

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 18日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2008～2011

課題番号：20687005

研究課題名（和文）昆虫類多様化の鍵を握る「翅の起源」に関する比較発生学的研究

研究課題名（英文）A comparative embryological research for the “origin of the insect wings”: A key factor to the diversification of insects

研究代表者

東城 幸治 (TOJO KOJI)

信州大学・理学部・准教授

研究者番号：30377618

研究成果の概要（和文）：昆虫類の多様化の鍵を握ると考えられる「翅の獲得」や「翅の起源」に関して、翅をもつ最も原始的な昆虫種群であるカゲロウ類に注目し、比較発生学的アプローチ、ならびに発生遺伝学的アプローチを行った。関連性が示唆される、付属肢、鰓、翅原基の形態学的な比較とこれらの形態形成に関わる遺伝的基盤に関する知見を深めると共に、翅の起源に関する独自のアイデアを提唱した。

研究成果の概要（英文）：For the “origin of the insect wings” and “acquisition of the wings”, I have conducted comparative embryological research, and also genetic developmental research, focusing on the mayflies, which is a group of the most basal lineages within the pterygotans (wing acquired insects). I have suggested that the homology embryologically between appendages, gills and wing primordial, and also observed the genetic regulation pattern of the formation of appendages, gills, and wings. I have integrated these results, I proposed the newly idea of their own the origin of the insects wings.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,500,000	2,550,000	11,050,000
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	2,300,000	690,000	2,990,000
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生物多様性・分類

キーワード：進化、多様性、昆虫、翅の起源、比較発生、相同、適応、カゲロウ

## 1. 研究開始当初の背景

昆虫類は、約180万種とされる全記載生物の半数以上の種数を占めており、種多様性の観点からは地球上で最も多様な生物種群であると考えられる。また、約97%の昆虫種を有翅昆虫類が占めることから、昆虫類の翅の獲得が、種多様化に果たした役割は極めて大

きいと考えられている。昆虫類における翅の獲得は、およそ4億年前のシルル紀後期頃と極めて古く、地球上で最初に飛翔に成功したことから空ニッチを存分に利用することができたとも考えられている。

しかし一方では、あまりにも古い時代の進化的イベントであるが故に、翅がどのように

起源したのか？ に関しては、依然として異論が絶えない。伝統的には、昆虫類の背側板の表皮が突出したとする「背側板起源説 paranotal theory」が受け入れられて来たものの、どのように翅を可動させる筋肉系が関与できたのかなどについては十分に説明し切れていない。近年では、最原始有翅昆虫類であるカゲロウ類の翅原基と腹部気管鰓との間に連続相同性 serial homology を想定する「鰓起源説 gill theory」が広く受け入れられている。この鰓起源説においては、鰓を付属肢基部環節の外葉 exite (特に epicoxal exite) と相同であるとの観点から、「外葉起源説 epicoxal exite theory」や「付属肢起源説 appendicular origin theory」などとも称されている。

## 2. 研究の目的

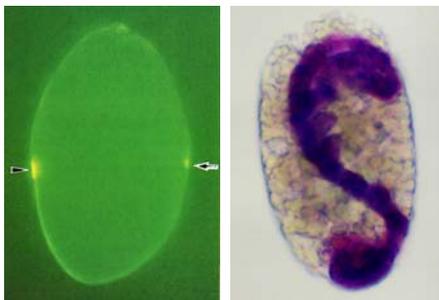
上記の背景に記したように、昆虫類の翅の起源を巡っては、2つの主要な仮説が提唱されてはいるものの、依然としてコンセンサスが得られているとは言い難い状況にあるため、本研究では有翅昆虫類の最原始クレードであるカゲロウ類を対象に、その形態形成プロセスを詳細に観察する比較発生学的研究、および、カゲロウ類の形態形成プロセスにおいて、どのような遺伝子がどのように関与・制御しているのか？ 特に翅形成や付属肢、鰓形成における遺伝的基盤の究明に取り組むこととした。

そして、これらの知見に基づき、従来、論争が続いてきた昆虫類の翅の起源に関する考察を深めることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 比較発生学的研究 (主として形態学的研究) には、オビカゲロウ *Bleptus fasciatus*, オオシロカゲロウ *Ephoron shigae*, アカツキシロカゲロウ *Ephoron eophilum*, そしてフタスジモンカゲロウ *Ephemera japonica* などを中心に野外から採取した交尾済みメス個体を採取し、実験室内で産卵をさせて、比較発生学的研究の試料とした。

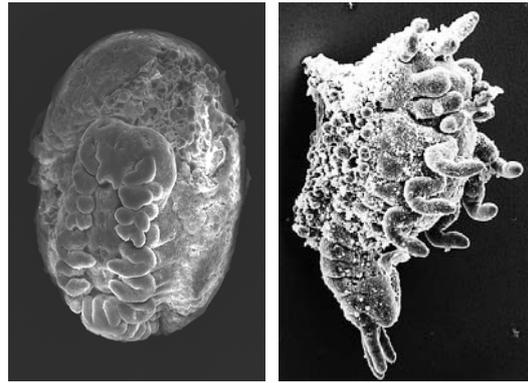
卵を解剖することで各発生ステージの胚



を摘出し、観察内容に応じた固定を行った。核を

特異的に染色する Tionin 染色、Hoechst 染色、DAPI 染色などで胚の外部形態を観察すると共に (上図)、走査型電子顕微鏡による

観察も実施した (下図)。また、卵から卵殻を摘出した後に、卵そのものを樹脂包埋し、



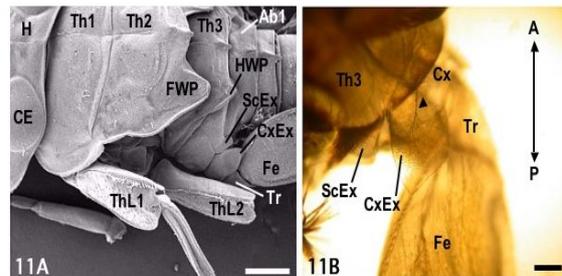
準薄切片を作製し、胚発生の詳細を観察すると共に (下図)、必要に応じては透過型電子顕微鏡による観察も実施した。



(2) 発生遺伝学的研究には、主として、アカツキシロカゲロウ *Ephoron eophilum*, フタスジモンカゲロウ *Ephemera japonica* を対象にした。ショウジョウバエ研究などを参考に、翅形成における関与や付属肢形成における関与が記載される *distal-less (Dll)*, *wingless (wg)*, *vestigial (vg)*, そして *apterous (ap)* に着目し、胚発生期において、これらの遺伝子がどのように発現するかを *in situ* hybridization 法により観察した。

## 4. 研究成果

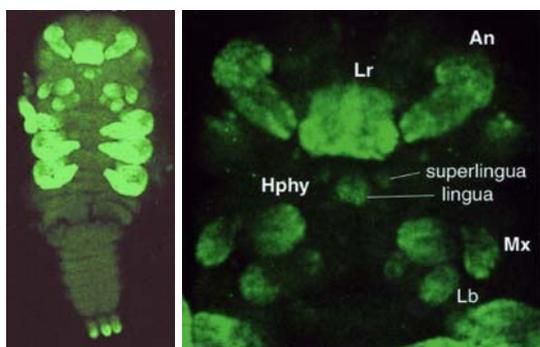
(1) 形態形成および比較発生学的研究において、現生の原始的カゲロウ種群から現生種では完全に退化してしまったものと考えられてきた付属肢基部環節の外葉 (coxal, subcoxal exites) に相当する構造を見いだした (下図)。現生の有翅昆虫類におけるこれらの構造の発見は世界初である。形態学的



精査や形成プロセスの精査から、カゲロウ類の幼生に認められる翅原基とこれらの付属肢基部節の外葉の相同性は確実であると結論した。

(2) 次に、翅の起源において重要視されてきた付属肢やカゲロウ幼生の腹部気管鰓に関して、これらの形成時に重要な役割を果たすと考えられる遺伝的基盤についても、アカツキシロカゲロウ *Ephoron eophilum* とフタスジモンカゲロウ *Ephemera japonica* における研究で、たいへん重要な知見が得られた。

付属肢の先端部(端肢節 telopodite)に特異的に発現すると考えられてきた *Dll* は、付属肢端肢節特異的な発現ではなく、非付属肢起源の構造物であっても外側(体軸に対して先端側 distal)へと突出する構造物であれば、その先端部分に発現することを明らかにした(下図)。



また、付属肢分化において重要な役割を担うと予想された *wg*, *vg* の両遺伝子に関しては、ショウジョウバエで報告されている発現パターンとはほぼ合致するような発現であることが明らかとなった。また、これらの遺伝子の発現が腹部気管鰓の分化にも極めて深く関与していることが明らかとなった。*Dll* 同様に、外側へと突出する構造の形成への関与が認められた。

*ap* に関しては、上記の遺伝子群のような突出構造の誘導ではなく、広く葉状(lobe-like)に広がる構造物の縁特異的に発現することが明らかとなった。

そして、以上の遺伝的基盤の研究と比較形態学的研究知見を総合すると、昆虫類の翅の起源に関しては、付属肢基部関節の外葉との相同性が高く、鰓との相同性も極めて強いこと、そして、この突出構造が、突起状になるのか?あるいは葉状になるのか?は、遺伝的基盤の相違ではなく、関与する遺伝子セットは同一でありながら、その発現の場がより背側であれば葉状化が強く誘導され、逆により腹側で発現すればより鋭い突起状の構造となること、すなわち、肢状の突起にも鰓にも、葉状の鰓や翅にも分化できるような統一的原理に辿り着くことができた。さらに、このように新規提唱した仮説は、従来、しばしば対比され論争されてきた「背側板起源

説」と「鰓(付属肢)起源説」とを排他的に評価するものではなく、いずれの説にも一理あることを示す、融合的な説であると言える。

この結論は、既に共同研究の論文として *Evolution & Development* 誌に公表され、国内外のメディア(USA Today, 理研 CDB 科学ニュース、早稲田ウェブマガジン、信濃毎日新聞社)にも取り上げられるなど、ある程度のインパクトのある研究成果として評価されたと考えている。

## 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14件)

- ① 東城幸治, 水生昆虫学における遺伝子解析手法の貢献と未来像, 水環境学会誌, 35 巻, 114-117, 2012, 依頼執筆, 査読有
- ② Sekine K and Tojo K, Potential for parthenogenesis of virgin females in the mayfly *Ephoron eophilum* (Insecta: Ephemeroptera, Polymitarcyidae), *Proc. Arthropod. Embryol. Soc. Jpn.*, 46 巻, 15-16, 2011, 査読有
- ③ Ogitani M, Sekine K and Tojo K, Habitat segregation and genetic relationship of two heptageniid mayflies, *Epeorus latifolium* and *Epeorus l-nigrus*, in the Shinano-gawa River basin, *Limnology*, 12 巻, 117-125, 2011, 査読有, doi: 10.1007/s10201-010-0328-y
- ④ Nagakubo A, Sekine K, Tanaka Y, Kuranishi RB, Kanada S and Tojo K, Rapid expansion of the distributional range and the population genetic structure of the freshwater amphipod *Crangonyx floridanus* in Japan, *Limnology*, 12 巻, 75-82, 2011, 査読有, doi: 10.1007/s10201-010-0323-3
- ⑤ Niwa N, Akimoto-Kato A, Niimi T, Tojo K, Machida R and Hayashi S, Evolutionary origin of the insect wing via integration of two developmental modules, *Evol. Dev.*, 12 巻, 168-176, 2010, 査読有, doi: 10.1111/j.1525-142X.2010.00402.x
- ⑥ Oka K, Yoshiyama N, Tojo K, Machida and Hatakeyama M, Characterization of abdominal appendages in the sawfly, *Athalia rosae* (Hymenoptera), by morphological and gene expression analyses, *Dev. Genes Evol.*, 220 巻, 53-59, 2010, 査読有, doi: 10.1007/s00427-010-0325-5
- ⑦ Sekine K and Tojo K, Automictic parthenogenesis of a geographically

- parthenogenetic mayfly, *Ephoron shigae* (Insecta: Ephemeroptera, Polymitarcyidae). Biol. J. Linn. Soc, 99 卷, 335-343, 2010, 査読有, doi: 10.1111/j.1095-8312.2009.01351.x
- ⑧ Sekine K and Tojo K, Potential for parthenogenesis of virgin females in a bisexual population of the geographically parthenogenetic mayfly *Ephoron shigae* (Insecta: Ephemeroptera, Polymitarcyidae). Biol. J. Linn. Soc, 99 卷, 326-334, 2010, 査読有, doi: 10.1111/j.1095-8312.2009.01350.x
- ⑨ Tojo K, Tanaka Y, Kuranishi RB and Kanada S, Reproductive biology and adaptability of the invasive alien freshwater amphipod *Crangonyx floridanus* (Crustacea: Amphipoda, Crangonyctidae). Zool. Sci, 27 卷, 522-527, 2010, 査読有, doi: 10.2108/zsj.27.522
- ⑩ Yoshiyama N, Tojo K and Hatakeyama M, Establishment of larval RNAi in the sawfly, *Athalia rosae ruficornis* Jakovlev (Hymenoptera) aiming at functional analysis of genes involved in appendage development during larval-adult transition, Proc. Arthropod. Embryol. Soc. Jpn, 45 卷, 35-36, 2010, 査読有
- ⑪ Kano T, Yamazaki K and Tojo K, A preliminary note on formation of the digestive tract during the early embryonic stages in a viviparous scorpion *Liocheles australasiae*. Proc. Arthropod. Embryol. Soc. Jpn., 45 卷, 37-38, 2010, 査読有
- ⑫ Tanaka Y and Tojo K, Embryogenesis of *Crangonyx floridanus* (Crustacea: Crangonyctidae). Proc. Arthropod. Embryol. Soc. Jpn, 44 卷, 49-51, 2009, 査読有
- ⑬ Sekine K and Tojo K, Potential for parthenogenesis of females in a bisexual population of the geographically parthenogenetic mayfly *Ephoron shigae* (Ephemeroptera, Polymitarcyidae). Proc. Arthropod. Embryol. Soc. Jpn, 44 卷, 33-34, 2009, 査読有
- ⑭ Tojo K, Palaeoptera or Metapterygota?: A comparative embryological approach, Proc. Arthropod. Embryol. Soc. Jpn, 43 卷, 43-55, 2009, 査読有
- [学会発表] (計 42 件, 国際学会のみ掲載)
- ① Sekine K and Tojo K, The origin and expansion of unisexual populations for the geographically parthenogenetic mayfly *Ephoron shigae* (Ephemeroptera: Polymitarcyidae), The 1st Symposium of Benthological Society of Asia, 2012.6.11-14, Matsumoto
- ② Tojo K, Evolutionary origin of the insect wing: Approach from Ephemeropteran embryology, The 1st Symposium of Benthological Society of Asia, 2012.6.11-14, Matsumoto
- ③ Kato Y and Tojo K, Molecular phylogenetic relationships of East Asian *Yoraperla* stoneflies (Plecoptera, Peltoperlidae), The 1st Symposium of Benthological Society of Asia, 2012.6.11-14, Matsumoto
- ④ Kato Y and Tojo K, Molecular phylogenetic relationships of East Asian *Cryptoperla* stoneflies (Plecoptera, Peltoperlidae), The 1st Symposium of Benthological Society of Asia, 2012.6.11-14, Matsumoto
- ⑤ Kume A, Suzuki A and Tojo K, A study into the dispersion pattern of a cosmopolitan distributed *Milnesium cf. tardigradum*: A molecular phylogenetic approach. The 1st Symposium of Benthological Society of Asia, 2012.6.11-14, Matsumoto
- ⑥ Morii Y, Yoshii M, Kishimoto T and Tojo K, Molecular biogeography of the scopurid stoneflies (Plecoptera, Scopuridae), The 1st Symposium of Benthological Society of Asia, 2012.6.11-14, Matsumoto
- ⑦ Morii Y, Yoshii M, Kishimoto T and Tojo K, The parapatric distribution pattern derived from reproductive interference between two closely related scopurid stoneflies (Plecoptera, Scopuridae), The 1st Symposium of Benthological Society of Asia, 2012.6.11-14, Matsumoto
- ⑧ Saito R and Tojo K, Genetic structures of the isonychiid mayfly *Isonychia japonica* (Ephemeroptera, isonychiidae), The 1st Symposium of Benthological Society of Asia, 2012.6.11-14, Matsumoto
- ⑨ Suzuki T and Tojo K, Phylogeography of two Japanese giant water bugs, *Appasus japonicus* and *Appasus major* (Heteroptera: Belostomatidae), The 1st Symposium of Benthological Society of Asia, 2012.6.11-14, Matsumoto
- ⑩ Takenaka M and Tojo K, Genetic structure of dipteromimid mayflies endemic to Japan (Ephemeroptera,

- Dipteromimidae), The 1st Symposium of Benthological Society of Asia, 2012. 6. 11-14, Matsumoto
- ⑪ Tojo K, Evolutionary origin of the insect wing: Approach from Ephemeropteran embryology, Internationa Joint Meeting of 13th International Conference on Ephemeroptera & 17th International Symposium on Plecoptera, 2012. 6. 3-9, Wakayama
- ⑫ Sekine K and Tojo K, Origin and expansion of unisexual populations for the geographically parthenogenetic mayfly *Ephoron shigae* (Ephemeroptera: Polymitarciidae), Internationa Joint Meeting of 13th International Conference on Ephemeroptera & 17th International Symposium on Plecoptera, 2012. 6. 3-9, Wakayama
- ⑬ Kato Y and Tojo K, Molecular phylogenetic relationships of East Asian *Yoraperla* stoneflies (Plecoptera, Peltoperlidae), Internationa Joint Meeting of 13th International Conference on Ephemeroptera & 17th International Symposium on Plecoptera, 2012. 6. 3-9, Wakayama
- ⑭ Kato Y and Tojo K, Molecular phylogenetic relationships of East Asian *Cryptoperla* stoneflies (Plecoptera, Peltoperlidae), Internationa Joint Meeting of 13th International Conference on Ephemeroptera & 17th International Symposium on Plecoptera, 2012. 6. 3-9, Wakayama
- ⑮ Takenaka M and Tojo K, Genetic structure of dipteromimid mayflies endemic to Japan (Ephemeroptera, Dipteromimidae), Internationa Joint Meeting of 13th International Conference on Ephemeroptera & 17th International Symposium on Plecoptera, 2012. 6. 3-9, Wakayama
- ⑯ Morii Y, Yoshii M, Kishimoto T and Tojo K, The parapatric distribution pattern derived from reproductive interference between two closely related scopurid stoneflies (Plecoptera, Scopuridae), Internationa Joint Meeting of 13th International Conference on Ephemeroptera & 17th International Symposium on Plecoptera, 2012. 6. 3-9, Wakayama
- ⑰ Morii Y, Yoshii M, Kishimoto T and Tojo K, Differences of the eclosion pattern between closely related scopurid stoneflies (Plecoptera, Scopuridae), Internationa Joint Meeting of 13th International Conference on Ephemeroptera & 17th International Symposium on Plecoptera, 2012. 6. 3-9, Wakayama
- ⑱ Machida R, Uchifune T and Tojo K, Egg structures and embryological features of heel-walkers (Mantophasmatodea). 23rd International Congress of Entomology, 2008. 7. 6-12, Durban, South Africa
- ⑲ Tojo K and Miyairi K, 'Exite'-like structures on the thoracic appendicular bases of the mayfly *Bleptus fasciatus* Eaton (Ephemeroptera: Heptageniidae), 23rd International Congress of Entomology, 2008. 7. 6-12, Durban, South Africa
- ⑳ Sekine K and Tojo K, Potential for parthenogenesis of females in a bisexual population of the geographically parthenogenetic mayfly *Ephoron shigae* (Polymitarciidae), Internationa Joint Meeting of 12th International Conference on Ephemeroptera & 16th International Symposium on Plecoptera, 2008. 6. 8-14, Stuttgart, Germany
- (21) Tojo K and Miyairi K, 'Exite'-like structures on the thoracic appendicular bases of a headwater-specific mayfly *Bleptus fasciatus* Eaton (Ephemeroptera: Heptageniidae), Internationa Joint Meeting of 12th International Conference on Ephemeroptera & 16th International Symposium on Plecoptera, 2008. 6. 8-14, Stuttgart, Germany
- \*他、国内学会での発表多数
- [図書] (計4件)
- ① 東城幸治, 岩波書店, 生物学辞典 (分担執筆), 2012 (印刷中)
- ② 東城幸治, 朝倉書店, 水辺の環境科学 I (分担執筆), 2012 (印刷中)
- ③ 東城幸治, 朝倉書店, 水辺の環境科学 II (分担執筆), 2012 (印刷中)
- ④ 東城幸治, オフィスエム, 山に登った虫たち, 2012, pp. 24-54
- [その他]
- ホームページ等  
信州大学学術情報オンラインシステム SOAR  
<http://soar-rd.shinshu-u.ac.jp/profile/ja.0Ccebhlh.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東城 幸治 (TOJO KOJI)

信州大学・理学部・准教授

研究者番号 : 30377618