

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

<研究の目的と進め方>

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。

< 2007 年度の研究の当初計画 >

1. 鱗翅目昆虫の幼虫皮膚・翅の cDNA データベースの構築と解析：カイコ・ナミアゲハ・シロオビアゲハの幼虫皮膚とシロオビアゲハの翅原基の cDNA ライブラリーを構築し、支援班のサポートを受けて各々 1 万～2 万の配列解析を行い、データベースを構築した。今年度は、その中から、皮膚構造・翅形態の多様化や色素合成・紋様形成に関与する遺伝子候補を探索し、in situ hybridization 法で重要遺伝子の発現パターンを解析し、擬態形成に関与する遺伝子を枚挙する。

2. cDNA サブトラクション法による擬態関連遺伝子の枚挙：アゲハ幼虫では 4 齢脱皮直後に幼若ホルモン JH が擬態紋様の運命を切り替える。JH 存在と JH 非存在の条件下での発現遺伝子の違いを cDNA サブトラクション法によって解析する。また、同法を用いて、アゲハ幼虫の紋様領域ごとの遺伝子発現パターンの違い、シロオビアゲハメスのベイツ擬態型・非擬態型間の遺伝子の発現の違いをそれぞれ検索する。

3. カイコ幼虫紋様遺伝子座 p 及び L の原因遺伝子の同定：前年度までに SNP 解析とポジショナルクローニング法により、p, L の候補遺伝子が示された。今年度は、各アリアルルの突然変異サイトの同定などから、最終的な原因遺伝子を決定する。さらに、トランスジェネシスで候補遺伝子の機能検定を行う。

4. アゲハ異種間交雑種の擬態紋様遺伝子の解析：

アゲハ異種間 (アゲハ、ナミアゲハ、キアゲハ) での交雑種を作成し、種特異的な紋様形成遺伝子の発現パターンを解析し、トランス因子、シス因子のいずれにより紋様が多様化したかを解析

する。また、紋様形成ネットワークの上位制御遺伝子を探索する。

< 2007 年度の成果 >

1. 鱗翅目昆虫 3 種の EST ライブラリーの比較解析：カイコ・ナミアゲハ・シロオビアゲハの幼虫皮膚とシロオビアゲハの翅原基の cDNA ライブラリーを 1 万～2 万の配列解析を行い、手動補正などで精緻化した EST データベースを構築した。アゲハ 2 種には含まれるがカイコには含まれない遺伝子として青色色素結合遺伝子、JH 結合タンパク質相同遺伝子 (JBR) などが見つかりこれらがアゲハ幼虫に特徴的な緑色の体色形成に関わっていることが示唆された。さらにアゲハ JBR を約 10 種類同定し、カイコの JBR14 種と比較したところ、アゲハの 4 つの JBR はアゲハ特異的なクラスターを形成し、in situ hybridization の結果から、これらの遺伝子が黄色、緑、白色など幼虫擬態紋様に関わる新規遺伝子群であることが示された。また、アゲハの擬態紋様形成に関わる遺伝子の網羅的探索を目的に、上記の EST ライブラリーデータベースを基に約 10000 の non-redundant なオリゴプローブを設計し、マイクロアレイを作成した。

2. cDNA サブトラクション法による擬態関連遺伝子の枚挙：アゲハ幼虫で JH が紋様を切り替える時期と考えられる 4 齢脱皮直後に JH 処理を行った個体と非処理個体間で cDNA サブトラクションを行った。100 クロンの予備的な解析から、JH 処理で発現が変動するクチクラ遺伝子、JH の分解に関わる JH エポキシヒドロラーゼが得られた。また、これとは別に紋様領域を切り分けて紋様ごとの cDNA サブトラクションを行い、200 クロンの予備的解析から、黒色紋様、白色部で特異的に発現する新規遺伝子が得られた。今後スケールアップして、より多くの擬態関連遺伝子を枚挙する予定である。

3. カイコ幼虫紋様遺伝子の同定：ポジショナルクローニングにより、p, L 遺伝子座の原因領域をそれぞれ 20kb、100kb に絞込んだ。各体節に特有な斑紋を生じる L (褐円) については、100kb 領域内の遺伝子構造の解析、in situ hybridization 発現パターン、機能解析からカイコの Wnt1 (wingless) が原因遺伝子とほぼ同定された。これまで Wnt ファミリーが表皮紋様の直接の原因遺伝子として示されたことはなく、今回が初めての報告である。一方、p 遺伝子座については原因遺伝子候補を数個に絞り込んだ。当初の研究計画以外にカイコの紋様・体色に関する遺伝子座の原因遺伝子として、赤蟻 (ch: 幼虫の紋様部の黒色化が生じない) は yellow、煤色 (so: 幼虫と蛹が黒化する) は ebony、と同定した。いずれもメラニン合成系の遺伝子であり、これらが体色や紋様と深く関わっていることが実証された。

4. カイコとアゲハのクチクラタンパク質の比較：カイコとアゲハでは紋様だけでなく体表表面の構造も異なることから、クチクラタンパク質の比較解析が擬態形成の理解には重要と考えられ

る。両者でクチクラタンパク質の発現を比較すると、遺伝子構成や体表での発現パターンは大きく異なっていた。アゲハの若齢幼虫では、イボ状突起や特定の紋様と関連のあるクチクラタンパク質が複数得られた。一方、カイコでは200以上のクチクラ遺伝子が存在し、それらの多くは大規模な遺伝子クラスターを形成していることが判明した。22番染色体に見られる最大のクラスターには53種類の遺伝子が存在するが、ESTライブラリーの比較解析を行うと、同一クラスター内の遺伝子でも、組織特異性や発現時期特異性などは異なっていた。近縁な昆虫でも遺伝子重複などによりクチクラタンパク質遺伝子は大きく変動しており、それぞれの昆虫のライフサイクルに適した構造や形態をもたらすように多様化したと考えられる。

<国内外での成果の位置づけ>

毒チョウ *Heliconius* はミューラー型の擬態モデルとしてこれまで着目されてきた。一方、オランダの Brakefield 博士や米国の Carroll 博士らが、蝶の翅の紋様と pattern formation 関連遺伝子との関連を精力的に解析してきたが、擬態と明瞭に結びついた紋様の研究はほとんどない。擬態紋様形成を体系的に調べる今回のようなプロジェクトはこれまでになく、日本独自のカイコとアゲハが擬態・紋様形成の主役の“モデル昆虫”として位置づけられることを期待できる。日本で様々な側面から研究が進められているナミアゲハ (*P. xuthus*) は、紋様形成の対象としてはこれまで欧米での知名度が低かったが、当研究グループが JH による紋様制御機構などを発表した (Futahashi & Fujiwara, Science, in press) ことにより今後注目を集められると思われる。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

1. アゲハ異種間交雑種の擬態紋様遺伝子の解析に関しては、昨年度から進展がなかった。その理由は、交雑種をつくるための2種の交配のタイミングが合わせにくいこと、さらに交雑種の飼育が難しくサンプルが十分に得られなかったことが挙げられる。飼育頭数を増やし、餌の改良も含めて飼育技術の見直しを図る必要がある。

2. p 遺伝子座の原因遺伝子領域を20kb以内まで範囲を絞り込んだが、原因遺伝子の特定には至っていない。原因領域範囲内にある遺伝子(機能未知)のORF内には機能欠損となる変異は検出できないことから、エンハンサーなど遺伝子調節領域の変異が原因と考えられる。従って、原因遺伝子そのものは領域外にある可能性もあり、周囲の遺伝子まで含めて発現パターンなどを網羅的に調べなければならなかった。

3. ベイツ型擬態のモデルとしてシロオビアゲハ翅の紋様形成メカニズムを解明しようとしているが、進捗状況は芳しくなかった。その理由は、翅における *in situ hybridization* 法が確立していないため、着目遺伝子の発現と紋様形成との関連性が明確に示せない点が多い。

<今後の課題>

1. EST解析の有効性を増し、擬態紋様のメカニズムに肉薄するために、全く異なる幼虫紋様を持つキアゲハのESTデータベースを構築する。

2. ベイツ型擬態の解明に向けて、翅における *in situ hybridization* システムを確立する。また、擬態型シロオビアゲハのモデルとなるベニモンアゲハの翅原基ESTデータベースを構築する。

3. 今年度予備的に行った JH 処理と非処理間、皮膚紋様領域間の cDNA サブトラクションが有効であることが確認されたので、スケールアップして関連遺伝子を枚挙する。

4. アゲハのマイクロアレイ、カイコのマイクロアレイを用いて擬態紋様関連遺伝子の発現パターンを網羅的に比較解析する。

5. カイコの主要紋様形成遺伝子座 p の原因遺伝子を確定するとともに、各体節に特有な線状紋様をもつ Ze の原因遺伝子を同定する。

6. 各種アゲハの交雑種を作成し、擬態紋様形成遺伝子の発現パターンの比較解析を行う。

<成果公表リスト>

1) 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 (2008) in press.
 - 0801221611 Maita, N., Aoyagi, H., Osanai, M., Shirakawa, M. and Fujiwara, H. Characterization of the sequence specificity of the R1Bm endonuclease domain by structural and biochemical studies. Nucleic Acids Research, 35, 3918-3927 (2007)
 - 0707181706: Kawashima, T., Osanai, M., Futahashi, R., Kojima, T. and Fujiwara, H. A novel target-specific gene delivery system combining baculovirus and sequence-specific LINEs. Virus Res.127, 49-60 (2007)
 - 0705071422: Futahashi, R. and Fujiwara, H. Regulation of 20-hydroxyecdysone on the larval pigmentation and the expression of melanin synthesis enzymes and yellow gene of the swallowtail butterfly, *Papilio xuthus*. Insect Biochem. Molec. Biol. 37, 855-864 (2007)
 - 0705071759: Lobbia, S., Futahashi, R. and Fujiwara, H. Modulation of ecdysteroid induced cell death by juvenile hormone during pupal wing development in Lepidoptera. Arch. Insect Biochem. Physiol. 65, 152-163 (2007)
- 2) 著作
0702081139: 藤原晴彦: 似せてだます 擬態の不思議な世界、Dojin 選書2、化学同人(2007) 206 page

研究室 HP : <http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/animal/index.htm>