

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：63904

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21436

研究課題名（和文）対の器官における左右非対称性の分子機構とその進化プロセスの解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of the left-right asymmetry in the paired organs: A study focused on the forewings of the Japanese bell cricket

研究代表者

中村 太郎（Nakamura, Taro）

基礎生物学研究所・進化発生研究部門・助教

研究者番号：80548834

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、コオロギ科に属するスズムシ *Homoeogryllus japonicus* の前翅に存在する発音器官が左右で非対称に形成されることに着目し、1対の器官に生じる左右非対称性の分子基盤を明らかにすることを目的とした。本課題遂行の結果、発音器官形成時期を同定できた。得られた時期を指標として、スズムシ前翅におけるRNA-seq解析を行った結果、左右で発現量に差のある遺伝子をリストできた。そしてRNAi法による網羅的な遺伝子機能解析を行った結果、1対の器官に生じる左右非対称性に関与する遺伝子を同定することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウスやショウジョウバエなど限られたモデル生物を用いて進展してきた左右非対称性に関する研究は、いずれも体に1つしか存在しない器官の発生過程で生じる左右非対称性を対象としてきた。ゆえに、1対の器官が左右で独立に発生する際に生じる左右非対称性は、既知のメカニズムとは異なる原理の発見につながると考えられる。本研究では、スズムシの前翅にある発音器官が左右で異なって形成されることに着目した。本課題遂行により、次世代シーケンス解析とRNAi法による機能解析法を駆使することで、1対の器官に生じる左右非対称性に関与する遺伝子を同定することに成功した。

研究成果の概要（英文）：This study focused on the asymmetrical formation of the pronotum in the forewings of *Homoeogryllus japonicus*, Japanese bell cricket belonging to the family Gryllidae. It aimed to clarify the molecular basis for the left-right asymmetry in the paired organs. As a result of this project, we were able to identify the timing of the formation of the sound-producing organs. Using the timing as an indicator, we performed RNA-seq analysis of the forewings of Japanese bell cricket. Then, we could list the genes whose expression levels differed between the left and right forewings. Then, we performed a comprehensive gene function analysis by RNAi method and identified the genes involved in the left-right asymmetry in the forewings.

研究分野：発生生物学

キーワード：左右非対称性 発生生物学 昆虫 コオロギ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国では鳴く虫の音を愛でる伝統的な文化が古より存在し、万葉集にも鳴く虫について詠まれた歌が集められているが、翅にある発音器の形成に関わる分子機構はこれまで全く未解明であった。研究代表者は、この発音器形成に着目し、様々な鳴く虫の翅構造とその多様性の研究に着手していた。その一種がスズムシであった。スズムシの翅にある発音器は、必ず右翅にはヤスリ器が左翅には摩擦器が形成される指向的左右非対称を示す。このことは、遺伝的に左右差が決定されていることの証左である。しかし、翅の発音器や、その左右非対称性に関わる分子基盤はこれまで全く不明であった。そこで、鳴く虫の翅にある発音器の左右性に着目しその分子機構を明らかにすることにより、世界で初めて発音器構造の分子基盤の解明のみならず、後胚発生時に形成される対の器官の左右性に関わる分子機構の解明および、その共通性と多様性の検証に挑戦可能であることから、本研究課題の構想に至った。



図：スズムシのオス前翅における発音器官（ヤスリ器と摩擦器）の左右性
上段：前翅の全体像。摩擦器は黒矢頭、ヤスリ器の位置はアスタリスクで示す。
下段：SEMによるヤスリ器の形態。スズムシの右前翅にのみ多数のヤスリ器が存在する（白矢印）。

左右相称動物における左右対称性の破れは、極性をもつ成体の形態や器官の巻きの方向、心臓や脳の機能を生み出す体制作りにおいて重要な現象である。そのため、左右性に関わる分子制御機構を明らかにすることは、発生生物学分野のみならず、進化生物学、基礎医学分野においても極めて重要な課題である。左右軸の形成メカニズムはモデル動物を中心に進められ、左右非対称性をもたらす基本原理が明らかにされた。近年、ショウジョウバエにおいて消化管の左右非対称性が形成される分子メカニズムが進展し、哺乳類とは異なる原理に基づくことが判明した。マウスやショウジョウバエなど限られたモデル生物を用いて進展してきた左右非対称性に関する研究は、いずれも体に1つしか存在しない器官の発生過程で生じる左右非対称性を対象としてきた。ゆえに、1対の翅が左右の体側で独立に発生する際に生じる左右非対称性は、既知のメカニズムとは異なる原理の発見につながる。

2. 研究の目的

本研究では、対の器官の左右非対称性を解明するためにスズムシを研究材料に、その対として存在する前翅に備わる発音器の数に左右非対称性が生じる分子メカニズムの解明に挑む。これまで誰も挑戦することなかった本研究テーマは、非モデル昆虫にも適用可能な最新技術である次世代シーケンス解析と遺伝子機能解析を駆使して分子基盤の解明に挑む点に特色がある。従って、本研究は全く未解明の謎への挑戦であるが、最新技術により分子基盤の解明が実現可能な非常に独創性の高い研究である。左右で独立に形成される器官に左右非対称性が生じる仕組みは、左右相称動物に共通する最も根本

的な問題の一つであり、全く前例のない普遍的な原理の発見につながるが大いに期待される。

3. 研究の方法

供試昆虫

直翅目コオロギ上科 スズムシ *Homoeogryllus japonicus*

(1) 詳細な翅形成タイミングの同定

これまで幼虫の齡期の分単位での特定は困難であった。そこで、飼育系を見直すこと、カメラで 24 時間監視しながら飼育することで脱皮のタイミングと翅形成過程を分単位で調べることに成功した。

(2) RNA-seq 法を用いた翅芽の網羅的な比較トランスクリプトーム解析

既知の遺伝子情報が利用できない新規現象に關与する遺伝子の同定には、遺伝子発現の差異に着目する方法が有効である。発現差のある遺伝子を網羅的に同定するため、次世代シーケンサーを用いた比較トランスクリプトーム解析を行った。

(1) で同定した発音器形成時重要な時期を含む前後 3 時期を RNA-seq 解析のためのサンプリング時期とした。翅芽全体ではなく左右非対称な領域を絞り込んで解析するため、ヤスリ器に左右差が觀察される領域のみを切除して RNA 抽出用のサンプルとした(合計 30 のライブラリー)。ライブラリー作製後、次世代シーケンサーを用いて paired end でシーケンスを行った。取得した RNA-seq データは、インフォマティクス解析を行い、左右の翅芽で発現差を示す遺伝子を網羅的にリストアップした。

(3) 左右非対称な遺伝子発現解析と RNAi 法を用いた遺伝子機能解析スクリーニング

(2) でリストアップした遺伝子の中で、左右非対称性が生じる過程で重要な役割を果たすと考えられる転写因子とシグナル伝達因子に着目する。これらの遺伝子について、RNAi 法による遺伝子機能解析スクリーニングを行った。発音器官が明瞭に形成されるより前の幼虫期に合成した二本鎖 RNA をマイクロインジェクションした。

(4) 左右非対称性を産み出す遺伝子の共通性と多様性の検証

コオロギ科内で翅の発音器の左右非対称性は種によって異なる。そこで、左右性に関わる分子基盤の共通性と多様性を明らかにする目的で、フタホシコオロギを利用する。フタホシコオロギはその前翅にある発音器の数やサイズは左右対称である。(3) で同定したスズムシの翅の発音器に左右非対称性をもたらす原因遺伝子について、コオロギの相同遺伝子の機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) 詳細な翅形成タイミングの同定

スズムシを通年使用可能となる飼育系を確立した。フタホシコオロギとは対照的にスズムシはこれまでに分子生物学的な研究ではあまり使用されてこなかった。我が国では多くの場合スズムシは野外において、成虫は越年性卵を産む一化性昆虫である。そこで、

人工気象器を用いて、卵を低温に晒すことで休眠打破を可能とした。また、卵の状態を低温下で1年間保存可能であった。これらのことから、実験に通年使用可能な飼育系を確立できた。次に、幼虫期にいつ発音器官が形成されるか、個体を監視カメラによる24時間モニタリングする観察系を立ち上げ、詳細な時間スケールで翅組織のサンプリングを可能とした。そして、各齢の幼虫の翅原基から細胞核と膜を染色し、予定発音器形成領域の組織変形過程を調査した。その結果、発音器官は終齢幼虫へ脱皮後48時間以内に発音器周辺の翅脈上の組織が変形することで形成されること、スズムシでは、左右非対称的な変形様式であることが判明した。そこで、終齢幼虫の左右それぞれの前翅原基を各時間毎に摘出し、RNA-seq解析により時期特異的、左右特異的に発現変動する遺伝子を解析した。

(2) 左右非対称性に関与する遺伝子の発見

発音器官が明瞭に左右で異なる時期を含む前後の時期をRNA-seq解析のためのサンプリング時期とした。3ステージ x 左右の翅にある発音器官組織 x biological replicate 5 samplesの合計30サンプルからRNA抽出、ライブラリ作製を行い、次世代シーケンサーを用いてRNA-seq解析を行った。得られたデータから、時期特異的、左右特異的に発現変動する遺伝子を解析した結果、左右の翅で発現量差を示す遺伝子を網羅的にリストアップできた。リストされた遺伝子群から、転写因子、シグナル分子に分類できる遺伝子を第一候補として、RNAiを利用した機能解析を網羅的に行った。その結果、転写因子である遺伝子Aの機能抑制個体では、左右非対称となる翅形態が対称となる表現型を示した。そこで、本遺伝子を対の器官を制御する遺伝子の第一候補とした。さらに、細胞接触や機械刺激の感知、細胞分化、器官のサイズ制御への関与に役割をもつシグナル経路の構成因子の機能抑制個体において、左右非対称性が乱れる表現型を示す個体を得た。本シグナル経路を制御する上流分子の機能解析から、器官サイズ制御シグナルが対の器官における左右性に関わる新規の知見を得た。

(3) スズムシのゲノム解析

本研究遂行において得られた候補遺伝子がどのように左右で入力異なるか、その発現制御機構を明らかにするためには、スズムシのゲノム情報が不可欠であると考えられた。そこで、スズムシ1匹から抽出した高分子ゲノムを用いてシーケンスデータを取得した。アセンブルの結果、スキャホールド長やコンティグ長のN50は比較的良好な結果が得られ、ゲノムサイズはおよそ1.6Gbであった。これにより、対の器官を制御する候補遺伝子の詳細な発現制御機構を明らかにすることが可能となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakamura Taro, Ylla Guillem, Extavour Cassandra G	4. 巻 50
2. 論文標題 Genomics and genome editing techniques of crickets, an emerging model insect for biology and food science	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Opinion in Insect Science	6. 最初と最後の頁 100881 ~ 100881
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cois.2022.100881	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村太郎、新美輝幸
2. 発表標題 フタホシコオロギ <i>Gryllus bimaculatus</i> の前翅における発音器官の形態形成メカニズム
3. 学会等名 日本節足動物発生学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村太郎、新美輝幸
2. 発表標題 コオロギ前翅における発音器官の形態形成メカニズム
3. 学会等名 日本動物学会 第93回 早稲田大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------