発生学会第54回大会	
4. 発表年 2018年	

1. 発表者名 大出高弘・三戸太郎・新美輝幸
2. 発表標題 有翅昆虫と無翅昆虫の発生比較から探る翅の進化的起源
3. 学会等名 第20回日本進化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 千頭康彦・新美輝幸
2. 発表標題 性特異的スプライシング制御の進化：マダラシミにおける性決定関連遺伝子の機能解析
3. 学会等名 日本動物学会第89回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takahiro Ohde, Taro Mito and Teruyuki Niimi
2. 発表標題 On the evolutionary origin of insect wings: insights from basal insects
3. 学会等名 The 46th Naito Conference "Mechanisms of Evolution and Biodiversity" (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川口はるか・中村太郎・新美輝幸
2. 発表標題 ナミテントウの卵巣凍結保存法の確立と精巣凍結保存の試み
3. 学会等名 昆虫ポストゲノム研究会2018 in 八丈島
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川口はるか・中村太郎・新美輝幸
2. 発表標題 ナミテントウの卵巢凍結保存法の確立
3. 学会等名 Cryopreservation conference 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 千頭康彦・新美輝幸
2. 発表標題 節足動物における性決定遺伝子doublesexの分子進化の理解に向けて
3. 学会等名 第39回 管平動物学セミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ohde, T. and Niimi T.
2. 発表標題 On the evolutionary origin of insect wings: comparison of development between basal pterygote and apterygote insects.
3. 学会等名 第10回Evo-Devo青年の会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ohde, T., Mito, T. and Niimi, T.
2. 発表標題 What is the key developmental change for insect wing evolution?
3. 学会等名 2nd Biennial Meeting of Pan-American Society for Evolutionary Developmental Biology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 新美輝幸
2. 発表標題 はじめに
3. 学会等名 日本進化学会第19回大会 シンポジウム “ エボデボから見る非モデル生物研究の魅力 ” (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川口はるか・新美輝幸
2. 発表標題 できるかな? ナミテントウの卵巣凍結保存
3. 学会等名 昆虫ポストゲノム研究会 2017年 in つくば
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川口はるか・新美輝幸
2. 発表標題 ナミテントウの卵巣凍結保存の試み
3. 学会等名 Cryopreservation Conference 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川口はるか・新美輝幸
2. 発表標題 ナミテントウの卵巣凍結保存
3. 学会等名 平成30年度 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 - 日本蚕糸学会第88回大会 -
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大出高弘・三戸太郎・新美輝幸
2. 発表標題 翅形成遺伝子群は昆虫の背板縁形成に機能する
3. 学会等名 第62回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大出高弘・新美輝幸
2. 発表標題 翅と翅連続相同物間における遺伝子発現の保存性について
3. 学会等名 第52回日本節足動物発生学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 大出高弘・新美輝幸
2. 発表標題 昆虫形態進化研究におけるボトムアップデザインアプローチ
3. 学会等名 昆虫デザイン研究会（招待講演）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 大出高弘
2. 発表標題 昆虫の翅は作れるのか？
3. 学会等名 第9回Evo-Devo青年の会（招待講演）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Takahiro Ohde and Teruyuki Niimi
2. 発表標題 Evo-devo study of insect wing and its serial homologs: from apterygotes to pterygotes
3. 学会等名 XXV International Congress of Entomology 2016 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Takahiro Ohde and Teruyuki Niimi
2. 発表標題 The role of wing formation genes in non-wing developmental contexts
3. 学会等名 The joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology and the Meeting of the Zoological Society of Japan (国際学会)
4. 発表年 2016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

1. 発表者名 新美輝幸
2. 発表標題 昆虫翅の起源を探る研究から害虫防除へ
3. 学会等名 昆虫科学・新産業創生研究センター 第2回シンポジウム 「昆虫多様性と生態の理解と応用」 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川口はるか・中村太郎・酒井弘貴・新美輝幸
2. 発表標題 ナミテントウの精巣凍結保存
3. 学会等名 Cryopreservation Conference 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大出高弘・三戸太郎・新美輝幸
2. 発表標題 フタホシコオロギの翅発生から探る翅の進化的起源
3. 学会等名 日本動物学会第90回 大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 千頭康彦・新美輝幸
2. 発表標題 無翅昆虫類マダラシミにおける doublesex アイソフォームの機能解析
3. 学会等名 日本動物学会 第90回 大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 千頭康彦・新美輝幸
2. 発表標題 マダラシミ <i>Thermobia domestica</i> の脂肪体と卵巣における性分化遺伝子 transformer と doublesex の発現解析
3. 学会等名 日本節足動物発生学会 第55回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 峯村俊儀・大出高弘・新美輝幸・塩月孝博・大門高明
2. 発表標題 無変態昆虫マダラシミにおける幼若ホルモン関連遺伝子群の発現解析
3. 学会等名 第63回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川口はるか・中村太郎・酒井弘貴・新美輝幸
2. 発表標題 ナミテントウの精巣凍結保存法の試み
3. 学会等名 平成31年度 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 日本蚕糸学会第89回
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 RNAi法で探る非モデル昆虫の形作りの仕組み
3. 学会等名 日本農薬学会第44回大会 シンポジウム「形を見る、形から学ぶ」(招待講演)
4. 発表年 2019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	大出 高弘  (Ohde Takahiro)  (60742111)	基礎生物学研究所・進化発生研究部門・助教    (63904)	