

機関番号：32659

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570211

研究課題名 (和文) 昆虫類の翅と鰓脚亜綱甲殻類の背甲との進化的関係の解明

研究課題名 (英文) Analyses on evolutionary relationship between insect wings and crustacean carapaces

研究代表者

志賀 靖弘 (SHIGA YASUHIRO)

東京薬科大学・生命科学部・助教

研究者番号：00277253

研究成果の概要 (和文)：

研究代表者は、昆虫の背部平板状構造物である翅を発生させるために必須の3つの遺伝子が、ミジンコを始めとした鰓脚亜綱甲殻類の背部平板状構造物である背甲においても必須であることを見出し、この分子機構が甲殻類と昆虫類の共通祖先に既に存在していたことを明らかにした。また各種マーカー遺伝子の発現を昆虫と甲殻類で詳細に比較することによって、同じ分子機構を使いながら、昆虫の翅と甲殻類の背甲は全く独立に進化してきたことを示した。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, I revealed that three essential genes for insect wing development also play inevitable roles in crustacean carapace development, suggesting that this molecular mechanism existed in the last common ancestor of insects and crustaceans. By detailed comparisons of various marker gene expressions, I suggested that this molecular mechanism for dorsal flat outgrowth was co-opted during arthropod evolution and that crustacean carapaces and insect wings have evolved independently.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：進化発生生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：ミジンコ、背甲、昆虫、翅、進化発生生物学、vestigial, scalloped, wingless

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 昆虫類は地球上に生息する全生物の70%以上を占めるが、その繁栄の裏には「翅の進化」があったことは言うまでもない。翅の形態的起源に関しては古くから多くの議論がなされ、本研究の開始当初までに1) 昆虫の祖先の脚に存在していた鰓が背部に移動して翅に進化した、2) 背部の上皮上に新奇の構造として翅が進化した、という二つの説が主に提唱されていたが、

どちらの説がより正しいのか結論は出ていなかった。

(2) 同時期までに昆虫の二つの翅パターン化遺伝子 (*nubbin* および *apterous*) が、甲殻類生物の発生過程において、脚の鰓 (副肢) 部分で発現していることが報告され、昆虫の祖先の脚に存在していた鰓が背部に移動して翅に進化したという説が主流になりつつあったが、昆虫の

翅パターン化遺伝子のいくつかが甲殻類生物の鰓で発現している事を理由に「鰓が翅の起源である」と断定するのは余りにも早急であると思われた。

(3) そこで研究代表者は、昆虫と甲殻類の共通祖先型の形質を進化的に保持している事が期待される鰓脚亜綱甲殻類生物から、昆虫類の翅のマスター遺伝子と考えられている転写補助因子の *vestigial* (*vg*) と転写因子 *scalloped* (*sd*) の相同遺伝子をクローン化し、その胚発生過程における発現パターンや遺伝子の機能を解析する必要があるとの考えに至った。

## 2. 研究の目的

上記した背景を踏まえ、本研究課題では、昆虫類の翅と鰓脚亜綱甲殻類の背甲の進化的関係の解明を最終目標に、ミジンコ *vg* および *sd* の発現部位、タンパク質の機能、更には遺伝子発現制御の分子機構を中心に、詳細に解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 鰓脚亜綱甲殻類 (ミジンコ、ブラインシュリンプ、カプトエビ) および軟甲綱甲殻類 (ヨコエビ、ザリガニ) からの *vg* および *sd* 遺伝子の単離と、遺伝子およびタンパク質レベルでの発現部位の同定。

(2) ミジンコの各種背甲形成関連マーカー遺伝子の単離と発現部位の同定。多重免疫染色、二重 *in situ* hybridization による発現部位の1細胞レベルでの解析。

(3) RNAi 法によるミジンコ *vg*、*sd*、および各種背甲形成関連マーカー遺伝子の機能解析。RNAi 胚において発現が変化する背甲形成関連遺伝子の探索。

(4) ミジンコ *vg* および *sd* 遺伝子発現調節エレメントの探索。

(5) ミジンコ VG および SD タンパク質の生化学的解析。

(6) ミジンコ形質転換系開発の試みと各種遺伝子の過剰発現による機能解析

## 4. 研究成果

(1) ミジンコ *vg* および *sd* cDNA をクローン化し、mRNA およびタンパク質レベルでの発現パターンを解析したところ、これら2つの遺伝子は背甲が形成され始める胚発生過程の中期から背甲の周縁部で強く共発現していたが、胸脚の鰓部分における発現は発生を通じて全く見られなかった。ミジンコなど鰓脚亜綱甲殻類の背甲は2つの細胞層が伸長した薄膜状の構造物であ

るが、このような形態の背甲はカンブリア紀初期には既に存在していたことが化石記録からも明らかである。また先述した昆虫の二つの翅パターン化遺伝子である *nubbin* および *apterous* は、ミジンコの発生過程においても、脚の鰓 (副肢) 部分で強く発現していたが、背甲形成時における発現は、2種類あるミジンコ *apterous* 遺伝子の1つが発生後期になってから一時的に発現する以外は全く観察されなかった。これらの事実は、有翅昆虫が進化するデボン紀初期から少なくとも1億5千万年前には、節足動物の背部側に薄膜上の構造物を形成する為に必要な分子機構が既に存在していたこと、即ち必ずしも脚の鰓部分が背中側に移動して翅に進化する必要はなかったことを強く示唆する。

(2) また長年の論争にも拘らず、鰓脚亜綱甲殻類の背甲がどの体節由来の構造物なのかはこれまで明らかになっていなかった。本研究において、腹側では第1および第2小顎体節で発現している Hox タンパク質である *Sex combs reduced* (*Scr*) のみが特異的に背甲全体で発現しており、近接する領域で発現する *Deformed* や *Antennapedia* などその他の Hox タンパク質は背甲形成に関与していないことを明らかにした。即ちミジンコなど鰓脚亜綱甲殻類の背甲は第1および第2小顎体節由来である決定的な証拠を遺伝子発現のレベルで初めて示したことになる。

(3) ミジンコ VG および SD タンパク質の生化学的性質を解析するために、両組み換えタンパク質を大腸菌で発現させた。両者とも菌体内で多量の封入体を形成してしまったために、生化学的解析にまでは至らなかった。

(4) ミジンコの背甲形成関連遺伝子群 *vg*、*sd*、および *wg* の2本鎖RNAを初期胚内にマイクロインジェクションし、RNA干渉法によりそれらの遺伝子機能を抑制した場合に背甲形成にどのような影響があるのかを解析した。*vg* RNAi 胚は初期ステージで発生が停止してしまっていたが、*sd* および *wg* RNAi 胚では、後期ステージまでその発生が進んだ。これらの遺伝子の RNAi 胚では、背甲部の周縁領域がほとんど伸長しておらず、不完全な背甲しか形成されなかった。また cDNA の重ならない、異なった領域から合成した二本鎖RNAを用いて同様に解析したところ、同じような表現形の胚が得られた。これらの結果から、ショウジョウバエの翅の周縁部伸長に必須なこれらの遺伝子が、ミジンコ背甲の発生においても、同じように周縁部の伸長に必須の役割を果たしていることを明らかにした。

(5) ミジンコ *wg* RNAi 胚における SD および VG の発現を2重免疫染色法により解析した。その結果、強い表現形を示す *wg* RNAi 胚においても SD および VG の背甲の縁における発現は正常

であった。ショウジョウバエ翅においては、SD および VG 発現の開始と維持は WG の制御下にあることが知られているが、ミジンコの VG および SD の発現の開始と維持は、ショウジョウバエと異なり、WG の制御下にないことを明らかにした。

(6) ショウジョウバエで良く知られている *vg* 遺伝子の 2 つのエンハンサー (boundary enhancer および Quadrant enhancer) と相同性の高い配列を、ミジンコおよびオオミジンコ *vg* 遺伝子周辺の配列内で探索したが、両ゲノム中には類似配列は存在しなかった。

(7) 各種背甲形成関連マーカー遺伝子の解析により、背甲の周縁部の前部 (表面) 側において *vg* および *sd* と *wingless (wg)* が共発現していること、および隣接する背甲周縁部の後部 (裏面) 側における *engrailed (en)* との排他的に発現していることを明らかにした。ショウジョウバエを始めとした昆虫の翅の周縁部が背腹軸境界に沿って形成されるが、ミジンコ背甲の周縁部はこれらとは異なり、前後軸の境界に沿って形成される (即ち体軸に対する方向が 90 度ずれていることになる)。以上の結果をまとめると、ショウジョウバエの翅形成とミジンコの背形成には VG, SD, WG が関与する同じ遺伝子モジュールが使用されているが、両器官には進化的な相同性がない事が強く示唆された。

(8) ミジンコ以外の甲殻類生物からの「背甲形成関連遺伝子の単離とその発現部位の同定」に関しては、以下に生物ごとに述べる。

① ブラインシュリンプはミジンコと同じ鰓脚亜綱に属するが、背甲を持たないため“無甲目”に分類されている。また化石記録上、同目は進化の過程で背甲を失った可能性がある。ブラインシュリンプから *sd* 遺伝子を単離し、ミジンコと同様に *in situ hybridization* でその mRNA の発現領域を解析したところ、胸部付属肢の腹側などで特異的な発現が観察されたが、背側体幹部における発現は全く見られなかった。また同タンパク質の発現を解析するために特異抗体を作製した。またブラインシュリンプの *Scr* および *wg* 遺伝子の一部を PCR により増幅した。

② カブトエビもミジンコと同じ鰓脚亜綱に属するが、ミジンコとは異なり平板に近い背甲を持つ。またカブトエビの *wg* 遺伝子が背甲の周縁で発現していることは既に他のグループから報告されている。本研究ではカブトエビの完全長 *sd* および *Scr* 遺伝子を単離した。

③ ザリガニは甲殻類の中ではミジンコなどとは遠縁な軟甲綱に属する。『背甲』を持つが、この『背甲』が鰓脚亜綱甲殻類の『背甲』と相同器官かどうかは結論が出ていない。本研究ではザリガニ *sd* 遺伝子の一部を増幅した。

④ ヨコエビはザリガニと同じ軟甲綱に属しており、背甲は持たない。PCR で単離した *sd* 遺伝子

の一部をプローブにして *in situ hybridization* で mRNA の発現部位を解析したところ、背板、底節板、および一部の胸脚に形成される平板構造の周縁部で発現していた。この結果は、背部側に薄膜上の構造物を形成する為に必要な VG/SD/WG が関連する分子機構を使って、どのような構造を作り上げるかは甲殻類内でも様々であったことを示唆する。

(9) ミジンコの形質転換法の確立を試みるために、形質転換のためのベクターを PiggyBac トランスポゾンを用いて作製した。この形質転換ベクターをミジンコ胚にマイクロインジェクションし、ミジンコの形質転換法の確立を試みたが、残念ながら目的の形質転換体は得られなかった。

## 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 2 件)

① Colbourne JK, Pfrender ME, Gilbert D, Thomas WK, Tucker A, Oakley TH, Tokishita S, Aerts A, Arnold GJ, Basu MK, Bauer DJ, Cáceres CE, Carmel L, Casola C, Choi JH, Detter JC, Dong Q, Dusheyko S, Eads BD, Fröhlich T, Geiler-Samerotte KA, Gerlach D, Hatcher P, Jogdeo S, Krijgsveld J, Kriventseva EV, Kültz D, Laforsch C, Lindquist E, Lopez J, Manak JR, Muller J, Pangilinan J, Patwardhan RP, Pitluck S, Pritham EJ, Rechtsteiner A, Rho M, Rogozin IB, Sakarya Q, Salamov A, Schaack S, Shapiro H, Shiga Y, Skalitzky C, Smith Z, Suvorov A, Sung W, Tang Z, Tsuchiya D, Tu H, Vos H, Wang M, Wolf YI, Yamagata H, Yamada T, Ye Y, Shaw JR, Andrews J, Crease TJ, Tang H, Lucas SM, Robertson HM, Bork P, Koonin EV, Zdobnov EM, Grigoriev IV, Lynch M, Boore JL. The Ecoresponsive Genome of *Daphnia pulex*. Science(査読有) 331 巻 2011 年 555-561

② Kato Y, Shiga Y, Kobayashi K, Tokishita S, Yamagata H, Iguchi T, Watanabe H. Development of an RNA interference method in the cladoceran crustacean *Daphnia magna*. Development, Genes and Evolution(査読有) 220 巻 2011 年

[学会発表] (計 8 件)

① 小松原英介. Analysis of microRNAs in the Hox cluster in the water flea, *Daphnia magna*. 第 33 回日本分子生物学会 (BMB2010) 2010 年 12 月 7 日、神戸

② 池田匡. オオミジンコにおける NK 遺伝子の単離と解析. 第 33 回日本分子生物学会

(BMB2010) 2010年12月9日、神戸

③志賀靖弘 Co-option of a conserved gene regulatory module during the evolution of flat outgrowths in Arthropods. 第12回日本進化学会大会 国際ワークショップ (招待講演) 2010年8月4日、東京

④小松原英介 Analysis of microRNAs in the Hox cluster in the water flea, *Daphnia magna*. 第43回日本発生生物学会年会 2010年6月21日、京都

⑤Yasuhiro Shiga Co-option of a conserved gene regulatory module during the evolution of wings, carapace and other flat outgrowths. *Daphnia* Genomics Consortium meeting 2010 2010年3月29日 ルーヴェン (ベルギー)

⑥志賀靖弘 Co-option of a conserved gene regulatory module during the evolution of wings, carapace and other flat outgrowths. 第32回日本分子生物学会年会 (招待講演) 2009年12月10日 横浜

⑦原口卓之 Analyses of insect wing-developing genes in the brine shrimp *Artemia franciscana*. 日本発生生物学会第42回大会 2009年5月28日 新潟

⑧志賀靖弘 Analyses of master genes for insect wing development, *vestigial* and *scalloped*, in the water flea, *Daphnia magna*. 日本発生生物学会第41回大会 (ISDB 共催) 2008年5月28日 徳島

[その他]

掲載新聞名：

- ①読売新聞(朝刊)平成23年2月4日 (34面)
- ②毎日新聞(夕刊)平成23年2月4日 (1,14面)
- ③朝日新聞(朝刊)平成23年2月15日 (23面)
- ④静岡新聞(夕刊)平成23年2月4日 (2面)
- ⑤朝日小学生新聞 平成23年2月6日 (1面)

掲載ホームページ名、URL：

①時事通信「ミジンコのゲノム解読＝甲殻類初、環境評価に応用期待-東京薬科大など国際チーム」2月4日配信

<http://www.jiji.com/jc/zc?k=201102/2011020400057>

②東京薬科大学生命科学部ホームページ 「ミジンコの環境応答性ゲノムを解読」、

<http://www.ls.toyaku.ac.jp/2011/110206/110206.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

志賀 靖弘 (SHIGA YASUHIRO)

東京薬科大学・生命科学部・助教

研究者番号：00277253

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：