

平成 23 年 2 月 18 日現在

研究種目： 基盤研究(B)  
 研究期間： 2007 ～ 2009  
 課題番号： 19380035  
 研究課題名（和文） 翅形成マスター遺伝子を用いた翅獲得メカニズムの解明とその応用  
 研究課題名（英文） Analyses of wing master gene orthologs in apterygote and pterygote insects and its application

## 研究代表者

新美 輝幸 (NIIMI TERUYUKI)  
 名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教  
 研究者番号：00293712

## 研究成果の概要（和文）：

昆虫の翅獲得の分子メカニズムを明らかにするため、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)* および VG とヘテロテトラマーを形成する転写因子をコードする *scalloped (sd)* に着目し、無翅昆虫および有翅昆虫を材料に用い、発現解析および RNAi 法を確立し機能解析を行った。本研究により、昆虫による翅獲得メカニズムを考察する新知見および新規生物農薬の開発の可能性を見いだした。

## 研究成果の概要（英文）：

In *Drosophila melanogaster*, the wing master gene *vestigial (vg)* and its interaction partner *scalloped (sd)* play a pivotal role to form the wing field identity. These genes would be good molecular markers to investigate the wing origin and evolution. We analyzed *vg* and *sd* orthologs from the twenty-eight spotted ladybird beetle *Henosepilachna vigintioctopunctata* as the first example other than diptera, and revealed functional conservation of *vg* and *sd* in wing formation.

To identify the structure from which insect wing was evolved, it is important to understand the ancestral wing gene function in apterygote. We focus on the firebrat *Thermobia domestica* (Insecta; Thysanura). Since Thysanura is phylogenetically the closest relative of pterygote, it would be a key insect to elucidate wing origin. To investigate the function of apterygote wing master gene ortholog, we developed RNAi method as a gene functional analysis tool in *Thermobia*. We are under the analysis of wing genes using the RNAi method.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2008 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2009 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	15,700,000	4,710,000	20,410,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学 ・ 応用昆虫学

キーワード：翅起源、翅形成マスター遺伝子、*vestigial*、*scalloped*、RNAi 法、生物農薬

### 1. 研究開始当初の背景

昆虫は様々な環境に適応し、極めて多様な翅を発展させた。翅の獲得は、昆虫がこの地球上で最も繁栄する生物群となる主要な要因の一つとなっている。手や肢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ものである。昆虫による翅の獲得がどのようなメカニズムにより生じたかは、進化の過程における重要な出来事である。しかしながら、昆虫の翅の起源に関する仮説は約二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。さらに、どのような分子メカニズムが翅獲得に寄与したかについては全く不明である。

また、これまで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る。したがって、本研究によって得られる翅形成に関する知見は、応用研究への展開が大いに期待される。

### 2. 研究の目的

本研究では、翅の起源を分子レベルで探求し、さらに有翅昆虫のみが有する翅の運命が発生過程においてどのように決定されるかについても解析し、進化の過程で翅が獲得されたプロセスの分子基盤の解明を目的とする。さらに、これらの研究によって得られた知見に基づき、ナミテントウのような捕食性天敵昆虫の翅形成機構を改変し、これまで問題になっていた飛翔による捕食性天敵昆虫の分散を阻止するため、飛べない天敵昆虫の開発に資する。本研究では、RNAi 法に改良を加え、効率よく翅形成を阻害したテントウムシの作出法を試みる。

### 3. 研究の方法

#### 供試昆虫

##### 無翅昆虫

総尾目：マダラシミ (*Thermobia domestica*)、ヤマトシミ (*Ctenolepisma villosa*)

##### 不完全変態昆虫

蜉蝣目：ユミモンヒラタカゲロウ (*Epeorus nipponicus*)、ホソバマダラカゲロウ (*Ephemereilla atagosana*)、

シロタニガワカゲロウ (*Ecdyonurus yoshidae*)

積翅目：ミネトワダカワゲラ (*Scopura Montana*)

直翅目：フタホシコオロギ (*Gryllus bimacuratus*)

蜚蠊目：トルキスタンローチ (*Blatta lateralis*)、アルゼンチンモリゴキブリ (*Blaptica dubia*)

蟻螂目：アフリカメダマカマキリ (*Pseudocreobotra wahlbergii*)

##### 完全変態昆虫

鞘翅目：チャイロコメノゴミムシダマシ (*Tenebrio molitor*)、ナミテントウ (*Harmonia axyridis*)、ニジュウヤホシテントウ (*Henosepilachna vigintioctopunctata*)

膜翅目：セイヨウミツバチ (*Apis mellifera*)

(1) *vestigial* (*vg*) および *scalloped* (*sd*) 遺伝子の発現パターンの解析

各種昆虫における *vg* と *sd* の発現を半定量および定量 RT-PCR 法、*in situ* ハイブリダイゼーション法により解析した。

(2) 無翅昆虫マダラシミにおける RNAi 法の確立

マダラシミ自体における遺伝子機能解析を通じて *Td-vg* および *Td-sd* の果たす役割を解明する必要がある。ところが、進化的に起源の古い無翅昆虫であるマダラシミにおいて、これまでに有効な遺伝子機能解析法は確立されていない。そこで、完全変態昆虫や不完全変態昆虫において有効性が示された遺伝子機能解析法として RNA interference (RNAi) 法に着目した。そこでまず、付属肢の遠位部形成に関与する進化的に保存されたホメオボックス遺伝子であり、遺伝子機能阻害による表現型が明確な *Distal-less* (*Dll*) に着目し、RT-PCR 法によりマダラシミから *Td-Dll* をクローニングした。続いて、*in vitro* で合成した *Td-Dll* の二本鎖 RNA をマダラシミの初期胚にインジェクションして得られた表現型を解析することにより、embryonic RNAi 法の有効性を検討した。さらに、幼虫期に二本鎖 RNA をインジェクションする larval RNAi 法についても検討した。

(3) *vg* および *sd* 遺伝子の機能解析  
各種昆虫において、embryonic RNAi 法や

larval RNAi 法を行い、*vg* および *sd* 遺伝子の機能を解析した。

#### (4) parental RNAi 法による翅なしテントウムシの作出法の検討

larval RNAi 法では、幼虫個体への二本鎖 RNA のインジェクションが必要であったが、RNAi による翅形成阻害個体を効率よく作出するため parental RNAi 法（雌蛹・成虫への二本鎖 RNA のインジェクションによって得られた次世代において効率よく RNAi 効果が現れる）を行い、インジェクションを行った雌成虫 1 個体が産卵した次世代において大量の翅なしテントウムシを作出するための条件検討を行った。この条件検討には、幼虫孵化の時点で RNAi の効果が明確であること、さらに初期胚へのインジェクションによる RNAi 法（embryonic RNAi 法）の効果を既に確認していることから、付属肢の遠近軸形成に関与するホメオボックス遺伝子 *Distal-less* (*Dll*) を用いた。次に、ここで得られた条件に基づき、*vg* と *sd* について Parental RNAi 法を行い、翅形成阻害への有効性を検討する。

#### (5) 二本鎖 RNA の摂食による翅なしテントウムシの作出法の開発

上記の larval RNAi 法では、幼虫の個体ごとに RNA 二本鎖のインジェクションを行うため、翅なしテントウムシを大量に作出するのは効率的ではない。そこで、簡便に翅なしテントウムシを作出するため、*vg* および *sd* 遺伝子の二本鎖 RNA を siRNA 粉末を混合した粉末の人工飼料の摂食によって翅形成阻害が生じるかを検討する。まず、siRNA として選択された配列の遺伝子の機能阻害効果を幼虫体へのインジェクションにより検討する。その結果、二本鎖 RNA の場合と同様に翅形成阻害が認められた siRNA を用いて、食餌への投与量および投与期間を幼虫期および成虫期において検討する。

## 4. 研究成果

### (1) *vestigial* (*vg*) および *scalloped* (*sd*) 遺伝子の発現パターンの解析

マダラシミからクローニングした *vg* および *sd* について、RT-PCR 法により各体節における発現解析を行った。その結果、マダラシミの *vg* は胸部全体節で高い発現を有していることが明らかとなった。興味深いことに、有翅昆虫において通常翅の存在しない前胸でもマダラシミにおいては他の胸部体節と同程度の発現が認められた。マダラシミの胸部各体節には側背板と呼ばれる背板側方部の突出構造が存在しており、この構造から翅が派生したとされる仮説が提唱されている。今回の結果から、*vg* が側背板のような突出構

造の形成に関与している可能性が示唆された。

また、有翅昆虫の中で最も祖先的と考えられている浮遊目昆虫の一種であるシロタニガワカゲロウを実験材料に用い *vg* の発現部位を調査するため、リアルタイム PCR 法に基づく定量的 RT-PCR 法を行った。その結果、昆虫翅の起源を考える上で興味深い結果が得られた。

チャイロコメノゴミムシダマシを材料に用いた *vg* および *sd* 遺伝子の *in situ* ハイブリダイゼーション法により、これまでに予想されていた翅原基の発現以外に興味深い発現部位が認められた。翅の起源を考える上で重要な知見となることが期待される。

### (2) 無翅昆虫マダラシミにおける RNAi 法の確立

まず *Td-Dll* について embryonic RNAi 法を行うための条件検討を行った。この結果に基づき *Td-Dll* の RNAi による表現型を解析したところ、胸部および頭部の付属肢において顕著な短縮が観察された。したがって、マダラシミにおいても embryonic RNAi 法を用いた遺伝子の機能解析が有効であることが判明した。

次に、胚における *vestigial* および *scalloped* の機能解析を行った。しかしながら、いずれの遺伝子においても胚致死となってしまった。したがって、embryonic RNAi 法では表現型の解析が不可能であることが判明した。

そこで、後胚発生期における遺伝子機能阻害を行うため、幼虫の体内への二本鎖 RNA 注射による nymphal RNAi 法の適用を試みた。その結果、いずれの遺伝子の RNAi において、特異的な表現型が観察された。したがって、マダラシミにおいて nymphal RNAi 法が有効であることが明らかとなった。現在、本方法を用いて、無翅昆虫における翅形成マスター遺伝子の機能を詳細に解析中である。

### (3) *vg* および *sd* 遺伝子の機能解析

ミネトワダカワゲラを材料に *vg* および *sd* 遺伝子について nymphal RNAi 法を行ったが、インジェクション後の脱皮にまでに長期間を要したため、飼育上の問題により、遺伝子の機能を見いだすことができなかった。

また、トルキスタンローチおよびアルゼンチンモリゴキブリを用いた *vg* および *sd* 遺伝子について nymphal RNAi 法を行った。その結果、不完全変態昆虫においてもこれらの遺伝子が翅形成に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

さらに、翅なしテントウムシの作出法を開発する過程で、これまで明らかにされていなかった *sd* の新規機能を発見した。さらに、この *sd* の新規機能はチャイロコメノゴミムシダマシにおいても保存されていることが

明らかとなった。

#### (4) parental RNAi 法による翅なしテントウムシの作出法の検討

まずナミテントウにおいてparental RNAi法を確立するため、二本鎖RNA量やインジェクションの時期、一回のインジェクションによるRNAiの有効期間などについて条件を検討した。この条件検討には、幼虫孵化の時点でRNAiの効果が明確であること、さらに初期胚へのインジェクションによるRNAi法 (embryonic RNAi法) の効果を既に確認していることから、付属肢の遠近軸形成に関与するホメオボックス遺伝子であるナミテントウ*Distal-less* (*Ha-DII*) を用いた。その結果、蛹・未交尾雌成虫のいずれのステージにおいても*Ha-DII*の二本鎖RNAをインジェクションした場合、不妊となりparental RNAi法による効果を確認できなかった。不妊となった原因については不明であるが、今後ナミテントウからクローニングした他の遺伝子について条件検討を行う予定である。

#### (5) 二本鎖 RNA の摂食による翅なしテントウムシの作出法の開発

*vg* および *sd* 遺伝子の siRNA を有効性を検討するため、それぞれの遺伝子について5つの siRNA を作製し larval RNAi 法を行った。その結果、これらの遺伝子の長鎖の二本鎖 RNA を用いた結果とは異なり、いずれの遺伝子の siRNA も全く表現型が得られなかった。したがって、長鎖と短鎖の二本鎖 RNA による RNAi 効果は異なる可能性が示唆された。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Niwa, N., Akimoto-Kato, A. Niimi, T., Tojo, K., Machida, R. and Hayashi, S. (2010) Evolutionary origin of the insect wing via integration of two developmental modules. *Evo. Dev.* **12**, 168-176. 査読有
- ② 大出高弘・柳沼利信・新美輝幸 (2010) 無翅昆虫から探る昆虫の翅の起源. *昆虫 DNA 研究会ニュースレター*, **13**, 33-36. 査読無
- ③ 新美輝幸・大出高弘・柳沼利信 (2010) 新規生物農薬「翅なしテントウムシ」の作出. *ニューカントリー*, **677**, 70-71. 査読無
- ④ 大出高弘・増本三香・新美輝幸 (2009) 昆虫翅形成遺伝子 *scalloped* の蛹脱皮における新機能—TEAD タンパク質の新展開—. *比較内分泌学*, **35**, 269-273. 査読

無

- ⑤ Ohde, T., Masumoto, M., Morita-Miwa, M., Matsuura, H., Yoshioka, H., Yaginuma, T. and Niimi, T. (2009) *vestigial* and *scalloped* in the ladybird beetle: a conserved function in wing development and a novel function in pupal ecdysis. *Insect Mol. Biol.*, **18**, 571-581. 査読有
- ⑥ Ohde, T., Masumoto, M., Yaginuma, T. and Niimi, T. (2009) Embryonic RNAi analysis in the firebrat, *Thermobia domestica*: *Distal-less* is required to form caudal filament. *J. Insect Biotechnol. Sericol.*, **78**, 99-105. 査読有

[学会発表] (計 21 件)

- ① 新美輝幸: 昆虫翅の起源から RNAi 育種法による生物農薬の開発へ。名古屋大学大学院生命農学研究科と愛知県農業総合試験場との研究交流会、2010年12月16日、名古屋市、名古屋大学大学院生命農学研究科大会議室
- ② 大出高弘・柳沼利信・新美輝幸: マダラシミにおける翅形成関連遺伝子のクローニング。平成22年度日本蚕糸学会第65回東北支部・第66回中部支部・第62回東海支部・第76回関西支部・第66回九州支部合同大会 昆虫機能・利用学術講演会、2010年11月15日、浦添市、浦添市てだこホール
- ③ Niimi, T.: Novel production of a flightless ladybird beetle for biological pest control. AgBiotech Industry Round Table, October 22, 2010, North Carolina Biotechnology Center, North Caroline, UAS
- ④ 新美輝幸: 昆虫の特異機能を探り害虫を退治する。平成22年度名古屋大学公開講座、未来を切り開く 挑戦する Nagoya University、2010年9月28日、名古屋市、名古屋大学経済学部第1講義室
- ⑤ Ohde, T., Yaginuma, T. and Niimi, T.: Analyses of wing master gene orthologs in apterygote and pterygote insects. ISBDS2010 International Symposium on Biodiversity Sciences “Genome, Evolution and Environment”, August 1, 2010, Hotel Rubra Ohzan, Nagoya, Japan
- ⑥ Ohde, T., Yaginuma, T. and Niimi, T.: Toward understanding the evolutionary origin of insect wing: Analyses of *vestigial* and *scalloped* orthologs from apterygote and pterygote insects. Third meeting of the European society for Evolutionary Developmental Biology, July 8, 2010, Paris, France

- ⑦大出高弘・柳沼利信・新美輝幸：マダラシミにおける RNAi 法を用いた遺伝子機能解析。第 46 回日本節足動物発生学会、2010 年 6 月 12 日、福島県白河市、キョロロン村アクティブセンター研修室
- ⑧大出高弘・柳沼利信・新美輝幸：無翅昆虫における遺伝子機能解析の試み。昆虫 DNA 研究会 第 7 回研究集会、2010 年 5 月 22 日、名古屋市、名古屋大学豊田講堂第 1 会議室
- ⑨大出高弘・柳沼利信・新美輝幸、マダラシミにおける nymphal RNAi 法を用いた遺伝子機能解析の試み、成 22 年度蚕糸・昆虫機能学術講演会-日本蚕糸学会第 80 回大会-、2010 年 4 月 4 日、上田市、信州大学繊維学部キャンパス・講義棟
- ⑩大出高弘・増本三香・大場裕一・柳沼利信・新美輝幸、有翅昆虫および無翅昆虫を用いて昆虫翅の起源に迫る、昆虫ワークショップ 09 福岡、2009 年 10 月 30 日、福岡市、ウェルサンピア福岡
- ⑪新美輝幸、昆虫の機能解明に基づく生物農薬の創造、北陸・東海 8 大学研究シーズ発表・展示会、2009 年 10 月 5 日、名古屋市、名古屋大学シンポジオンホール
- ⑫大出高弘・増本三香・柳沼利信・新美輝幸、ニジュウヤホシテントウにおける翅形成マスター遺伝子の解析、第 45 回日本節足動物発生学会、2009 年 6 月 6 日、ひたちなか市、ホテルニュー白亜紀
- ⑬丹羽尚・秋元加藤愛・新美輝幸・東城幸治・町田龍一郎・林茂生、翅の進化モデル：イシノミ類とカゲロウ類における翅形成遺伝子群の発現パターンより、第 45 回日本節足動物発生学会、2009 年 6 月 6 日、ひたちなか市、ホテルニュー白亜紀
- ⑭大出高弘・増本三香・三輪雅代・大場裕一・柳沼利信・新美輝幸、マダラシミにおける *vestigial* および *scalloped* の発現解析、平成 21 年度蚕糸・昆虫機能学術講演会-日本蚕糸学会第 79 回大会-、2009 年 3 月 22 日、府中市、東京農工大学農学部
- ⑮大出高弘・増本三香・三輪雅代・松浦宏典・柳沼利信・新美輝幸、ニジュウヤホシテントウ *scalloped* の機能および発現解析、日本蚕糸学会中部支部第 64 回・東海支部大会第 60 回、2008 年 11 月 27 日、上田市、信州大学繊維学部
- ⑯新美輝幸、RNAi 法を用いた新規生物農薬の開発、アグリビジネス創出フェア 2008、2008 年 10 月 29 日、千代田区、東京国際フォーラム展示ホール
- ⑰大出高弘・増本三香・柳沼利信・新美輝幸、昆虫翅の起源の解明をめざして -マダラシミにおける embryonic RNAi 法の確立-、第 44 回日本節足動物発生学会、2008 年 5

- 月 22 日、上田市、信州大学理学部
- ⑱大出高弘・増本三香・柳沼利信・新美輝幸、マダラシミにおける embryonic RNAi 法の確立、平成 20 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会-日本蚕糸学会第 78 回大会-、2008 年 3 月 20 日、名古屋市、名古屋大学大学院生命農学研究科・講義棟
- ⑲ Ohde, T., Masumoto, M., Miwa, M., Matsuura, H., Yaginuma, T. and Niimi, T.: Functional analyses of *vestigial* and *scalloped* in the twenty-eight-spotted lady beetle, *Henosepilachna vigintioctopunctata*. Asia-Pacific Congress of Sericulture and Insect Biotechnology 2008 Nagoya, March 22, 2008, Noyori Conference Hall, Nagoya University, Nagoya, Japan
- ⑳大出高弘・増本三香・三輪雅代・松浦宏典・柳沼利信・新美輝幸：ニジュウヤホシテントウ *vestigial* および *scalloped* の機能解析。日本蚕糸学会中部支部第 63 回・東海支部大会第 59 回、2007 年 11 月 29 日、岡谷市、ジョイントプラザ マリオ
- ㉑新美輝幸：RNAi 法を用いた昆虫翅の多様性の理解を目指して。RNAi 研究会 2007、2007 年 9 月 11 日、中頭郡西原町、琉球大学理系複合棟

〔産業財産権〕  
○出願状況（計 1 件）

名称：テントウムシ科の昆虫を含む生物農薬  
発明者：新美輝幸・柳沼利信  
権利者：名古屋大学  
種類：PCT/JP2007/  
番号：061851  
出願年月日：2007 年 6 月 13 日  
国内外の別：外国

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

新美 輝幸 (NIIMI TERUYUKI)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教  
研究者番号：00293712

### (2) 研究分担者

柳沼 利信 (YAGINUMA TOSHINOBU)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授  
研究者番号：60135332