

研究課題別評価

1 研究課題名: 遺伝子機能によるテントウムシ斑紋のパターン形成機構

2 研究者氏名: 新美輝幸

3 研究の狙い:

自然に生じた遺伝的に異なる前翅の斑紋多型が存在するナミテントウは、進化の過程でもたらされた遺伝子上の変化がどのように形態・紋様の多様性を引き起こしたのかを研究するよいモデルとなる。約90年前から行われてきた遺伝学的交配実験により、ナミテントウの多様な斑紋は、主要な4種の斑紋の組み合わせ、すなわち親から由来する任意の2種の斑紋の重ね合わせにより生じ、黒色と赤色が重なった領域では、黒色が優性として現れることが明らかにされている。さらに斑紋型のヘテロ接合体どうしを交配した次世代ではメンデルの法則に従って斑紋型が分離することから、斑紋の多型は同一遺伝子座の複対立遺伝子によりもたらされると考えられている。しかしながら、斑紋がどのような機構で形成されるかは全く不明である。本研究では、ナミテントウ斑紋のパターン形成機構を分子レベルで明らかにするため、斑紋の形成過程を明らかにし、遺伝子機能解析を行うことにより斑紋のパターン形成に関与する遺伝子を同定することを試みた。さらに遺伝子の機能解析を行うことにより、斑紋多型の要因となる遺伝子上の変化を特定し、斑紋の多様性をもたらした進化メカニズムの一端の解明につなげることを目標とする。

4 研究成果:

1) 斑紋形成メカニズム

斑紋色素の発現過程を解析した結果、ヘテロ接合体において黒色と赤色が重なる領域において黒色が優性として現れるのは、黒色が赤色を隠蔽するからではなく、黒色領域と赤色領域は互いに重ならないように制御されていること、さらに翅を形成する背側の細胞ではメラニン形成、腹側の細胞ではカロテノイドの着色が生じることが判明した。したがって、背腹細胞の相互作用を通して斑紋が形成される可能性が示唆され、チョウの紋様形成とは異なるこれまでに報告例のない新規のメカニズムによりナミテントウの斑紋が形成されると考えられる。

2) 候補遺伝子の発現解析

様々な抗体を用いて免疫染色を行った結果、完全変態昆虫の中で原始的な鞘翅目昆虫に属するナミテントウにおいても、ショウジョウバエ翅パターン形成因子の局在は翅形成の初期段階ではよく保存されていることが明らかとなった。

また、ショウジョウバエの翅脈形成に関与する遺伝子の発現はナミテントウの前翅原基の全体にわたって観察された。したがって、鞘翅目昆虫が獲得した新奇形態である翅全体が硬化した前翅(鞘翅)は、翅脈形成過程に生じた変化に起因し、翅脈が翅全体に広がって生じた可能性が示唆された。この知見は鞘翅目昆虫の進化を考える上で大変興味深く、この問題の解決の糸口となることが期待される。

3) Larval RNAi 法による遺伝子機能解析

初期胚への二本鎖 RNA のマイクロインジェクションによる RNAi 法では、RNAi の効果は長期間持続しないため、後胚発生期の遺伝子機能阻害は困難であった。そこでまず、ナミテントウを用いて後胚発生期の遺伝子機能阻害に有効な幼虫への二本鎖 RNA のインジェクションによる larval RNAi 法を確立した。次に、斑紋形成過程で機能する遺伝子を同定するため、ナミテントウからクローニングした12種類の遺伝子について Larval RNAi 法を行ったところ、斑紋に変化が生じたものを少なくとも2種類同定できた。これら2種の遺伝子についてはさらに解析を進め、斑紋形成過程での役割を明らかにしていきたい。

ナミテントウにおいて確立した larval RNAi 法は、他の非モデル昆虫に応用することにより、これまで遺伝子の機能解析が困難であった後胚発生期の現象解明への有効な方法となることが期待される。

4) トランスジェニックナミテントウを用いた遺伝子機能解析

厳密な遺伝子の機能解析には形質転換体の利用は不可欠である。そこで、様々な昆虫において形質転換体の作出に有効な *piggyBac* ベクターを用い、多彩な遺伝子機能解析を行うため独自に工夫したベクターを開発し、以下の解析を行った。

異所的発現系には、テトラサイクリン的人為的な投与により発現の時期特異的な調節が可能なテトラサイクリン OFF システムを行うための *piggyBac* ベクターを作製した。まず、ショウジョウバエを用いてこれらベクターの有効性を確認した。次にこれらベクターを導入したトランスジェニックナミテントウを作出した。現在最適化の条件を検討中である。

遺伝子の機能解析を効率よく行うため、レポーターアッセイと異所的発現の両方に有効な、転写活性化能(テトラサイクリン制御性転写活性化因子、tTA)とレポーター能(GFP)を兼ね備えた融合タンパク質(tTA::GFP)の作製に成功した。

ゲノム中のエンハンサーの同定に有効なエンハンサートラップ法を行う基盤をナミテントウを用いて確立した。斑紋形成に関連した発現パターンを示す遺伝子を同定するためには、多くのエンハンサートラップシステムをスクリーニングする必要がある。キイロショウジョウバエでは、ジャンプスターターとミュテーターとの交配により多くの挿入変異系統が得られるジャンプスタート法が確立されている。ナミテントウにおいてジャンプスタート法を行うためには、*piggyBac* の転移酵素遺伝子が不動化したジャンプスターター因子がゲノム中に安定して維持されることが必要不可欠である。そこで、単一の *piggyBac* ベクターのみを用いてジャンプスタート法に必要なジャンプスターターとミュテーター(エンハンサートラップシステム)を同時に作出することができる画期的な新しい方法をトランスジェニックナミテントウを用いて開発した。これらのシステムを使用して、ナミテントウにおいてジャンプスタート法を行った結果、非常に高い効率で新規転移個体が得られることが判明した。さらに、計画では予定していなかった副次的な成果として、上記ベクターがナミテントウゲノムに挿入したシステムの中で、8 世代にわたり雄のみしか得られない系統が見いだされた。この系統は、ナミテントウの性決定機構または雌の生存に必須の遺伝子を探る上で重要な手掛かりとなることが期待されるだけでなく、害虫管理技術の観点からも大変興味深い。今後は、tTA::GFP をレポーターにもつエンハンサートラップシステムを多数スクリーニングして、斑紋に関連する発現や異所的発現に利用可能な翅原基で発現を示すシステムのスクリーニングを行う。

本研究で開発した遺伝子機能解析系は汎用性が高く他の昆虫にも応用可能であり、未開の生物資源である昆虫の人為的な改変を容易にし、新規の昆虫機能利用法や害虫防除法への発展が期待される。

5 自己評価:

本研究により、これまで全く不明であったナミテントウの斑紋形成機構の一端を明らかにすることができたことに加え、今後の研究の発展に必要な遺伝子機能解析系を大きく進展させることができた。なかでも、ナミテントウという非モデル昆虫を用いて、これまで不可能と考えられていたジャンプスターターの新規作出法を提案できたのは予想外の成果であった。

しかしながら反省すべき点も多々あった。作製したコンストラクトを導入したトランスジェニックナミテントウを確実に作出することは問題なく遂行できたが、予想以上に時間がかかってしまった。また一番の反省点は、論文の纏め方にあり、完成度が高くインパクトのある論文を目指したため、論文発表が遅れてしまったことにある。現在投稿準備中の論文は早期に完成させ、さらに次の論文では纏めるためのデータを早急に追加し、今後速やかに本研究成果のすべてを発表する予定である。

今後、最終目標を達成させるべく研究を継続し、本研究で得られた成果をもとにさらなる発展へと繋いでいきたい。

6 研究総括の見解:

テントウムシの斑紋パターンの形成機構を明らかにすることを目的とするユニークな研究である。遺伝子導入等の解析系を確立すると共に、今後の研究の展開に有用なトランスジェニック・テントウムシの作出にも成功し、斑紋形成機構の一端を明らかにした。しかし、方法論の確立に時間を要し研究の進捗は必ずしも良好とは言い難く、今後、確立された遺伝子機能解析系を活用しての研究展開を大いに期待したい。

7 主な論文等:

主な論文

1. Niimi, T., Kuwayama, H. and Yaginuma, T. (2005) Larval RNAi applied to the analysis of postembryonic development in the ladybird beetle, *Harmonia axyridis*. *J. Insect Biotechnol. Sericol.* **74** (in press)
2. Niimi, T., Kuwayama, H. and Yaginuma, T. A single versatile vector for genome-wide functional analyses. (submitted)
3. 新美輝幸・桑山久史・柳沼利信 (2003) ナミテントウの RNAi プロトコル. *細胞工学* **22**, 80-85.

口頭発表

1. 桑山久史・柳沼利信・新美輝幸: *piggyBac* ジャンプスターター因子を導入した形質転換ナミテントウの作出. 日本蚕糸学会中部支部第 58 回・東海支部第 54 回発表会ならびに特別講演会、名古屋、2002 年 11 月 15 日
2. Niimi, T., Kuwayama, H. and Yaginuma, T.: Generation of transgenic ladybird beetles for gene function analyses. Fourth International Workshop on Transgenesis and Genomics of Invertebrate organisms, California, USA, 2003 年 5 月 14 日
3. 新美輝幸・桑山久史・柳沼利信: ナミテントウにおける形質転換体作出法および RNAi 法の確立、第 39 回日本節足動物発生学会、潮来、2003 年 5 月 31 日
4. 新美輝幸・桑山久史・柳沼利信: ナミテントウにおける遺伝子機能解析系の確立. 日本発生生物学会第 36 回大会、札幌、2003 年 6 月 11 日
5. Niimi, T., Kuwayama, H. and Yaginuma, T.: Towards the establishment of gene function analysis systems in a nonmodel insect, ladybird beetle. ショウジョウバエ研究会第 6 回研究集会、東京、2003 年 7 月 30 日
6. 新美輝幸・桑山久史・柳沼利信: ナミテントウにおけるジャンプスタート法の確立. 日本蚕糸学会第 74 回大会 昆虫機能利用、盛岡、2004 年 3 月 30 日
7. 新美輝幸・桑山久史・柳沼利信: ナミテントウにおけるエンハンサートラップ法の試み. 日本発生生物学会第 37 回大会、名古屋、2004 年 6 月 6 日
8. 新美輝幸・桑山久史・柳沼利信: ナミテントウへの異所的発現系導入の試み. 第 40 回日本節足動物発生学会特別大会、菅平、2004 年 6 月 18 日

招待講演

1. 新美輝幸・桑山久史・柳沼利信: 形質転換ナミテントウを用いた遺伝子機能解析系の開発. 第 25 回日本分子生物学会年会ワークショップ「昆虫ゲノムの特異性と多様性」、横浜、2002 年 12 月 12 日
2. 新美輝幸: ナミテントウの斑紋パターン形成機構解明への分子遺伝学的アプローチ. 昆虫遺伝研究会「昆虫遺伝学 最近の話題」、東京、2003 年 3 月 29 日
3. 新美輝幸・桑山久史・柳沼利信: 遺伝子機能解析によるナミテントウ斑紋多型解明へのアプローチ. 第 26 回日本分子生物学会年会シンポジウム「21 世紀の進化発生学のチャレンジ」、神戸、2003 年 12 月 10 日
4. 新美輝幸: 遺伝子機能解析によるテントウムシの斑紋形成メカニズムの解明をめざして. 基生研

研究会「新しいモデル生物が拓く生物学フロンティア」、岡崎、2004年3月2日

5. 新美輝幸・桑山久史・柳沼利信:非モデル昆虫における遺伝子機能解析系の開発. 昆虫ワークショップ '04 基調講演、つくば、2004年5月27日

6. 新美輝幸・桑山久史・大場裕一・柳沼利信:テントウムシ斑紋の多様性創出メカニズムの解明へ向けて. 日本進化学会第6回大会シンポジウム「表現型可塑性の進化学」、東京、2004年8月6日

7. 新美輝幸・桑山久史・柳沼利信:ナミテントウの斑紋研究から擬態現象の理解へ. 日本動物学会第75回大会シンポジウム「昆虫の適応戦略の分子基盤 社会性から擬態まで」、神戸、2004年9月10日

8. 新美輝幸:ナミテントウ斑紋のパターン形成メカニズムの解明をめざして. 杏林大学学術フロンティアワークショップ「多様性と共通性」、神戸、2004年9月13日

9. 新美輝幸:ナミテントウの斑紋多型の解明をめざして. 講演会「昆虫の体色多形性発現および斑紋形成に潜む分子メカニズム解明への挑戦」、上田、2004年10月5日

10. 新美輝幸・柳沼利信:テントウムシ斑紋のパターン形成機構. 第27回日本分子生物学会年会ワークショップ「発生現象の再発見」、神戸、2004年12月9日

11. Niimi, T. and Yaginuma, T.: Towards understanding the molecular mechanism of wing-color pattern formation in the ladybird beetle, *Harmonia axyridis*. The 12th CDB Meeting “Diversity of Developmental Mechanisms in Invertebrates”, Kobe, Japan, 2005年2月2日

12. Niimi, T. and Yaginuma, T.: Gene function analysis systems in the ladybird beetle, *Harmonia axyridis*. NIAS/COE International Symposium “Genetic resources and functional genomics in insects”, Tsukuba, Japan, 2005年3月8日

13. 新美輝幸:テントウムシの斑紋形成と擬態現象の分子基盤の解明をめざして. 京都大学21世紀COEプログラム「生物多様性研究の統合のための拠点形成」公開シンポジウム「擬態と幼形成熟-昆虫の多様性の世界-」、京都、2005年3月10日