

## 昆虫の擬態紋様形成の分子基盤

●藤原 晴彦

東京大学大学院新領域創成科学研究科

## &lt;研究の目的と進め方&gt;

本研究の目的は、情報発信者が受信者を攪乱する戦略として広く使われる「擬態」のモデルとして、昆虫の紋様・体色形成の分子基盤を明らかにすることである。具体的には、アゲハとカイコの幼虫擬態紋様、シロオビアゲハ翅のベイツ型擬態紋様を対象に、個々の完全長 cDNA (EST) ゲノムデータベースを構築して制御遺伝子を枚挙し、紋様形成プログラムの進行過程をプロファイルする。さらに紋様形成モデルとしてカイコの主要紋様遺伝子座 p などの原因遺伝子を同定する。アメリカでは毒チョウ (*Heliconius*) 成虫のミューラー型擬態のメカニズムの理解が進んでいる。本研究の進展は、カイコのデータベースを有効に拡張させるだけでなく、アゲハ、カイコ、*Heliconius* という 3 種の鱗翅目昆虫データベースの比較から、擬態の分子基盤を明確にすると期待できる。極めて多様な紋様が近縁種で比較でき、トランスジェネシスなどの分子遺伝学的手法が完備されつつある鱗翅目昆虫で「擬態」のメカニズムは最も効率的に解析できる。本研究は、適応的な生物形態の多様性を探る世界的な学問潮流と流れを一にするが、独創的な成果を日本から発信しうる研究と考える。

## &lt; 2008 年度の研究の当初計画 &gt;

- 6 種類の完全長 cDNA データベースの構築：幼虫擬態紋様に関しキアゲハ、シロオビアゲハのベイツ型擬態に関しモデル種のベニモンアゲハの蛹翅の cDNA ライブラリーを構築し、既存の 4 種類とあわせたデータベースの完成を目指す。
- cDNA サブトラクション法による擬態紋様遺伝子の探索：アゲハの幼虫紋様パターンは 4 齢初期に幼若ホルモン JH に決定される。JH 処理と JH 非処理の 4 齢幼虫皮膚、各紋様領域の皮膚などを用いて cDNA サブトラクションを行い、幼虫擬態紋様に関わる遺伝子を探索する。
- マイクロアレイによる紋様形成遺伝子の網羅的発現解析：これまでに構築された 4 種類の cDNA データベースから DNA チップを作成し、JH 処理と非処理アゲハ 4 齢皮膚、3 齢脱皮期と 4 齢脱皮期皮膚、紋様領域ごとの mRNA に対してマイクロアレイ解析を行い、遺伝子発現動態を網羅的に調べる。また、シロオビアゲハ擬態♀、非擬態♀についても行う。
- カイコ幼虫紋様変異系統 (p, L, Ze) の原因遺伝子の同定：各変異系統と標準系統の BF1 個体の交雑と組み換えを利用して原因領域を絞り込み、原因遺伝子の同定とその機能的証明を行う。

## &lt; 2008 年度の成果 &gt;

- 6 種類の完全長 cDNA データベースの構築：新たな cDNA ライブラリーとして、キアゲハ皮膚、ベニモンアゲハ蛹翅を構築した。支援班の協力を得て、2009 年 3 月までに約 3 万の EST 配列がそれぞれ決定される予定で、来年度にデータベースの構築とマイクロアレイへの設計が可能となった。一方、

従来作成していた 4 種 (アゲハ、カイコ、シロオビ皮膚・蛹翅) とアゲハ前脚ふ節データベース (Ozaki et al. 2008) を詳細に比較したところ、組織特異的な発現をするクチクラタンパク質が多数発見されたこと、アゲハ蛹の緑色の隠蔽色には新たな青色色素結合遺伝子が関与していること、茶色の隠蔽色にはメラニン合成系遺伝子が関与していること、などの発見があった。

2. マイクロアレイによる紋様形成遺伝子の網羅的発現解析：キアゲハ約 4000、シロオビアゲハ約 4600、キアゲハ 12 の合計 8600 遺伝子について、1 遺伝子 2 種類のユニークな 60mer 配列を設計し、計 15208 のアゲハオリゴアレイを作成した。このマイクロアレイを利用し、(1) アゲハ個体において 4 齢初期の JH 処理と非処理個体、(2) 3 齢脱皮期と 4 齢脱皮期、(3) 個々の斑紋領域 (鳥のフン型幼虫の白と黒の部分、柑橘系葉型幼虫の目玉模様と V 字紋様) などの RNA サンプルを用いて、紋様や JH 応答に関与する遺伝子を探索した。その結果、特定の紋様形成に関わる遺伝子、齢特異的な遺伝子 (JH の制御を受けている可能性が高い)、脱皮期時期特異的遺伝子 (エクジソンの制御を受けている可能性が高い) などの新規遺伝子が多数見つかった。
3. カイコ幼虫斑紋変異系統の原因遺伝子の同定：昨年度に、L (褐円：各体節に特有な紋様がある) の原因遺伝子として *wnt1* が最終的な候補遺伝子に絞られた。今年度は、*wnt* シグナルの阻害剤クルセチンを 4 齢幼虫の特定のステージに L 斑紋予定領域にインジェクションしたところ斑紋が消失したこと、L/+ のヘテロ個体では L の染色体からのみ皮膚特異的に *wnt1* が転写されていることから、L の *wnt1* 遺伝子の上流にある cis エレメントの異常によって L の斑紋が形成されることがわかった。この結果は、紋様形成が *wnt1* によるプレパターン形成によって制御されていることを遺伝学的にはじめて示したものである。一方、BF1 個体の交雑と SNP マーカーによるポジショナルクローニングを行い、p (姫蚕) 遺伝子座は候補遺伝子 3 個、Ze (虎蚕) 遺伝子座は候補遺伝子 12 - 13 個に絞られた。また、当初計画には入れていなかったが、カイコ幼虫体色変異体の解析も進めたところ、赤蟻 (Ch) は *yellow* 遺伝子、煤色 (so) は *ebony*、眼紋赤 (ro) は *tan* 遺伝子がそれぞれの原因遺伝子であることがほぼ確かめられた。これまで昆虫の幼虫の体色や斑紋に関して、体系的に原因遺伝子が同定されたことはなく、以上の成果は擬態紋様形成機構の解明に大きなインパクトを与えると考えられる。

## &lt; 達成できなかったこと、予想外の困難、その理由 &gt;

1. キアゲハ、ベニモンアゲハの完全長 cDNA データベースの構築は当初、今年度中に終わる予定であったが、cDNA ライブラリー構築などが予定より遅れたため、配列解析のみに留ま

り、アノテーション作業やマイクロアレイの作成は来年度に持ち越すことになった。

- cDNA サブトラクションを用いてアゲハ 4 齢初期に JH に応答する遺伝子を検索したが、明確な発現変動を見せる遺伝子は得られなかった。この原因は、サブトラクション法が比較的発現変動の大きな遺伝子にしか有効に働かないことや、JH による処理条件が適切でなかったなどの原因が考えられる。ただ、JH 処理、非処理アゲハ表皮から RNA を調製し、マイクロアレイで解析することにより、データとしてはある程度これを補完することができた。
- シロオビアゲハのベイツ型擬態に関してはマイクロアレイ解析を進める予定だったが、今年度は RNA 調製次期の検討など、予備的な実験に留め、来年度シロオビアゲハのモデル擬態種であるベニモンアゲハの情報を付加したアレイを用いて、より体系的な解析を行うことにした。

#### <今後の課題>

- アゲハ幼虫紋様に関しては、各紋様形成に関与する遺伝子、紋様切り替えに関与する JH 応答遺伝子がある程度枚挙されたことから、今後は擬態紋様形成で中心的な役割を果たす遺伝子に焦点を絞り、その機能を調べる方向性にシフトしたい。そのためには、鱗翅目では比較的困難とされる RNAi やウィルスをを用いた *in vivo* レポーターアッセイの解析システムを構築する必要がある。
- アゲハとキアゲハは互いに近縁種でありながら、その食草に応じて全く異なる紋様を進化させたと考えられる。アゲハとキアゲハの F1 ハイブリッドなどを用いると、擬態紋様形成の進化的プロセスがある程度明確になると期待される。あらたに構築される予定のキアゲハのデータベースとの比較解析は、その意味から極めて重要な情報を与えると考える。
- これまで困難だった蛹翅における *in situ* hybridization システムの構築に今年度成功したことから、この系を用いて、シロオビアゲハベイツ型擬態に関わる遺伝子を解析することが可能になった。今後、シロオビアゲハの雌雄、メスの擬態型・非擬態型、さらに紋様毎のサブトラクションとマイクロアレイ解析により、どのような遺伝子がベイツ型擬態に関与しているか明確になると期待される。また、モデル種であるベニモンアゲハのデータベースの構築、マイクロアレイの拡充がこれらの解析をサポートするのは間違いない。
- カイコの紋様形成遺伝子  
L に続き、p、Ze の原因遺伝子の解明が急がれる。これらのカイコ幼虫斑紋の代表的な遺伝子座の原因遺伝子が同定されれば、紋様形成機構の上位でのメカニズムが明らかになる。さらに、これらの斑紋に似た紋様を持つ野外昆虫で、これらの遺伝子発現と紋様との関連を調べることはきわめて興味深い。

#### <成果公表リスト>

- 論文/プロシーディング (査読付きのものに限る)
- 080122619 Futahashi, R. and Fujiwara, H. Juvenile hormone regulates butterfly larval pattern switches, *Science* 319, 1061 (2008) .
- 0805151822 The Tribolium genome sequencing consortium (including Fujiwara, H. and Osanai, M.) . The genome of the developmental model beetle and pest *Tribolium castaneum*.

*Nature* 452, 949-955 (2008) .

- 0805151830 Sato, K., Matsunaga, M. T., Futahashi, R., Kojima, T., Mita, K., Bannno, Y. and Fujiwara, H. Positional cloning of *Bombyx* wingless loci *flugellos* (*fl*) reveals a critical role of fringe that is specific for wing morphogenesis. *Genetics* 179, 875-885 (2008) .
  - 0806261908: Futahashi, R., Okamoto, S., Kawasaki, H., Zhong, Y-S., Iwanaga, M., Mita, K. and Fujiwara, H. Genome-wide identification of cuticular protein genes in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* in press (2008) .
  - 0901091822: Okamoto, S, Mita, K., Futahashi, R., Kojima, T. and Fujiwara, H. Catalogue of epidermal genes: genes expressed in the epidermal cells during molt of the silkworm, *B. mori*. *BMC genomics*, 9, 396 (2008)
  - 0901091838: Futahashi, R., Sato, J., Meng, Y., Okamoto, S., Daimon, T., Yamamoto, K., Suetsugu, Y., Narukawa, J., Takahashi, H., Banno, Y., Katsuma, S., Shimada, T., Mita, K. and Fujiwara, H. yellow and ebony are the responsible genes for the larval color mutants of the silkworm *Bombyx mori*. *Genetics* (2008) in press.
  - 0901091849: Futahashi, R. and Fujiwara, H. Identification of stage-specific larval camouflage associated genes in the swallowtail butterfly, *Papilio xuthus*. *Dev. Genes Evol.* 218, 491-504 (2008)
- 研究室 HP :  
<http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/animal/index.htm>