

比較ゲノム解析による擬態斑紋の進化プロセスの解明

●新美 輝幸

名古屋大学大学院生命農学研究科

<研究の目的と進め方>

本研究は、系統的に遠縁の種間に類似した擬態斑紋が獲得された進化プロセスを解明することを目的とする。研究対象には、異なる分類レベルの昆虫種、すなわち警告色として機能する斑紋に遺伝的多型が存在するナミテントウ、有害なもの同士が似るミューラー型擬態が観察されるテントウムシ科内の種、上科レベルという系統的に大きく異なるにもかかわらず類似した擬態斑紋をもつヘリグロテントウノミハムシを用い、ゲノムの構造と機能の比較を通して擬態斑紋がもたらされた分子基盤の共通性・多様性を解明することを目指す。

本研究では、我々が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）および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に着目する。まず、これら遺伝子を数種のテントウムシおよびヘリグロテントウノミハムシから単離し、*in situ* hybridization法による発現解析、larval RNAi法（幼虫体への二本鎖RNAのインジェクションによるRNAi法）による機能解析を行い、得られた結果を昆虫種間で比較検討する。次に、プロモーター上流域をクローニングし、その配列を昆虫種間で比較する。さらに、我々が作出法を確立したトランスジェニック・ナミテントウを用いて、同種・異種の遺伝子の発現制御領域のレポーターアッセイを行い、共通した擬態斑紋をもたらし遺伝子発現制御領域や斑紋の変化をもたらし要因となるゲノム上の変化を特定する。

<2007年度の研究の当初計画>

1. ナミ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群の発現制御領域の解析： 斑紋特異的な発現パターンを示す遺伝子のプロモーター上流域をトランスジェニック・ナミテントウを用いてレポーターアッセイを行い、斑紋パターン発現制御領域を特定する。

2. ヘリグロテントウノミハムシの斑紋特異的な発現パターンを示す遺伝子の同定： ヘリグロテントウノミハムシからこれまでに単離した斑紋形成の候補遺伝子の機能を同定するため、larval RNAi法を用いた解析および発現パターンの解析を行う。

3. ナミテントウの斑紋多型の原因遺伝子の同定： 斑紋プレパターン遺伝子の発現制御領域を各斑紋型間で比較する。さらに、トランスジェニック・ナミテントウを用いてレポーターアッセイを行い、斑紋多型を生じた遺伝子上の変化を特定する。

4. 擬態斑紋形成機構の共通性・多様性を担う遺伝子制御領域の解析： ヘリグロテントウノミハムシおよびテントウムシ科の数種において斑紋特異的な発現を示した遺伝子のプロモーター上流域をトランスジェニック・ナミテントウによるレポーターアッセイを行い、擬態斑紋形成に関わる遺伝子の共通性・多様性を見いだす。

<2007年度の成果>

1) 斑紋多型を示すナミテントウを用いた解析

ナミテントウ斑紋のメラニン形成過程で必須の役割を果たすことが判明した *tyrosine hydroxylase* (*th*)、*dopa decarboxylase* (*ddc*)、*laccase 2* (*lac 2*) の3種の酵素遺伝子は、いずれも同時期にメラニン形成領域に一致した発現を示すことから、共通した転写因子による発現調節を受ける可能性が示唆された。この発現調節因子による発現調節を受ける可能性が示唆された。この発現調節因子を同定するため、これら3種類の遺伝子のプロモーターの上流域をクローニングした。その結果、翅パターン形成のシグナル伝達に関与する2種類の転写因子の結合サイトが上記3種の遺伝子のプロモーター上流域にすべて共通して存在していた。さらに興味深いことに、斑紋プレパターン遺伝子がコードする転写因子の結合サイトがいずれの遺伝子の上流域に複数存在していた。したがって、メラニンパターンを実行する上記3種の酵素遺伝子は斑紋プレパターン遺伝子によって直接制御される可能性が示唆された。次に、これら3種の遺伝子のレポーターアッセイを行うため、昆虫の形質転換ベクターである *piggyBac* を用いて、各遺伝子のプロモーター上流域をEGFP遺伝子につないだレポーターアッセイベクター、pBac[*Ha-th* (-1095)-EGFP, 3xP3-DsRed]、pBac[*Ha-ddc* (-962)-EGFP, 3xP3-DsRed]、pBac[*Ha-lac 2* (-1485)-EGFP, 3xP3-DsRed] を構築した。続いてこれら3種のベクターをナミテントウの初期胚にマイクロインジェクションした。

斑紋プレパターン遺伝子の翅原基での転写開始点に対するプロモーター上流域をクローニングした。その結果、翅パターン形成に関与する転写因子の結合サイトが多数存在することが判明した。また、相同配列検索では相同性の認められなかった約200bpの繰り返し配列が見いだされ、斑紋プレパターン遺伝子のシスエレメントの重複や多様化に貢献した可能性が示唆された。したがって、斑紋プレパターン遺伝子の発現調節領域に生じた変異が斑紋多型を創出した可能性が示唆された。

2) ミューラー型擬態を示すテントウムシ科内の種を用いた解析

各種テントウムシにおいてlarval RNAi法による斑紋プレパターン遺伝子の機能解析を行い、成虫の表現型を観察した。その結果、ナナホシテントウとカメノコテントウでは、ナミテントウと同様にメラニン形成領域が完全に消失し、翅全体が赤いカロチノイド領域に変化する表現型が観察された。また、ニジュウヤホシテントウではメラニン形成領域の部分的な抑制が観察された。以上の結果より、ミューラー型擬態を示す各種テントウムシに関しては、色素形成より上位で機能する斑紋プレパターン形成の段階においても高く保存される可能性が示された。したがって、テントウムシの種間で異なる斑紋パターンは、ナミテントウの斑紋多型と同様に斑紋プレパターン遺伝子の発現調節の差異によってもたらされる可能性が考えられた。

ヒメカメノコテントウはナミテントウと同様に斑紋に遺伝的多型が存在することが知られているが、その斑紋多型はナミテントウとは異なり2つの遺伝子座に関与することが交配実験から明ら

かにされている。そこで、斑紋のパターンを決定する遺伝子をさらに同定するため、翅のパターン形成に関与する遺伝子7種類をその候補としてクローニングした。現在、larval RNAi法を用いてヒメカメノコテントウにおいてこれら遺伝子の機能を解析している。

3) テントウムシと上科レベルで異なるヘリグロテントウノミハムシを用いた解析

ヘリグロテントウノミハムシから、*lac 2*、*ebony* および斑紋プレパターン遺伝子をクローニングし、larval RNAi法による遺伝子機能解析を行った。その結果、*lac 2*のRNAiではメラニン形成が体全体にわたって阻害されたことから、ヘリグロテントウノミハムシにおいても*lac 2*はメラニン形成およびクチクラの硬化において必須の役割を果たすことが判明した。一方、*ebony*のRNAiでは赤色斑点が無色に変化したことから、ヘリグロテントウノミハムシの赤色斑点は*ebony*によって生じるクチクラの硬化反応に伴った着色によりもたらされることが判明した。しかしながら、赤色斑点は無色に変化したのみであり斑紋のパターンそのものは変化しなかったことから、*ebony*を介さずに生じる無色のクチクラの硬化反応に関与する*dopamine acetyl transferase (dat)* 遺伝子の発現により斑紋パターンが形成される可能性が示唆された。現在、*dat* 遺伝子のクローニングを試みている。

また、斑紋プレパターン遺伝子のRNAiでは、メラニン形成領域の部分的な阻害が観察された。解析可能な個体が少数であったため今後さらなる解析が必要であるが、斑紋プレパターン遺伝子の機能は広範な昆虫種で共通する可能性が示された。

<国内外での成果の位置づけ>

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かかわらず、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いる。最近、ミユラー型擬態を示す*Heliconius*属の毒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。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一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。しかしながら、その遺伝子の実体は依然不明のままである。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、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。本研究では、ナミテントウを用いて翅全体のパターンを決定する斑紋プレパターン遺伝子のクローニングに成功した。また、本研究では、ゲノム機能の比較に必要な形質転換体やlarval RNAi法を用いた遺伝子機能解析系を既に確立している。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。

擬態研究においてこれまで不可能であったアプローチを行う本研究は未開拓分野への挑戦であり、種・科・上科のレベルから得られた斑紋形成の共通性・多様性に関する知見を統合することにより、擬態斑紋が獲得された進化プロセスについて新規の知見ならびに総合的な理解が得られることが期待される。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

多くの昆虫種において斑紋プレパターン遺伝子の発現解析を迅速・容易に行うため、斑紋プレパターン遺伝子がコードする転写因子のアミノ酸配列のうち保存性の高い領域を認識するモノクロナール抗体の作製を試みた。しかしながら、斑紋プレパターン遺伝子産物を認識するモノクロナール抗体は残念ながら得られなかった。そこで、これまでクローニングしたすべてのテントウムシにおいてアミノ酸配列が完全に一致したDNA結合領域を認識するポリクロナール抗体を現在作製中である。この抗体を利用することにより、テントウムシ科の近縁種で斑紋をもたない昆虫やテントウムシに擬態していると考えられる昆虫について可能な限り多くの種について発現パターンを比較し、斑紋プレパターン遺伝子が進化の過程でどのように斑紋形成に関与するように進化してきたかについて考察する。

厚いクチクラが形成されたステージで発現する前述の酵素遺伝子の発現解析には切片による*in situ* hybridization法を用いて解析してきたが、得られたシグナルと成虫のメラニンパターンを対応させることが困難であった。そこで、連続切片による遺伝子発現パターンの解析結果を三次元画像合成するための共同研究を遺伝研の池尾一穂博士(生命システム情報)と開始した。これまでホールマウントで解析が不可能であった発現ステージの三次元画像が得られることにより、発現パターンの詳細な検討が可能となることが期待される。

<今後の課題>

本研究は概ね順調に進捗しているが、早急にトランスジェニック・ナミテントウを用いたレポーターアッセイを進める予定である。この結果、斑紋パターンが再現される発現制御領域が得られたら、さらに細分割したコンストラクトを作製し、同様にレポーターアッセイを行い、斑紋パターン発現制御領域を特定する。この領域において転写因子の結合配列を探索し、この領域に結合して斑紋での発現制御に関与する転写因子を推定する。斑紋プレパターン遺伝子の直接のターゲットである可能性が示唆されるメラニン形成酵素遺伝子については、斑紋プレパターン遺伝子産物の結合配列の役割について調査する。

これまでの研究から斑紋プレパターン遺伝子に相同な遺伝子は様々な転写因子と相互作用することが知られている。したがって、斑紋のパターンを決定する際に、斑紋プレパターン遺伝子がコードする転写因子と相互作用する転写因子が重要な役割を果たす可能性が考えられる。そこで、転写因子のタンパク質間相互作用を行うため、筑波大の三輪宏博士(生命システム情報)と共同研究を開始した。三輪博士が開発した新規のタンパク質間相互作用の検出法を用いることで、酵母two-hybrid systemでは困難であった斑紋プレパターン遺伝子がコードする転写因子と相互作用するタンパク質の解明が期待される。

これまでに斑紋多型の原因遺伝子が存在する染色体に挿入されたトランスジーンをもつトランスジェニック・ナミテントウを既に作出した系統の中から1系統同定した。今後同染色体にトランスジーンが挿入された系統をさらに作出し、少なくとも2系統用いて、斑紋多型の原因遺伝子座とトランスジーンとの組換え価を決定する。次に、既に確立したFISH法を用い、斑紋プレパターン遺伝子とトランスジーンの染色体上での位置関係を調査する。得られた組換え価と染色体上での位置関係から、斑紋プレパターン遺伝子が斑紋多型の原因遺伝子である可能性を示す。

<成果公表リスト>

なし