

令和元年6月14日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04825

研究課題名(和文) 昆虫類頭部内骨格の比較発生学的検討 - 昆虫類基部分岐の系統学的再構築 -

研究課題名(英文) Diversity of fertilization in the basal lineages of insects, for deepening our insight to insect early evolution

研究代表者

町田 龍一郎 (MACHIDA, RYUICHIRO)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：50199725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：多様性を誇る六脚類の大部分を構成する外顎類は、強力な咀嚼力を保証する「幕状骨」とよばれる強靱な頭部内骨格を発達させた。幕状骨には単関節丘類(イシノミ目)、双関節丘類無翅類(シミ目)、双関節丘類の有翅昆虫類に至る向上進化的変遷が明瞭に認められるが、六脚類の基部分岐での「初原状態」についての理解は極めて断片的である。本研究は、基部分岐である「内顎類」の頭部内骨格の形成を詳細に検討することにより、カマアシムシ目の頭部内骨格は本目の固有派生形質、コムシ目の頭部内骨格が外顎類の幕状骨の初原状態を示すなどの重要な成果をあげた。あわせて、六脚類の基部分岐、多新翅類の高次系統に関する議論も発展させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

六脚類(広義の昆虫類)は種数において全動物の75%、全生物の60%を占める、最も多様性の高い動物群、生物群である。したがって、動物を理解する上で、また、生物を考えていく上で、六脚類は最も興味深いグループである。ドブジャンスキーが「進化の光に照らさない生物学は何の意味もなさない」と語ったように、生物を理解するためには、生物、個々のグループの進化が正確にフォローされなければならない。動物を理解する上で、また、生物とは何かを語るために、六脚類は最重要のグループであり、私たちは六脚類の進化を正しく把握したい。本研究は、六脚類の系統進化を、頭部内骨格の進化的変遷との視点から、描写したものである。

研究成果の概要(英文)：Hexapoda (Insecta s. lato), which is known as the most prosperous group in animals, have developed the tough cephalic endoskeletal system named tentorium, that ensures strong biting. An anagenetic transition is demonstrated on the tentorial system, i.e., from Monocondylia (Archaeognatha), via apterous Dicondylia (Zygentoma), to winged Dicondylia (Pterygota), but nothing definite is yet to be clarified on the ancestral states of the hexapod tentorial system. The present study analyzed the morphogenesis of the cephalic endoskeleton in the hexapod basal lineages “Entognatha,” and produced significant results such as: 1) the cephalic endoskeleton of Protura, to which the most ancestral state in hexapods has been bestowed, proved to be the structure autapomorphic to the group, and 2) that of Diplura was demonstrated to represent the most primitive state leading to the tentorial system. We also developed discussions on the hexapod phylogeny, focusing on the basal hexapods and Polyneoptera.

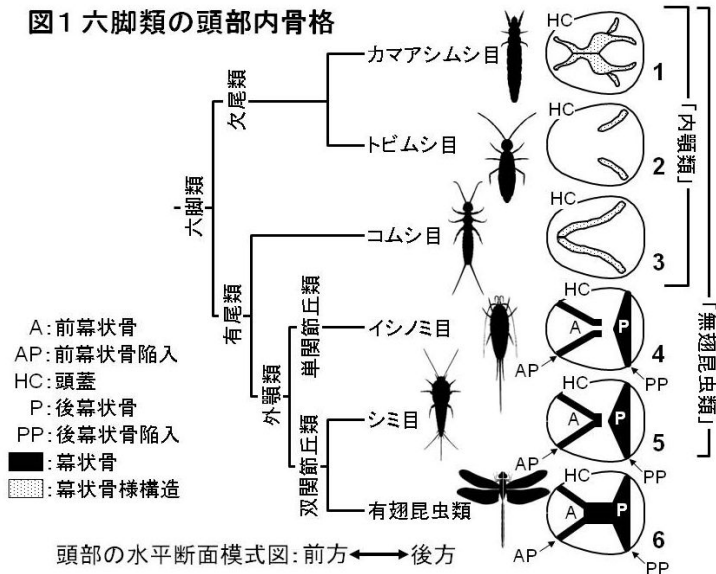
研究分野：動物系統分類学

キーワード：比較発生学 六脚類 昆虫類 内顎類 無翅昆虫類 幕状骨 多新翅類 系統進化

1. 研究開始当初の背景

六脚類(広義の昆虫類)は、全動物種の75%を占める最も繁栄している動物群である。六脚類は、翅の獲得には至っていない原始的な「無翅昆虫類」と総称されるカマアシムシ目、トビムシ目、コムシ目、イシノミ目、シミ目、そして、六脚類の99%を占める翅を獲得した有翅昆虫類の、6高次系統群からなる。その高次系統関係として広く受け入れられてきた「内顎類-外顎類システム」は、近年になり、多方面からのチャレンジを受けている。応募者は、翅の獲得に至っていない「無翅昆虫類」と総称される5原始系統群、祖先的な有翅昆虫類である多新翅類の比較発生学、「無翅昆虫類」

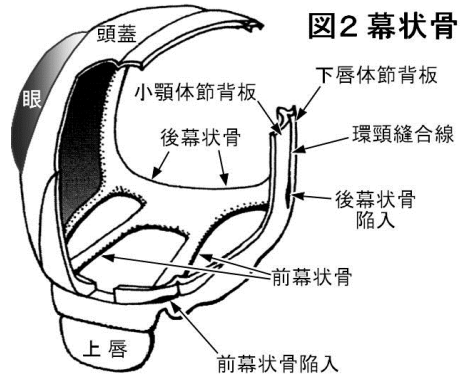
図1 六脚類の頭部内骨格



の口器の機能形態学を通して、六脚類のグラウンドプランを構築、高次系統を議論してきた。そして、図1に示す六脚類の高次系統を導いた。この系統仮説は私たちも参加している大規模トランスクリプトーム解析による国際プロジェクト「1 KITE」(Misof et al., 2014, Science, 346)などの最近の分子系統学的成果でも支持されている。

外顎類は六脚類の99.5%を占める多様性を誇る群である。外顎類、特にその主要群である双関節丘類(他の六脚類を含めた節足動物の大顎の関節丘が単一であるのに対し、二つの関節丘をもつ)は強力な咀嚼口を獲得した。この高い咀嚼力を保証するためには、頭蓋の補強および頑丈な筋付着点が必要である。このため、外顎類は外骨格の陥入構造に由来する「幕状骨」と呼ばれる「頭部内骨格」を獲得した。幕状骨は、左右の触角基部の「前幕状骨陥入」より形成される「前幕状骨」と、小顎体節背板と下唇体節背板の境界である「環頸縫合線」上に現われる「後幕状骨陥入」より形成される「後幕状骨」からなる(図2)。他の節足動物ではみられない六脚類特有の幕状骨に関して、1) 初原の外顎類であるイシノミ目(単関節丘類)で左右の後幕状骨が融合(図1 4)、2) 初原の双関節丘類であるシミ目ではさらに左右の前幕状骨も融合(図1 5)、3) 有翅昆虫類では前・後幕状骨同士も融合し強固な幕状骨系が完成する(図1 6, 図2)という、明瞭な向上進化的変遷も指摘されている(図1 4~6)。

六脚類の重要なグラウンドプランの一つである「幕状骨」の向上進化的変遷は極めて魅力的な進化的なシエマである。しかしながら、これは外顎類のみに関わることであり、このようなシエマに至る前段階はどのようなであったのだろうか? すなわち、より初原的なグループである「内顎類」にはどのような前適応があったのであろうか? この進化的に極めて重要な問いに答えるためには、「内顎類」3目の形成過程もしっかり把握した頭部構造の詳細な見当が必要なのである。しかしながら、これらカマアシムシ目、トビムシ目、コムシ目の頭部内骨格に関しては筋肉が付着する「幕状骨様構造」は記載されているものの、それ以上の構造学的知見はなく、ましてやそれらの起源についての議論もなされていない。



2. 研究の目的

私たちは、これまでの研究の過程で、「内顎類」の「幕状骨様構造」に関しても重要なデータを得てきている。同時に、六脚類の進化を考える上で興味深いテーマであるにもかかわらず、「内顎類」の「幕状骨様構造」の議論が進展しなかった理由も分かってきた。検討対象は小さな「内顎類」の頭部であり、例えばカマアシムシ目の頭部は成虫でも100 μmに満たず、卵も100~200 μm程度、胚の頭部にいたっては数10 μm以下である。その頭部内の構造である「幕状骨様構造」の厳密な理解は、TEMによる超薄連続切片観察以外では不可能だったのだ。しかし、今までこのような検討は行われてこなかった。また、構造の由来・起源の理解には完成型の検討だけでは不十分で、形成過程を追跡しなければならなかったのである。

本研究の目的は、1) 「内顎類」3目、すなわち、カマアシムシ目、トビムシ目、コムシ目の「幕状骨様構造」の形成過程を、胚発生および後胚発生過程を通して、電子顕微鏡により詳細に検討する; 2) これにより「内顎類」3目の当該構造のグラウンドプランを明らかにする; 3) 以

上を基に、長い間未解明であった六脚類の基部分岐での「頭部内骨格」の進化を議論し、「頭部内骨格」の進化との観点から六脚類基部分岐の系統学的検証、再構築を行なうことにある。4) 上記は「内顎類」を主対象としているが、本研究は六脚類の系統進化に関わるものであり、六脚類の最大群である外顎類の系統学的、比較発生学的理解が前提となる。外顎類の系統学的、比較発生学的検討も並行して進めることも、本研究の目的に含まれる。

3. 研究の方法

(1) 私たちはこれまで「内顎類」3目であるカマアシムシ目、トビムシ目、コムシ目に関する発生学的研究を数年に亘り行ってきている。これまでの研究で培ってきた方法により、材料確保、採卵を行い、卵を固定して各ステージ胚を揃えとともに、卵を孵化させ成虫に至る後胚発生の各ステージを確保、これらの試料を固定し、組織学的研究に供する。

(2) また、外顎類昆虫として、「無翅昆虫類」のイシノミ目、シミ目、有翅昆虫類としては、その初期分岐に直接由来し有翅昆虫類を代表させるのに好適な多新翅類を予定する：多新翅類としてはカワゲラ目、ジュズヒゲムシ目、バツタ目のフタホシコオロギ、ゴキブリ目のルリゴキブリを主材料とする。これらも同様にすでに発生学的研究を行ってきており、方法も確立している。

(3) 準備できた試料の外部観察は、主に走査型電子顕微鏡で行う。観察法は、本研究過程で応用に成功したナノスーツ法を汎用する。

(4) 内部構造の検討には、メタクリル系樹脂テクノビット 7100 による準薄連続切片を作成、光学顕微鏡ルーティン観察を行う。

(5) 詳細な微細構造額の検討は、エポキシ系樹脂スパー（代替品である LV）による超薄連続切片を作成、透過型電子顕微鏡観察を行う。なお、内顎類、特にカマアシムシ目の胚は微小なので、樹脂ブロック作成に当たっては、DAPI 染色した試料を蛍光実体顕微鏡下で観察しながら樹脂包埋を行う。

(6) 得られたデータを比較発生学的、系統学的に考察し、原著論文ないしは総説としてまとめ挙げ、順次、講演で発表するとともに出版物として公表する。

4. 研究成果

(1) 六脚類の頭部内骨格の起源および進化的変遷を解明することを目的とした本研究は、六脚類の主要群である有翅昆虫類の発達した頭部内骨格の主要要素である前幕状骨と後幕状骨の初原は、六脚類の原始群である「内顎類」にすでに存在し、それらが六脚類の初期分岐で徐々に発達することで有翅昆虫類の発達した頭部内骨格系が確立する、との作業仮説に沿って計画された。

しかしながら、六脚類の最原始系統群とされてきたカマアシムシ目の前幕状骨と同定されてきた構造が、前腸ないし口腔底を裏打ちするクチクラ（外骨格）と連続していることが確認され、このクチクラが「前幕状骨」と見紛うほどに著しく拡張、「前幕状骨」として筋肉系の付着点として機能するようになったことを明らかにした。また、図4で*で示した構造は位置的に外顎類の後幕状骨陥入に対応することで、両者は相同であると予想していた。しかしながら、この構造が最終的にも「幕状骨様構造」と連絡しないことが明らかとなり、カマアシムシ目の「幕状骨様構造」は外顎類の幕状骨とは別起源のものであり、本目の固有派生形質である可能性が示唆された。

(2) 一方、トビムシ目においては、頭部前方ならびに後方に陥入する1対ずつの構造を確認した。これらは外顎類の幕状骨陥入と相同視できるものであった。さらに、後幕状骨として同定された構造は(図3)、小顎体節と下唇体節の背板の境界に由来する構造であることが明らかになり、この陥入が背板由来であると結論された。あわせて、トビムシ目の内顎口形成について、理解を深めることができた。

(3) 幕状骨と胸部ならびに腹部の気管陥入は連続相同にあることがしばしば指摘される。しかしながら、気管陥入は付属肢の基部環節である亜基節に由来する preepisternum などの側板由来とされてきた。今回のトビムシ目の後幕状骨が背板由来であるということは、上記の相同性の理解に不都合である。

そこで、フタホシコオロギを材料に側板形成を検討した研究を行ったところ、気管が亜基節

図3 トビムシ後期胚頭部

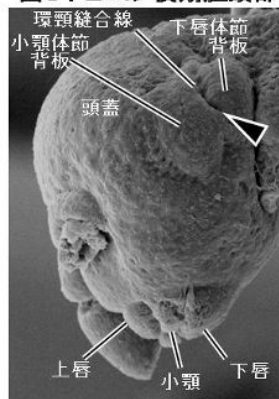
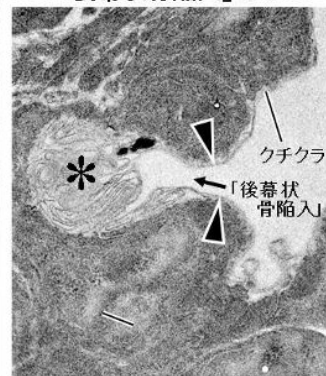


図4 カマアシムシの「後幕状骨陥入」のTEM



▶は「後幕状骨陥入」クチクラは密に分泌されるが(*)基部(▶)においては薄い

(側板)ではなく背板に由来することを明示することができ、後幕状骨が背板由来であるとの理解は強化された。

(4) ルリゴキブリの頭部形成の検討において、未固定の生物試料を走査型電子顕微鏡観察する目的で開発されたナノスーツ法を、初めて昆虫発生学の分野で実用化することもでき、このテクニックを汎用してアーティファクトの極めて少ない未固定胚の外部観察を行うことができるようになった。

(5) コムシ目に関しては、これまでに得られていた発生学的データを、SPring-8のシンクロトロンを用いて得られた成虫頭部の μ -CT立体構築像とともに総合的に検討したところ、コムシ目の幕状骨は外顎類のその初原を示すものであるとの結論が得られた。

(6) トランスクリプトームデータと、比較発生学、比較形態学的データを総合的に検討した結果、多新翅類ならびに網翅類(ゴキブリ目、シロアリ目、カマキリ目からなるグループ)の類内系統関係を明らかにすることができた。

(7) 比較発生学的立場から六脚類の系統進化が陸上進出への適応との観点から理解できるとの考え方を発展させ、第89回日本動物学会大会のシンポジウム「Major Transitions in Animal Evolution」で招待講演「Early divergence of insects and their adaptation to terrestrial habitat: A comparative embryological perspective」として発表された(本講演は北海道地震で実際は中止となったが、「発表」が認定されている。また、第90回大会で同内容が日本語で講演される予定)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計40件)

Wipfler, B., H. Letsch, P. B. Frandsen, P. Kapli, C. Mayer, D. Bartel, T. R. Buckley, A. Donath, J. S. Edgerly-Rooks, M. Fujita, S. Liu, R. Machida, Y. Mashimo, B. Misof, O. Niehuis, R. S. Peters, M. Petersen, L. Podsiadlowski, K. Schutte, S. Shimizu, T. Uchifune, J. Wilbrandt, E. Yan, X. Zhou and S. Simon (2019) Evolutionary History of Polyneoptera and Its Implications for Our Understanding of Early Winged Insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116: 3024-3029, doi/10.1073/pnas.1817794116. (査読有)

Mtow, S. And R. Machida (2019) Note on the thickened serosa and serosal cuticle formed beneath the embryo in *Scopura montana* Maruyama, 1987 (Insecta, Plecoptera, Scopuridae). *Proceedings of the Arthropodan Embryological Society of Japan*, 52: 11-14. (査読有)

Evangelista, D. A., B. Wipfler, O. Bethoux, A. Donath, M. Fujita, M. K. Kohli, F. Legendre, S. Liu, R. Machida, B. Misof, R. S. Peters, L. Podsiadlowski, J. Rust, K. Schuette, W. Tollenaa, J. L. Ware, T. Wappler, X. Zhou, K. Meusemann and S. Simon (2019) An integrative phylogenomic approach illuminates the evolutionary history of cockroaches and termites (Blattodea). *Proceedings of the Royal Society B*, 286: 20182076, doi.org/10.1098/rspb.2018.2076. (査読有)

Brandt, A., J. Bast, S. Scheu, K. Meusemann, A. Donath, K. Schutte, R. Machida and K. Kraaijeveld (2019) No signal of deleterious mutation accumulation in conserved nene sequences of extant asexual hexapods. *Scientific Reports*, 9: 5338, doi.org/10.1038/s41598-019-41821-x. (査読有)

Hirai, Y., N. Okuda, N. Saito, T. Ogawa, R. Machida, S. Nomura, M. Ohara, M. Haseyama and M. Shimomura (2019) The friction properties of firebrat scales. *Biomimetics*, 2019.4.2: doi:10.3390/biomimetics4010002. (査読有)

Mtow, S. And R. Machida (2019) Development and ultrastructure of the thickened serosa and serosal cuticle formed beneath the embryo in the stonefly *Scopura montana* Maruyama, 1987 (Insecta, Plecoptera, Scopuridae). *Arthropod Structure and Development*, 47: 643-654, doi.org/10.1016/j.asd.2018.09.002. (査読有)

Fukui, M., Fujita, M., S. Tomizuka, Y. Mashimo, S. Shimizu, C.-Y. Lee, Y. Murakami and R. Machida (2018) Egg structure and outline of embryonic development of the basal mantodean, *Metallyticus splendidus* Westwood, 1835 (Insecta, Mantodea, Metallyticidae). *Arthropod Structure and Development*, 47: 64-73, doi.org/10.1016/j.asd.2017.11.001. (査読有)

Mashimo, Y., Y. Matsumura, R.G. Beutel, L. Njoroge and R. Machida (2018) A remarkable new species of Zoraptera, *Zorotypus asymmetrosterni* from Kenya. *Zootaxa*, 3717(4): 498-514. (査読有)

Mtow, S. And R. Machida (2018) Egg structure and embryonic development of arctoperlarian stoneflies: A comparative embryological study (Plecoptera). *Arthropod Systematics and Phylogeny*, 76: 65-86. (査読有)

Fujita, M. And R. Machida (2018) Embryonic development of *Eucorydia yasumatsui*

- Asahina, with special reference to external morphology (Insecta: Blattodea, Corydiidae). Journal of Morphology, 278: 1469-1489, DOI: 10.1002/jmor.20725. (査読有)
- Mashimo, Y. And R. Machida (2018) Embryological evidence substantiates the subcoxal theory on the origin of pleuron in insects. Scientific Reports, 7: 12597, DOI:10.1038/s41598-017-12728-2. (査読有)
- Fujita, M. And R. Machida (2018) Embryonic development of Nocticolidae (Insecta: Blattodea, Nocticolidae). Proceedings of the Arthropodan Embryological Society of Japan, 51: 25-26. (査読有)
- Fukui, M. and R. Machida (2017) Dorsal closure of *Baculentulus densus* (Imadaté) (Hexapoda: Protura, Acerentomidae). Proceedings of the Arthropodan Embryological Society of Japan, 51: 21-22. (査読有)
- Tomizuka, S. and R. Machida (2017) Tentorial invaginations of the collembolan *Tomocerus cuspidatus* Börner, 1909 (Hexapoda: Collembola, Tomoceridae). Proceedings of the Arthropodan Embryological Society of Japan, 48: 43-45. (査読有)
- Fujita, M. and R. Machida (2017) Preliminary Note on the Embryonic Development of *Eucorydia yasu* Proceedings of the Arthropodan Embryological Society of Japan Proc. Arthropod. Embryol. Soc. Jpn., 48: 39-41. (査読有)
- Dallai, R., D. Mercati, Y. Mashimo, R. Machida and R.G. Beutel (2017) The morphology and ultrastructure of salivary glands of Zoraptera (Insecta). Arthropod Structure and Development, 46: 508-517, doi.org/10.1016/j.asd.2017.02.001. (査読有)
- Blanke, A. and R. Machida (2016) The homology of cephalic muscles and endoskeletal elements between Diplura and Ectognatha (Insecta). Organisms Diversity and Evolution, 16: 241-257, DOI: 10.1007/s13127-015-0251-5. (査読有)
- Tomizuka, S., M. Fukui, K. Sekiya and R. Machida (2016) Entognathy formations of three entognathan orders: A phylogenetic argument. Proceedings of the Arthropodan Embryological Society of Japan, 49: 13. (査読有)
- Fujita, M., A. Blanke, S. Nomura and R. Machida (2016) Simple, artifact-free SEM observations of insect embryos: Application of the Nano-suit Method to insect embryology. Proceedings of the Arthropodan Embryological Society of Japan, 50: 7-10. (査読有)
- Blanke, A. and R. Machida (2016) Structural mouthpart interaction evolved already in the earliest lineages of insects. In: SPring-8/Sacla Research Frontiers 2015, 36-37. (査読有)

[学会発表] (計 16 件)

- Machida, R. (2018) Early divergence of insects and their adaptation to terrestrial habitat: A comparative embryological perspective. 第 89 回日本動物学会大会 (招待講演).
- 福井 眞生子・町田 龍一郎 (2018) サイコクカマアシムシ *Baculentulus densus* (Imadaté) の発生学的研究 - 頭部内骨格の起源解明に向けて - . 第89回日本動物学会大会.
- 福井 眞生子・町田 龍一郎 (2018) サイコクカマアシムシ *Baculentulus densus* (Imadaté) の発生学的研究 - 頭部内骨格の起源解明に向けて - . 第54回日本節足動物発生学会大会.
- 福井 眞生子・町田 龍一郎 (2016) サイコクカマアシムシ *Baculentulus densus* (Imadaté) の背形成 (六脚類・カマアシムシ目・クシカマアシムシ科). 第 52 回日本節足動物発生学会大会 .
- Fukui, M. and R. Machida (2016) Cephalic endoskeleton of *Baculentulus densus* (Imadaté). 14th International Colloquium on Apterygota.
- Tomizuka, S., M. Fukui, K. Sekiya and R. Machida (2016) Early splitting of Hexapoda reviewed from the comparative embryology: A revised synthesis. 14th International Colloquium on Apterygota.

[その他]

ホームページ等

昆虫比較発生学教室 町田研究室へようこそ！

<http://www.sugadaira.tsukuba.ac.jp/machida/mushi.html>

有翅昆虫類の系統樹の構築 - 身近なバツタ、カマキリなどからなる多新翅類の祖先型を復元

<http://www.tsukuba.ac.jp/attention-research/p201901151400.html>

ゴキブリの起源は意外と新しかった！

<http://www.tsukuba.ac.jp/attention-research/r201902011400.html>

昆虫類の翅の起源を発生学的に解明 ~ 翅の起源に関わる側板は肢の付け根に由来する ~

<https://www.tsukuba.ac.jp/attention-research/p201710031800.html>

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

氏名：福井 眞生子

ローマ字氏名：FUKUI, Makiko

所属研究機関名：愛媛大学

部局名：理工学研究科

職名：助教

研究者番号(8桁): 90635872