

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25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010 ~ 2012

課題番号：22380035

研究課題名（和文）

テントウムシに関連した擬態斑紋形成メカニズムの解明

研究課題名（英文）

Molecular mechanisms in wing-color pattern formation and mimicry in ladybird beetles

研究代表者

新美 輝幸 (NIIMI TERUYUKI)

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号：00293712

研究成果の概要（和文）：本研究では、擬態斑紋形成過程を総合的に理解するため、パターンニング遺伝子・エフェクター遺伝子・色素の着色の各ステップについて、擬態斑紋を示す分類レベルの異なる各種昆虫を用いて解析した。その結果、ミユラー型擬態を示すテントウムシ科内において、色素およびパターンニング遺伝子のレベルにおいて保存性が高くないことが判明した。一方、ベーツ型擬態を示すテントウノミハムシでは、全てのレベルにおいてテントウムシとは異なっていた。

研究成果の概要（英文）：Vivid wing color patterns of ladybirds function as warning against predators to appeal distaste. Thus, ladybird beetles are mimicked by various insect species. To understand the mimetic color pattern formation, we analyzed pigments, effector genes and patterning genes for wing color pattern formation in several ladybird species and *Argopistes coccinelliformis*. Our results suggest that although wing color patterns for mimicry are very similar, these steps are diverged among insect we examined.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2011年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2012年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

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：テントウムシ・擬態・斑紋形成

1. 研究開始当初の背景

(1) 擬態現象は多くの生物種において観察されるが、系統的に遠い関係にあるにも関わらず、類似した擬態斑紋が形成されるメカニズムは依然として謎のままである。この分子メカニズムを解明するため、擬態を示すチョウを実験材料に用いて研究が行われてきた。

(2) 最近、ミユラー型擬態を示す *Heliconius* 属のチョウの擬態斑紋に関与する遺伝子を同定するため、DNA連鎖地図、ESTデータベース、BACコンティグの作製が外国の研究グループにより進められている。交配実験から、多様な斑紋パターンは少数の遺伝子座によって制御されること、さらにその遺伝子座はいくつかの種では同様のゲノム領域に存在することが明らかにされた (Joron

et al., 2006)。また、ベーツ型擬態が観察されるオスジロアゲハでは、擬態斑紋は雌に特異的であり、擬態を示す翅全体のパターンは1つの遺伝子座により決定され、少なくとも11種類の対立遺伝子による斑紋多型が存在することが明らかにされている (Nijhout, 2003)。しかしながら、その遺伝子の実体は不明である。

(3) 斑紋形成に関してこれまでに明らかにされた遺伝子群は、眼状紋など翅の部分的なパターンの形成に関与するもののみであり (Monteiro, 2006)、上記のように擬態斑紋を形成する翅全体のグローバルなパターンを決定する遺伝子に関しては全く不明である。

(4) 本申請代表者は、パターンニング遺伝子として、ナミテントウを用いて翅全体のパターンを指定する転写因子をコードする斑紋プレパターン遺伝子の同定に世界で初めて成功した。また、エフェクター遺伝子として、他のテントウムシとは異なる種特異的なRNAi 効果をもたらされた斑紋形成の鍵となるメラニン合成酵素遺伝子をニジュウヤホシテントウおよびヘリグロテントウノミハムシにおいて、それぞれ同定した。

(5) 本研究では、分子レベルでの解析に必要な不可欠な質転換体 (Kawayama et al., 2006) や larval RNAi 法 (幼虫体への二本鎖RNAの注射によるRNAi法) を用いた遺伝子機能解析系を既に確立している (Niimi et al., 2005)。申請者がこれまでに確立したトランスジェニック・ナミテントウを用いた遺伝子機能解析系は、非モデル昆虫の分野において世界をリードしている (Hara et al., 2008, 2009)。チョウでは困難な遺伝子機能解析ツールが整っているのは、本研究の有利な点である。

2. 研究の目的

本研究は、申請代表者が世界に先駆けてナミテントウにおいて同定した翅全体の斑紋パターンを指定する転写因子をコードする遺伝子 (斑紋プレパターン遺伝子)、斑紋プレパターンに従って発現するメラニン形成過程に関与する酵素遺伝子群、および色素の着色に着目し、テントウムシに関連した擬態斑紋が形成されるメカニズムを解明することを目的とする。テントウムシに関連した擬態斑紋をもつ異なる分類レベルの各種昆虫を用い、斑紋形成過程の比較解析を徹底的に行うことにより、擬態斑紋がもたらされた分子基盤の共通性・多様性を解明する。さらに、テントウムシ科の分子系統の解析を行い擬態斑紋の進化プロセスを考察することを目

指す。

3. 研究の方法

(1) 供試昆虫

- ・ウンモンテントウ (*Anatis halonis*)
- ・カメノコテントウ (*Aiolocaria hexaspilota*)
- ・キイロテントウ (*Illeis koebelei*)
- ・ダンドラテントウ (*Menochilus sexmaculatus*)
- ・ナナホシテントウ (*Coccinella septempunctata*)
- ・ナミテントウ (*Harmonia axyridis*)
- ・フタモンテントウ (*Adalia bipunctata*)
- ・ニジュウヤホシテントウ (*Henosepilachna vigintioctopunctata*)
- ・ヒメカメノコテントウ (*Propylea japonica*)
- ・ムーアシロホシテントウ (*Calvia muii*)
- ・ヘリグロテントウノミハムシ (*Argopistes coccinelliformis*)

(2) 遺伝子クローニング

各種テントウムシおよびヘリグロテントウノミハムシの前翅原基から全RNAを抽出し、ファーストストランドcDNAを合成し、RT-PCR法により目的とする遺伝子の部分配列を得た。さらに、全長cDNAを決定する際にはRACE法を用いてクローニングを行った。

(3) larval RNAi 法

① 二本鎖RNAの合成

RT-PCR法にて得られた各種cDNAがサブクローニングされたプラスミドDNAをプレートに用い、MEGAscript™ T7 Kit (Ambion) を用いて、キットのプロトコルに従い二本鎖RNAを合成した。

② インジェクション

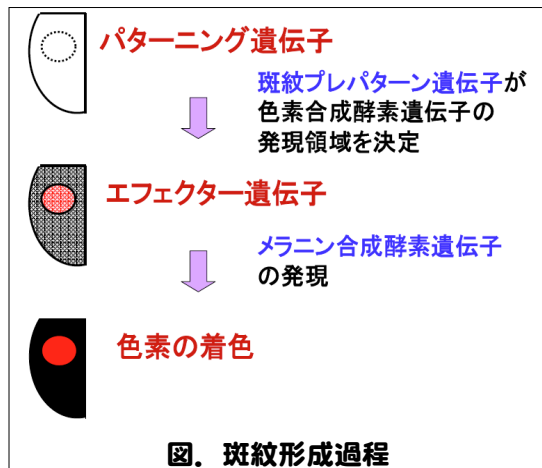
インジェクター (FemtoJet; Eppendorf) を用いて、二本鎖RNAを各種昆虫の終齢幼虫にインジェクションした。なお、コントロールには *egfp* の二本鎖RNAを使用した。

4. 研究成果

本研究では、擬態斑紋形成過程を総合的に理解するため、パターンニング遺伝子・エフェクター遺伝子・色素の着色の各ステップにおいて、擬態斑紋を示す分類レベルの異なる各種昆虫を用いて解析した (図)。

(1) 斑紋色素の解析

① 各種テントウムシの斑紋色素



テントウムシの鞘翅は、斑紋のパターンのみならず斑紋を構成する色彩においても多様性に富んでいる。多くのテントウムシは、ナミテントウのように警告色として機能する赤色と黒色からなる目立つ斑紋を持つ。このようなテントウムシの色彩は、いかに進化してきたのであろうか?そこで、テントウムシ鞘翅斑紋の色素分析を行った。これまでに、ナミテントウの鞘翅の黒色色素はメラニン、赤色色素はカロテノイドであることが判明している。そこで、各種テントウムシについても色素の分析を行った。まず黒色色素の分析では、テントウムシの蛹期の翅原基においてメラニン合成過程で作用するPhenoloxidase (PO)の活性染色を行った。その結果、実験したすべての種で鞘翅斑紋の黒色領域に一致したPO活性が見られた。次に、鞘翅斑紋の黒色色素以外の色素分析を行った。鞘翅のヘキササン抽出、アンモニア抽出、塩酸/メタノール抽出およびTLC分析の結果、カロテノイド系色素、プテリジン系色素およびオモクローム系色素を持つ種が存在することが示唆された。さらに、28SrDNAに基づきテントウムシの系統樹を作成し、テントウムシの系統発生における斑紋色素の獲得について考察した。

② カメノコテントウの赤色色素

斑紋色素の同定を行う過程において、カメノコテントウの赤色色素に関する予想外の成果として、休眠覚醒と関連した長期低温処理により着色に変化が生じることを発見した。この赤色色素の変化は、長期低温処理中であるため、ほとんど摂食が認められない状態で生じた変化であり、食餌に含まれる色素あるいはその前駆体に由来する可能性は低く、テントウムシ体内で生じた何らかの変化によってもたらされた可能性が推察された。また、色素分析の結果、この赤色色素の変化にはプテリジン系色素が関わることを示唆された。成虫休眠するテントウムシにおいて鞘翅斑紋色素の変化に関する報告はこれまでになく、今回発見した現象は大変興味深い

ものである。

(2) エフェクター遺伝子の解析

① ヘリグロテントウノミハムシのメラニン合成酵素遺伝子群

ヘリグロテントウノミハムシを用いた解析により、メラニン生合成に関与する酵素遺伝子において、赤色斑紋の形成に必須の役割を果たす遺伝子を同定した。

② ムーアシロホシテントウの *white* 遺伝子

ナミテントウと同じテントウムシ族に属するムーアシロホシテントウ (*Calvia muiri*) は、赤色と黒色の斑紋に類似したパターンであるにも関わらず茶色と白色の異なる色彩からなる斑紋を持つ。茶色と白色の斑紋は、赤色と黒色の斑紋からいかに進化してきたのであろうか?この進化のメカニズムを調べるために、白色色素の着色メカニズムを理解するため、プテリジンや尿酸などの表皮細胞への取り込みに関与するABCトランスポーターをコードする *white* (*w*) に着目した。ABCトランスポーターは、微生物からヒトに至るまで幅広い種で保存されている膜貫通型のタンパク質である。昆虫において、*w* がコードするABCトランスポーターは、他のABCトランスポーターと二量体を形成して、色素前駆体の膜輸送に関与することが知られている。まず、ナミテントウを用いた次世代シーケンス解析に基づくデータベースから得た配列情報を利用して *w* (*Ha-w*) cDNA をクローニングした。続いて、*Ha-w* の larval RNAi 法を行ったところ、複眼の着色が阻害された。従って、今回クローニングした遺伝子はナミテントウの *w* であると判断した。次に、*Ha-w* の配列情報を利用してムーアシロホシテントウから *w* (*Cm-w*) cDNA をクローニングし、larval RNAi 法により *Cm-w* の遺伝子機能解析を行ったところ、複眼の着色への影響は観察されたが、鞘翅の白色斑紋には影響が認められなかった。そこで、ムーアシロホシテントウから *w* に系統的に近い新規ABCトランスポーターを3つクローニングした。現在、larval RNAi 法を用い、これら遺伝子の機能解析を進めている。

③ フタモンテントウのメラニン合成酵素遺伝子群

ナミテントウから得られた知見を参考に、斑紋形成に関与する複数の遺伝子をクローニングした。次に、これら遺伝子について larval RNAi 法を用いて機能解析を行ったところ、ナミテントウとは異なる興味深い結果が得られた。

(3) パターンニング遺伝子の解析

① ナミテントウの斑紋プレパターン遺伝子

トランスジェニック・ナミテントウを用いた斑紋形成遺伝子群のレポーターアッセイを行うため、ナミテントウの紅型および斑型から斑紋プレパターン遺伝子のプロモーター上流域をクローニングした。現在、トランスジェニック・ナミテントウを用いた解析を進めている。

② ヒメカメノコテントウにおける斑紋プレパターン遺伝子

ヒメカメノコテントウにおいて、斑紋特異的な発現パターンを示す遺伝子の探索を行った。その候補として、キイロショウジョウバエで明らかにされた転写因子やシグナリング分子などのパターン形成遺伝子群に着目し、ヒメカメノコテントウの蛹期の鞘翅原基より 18 種類の遺伝子を新たにクローニングした。その結果、今回クローニングしたすべての遺伝子は、相同検索の結果いずれも目的とする遺伝子と高い相同性が認められ、目的の遺伝子がクローニングされたことが確認された。次に、今回クローニングした遺伝子の配列にもとづき二本鎖 RNA を合成し、larval RNAi 法を用いた遺伝子機能解析を行った。その結果、翅形成に影響を与えた遺伝子は 13 種類、鞘翅斑紋に顕著な影響を与えた遺伝子は 2 種類認められた。今回ヒメカメノコテントウからクローニングしたパターン形成遺伝子の相同遺伝子は、翅のパターン形成そのものだけでなく、鞘翅斑紋形成にも影響を与える機能をもつことは大変興味深い。さらに、ナミテントウと比較検討したところ、斑紋のパターニングレベルにおいて、近縁種であっても必ずしも保存性が高くないことが判明した。

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 3 件)

① Osanai-Futahashi, M., Ohde, T., Hirata, J., Uchino, K., Futahashi, R., Tamura, T., Niimi, T. and Sezutsu, H. (2012) A visible dominant marker for insect transgenesis. *Nat. Commun.*, **3**, 1295. 査読有
DOI:10.1038/ncomms2312.

② 新美輝幸・岡田駿吾・大場裕一・柳沼利信 (2011) テントウムシの斑紋形成メカニズムと進化. *昆虫と自然*, **46**, 5-9. 査読無

③ 伊藤彰紀・大場裕一・柳沼利信・新美輝幸 (2010) テントウムシの斑紋と擬態. *昆虫 DNA 研究会ニュースレター*, **13**, 17-23. 査読無

[学会発表] (計 23 件)

① 平田隼也・柳沼利信・新美輝幸: ムーアシロホシテントウ *white* 遺伝子のクローニング. 平成 25 年度 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会—日本蚕糸学会第 83 回大会—, 2013 年 3 月 19 日, つくば市, 農林水産技術会議事務局筑波事務所本館.

② van de Graaf, L., Brakefield, P. M., van der Zee, M., Yaginuma, T. and Niimi, T.: Cloning of Candidate Genes Responsible for Naturally Occurring Winglessness in the Two-Spot Ladybird (*Adalia bipunctata*). 平成 25 年度 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会—日本蚕糸学会第 83 回大会—, 2013 年 3 月 19 日, つくば市, 農林水産技術会議事務局筑波事務所本館.

③ Niimi, T., Ohde, T. and Yaginuma, T.: RNAi for biological control. “RNAi methods for controlling insects and their pathogens”, XXIV International Congress of Entomology 2012, 24 August 2012, The EXCO-Daegu Convention Center, Daegu, Korea.

④ Niimi, T.: Wing pigment patterns in the ladybird beetle, *Harmonia axyridis*. “Insect Cuticle”, XXIV International Congress of Entomology 2012, 23 August 2012, The EXCO-Daegu Convention Center, Daegu, Korea.

⑤ 伊藤彰紀・後藤久美子・大場裕一・柳沼利信・新美輝幸: テントウムシ亜科昆虫の鞘翅斑紋色素の多様性. 日本蚕糸学会中部支部第 67 回・東海支部第 63 回 研究発表会ならびに特別講演会, 2011 年 11 月 24 日, 山梨県北杜市, セラヴィリゾート泉郷.

⑥ 伊藤彰紀・後藤久美子・大場裕一・柳沼利信・新美輝幸: テントウムシの鞘翅斑紋色素の多様性. 昆虫ワークショップ 2011 東北, 2011 年 10 月 13 日, 山形市, ZAO センタープラザ.

⑦ 新美輝幸: 昆虫翅の起源と多様性. 282 回昆虫学土曜セミナー, 2011 年 6 月 25 日, 岡山市, 岡山大学農学部.

⑧ 伊藤彰紀・後藤久美子・原喜実子・大場裕一・柳沼利信・新美輝幸: テントウムシ亜科昆虫の鞘翅斑紋の色素分析. 第 47 回日本節足動物発生学会, 2011 年 6 月 11 日, 滋賀県守山市, 琵琶湖リゾートクラブ.

⑨ Niimi, T., Ito, A., Goto, K., Oba, Y. and Yaginuma, T.: Molecular basis of wing melanization patterns and mimicry in ladybird beetles. Sixth International Symposium on Molecular Insect Science, October 4, 2011, NH Grand Hotel Krasnapolsky, The Netherlands, Amsterdam.

⑩ 伊藤彰紀・後藤久美子・原喜実子・大場裕一・柳沼利信・新美輝幸: テントウムシ鞘翅斑紋の色素分析. 平成23年度 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会～日本蚕糸学会第81回通常総会～, 2011年3月20日, 要旨集.

⑪ Niimi, T.: Transgenic ladybird: development of gene function analysis systems for non-model insects. The 1st International Conference on the Cricket / RNAi Symposium for Medicine-Agriculture-Engineering Collaboration Project (Joint Meeting), March 14, 2011, 要旨集.

⑫ Niimi, T.: RNAi in ladybirds: towards the understanding of mimicry. The 1st International Conference on the Cricket / RNAi Symposium for Medicine-Agriculture-Engineering Collaboration Project (Joint Meeting), March 14, 2011, 要旨集.

⑬ Ito, A., Goto, K., Oba, Y., Yaginuma, T. and Niimi, T.: Wing Melanization Patterns between *Harmonia axyridis* and *Argopistes coccinelliformis*. The 20th CDB Meeting Molecular Bases for Evolution of Complex Traits, February 23, 2011, RIKEN Center for Developmental Biology, Kobe, Japan.

⑭ 伊藤彰紀・新美輝幸: テントウムシに化ける虫たち. 科学三昧 in 愛知 2010, 2010年12月24日. 名古屋市, ウィルあいち.

⑮ 伊藤彰紀・後藤久美子・柳沼利信・新美輝幸: ナミテントウとヘリグロテントウノミハムシの斑紋色素形成に関わる酵素遺伝子の発現および機能解析. 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.

⑯ Goto, K., Ito, A., Oba, Y., Yaginuma, T. and Niimi, T.: Comparison of wing melanization patterns between *Harmonia*

axyridis and *Argopistes coccinelliformis*. ISBDS2010 International Symposium on Biodiversity Sciences "Genome, Evolution and Environment", August 2, 2010, Hotel Rubra Ohzan, Nagoya, Japan.

⑰ 伊藤彰紀・後藤久美子・柳沼利信・新美輝幸: ナミテントウとヘリグロテントウノミハムシの斑紋色素形成に関わる酵素遺伝子のRNA干渉法による機能解析. 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.

⑱ 新美輝幸: テントウムシからみた生物多様性. 第6回環境学公開講演会, 2010年5月26日, 豊橋市, 豊橋商工会議所9F.

⑳ 新美輝幸・後藤久美子・松田武・伊藤彰紀・大場裕一・柳沼利信: 色素合成酵素遺伝子から探るテントウムシの斑紋と擬態. 昆虫DNA研究会 第7回研究集会, 2010年5月23日, 名古屋市, 名古屋大学豊田講堂第1会議室.

㉑ 新美輝幸: テントウムシから生物多様性を考える一羽の模様をめぐる不思議な多様性の世界. 愛知学院大学 第50回モーニング・セミナー, 2010年5月11日, 名古屋市, 愛知学院大学楠元学舎110周年記念講堂.

㉒ 新美輝幸: テントウムシをめぐる擬態斑紋. 愛知学院大学歯学部 第6回若手研究者・大学院生のための講演会, 2010年4月20日, 名古屋市, 愛知学院大学歯学部楠元学舎・第2会議室.

㉓ 伊藤彰紀・大出高弘・後藤久美子・松田武・柳沼利信・新美輝幸: ナミテントウとニジュウヤホシテントウの斑紋色素形成に関わる酵素遺伝子の発現および機能解析. 平成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.

[図書] (計1件)

新美輝幸: テントウムシからみた生物多様性. 「地球からのおくりもの～生物多様性を理解するために～」名古屋大学大学院環境学研究科しんきん環境事業イノベーション寄附講座 編, 風媒社, 神奈川. 2011年, P78-90.

[その他]

ホームページ等

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~yousan/>

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

大場 裕一 (OBA YUICHI)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教
研究者番号：40332704

(3) 連携研究者

()

研究者番号：