

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16181

研究課題名(和文)カブトムシの角形成遺伝子制御ネットワークの解明と角獲得メカニズムの解析

研究課題名(英文)Analysis of the horn formation gene regulatory network in *Tripoxylus dichotomus*

研究代表者

森田 慎一 (Morita, Shinichi)

基礎生物学研究所・進化発生研究部門・特任助教

研究者番号：10780926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、進化的新奇形質のモデルとしてカブトムシの角に着目し、1. 角形成に関与する遺伝子を同定、2. これらの遺伝子の時空間的な発現領域を解析、3. 角形成を制御する遺伝子制御ネットワークの解明を試みた。結果として、角形成に関与する多くの遺伝子を見出すことに成功した。また、角原基を切り分けて RNA-seq 解析を行なうことで、擬似的な空間的発現プロファイルを得た。これらのデータから、同様の発現パターンと表現型を示す遺伝子を分類し、RNAi バックグラウンド個体で定量 PCR を行なうことで、いくつかの角形成を制御する遺伝子制御ネットワークの実体を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国では、立派な角をもつカブトムシは子供から大人まで人気の高い昆虫であるが、角がどのような遺伝的プログラム(遺伝子制御ネットワーク)の改変により生じてきた形質かはほとんど明らかになっていなかった。本研究では、これまでにない大規模な解析を試み、いくつかの角形成を制御する遺伝子制御ネットワークの実体を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This study focused on beetle horns as a model for evolutionary novel traits and tried to 1) identify genes involved in horn formation, 2) analyze the spatiotemporal expression regions of these genes, and 3) elucidate the gene regulatory network that controls horn formation. As a result, identified many genes involved in horn formation. In addition, RNA-seq analysis was performed by dividing the horn primordia to obtain pseudo-spatial expression profiles. From these data, the genes showing similar expression patterns and phenotypes were categorized, and the results of quantitative PCR in RNAi background individuals revealed several gene regulatory networks controlling horn formation.

研究分野：発生生物学

キーワード：カブトムシ 角形成 進化的新奇形質 性的二型

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 全く新しい器官の創出は、生物種ごとの体づくりを司る個体発生を制御する遺伝的プログラム(遺伝子制御ネットワーク)が改変されることで生じてきたと考えられている。しかし、生物種特有の形質を創出する際に必要な特定の遺伝的変異の実体やそれに伴う発生プログラムの枠組みの変化は発生遺伝学のモデル生物とその近縁種の間でしか明らかになっておらず、その他の多くの非モデル生物が有する適応形質がどのように獲得されてきたかの全貌はほとんど明らかになっていない。



(2) カブトムシの「角」は頭部と胸部に存在し、オス同士の闘争や餌場の確保のための武器として使用される。このような角は多くのコガネムシ科の昆虫においてオスにのみ存在し(性的二型形質)、それらの形、数、大きさや形成領域は近縁種間においても多様である。さらに、カブトムシの角は新奇に獲得された器官(進化的新奇形質)であると考えられており、表皮シートから派生した構造物である。このような角という形質がコガネムシ科でどのように形成され獲得されたかを解明することは、進化の過程での形態的な多様性獲得メカニズムを理解することにつながるであろう。

(3) カブトムシは入手が容易であり、近年 RNA 干渉(RNAi)法による遺伝子機能阻害スクリーニングの系が確立しているため、上記の問題を解決するためのモデルである。そこで、カブトムシが有する新奇形質である「角」に着目し、その形成を制御する遺伝子制御ネットワークの全貌を明らかにすることで、生物の適応的新奇形質の起源の解明及び生物の多様性創出機構を紐解く手掛かりを得ることを目指した。

2. 研究の目的

- (1) 角形成に関与する遺伝子の同定
- (2) 角形成遺伝子の時空間的な発現領域の解析
- (3) 角形成を制御する遺伝子制御ネットワークの実体の解明

3. 研究の方法

- (1) 供試昆虫 完全変態昆虫 カブトムシ (*Trypoxylus dichotomus*)
- (2) RNA シークエンシング (RNA-seq)
- (3) Larval RNA 干渉法
- (4) リアルタイム定量 PCR 法
- (5) Assay for Transposase-Accessible Chromatin シークエンシング (ATAC-seq)
- (6) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment 法 (Selex)
- (7) ゲルシフトアッセイ

4. 研究成果

- (1) 比較トランスクリプトーム解析による角形成を制御する遺伝子の推定

角形成に関与する遺伝子を推定するために、カブトムシのオスにおいて、前蛹開始後 36 時間の頭部及び胸部角原基とその周辺組織を解剖摘出し、total RNA を抽出した。この total RNA より、TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit を用いてライブラリを調整、Nova-seq を用いて 100 bp Pair End でシークエンスした。得られたリードをゲノムにマッピング・カウントし(HISAT2・StringTie)、遺伝子発現の挙動を解析した(DEGES)。結果として、角原基領域で有意に高発現している遺伝子(およそ 3500 遺伝子)を見出した。

本解析で得られた RNA-seq データに加えて、これまでに解析が行なわれているカブトムシの RNA-seq データを用いて Weighted Gene Correlation Network Analysis (WGCNA) を行

なった。WGCNA 解析から得られた相関より、ネットワーク上の重要度が高いと考えられる遺伝子 (媒介中心性等) を見出した。

上記 と より得られた結果をもとに、約 300 個の遺伝子を角形成に重要な機能を有している可能性が高い遺伝子として選出した。

(2) 角形成を制御する遺伝子の同定

上記で選出した角形成を制御する約 300 個の候補遺伝子に対して、larval RNAi 法による遺伝子機能解析を行なった。結果として、頭部及び胸部の角に影響を及ぼす遺伝子を多く同定することに成功した。

(3) 擬似的な空間的発現プロファイル

角原基での遺伝子の空間的発現プロファイルを解析するために、前蛹開始後 60 時間の頭部角原基を 10 区画、胸部角原基を 3 区画に細分化し (39 サンプル + その周辺組織 6 サンプルの合計 45 サンプル)、total RNA を抽出した。この total RNA より、TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit を用いてライブラリを調整、Nova-seq を用いて 100 bp Pair End でシーケンスした。得られたリードをゲノムにマッピング・カウントし (HISAT2・StringTie)、遺伝子発現の挙動を解析した (DEGES)。さらに、遺伝子毎に各領域の発現情報をまとめ、擬似的な空間的発現プロファイルデータを作成した。

(4) 角形成を制御する遺伝子制御ネットワークの解析

研究成果 (2) で得られた角形成遺伝子の表現型は多様であったが、似た表現型を示す遺伝子も存在した。表現型が酷似した遺伝子は、共通モジュールの可能性が高いと判断できる。したがって、類似する表現型毎に 12 個に分類した。

上記で分類した遺伝子群の発現に時空間的な相関があるかを、研究成果 (3) で得られた擬似的な発現プロファイルから解析し、制御関係の可能性を推定した。

制御関係があり得ると推定された遺伝子の RNAi バックグラウンド個体から total RNA を抽出し、表現型毎に分類された遺伝子の発現の変動をリアルタイム定量 PCR 法を用いて解析した。結果として、発現レベルが低下する遺伝子を複数見出すことに成功した。これらの発現レベルが低下する遺伝子は、RNAi により発現を抑制された遺伝子に直接もしくは間接的にその発現を制御され、下流で機能していることが示唆された。このような遺伝子制御関係は現在までに 5 つ分類群 (23 遺伝子) で確認された。

(5) ATAC-seq 解析によるオープンクロマチン領域の網羅的な探索

角原基形成時のオープンクロマチン領域を特定すべく、カブトムシでの ATAC-seq 法の開発に取り組んだ。カブトムシのオスにおいて、前蛹開始後 36 時間の頭部及び胸部角原基、肢原基及び翅原基を解剖摘出し、核を $1 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ 個抽出した。この核より、Illumina Tagment DNA TDE1 Enzyme and Buffer Kits を用いてライブラリを調整し、Nova-seq を用いて 100 bp Pair End でシーケンスした。得られたリードをゲノムにマッピングし (Bowtie2)、ピークを抽出した (MACS2)。さらに、組織毎に特異的なピークを解析し、角特異的なオープンクロマチン領域を特定した。

(6) Selex 解析によるシス制御配列の推定

研究成果 (4) で得られた遺伝子制御関係のうち、上流に位置する遺伝子について、Trx タグ融合タンパク質を作製した。

上記の融合タンパク質を用いて Selex 解析を行ない、シス制御配列を含む領域を濃縮した。この PCR 産物よりライブラリを調整し、Mi-seq を用いてシーケンスした。

得られたリードよりモチーフを検索し (MEME)、シス制御配列を推定した。

(7) ゲルシフトアッセイによるシス制御配列の同定

研究成果 (4) で得られた下流で機能している遺伝子座周辺のオープンクロマチン領域に研究成果 (6) で得られたシス制御配列の有無を解析した。この結果、下流で機能している遺伝子座周辺にシス制御配列の存在が確認できた。

シス制御配列が存在した遺伝子において、蛍光プローブを作製し、ゲルシフトアッセイを行なったところバンドのシフトが確認された。この結果は、研究成果 (4) で遺伝子制御

関係が予測された遺伝子のうち、直接下流の遺伝子を制御しているであろう遺伝子が存在していることを示唆した。

以上の解析を行ない、本研究の目的である角形成に関連遺伝子を多く同定し、いくつかの角形成を制御する遺伝子制御ネットワークの実体を解明することに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2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 森田慎一・新美輝幸	4. 巻 89
2. 論文標題 カブトムシの角発生メカニズム	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 蚕糸昆虫バイオテック	6. 最初と最後の頁 145-151
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 森田慎一・新美輝幸	4. 巻 74
2. 論文標題 カブトムシの角の形成に性差ができる時期を特定！	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 化学	6. 最初と最後の頁 73
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 新美輝幸・安藤俊哉・森田慎一	4. 巻 44
2. 論文標題 RNAi法で探る非モデル昆虫の形作りの仕組み	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本農薬学会誌	6. 最初と最後の頁 219-225
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Morita, S., Sakura, K., Gotoh, H., Emlen, D. J., Niimi T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Recent advances in understanding horn formation in the Japanese rhinoceros beetle <i>Trypoxylus dichotomus</i> using next generation sequencing technology	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Curr. Opin. Insect Sci.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cois.2022.100901	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 Sakura, K.* and Morita, S.*, Niimi T. (* contributed equally to this work)	4. 巻 12
2. 論文標題 RNA Interference Method for Gene Function Analysis in the Japanese Rhinoceros Beetle <i>Trypoxylus dichotomus</i> .	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bio-protocol	6. 最初と最後の頁 e4396.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21769/BioProtoc.4396	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8件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 森田慎一・加藤輝・前野哲輝・新美輝幸
2. 発表標題 マイクロフォーカスX線CT法によるカブトムシの角形態の観察と計測
3. 学会等名 第14回 NIBB Bioimaging Forum 「非光学的モダリティによる生物イメージングの新展開」 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Niimi, T. and Morita, S.
2. 発表標題 Towards the elucidation of the horn formation mechanism in the Japanese rhinoceros beetle using NGS analyses.
3. 学会等名 The 43rd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Workshop 1AW-14, "Adaptive evolution and genome-wide analysis of fish and insects" (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森田慎一・新美輝幸
2. 発表標題 カブトムシの角形成を制御する遺伝子制御ネットワークの解析
3. 学会等名 第90回 日本動物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新美輝幸・森田慎一・大出高弘
2. 発表標題 カブトムシの角形成機構から新規形質の進化を探る
3. 学会等名 第90回 日本動物学会（招待講演）
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 昆虫の多様な形質をもたらす分子メカニズムを探る
3. 学会等名 第31回 高遠・分子細胞生物学シンポジウム（招待講演）
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 昆虫の模様と形の進化発生生物学
3. 学会等名 2019年度 昆虫DNA研究会第16回研究集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Niimi, T. and Morita, S.
2. 発表標題 Towards the elucidation of the horn formation mechanism in the Japanese rhinoceros beetle
3. 学会等名 The 93rd Annual Meeting of the Genetics Society of Japan, Joint International Symposium (S1) “ Evolution and Development of Insects in New Genomic Era ”（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森川健太郎・森田慎一・左倉和喜・後藤寛貴・新美輝幸・井上康博
2. 発表標題 三次元形態形成における上皮細胞シートの面積拡大率分布の推定手法の開発
3. 学会等名 第32回バイオフロンティア講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Morita, S., Sakura, K. Niimi T.	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Springer Nature Singapore Pte Ltd.	5. 総ページ数 -
3. 書名 Spectrum of sex in a horn of the Japanese rhinoceros beetle	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------