

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25292199

研究課題名(和文) 昆虫翅の起源と多様化メカニズムの解明とその応用

研究課題名(英文) The origin and diversification mechanism of insect wings and its application

研究代表者

新美 輝幸 (Niimi, Teruyuki)

基礎生物学研究所・進化発生研究部門・教授

研究者番号：00293712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：世界に先駆けて同定した鍵となる遺伝子をツールに、解析に適した非モデル昆虫を用い、RNAi法や形質転換体を用いた遺伝子機能解析法を駆使して、昆虫翅の多様性獲得に寄与した分子メカニズムの理解を目指した。

その結果、鞘翅形成に重要な役割を果たす新規遺伝子の同定に成功した。この遺伝子のRNAiにより、鞘翅特異的にクチクラの硬化が阻害されるという大変興味深い表現型が得られた。このような鞘翅特異的な表現型はこれまで知られておらず、鞘翅の進化を考える上で鍵となる重要な発見である。

研究成果の概要(英文)：In order to understand the molecular mechanisms underlying the diversification of insect wings, the gene functional gene analyses, such as RNAi and transgenesis, were performed using non-model insects.

In this study, we successfully identified a novel gene which plays crucial roles on the formation of elytra. Interestingly, the RNAi phenotype of this gene showed elytra-specific inhibition of sclerotization. This result will provide an insight to the evolution of elytra in coleopteran insects.

研究分野：分子昆虫学

キーワード：翅 vestigial

1. 研究開始当初の背景

(1) 昆虫は様々な環境に適応し、極めて多様な翅を進展させてきた。翅の獲得および多様化は、昆虫がこの地球上で最も繁栄する生物群となる大きな要因となっている。手や足と独立に存在する翅は他の生物にはない昆虫固有の特徴であり、昆虫のみが進化の過程で独自に獲得した新奇形態である。昆虫は翅の獲得後、極めて多様性に富む翅を進化させてきた。従って、進化の過程で起きた遺伝子上および発生プログラム上の変化が、いかに多様性をもたらすかを研究するよいモデルとなる。翅形成の分子機構は、キイロショウジョウバエを用いた研究により詳細に解明されつつある。一方、多くの昆虫の翅は、ショウジョウバエにない興味深い形質をもつが、それら形質形成の分子機構に関してはほとんど不明である。

(2) 数世紀にわたる未解決な昆虫翅の起源にアプローチするため、ショウジョウバエにおいて翅形成のマスター遺伝子として同定された *vestigial (vg)* および *VG* とヘテロテトラマーを形成する転写因子をコードする *scalloped (sd)* (Kim et al., 1996; Halder et al., 1998) に着目した。vg は唯一異所的な翅形成能をもつ遺伝子であるにもかかわらず、ショウジョウバエ属内においてもアミノ酸配列の相同性が低く、他の昆虫からのクローニングが不可能であった。しかしながら、研究代表者らは PCR 法の工夫により、ニジュウヤホシテントウより *vg* cDNA のクローニングに成功した (Ohde et al., 2009)。この配列情報を利用し、様々な有翅昆虫のみならず無翅昆虫からも *vg* cDNA をクローニングした (Niwa et al., 2010)。

(3) 研究代表者は、*vg* と *sd* の予想外の多面的な機能を発見し、*vg* と *sd* は翅の起源を探るツールのみならず、翅の多様化に貢献した進化プロセスを理解するツールとしても有用であることを明らかにしてきた。

(4) 研究代表者は、分子レベルでの解析に必要な不可欠な形質転換体 (Kuwayama et al., 2006; Hara et al., 2008, 2009; Masumoto et al., 2012) 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た (Niimi et al., 2005; Ohde et al., 2009, 2011)。

(5) 環境に優しい生物農薬として天敵昆虫は世界各地で使用されているが、捕食性天敵昆虫としてテントウムシを利用する場合、飛翔による成虫の分散が害虫防除効果を減少させることが問題となっている。研究代表者は、larval RNAi 法を用いて *vg* 遺伝子の機能阻害を誘導することにより、翅形成のみが特異的に阻害された翅なしテントウムシの作出に成功した (Ohde et al., 2009; 特許第

4911731 号)。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、研究代表者が非モデル昆虫において発見した翅形成マスター遺伝子の予想外の多面的な機能に基づき、解析に適した非モデル昆虫を用い、RNAi 法や形質転換体を用いた遺伝子機能解析法を駆使して、翅形成マスター遺伝子の機能を探ることで昆虫翅の起源と多様性獲得に寄与した進化プロセスの理解とその応用を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 供試昆虫

無変態昆虫

マダラシミ

(*Thermobia domestica*; 総尾目)

完全変態昆虫

コクヌストモドキ

(*Tribolium castaneum*; 鞘翅目)

チャイロコメノゴミムシダマシ

(*Tenebrio molitor*; 鞘翅目)

ナミテントウ

(*Harmonia axyridis*; 鞘翅目)

キイロショウジョウバエ

(*Drosophila melanogaster*;

双翅目)

(2) 定量リアルタイム PCR 法

total RNA の抽出

脱皮後 1、7、13 日目のマダラシミ成虫を氷上で頭部、胸部、腹部に分け、さらに胸部を側背板、肢、胸部残渣に解剖し、腹部は尾部側 2 体節と腹部残渣に分けて解剖した。その後液体窒素で凍結し -80 で保存した。

QIAcube (QIAGEN) を用いて DNase (QIAGEN) 処理を含む RNA の自動抽出を行い、total RNA を得た。

First strand cDNA の合成

上記で抽出した total RNA をテンプレートとして 30 ng ずつ使用し、SuperScript™ III RNase H- Reverse Transcriptase (Invitrogen) のプロトコルに従い、全体量が 20 μl の first strand cDNA 溶液を得た。得られた cDNA 溶液は 10 倍希釈し定量的リアルタイム PCR でのテンプレートとした。

定量的リアルタイム PCR 法

リアルタイム PCR 法は Power SYBR® select Master Mix (Applied Biosystems, Branchburg) を用いて行った。反応条件は UDG 活性化を 50 で 2 分間、変性を 95 で 2 分間行った後、変性を 95 で 3 秒間、アニリングと伸長を 60 で 30 秒間を 40 サイクル行った。PCR と蛍光強度の検出は Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いて行った。内在性コントロール遺伝子として *Thermobia domestica ribosomal protein 49* を使用した。得られたデータは Ct 法により解析を

行った。

(3)コクヌストモドキにおける larval RNAi 法を用いた遺伝子機能解析

二本鎖 RNA の合成

PCR 産物の長さが 300-500 bp になるよう二本鎖 RNA 合成用のプライマーを設計し、T7 プロモーター (TAATACGACTCACTATAGGGAGACCAC) をプライマーの 5' 側に付加した。これらプライマーを使用して、コクヌストモドキの終齢、前蛹、あるいは蛹から抽出した total RNA から合成したファーストストランド cDNA をテンプレートに用い、二本鎖 RNA 合成用のテンプレートを調整した。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。

マイクロインジェクション

コクヌストモドキ終齢幼虫を使用した。インジェクター (FemtoJet; Eppendorf) を用いて、二本鎖 RNA をマイクロインジェクションした。なお、コントロールには *gfp* の二本鎖 RNA を使用した。

4. 研究成果

(1) 定量リアルタイム PCR 法を用いたマダラシミ *vg* (*Tdom-vg*) および *sd* (*Tdom-sd*) の発現解析

まず初めに、*Tdom-vg* および *Tdom-sd* の機能を探る一助として、マダラシミ成虫において発現解析を行った。マダラシミ成虫の脱皮サイクルは 36-37 の環境下において約 14 日である。この脱皮サイクルにおける *Tdom-vg*、*Tdom-sd* mRNA の発現量を調べるため、脱皮後 1、7、13 日の成虫の頭部、肢、側背板、胸部残渣、腹部尾部側 2 体節と腹部残渣に分けて定量リアルタイム PCR 法により mRNA の発現変動を調査した。その結果、*Tdom-vg* および *Tdom-sd* の発現は、予想に反する興味深い発現変動パターンを示した。現在、これらの結果を検証するため、*Tdom-vg* および *Tdom-sd* の遺伝子機能解析を行っている。

(2)コクヌストモドキにおける翅連続相同構造の形成に関与する遺伝子の探索および larval RNAi 法を用いた遺伝子機能解析

翅アイデンティティーの決定機構を解析するため、まず翅と翅連続相同構造間で異なる役割を担う遺伝子を同定することが必要不可欠となる。そこで、候補遺伝子アプローチでは不可能な未知の遺伝子を同定するため、網羅的な方法を試みた。チャイロコメノゴミムシダマシと同じ鞘翅目に属し、既にゲノム解読が完了したコクヌストモドキを用いたマイクロアレイ解析により、前胸および中胸の翅連続相同構造の形態的な差異をもたらす遺伝子を探索した。具体的には、コクヌストモドキの幼虫-前蛹期の前胸と中胸を比較したマイクロアレイの解析データをもとに、前胸および中胸間で発現差がみられる

遺伝子を 8 個選抜した。これらの候補遺伝子のうち、6 個の候補遺伝子において RNA 干渉 (RNAi) 法による機能解析を行い、得られた成虫の表現型を解析した。その結果、前胸と中胸の翅連続相同構造形成における特異的な表現型は観察されなかった。

(3)コクヌストモドキにおける鞘翅および後翅の形成に関与する遺伝子の探索および larval RNAi 法を用いた遺伝子機能解析

コクヌストモドキの翅構造はキイロショウジョウバエの翅構造と異なり、前翅は硬化したクチクラ層を有する鞘翅であり、後翅は飛翔に用いる膜状の翅構造である。コクヌストモドキ蛹の蛹化後 0、3、5 日目の鞘翅および後翅の翅原基を比較したマイクロアレイの解析データを用いて、種々の条件で鞘翅および後翅の発現量を比較し、鞘翅と後翅の差異をもたらす遺伝子の候補として 51 個の遺伝子に絞り込んだ。次に、発現差の認められた 51 個の候補遺伝子について larval RNAi 法による機能解析を行うため、コクヌストモドキの終齢幼虫に dsRNA をインジェクションした。成虫での表現型を観察した結果、29 個の遺伝子の RNAi により、翅において表現型が観察された。興味深いことに、RNAi により鞘翅特異的な着色不全が観察される遺伝子が存在した。この遺伝子は RNAi による機能解析の結果から、鞘翅特異的にクチクラの着色および硬化に関与することが示唆された。

この遺伝子は、クチクラタンパク質とは異なるこれまでに報告のない特徴を有するタンパク質をコードする新規遺伝子である。この遺伝子の RNAi により、鞘翅特異的にクチクラの硬化が阻害されるという大変興味深い表現型が得られた。このような鞘翅特異的な表現型はこれまで知られておらず、鞘翅の進化を考える上で鍵となる重要な発見である。

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 3 件)

Minakuchi, C., Ohde, T., Miura, K., Tanaka, T. and Niimi, T. (2015) Role of *scalloped* in post-embryonic development of the red flour beetle *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Appl. Entomol. Zool.*, **50**, 17-26.
doi: 10.1002/ps.3940.

(査読有り)

Ohde, T., Yaginuma, T. and Niimi, T. (2014) Wing serial homologs and the origin and evolution of the insect wing. *Zoology*, **117**, 93-94.
doi: 10.1016/j.zool.2013.11.001.

(査読有り)

Kuwayama, H., Gotoh, H., Konishi, Y., Nishikawa, H., Yaginuma, T. and Niimi, T. (2014) Establishment of transgenic lines for jumpstarter method using a composite transposon vector in the ladybird beetle, *Harmonia axyridis*. *PLoS ONE*, **9**, e100804. doi: 10.1371/journal.pone.0100804. (査読有り)

〔学会発表〕(計 16 件)

新美輝幸：地球の覇者-昆虫の多様な世界. 第 20 回 自然科学研究機構シンポジウム“生命の起源と進化”, 学術総合センター, 東京都・千代田区, 2016 年 3 月 13 日.

新美輝幸：昆虫特異的な新奇形態の Evo-Devo 研究. C-Bio Seminar 37th, 宇都宮大学 ゲノミクス研究棟セミナー室, 栃木県・宇都宮市, 2015 年 11 月 9 日.

彌富丈一郎・畠山正統・**新美輝幸**：ナミテントウにおける TALEN を用いたゲノム編集技術の確立. 日本アブラムシ研究会 第 5 回研究集会, 岡崎コンファレンスセンター, 愛知県・岡崎市, 2015 年 8 月 8 日.

新美輝幸：ナミテントウ斑紋多型現象解明へのアプローチ. 第 1 回 Evolution 研究集会, 名古屋大学理学研究科附属菅島臨海実験所, 三重県・鳥羽市, 2015 年 3 月 26 日.

新美輝幸：昆虫の形作りの秘密を探る. あいちサイエンス・コミュニケーションネットワーク事業 名古屋大学出前授業 in 豊橋, 豊橋市自然史博物館, 愛知県・豊橋市, 2014 年 12 月 14 日.

新美輝幸：非モデル昆虫の遺伝子機能解析. 基調講演, 日本アブラムシ研究会 第 4 回研究集会, 岡崎コンファレンスセンター, 愛知県・岡崎市, 2014 年 8 月 9 日.

Niimi, T.: Wing color pattern formation in ladybird beetles. “Integrated Approaches to the Analysis of Pattern Formation in Biological Systems”, The Joint Annual Meeting of the Japanese Society for Mathematical Biology and the Society for Mathematical Biology, Osaka International Convention Center, Osaka, Japan, July 30, 2014.

富田智恵理・大出高弘・柳沼利信・**新美輝幸**：無翅昆虫マダラシミにおける *vestigial* および *scalloped* の定量リアルタイム PCR 法による発現解析. 平成 26 年度 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 - 日本蚕糸学会第 84 回大会, 神奈川県・藤沢市, 日本大

学生物資源科学部, 2014 年 3 月 11 日.

新美輝幸：昆虫の模様と形の多様性. 生命農学研究科附属フィールド 科学教育研究センター 東郷フィールド第 2 回農場講演会, 愛知県・愛知郡東郷町, 東郷フィールド農業館, 2013 年 10 月 26 日.

新美輝幸：テントウムシの羽と模様を学ぶ. あいちサイエンスフェスティバル 2013 “さかえサイエンストーク”, 愛知県・名古屋市, 文化系飲食店「ボクモ」, 2013 年 10 月 17 日.

Niimi, T.: Novel biological control method based on the molecular mechanisms underlying wing formation. Joint Minisymposium of Dong-A University and Nagoya University, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Nagoya, Japan, September 24, 2013.

新美輝幸：昆虫の“隠された翅”を探る. 助教会・夏の勉強会, 愛知県・名古屋市, 名古屋大学大学院生命農学研究科, 2013 年 9 月 30 日.

新美輝幸：昆虫の“隠された羽”. 認識と形成研究会 2013, 愛知県・岡崎市, 基礎生物学研究所, 2013 年 9 月 14 日.

新美輝幸：昆虫の翅と角の多様性をもたらす遺伝子の機能. 日本進化学会第 15 回つくば大会・シンポジウム「昆虫の形態多様性をもたらす遺伝子の機能-最近のトピックスと今後の展望-」, 茨城県・つくば市, 筑波大学, 2013 年 8 月 28 日.

新美輝幸：昆虫特異的な新奇形態のエボデボ研究：翅と角に関する最近のトピックス. IGER Seminar, 愛知県・名古屋市, 名古屋大学 理学南館 セミナー室, 2013 年 7 月 25 日.

新美輝幸：昆虫特異的な新奇形態のエボデボ研究～翅と角に関する最新の知見. 学習院大学 生命科学セミナー, 東京都・豊島区, 学習院大学 南 7 号館, 2013 年 6 月 6 日.

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.nibb.ac.jp/niimilab/>

http://www.nibb.ac.jp/sections/evolutionary_biology_and_biodiversity/niimi/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新美 輝幸 (NIIMI, TERUYUKI)

基礎生物学研究所・進化発生研究部門

・教授

研究者番号：00293712

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()