

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。

<2008 年度の研究の当初計画>

in situ hybridization 法により斑紋と同様の発現を示した 3 種のメラニン合成酵素遺伝子 *tyrosine hydroxylase* (*th*)、*dopa decarboxylase* (*ddc*)、*laccase 2* (*lac 2*) のプロモーター上流域を *piggyBac* レポーターアッセイ・ベクターに挿入したコンストラクトが導入されたトランスジェニック・ナミテントウを解析し、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。

テントウムシ科内で認められる類似した斑紋はミューラー型擬態（有害なもの同士が似る擬態）として機能することが知られている。ナミテントウにおいて同定した斑紋プレパターン遺伝子の共通性・多様性をテントウムシ科内において発現および機能の面から解析する。さらに、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、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作製する。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わるようになってきたかについて考察する。また、色素合成過程においてナミテントウと差異が認められたテントウムシを用い、色素合成に関与する酵素遺伝子の発現および機能を解析し、色素合成過程に変化をもたらした原因を特定する。

これまでに行った研究結果より、ヘリグロテントウノミハムシの斑紋形成において重要な役割を果たすことが推定される *yellow* および *dopamine acetyltransferase* 遺伝子をヘリグロテントウノミハムシよりクローニングする。また、遺伝子発現を *in situ* hybridization 法により調査し、斑紋に相当する発現を示す遺伝子を同定する。さらに、larval RNAi 法を行い斑紋形成における機能を解析する。

<2008 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

ナミテントウにおいて斑紋特異的な発現パターンを示す遺伝子として同定した *th*、*ddc*、*lac 2* 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]* を導入した形質転換ナミテントウを作成した。各コンストラクトにつき、独立した 4?6 の系統が得られ、その形質転換効率は、5.1～7.7%であった。次に、これらの系統を野生型と交配し、形質転換体の個体数を殖やし、*EGFP* レポーターの発現を観察したところ、これらの内在性遺伝子が発現する蛹後期の翅原基において *EGFP* の蛍光は認められなかった。したがって、今回クローニングした各酵素遺伝子のプロモーター上流域には、斑紋に従った発現の制御領域は含まれていないことが示唆された。

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

ニジュウヤホシテントウから、クチクラの硬化に関わる酵素遺伝子として *ebony*、メラニン合成経路で作用する酵素遺伝子として *th*、*yellow*、*ddc*、*lac 2* の cDNA をクローニングした。得られた遺伝子の塩基配列から推定されるアミノ酸配列は、いずれも各種昆虫において報告されたものと高い相同性を示した。次に、larval RNAi 法を行い、成虫クチクラの着色を観察した。その結果、ナミテントウとニジュウヤホシテントウの 2 種間で最も顕著な違いが現れたのは *ebony* の RNAi であった。ナミテントウでは黒色領域が拡大しただけだったのに対し、ニジュウヤホシテントウでは赤色領域が黒色に変化した表現型が観察された。以上の結果より、ニジュウヤホシテントウの赤い

斑紋は *ebony* によって制御されることが明らかとなった。

これまで、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が、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得られなかった。そこで、これまでに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の作製を試みた。大腸菌を用いて発現させたリコンビナントタンパク質を精製し、ウサギ、ラット、モルモット各2匹ずつに免疫したが、いずれも斑紋プレパターン遺伝子産物を認識する抗体は残念ながら得られなかった。

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の斑紋形成において重要な役割を果たすことが推定される *yellow* 遺伝子をヘリグロテントウノミハムシよりクローニングした。他の昆虫の配列と比較したところ、アミノ酸レベルで 60 ~ 71% の相同性が認められた。現在、larval RNAi 法を用いた機能解析を行う準備を進めている。

<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が、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不可欠な形質転換体や 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>

予想外の困難としては、斑紋プレパターン遺伝子産物に対する抗体が作製できなかったことである。これまでは、目のレベルで

異なる昆虫においても保存性の最も高い DNA 結合領域に対する抗体の作製を試みてきたが、少なくともテントウムシ間で保存された他の領域に着目し、抗体作製を試みる予定である。

<今後の課題>

1. 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

トランスジェニック・ナミテントウを用い、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の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. 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

テントウノミハムシから既に単離した斑紋プレパターン遺伝子および色素形成遺伝子群の発現および機能を解析し、斑紋特異的な発現パターンを示す遺伝子を同定する。

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

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・ナミテントウを用いて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。

<成果公表リスト>

1. 著書

- (1) 901151603 新美輝幸 (2009) 昆虫の斑紋をつくる遺伝子を探る. 「昆虫が語る生物学の未来」, 衣笠会繊維研究所 (印刷中)
- (2) 901151606 新美輝幸 (2009) 模様と形の多様性創出. 「分子昆虫学」, 共立出版 (印刷中)

2. その他 (総説)

- (1) 901151611 新美輝幸・柳沼利信 (2006) ナミテントウの larval RNAi 法. 日本比較内分泌学会ニュース, 121, 32-37.
- (2) 901151614 新美輝幸・桑山久史・原喜実子・柳沼利信 (2006) ナミテントウの遺伝子機能解析システムの現状と将来. 蝨糸・昆虫バイオテック, 75, 175-182.
- (3) 901151616 原喜実子・大場裕一・柳沼利信・新美輝幸 (2008) ナミテントウ幼虫の斑紋パターンの変化. 比較内分泌学, 34, 146-148.
- (4) 901151618 後藤久美子・大場裕一・柳沼利信・新美輝幸 (2008) テントウムシに関連した擬態. 比較内分泌学, 34, 219-221.

3. 共同研究

筑波大の三輪佳宏博士 (生命システム情報) および遺伝研の池尾一穂博士 (応用ゲノム) との共同研究を進めている。