

博士論文

論文題目 武器甲虫の形態形成と表現型可塑性

氏名 小澤 高嶺

目次

略語表	1
論文内容の要旨	2
序章	8
0-1 環境と表現型可塑性	9
0-2 非モデル生物を用いた表現型可塑性のモデル系の構築	10
0-3 表現型可塑性のモデルとしての武器甲虫	10
0-4 実験材料「オオツノコクヌストモドキ」の長所	11
0-5 本研究の概説	12
 図表	 14
第1章 密度環境による蛹化時期の決定機構	18
序論	19
1-1 個体間相互作用と表現型可塑性	19
1-2 昆虫の共食いや捕食に適応した発生戦略	19
1-3 甲虫目に見られる個体群密度による蛹化の制御	20
1-4 オオツノコクヌストモドキの蛹化抑制における 環境要因の解明	21
 材料と方法	 23
2-1 昆虫	23
2-1-1 オオツノコクヌストモドキ	23
2-1-2 コクヌストモドキ	23
2-2 昆虫の飼育	23
2-2-1 飼育方法	23
2-2-2 オオツノコクヌストモドキの飼育	24
2-2-3 コクヌストモドキの飼育	24
2-3 個体間相互作用の実験系	24
2-3-1 実験環境	24
2-3-2 蛹化遅延効果の解析	24
2-3-3 共食い、捕食の観察	25
2-3-4 蛹化抑制効果への性の影響	25

2-3-5	接触刺激	26
2-4	統計解析	26
結果		28
3-1	終齢幼虫の個体密度による蛹化への影響	28
3-2	共食いの発生	28
3-3	他の発生ステージ、異種による抑制効果	28
3-3-1	蛹化抑制効果	28
3-3-2	共食いと捕食への影響	29
3-4	性の影響	29
3-5	接触刺激	30
考察		31
4-1	オオツノコクヌストモドキの蛹化抑制	31
4-2	共食い・捕食からの回避効果	31
4-3	機械的刺激	32
4-4	蛹化抑制の生理的機能	33
図表		35
第2章 武器形質の形態可塑性のエピゲノム制御		43
序論		44
5-1	栄養環境と表現型可塑性	44
5-2	武器昆虫の形態可塑性	45
5-3	武器形質の分子機構	46
5-3-1	幼若ホルモン	46
5-3-2	性決定経路	47
5-3-3	インスリン/インスリン様シグナル伝達経路	48
5-4	クロマチン構造とエピジェネティック修飾	49
5-5	ヒストン脱アセチル化修飾酵素 (HDAC)	51
5-6	表現型可塑性とエピゲノム	51
5-7	武器甲虫の栄養応答の形態可塑性の解明	53
5-7-1	形態可塑性の分子制御機構	53
5-7-2	分子実験系の確立	53
5-7-3	栄養条件間での比較トランスクリプトーム解析	54

材料と方法	55
6-1 オオツノコクヌストモドキ	55
6-2 性判別 PCR	55
6-3 マイクロインジェクション	55
6-4 ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬剤	55
6-5 RNAi 法	56
6-5-1 dsRNA の作製	56
6-5-2 dsRNA のマイクロインジェクション	58
6-6 リアルタイム PCR による遺伝子ノックダウン効率 ・発現量の評価	58
6-7 <i>de novo</i> トランスクリプトーム解析	59
6-7-1 RNA の精製	59
6-7-2 Illumina Miseq による配列取得	60
6-7-3 リードデータの処理	60
6-7-4 <i>de novo</i> トランスクリプトームアッセンブル	61
6-7-5 データベース検索	61
6-8 栄養条件による発現変動遺伝子の網羅的探索	62
6-8-1 栄養条件と発生段階の設定	62
6-8-2 RNA 精製	62
6-8-3 テンプレートスイッチング法	63
6-8-4 Illumina Hiseq による配列取得	65
6-8-5 参照配列の作製	67
6-8-6 発現変動遺伝子の検出	67
6-9 形態観察と形態計測	68
6-9-1 標本の作製	68
6-9-2 形態観察	68
6-9-3 成虫の形態計測	68
結果	70
7-1 HDAC 阻害剤 TSA の影響	70
7-2 オオツノコクヌストモドキの分子実験系の確立	70
7-2-1 RNAi 実験系の確立	70
7-2-2 <i>de novo</i> トランスクリプトーム解析	71
7-2-3 オオツノコクヌストモドキの HDAC の同定	71
7-3 RNAi による HDAC の機能阻害実験	72
7-3-1 蛹の形態への影響	72

7-3-2	成虫の大顎形態への影響	72
7-3-3	ノックダウン効果の検証	73
7-4	比較トランスクリプトーム解析	73
7-4-1	クラスターリング解析	74
7-4-2	オスの栄養条件間の遺伝子発現プロファイルの比較	74
7-4-3	RNAi によるスクリーニング	75
考察		76
8-1	新規モデル実験系としてのオオツノコクヌストモドキの 有用性	76
8-2	形態形成における HDAC 遺伝子の機能	77
8-3	HDAC1/2 と HDAC3 遺伝子の機能	78
8-4	HDAC1/2、HDAC3 の部位特異性	79
8-5	武器形成に関わる因子	81
図表		83
参考文献		116
謝辞		127

略語表

ANCOVA	analysis of <u>c</u> ovariance
Dmrt	<u>d</u> oublesex- and <u>m</u> ab-3- <u>r</u> elated <u>t</u> ranscription factor
DMSO	<u>d</u> imethyl <u>s</u> ulfo <u>x</u> ide
dsx	<u>d</u> ouble <u>s</u> ex
FRAP	<u>F</u> KBP12- <u>r</u> apamycin- <u>a</u> ssociated <u>p</u> rotein
HDAC	<u>h</u> istone <u>d</u> eacetylase
InR	<u>i</u> nsulin <u>r</u> eceptor
IRS	<u>i</u> nsulin <u>r</u> eceptor <u>s</u> ubstrate
JH	<u>j</u> uvenile <u>h</u> ormone
PCR	polymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction
RAPTOR	<u>r</u> egulatory <u>a</u> ssociated <u>p</u> rotein of m <u>TOR</u>
RNAi	<u>R</u> NA <u>i</u> nterference
TOR	<u>t</u> arget of <u>r</u> apamycin
TSA	<u>T</u> richostatin <u>A</u>

論文内容の要旨

【背景と目的】

生物が生息する環境は多くの場合予測不可能であり、絶え間なく変動している。生物の表現型は、ゲノム情報によって一義的に決まるわけではなく、こうした環境変動に応じて柔軟に変化し（表現型の可塑性）、変動環境を生き抜くことを可能にしている。表現型の可塑性は、個体レベルでは適応的な表現型の変化をもたらし、集団レベルでは多様な表現型を生み出すことで、環境変動に対する個体の頑丈性や個体群レベルでの生存戦略において重要な役割を果たしている。環境と表現型可塑性は今日大きな注目を集めている課題であるが、両者を結び付ける具体的な分子機構の存在には未解明であり、統合的な理解には至っていない。そこで本研究は、環境条件と表現型可塑性をつなぐ連携機構に着目した。

環境と表現型可塑性を解明するためには、既存のモデル生物ではなく、可塑性の解析に適した性質を持つ非モデル生物を用いることが有効だと考えられる。しかしながら、非モデル生物は飼育や維持が困難な種が多く、加えて、ゲノム情報が未知であることや、遺伝学的な解析手法も確立されておらず、分子生物学的手法の適応には実験系を新規に構築する必要がある。近年、次世代シーケンサーや RNA 干渉法、ゲノム編集技術などの発展から、非モデル生物の遺伝解析が可能になり、非モデル系を活用した研究が活発化し始めている。本研究では、環境要因と表現型可塑性の連携機構の解明に適した新たなモデル系として、武器甲虫を用いた新しい実験系の構築を行った。

小型の武器甲虫であるオオツノコクヌストモドキは、カブトムシやクワガタムシなどにみられる角や大顎といった武器形質（大顎）を持ち、他の武器甲虫と同様に、本種オスの大顎は幼虫時の栄養によって顕著な形態変化を示す。また、本種には幼虫の密度が高い環境では終齢幼虫の蛹化が抑制される、という変態過程の環境依存的な可塑性がある。この性質によって蛹化の進行を人為的に操作することができ、個別に隔離するこ

とで蛹化（変態）を任意のタイミングで誘導することが可能である。加えて、成虫の体長は 3～4mm 程度と小型であり、世代時間が約 1 か月半と短い。害虫でもある本種は、全粒粉によって大量の通年維持が可能である。本種は以上のような優れた性質を持ち、従来のモデル生物とは異なる性質を持つ新たな“武器昆虫のモデル系”として発展する可能性がある。

これら背景のもと、本研究では、環境要因と表現型可塑性を繋ぐ生体メカニズムの解明を目的とし、オオツノコクヌストモドキを新しいモデル系として用いた。本研究では、本種が示す変態過程の密度依存性についての生理学的解析、栄養環境と武器形質の形態可塑性の制御機構について解析を行った。

個体密度による蛹化時期の決定機構では、本種の個体間相互作用に注目した。本種の蛹化時期を決定する要因について、同種の性別や密度、異種の影響、物理的接触刺激の影響を検証した。さらに蛹化時期の可塑性の適応的意義を探索するため、蛹化の遅延による共食い回避、捕食回避効果を検証した。

栄養環境と武器形質の形態可塑性の制御機構の解析では、栄養条件と表現型の間を取り持つ分子メカニズムを解析した。非モデルである本種に次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析を最大限に活用し、ターゲット遺伝子の配列や発現情報を得るとともに、本種における遺伝子機能解析手法として RNAi 法による標的遺伝子のノックダウン法を確立し、これらを組み合わせた分子実験のパイプラインを確立した。この分子実験系を用い、大顎形態の可塑性を担う分子機構としてエピゲノム制御に注目し、解析を行った。さらには、栄養条件と雌雄間で、形態形成時期に頭部で発現する遺伝子について比較トランスクリプトーム解析を行い、武器形成の分子発生学的な基盤を解明した。

【結果および考察】

1. 個体密度による蛹化時期の決定機構

蛹化時期の決定要因について、異種の影響を始め、同種の性別、環境中に広くみられる接触刺激の影響について調べた。さらに発生が遅延による共食い、捕食に対する回避効果について発生段階ごとの脆弱性を評価した。本種の幼虫を、同種の幼虫と成虫、異種であるコクヌストモドキの成虫の存在下で維持した時、前蛹期に到達するまでの期間は顕著に延長した。また幼虫の性環境は蛹化時期に影響しなかった。これらの結果は、蛹化時期の決定要因は性別や種に特異的ではなく、他種を含めた広範な刺激が蛹化抑制に関わることを明らかにした。

加えて、ガラスビーズをぶつけることによる物理的な接触刺激が蛹化を抑制することを発見した。また、捕食回避能力の解析からは、本種は幼虫期に比べ、前蛹期と蛹期が共食いや捕食に対し脆弱であることも見つけた。これらの結果から本種の幼虫は蛹化の決定に生物種非特異的な接触刺激を用いることを示した。こうした物理刺激への応答性は共食いだけでなく捕食者に対するより一般的な防御機能と考えられる。これらの解析は、個体間相互作用と蛹化時期決定メカニズムを解明するのみならず、本種の変態過程の制御機構を解明することで、発生過程を操作する実験系の構築にも貢献している。

2. 栄養環境と武器形質の形態可塑性の制御機構

分子実験系の確立

RNAi 法の有効性の検証実験には、形態変化の予測が容易なホメオティック遺伝子 *Proboscipedia* 遺伝子を用いた。*Proboscipedia* 遺伝子に RNAi によるノックダウンを行い、形態への影響を確認した。この結果から、本種においても、RNAi を用いた分子発生学的な操作実験が効率的に実施可能であることがわかった。

次に、次世代シーケンサーを用いて本種の遺伝子配列情報の取得を行った。発現す

る遺伝子の種類は発生段階や部位で異なることが予想されるため、幼虫、オスの蛹、オスの成虫のそれぞれの全身、さらに武器形質の形態形成に関わる終齢幼虫と前蛹期の頭部から全RNAを精製し、発現する遺伝子について *de novo* RNA-seq を用いて解析した。得られた遺伝子配列についてデータベースを用いた相同性検索を行った。その結果、4878 の新規遺伝子配列を取得した。これら結果から、本種における分子実験系の確立に成功した。

武器形質の形態形成におけるエピゲノム制御

武器形質の形態形成へのエピゲノム制御の関与の可能性を検証するため、まず終齢幼虫にヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）阻害剤 TSA を注射し、成虫の武器サイズへの影響を調べた。その結果、TSA 処理群において、体サイズに対して相対的な大顎サイズの増大が観察された。この結果から、大顎のサイズ決定に前蛹期の HDAC が何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。

次に、大顎の形態形成への HDAC の機能を調べた。上記の *de novo* RNA-seq 実験で同定した遺伝子リストの中に HDAC1/2、HDAC3、HDAC4/5、HDAC6/10、HDAC11 の 5 種類の HDAC ファミリー遺伝子を見出した。各 HDAC ファミリー遺伝子について RNAi によるノックダウンを行い、対照群とともに蛹段階の個体について大顎などの形態観察を行った。その結果、HDAC4/5、HDAC6/10、HDAC11 処理個体では、形態への影響はほとんど観察されなかったが、HDAC1/2 RNAi 処理個体では顕著な大顎の縮小が観察された。また、HDAC3 処理個体では逆に顕著な大顎の増大が見られた。

次に、各 HDAC ファミリー遺伝子について RNAi を行い、得られた成虫について形態への影響を調べた。この場合も、HDAC4/5、HDAC6/10、HDAC11 RNAi 処理群では体サイズに対する大顎サイズの影響は見られなかった。一方、HDAC1/2 RNAi 処理群では体サイズに対する相対的な大顎サイズが減少することが、再度確認された。さ

らに、HDAC3 処理個体では RNAi 処理群では、体サイズに対する相対的な大顎サイズが増大することが判明した。

オスの栄養条件間の遺伝子発現プロファイルの比較

大顎の形態形成に最も関わると考えられる前蛹前期と前蛹中期において、遺伝子発現プロファイルをオスの栄養条件間で比較した。前蛹前期、前蛹中期における発現変動の大きい上位 50 遺伝子について、それぞれクラスタリング解析を行った。それらの結果、前蛹前期では 344 個、前蛹中期では 31 個の遺伝子が栄養応答遺伝子として同定された。この中には武器形質の形成に関与が示唆されるインスリン/mTOR 経路の mTOR が含まれていた。

大顎形態形成への関与が示唆された HDAC と因子について栄養間での個々の遺伝子の発現変動について調べた。その結果、HDAC ファミリー遺伝子について、HDAC1/2、HDAC6/10 は前蛹前期中期ともに栄養条件間での発現変動はみられなかった。HDAC3、HDAC4/5 は、前蛹前期で発現変動が見られた。HDAC3 と HDAC11 は大型群で発現が高い傾向が見られ、HDAC4/5 は小型群発現が高い傾向が見られた。インスリン/mTOR 経路の因子については、前蛹前期において、FRAP (mTOR)、RICTOR、RAPTOR、IRS の発現が小型群で高い傾向が見られた。また、前蛹中期では、FRAP (mTOR) と IRS の発現が小型群で高い傾向が見られた。

インスリン経路に関わる各遺伝子群について、網羅的 RNAi スクリーニングを開始した。まず、InR、FRAP (mTOR)、RAPTOR に対する dsRNA をマイクロインジェクションし、蛹形態への影響を観察したところ、InR、mTOR、RAPTOR の RNAi において、大顎の縮小が観察された。

このように本研究では、次世代シーケンサーを用いて遺伝子情報を取得し、遺伝子機

能解析手法として RNAi 法を確立し、これらを組み合わせた分子発生学的実験系を確立することに成功した。この分子実験系を用い、武器形質の形態形成に HDAC が関与することを初めて明らかにし、表現型可塑性とエピゲノム機構の重要性が示されたことになる。さらに、武器形成過程の栄養応答遺伝子やインスリン経路/mTOR 経路の栄養応答性や下流経路の機能について初めて明らかにし、武器形成経路の分子基盤について重要な知見を得たと言える。

序章

0-1 環境と表現型可塑性

生物が生息する環境は絶え間なく変動しており、その変化は予測不可能である。生物の表現型は、ゲノム情報によって一義的に決まるわけではなく、こうした環境変動に応じて柔軟に変化し（表現型の可塑性）、変動環境を生き抜くことを可能にしている。表現型に作用しうる環境要因には光や温度など生息環境の気候的要因をはじめ、生物集団内で見られるの個体密度などの個体間相互作用や、生体内の栄養状態などといった多様な要因が知られており、多くの生物ではこれらの変化に適応した表現型を作り出すしくみを獲得している。表現型の可塑性は、個体レベルでは適応的な表現型の変化をもたらし、集団レベルでは多様な表現型を生み出すことで、環境変動に対する個体の頑丈性や、個体群レベルでの生存戦略において重要な役割を果たしている(West-Eberhard, 2003)。

可塑的な表現型制御の背景には、発生、成長や代謝に関わる遺伝子の発現を環境に応じて適切に変化させる遺伝的、発生学的、生理学的な仕組みが存在すると考えられる。加えて、この制御の特徴は、遺伝子発現パターンの多様性を同一のゲノム情報から作り出すことである。このような DNA 配列変化を伴わない遺伝子発現機構はエピジェネティクスと呼ばれている(Waddington CH, 1942; Riggs AD et al., 1996)。エピゲノム制御は真核生物において広く保存されており、細胞の分化に伴い、ゲノム上に DNA メチル化やヒストン修飾などの化学修飾が施され、遺伝子発現パターンの細胞メモリーとして機能している (Jaenisch and Bird, 2003)。さらに環境変化がエピゲノム変化を誘導することが知られており、表現型可塑性の分子基盤の 1 つとして、エピゲノム制御が想定されている(Gilbert and Epel, 2009)。

環境と表現型可塑性は大きな注目を集めつつある課題であるが、両者を結び付ける具体的な分子機構についてはほとんどわかっていない。そこで本研究は、環境条件と表現型可塑性の連携機構に着目した。

0-2 非モデル生物を用いた表現型可塑性のモデル系の構築

環境と表現型可塑性を解明するためには、第一に「環境要因によって顕著に表現型の変化を示す生物」を利用することが必須である。これまで広く用いられてきているショウジョウバエやマウスといったモデル生物は、均一性や安定性などの生物学的な利点から生物種の選定が行われている。これらの点は、表現型解析の精度を高め、また個体の取り扱いを容易にする反面、表現型の可塑性の解析に不適な過剰な均一性をもたらす。したがって、表現型可塑性の解析には、これら従来型モデル生物とは異なる新たな「非モデル生物」を導入する必要がある。

しかしながら、非モデル生物はそれらの生活史の特殊性から実験室内での飼育や維持が困難な種が多い。加えて、ゲノム情報が未知であることや、遺伝学的な解析手法も確立されておらず、分子生物学的手法の適応には実験系を新規に構築する必要がある。ところが近年、次世代シーケンサーや RNA 干渉法(RNAi)、ゲノム編集技術などの発展から、非モデル生物の遺伝解析が可能になり、種々の研究が開始されるに至っている。本研究では、このような研究の新しい潮流を踏まえた上で、環境要因と表現型可塑性の連携機構の解明に適した新たなモデル系として、武器をもつ昆虫に着目し、独自に実験系を立ち上げることにした。

0-3 表現型可塑性のモデルとしての武器甲虫

表現型可塑性のモデル系に適した生物種は、人為的に制御可能な環境要因によって顕著な表現型可塑性を示し、飼育や繁殖が容易である必要がある。

昆虫類には環境要因によって顕著な表現型変化を示す生物種が多く存在する。例えば、バッタの相変異や鱗翅目に見られる季節型、ハチやアリなどの社会性昆虫にみられるカースト多型などがよく知られる例である(West-Eberhard, 2003)。カブトムシの角に見られるような、オス間競争で用いる“武器”もまた、大きな環境変異を示す表現型の好例

である。本研究では表現型可塑性のモデル系として武器甲虫に着目した。

甲虫目では、カブトムシやクワガタムシのように、角や大顎といった武器形質が発達している事例が多い（図 0-1）。武器形質はオスのみで顕著に発達し、性的二型性を示す（図 0-2A）。また、甲虫では成長期である幼虫の間の栄養条件に依存して、角や大顎などの武器形質に顕著な形態変化を示す（図 0-2B）。生育環境の栄養条件が良い大型の幼虫は、成虫期に大型の武器形質を発達させ、一方で栄養条件が悪い小型の幼虫は過度に小さい武器を持つ小型の成虫になる。このような武器形質の栄養依存性の作用点は、“成虫原基”（幼虫がもつ成虫器官の原器）の発生過程であると考えられており、特に幼虫から蛹・成虫へのダイナミックな形態形成が起こる前蛹期（幼虫期から蛹期への移行段階）が重要な発生過程であると考えられている(Moczek, 2009)。

0-4 実験材料「オオツノコクヌストモドキ」の長所

オオツノコクヌストモドキ（以下本種と略記, 図 0-3A）は、変態過程や成虫の形態形成が幼虫期の栄養条件と個体密度に大きく影響され、顕著な表現型可塑性を示す(Okada et al., 2006; Tsuda and Yoshida, 1985)。他の武器甲虫と同様に、本種オスの大顎は幼虫時の栄養によって大きく発達度合いが変わる(図 0-3B, Okada and Miyatake, 2010b)。

また、本種には幼虫の密度が高い環境では終齢幼虫の蛹化が抑制される、という変態過程の環境依存的な可塑性がある(Tsuda and Yoshida, 1985)。この性質によって蛹化の進行を人為的に操作することができ、高密度条件で蛹化を抑制させた状態で維持することや、個別に隔離することで蛹化（変態）を任意のタイミングで誘導することが可能である（図 0-4A）。高密度条件では、終齢幼虫の蛹化を抑制させた状態で大量に発生段階を揃えた状態で維持できるため、武器形成の決定期である前蛹期の個体を容易に多数得ることができ、操作実験を円滑に進めることができる。終齢幼虫から約 2 週間で成虫ま

で発生するため、終齢幼虫への操作実験の効果を短期間で検証することができるのも大きな利点である（図 0-4B）。また、成虫の体長は 3~4 mm 程度と小型であり、世代時間が約 1 か月半と短い。害虫でもある本種は、全粒粉によって大量の通年維持が可能であるため、実験生物として優れている。

以上のような優れた性質を持つ本種において、分子実験系を確立することは、表現型可塑性の解明に大きく貢献することが期待できる。例えば、蛹化過程における RNAi スクリーニングなどを大量かつ簡便に行うことができるため、分子レベルでの解明が急速に進展することが期待できる。さらには、変異系統は蛹化抑制を利用することで容易に維持することが可能である。このように本種は“武器昆虫のモデル系”として今後発展が期待できる。

0-5 本研究の概説

本研究では、環境要因と表現型可塑性を繋ぐ生体メカニズムの解明を目的とし、オオツノコクヌストモドキを新しいモデル系として用いた。本論文では、第 1 章で本種が示す変態過程の密度依存性についての生理学的解析、第 2 章では栄養環境と武器サイズの可塑性におけるエピゲノム機構の関与の検証、および栄養環境による武器サイズ可塑性をもたらす遺伝子の網羅的発現解析について論じ、最後に総合的な考察を行った。

第 1 章の個体密度による蛹化時期の決定機構では、本種の個体間相互作用に注目した。本種の蛹化時期を決定する要因について、同種の性別や密度、異種の影響、物理的接触刺激の影響を検証した。さらに蛹化時期の可塑性の適応的意義を探るため、蛹化の遅延による共食い回避、捕食回避効果を検証した。これらの解析は、個体間相互作用と蛹化時期決定メカニズムを解明するのみならず、本種の変態過程の制御機構を解明することで、発生過程を操作する実験系の構築にも貢献している。

第 2 章の栄養環境と武器形質の形態可塑性の制御機構の解析では、栄養条件と表現型

の間を取り持つ分子メカニズムを解析した。まず、非モデルである本種に次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析を最大限に活用し、ターゲット遺伝子の配列や発現情報を取得した。次に、本種における遺伝子機能解析手法として RNAi 法による標的遺伝子のノックダウン法を確立し、これらを組み合わせた分子実験のパイプラインを確立した。この実験系を用い、大顎形態の可塑性を担う分子機構としてエピゲノム制御に注目し、解析を行った。さらに、形態形成時期に頭部で発現する遺伝子について、栄養条件の違いや雌雄間における比較トランスクリプトーム解析を行い、武器形成の分子発生的な基盤を確立した。本論文で構築した分子実験系は他種にも広く応用が可能であり、武器形成やその可塑性の分子基盤解明、生物の栄養応答機構の解明など、多くの波及効果を潜在するシステムを作ることができたと考えている。また、本研究を通じて、昆虫の表現型可塑性がエピゲノム修飾因子によって制御されている可能性が強く示唆された。エピゲノム制御は栄養環境との関係が深いことが知られている。以上のことを総合し、栄養環境の変化がエピゲノム制御を介して武器甲虫の武器形態を制御するという、新規な概念を提案する。この概念は、哺乳類で報告されている発生初期の栄養状態が成長期の健康状態を決定するというバーカー仮説と類似性が高く、生物に広く見られる普遍的な機構が存在することが予想される。今回確立したオオツノコクヌストモドキを用いた分子生物学的解析系は、武器形質分化の分子機構の解明だけでなく、生物共通の栄養応答反応に対する本質的な理解をもたらすことが期待される。



図 0-1 甲虫にみられる武器形質

多くの種で武器形質はオスにのみに発達し、頭部および胸部に多様な形態がみられる。上段左から、コクワガタ (*Dorcus rectus*)、ミヤマクワガタ (*Lucanus maculifemoratus*)、インカツノコガネ (*Inca clathratus*)。下段左から、ミヤマダイコクコガネ (*Copris pecuarius*)、シロヘリミドリツノカナブン (*Dicronorhina derbyana*)、フローレンシスヒメカブト (*Xylotrupes florensis*) (インカツノコガネ、ミヤマダイコクコガネ、シロヘリミドリツノカナブン、フローレンシスヒメカブトの写真は、小島渉博士より提供)。

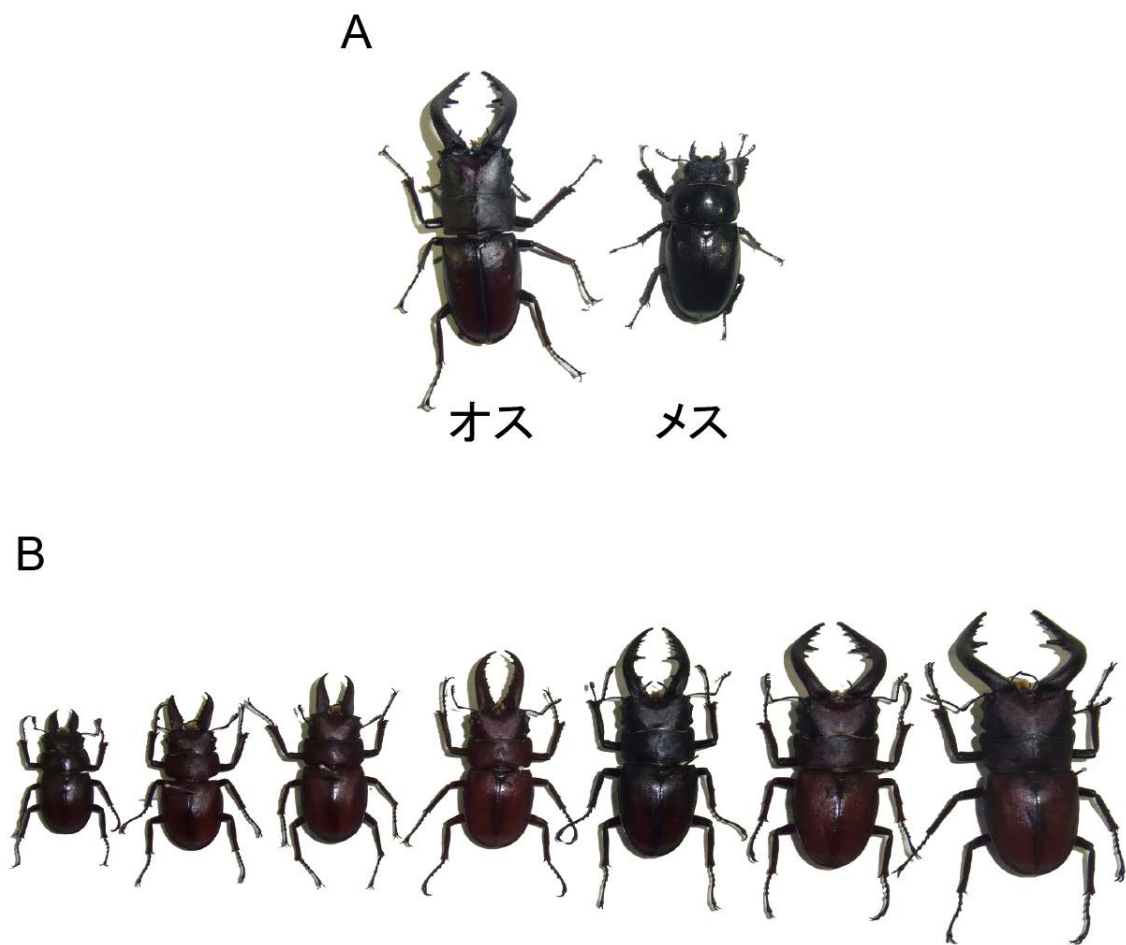


図 0-2 武器甲虫の形態可塑性

(A) ノコギリクワガタ (*Prosopocoilus inclinatus*) の性的二型。オスのみ顕著な大顎（武器形質）を持つ。

(B) ノコギリクワガタのオス成虫の種内多型。2012 年 7 月、8 月に神奈川県足柄下郡湯河原町鍛冶屋地区 (35.15° , 139.11°) で採集した個体群で右ほど高栄養環境の個体を示す。同時期、同地域内の個体群においても多様な種内多型がみられる。

A

オス



メス



1.0mm

B

オスの栄養条件

富栄養

貧栄養

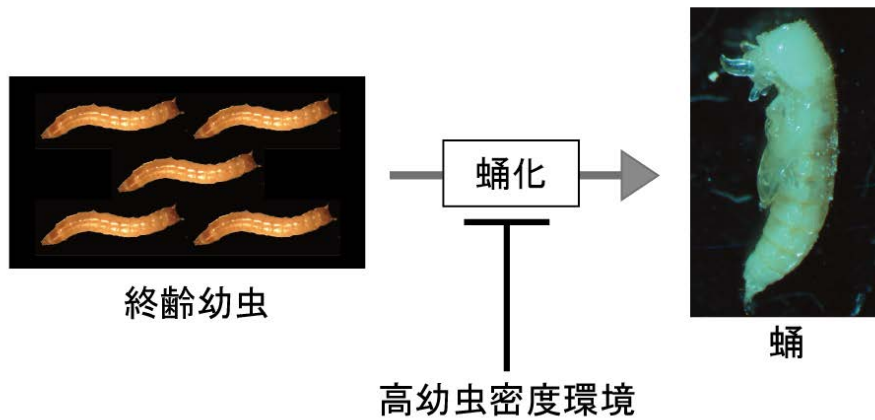


図 0-3 オオツノコクヌストモドキ (*Gnatocerus cornutus*) の成虫形態

(A) 左にオス成虫、右にメス成虫を示した。オスにのみ武器形質の大顎を持つ。

(B) オスの大顎は栄養条件によって形態が変化する。富栄養条件の個体は大型の大顎を発達させ、貧栄養では小型の大顎となる。

A



B

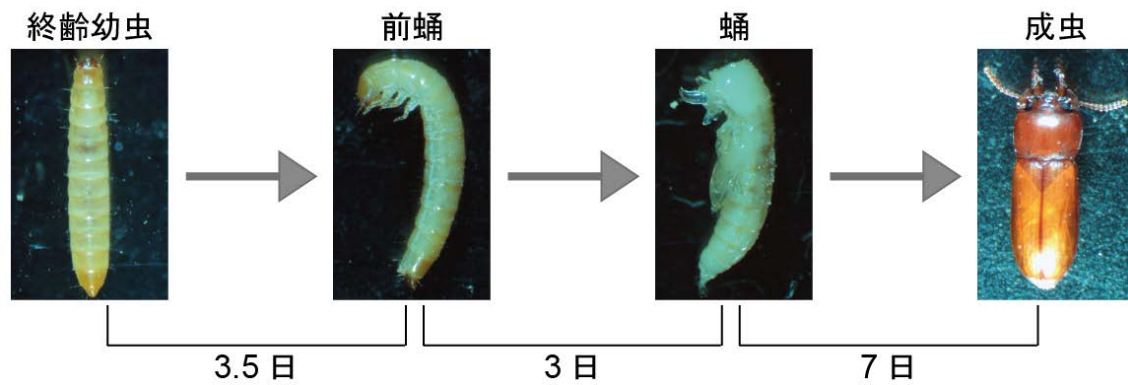


図 0-4 オオツノコクヌストモドキの蛹化過程の概略図

(A) 個体密度による蛹化の制御。オオツノコクヌストモドキは高終齢幼虫密度では蛹化を抑制する性質を示す。この性質を利用し、人為的に個体密度を調節することで、蛹化の活性を制御することができる。

(B) 蛹化のスケジュール。高密度条件で維持された終齢幼虫は、蛹化の活性化から約 3.5 日で前蛹になり、前蛹から約 3 日で蛹となり、蛹から約 7 日で成虫となる。

第 1 章

密度環境による蛹化時期の決定機構

序論

1-1 個体間相互作用と表現型可塑性

同種集団内や異種の競合者、捕食者との間に見られる個体間相互作用は生物の生活史に影響を与える重要な環境要因である。集団の個体密度や種内、種間での競争、共食い・捕食などの個体間相互作用は表現型に影響し、生物は環境要因によって発生過程を制御し、表現型を可塑的に変化させる。例えば、バッタやアブラムシでは密度環境が表現型に大きく影響する(Beldade et al., 2006; Müller et al., 2001; Wang and Kang, 2014)。また、魚類では集団内の順位に応じて性転換する種が存在する。捕食者や被捕食者の存在も重要な環境要因となり、ミジンコでは外敵の存在下では、捕食を受けにくい形態へと変化させる(Lass and Spaak, 2003)。また、エゾサンショウウオの幼生は密度環境に応じて頭部を捕食に適した形態へと変化させる(Collins and Cheek, 1983; Wakahara, 1995)。これらの例は、生息環境における個体間相互作用が表現型に大きく影響しうることを示している。

1-2 昆虫の共食いや捕食に適応した発生戦略

環境要因として共食いや捕食は強い選択圧であり、動物界における広範囲の生活史特性を進化させる要因となっている(Fox, 1975; Polis, 1981; Tollrian, 1999)。昆虫において、卵や蛹といった移動性に乏しい発生段階は共食いや捕食による被害を受けるリスクが非常に高いことが知られている(Dixon, 2000; Thomas Park, 1965)。生存のための対策として、隠蔽擬態、隠蔽行動、分散、蛹室や繭の形成といった共食いや捕食に対する多種多様な防御機構が進化的に獲得されてきている。(Hinton, 1946; Hinton, 1955; Lucas et al., 2000)。

1-3 甲虫目に見られる個体群密度による蛹化の制御

甲虫目ゴミムシダマシ科とカツオブシムシ科において、幼虫の個体密度が蛹化の進行に影響する生物種が存在する。これらの生物種では、高幼虫密度環境において幼虫が蛹化過程への発生の進行を抑制し、幼虫期を維持し続けることが報告されている(カツオブシムシの一種(*Attagenus elongatulus*, Barak and Burkholder, 1977); カシミールコクヌストモドキ(*Tribolium freemani*, Nakakita, 1982); チャイロコメノゴミムシダマシ (*Tenebrio molitor*, Tschinkel and Willson, 1971) ゴミムシダマシの一種(*Zophobas rugipes*, Tschinkel and Willson, 1971))。カシミールコクヌストモドキにおいては、蛹化抑制の効果が報告されており、高密度条件で飼育することによって、蛹化せずに幼虫期を半年以上維持することが可能であり(Kotaki and Fujii, 1995)、密度が発生に強い制約を与えている。また、これらの生物種において、終齢幼虫は蛹化前に元の生息場所から分散する傾向がみられる(ゴミムシダマシの一種(*Z. rugipes*, Tschinkel, 1981); ツヤケシオオゴミムシダマシ(*Zophobas atratus*, Tschinkel, 1981); カシミールコクヌストモドキ(Kotaki and Fujii, 1995))。このような密度環境に応じた蛹化の遅延と拡散行動は耐捕食者行動と考えられている(Tschinkel, 1981)。

高密度環境において共食いは重要な環境要因であると言えるが、幼虫の微小生息域においては多種多様な環境要因が偶発的に発生しており、共食い以外の環境要因が蛹化の決定に機能することが考えられる。幼虫の蛹化場所と発生時期の両者は成虫時の配偶者の獲得に影響するため(Rhainds et al., 1995)、幼虫が発生を停止することは将来の配偶者の獲得の機会を逃しているとも思われる。そのような状況では、将来的な競合者や配偶者の存在といった幼虫の性的な相互作用は蛹化の重要な決定要因になりうる。また、異種間相互作用も重要な環境要因であり、捕食者の存在は捕食から逃れるための重要な合図となりうる(Lucas et al., 2000)。このように、微小生息域におけるこれらの環境要

因の潜在的な重要性にもかかわらず、蛹化の決定の因子として共食い以外の環境要因については解明されていない。

蛹化抑制に関わる制御因子は、幼虫密度の上昇に伴い増加する因子であることが推定される。物理的な接触や振動刺激は個体密度によって変化が見られる環境因子であり、蛹化抑制に機能することがゴミムシダマシ科の3種で報告されている(ゴミムシダマシの一種(*Z. rugipes*, Tschinkel and Willson, 1971); チャイロコメノゴミムシダマシ(Tschinkel and Willson, 1971); カシミールコクヌストモドキ(Kotaki and Fujii, 1995))。

1-4 オオツノコクヌストモドキの蛹化抑制における環境要因の解明

本種は、幼虫密度によって蛹化が抑制され、高幼虫密度条件で蛹化が抑制される(Tsuda and Yoshida, 1985)。また、密度と幼虫の発育に対する混み合い効果は幼虫の発育は飼育密度に関係ないことが示されている。このことから、蛹化抑制は終齢期の感受期を持ち、環境刺激のキューによって、蛹化に進むか否かを決めるような制御機構が存在することになる。本種における蛹化の決定因子として幼虫密度以外の環境要因については検証されていない。

そこで本章では、本種の蛹化の決定機構を明らかにするため、幼虫密度の他に微小生息域に存在する環境要因について詳細に解析を行った。微小生息域に存在する幼虫密度以外の環境要因に注目し、同種の他の発生段階の個体、異種、共食い、捕食、接触刺激などについて詳細に解析した。そして得られた知見をもとに抑制機構へのメカニズムの寄与を解析した。

本種の個体群は、幼虫の他に卵、若齢幼虫、成虫が含まれ、複数の発生段階の個体によって構成される。このため、幼虫以外の発生段階との相互作用が蛹化の決定に影響する可能性が考えられる。反対に影響が見られない場合は、蛹化の決定因子が幼虫期に特

異性を持つことになる。そこで、成虫との個体間相互作用による蛹化の決定について検証した。

また、本種は幼虫密度による蛹化抑制がみられる他の生物種と異なる点として、明確な性的二型を持つことが挙げられる。本種の成虫ではオスのみが顕著な大顎を発達させ、オス同士が縄張りや雌獲得のための闘争を行うことが知られており(Okada et al., 2006)、性が形態や行動に対して明確な機能を持っている。そこで、蛹化の決定における性の影響について検証した。

微小生息域には、類似する生息域を持つ種や捕食者などの異種の存在も発生に影響する要因であると考えられる。そこで、類似した生息域を持つコクヌストモドキ (*Tribolium castaneum*) を用い、異種間相互作用による蛹化の決定への影響を検証した。これにより、抑制効果の生物種の特異性についても検証した。

本種の潜在的な捕食者として、コクヌストモドキの生息域である貯穀倉庫において、アダンソンハエトリグモ (*Hasarius adansoni*) とコメグラサシガメ (*Amphibolus venator*) が見ついている(Fuchikawa and Okada, 2013)。また、コメグラサシガメは貯穀害虫の捕食者であり、特にコクヌストモドキ属を好んで捕食する(Nishi et al., 2004)。また、コクヌストモドキ属の 7 種では相互に捕食し合う(Alabi et al., 2008)。そこで、個体間相互作用の解析において、共食い捕食の発生について調べた。

同種および異種間相互作用の結果から、抑制効果は生物種非特異的な影響が見られた。そこで、個体密度依存的に上昇する環境要因として接触刺激に注目した。ガラスビーズを用いて接触刺激を与え、蛹化への影響を検討した。

材料と方法

2-1 昆虫

2-1-1 オオツノコクヌストモドキ

オオツノコクヌストモドキ (*G. cornutus*, 図 0-3, 以下本種と略記) は、宮崎県宮崎市 (31°54', 131°25') で採集され、食品総合研究所と岡山大学で 50 年以上 (Okada and Miyatake, 2010a)、東京大学で 2 年以上継代された個体群を使用した。

2-1-2 コクヌストモドキ

コクヌストモドキ (*T. castaneum*, 図 1-1) は、筑波大学で 25 年以上飼育された個体群を使用した (Miyatake et al., 2004)。

2-2 昆虫の飼育

2-2-1 飼育方法

本種とコクヌストモドキの成虫および幼虫の飼育には、乾燥酵母を添加した小麦粉を飼育材として用い、飼育容器にはプラスチック容器 (直径 65 mm、高さ 45 mm) を用いた。飼育容器に 100 ml の飼育材を入れ、成虫を入れて産卵させ、幼虫を発生させた。昆虫の飼育は、室温 25 °C、湿度 60 %、明期 16 時間、暗期 8 時間の光条件の培養室中で行った。

飼育材の組成

全粒粉	(風の麦工房)	87.5 %
乾燥酵母	(乾燥酵母エビオス、田辺三菱製薬)	12.5 %

2-2-2 オオツノコクヌストモドキの飼育

本種の終齢幼虫は高幼虫密度条件下では蛹化せずに終齢期で発生の進行を止める (Tsuda and Yoshida, 1985)。この性質を利用し、本種の終齢幼虫は高密度条件で維持したものを使用した。成虫を得るときは、高密度条件で維持した終齢幼虫の集団から無作為に選び、24 穴プレート（穴の直径 15 mm, Nunc; Thermo scientific, USA)の各穴に隔離することで蛹化を誘導し、成虫へと発生させた。

2-2-3 コクヌストモドキの飼育

コクヌストモドキの幼虫は、成虫を入れてから 30 日から 40 日後に得られた幼虫を使用した。コクヌストモドキは、幼虫の密度条件に関わらず蛹化を進行させる。成虫を使用する際は、得られた成虫を適宜使用した。

2-3 個体間相互作用の実験系

2-3-1 実験環境

項目 2-3-2、2-3-3、2-3-4、2-3-5 では、飼育容器として 24 穴プレート(直径 15 mm, Nunc; Thermo scientific, USA)を用いた。24 穴プレートの各穴に本種の終齢幼虫と相互作用を検証する個体もしくはガラスビーズを入れて共飼育した (図 1-2)。解析は飼育材を与えずに行った。すべての実験は、室温 25 °C、湿度 60 %、明期 16 時間、暗期 8 時間の光条件の培養室中で行った。

2-3-2 蛹化遅延効果の解析

本種の終齢幼虫を高幼虫密度条件で維持した集団から無作為に選び、24 穴プレートの各穴に 1 匹ずつ隔離した。抑制効果を測定する観察対象の本種の幼虫を、単独飼育 (n=48)、同種の幼虫 (n=960)、同種の成虫 (n=96)、コクヌストモドキの幼虫 (n=48)、

コクヌストモドキの成虫（n=96）を共飼育した。観察期間を 13 日とし、観察対象の本種の幼虫の発生段階（幼虫、前蛹、蛹、成虫）を 1 日 1 回記録した。本種の前蛹期の個体は特徴的な L 型の姿勢をとるため、発生段階を容易に判定できる（図 1-3）。終齢幼虫が前蛹期に移行すると、変態は不可逆的に蛹、成虫へと進行する。このことから前蛹期への移行を蛹化期の進行の指標とした。幼虫が前蛹期に入る前に共飼育した個体から共食いや捕食などの攻撃を受けて死亡した場合は解析対象から除外した。

2-3-3 共食い、捕食の観察

方法 2-3-2 の蛹化抑制効果の観察において、共食いと捕食の発生についても同時に記録した。共食い、捕食を受けた観察対象の本種の発生段階は、死体の発生段階で特定した。死体が完全に食べられ、発生段階を判定できない場合は、共食い、捕食を受ける前日の発生段階を犠牲になった発生段階とした。蛹化抑制効果を測定する本種の幼虫は、前蛹から蛹へと脱皮する間に頻繁に共食い、捕食を受け、捕食されたステージが前蛹なのか蛹なのかを区別することは難しい。そのため、捕食されたステージの解析では、前蛹と蛹の発生段階を合算した。

2-3-4 蛹化抑制効果への性の影響

観察対象の本種の幼虫 1 匹と同種の幼虫もしくは成虫 1 匹を 24 穴プレートの各穴で共飼育した。発生段階と性別の組み合わせは、オスーオス（オス幼虫ーオス幼虫：n=444；オス幼虫ーオス成虫：n=60）、オスーメス（オス幼虫ーメス幼虫：n=123；オス幼虫ーメス成虫：n=14）、メスーオス（メス幼虫ーオス幼虫：n=120；メス幼虫ーオス成虫：n=61）、メスーメス（メス幼虫ーメス幼虫：n=74；メス幼虫ーメス成虫：n=27）で行った。幼虫期、前蛹期では形態に雌雄差がなく性別を特定できない。蛹期に入ると形態に明確な性差が表れ容易に判定できるため、対象の幼虫の性別は蛹期にまで発生させて事後的に特

定した。また、成虫は前蛹から蛹へと脱皮する段階の幼虫を頻繁に共食いし、被食者の性別がわからなくなるため、対象の幼虫が前蛹期になった時点で成虫を取り除いた。成虫を取り除くことで、幼虫の性の特定ができるようになる。共飼育する個体が死んだ場合は、新しい成虫と適宜入れ替えた。幼虫の発生は項目 2-3-2 で記録した。

2-3-5 接触刺激

1 匹の本種の幼虫を 24 穴プレートの各穴に隔離した。その後、1、3、5 個のガラスビーズ(2 mm, BZ-02, AS ONE, Japan)を各穴に入れて、水平旋回式シェーカー(MMS-3000, TOKYO RIKAKIKAI, Japan)で 70rpm の条件で攪拌しながら飼育した(n=48)。この条件では、転がったガラスビーズが幼虫に接触し、物理刺激を与える。対照実験として、ガラスビーズを加えずにシェーカーによる旋回の動きのみを与えた。観察期間を 13 日とし、観察対象の本種の幼虫の発生段階(幼虫、前蛹、蛹、成虫)を 1 日 1 回記録した。

2-4 統計解析

項目 2-3-2、2-3-4、2-3-5 における前蛹化にかかる日数の比較はノンパラメトリックの多重比較法である Steel-Dwass 検定により行った。13 日間の観察期間内に前蛹化が起これずに幼虫期を維持した場合は、打ち切りデータとして取扱い、前蛹化日数を 13 日として扱った。項目 2-3-3 における共食い／捕食イベントの時間累積的な発生は生存分析(一般化ウィルソン検定)により解析した。観察期間が終わるまで生存した個体は 13 日の打ち切りデータ(センサー)として扱った。生存分析はペアワイズ比較をすべての組み合わせで行い、Sequential Bonferroni 法によって多重比較検定での有意性補正を行った。捕食(共食い)を受けた発生ステージの比率は各処理間でペアワイズの G 検定(尤度比検定)を行い Sequential Bonferroni 法で多重比較検定での有意性補正を行った。

観察中に幼虫が死亡した場合や、観察区から脱走した場合は解析から除外した。すべての統計解析は統計解析ソフトウェア JMP 9 (SAS Institute, 2010) と R 3.1.1. (The R Foundation for Statistical Computing, 2012)で行った。

結果

3-1 終齢幼虫の個体密度による蛹化への影響

本種の終齢幼虫密度による蛹化抑制への影響を調べるため、終齢幼虫の個体密度を 1 匹から 5 匹に段階的に設定し、前蛹期に到達するまでの期間を測定した。その結果、前蛹期に到達するまでの期間は他の幼虫の存在によって遅延した (図 1-4A)。前蛹期に到達するまでの期間は、共飼育する幼虫数の増加に伴い増加した (1 匹: 3.8 ± 0.38 (days \pm SD), 2 匹: 5.9 ± 1.6 , 3 匹: 8.5 ± 2.9 , 4 匹: 9.1 ± 3.1 , and 5 匹: 11.1 ± 2.8)。幼虫密度による蛹化抑制への影響は密度依存性を示し、高密度条件では強く抑制された (図 1-4A)。

3-2 共食いの発生

前項 3-1 の幼虫密度の蛹化への影響の観察の際に、共食いの発生についても同時に記録した。その結果、抑制効果とは反対に、幼虫の生存率はほぼ個体密度依存的に減少した (図 1-4B)。また、4 匹と 5 匹の密度条件は同程度の生存率を示した。本実験では、個体識別を行っていなかったため、共食いを受けた正確な発生段階は同定できなかった。共食いの発生は前蛹、蛹が観察された実験区で起こった。そのため、ペア実験結果から、共食いを受けたステージは、ほとんど前蛹／蛹期であったことが推測された。

3-3 他の発生ステージ、異種による抑制効果

前項 3-1 では、同種の幼虫が抑制効果を持つことが示された。ここでは、同種の成虫、本種と同様の生息環境で異種との競合や捕食することが知れているコクヌストモドキをモデルとし、発生ステージ間、生物種間での抑制効果を検証した。

3-3-1 蛹化抑制効果

本種の終齢幼虫の蛹化は、同種の幼虫および成虫との相互作用だけでなく、異種のコ

クヌストモドキの成虫でも抑制された（図 1-5A）。本種の幼虫を単独で飼育した条件では、蛹化の誘導から前蛹期に移行するまでの期間は約 3.6 日であった。本種の幼虫、成虫、およびクヌストモドキの成虫の存在条件下では、前蛹期に移行するまでの期間は有意に増大し、それぞれ 5.0 日、6.8 日、7.6 日であった（図 1-5A）。クヌストモドキの幼虫の場合は、本種の幼虫を高頻度で捕食したため、クヌストモドキの幼虫による蛹化抑制効果は評価できなかった。（45 個体のうち、18 個体が幼虫期に捕食され、生存した 27 個体は観察期間内に蛹へと発生した。）。

3-3-2 共食いと捕食への影響

本種の幼虫を 2 匹で飼ったとき、本種の幼虫はほとんど共食いが観察されなかった（図 1-5B）。しかしながら、同種の成虫と共に飼育したとき、蛹化誘導から 6 日後から共食いが始まり、最終的に約 60 %が共食いされた。クヌストモドキの成虫は蛹化誘導 9 日後から捕食を始めた。この 3 つの場合では、本種は前蛹、蛹期に共食い／捕食を受けた（図 1-6）。これに対し、クヌストモドキの幼虫は、3 日後から捕食を始めた（図 1-5B）。まとめると、本種とクヌストモドキの成虫は前蛹、蛹期のみを捕食し、一方で、クヌストモドキの幼虫は高頻度で幼虫を捕食した。

3-4 性の影響

本種はクヌストモドキなどの他のゴミムシダマシ類とは異なり顕著な性的二型を有している。幼虫時の社会環境（同性や異性の存在）は将来的な競合者や配偶者の存在を意味しており、こうした性環境が発生過程に影響する可能性が考えられる。そこで、蛹化抑制における性の影響を調べた。幼虫 2 匹で蛹化抑制効果を、幼虫の性の組み合わせによる蛹化抑制効果の差異は見られなかった（図 1-7A）。同様に、雌雄の成虫を用いて同様の実験を行ったが、幼虫の性と成虫の性の組み合わせによる蛹化抑制効果の差異

は見られなかった（図 1-7B）。

3-5 接触刺激

前項までの結果から、蛹化抑制には、生物種や発生段階の特異性は見られなかった。そこで、より一般性の高い刺激である接触刺激（物理刺激）に注目し、その効果を検証した。

ガラスビーズを用いて幼虫に接触刺激を与え続けつづけながら飼育を行い、発生の進行を観察した。その結果、前蛹期に移行するまでの期間が約 1 日延長された（図 1-8）。しかしながら、ビーズの数を増加させたときの累積的な影響は検出できなかった。

考察

4-1 オオツノコクヌストモドキの蛹化抑制

本種の蛹化は高幼虫密度によって抑制された（図 1-4A）。この結果は、津田らの先行研究(Tsuda and Yoshida, 1985)の結果と合致する。本研究では、さらに同種の成虫と近縁種のコクヌストモドキの成虫および幼虫を用いて、蛹化の抑制について検証した。その結果、同種の幼虫同士の場合と同様に、同種の成虫と共飼育した場合においても強い抑制効果を示すことを見出した（図 1-5A）。以上の結果は、個体密度による蛹化の抑制が共存する相手の発生段階に依存しないことを示す。また、成虫期において本種のオスは誇張形質の大顎を持ち、オス同士で激しい縄張り争いを行う(Okada et al., 2006)。そのため、将来的な競合者および配偶者の共存条件がそれらの発生に影響することを予想した。そこで、幼虫同士、幼虫と雌雄の成虫の性を組み合わせで抑制効果を検証した。しかしながら、性の組み合わせは発生のタイミングに影響せず（図 1-7）、共存者の性は本種における蛹化時期の決定因子ではないことを意味する。

本種と同様の生活環境を持つコクヌストモドキを用いて異種による蛹化抑制効果を調べたところ、コクヌストモドキ成虫もまた発生を抑制する効果を示した（図 1-5A）。以上のことから、蛹化の抑制は発生段階や生物種に特異的ではないことを示した。

4-2 共食い・捕食からの回避効果

昆虫において、共食いや捕食は表皮が機械的に弱く、移動性のない卵と蛹期や、脱皮の前や後や最中などに起きやすい(Dixon, 2000)。本研究は幼虫から蛹化の期間に着目しており、共食いや捕食は前蛹や蛹期に発生しやすいことが予測される(図 1-6)。本種の成虫と一緒にしたとき、本種の幼虫は最初の 6 日間は共食いを受けて、7 日目以降に共食いが上昇した。これらの条件下において、幼虫は約 3 日後から前蛹化への移行を始める（図 1-4A）。本種の蛹化誘導から前蛹化にかかる期間は 2.8 日(Okada et al., 2012)であ

り、従って共食いが増加する開始時期はおおよそ幼虫が蛹へ脱皮する時期に一致する。若干の遅れが見られたもののおおよそ同様の傾向がコクヌストモドキの成虫を入れた場合においても観察された（図 1-5A, B）。幼虫は本種とコクヌストモドキの成虫からの共食い・捕食に耐性があるが、しかしながら、蛹に脱皮するときは非常に弱くなる。このことは、幼虫は蛹化時期を遅らせることで長く生存できることを示す。成虫の場合とは対照的に、コクヌストモドキ幼虫は本種の幼虫を高頻度で捕食しており（図 1-6）、脱皮ステージではない時期を捕食することを示唆する。このことはコクヌストモドキの幼虫が同種・異種に対して非常に攻撃的であるという報告(Young, 1970)を支持する。本種の幼虫はコクヌストモドキ幼虫に対しては被食される立場にあると考えられる。他個体に対する攻撃性や食欲さにおけるこの2種間の違いは攻撃行動自体の違いや口器の鋭さといった構造的差異を背景に持つ可能性がある。ショウジョウバエにおいて、捕食するものによって顎の形状が変わることがわかっており、共食いを好むものは歯の本数が多くなる(Vijendravarma et al., 2013)。種ごとの捕食能力の違い・競争戦略の違いを生み出すしくみは今後の生態学的課題である。

本種の幼虫を2匹で維持したとき、共食いはほとんど観察されず、ほぼすべての幼虫が次の発生ステージへと進んだ（図 1-4B, Okada and Miyatake, 2010b）。同一環境に2匹の幼虫の共存するとき、それらは同時に前蛹へと発生したため、共食いはほとんど起きなかった。2匹の幼虫の共存条件における前蛹になるまでの期間のバラツキの小ささ（標準偏差 $SD = 1.6$ （日））は同調的な前蛹化を反映していると考えられる。

4-3 機械的刺激

結果 3-1、3-3-1 より、抑制には同種の発生段階や生物種に非特異的に起こることがわかり、抑制効果は個体密度依存的に増大していた。ガラスビーズによる非生物的な接触刺激は部分的であるが、本種の蛹化を抑制する効果を示した（図 1-8）。総合すると、本

種は物理刺激をキューとして用いることで、様々な捕食者を察知し、蛹化の遅延を行っていると考えられる。しかしながら、本実験で用いたガラスビーズによる物理刺激の効果は5つのビーズを入れた時でさえ、実際の生物による抑制効果よりも弱かった。実際の捕食者がいる環境では、幼虫は捕食者からの噛みつきなどの攻撃を受けると頻繁に体を回転させ、捕食者を回避しようとしていた（小澤，未発表）。しかし、ビーズでの刺激に対してはこのような行動は観察されなかった。ガラスビーズによる接触刺激は部分的な影響を示すものの、蛹化の完全な抑制には捕食者特異的な噛みつき刺激や回避反応が必要なのだろう。加えて、カシ米尔コクヌストモドキにおいて、体表の匂い物質などの化学刺激が制御因子のひとつとして報告されており (Kotaki and Fujii, 1995)、接触刺激のほかに化学刺激なども制御因子であることが予測される。今後はこういった研究も必要だろう。

4-4 蛹化抑制の生理的機能

本研究では、本種の幼虫は、蛹になるまではコクヌストモドキの成虫による捕食から生存できた。飼育条件下において、本種の終齢幼虫は元の場所から拡散を試みており、以前の他のゴミムシダマシ科(ツヤケシオオゴミムシダマシ(Tschinkel, 1981); カシ米尔コクヌストモドキ(Kotaki and Fujii, 1995))などの幼虫の観察結果に一致する。自然界において、成熟した終齢幼虫は捕食者のいない場所に分散する傾向があり (Savvidou and Bell, 1994) 、接触刺激は蛹化のタイミングを決める重要なキューとして働いているのだろう。機械的刺激の影響は他のゴミムシダマシの3種においても観察されている（ゴミムシダマシの一種(*Z. rugppes*, Tschinkel and Willson, 1971); チャイロゴミムシダマシ (Tschinkel and Willson, 1971); カシ米尔コクヌストモドキ(Kotaki and Fujii, 1995))。このことから、ゴミムシダマシ科の幼虫において、物理刺激は捕食を避ける機構として広く使われていると考えられる。蛹化のタイミングは捕食リスクの他にも、いくつかの環境

要因によって影響を受ける。たとえば餌の存在条件では、本種の蛹化までの発生時間が長くなる。これらの環境依存的な発生は、共食いや捕食に対する生物種特異的な脆弱性に影響を及ぼす可能性がある。こうした発生可塑性の生態学的な知見は今後の重要な研究課題である。

本研究は機械的刺激が本種の蛹化を遅らせることを最初に示した。加えて、蛹化の遅延はコクヌストモドキの成虫に対する捕食回避効果を持っていた。これらのことからオ本種の蛹化の遅延は広義の防御効果を持つ適応的な発生可塑性であると考えられる。



図 1-1 コクヌストモドキ(*Tribolium casaneum*)の成虫と幼虫
左に成虫、右に幼虫を示した。図中のスケールバーは 1 mm を示す。

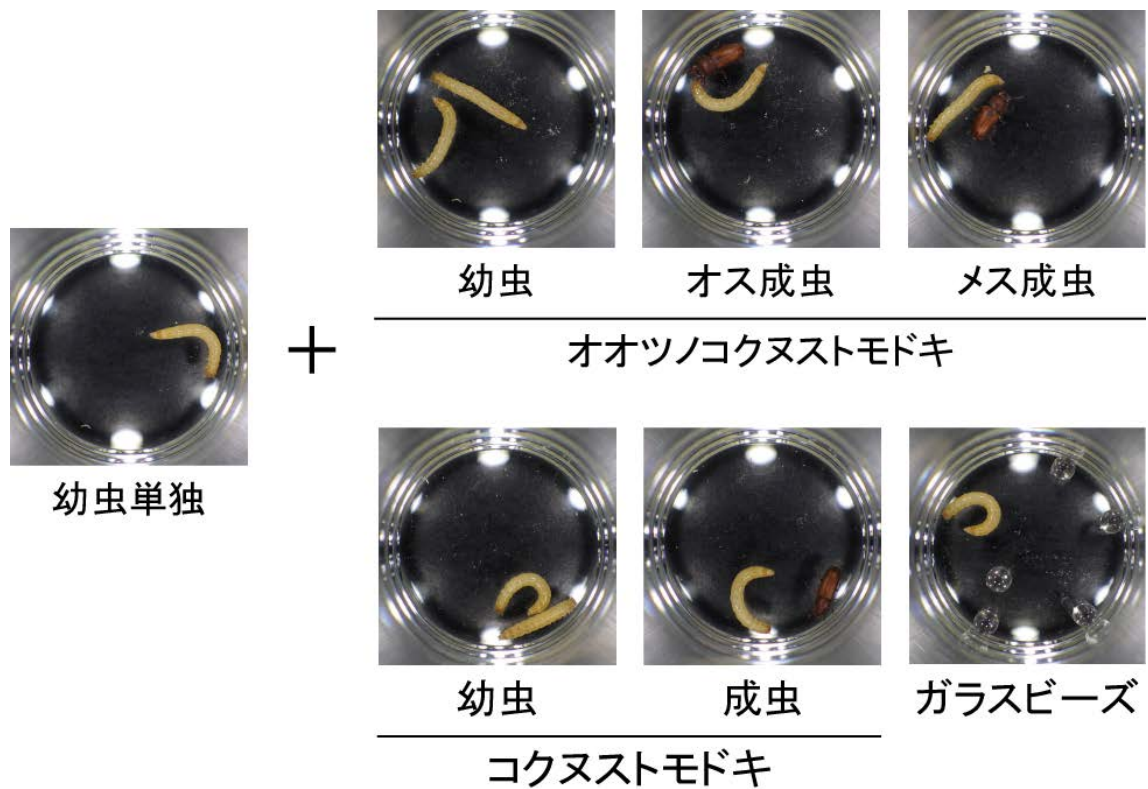


図 1-2 個体間相互作用の実験系の模式図

24 穴プレートの各穴で、オオツノコクヌストモドキの終齢幼虫を単独で飼育、またはオオツノコクヌストモドキの幼虫、オス成虫、メス成虫、コクヌストモドキの幼虫、成虫、ガラスビーズと共に飼育した。

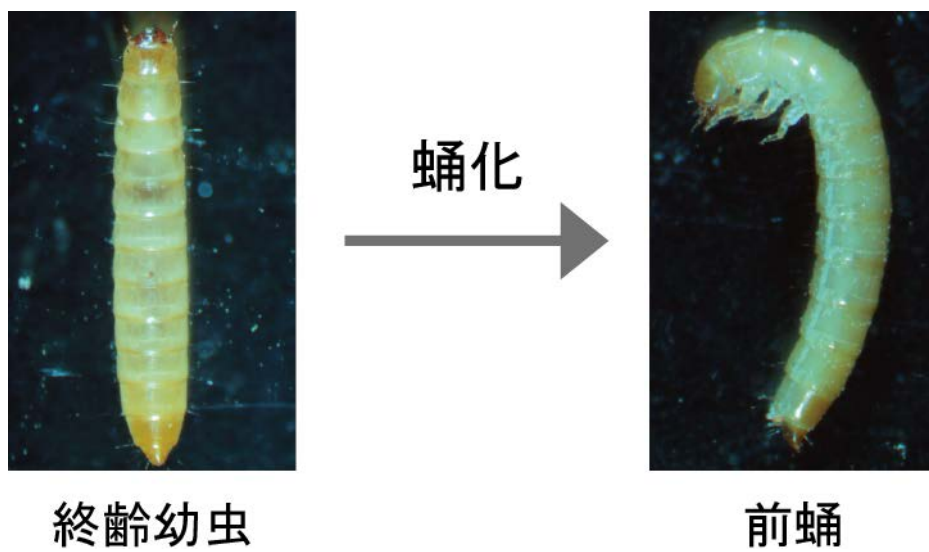


図 1-3 オオツノコクヌストモドキの蛹化の進行と前蛹化

前蛹期の個体は L 型の姿勢となる。終齢幼虫が前蛹期に移行すると不可逆的に蛹化が進行する。

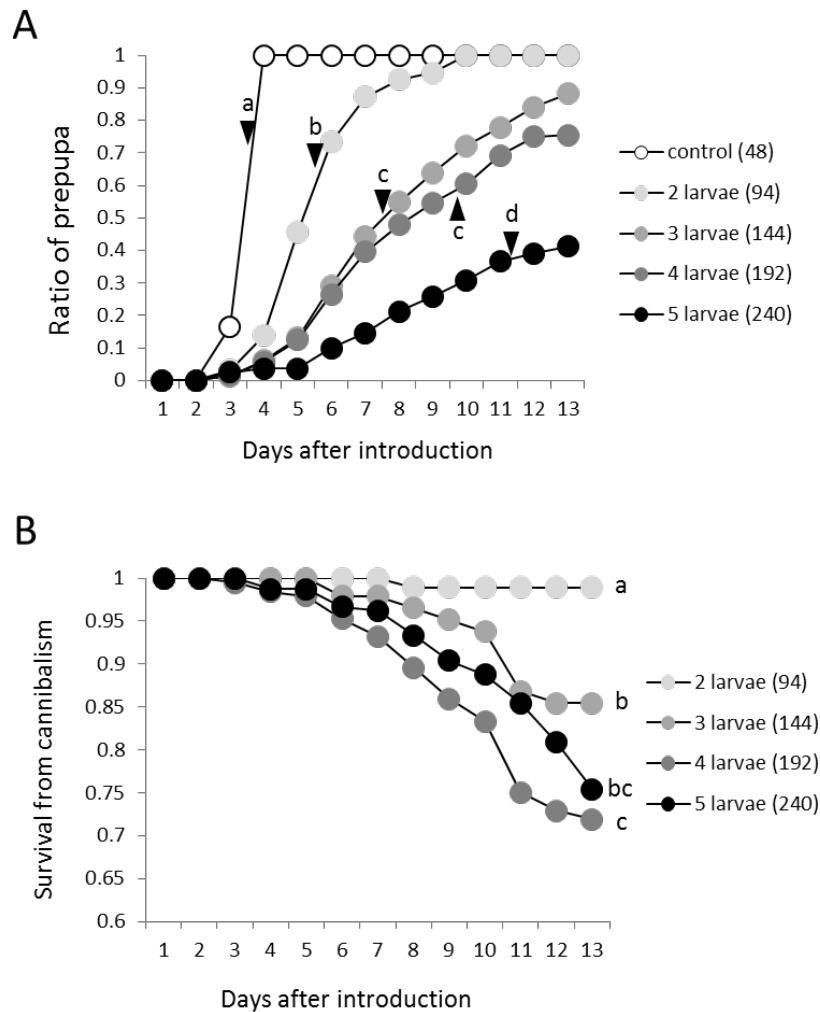


図 1-4 オオツノコクヌストモドキの幼虫の前蛹化までの発生における幼虫密度の影響

(A) 集団飼育から隔離後のオオツノコクヌストモドキの前蛹化の累積率を測定した。矢印は前蛹期に到達するまでの平均時間（日）を示す。異なる文字（a-d）は統計的に有意な差を示す（ $P < 0.05$, Steel-Dwass test）。サンプル数は $n = 48$ （単独）、94（2 匹）、144（3 匹）、192（4 匹）、240（5 匹）を用いた。

(B) オオツノコクヌストモドキの幼虫を 1-5 匹で維持した時の幼虫の生存曲線を調べた。異なる文字（a-c）は統計的な有意差を示す（ $P < 0.05$, Generalized Wilcoxon test, P-values corrected by Sequential Bonferroni）。サンプル数は、 $n = 48$ （単独）、94（2 匹）、144（3 匹）、192（4 匹）、240（5 匹）を用いた。

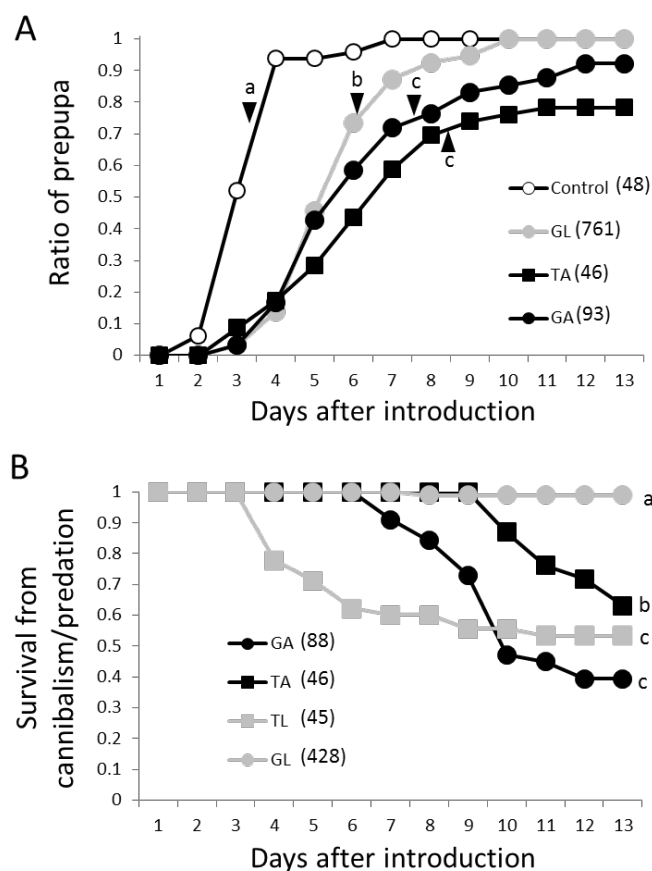


図 1-5 オオツノコクヌストモドキの幼虫の前蛹化までの時間と生存率への同種と異種個体の存在の影響

(A) 幼虫単独 (対照、○)、1 匹のオオツノコクヌストモドキの幼虫 (GL、●)、同種の成虫 (GA、●)、コクヌストモドキの成虫 (TA、■) と飼育したときのオオツノコクヌストモドキの前蛹の累積率を測定した。前蛹化までの日数の平均は累積曲線上に矢印で示した。矢印に示した異なる文字 (a-c) は統計的な有意差を示す ($P < 0.05$, Steel-Dwass test)。サンプル数は図中の各処理群に併記した。

(B) オオツノコクヌストモドキの幼虫の生存曲線
 幼虫単独 (対照、○)、1 匹のオオツノコクヌストモドキの幼虫 (GL、●)、同種の成虫 (GA、●)、コクヌストモドキの成虫 (TA、■) と飼育したときのオオツノコクヌストモドキの幼虫の生存曲線を測定した。異なる文字 (a-c) は統計的な有意差を示す ($P < 0.05$, Generalized Wilcoxon test, P-values corrected by Sequential Bonferroni)。サンプル数は図中の各処理群に併記した。

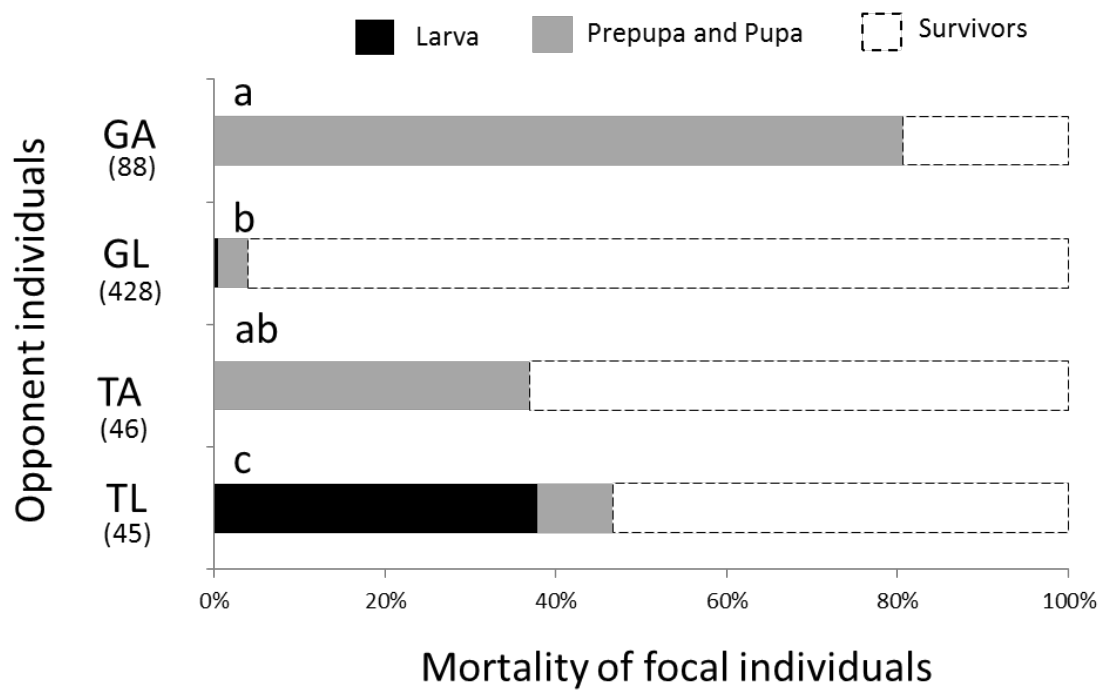


図 1-6 共食い、捕食の被害の発生段階のバリエーション

観察対象のオオツノコクヌストモドキの幼虫が共食い、捕食の被害にあった発生段階。オオツノコクヌストモドキの成虫 (GA)、幼虫 (GL)、コクヌストモドキの成虫 (TA)、幼虫 (TL)。異なる文字 (a-c) は統計的な有意差を示す ($P < 0.05$, G-test, P-values corrected by Sequential Bonferroni)。サンプル数は図中の各処理群に併記した。

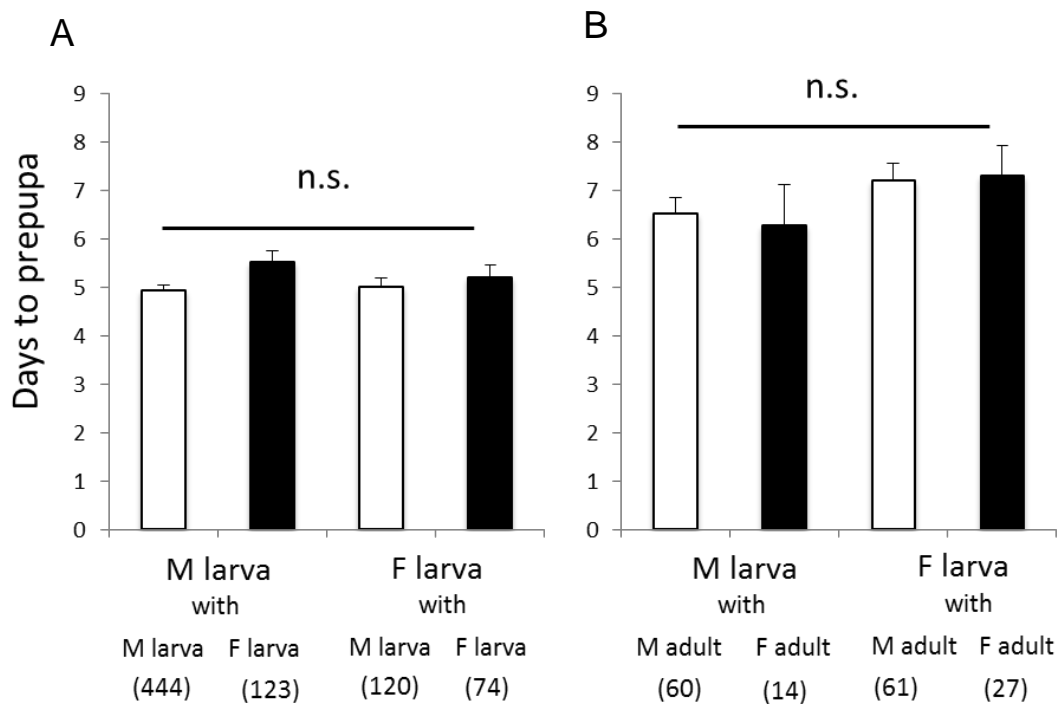


図 1-7 オオツノコクヌストモドキの前蛹期に到達するまでの期間への性の影響
 オオツノコクヌストモドキの幼虫の前蛹期に到達するまでの期間（日）の平均値について、同じか異なる性の幼虫との共飼育（A）、同じか異なる性の成虫との共飼育（B）を示した。それぞれの処理において、Steel-Dwass test による統計的有意差はなかった。サンプル数は図中の各処理群に併記した。

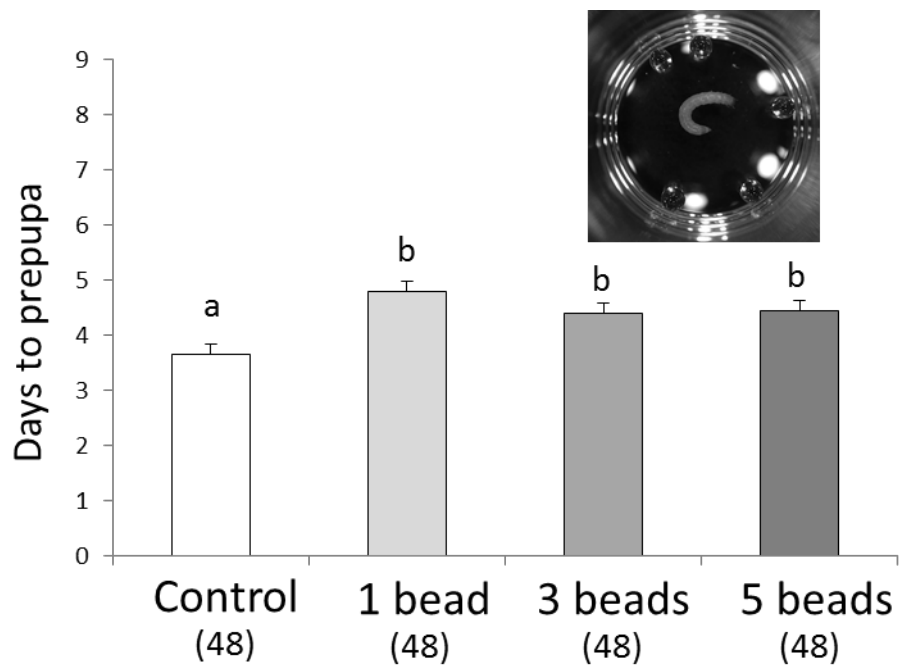


図 1-8 オオツノコクヌストモドキの前蛹期に到達するまでの期間への接触刺激の影響

ガラスビーズによる機械的刺激によってオオツノコクヌストモドキの幼虫の前蛹期に到達するまでの期間（日）の平均値が延長された。異なる文字（a-c）は統計的な有意差を示す（ $P < 0.05$, Steel-Dwass test）。サンプル数は図中の各処理群に併記した。

第 2 章

武器形質の形態可塑性の エピゲノム制御

序論

5-1 栄養環境と表現型可塑性

栄養環境は生物の生存に影響を与える要因として極めて重要である。栄養が枯渇すると、生物の成長や生存に問題が生じるが、これに対応して生物は成長や代謝に関わる遺伝子の発現を適切に変化させ、適応的な反応をする。本論で取り扱う「表現型の可塑性」は、同一の遺伝的背景を有する個体が、外部環境に応じて表現型を柔軟に変化させる現象であり、とりわけ栄養環境は表現型の可塑的制御に大きく影響することが知られている。例えば、ヒトなど哺乳類においては、発生初期段階の栄養状態が、その個体が成長した後でも疾患などの発生に大きく影響することが知られている。表現型可塑性と栄養環境の関係は今日大きな注目を集めている課題であるが、両者の連携機構を分子レベルで統一的に理解するには至っていないのが実情である。

動物には、クジャクの羽やカブトムシの角といった装飾や武器などの「誇張形質」を有しているものがある。誇張形質は哺乳類などの脊椎動物や節足動物まで広くみられ、とりわけ昆虫類では武器や装飾形質を備えた種が数多く存在する。これらの「誇張形質」は性選択に重要な役割を果たすので、進化的観点からも重要な形質である。興味深いことに、栄養環境が誇張形質の発現に強く作用することが知られている。誇張形質は、発生期・成長期における栄養環境に応じて多様に変化し、結果として同一種内に幅広い表現型の多様性が生み出される。本研究で用いた昆虫、オオツノコクヌストモドキ(*G. cornutus*) (以下本種と略記) は、オス特異的な発達した大顎を持ち、栄養に応答して武器である大顎の形態を劇的に変化させる“武器昆虫”である(Okada et al., 2006)。

そこで本研究では、本種を新しいモデル系として用いることで、表現型可塑性と栄養環境を結びつける分子機構を明らかにすることを目標とした。

5-2 武器甲虫の形態可塑性

本種が属する甲虫目では、巨大な角や大顎といった武器形質が多く種の発達しており、その大きさや形、形成される部位には多様性がみられる（図 0-1）。武器形質の多様性は種間だけでなく、同種内においても栄養に応じた形態の多様性が作り出させている（図 0-2B）

武器形質はしばしばオス特異的な発現が見られ、縄張りや雌を巡るオス間闘争の「武器」として用いられる(Eberhard, 1979)。本種においても実際に大顎がオス間闘争の武器として用いられ、体サイズと大顎サイズが大きいオスが闘争に有利である(Okada et al., 2006)。その一方で、体躯・大顎サイズが小さいオスは全く勝ち目がないかというところではなく、大顎への資源配分を抑える代わりに翅や腹部、精巣のサイズが相対的に大きくなっており、飛翔分散や射精量という点で優れている。生物が置かれる環境は不確定で移ろいやすいものだが、このような栄養条件依存的な形態形成メカニズムは、貧栄養環境での生存や劣悪な環境からの移動・分散を通じて個体群全体の摂動に対する安定性や環境適応能力をもたらしている(Okada and Miyatake, 2009, 2010a; Okada et al., 2012)。

前述の通り、武器甲虫では武器形質に幼虫期の栄養状態が強く影響する。具体的には、高栄養下で飼育された幼虫は大型化し、成虫においても大型の武器形質を保持し、闘争に有利な形態を獲得する。低栄養下で飼育された幼虫は小型化し、過度に小さい武器を持つ成虫「スニーカー型」となる。こうした武器形質の可塑性は数多くの武器昆虫にみられる共通した性質である（オオツノコクヌストモドキ(Okada and Miyatake, 2010a); エンマコガネの一種(*Onthophagus acuminatus*, Emlen, 1994); メタリフェルホソアカクワガタ(*Cyclommatus metalifer*, Gotoh et al., 2011); 日本産カブトムシ(*Trypoxylus dichotomus*, Karino et al., 2004))。

このような武器形質の栄養依存性の作用点は、成虫原基の発生過程（幼虫期から蛹期

への移行段階) であると考えられている(Moczek, 2009)。前蛹期において、幼虫体内に準備されている武器の成虫原基が成虫形態の表皮に急速に分化し、頭部に折りたたみ構造として格納されるようになる。そして、蛹化脱皮直後に表皮の折りたたみ構造を展開することで、一気に武器形質を伸長させる(Emlen, 2000; Gotoh et al., 2011)。したがって、武器形質の表現型可塑性を支配する主要な形態形成時期は「前蛹期」とであると推定される。そこで、以降の研究ではこの前蛹期に焦点を絞ることとした。

5-3 武器形質の分子機構

前蛹期の形態形成を制御するシグナル伝達系路として、これまでに幼若ホルモン、性決定経路、インスリン/IGF 経路の 3 つが関与することが知られている。これらの経路は栄養との関係も深い。以下ではこれらについて概説する。

5-3-1 幼若ホルモン

昆虫において、幼若ホルモン (JH) と脱皮ホルモン (エクダイソン) は主要な発生過程の制御因子として知られている。JH とエクダイソンの下流では、成長や脱皮、変態など昆虫の多様な発生現象が制御されているが、その他にもアリ、シロアリ、ミツバチのカースト分化やアブラムシの翅多型など形態形成の多様性をもたらす多機能のステロイドホルモンである(Hartfelder and Emlen, 2011)。

武器形質には JH に対する組織特異的な感受性が見られる (エンマコガネの一種 (*Onthophagus taurus*, Emlen and Nijhout, 1999); メタリフェルホソアカクワガタ:(Gotoh et al., 2011); オオツノコクヌストモドキ(Okada et al., 2012))。本種では、JH 類似体の刺激によって大顎のサイズが増大し、さらに大顎を筋肉や外骨格によって構造的に支持する頭部や胸部についても大型化が見られる (Okada et al., 2012)。しか

しながら、鞘翅や翅への影響は小さく、中脚・後脚では影響が見られないなど JH 感受性が組織ごとに異なることが示されている(Okada et al., 2012)。

また、武器形質の JH 感受性は雌雄でも異なる。JH 類似体の刺激によってクワガタのオスでは大顎サイズが増大するが、メスの大顎では影響が見られない(Gotoh et al., 2011)。体内の JH 濃度は大顎原基の JH 感受期において雌雄で違いはみられないため、雌雄での大顎原器の JH 応答性の違いがオス特異的な武器発達に関わると考えられている(Gotoh et al., 2011)。

5-3-2 性決定経路

大顎や角などの誇張形質は、しばしば片方の性のみで顕著に発達し、「性的二型」を生み出す。ハエやメダカ、マウスなどのモデル生物の性的二型は、Dmrt ファミリー転写因子群が重要な役割を果たすことが知られている。Dmrt ファミリー転写因子群は、線形動物から哺乳類まで進化的に広く保存されている(Kopp, 2012; Matson and Zarkower, 2012)。昆虫では doublesex (dsx) が性決定に関与していることが知られている(Shukla and Nagaraju, 2010)。

dsx は両性で発現しているが、性ごとに異なるスプライシングバリエントによるオス型、メス型のアイソフォームが合成される。オス型とメス型の Dsx タンパク質はともに zinc finger like DNA 結合ドメインを持ち、発生期の組織に性分化過程で働きかける転写制御因子として作用する。

興味深いことに、dsx の発現は性特異性だけでなく、組織特異性と栄養依存性が見られる。オスの武器形質で高発現が見られ、さらには小型個体に比べ大型個体で高発現が見られる(Kijimoto et al., 2009, Snell-Rood et al., 2011)。加えて、RNAi による dsx 遺伝子のノックダウンによって、エンマコガネ、カブトムシやクワガタ、オオツノコクヌストモドキにおいて、dsx が性特異的な武器形質の成長を制御することが示されている

(エンマコガネ属 (*O. taurus*, *O. Sagittarius*, Kijimoto et al., 2012); カブトムシ;(Ito et al., 2013), メタリフェルホソアカクワガタ (Gotoh et al., 2014); オオツノコクヌストモドキ; 新美ら 未発表))。

前項 5-3-1 で述べたように、武器形質の形成に JH が関与しており、その感受性には雌雄差が見られる。そして JH 感受性の雌雄差には、Dsx が関与することが示されている(Gotoh et al., 2014)。たとえば、メタリフェルホソアカクワガタでは、大顎の JH 感受性はオスのみでみられる。Dsx ノックダウンオスでは JH 刺激による大顎の成長の促進が見られなくなり、反対にメスでは大顎の成長が促進される。以上から、性特異的な武器形質の形成には、性決定経路と幼若ホルモンが共調した複雑な制御機構が関与すると推定されている。

5-3-3 インスリン/インスリン様シグナル伝達経路

甲虫武器形質の表現型可塑性を制御する重要なシグナル伝達経路として、インスリン/インスリン様シグナル伝達経路がある。この経路は線虫から昆虫、哺乳類まで進化的に保存されており、個体の栄養状態に応じて細胞の増殖や成長、代謝や老化などを幅広く制御する“栄養応答因子”である(Claeys et al., 2002; Clemmons et al., 2010; Wu and Brown, 2006)。昆虫では、インスリン様シグナル伝達経路や mTOR 経路、上皮成長因子経路 (EGF 経路) が互いにリンクし、栄養依存的な発生の可塑性や器官形成に機能することが知られている(Koyama et al., 2013)。

武器形質の制御にもインスリン経路が重要な役割を果たす(Emlen et al., 2012)。例としては、カブトムシの形態形成におけるインスリン感受性があげられる。具体的には、幼虫期の生殖原基では栄養依存性およびインスリン感受性が低い傾向がある一方、武器原基は高い栄養依存性とインスリン感受性を示す。Emlen らは、インスリン受容体の遺伝子ノックダウン実験により、ノックダウン個体のツノのサイズが顕著に縮小するこ

とを示した。しかしながら、インスリン受容体の発現量は諸器官の間で大きな違いは見られず、上記の栄養応答性の違いはインスリン経路下流の因子に依存するものと考えられている(Warren et al., 2013)。

5-4 クロマチン構造とエピジェネティック修飾

近年の細胞生物学の発達によって、組織・器官を形作る細胞の多様性がどのように生まれ、維持されるのかが解明されつつあり、染色体構造や DNA の修飾などのクロマチンレベルもしくはエピゲノム制御がきわめて重要な機構であることがわかってきた。こうしたエピゲノム機構は細胞の栄養応答にも深く関連している(Kaelin and McKnight, 2013)。本論文の主題である昆虫の武器形質の多様性作出プロセスにおいても、栄養条件や性に特異的な細胞の増殖、あるいは遺伝子発現にクロマチンレベルもしくはエピゲノム制御が関与し、武器を形作る遺伝子の発現制御を行っている可能性がある。そこで、本項では栄養環境と表現型可塑性の間にクロマチン構造やエピゲノム修飾が介在する、という仮説を立て、両者を結びつける分子機構を考察する。以下ではこれらについて概説する。

真核生物の DNA は、タンパク質と凝集してクロマチンという構造を取っている。クロマチン構造は H2A、H2B、H3、H4 各 2 分子ずつからなるヒストン 8 量体に、DNA が約 146bp 巻き付いたヌクレオソーム構造を基本単位としている。ヒストンタンパク質の N 末端のヒストンテールと呼ばれる直鎖状の構造を取っており、ヒストンテールに含まれるリシンやセリン残基などが、アセチル化、メチル化、リン酸化などの翻訳後修飾を受けることが知られている。また、DNA 自体もシトシン残基がメチル化（哺乳類では主として CpG 配列の G に生じる）を受けることが知られている。

上記のようなクロマチン上または DNA 上のエピゲノム修飾によって、ヒストンタンパク質同士や DNA と間の相互作用や、それぞれの修飾を特異的に認識して結合する因

子によってクロマチンの局所的な構造変化が引き起こされ、遺伝子発現が制御されている。エピゲノム修飾は、分化や発生に伴い環境に応じて後生的に獲得され、そのパターンは細胞分裂を経ても維持される。このようなエピゲノムの性質により、同じゲノム情報を持つ細胞であっても、多様な遺伝子発現パターンや表現型を創出することができる (Jenuwein and Allis, 2001; Shahbazian and Grunstein, 2007; Strahl and Allis, 2000)。

ヒストンのアセチル化は、主として遺伝子の活性化に関わることが知られている。特定の残基がエピゲノム修飾されたヒストンは「コード読み取りタンパク質」と呼ばれる一群のタンパク質と特異的に結合する。アセチル化ヒストンを認識するコード読み取りタンパク質の多くが、クロマチンを局所的に緩める因子を結合するなど、転写を活性化する働きを有しており、これらの働きでアセチル化されたヒストンに富む遺伝子領域の発現が活性化することになる。アセチル化ヒストンに結合するコード読み取りタンパク質の一例として、アセチル化部位に結合する「ブロモドメイン」を持つタンパク質がある (Yang, 2004)。一方で、アセチル化の逆反応である「ヒストンの脱アセチル化」が起これば、上記と正反対の反応が起こる。すなわち、クロマチンの凝集度が高まり、転写関連因子の DNA への結合が妨げられ、結果として局所的に転写が抑制される。

DNA のメチル化では、シトシン残基にメチル基が共有結合することで、転写因子などの DNA への結合が物理的に阻害され、これにより遺伝子発現が抑制される (Watt and Molloy, 1988)。また、メチル化 CpG に特異的に結合するタンパク質ドメイン (methyl binding domain, MBD) が存在し、特定のメチル化 DNA に結合する (Klose and Bird, 2006; Clouaire et al., 2010)。MBD は HDAC などのエピジェネティック因子を呼び込み、周囲のクロマチンを凝集させることで、遺伝子発現を抑制する (Bogdanović and Veenstra, 2009; Feng and Zhang, 2001; Hendrich and Tweedie, 2003; Jones and Baylin, 2002; Jones et al., 1998)。

5-5 ヒストン脱アセチル化修飾酵素 (HDAC)

ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) はアセチル化されたヒストンからアセチル基を脱離する酵素群である (図 2-1A)。哺乳類には HDAC 遺伝子が 18 種類存在し、ショウジョウバエ、セイヨウミツバチ (*Apis mellifera*)、コクヌストモドキなどの昆虫にも複数存在することが知られている (図 2-1B, Tribolium Genome Sequencing Consortium, 2008; Gallinari et al., 2007; The Honeybee Genome Sequencing, 2006)。

HDAC 遺伝子はその性質から、クラス I ~IV の 4 タイプに分類されている (De Ruijter et al., 2003; Gallinari et al., 2007; Minucci and Pelicci, 2006)。クラス I には HDAC1、2、3、8 が分類される。これらの因子は、核内に局在が見られ、多くの組織で恒常的な発現が見られる。クラス II には HDAC4、5、6、7、9、10 が分類される。これらの因子は核と細胞質に局在が見られ、発現は組織特異性である。クラス I と II の HDAC はよく似た酵素活性機構を持ち、酵素活性中心に亜鉛配位ドメインが見られ、亜鉛イオンを触媒として脱アセチ化反応を行う。クラス IV には高等真核生物で保存されている HDAC11 が含まれ、クラス I と II と同じく亜鉛依存性の酵素活性を示すが、機能的には両者と異なる。クラス III は他のクラスとは異なり、酵素活性に NAD を要求するものである。クラス III には、一部細胞寿命に関わることで注目されている「サーチュイン (SIRT1~7)」が含まれる。

本研究で用いた HDAC 阻害薬剤 TSA はクラス I とクラス II HDAC に作用することが知られている。TSA はその構造にキレート効果を示すヒドロキサム酸基を持つ (Furumai et al., 2002; Yoshida et al., 1990)。HDAC の活性中心から亜鉛イオンを奪うことで HDAC の酵素活性を阻害すると考えられている (Hassig et al., 1998)。

5-6 表現型可塑性とエピゲノム

表現型可塑性は、同一の遺伝情報から環境情報に応じた多様な遺伝子発現パターンを

作り出すことによってもたらされる。この可塑的な遺伝子発現機構の基盤として、DNA メチル化やヒストン修飾などのエピゲノム制御が想定されている(Gilbert and Epel, 2009)。

哺乳類では、栄養環境がゲノム上の DNA メチル化やヒストンアセチル化などのエピゲノム修飾パターンを変え、遺伝子発現に影響を及ぼすことが知られている(Jaenisch and Bird, 2003)。加えて、栄養環境は疾患の発症とも関係性が見られ、両親や祖父母の栄養状態が、子の心臓血管や糖尿病の死亡率を大きく影響することが分かっている(Kaati et al., 2002)。アグーチヴァイアブリエロー(*Avy*)マウスでは、母親の栄養（特にメチル基供与体である葉酸）状態が仔の毛色や肥満傾向に大きく影響することが報告されている(Waterland and Jirtle, 2003)。*Avy* マウスの表現型可塑性には、DNA メチル化による遺伝子発現制御機構が関与している。このように、発生初期の環境がエピゲノムの継承を通じて児の生涯にわたる表現型に影響をもたらす事例はヒトにも見られ、「DOHaD(Developmental Origins of Health and Disease)仮説」や「バーカー仮説」の提唱がなされるに至っている(Barker and Osmond, 1986; Wadhwa et al., 2009)。

昆虫の表現型可塑性においても、エピゲノム制御の重要性が示唆されている。ハチやアリなどの社会性昆虫では、幼虫期における栄養状態に依存して、女王やワーカーなどといった明確な機能を持ったカースト分化が生じる。セイヨウミツバチは幼虫期に与えられる餌の種類（ローヤルゼリーもしくはワーカーゼリー）でカースト運命が決定されるが、この過程に DNA メチル化が関わることが報告されている(Kucharski et al., 2008)。また、エンマコガネの一種(*O. gazella*)では、後成的な形態的变化をもたらす餌の種類によってゲノム全体のメチル化状態が変化することが知られている(Snell-Rood et al., 2013)。

5-7 武器甲虫の栄養応答の形態可塑性の解明

本章では、武器甲虫の栄養に応答した形態可塑性の分子機構を明らかにするため、まずオオツノコクヌストモドキを用いた新規の実験系の構築を行った。特にその大顎形態の可塑性とエピゲノム制御に注目し、最新の「非モデル生物」研究手法である *de novo* トランスクリプトーム解析と網羅的 RNAi を組み合わせた方法を適用して、分子機構の実態を明らかにしようと考えた。

既に述べたとおり、オオツノコクヌストモドキの大顎は栄養環境によってオスの大顎形態が劇的に変化する。この形態変化には前蛹期の栄養状態とエピゲノム制御によるメモリー機構が重要な役割を果たすと考えられる。そこで、RNAi 実験の主要なターゲットとしてエピゲノム制御因子に焦点を絞ることとした。

5-7-1 形態可塑性の分子制御機構

大顎の形態可塑性にエピゲノム制御が関わるかを検証する第 1 段階の実験として、エピゲノム修飾阻害剤を前蛹にマイクロインジェクションし、成虫の大顎形態への影響を調べた。次に、効果が見られた薬剤の標的因子グループについて、RNAi によるノックダウン実験を網羅的にを行い、大顎形態を制御する因子の同定を行った。

5-7-2 分子実験系の確立

近年、次世代シーケンサーや RNAi、ゲノム編集技術を組み合わせることで、従来の生物学研究の対象外であるものの、特定の生命現象の解明には有利である非モデル生物の解析が可能になり、米国を中心に研究が活発化し始めている。オオツノコクヌストモドキは、表現型可塑性の研究には非常に適した生物であるが、ゲノム情報が未知であることや、遺伝学的な解析手法が確立されていない点で、分子生物学的手法の適用が困難であった。そこで、次世代シーケンサー技術を用いてオオツノコクヌストモドキの分子

生物学実験系を新規に構築することとした。また、非モデル生物の遺伝子機能解析手法として広く用いられる RNAi 法も適用した。以上を通じて、オオツノコクヌストモドキを用いた効率的な分子生物学研究実験系の確立を目指した。

5-7-3 栄養条件間での比較トランスクリプトーム解析

上記に加え、武器の形成を担う武器形成遺伝子を効果的にスクリーニングする目的で、2通りの方法で遺伝子発現解析を行った。1つ目の方法として、栄養条件間で発現量が変動する遺伝子について網羅的発現解析（比較トランスクリプトーム解析）を行った。これらを通じて、表現型可塑性を制御する遺伝子群を網羅的にリストアップすることを目指した。2つ目の方法として、発現の栄養応答性を持つことが推測される因子として、本研究で大顎形成への関与が示された HDAC ファミリー遺伝子と武器形質の形成への関与が示唆されているインスリン/mTOR 経路の各因子に着目し、栄養条件間で発現量変動について比較解析を行った。

材料と方法

6-1 オオツノコクヌストモドキ

第 1 章の方法 2-1-1、2-2-2 と同様に行った。

6-2 性判別 PCR

幼虫期、前蛹期では、形態から性別が判定できないため、性決定因子の *dsx*(double sex) 遺伝子の性特異的スプライシングバリエーションに対するプライマーを用いて PCR で判定した。プライマー配列は名古屋大、新美輝幸助教より提供を受けた（新美ら 未発表）。

Dsx 性判別プライマー	
Dsx_370_F	TATAGACCCGCATGTCCTGCAGA
Dsx_1124_R	GCAGAAGTCTAGGAGGATCTCGG

6-3 マイクロインジェクション

終齢幼虫を高濃度の二酸化炭素を用いて麻酔処理を行った。マイクロインジェクター NANOJECT II(DRUMMOND)を用いて、終齢幼虫の背側腹部の体節間にガラス針の先端を射し込み、試料を微量注入した。注射後の幼虫は 24 穴プレート(直径 15 mm, Nunc; Thermo scientific, USA)の各穴に 1 匹ずつ隔離し、蛹化を誘導した。

6-4 ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬剤

ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害薬として Trichostatin A (TSA、和光純薬株式会社)を用いた。TSA は DMSO (和光純薬)に溶解した。1 個体あたり 46 ng 注射した。

6-5 RNAi 法

6-5-1 dsRNA の作製

本研究では 6-7, 6-8 項に述べる頭部の発現遺伝子の大規模シーケンス (RNA-seq による *de novo* transcriptome) で得られた mRNA の配列情報をもとに、オオツノコクヌストモドキにおける下記遺伝子の相同配列 (オルソログ) を決定し、二本鎖 RNA(dsRNA)の作成を行った。下記リストにある HDAC ファミリーやインスリン/mTOR 経路の遺伝子は種を超えて配列の保存性が高いため、本種の遺伝子データベースに対して相同性検索(local blast)を行うことで、明瞭な相同配列を得ることができた。標的遺伝子の標的部位の配列の 5'端に T7 配列(TAATACGACTCACTATAGGG)を付加したプライマーを設計した。用いたプライマーの配列は下表にまとめた。設計した部位は図 2-2 にまとめた。dsRNA の注射自体のストレスなどによる影響を評価するためのネガティブコントロールとして、本種のゲノム内には存在しない遺伝子である EGFP (緑色蛍光タンパク) を用いた。EGFP は市販の pUC19-EGFP ベクターを鋳型に増幅を行った。また、RNAi の有効性を確認するためのポジティブコントロールとして、変異体では口器部分に脚が形成される Hox 遺伝子である *Proboscipedia*(プライマー情報、配列情報は名古屋大、新美輝幸助教より提供) を用いた。HDAC ファミリー因子とインスリン/mTOR 経路因子は前蛹期の個体から作製した cDNA を鋳型とし、T7 配列付加プライマーを用いて PCR を行い、目的の DNA 断片を増幅した。

EGFP RNAi (Tomoyasu and Denell, 2004)	
GFPiF2	TAATACGACTCACTATAGGGCGATGCCACCT
GFPiR5	TAATACGACTCACTATAGGGCGGACTGGGTG
<i>Proboscipedia</i> RNAi	
Pbi_1_F	TAATACGACTCACTATAGGGGACCACCAGGAAAAGTAGCC
Pbi_1_R	TAATACGACTCACTATAGGGTGACCTGTCGTTCCGGTTAGA
HDAC1/2 RNAi	

HDAC1/2i_2_F	TAATACGACTCACTATAGGGTCCAAGCAATATGGGCAATC
HDAC1/2i_2_R	TAATACGACTCACTATAGGGGACGGAGTTGGTCCCGTATC
HDAC3 RNAi	
HDAC3i_1_F	TAATACGACTCACTATAGGGTTTTTGTCCCGGACTTTACG
HDAC3i_1_R	TAATACGACTCACTATAGGGAGGTTTCCATTTCTTCCTTATCGT
HDAC4/5 RNAi	
HDAC4/5i_1_F	TAATACGACTCACTATAGGGGGAAGGAGGCTACGATCTGC
HDAC4/5i_1_R	TAATACGACTCACTATAGGGGGCGAACAACCTGGGTGATA
HDAC6/10 RNAi	
HDAC6/10i_1_F	TAATACGACTCACTATAGGGCCGATTGTAATGCCGAGAGA
HDAC6/10i_1_R	TAATACGACTCACTATAGGGTTGGAAGTGTAAAAGCGTTG
HDAC11 RNAi	
HDAC11i_1_F	TAATACGACTCACTATAGGGTAGTGTACCGCCCCGAGTAC
HDAC11i_1_R	TAATACGACTCACTATAGGGCAGTTTTCCGGCCAAAATAG
Insulin receptor RNAi	
InRi_1_F	TAATACGACTCACTATAGGGCCATTTGTCCCGGGGATGAA
InRi_1_R	TAATACGACTCACTATAGGGACCGTTCTGCGACTGGAAAT
FRAP(mTOR) RNAi	
FRAPi_3_F	TAATACGACTCACTATAGGGGTTGGCTACGTTTCGATTTTCG
FRAPi_3_R	TAATACGACTCACTATAGGGTCCGATCCAAGGAGATTAGC
RAPTOR RNAi	
RAPTORi_1_F	TAATACGACTCACTATAGGGAAGTCCATACAGAAAATTGG
RAPTORi_1_R	TAATACGACTCACTATAGGGCATGGCAAAATGTTCAAACG

アガロースゲル電気泳動により、PCR 産物の DNA 断片が目的のサイズであることを確認した。電気泳動の結果、単一のバンドではなく、複数のバンドが見られた場合は目的のバンドを切り出し、Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いてゲル精製を行った。

T7 配列を付加した DNA 断片を鋳型とし、Megascript® T7 Transcription kit (Life Technologies)を用いて *in vitro* 転写を行った。実験操作は添付のプロトコールに従った。

転写反応後の反応液を 80 °C で 10 分間加熱し、室温で 1 時間静置して RNA 断片を 2 本鎖化させた。2 本鎖 RNA を含む溶液に DNase (Life Technologies) /RNaseA (和光純薬株式会社) を加え 37 °C で 15 分間処理し、鋳型 DNA と 1 本鎖 RNA を除去した。その後、フェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿により dsRNA を精製、回収した。精製後の dsRNA はアガロースゲル電気泳動でサイズを確認した。

6-5-2 dsRNA のマイクロインジェクション

マイクロインジェクションを行う dsRNA 濃度について予備実験を行い、1 µg/µl を上限とし、希釈した dsRNA を 50.6 nl ずつマイクロインジェクションし、正常に蛹まで正常に到達する濃度 (蛹) と正常な成虫が得られる濃度 (成虫) を設定した。1 個体あたり、以下の量をマイクロインジェクションした。GFP dsRNA (520 bp) 50.6 ng (蛹、成虫)、Probosipedia RNAi (205 bp) 50.6 ng (蛹、成虫)、HDAC1/2 dsRNA (435 bp) 0.0506 ng (蛹) 0.00506 ng (成虫)、HDAC3 dsRNA (300 bp) 50.6 ng (蛹) 0.506 ng (成虫)、HDAC4/5 dsRNA (336 bp) 5.06 ng (蛹、成虫)、HDAC6/10 dsRNA (263 bp) 50.6 ng (蛹、成虫)、HDAC11 dsRNA (329 bp) 50.6 ng (蛹、成虫)、InR dsRNA (398 bp) 25.3 ng (蛹)、 mTOR dsRNA (272 bp) 25.3 ng (蛹)、 RAPTOR dsRNA (345 bp) 25.3 ng (蛹) をそれぞれ使用した。

6-6 リアルタイム PCR による遺伝子ノックダウン効率・発現量の評価

前蛹の各個体の頭部、胸部、腹部から RNAqueous®-Micro Total RNA isolation kit (Life technologies)を用いて total RNA を精製した。PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) (takara)を用い、各 total RNA 100 ng を使用して逆転写反応を行い、リアルタイム PCR 用テンプレートを作製した。KAPA SYBR Fast qPCR kit と Applied Biosystems® StepOnePlus™ リアルタイム PCR システムを用いた定量 PCR により解

析した。実験操作は添付のプロトコールに従った。用いたプライマーを下表にまとめた。プライマーの設計部位は図 2-2 に示した。各処理群で Actin 遺伝子に対する相対的な発現量を目的遺伝子のノックダウン群と対照群(EGFP dsRNA 注射処理群)との間で比較した。

Actin	
Actin_q_1_F	CCCATACCGACCATGAC
Actin_q_1_R	TCCGGTATGTGCAAAGCC
HDAC1/2	
HDAC1/2_q_6_F	TGCAAACACGCTGTTAGTGC
HDAC1/2_q_6_R	CAAAACCTTCGCACTAGACTTG
HDAC3	
HDAC3_q_2_F	ACAACACCTCGCTTCTCGTT
HDAC3_q_2_R	TGAAGCTCCTTCCACACGTA
HDAC4/5	
HDAC4/5_q_1_F	TTAAAACAACGCGTGATGGA
HDAC4/5_q_1_R	GCTCTTGAGGAGGTGATTCTG
HDAC6/10	
HDAC6/10_q_1_F	GGATAAGAAGAAGGGCAGAGG
HDAC6/10_q_1_R	CAACGACAATGGTTTCATCG
HDAC11	
HDAC11_q_1_F	ACGGGAAATGAACACTTTGG
HDAC11_q_1_R	CGCAAACACAAACAAACTGC

6-7 *de novo* トランスクリプトーム解析

6-7-1 RNA の精製

昆虫の幼虫、蛹、成虫の全身および幼虫と前蛹期の頭部から SV total RNA isolation kit (Promega)を用いて、total RNA を精製した。個体の全身を用いた場合は 5 個体、頭部を用いた場合は 100 個体を使用した。実験操作は添付のプロトコールに従った。

約 4 µg の Total RNA から Oligotex™ -dT30<Super> mRNA Purification Kit (From Total RNA) を用いて polyA RNA を精製した。精製した polyA RNA の品質は Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) を用いて確認した。

6-7-2 illumina Miseq による配列取得

ライブラリー作製は NEBNext® Ultra™ Directional RNA Library Prep Kit for illumina と NEBNext® Multiplex Oligos for illumina を用いた。実験操作は添付のプロトコール(Revision 2.0)に従った。polyA RNA は 100 µg 用いてライブラリーを作製し、ライブラリーの DNA 断片のサイズを 500-700 bp になるように精製した。精製したライブラリーのサイズは Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) を用いて確認した。Miseq Reagent Kits V2 を用いて、Mi-seq (illumina) を用いて 250 bp ペアードエンドの条件で配列解析を行った。

6-7-3 リードデータの処理

Miseq、項目 6-8-4 の Hiseq で得られた Fastq 形式のペアエンドリードデータを図 2-3 の手順で処理し、トランスクリプトカタログを作製した。以下に詳細を示す。

FASTX-Toolkit (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/) に含まれる

fastq_quality_filter ツールと fastq_quality_trimmer ツールを用いて、塩基配列の信頼性を示す Q 値を指標にクオリティの低いデータの除去を行った。具体的には、以下の

(1) から (4) を行った。

(1) イルミナのデータは、仕様上リードの後半の品質が落ちる傾向があるため、Fastq_quality_trimmer で、リードの削り込みを行った。MiSeq データは、各リードの 3'側から Q 値 20 以下のデータ順番に除去した。削り込みの結果、リードの長さが 100bp より短くなったリードを除去した (使用 option “-t 20 -l 100 -Q33”)。HiSeq デ

ータは、各リードの 3'側から Q 値 20 以下のデータ順番に除去した。削り込みの結果、リードの長さが 25 bp より短くなったリードを除去した。（使用 option “-t 20 -l 25 -Q33”）。

（2）Fastq_quality_filter で、各リードのクオリティを確認し、品質の低いリードを除去した。MiSeq と HiSeq データは共に Q 値 20 以下の塩基の割合が 80 %未満のリードを削除した（使用 option “-q20 -p80 -Q33”）。

（3）Tagdust (Lassmann et al., 2009)で、各リードデータから Miseq、Hiseq の解析で用いたアダプター配列を除去した（使用 option “-f 0.01”）。

（4）cmpfastq_pe (http://compbio.brc.iop.kcl.ac.uk/software/cmpfastq_pe.php)で、ペアエンドリードを持つリードを選別した。（1）から（3）の操作により、ペアの片側が除去されてなくなってしまう、片側だけのデータになっているものを除去した。

6-7-4 de novo トランスクリプトームアッセンブル

アッセンブルソフトに Trinity (Grabherr et al., 2011; Haas et al., 2013; Trinity version: Trinityrnaseq_r20131110)を用いた。処理後のリードデータを Trinity(パラメータ: SS_lib_type = RF, min_contig_length = 200) でアッセンブルし、コンティグ配列を作製した。

6-7-5 データベース検索

コンティグ配列は KAAS (<http://www.genome.jp/tools/kaas/>) によりアノテーション情報を検索した。また、BLAST (<http://blast.be-md.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)でコクヌストモドキ(*T. castaneum*)の配列情報と比較した。予測タンパク質の推定には Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) を用いた。

6-8 栄養条件による発現変動遺伝子の網羅的探索

6-8-1 栄養条件と発生段階の設定

栄養条件による成虫の形態変異を実験的に再現するために、終齢幼虫の体重によって、小型・大型の分別を行った。予備実験によって、終齢幼虫の体重が成虫の形態変異に及ぼす効果を検討し、個別に単離後に正常に成虫に発生する範囲内で大型・小型の個体を定義した（図 2-4）。集団飼育した終齢幼虫の体重を電子はかりで測定し、オスの 5 mg 以上、メスの 4.5 mg 以上を大型個体、オスの 4.0 mg 以下、メスの 3.5 mg 以下を小型個体とし、以下の実験を行った。形態形成遺伝子を探索する上で、形態形成が盛んな時期を用いる必要がある。本種と同様に誇張化した大顎をもつクワガタムシの 1 種では前蛹初期に栄養条件に応じた内分泌状態の変化が認められており、前蛹の前期・中期が武器変異の形成に重要な時期と考えられる(Gotoh et al., 2011)。本種の前蛹期は約 3.6 日であり（1 章参照）、蛹に向けた形態形成開始期と考えられる“前蛹前期（前蛹化 1 日目）”、および形態形成が中盤に差し掛かっている“前蛹中期（前蛹化 2 日目）”に着目して解析を行った。また、形態形成を始めていない段階である幼虫段階を“終齢幼虫期”として解析サンプルに含めた。各サンプル個体は終齢幼虫期の体重に基づくサイズ選別後、下に示す方法で RNA 精製を行った。前蛹期の個体は、上記のサイズ選別後、24 穴プレートに隔離し、蛹化を誘導し、蛹化誘導後 1 日 1 回発生段階を観察した。蛹化後の経過時間が 24 時間以内の個体を前蛹前期、24 時間から 48 時間以内の個体を前蛹中期と定義し、以下の実験に用いた（図 2-5）。

6-8-2 RNA 精製

各群の終齢幼虫期、および前蛹前期・中期の各個体の頭部を切断し、RNAqueous®-Micro Total RNA isolation kit (Life technologies)を用いて total RNA を精製した。方法は添付のプロトコールに従った。

6-8-3 テンプレートスイッチング法

1 個体の頭部から精製される total RNA 量は微量であるため、cDNA の作製にはテンプレートスイッチング法を用いた(図 2-6, Aird et al., 2013 の手法を改変)。First strand cDNA 合成反応時に、mRNA の両端に特異的な配列を付加することで、その後の PCR 反応で mRNA を特異的に増幅させることができる。用いたプライマーを下表にまとめた。

名称	プライマー配列
PolyT START	AATTGCAGTGGTATCAACGCAGAGCGGCCGCTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN
Template switching oligo (RNA)	AAGCAGUGGUAUCAACGCAGAGUACAUGGG
START	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACAATTGCAGTGGTATCA ACGCAGA
TS-LONG	CTTGTAGGTTAAGTGGAGAGCTAACAATTTACACAGGAA AGCAGTGGTATCAACGC

V(A or G or C)、 N(A or T or G or C)

幼虫、前蛹個体の頭部から精製した total RNA を以下の組成になるように混合した。

反応液	Volume [μ L]
Total RNA sample (up to 1 μ g)	x
10 μ M PolyT START*	1
RNase free H ₂ O	Up to 10
Total	10.0

65℃、5 分間加熱した。氷上で 3 分間置いた。

上の total RNA 反応液に以下の組成になるように試薬を加え、逆転写反応を行った。

Reagents	Volume [μ L]
Total RNA 反応液	10.0
5 \times First Strand Synthesis buffer (SSII, Invitrogen)	4.0
10 mM dNTP mix	1.0
0.1 M DTT (SSII, Invitrogen)	2.0
12 μ M Template Switching Primer	1.0
RNase inhibitor (4 U/ μ L, QIAGEN)**	1.0
Super Script II (200 U/ μ L, Invitrogen)	1.0
	20.0

反応液をよく混ぜ、42 $^{\circ}$ C で 60 分間、65 $^{\circ}$ C で 15 分間処理し、反応後は氷上に静置した。80 μ l の水を加えて反応液を希釈した。

上記のように合成された cDNA を用いて性判別 PCR（項目 6-2）を行い個体の性別を判定したのち、栄養条件・発生段階・性別が同じカテゴリーについて、個体差を最小にするため、5 個体の cDNA を等量ずつ混合したものを 1 サンプルとした。各同一カテゴリーについて 3 回の生物学的反復を作製した。上記で作製した poly-T を含む First-strand -cDNA（主に mRNA 由来）を PCR 反応でやや増幅し（20 サイクル）、次世代シーケンサー解析用 cDNA ライブラリーとした。

Reagents	Volume [μ L]
Diluted FS-cDNA	10.0
5 \times Phusion HF Buffer (Finnzymes)	10.0
10 mM dNTP mix	1.0
5 μ M each Primer, START & TS-LONG	2.5
Phusion DNA Polymerase (Finnzymes)	0.5
MilliQ	26.0
Total	50

PCR 反応は以下の温度サイクルで行った。

98 $^{\circ}$ C | 30 sec

98 °C	10 sec	× 20 cycles
68 °C	6 min	
72 °C	10 min	
4 °C	Hold	

PCR 産物を Agencourt AMPure XP ビーズ (BECKMAN COULTER) で精製し、12 μ l のバッファーに溶出した。DNA 断片化装置 S220 (Covaris) を用いて、800bp プロトコールで DNA を断片化した。断片化処理後の DNA は Agencourt AMPure XP ビーズを用いて精製し、Qubit® dsDNA HA Assay Kit と Qubit® 2.0 Fluorometer (Life technologies) を用いて DNA 濃度を測定した。

6-8-4 Illumina Hiseq による配列取得

ライブラリー作製には NEBNext® Ultra™ Directional RNA Library Prep Kit for Illumina と NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina を用いた。鋳型が cDNA であるため、プロトコールの End Repair/dA tail of cDNA Library の段階から行った。cDNA ライブラリーを DNA 断片サイズが 350-700 bp となるよう精製し、適正なサイズであることを Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) を用いて確認した。作製したライブラリーの解析は BGI JAPAN 株式会社に委託し、Hi-seq 2000 (Illumina) を用いて 100 bp ペアードエンドの条件で解析した。解析には、1 レーンあたり 12 サンプルとし、3 レーン分用いた。各レーンのサンプルと index 配列は下表にまとめた。

レーン	カテゴリー	生物学的反復	illumina index No.
レーン 1	幼虫・大型・オス	1	1
レーン 1	幼虫・大型・オス	2	2

レーン 1	幼虫・大型・オス	3	3
レーン 1	前蛹前期・大型・オス	1	4
レーン 1	前蛹前期・大型・オス	2	5
レーン 1	前蛹前期・大型・オス	3	6
レーン 1	前蛹中期・大型・オス	1	27
レーン 1	前蛹中期・大型・オス	2	8
レーン 1	前蛹中期・大型・オス	3	9
レーン 1	幼虫・小型・オス	1	10
レーン 1	幼虫・小型・オス	2	11
レーン 1	幼虫・小型・オス	3	12
レーン 2	前蛹前期・小型・オス	1	1
レーン 2	前蛹前期・小型・オス	2	2
レーン 2	前蛹前期・小型・オス	3	3
レーン 2	前蛹中期・小型・オス	1	4
レーン 2	前蛹中期・小型・オス	2	5
レーン 2	前蛹中期・小型・オス	3	6
レーン 2	幼虫・大型・メス	1	27
レーン 2	幼虫・大型・メス	2	8
レーン 2	幼虫・大型・メス	3	9
レーン 2	前蛹前期・大型・メス	1	10
レーン 2	前蛹前期・大型・メス	2	11
レーン 2	前蛹前期・大型・メス	3	12
レーン 3	前蛹中期・大型・メス	1	1
レーン 3	前蛹中期・大型・メス	2	2
レーン 3	前蛹中期・大型・メス	3	3
レーン 3	幼虫・小型・メス	1	4
レーン 3	幼虫・小型・メス	2	5
レーン 3	幼虫・小型・メス	3	6
レーン 3	前蛹前期・小型・メス	1	27
レーン 3	前蛹前期・小型・メス	2	8
レーン 3	前蛹前期・小型・メス	3	9
レーン 3	前蛹中期・小型・メス	1	10
レーン 3	前蛹中期・小型・メス	2	11
レーン 3	前蛹中期・小型・メス	3	12

6-8-5 参照配列の作製

方法 6-8-4 で得られた Hiseq のリードデータを項目 6-7-4 の方法でアッセンブルし、コンティグ配列を作製した。方法 6-7-5 の KAAS を用いて、コンティグ配列にアノテーション情報を付加したコンティグ配列リストを作製した。作製したリストに対し、アノテーション情報が付加の有無によるコンティグ配列の選別を行った。以下の操作を行った。アノテーション情報が付加されたコンティグ配列について、同一のアノテーション情報を持つコンティグ配列をまとめ、この中の最大長のコンティグ配列をその遺伝子の参照配列とした。アノテーション情報が付加されなかったコンティグ配列は、クラスタリングソフト CD-HIT (<http://weizhongli-lab.org/cd-hit/>) を用いて配列の類似性を元にクラスタリングを行った。グループ内で最大長のコンティグ配列を選別して参照配列とした。

6-8-6 発現変動遺伝子の検出

発現量の検出には、アッセンブルソフト Trinity (Grabherr et al., 2011; Haas et al., 2013; Grabherr, et al., 2013; Trinity version: Trinityrnaseq_r20131110) に含まれる align_and_estimate_abundance.pl ツールを使用した。6-8-5 で作製した参照配列を用い、Hiseq で得られた各カテゴリーの参照配列に対するリードカウントデータを得た (使用 option “--est_method RSEM --alin_method bowtie --SS_lib_type RF”)。以下の解析には遺伝子長および各ライブラリーの総リード数によって発現量の正規化した RPKM (reads per kilobase of exon per million mapped sequence reads) 値を用いた。

さまざまな発生段階、栄養条件と性別が異なる 36 サンプルについて、遺伝子発現プロファイルは同一、あるいは似たカテゴリー間ほど類似すると予測される。多次元尺度構成法を用いて、サンプルごとの発現プロファイルの類似性を二次元平面上に視覚化し、類似するサンプルが遺伝子発現プロファイルでも類似するかどうかを確認した (統計ソ

フト R (The R Foundation for Statistical Computing, 2012, EdgeR パッケージ (<http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/edgeR.html>))、および plotMDS プログラム)。また、発現解析用 R パッケージソフト TCC (Sun et al., 2013) を使用し、異なる栄養条件間における発現変動遺伝子の検出と M-A プロット (各遺伝子の総発現量に対する発現量の差 (比率) をグラフ化する手法) の作成を行った。事前にリストアップした HDAC ファミリー遺伝子とインスリン/mTOR 経路の各因子の発現解析は、TCC を使用し、P 値を用いた比較解析を行った。発現変動遺伝子については、統計的有意性が高い上位 50 の遺伝子について、色の濃淡によって発現変動を示すヒートマップを作成し、ヒートマップ表示では発現プロファイルおよびサンプルの類似性に従ってクラスタリングを行った (Gplot パッケージ (<http://gplot.sourceforge.net/>))、Heatmap.2 プログラムを使用)。

6-9 形態観察と形態計測

6-9-1 標本の作製

形態観察の蛹の FAA (Formalin-Acetic acid-Alcohol) 溶液 (10 % ホルマリン、5 % 氷酢酸、50 % エタノール、35 % 水) に浸して固定した。固定後の蛹は 70% エタノールに浸して保管した。成虫は冷凍庫で殺虫し、十分に乾燥させて標本を作製した。

6-9-2 形態観察

蛹、成虫の形態観察には、走査型電子顕微鏡 (VE-8800、KEYENCE) を用いて撮影し、画像データを取得した。

6-9-3 成虫の形態計測

各個体の大顎長、大顎外縁長、大顎幅、体サイズの指標として翅鞘幅 (Okada and

Miyatake, 2010b) を測定した (図 2-7)。大顎長、大顎幅、翅鞘幅の測定には、測定用実体顕微鏡(VHX-200, KEYENCE)を使用した。大顎外縁長の測定は測定用実体顕微鏡(VHX-200, KEYENCE)で画像データを取得し、画像解析ソフト ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>) を用いて測定した。統計解析は、R 3.1.1. (The R Foundation for Statistical Computing, 2012)で行った。得られたデータをもとに、大顎サイズを変量、体サイズを共変量、処理区を水準とする共分散分析を行い、体サイズを考慮した上で大顎サイズを処理区間で比較した。

結果

7-1 HDAC 阻害剤 TSA の影響

武器形質の形態形成におけるエピゲノム制御の関与の可能性を検証するため、まず終齢幼虫にエピゲノム修飾因子の阻害剤（ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 TSA および DNA メチル化阻害剤 5-アザシチジン）を注射し、成虫の武器サイズへの影響を調べた。なお、大顎の大きさは体サイズに依存して変化するため、「体サイズ（鞘翅幅）」を共変量とした共分散分析（ANCOVA）を用いて、薬剤処理が大顎長へ及ぼす効果を評価した。

その結果、ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）の阻害剤である TSA 処理群において、体サイズに対して相対的な大顎長の増大が観察された(図 2-8)。5-アザシチジンについては、蛹化の速度への影響が見られたが、武器形質には顕著な効果が認められなかった。以上の結果から、大顎のサイズ決定に前蛹期のヒストンアセチル化を介した制御が何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。

7-2 オオツノコクヌストモドキの分子実験系の確立

7-2-1 RNAi 実験系の確立

RNAi 法は非モデル生物での生体内での遺伝子機能解析に有効な手法の一つである。しかし、昆虫において RNAi は種によってその有効性が異なることが知られている。甲虫目では RNAi による遺伝子機能阻害は複数の生物種でその有効性が確認されている（メタリフェルホソアカクワガタ(Gotoh et al., 2014); エンマコガネ属(Kijimoto et al., 2012); コクヌストモドキ(Tomoyasu and Denell, 2004))。

有効性の検証実験には、形態変化の予測が容易な *Proboscipedia* 遺伝子を用いた。*Proboscipedia* 遺伝子はホメオティック遺伝子の一つで、機能阻害によって頭部の小顎髭と下唇を脚に誘導することが期待される。本種の *Proboscipedia* 遺伝子に対し、

dsRNA を設計し、終齢幼虫にマイクロインジェクションした。その後、成虫まで発生させ、形態への影響を観察した。その結果、期待通り小顎髭と下唇の脚化が観察された（図 2-9）。この結果から、本種においても、RNAi を用いた分子発生的な操作実験が効率的に実施可能であることを示した。

7-2-2 *de novo* トランスクリプトーム解析

次に、オオツノコクヌストモドキの遺伝子配列情報の取得を目指した。発現する遺伝子の種類は発生段階や部位で異なることが予想されるため、幼虫、オスの蛹、オスの成虫のそれぞれの全身、さらに武器形質の形態形成に関わる終齢幼虫と前蛹期の頭部から全 RNA を精製し、発現する遺伝子について次世代シーケンサーillumina 社の Mi-seq を用いて解析し、予備的な遺伝子配列のリードデータを取得した（表 2-1A）。得られたリードデータをアッセンブルしてコンティグ配列を作製し、データベース KAAS で相同性検索を行い、遺伝子リストを作成した（表 2-2A）。さらに詳細な完全版遺伝子リストを作成するため、Hiseq で解析し、より多数のリードデータを取得した（表 2-1B）。これらについても同様にコンティグ配列の作製とデータベース検索を行い、遺伝子リストを作成した（表 2-2B）。

7-2-3 オオツノコクヌストモドキの HDAC の同定

TSA のマイクロインジェクション実験結果（7-1）から、大顎の形態形成に HDAC が関与することが予想された。そこで、上記の *de novo* RNA-seq 実験で同定した遺伝子リストの中に HDAC1/2、HDAC3、HDAC4/5、HDAC6/10、HDAC11 の 5 種類の HDAC ファミリー遺伝子を見出した（図 2-10）。これらは類縁種のコクヌストモドキの HDAC と高い類似性を示した（それぞれ 97 %、98 %、96 %、57 %、84 %）。

7-3 RNAi による HDAC の機能阻害実験

7-3-1 蛹の形態への影響

各 HDAC ファミリー遺伝子について RNAi 実験用の dsRNA を設計し、種々の濃度を終齢幼虫期に注入し、蛹化を誘導した。一部の dsRNA を高濃度に注入すると発生に異常が見られたが、正常に蛹まで到達する適正 dsRNA 濃度を求めることで、マイクロインジェクション後の蛹化誘導を実現した。まず対照群とともに蛹段階の個体について光学顕微鏡および走査型電子顕微鏡を用いて大顎などの形態観察を行った。

その結果、HDAC1/2 RNAi 処理個体では顕著な大顎の縮小が観察された (図 2-11)。また、HDAC3 処理個体では逆に顕著な大顎の増大が見られた (図 2-11)。一方、HDAC4/5、HDAC6/10、HDAC11 処理個体では、形態への影響はほとんど観察されなかった (図 2-12)

7-3-2 成虫の大顎形態への影響

次に、各 HDAC ファミリー遺伝子について、成虫までの発生が可能な濃度の dsRNA をマイクロインジェクションし、得られた成虫について形態への影響を光学顕微鏡および走査型電子顕微鏡を用いて調べた。本種の大顎はサイズ増加に伴い、湾曲が強くなるため、大顎サイズとして大顎の根本から先端までの輪郭の距離とした大顎外縁長と、大顎幅の 2 か所を設定した。体サイズとして鞘翅幅を測定した。HDAC の RNAi によるノックダウンが大顎サイズに与える影響について、体サイズ (鞘翅幅) を共変量とした共分散分析 (ANCOVA) を行い、形態への影響を評価した。

その結果、HDAC1/2 RNAi 処理群では体サイズに対する相対的な大顎外縁長と大顎幅が減少することが、再度確認された (図 2-13B,C)。さらに、HDAC3 処理個体では RNAi 処理群では、体サイズに対する相対的な大顎外縁長と大顎幅が増大することが判明した (図 2-14B,C)。この場合も、HDAC4/5、HDAC6/10、HDAC11 RNAi 処理群で

は体サイズに対する相対的な大顎外縁長と大顎幅への影響は見られなかった(図 2-15、16、17)。

7-3-3 ノックダウン効果の検証

RNAi により標的遺伝子の発現抑制が特異的に生じているかを、リアルタイム定量 PCR により検証した。正常に蛹まで正常に到達する濃度でマイクロインジェクションを行い、4 日後に前蛹期の個体の頭部から RNA を精製し、各 HDAC 遺伝子の発現を調べた。

その結果、HDAC1/2 では、対照を 100 %とすると 59.1 %程度であることがわかった(図 2-18A, $P < 0.001$, t-test)。HDAC3 では、対照と比べて 22.8 %程度であることがわかった(図 2-18B, $P = 0.003$, t-test)。HDAC4/5 では、対照と比べて 89.7 %と効果があり見られなかった(図 2-18C, $P = 0.171$, t-test)。HDAC6/10 では、対照と比べて 54.0 %程度であることがわかった(図 2-18D, $P < 0.001$, t-test)。HDAC11 対照と比べて 69.0 %程度であることがわかった(図 2-18E, $P < 0.001$, t-test)。対照として調べた他の遺伝子(EGFP)ではこのような効果は認められなかった。

HDAC1/2 と HDAC3 について、ノックダウン効果の組織特異性を調べた。前蛹期の個体の頭部、胸部、腹部から RNA を精製し、RNAi の発現抑制について、リアルタイム PCR を行った。その結果、HDAC1/2 では、頭部、胸部、腹部において、発現の抑制が見られた(図 2-18A)。また、HDAC3 についても HDAC1/2 と同様にすべての部位で発現が抑制されていた(図 2-18B)。

7-4 比較トランスクリプトーム解析

Hi-seq2000 によるシーケンシング、*de novo* アセンブリ、およびアイソフォーム様配列の集約化によって、発現解析に用いる 14,940 個の mRNA 様フラグメント(参

照配列) を決定した。このうち KAAS アルゴリズムによって 4,445 の参照配列にアノテーション (遺伝子名) が付加された。アノテーションが付加されないこの他の参照配列は、既知遺伝子との相同性が低い本種、あるいは甲虫に特異的な遺伝子や、タンパク質コード領域を持たないが poly-A 配列を持つ mRNA 様の non-coding RNA と考えられた。下記の遺伝子発現解析ではリードカウントが 0 の低発現の参照配列を除去した 13,808 個の参照配列を用い、各参照配列にマッピングされたリード数を遺伝子発現量とした。

7-4-1 クラスタリング解析

解析サンプルには栄養条件 (良い・悪いの 2 通り)、発生段階 (終令幼虫、前蛹前期、前蛹中期の 3 通り)、雌雄 (2 通り) があり、3 つの生物学的反復を組み合わせると 36 カテゴリーが存在することになる。13,808 個の遺伝子の発現量を多次元尺度構成法 (MDS) による各カテゴリーの遺伝子発現プロファイルの解析ではプロファイルが類似するサンプルほど近くに配置される。終令幼虫 (緑) と前蛹 (青と赤) は、多次元尺度第一軸 (MDS1, X 軸) で大きく離れており、顕著な遺伝子発現プロファイルの差が見られた。さらに各発生段階において、貧栄養 (小型) 個体は多次元尺度第二軸 (MDS2, Y 軸) で大きな値をとる傾向があった。また、雌雄も概ね同一カテゴリーのサンプルは近くに位置し、頭部における遺伝子発現パターンは、発生段階、栄養条件、雌雄差を反映したものになっていた (図 2-19)。

7-4-2 オスの栄養条件間の遺伝子発現プロファイルの比較

大顎の形態形成にもっとも関わりと考えられる前蛹前期と前蛹中期において、遺伝子発現プロファイルをオスの栄養条件間で比較した。前蛹前期、前蛹中期における発現変動の大きい上位 50 遺伝子について、それぞれクラスタリング解析とヒートマップ表示

によるプロファイル表示を行った (図 2-20, 21)。多重比較による有意差の補正を比較トランスクリプトームでは一般的な FDR=10 % (False Discovery Rate, 誤判別率)で行った結果、前蛹前期では 344 個、前蛹中期では 31 個のフラグメント (≡遺伝子) が栄養応答遺伝子として同定された(図 2-22A,B)。前蛹前期と前蛹中期で共通する発現変動遺伝子が少なかったため、前蛹前期と前蛹中期は個別に分けて結果をまとめた(図 2-22A,B)。前蛹中期の上位 50 遺伝子の中には、武器形質の形成への関与が示唆されている栄養応答経路であるインスリン/mTOR 経路の FRAP (mTOR) が含まれていた。

次に大顎形態に影響をもたらす HDAC ファミリー遺伝子やインスリン/mTOR 経路の因子について栄養間での個々の遺伝子の発現変動について調べた (表 2-3)。その結果、HDAC ファミリー遺伝子について、HDAC1/2、HDAC6/10 は前蛹前期中期ともに栄養条件間での発現変動はみられなかった。HDAC3、HDAC4/5 は、前蛹前期で発現変動が見られた。HDAC3 と HDAC11 は大型群では、小型群に比べ発現量が 1.37 倍、1.44 倍だった。HDAC4/5 は小型群で大型群に比べて 1.5 倍だった。インスリン/mTOR 経路の因子については、前蛹前期において、FRAP (mTOR)、RICTOR、RAPTOR、IRS の発現が小型群で高い傾向が見られた。また、前蛹中期では、FRAP (mTOR) と IRS の発現が小型群で高い傾向が見られた。

7-4-3 RNAi によるスクリーニング

上記の解析でインスリン/mTOR 経路の因子は栄養応答性が見られた。そこで、インスリン/mTOR 経路に関わる各遺伝子群について、網羅的 RNAi スクリーニングを開始した。まず、InR、FRAP (mTOR)、RAPTOR に対する dsRNA をマイクロインジェクションし、蛹形態への影響を観察したところ、InR、mTOR、RAPTOR の RNAi において、大顎の縮小が観察された (図 2-23)。

考察

8-1 新規モデル実験系としてのオオツノコクヌストモドキの有用性

本種は小型で飼育が容易であることや、個体密度によって人為的に蛹化の進行を制御することができるなど、実験系としての優位性を有する。また、武器形質の形態形成の解析に適した終齢幼虫を大量に同調させることができることなど、これまで用いられている他の武器甲虫にはない優れた特質も有している。

しかしながら、同種の遺伝子・ゲノム情報がほとんど取得されていないほか、遺伝子解析手法も確立されておらず、分子実験系を新たに一から構築する必要があった。本研究では、近年技術革新の著しい次世代シーケンサーを用いて遺伝子情報を取得し、遺伝子機能解析手法として RNAi 法を確立し、これらを組み合わせた分子発生的実験系を確立することに成功した。

本研究では、*de novo* トランスクリプトーム解析によって、4878 の新規遺伝子配列の取得に成功した。この中には HDAC の他にも多数のエピジェネティック遺伝子が含まれている（表 2-4）。今後、さらなる網羅的 RNAi 解析により、他のエピゲノム制御因子についても解析を進めることが可能になっている。

本種は大顎の表現型可塑性だけでなく、オス間の闘争行動や求愛行動のモデル系としての重要性も指摘されている(Okada et al., 2006)。本研究で確立した分子実験系をこれら高次機能の解析に応用することも可能であり、複雑な昆虫の行動を司る分子メカニズムの解明につながることを期待される。

本種の大顎は顕著な栄養応答性を示す。今回の解析で、カブトムシなどと同様に、インスリンシグナル伝達経路が栄養応答性に関与することが示唆された。インスリンシグナル伝達系路は、武器甲虫だけでなく、哺乳類でも体サイズの決定に重要な役割を果たしているため、広範囲の動物種に普遍的な体サイズや体モジュールの制御機構である(Shingleton and Frankino, 2013)。今後のオオツノコクヌストモドキの研究を通じて、

このような普遍的な栄養制御システムの実体を解明できる可能性がある。

制御経路が種間で保存されていることは、今後の分子生物学的研究に新たな展開をもたらすと考えられる。本種は小型で大量飼育可能であり発生期間が短いことなどから RNAi スクリーニングなどの分子実験系に有効である。その反面、エピゲノム解析などで必須な ChiP-seq やプロテオミクス解析など、大量のタンパク質サンプルを必要とする実験には不向きである。種間で関与遺伝子が保存されていれば、カブトムシなどの大型の武器甲虫を用いた ChiP-seq 実験・プロテオミクス解析にも展望が開ける。これらのことから、複数の武器甲虫を組み合わせ、遺伝子の武器形成機能を比較・検証する「武器甲虫パイプライン」の構築が有効だと考えられる。

現在新たなモデル武器甲虫として、後脚の発達が高い栄養応答性を示す「モモブトハムシ(*Sagra femorata*)」についても *de novo* トランスクリプトーム解析を実施している。すでに HDAC 遺伝子をいくつか同定しているので、今後これらの解析を通じてより普遍的な武器形態の制御メカニズムの解明を目指していきたい。

8-2 形態形成における HDAC 遺伝子の機能

本研究では、武器形質の形態形成に HDAC の一種が重要な役割を果たすことが明らかになった。RNA-seq 解析によって、本種の 5 種類の HDAC 因子を同定した(図 2-10)。武器形質の形態形成は HDAC 阻害剤 TSA によって影響を受けるが、RNAi 実験によっても TSA の標的となるクラス I の HDAC1/2 と HDAC3 が大顎の形態に影響を示すことが示された(図 2-13,14)。興味深いことに、TSA 処理と同様に大顎のサイズ増大を示したのは HDAC3 のノックダウンだけであり、HDAC1/2 のノックダウンではサイズの縮小が認められた。TSA はクラス I と II の HDAC を幅広く抑制するので、TSA 処理では両者とも抑制されているはずである。しかるに TSA 処理で大顎の増大が認められたことから、サイズ決定には HDAC3 の寄与がかなり大きいことが予想される。今後は、

異なる HDAC 遺伝子を同時に複数ノックダウンするなどにより、遺伝子間の上下関係を調べることも重要であろう。なお、RNAi による発現抑制の効果は、おおむねどの HDAC にも有効（7 割から 2 割程度まで低減）であったが、HDAC4/5 では 89.7 %程度までの抑制に留まった。複数ノックダウン実験には、dsRNA の注入量や異なる領域の dsRNA を設計するなど、細部の調整を行うことが必要であろう。

また、RNAi 法は簡易的に行える一方で、その効果は全身性である。したがって、組織特異的な機能解析には、別の技術を導入する必要がある。近年、TALEN（Transcription activator-like effector nucleases）や CRISPR/Cas9（Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat/Cas9）などゲノム編集技術の発展が見られ、これらを用いてゲノム上の標的遺伝子のノックアウトやレポーター遺伝子のノックインなどが可能となっている(Barrangou, 2012; Joung and Sander, 2013)。これらの技術はモデル生物だけでなく、非モデル生物においても適応例が報告されている(Ikmi et al., 2014; Watanabe et al., 2012)。本種においてもこうしたゲノム編集技術を導入し、かつ条件的に作動させることにより、さらなる詳細な解析が可能となるであろう。

8-3 HDAC1/2 と HDAC3 遺伝子の機能

本研究の RNAi 実験で、クラス I の HDAC1/2 と HDAC3 が大顎の形態形成に機能することがわかった。両者の効果は前述の通り相反的で、HDAC1/2 RNAi では大顎の縮小がみられ、HDAC3 RNAi では大顎が増大した（図 2-13,14）。クラス I HDAC は、発生や細胞増殖などの機能することが知られている(De Ruijter et al., 2003; Gallinari et al., 2007; Minucci and Pelicci, 2006)。哺乳類において、HDAC1、HDAC2、HDAC3 の遺伝子欠損は胎生致死となる(Bhaskara et al., 2008; Lager et al., 2002; Montgomery et al., 2007; Montgomery et al., 2008)。またショウジョウバエでは、Rpd3

(HDAC1) と HDAC3 は恒常的に発現が見られ、特に胎生期と変態期には高い遺伝子発現を示す(Cho et al., 2005)。これらのことから HDAC1/2 と HDAC3 は武器形質の形態形成において、(おそらく互いに相反的な) 機能を持つことが考えられる。

武器形質では前蛹期に武器の成虫原基の急速な細胞増殖が見られる(Gotoh et al., 2011)。HDAC1 は細胞増殖に機能し、サイクリン依存キナーゼ抑制タンパク質 p21 の発現を抑制する。マウスの培養細胞を用いた研究において、HDAC1 の遺伝子欠損は p21 の発現上昇が見られ、細胞増殖能が低下する(Lagger et al., 2002)。HDAC1/2 RNAi でみられた大顎の縮小は、こうした HDAC1 の生物で広くみられる細胞増殖の機能を反映したものだと考えられる。

HDAC3 は他の HDAC 遺伝子とは異なる機能を持ち、HDAC3 の欠損は発生の異常や致死性を示す。骨軟骨前駆細胞において、HDAC3 は Phlpp1(PH Domain and Leucine-rich Repeat Phosphatase 1)の発現制御を介して、Akt/mTOR 経路を抑制する(Bradley et al., 2013; Razidlo et al., 2010)。Akt/mTOR 経路はインスリン経路の下流に位置しており、HDAC3 は栄養環境に応じた経路の活性制御に機能することが考えられる。

8-4 HDAC1/2、HDAC3 の部位特異性

HDAC1/2 と HDAC3 は前蛹期において全身で発現が確認されている(図 2-18A, B)。また、HDAC1/2 および HDAC3 の RNAi では頭部、胸部、腹部のいずれにおいても発現の抑制がみられた(図 2-18 A, B)。しかしながら、HDAC1/2 および HDAC3 の RNAi 実験では、その効果は大顎や頭部にのみ顕著に現れ、他の部位では大きな影響は見られなかった。これは HDAC の全身的発現・RNAi の全身的効果を考えると、きわめて注目すべき現象である。

HDAC の機能は多層的に制御されている。HDAC1/2 と HDAC3 は単体では酵素活性

を示さない(Gregoretto et al., 2004; Sengupta and Seto, 2004; Yang and Seto, 2003)。そのため、HDAC1/2 と HDAC3 は他の因子との複合体形成によって酵素活性をはじめ DNA やクロマチンとの結合部位能が獲得される(Alland et al., 2002; Grozinger and Schreiber, 2002; Zhang et al., 1999)。HDAC1/2 は複合体 CoREST、Sin3、NuRD、NODE、MiDAC と複合体を形成し、HDAC3 は NCoR/SMRT と複合体を形成する(Guenther et al., 2001; Guenther et al., 2002)。さらに、HDAC は翻訳後修飾を受け、リン酸化、アセチル化、ユビキチン化などが酵素活性や複合体形成能が制御されている(Segré and Chiocca, 2010; Wolfson et al., 2013)。例えば、HDAC1/2 と HDAC3 は CK2(Casein Kinase 2)によってリン酸化によって酵素活性や複合体形成能が上昇する(Pflum et al., 2001; Tsai and Seto, 2002)。したがって、武器形質において、HDAC1/2 および HDAC3 が、これら相互作用因子によって特定の「武器形成遺伝子」の転写機械にリクルートされ、前蛹期においてはこれらの遺伝子のみに特異的に作用している可能性がある。

これとあわせて重要な点は、大顎のサイズ決定期は終齢期から前蛹期の限られた期間であり、この時期の栄養条件に大顎が特異的に影響を受けることである。HDAC などのエピゲノム制御因子は他の器官形成にも重要である。たとえば、哺乳類においては HDAC1、HDAC2、HDAC3 の遺伝子欠損は胎生致死となる(Bhaskara et al., 2008; Lagger et al., 2002; Montgomery et al., 2007; Montgomery et al., 2008)。ではなぜ、前蛹期での HDAC ノックダウンが大顎サイズにだけ影響を示すのであろうか。一つの可能性としては、本種の大顎サイズ決定の臨界期にいたっては、HDAC の標的が大顎の形態形成に関わる遺伝子群などきわめて限定的なものに限られている可能性が高いのではなかろうか。

ワディントンの「エピジェネティック・ランドスケープ」でも提唱されているように、発生・分化の各段階で細胞毎に異なるエピゲノム制御が生じ、細胞運命の分岐が生じる

ことが推測される。したがって、同じエピゲノム制御因子でも発生の前半と後半では異なる役割を果たすことが期待される。実際、セイヨウミツバチでは、卵期での DNMT (DNA methyltransferase) 3 の阻害は致死となるが、幼虫期での阻害はカースト分化 (女王形成) にのみ影響が現れる (Kucharski et al., 2008)。

以上から、成虫の基本的なボディープランは、発生初期に栄養環境に依らず確立される頑健さを持つのに対し、性選択形質やカースト (社会性昆虫の階級) といった環境影響を受けやすい表現型は発生後期に限定的に取り残されて決定される可能性がある。このような機構を通じて、武器形質などの可塑性の高い表現型が、発生の比較的后半で環境の影響を受けながら決定され、個体群における表現型の多様性が生み出されているのかも知れない。

この仮説を検証するためには、前蛹期以外の段階で HDAC のノックダウンを行い、その影響を詳しく解析することが重要である。本研究においては、大顎の形態形成に焦点を絞ったため、その発達期の前蛹期にのみ解析を行った。今後は、種々の発生段階での RNAi 実験を行い、この考えの妥当性を検証していく予定である。

8-5 武器形成に関わる因子

武器形成は栄養応答機能を持ち、さらには雌雄間で発現が異なる性的二型の形質である。そこで、比較トランスクリプトーム解析を用いて、栄養条件間や雌雄間の遺伝子発現プロファイルを比較し、武器形成に機能する遺伝子の同定を行った。遺伝子発現プロファイルの比較では、幼虫期と前蛹期で明確に異なる傾向を示し、さらには栄養条件間や雌雄間でも分かれる傾向を示した (図 2-19)。この結果は、発生段階、雌雄、栄養条件が、実際に遺伝子発現パターンに大きく影響することを示した。

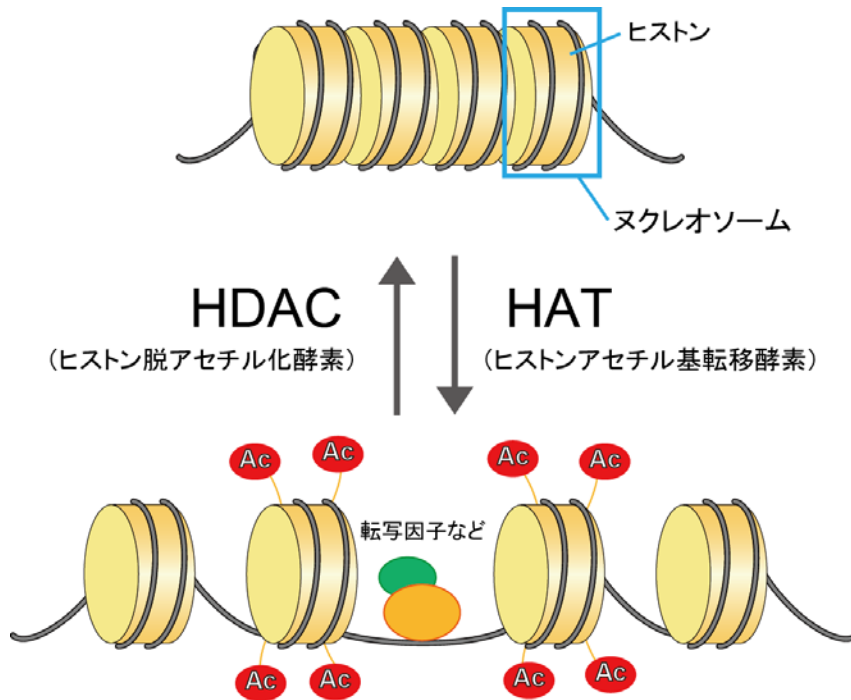
本研究では、栄養環境と武器形成過程に着目し、オスの栄養条件間の発現変動遺伝子を調べた。前蛹前期、前蛹中期における栄養条件間の発現変動上位 50 因子の選び、武

器形成に関与する既知の因子として、インスリン経路の FRAP (mTOR) が含まれた (図 2-21)。さらに、HDAC ファミリー遺伝子とインスリン経路因子について栄養条件間での発現変動を調べた。HDAC1/2 は発現変動が見られなかった。HDAC3 は前蛹前期において発現変動が見られた。インスリン経路因子では、インスリン受容体 (InR) は発現変動が見られず、Emlen らのカブトムシの先行研究の結果と合致した (Emlen et al., 2012)。栄養下流の因子として FRAP(mTOR)、RAPTOR、RICTOR、IRS1 が発現変動を示すことが分かり、武器形成におけるインスリン経路の栄養応答性において重要な知見を得たと言える。

上記の通り、HDAC やインスリン経路因子の栄養応答性が、武器形態の応答性に寄与する可能性が高い。しかしながら、これらの因子は翻訳後修飾など多層的に制御を受けることが知られており、さらなる分子レベルの解析が必要である。インスリン経路の一部因子の RNAi スクリーニングでは、これまでに InR、FRAP(mTOR)、RAPTOR が大顎に影響が見られた (図 2-23)。InR はカブトムシにおいて武器形質のサイズ制御を行うことが知られており、本種においても同様の制御機構の存在が示唆された。さらにインスリン経路の下流因子の機能について初めて明らかにし、武器形成経路について重要な知見を得たと言える。

このように本研究では、次世代シーケンサーや遺伝子機能解析手法の RNAi 法を組み合わせた非モデル生物の新たな分子発生的実験系を確立することに成功した。この分子実験系を用い、武器形質の形態形成に HDAC が関与することを初めて明らかにし、表現型可塑性とエピゲノム機構の重要性が示されたことになる。さらに、武器形成過程の栄養応答遺伝子やインスリン経路/mTOR 経路の各因子の機能について初めて明らかにし、武器形成経路について重要な知見を得たと言える。今後は、武器形成経路を始め、生物に広く備わる環境と表現型可塑性の制御メカニズムの解明を目指していきたい。

A



B

Class	Human	<i>D. melanogaster</i>	<i>T. castaneum</i>	<i>A. mellifera</i>
Class I	HDAC1	DHDAC1	HDAC1/2	HDAC1
	HDAC2			
	HDAC3	DHDAC3	HDAC3	HDAC3
	HDAC8			
Class II	HDAC4	DHDAC4	HDAC4/5	HDAC4
	HDAC5			
	HDAC6	DHDAC2	HDAC6/10	HDAC6
	HDAC7			
	HDAC9			
	HDAC10			
Class III	SIRT1-7	SIRT1,2,4,6,7	SIRT1,2,4,5,6,7	SIRT1,2,4,5,6,7
Class IV	HDAC11	HDACX	HDAC11	

図 2-1 ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC)

(A) ヒストン脱アセチル化酵素とヒストンアセチル化酵素によるヒストンアセチル化修飾によるクロマチン構造変換の模式図。

(B) ヒトおよび昆虫類におけるヒストン脱アセチル化酵素の分類。

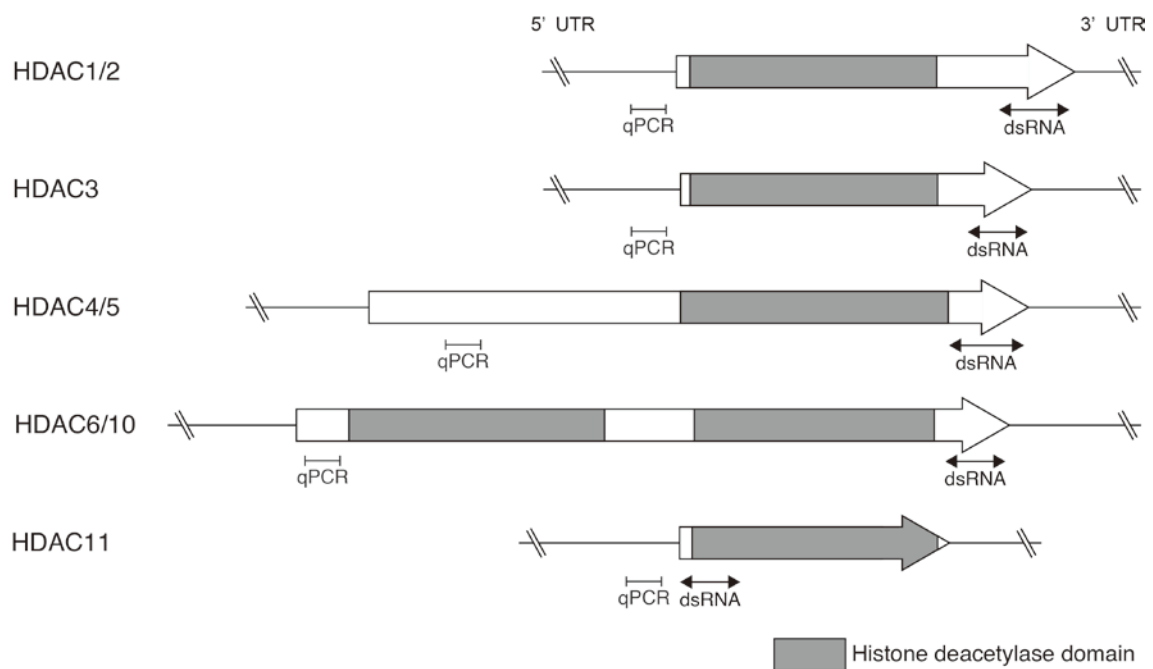


図 2-2 HDAC の RNAi のおよびリアルタイム PCR に用いたプライマー設計部位の概略図

RNAi の dsRNA のプライマーの設計部位のは dsRNA、リアルタイム PCR のプライマーの設計部位は qPCR として図中に示した。

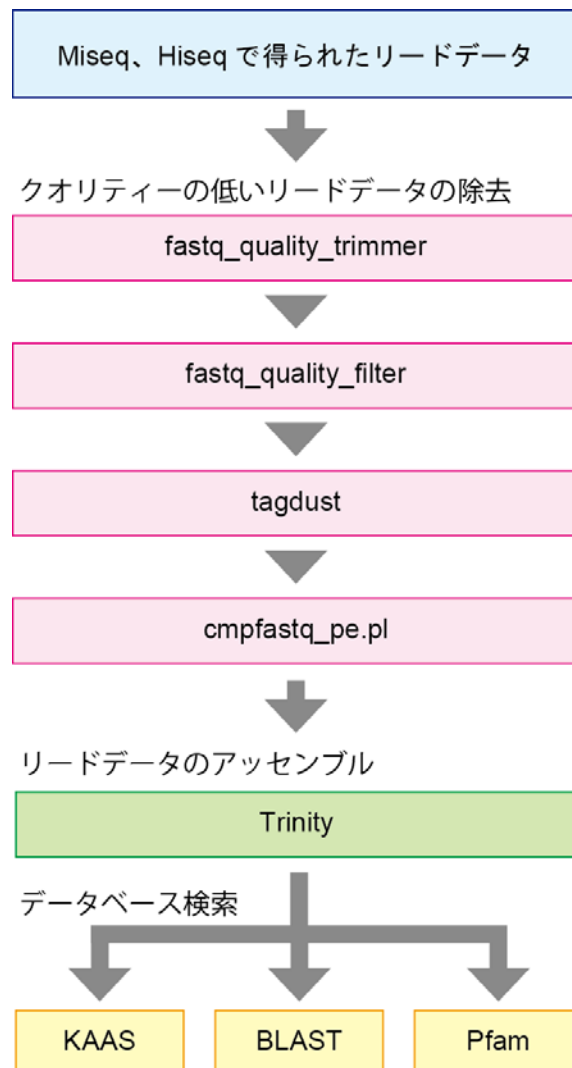


図 2-3 de novo トランスクリプトーム解析のフローチャート

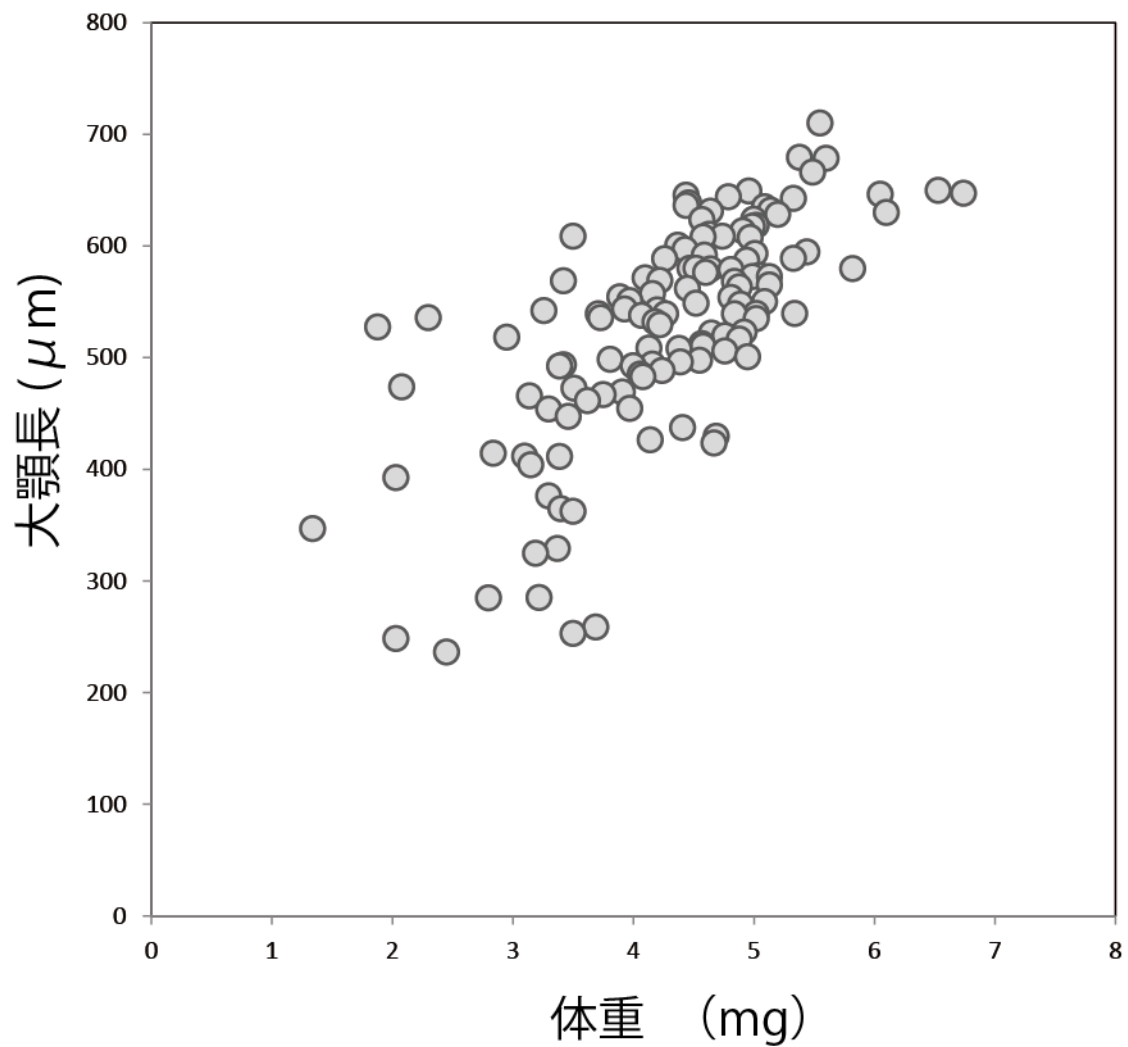


図 2-4 成虫の大顎長と終齢幼虫の体重の散布図

横軸に終齢幼虫の体重 (mg)、縦軸にオス成虫の大顎長 (μm) を取り、散布図中のプロットは各個体の計測結果を示す。サンプルサイズは $n=115$ を用いた。

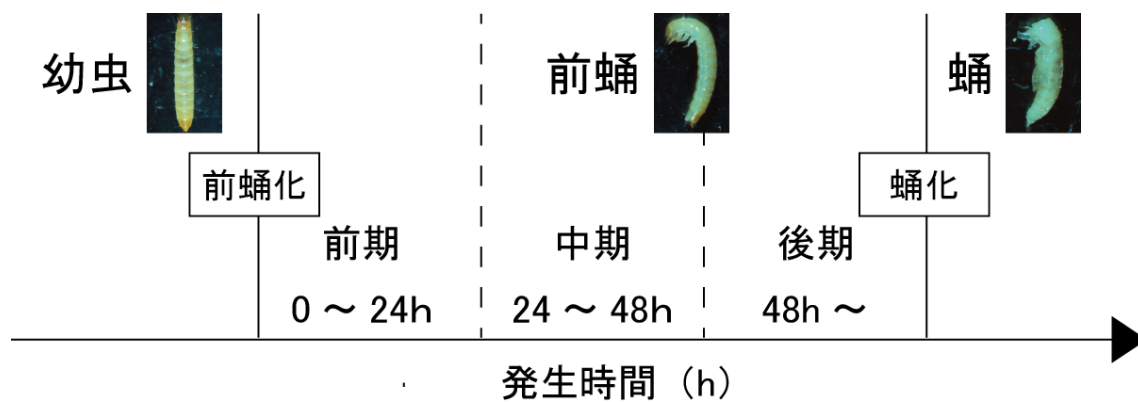


図 2-5 栄養条件間の比較トランスクリプトーム解析における発生段階の設定

前蛹期は約 3 日間であるため、前蛹化 0~24 時間後を前蛹前期、24~48 時間後を中期、48 時間以降を後期と設定した。解析には、幼虫期、前蛹前期、前蛹中期を用いた。

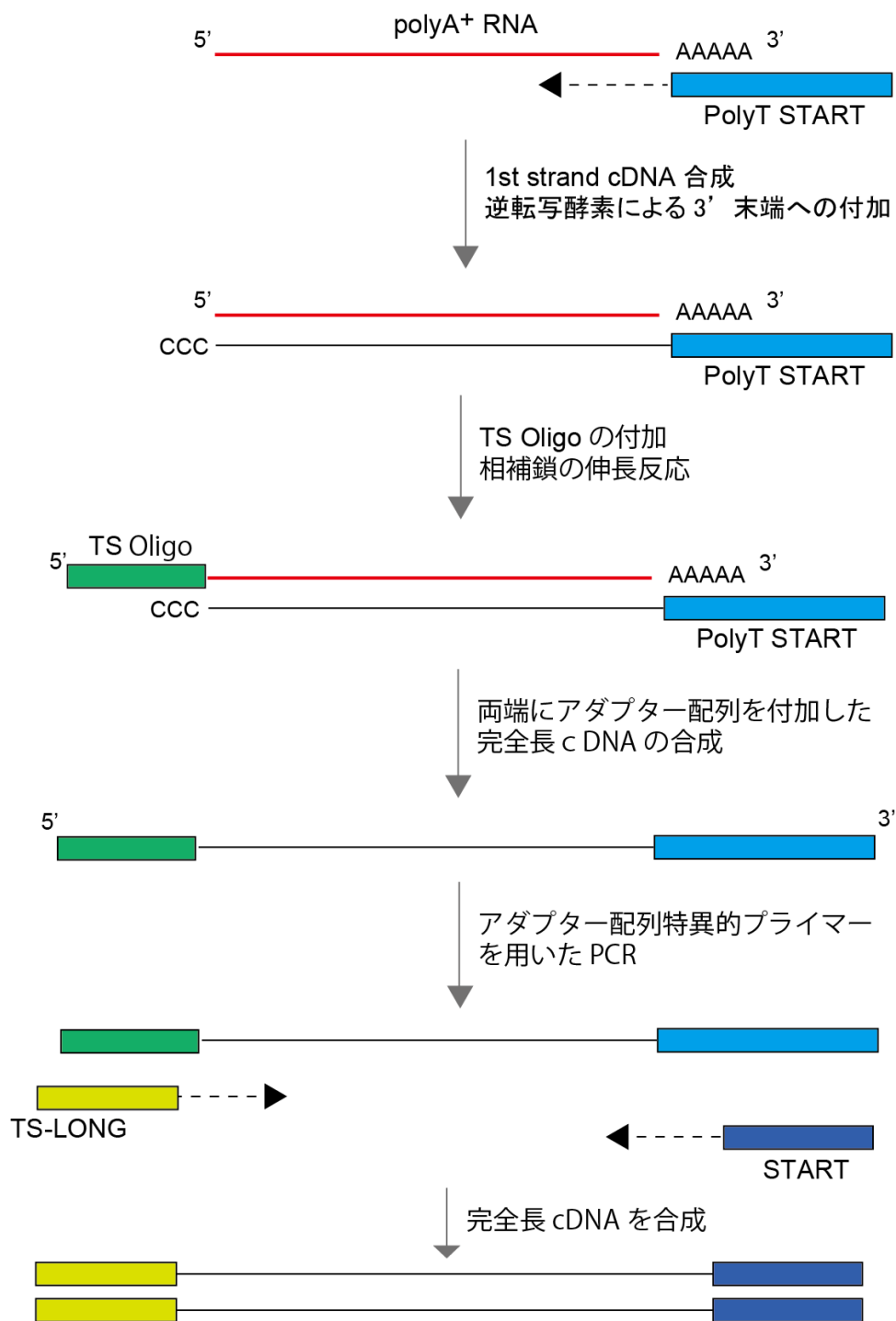


図 2-6 テンプレートスイッチング法の概略図

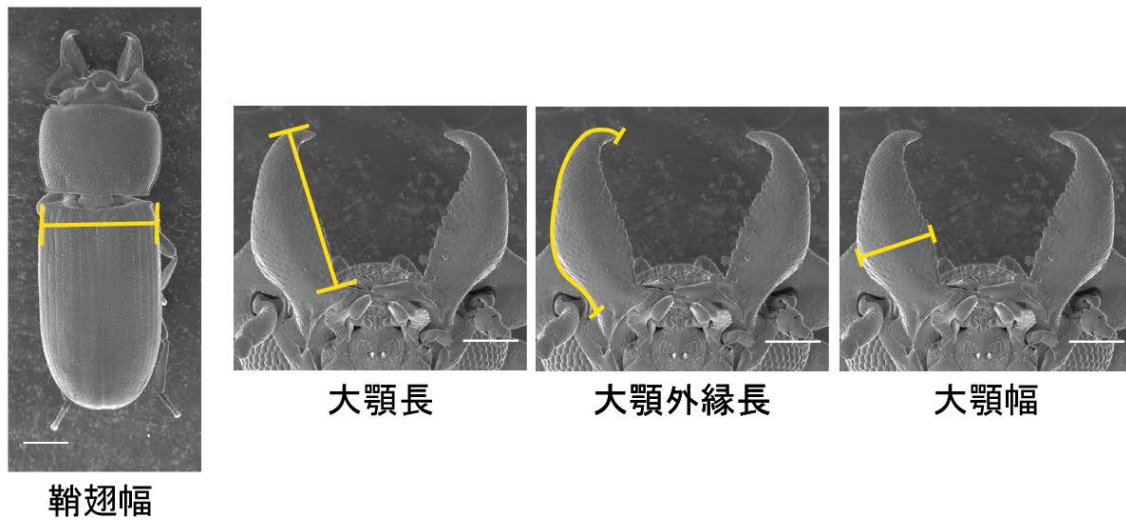


図 2-7 オス成虫の形態計測部位

各測定部位を図中に示した。鞘翅幅は背型の部位を測定した。大顎長は大顎の根本から先端までの図中に示した部位を測定した。大顎外縁長は大顎の根本から先端までの外縁に沿った部位を測定した。大顎幅は大顎幅が最大となる部位を測定した。

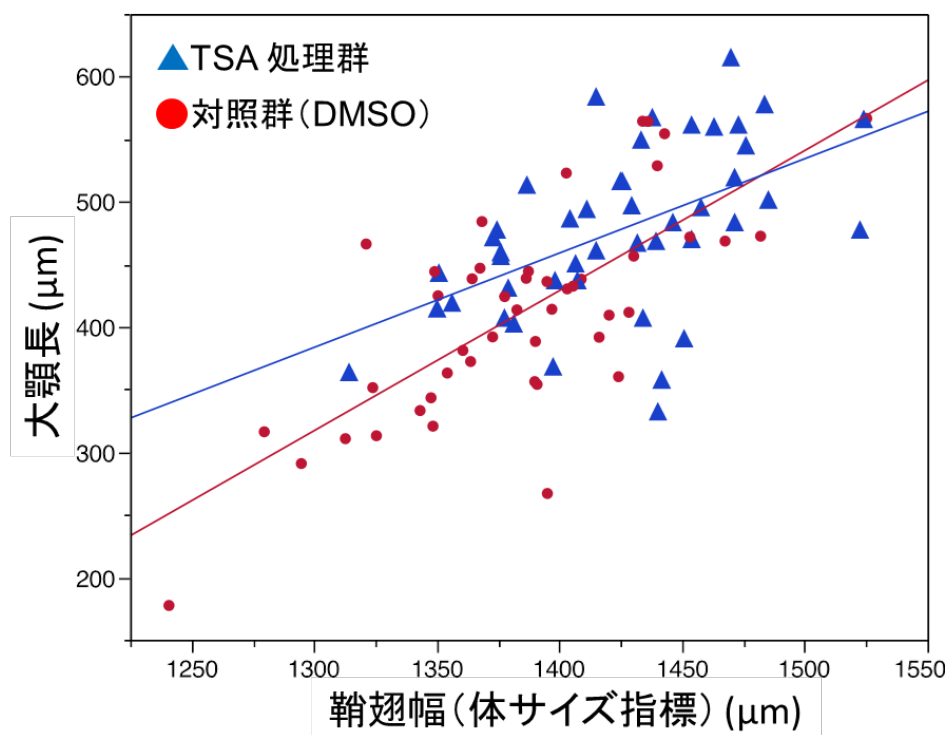


図 2-8 エピジェネティック因子阻害薬剤 (TSA) のオス成虫の大顎形態への影響

TSA のオス成虫の大顎形態への影響を調べた。対照に DMSO を用いた。各処理群のオス成虫の大顎長と鞘翅幅をそれぞれ計測した。散布図中の▲は TSA 処理群、●は DMSO 処理群の各個体の計測結果を示し、青および赤の直線は各処理群の近似直線を示す両群において、鞘翅幅 (体サイズ) に対する相対的な大顎長を処理区間で比較した結果、有意差が認められた (ANCOVA, 処理の効果: $F=4.421$, $P<0.05$; 処理 \times 体サイズの効果: $F=2.221$, $P=0.139$)。



GFP RNAi



Proboscipedia
RNAi

図 2-9 *Proboscipedia* RNAi のオス成虫の頭部形態への影響

RNAi による成虫形態への影響を調べた。GFP RNAi (対照) と *Proboscipedia* RNAi 処理をしたオス成虫の頭部腹側をそれぞれ示した。図中のスケールバーは 200 μm を示した。

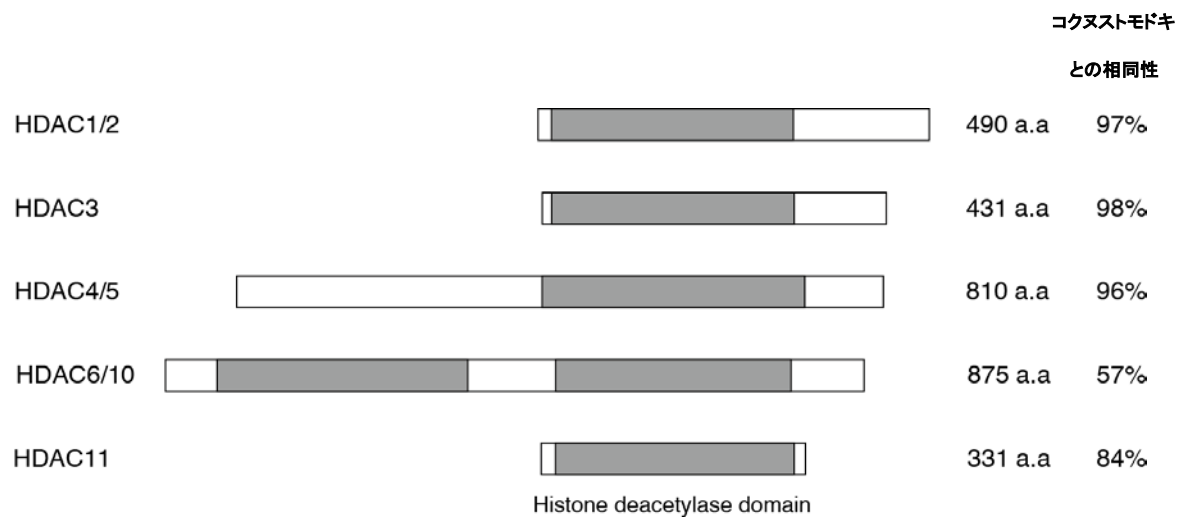


図 2-10 オオツノコクヌストモドキの HDAC ファミリータンパク質の略図

灰色で示した四角はヒストン脱アセチル化酵素ドメイン (Histone deacetylase domain) を示した。

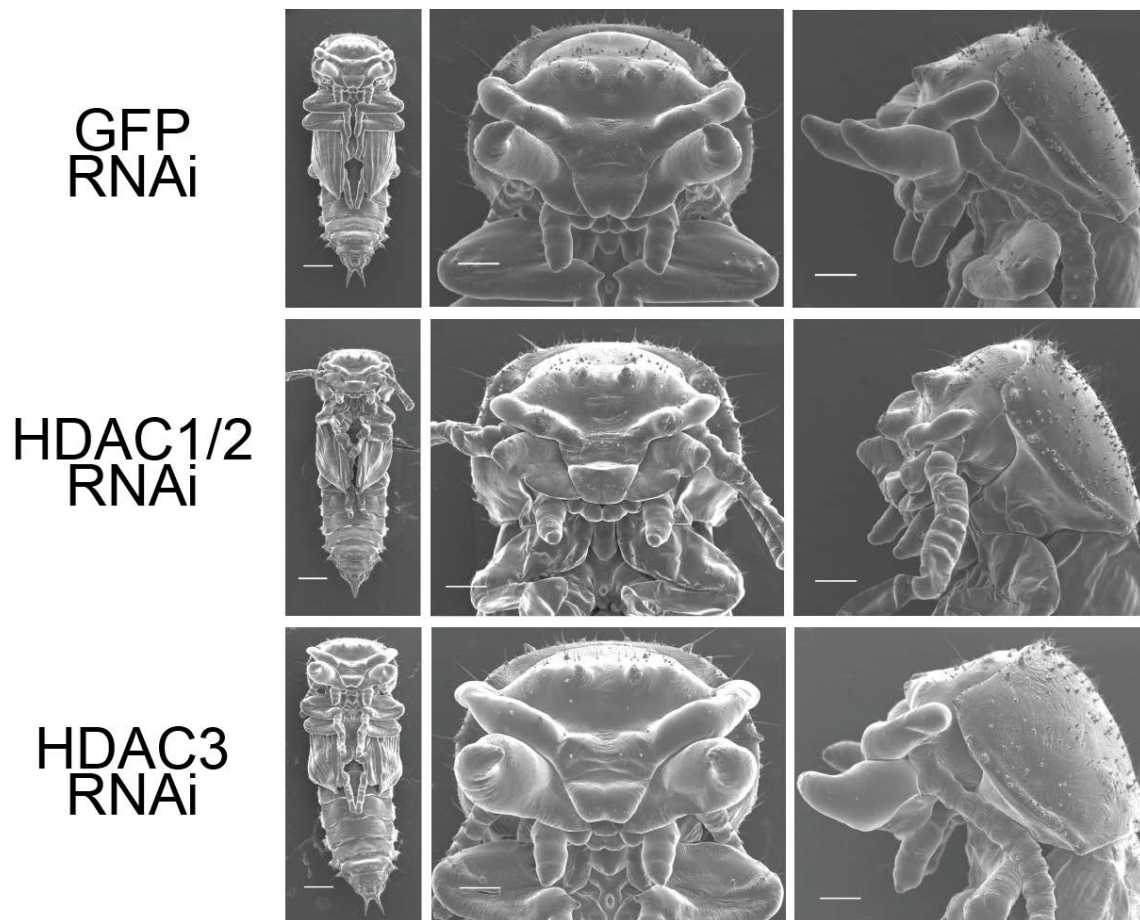


図 2-11 HDAC1/2 RNAi、HDAC3 RNAi による蛹形態への影響

GFP RNAi (対照)、HDAC1/2 RNAi、HDAC3 RNAi の蛹の形態について、左に全身、中央に頭部正面、右に頭部側面をそれぞれ示した。スケールバーは、全身で 500 μm 、頭部正面および側面で 200 μm を示した。

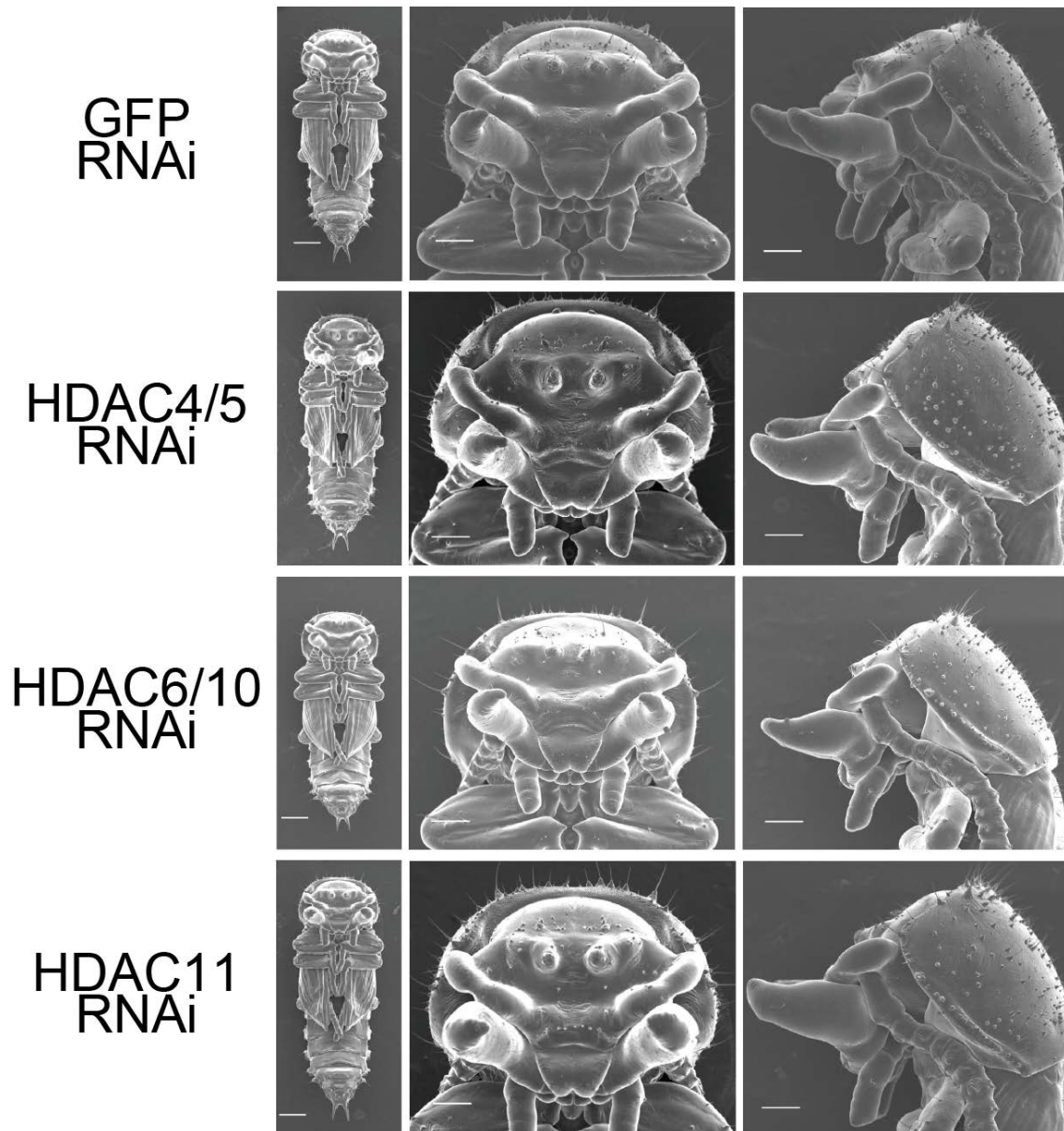
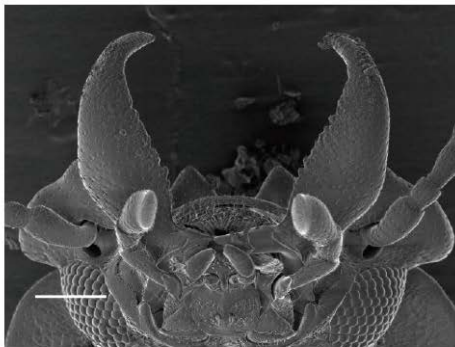


図 2-12 HDAC4/5 RNAi、HDAC6/10 RNAi、HDAC11 RNAi による蛹形態への影響
GFP RNAi (対照)、HDAC4/5 RNAi、HDAC6/10 RNAi、HDAC11 RNAi の蛹の形態
について、左に全身、中央に頭部正面、右に頭部側面をそれぞれ示した。スケールバー
は、全身で 500 μ m、頭部正面および側面で 200 μ m を示した。

A

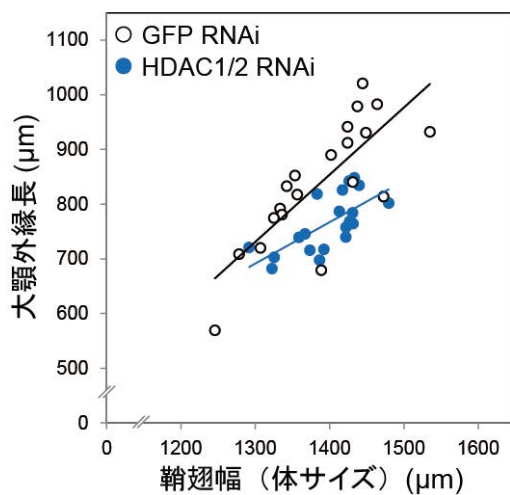


GFP RNAi



HDAC1/2 RNAi

B



C

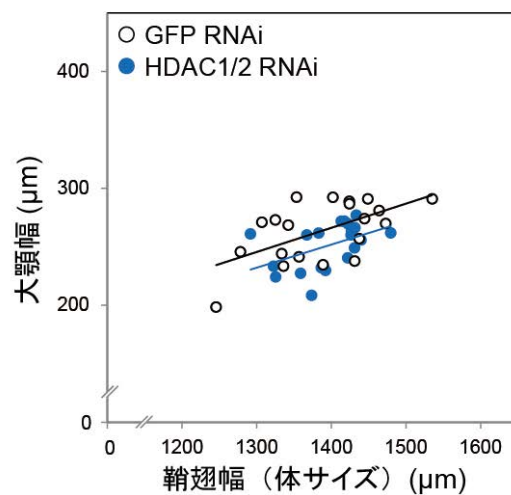


図 2-13 HDAC1/2 RNAi によるオス成虫の大顎形態への影響

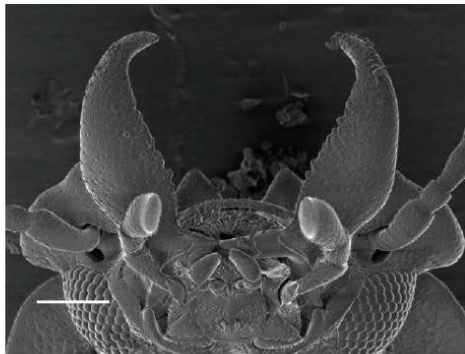
(A) GFP RNAi (対照) と HDAC1/2 RNAi 処理をしたオス成虫の頭部腹側をそれぞれ示した。図中のスケールバーは 200 μm を示した。

(B.C) HDAC1/2 RNAi のオス成虫の大顎形態への影響を調べた。対照に GFP RNAi を用いた。サンプル数はそれぞれ $n=20$ を用いた。

(B) 各処理群のオス成虫の大顎外縁長と鞘翅幅をそれぞれ計測した。散布図中の●は HDAC1/2 RNAi 群、○は GFP RNAi 群の各個体の計測結果を示し、青および黒の直線は各処理群の大顎サイズの体サイズに対する回帰直線を示す。両群において、鞘翅幅(体サイズ)に対する相対的な大顎外縁長を処理区間で比較した結果、有意差が認められた (ANCOVA, 処理の効果: $F=20.28$, $P<0.001$; 処理 \times 体サイズの効果: $F=1.918$, $P=0.175$)。 (次ページに続く)

(C) 各処理群のオス成虫の大顎幅と鞘翅幅をそれぞれ計測した。散布図中の●は HDAC1/2 RNAi 群、○は GFP RNAi 群の各個体の計測結果を示し、青および黒の直線は各処理群の大顎サイズの体サイズに対する回帰直線を示す。両群において、鞘翅幅(体サイズ)に対する相対的な大顎幅を処理区間で比較した結果、有意差が認められた (ANCOVA, 処理の効果 : $F=5.316$, $P<0.001$; 処理 x 体サイズの効果: $F=0.007$, $P=0.934$)。

A

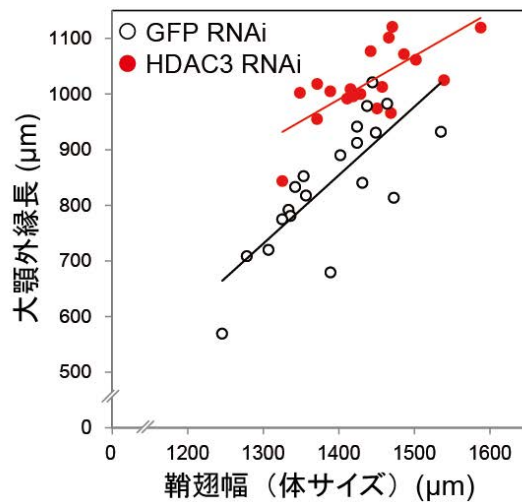


GFP RNAi



HDAC3 RNAi

B



C

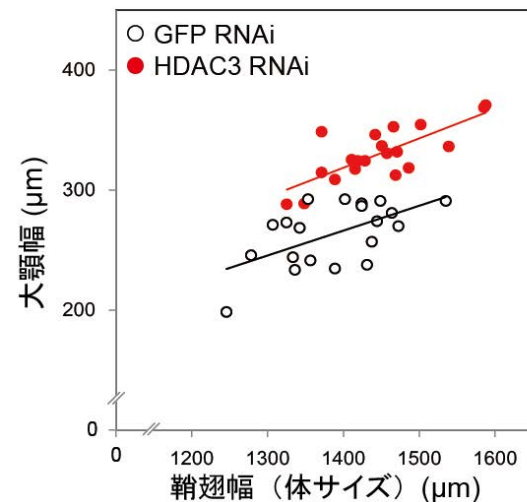


図 2-14 HDAC3 RNAi によるオス成虫の大顎形態への影響

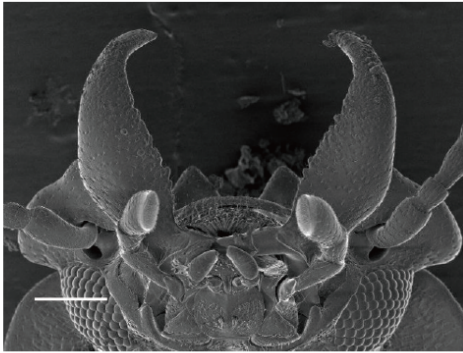
(A) GFP RNAi (対照) と HDAC3 RNAi 処理をしたオス成虫の頭部腹側をそれぞれ示した。図中のスケールバーは 200 μm を示した。

(B.C) HDAC3 RNAi のオス成虫の大顎形態への影響を調べた。対照に GFP RNAi を用いた。サンプル数はそれぞれ $n=20$ を用いた。

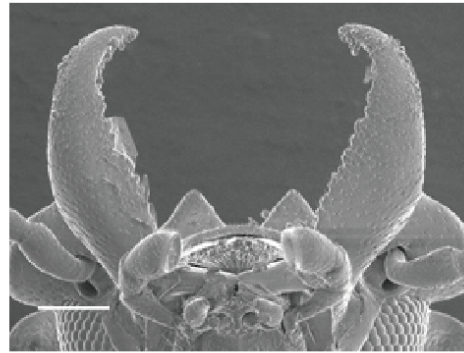
(B) 各処理群のオス成虫の大顎外縁長と鞘翅幅をそれぞれ計測した。散布図中の●は HDAC3 RNAi 群、○は GFP RNAi 群の各個体の計測結果を示し、赤および黒の直線は各処理群の大顎サイズの体サイズに対する回帰直線を示す。両群において、鞘翅幅(体サイズ)に対する相対的な大顎外縁長を処理区間で比較した結果、有意差が認められた (ANCOVA, 処理の効果: $F=34.394$, $P<0.001$; 処理 \times 体サイズの効果: $F=2.561$, $P=0.118$)。 (次ページに続く)

(C) 各処理群のオス成虫の大顎幅と鞘翅幅をそれぞれ計測した。散布図中の●は HDAC3 RNAi 群、○は GFP RNAi 群の各個体の計測結果を示し、赤および黒の直線は各処理群の大顎サイズの体サイズに対する回帰直線を示す。両群において、鞘翅幅(体サイズ)に対する相対的な大顎幅を処理区間で比較した結果、有意差が認められた (ANCOVA, 処理の効果: $F=7.023$, $P<0.001$; 処理 x 体サイズの効果: $F=0.205$, $P=0.653$)。

A

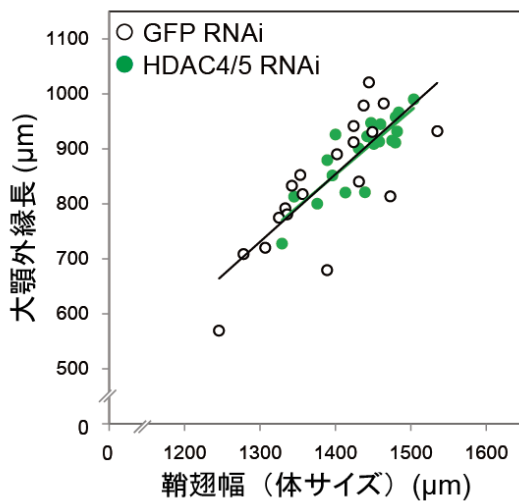


GFP RNAi



HDAC4/5 RNAi

B



C

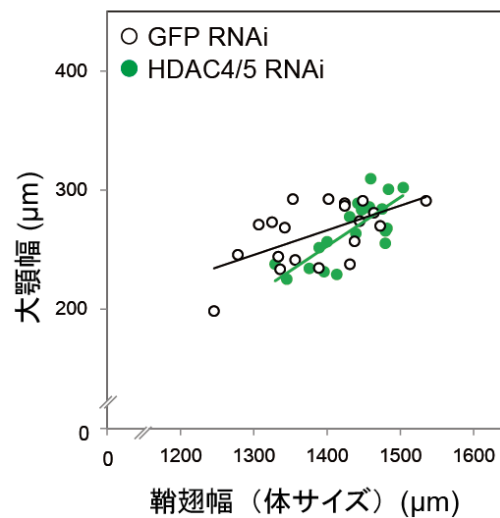


図 2-15 HDAC4/5 RNAi によるオス成虫の大顎形態への影響

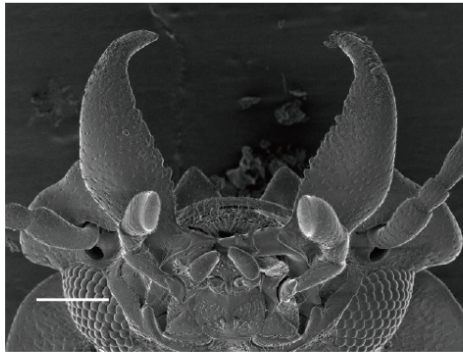
(A) GFP RNAi (対照) と HDAC4/5 RNAi 処理をしたオス成虫の頭部腹側をそれぞれ示した。図中のスケールバーは 200 μm を示した。

(B.C) HDAC4/5 RNAi のオス成虫の大顎形態への影響を調べた。対照に GFP RNAi を用いた。サンプル数はそれぞれ $n=20$ を用いた。

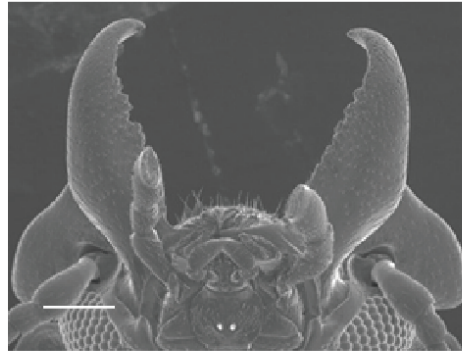
(B) 各処理群のオス成虫の大顎外縁長と鞘翅幅をそれぞれ計測した。散布図中の●は HDAC4/5 RNAi 群、○は GFP RNAi 群の各個体の計測結果を示し、緑および黒の直線は各処理群の大顎サイズの体サイズに対する回帰直線を示す。両群において、鞘翅幅 (体サイズ) に対する相対的な大顎外縁長を処理区間で比較した結果、有意差が認められなかった (ANCOVA, 処理の効果: $F=0.015$, $P=0.904$; 処理 \times 体サイズの効果: $F=0.037$, $P=0.849$)。 (次ページに続く)

(C) 各処理群のオス成虫の大顎幅と鞘翅幅をそれぞれ計測した。散布図中の●は HDAC4/5 RNAi 群、○は GFP RNAi 群の各個体の計測結果を示し、緑および黒の直線は各処理群の大顎サイズと体サイズに対する回帰直線を示す。両群において、鞘翅幅（体サイズ）に対する相対的な大顎幅を処理区間で比較した結果、有意差が認められなかった（ANCOVA, 処理の効果: $F=1.858$, $P=0.181$; 処理 x 体サイズの効果: $F=3.343$, $P=0.076$ ）。

A

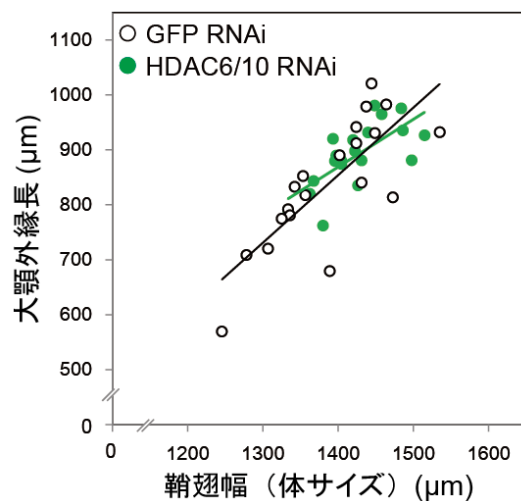


GFP RNAi



HDAC6/10 RNAi

B



C

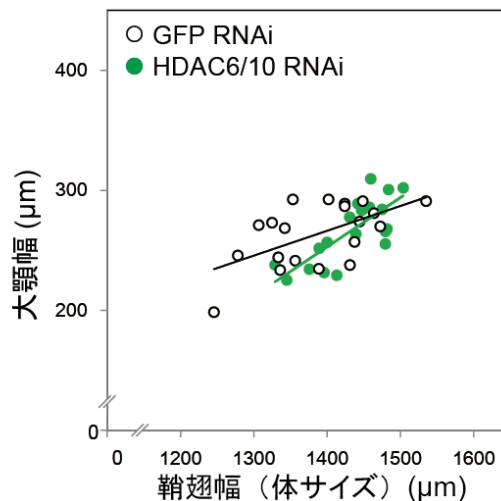


図 2-16 HDAC6/10 RNAi によるオス成虫の大顎形態への影響

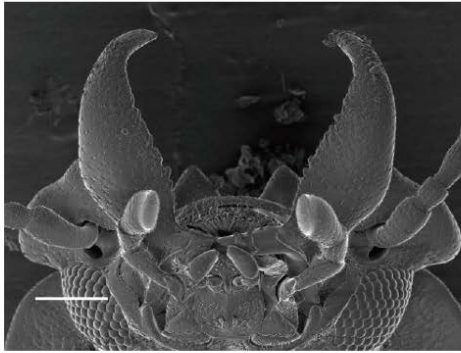
(A) GFP RNAi (対照) と HDAC4/5 RNAi 処理をしたオス成虫の頭部腹側をそれぞれ示した。図中のスケールバーは 200 μm を示した。

(B,C) HDAC6/10 RNAi のオス成虫の大顎形態への影響を調べた。対照に GFP RNAi を用いた。サンプル数はそれぞれ $n=20$ を用いた。

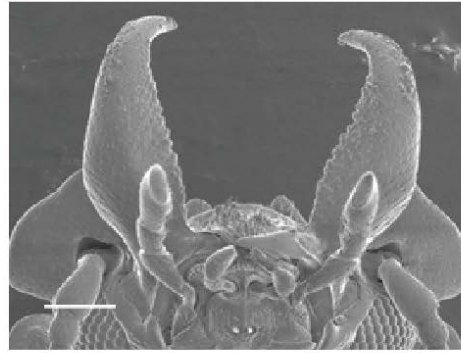
(B) 各処理群のオス成虫の大顎外縁長と鞘翅幅をそれぞれ計測した。散布図中の●は HDAC6/10 RNAi 群、○は GFP RNAi 群の各個体の計測結果を示し、緑および黒の直線は各処理群の大顎サイズの体サイズに対する回帰直線を示す。両群において、鞘翅幅 (体サイズ) に対する相対的な大顎外縁長を処理区間で比較した結果、有意差が認められなかった (ANCOVA, 処理の効果: $F=0.270$, $P=0.606$; 処理 \times 体サイズの効果: $F=1.108$, $P=0.229$)。 (次ページに続く)

(C) 各処理群のオス成虫の大顎幅と鞘翅幅をそれぞれ計測した。散布図中の●は HDAC6/10 RNAi 群、○は GFP RNAi 群の各個体の計測結果を示し、緑および黒の直線は各処理群の大顎サイズの体サイズに対する回帰直線を示す。両群において、鞘翅幅（体サイズ）に対する相対的な大顎幅を処理区間で比較した結果、有意差が認められなかった (ANCOVA, 処理の効果: $F=0.435$, $P=0.513$; 処理 \times 体サイズの効果: $F=0.002$, $P=0.967$)。

A

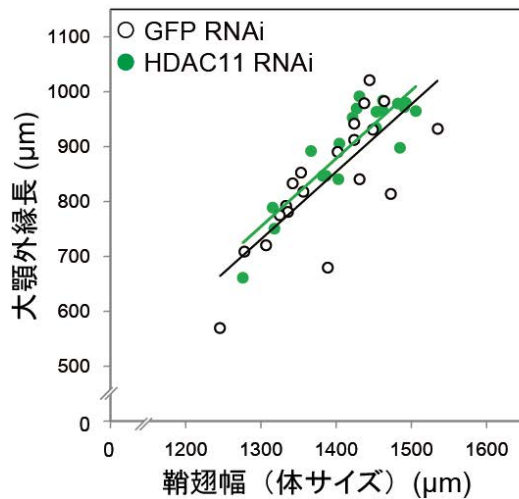


GFP RNAi



HDAC11 RNAi

B



C

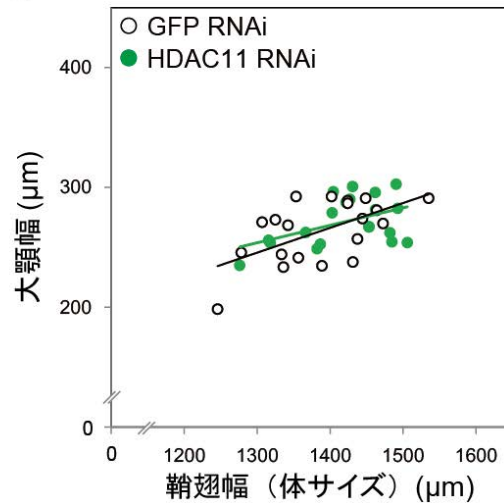


図 2-17 HDAC11 RNAi によるオス成虫の大顎形態への影響

(A) GFP RNAi (対照) と HDAC4/5 RNAi 処理をしたオス成虫の頭部腹側をそれぞれ示した。図中のスケールバーは 200 μm を示した。

(B,C) HDAC11 RNAi のオス成虫の大顎形態への影響を調べた。対照に GFP RNAi を用いた。サンプル数はそれぞれ $n=20$ を用いた。

(B) 各処理群のオス成虫の大顎外縁長と鞘翅幅をそれぞれ計測した。散布図中の●は HDAC11 RNAi 群、○は GFP RNAi 群の各個体の計測結果を示し、緑および黒の直線は各処理群の大顎サイズの体サイズに対する回帰直線を示す。両群において、鞘翅幅(体サイズ)に対する相対的な大顎外縁長を処理区間で比較した結果、有意差が認められなかった (ANCOVA, 処理の効果: $F=1.597$, $P=0.214$; 処理 \times 体サイズの効果: $F=0.001$, $P=0.972$)。 (次ページに続く)

(C) 各処理群のオス成虫の大顎幅と鞘翅幅をそれぞれ計測した。散布図中の●は HDAC11 RNAi 群、○は GFP RNAi 群の各個体の計測結果を示し、緑および黒の直線 は各処理群の大顎サイズの体サイズに対する回帰直線を示す。両群において、鞘翅幅 (体サイズ) に対する相対的な大顎幅を処理区間で比較した結果、有意差が認められなかった (ANCOVA, 処理の効果: $F=0.082$, $P=0.776$; 処理 x 体サイズの効果: $F=0.420$, $P=0.521$)。

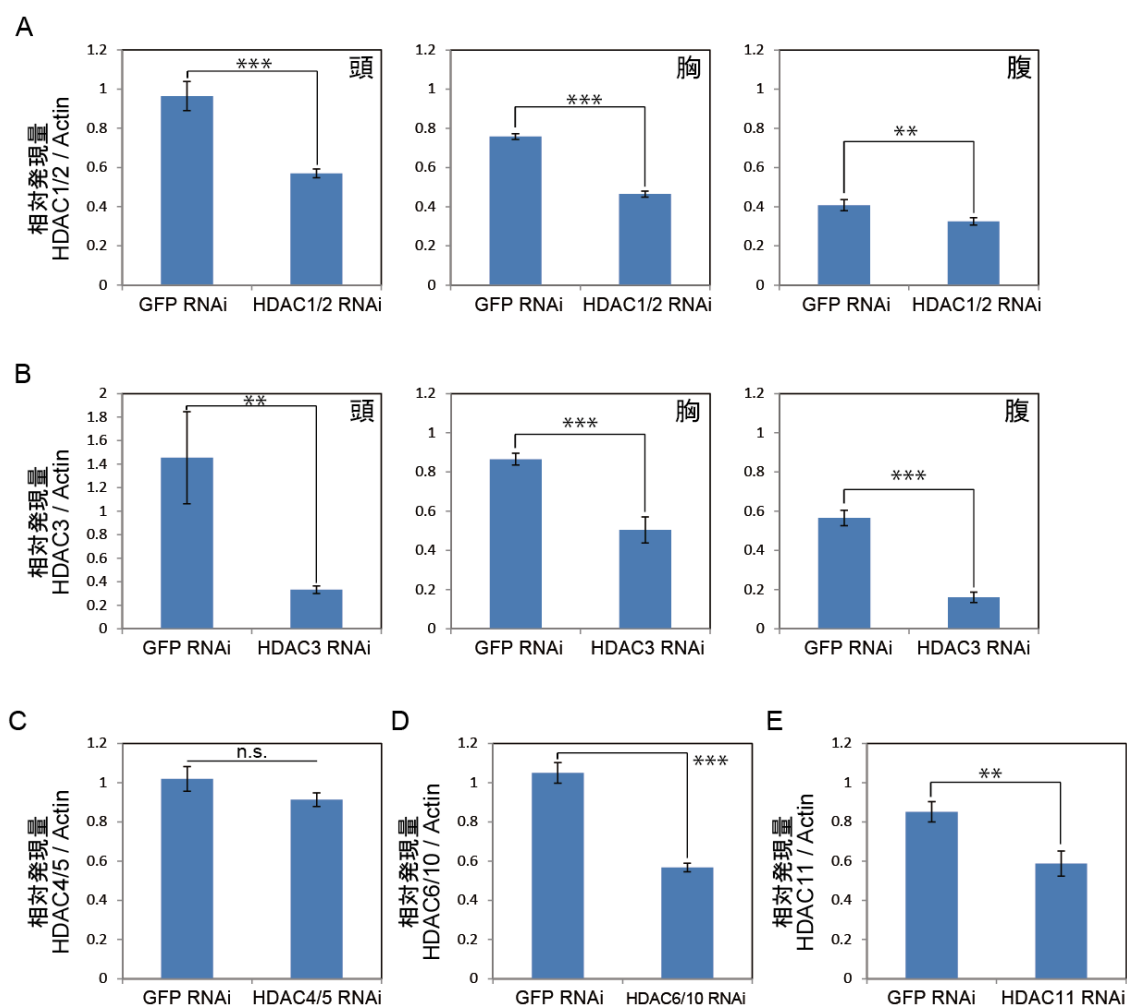


図 2-18 HDAC 遺伝子の RNAi による遺伝子発現量への影響

マイクロインジェクション 4 日後の前蛹期の個体を用い、Actin 遺伝子に対する各 HDAC 遺伝子の相対発現量の平均値と標準誤差を示した。GFP RNAi を対照とし、各 HDAC RNAi と t 検定を行った。検定結果は図中に、*** : $P < 0.001$ 、** : $P < 0.01$ 、n.s. : not significant、として表記した。

(A,B) HDAC1/2 RNAi と HDAC3 RNAi の各遺伝子の発現への影響を頭、胸、腹の 3 部位を調べた。サンプル数はそれぞれ、 $n=6$ (頭:GFP)、8 (胸:GFP)、8 (腹:GFP)、8 (頭:HDAC1/2)、8 (胸:HDAC1/2)、8 (腹:HDAC1/2)、8 (頭:HDAC3)、8 (胸:HDAC3)、7 (腹:HDAC3) を用いた。

(C,D,E) HDAC4/5 RNAi、HDAC6/10 RNAi、HDAC11 RNAi の各 HDAC 遺伝子の頭での発現への影響を調べた。サンプル数はそれぞれ、 $n=8$ (頭:GFP)、7 (頭:HDAC4/5)、8 (頭:HDAC6/10)、7 (頭:HDAC11) を用いた。

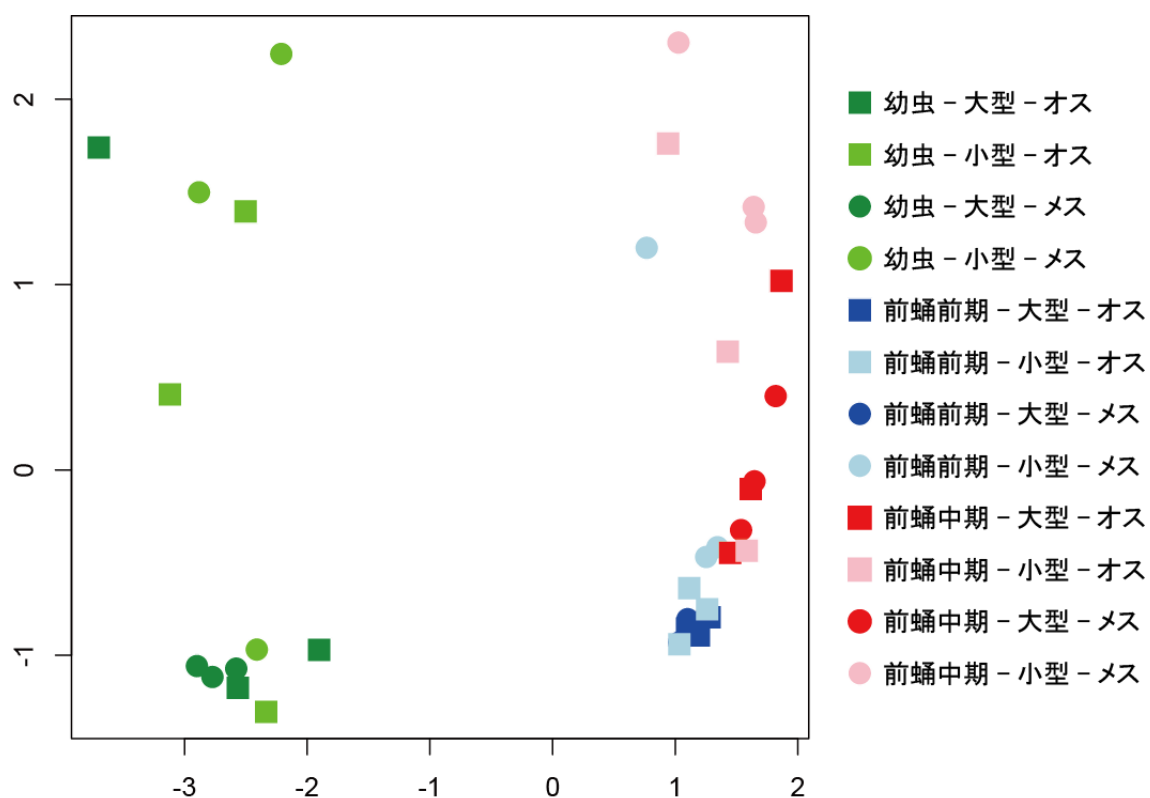


図 2-19 発生段階、栄養条件、雌雄における遺伝子発現プロファイルの二次元化表示
 多次元尺度構成法を用いて各カテゴリーの遺伝子発現プロファイルを 2 次元に表現し、類似度を比較した。同一カテゴリーのサンプルはそれぞれ $n=3$ の生物学的反復をもつ。
 横軸、縦軸は Multi Dimension Scaling (MDS) dimension1, MDS dimension2 (多次元尺度第一次元、第二次元)。

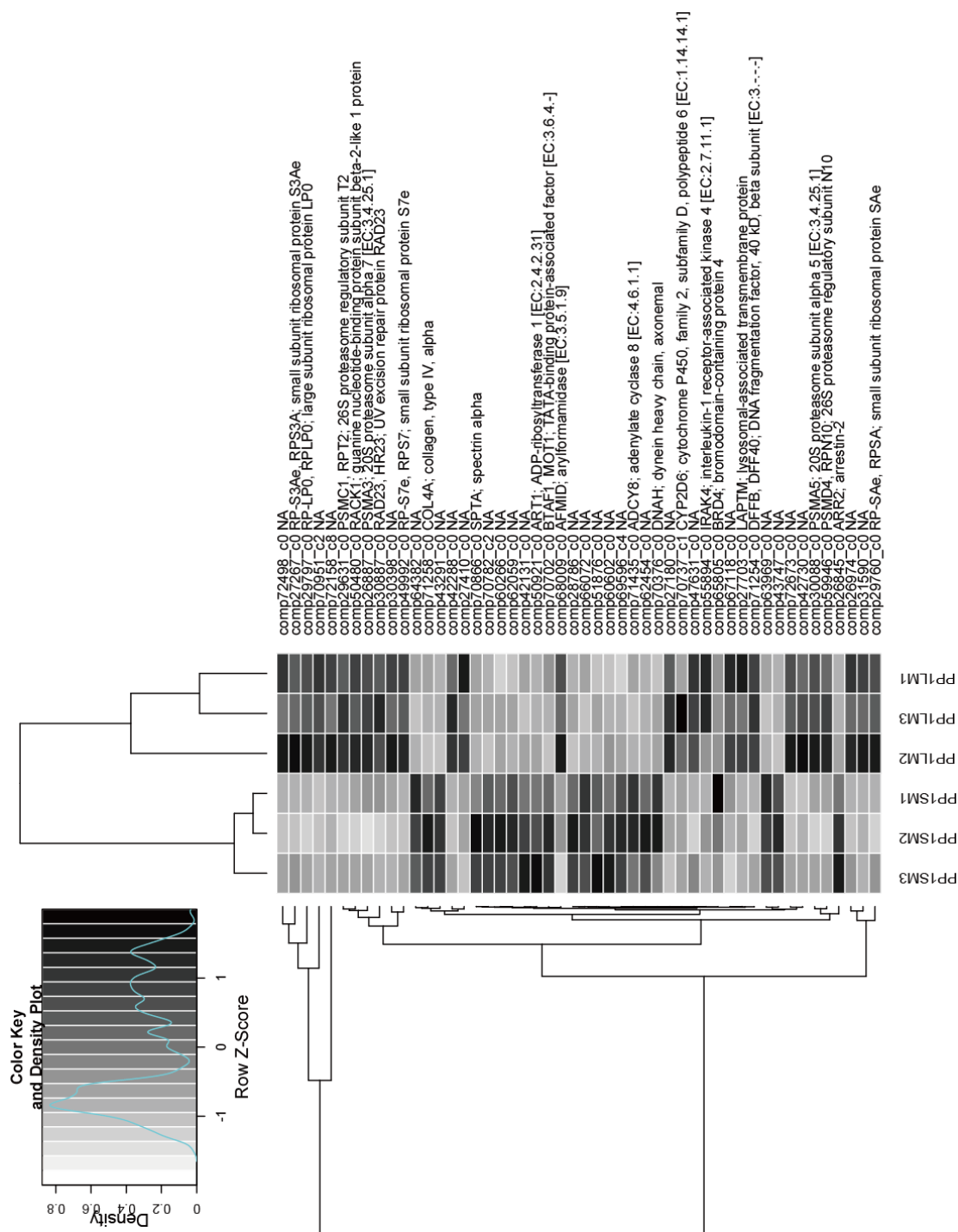


図 2-20 前蛹前期のオスにおける栄養環境間の遺伝子発現プロファイルの比較

前蛹前期のオスにおける栄養環境間において、発現変動の上位 50 遺伝子についてクラスタリング解析を行った。PP1LM は前蛹前期大型オス、PP1SM は前蛹前期小型オスを示し、後ろの 1 から 3 の数値は生物学的反復を示した。

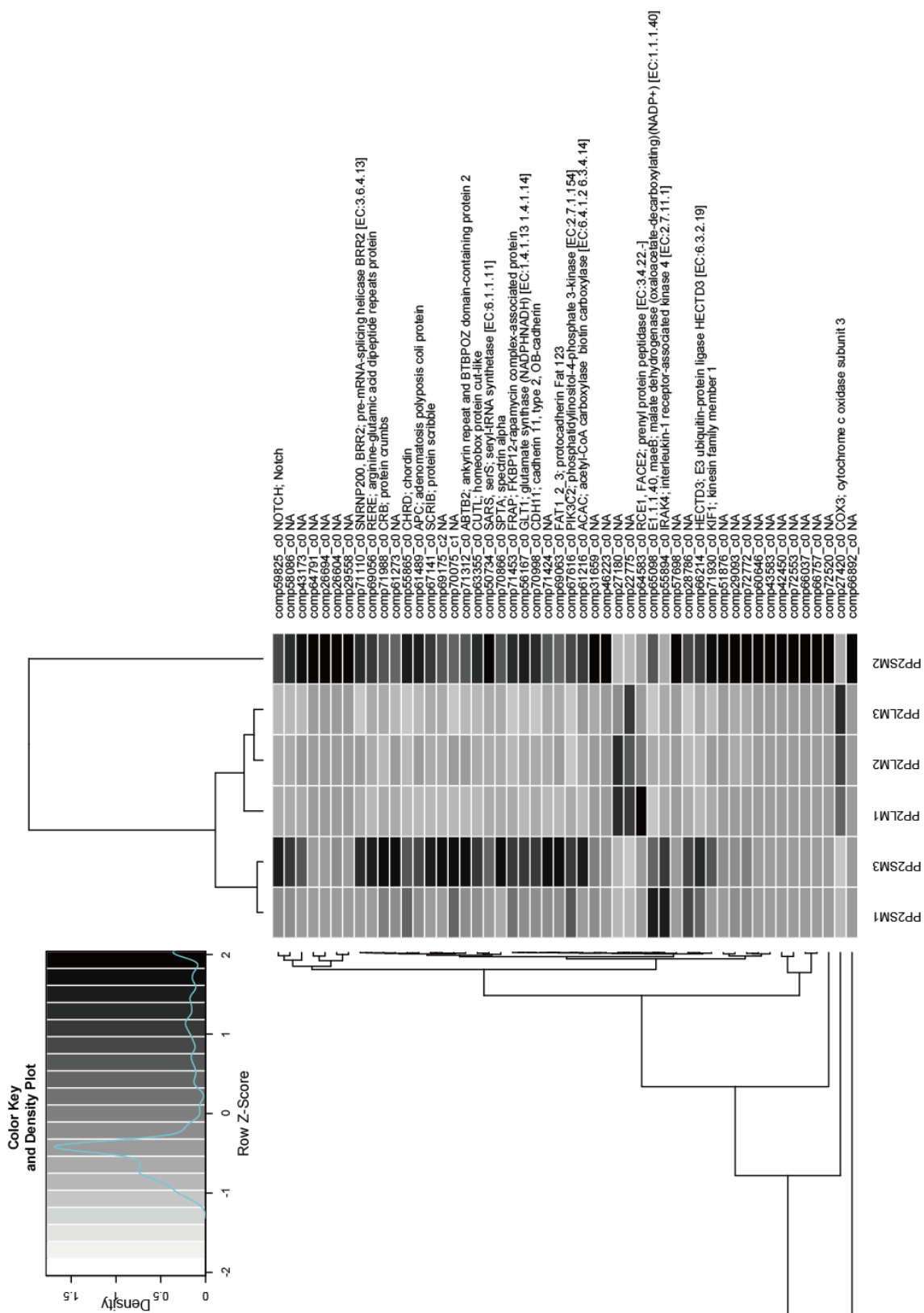


図 2-21 前蛹中期のオスにおける栄養環境間の遺伝子発現プロファイルの比較
 前蛹前期のオスにおける栄養環境間において、発現変動の上位 50 遺伝子についてクラスタリング解析を行った。PP2LM は前蛹中期大型オス、PP2SM は前蛹中期小型オスを示し、後ろの 1 から 3 の数値は生物学的反復を示した。

A

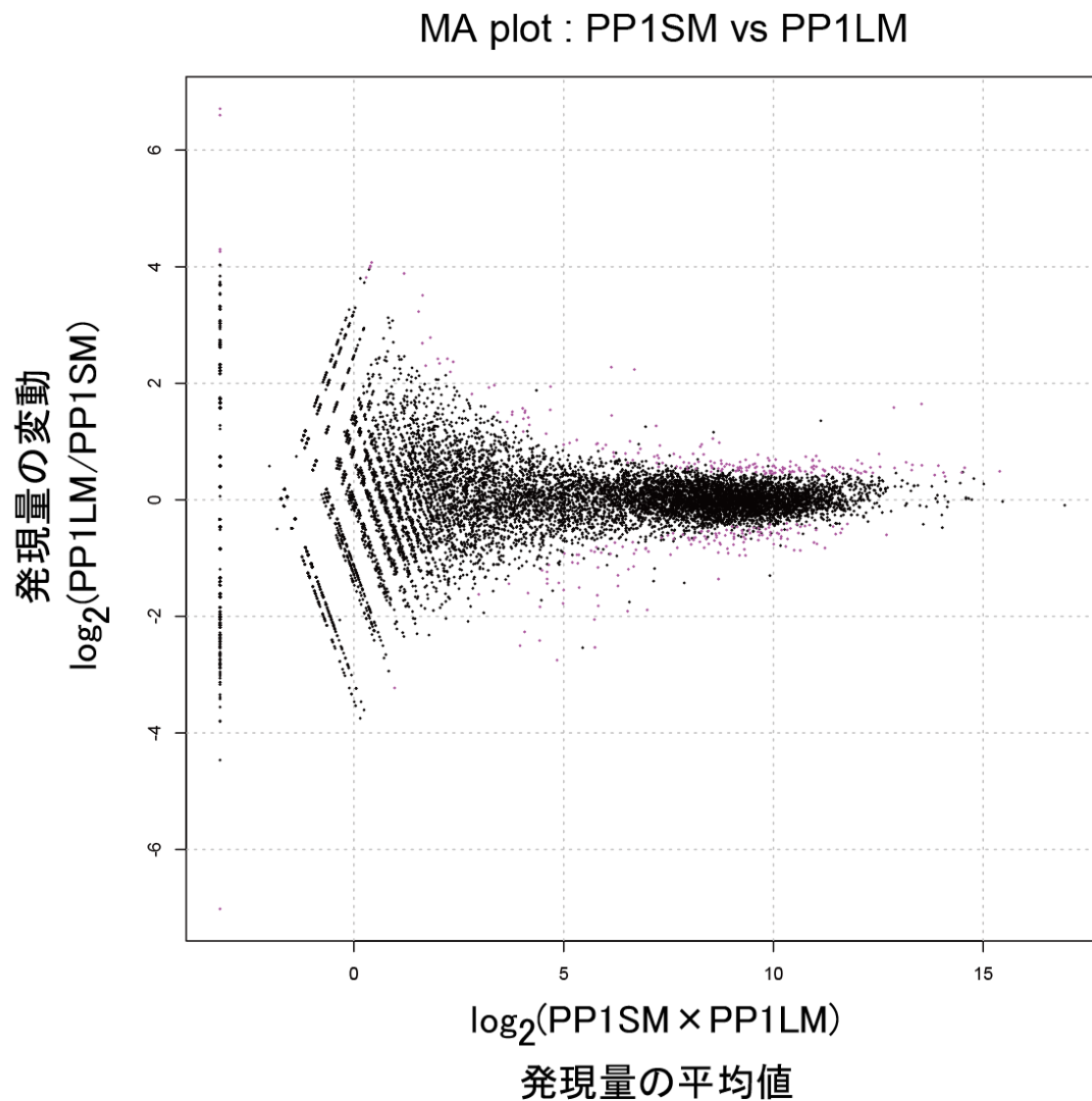
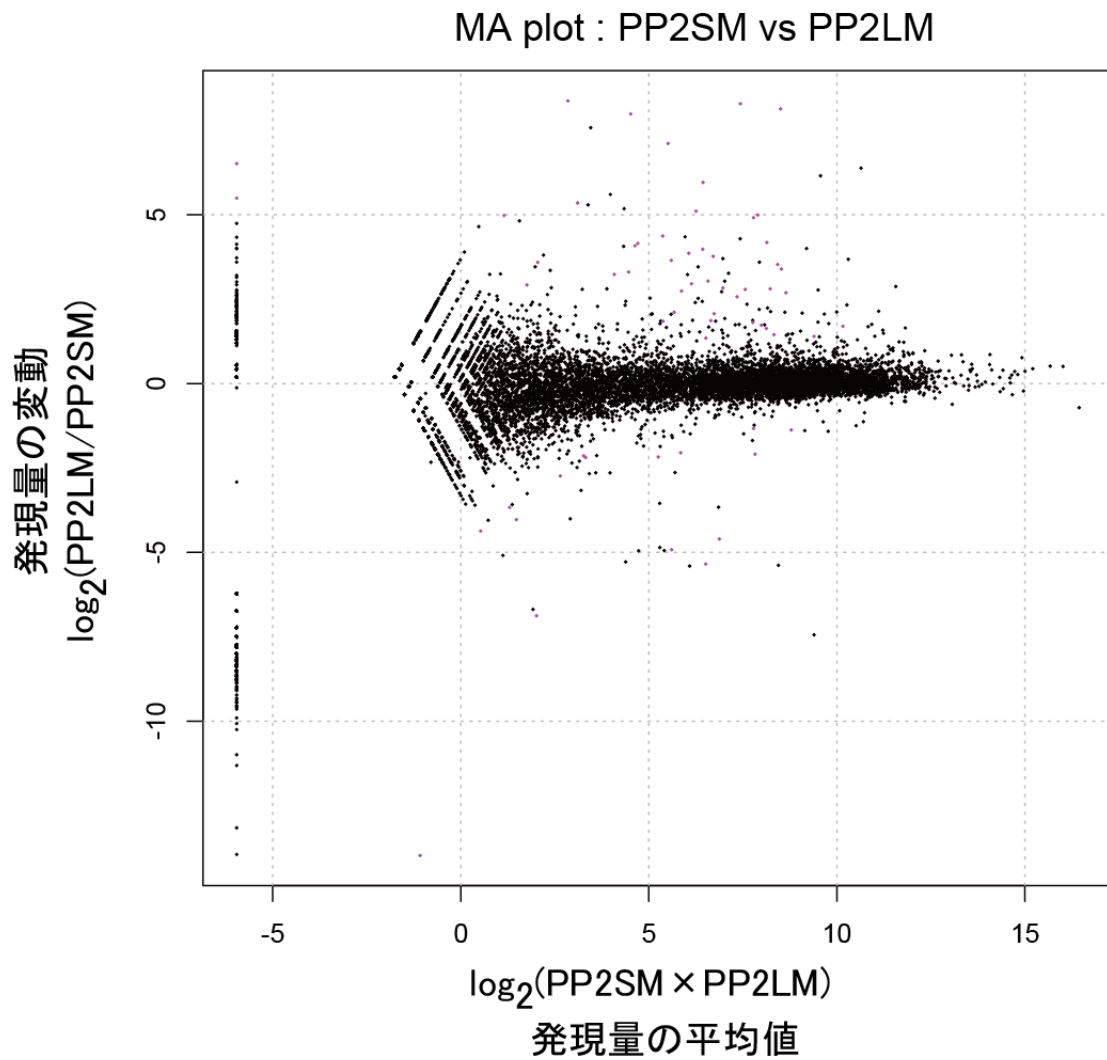


図 2-22 オス前蛹期の栄養条件間における MA プロット

(A) 前蛹前期におけるオス前蛹前期小型 (PP1SM) オス前蛹前期大型 (PP1LM) の各遺伝子の総発現量に対する発現量の差から発現変動遺伝子を調べた。図中の●のプロットが発現変動遺伝子を示す。FDR=10%の条件で 344 個の発現変動遺伝子が検出された。(次ページに続く)

B



(B) 前蛹中期におけるオス前蛹前期小型 (PP1SM) オス前蛹前期大型 (PP1LM) の各遺伝子の総発現量に対する発現量の差から発現変動遺伝子を調べた。図中の●のプロットが発現変動遺伝子を示す。FDR=10%の条件で 31 個の発現変動遺伝子が検出された。

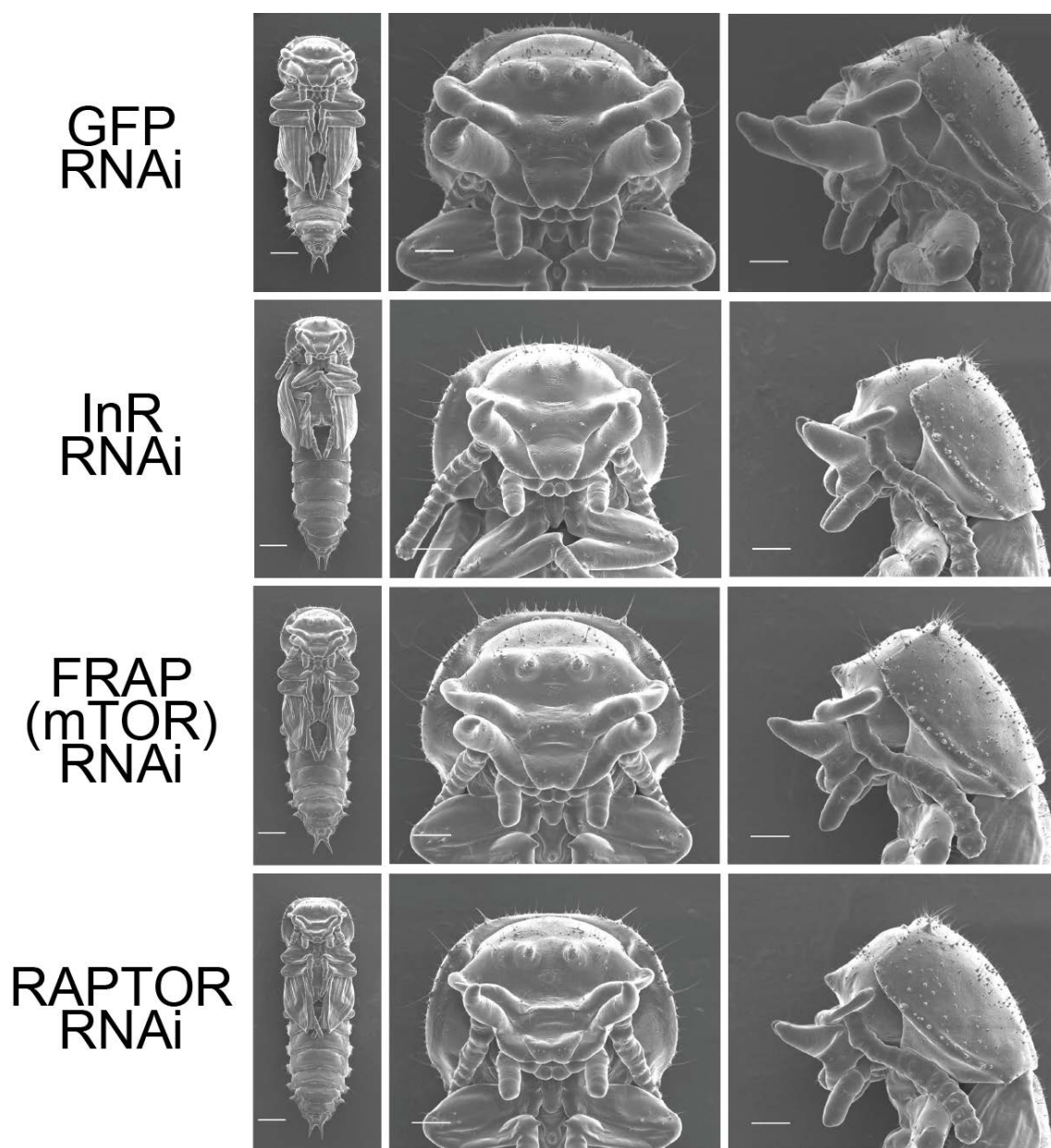


図 2-23 InR RNAi、FRAP(mTOR) RNAi、RAPTOR RNAi による蛹形態への影響
GFP RNAi (対照)、InR RNAi、FRAP(mTOR) RNAi、RAPTOR RNAi の蛹の形態について、左に全身、中央に頭部正面、右に頭部側面をそれぞれ示した。スケールバーは、全身で 500 μ m、頭部正面および側面で 200 μ m を示した。

A

サンプル		リード数
幼虫	全身	5831986
蛹	全身	5645672
成虫	全身	5654460
幼虫	頭部	17298882
前蛹	頭部	20577354

B

サンプル				総リード数
幼虫	大型	オス	1	11178922
幼虫	大型	オス	2	12631152
幼虫	大型	オス	3	13162958
前蛹前期	大型	オス	1	14150998
前蛹前期	大型	オス	2	12607148
前蛹前期	大型	オス	3	11987535
前蛹中期	大型	オス	1	13334225
前蛹中期	大型	オス	2	12744088
前蛹中期	大型	オス	3	10869891
幼虫	小型	オス	1	11284586
幼虫	小型	オス	2	10282005
幼虫	小型	オス	3	11086376
前蛹前期	小型	オス	1	11854100
前蛹前期	小型	オス	2	13200788
前蛹前期	小型	オス	3	10747647
前蛹中期	小型	オス	1	13469736
前蛹中期	小型	オス	2	10893344
前蛹中期	小型	オス	3	14285870
幼虫	大型	メス	1	12640595
幼虫	大型	メス	2	12614528
幼虫	大型	メス	3	11745712
前蛹前期	大型	メス	1	12035922
前蛹前期	大型	メス	2	13766854
前蛹前期	大型	メス	3	14205887
前蛹中期	大型	メス	1	13150136
前蛹中期	大型	メス	2	12162282
前蛹中期	大型	メス	3	15503277
幼虫	小型	メス	1	13867519
幼虫	小型	メス	2	10746137
幼虫	小型	メス	3	14412623
前蛹前期	小型	メス	1	13647273
前蛹前期	小型	メス	2	12991687
前蛹前期	小型	メス	3	9133978
前蛹中期	小型	メス	1	10718104
前蛹中期	小型	メス	2	12061562
前蛹中期	小型	メス	3	11016360

表 2-1 Miseq、Hiseq で取得したリード数

(A) Miseq (250bp ペアードエンド)、(B) Hiseq (100bp ペアードエンド) での解析で取得した各サンプルのリード数を示した。

A

	アッセンブルに用いた塩基数 (base)	266679499
Trinity	総コンティグ配列数	156171
	コンティグクラスター数	83686
	平均コンティグ長 (base)	1707.61
	コンティグ N50 (base)	3384
KAAS	アノテーション付加コンティグ配列数	18405
	同定した遺伝子数	4445

B

	アッセンブルに用いた塩基数 (base)	932155473
Trinity	総コンティグ配列数	412824
	コンティグクラスター数	138442
	平均コンティグ長 (base)	2258
	コンティグ N50 (base)	4025
KAAS	アノテーション付加コンティグ配列数	43933
	同定した遺伝子数	4287

表 2-2 *de novo* トランスク립トーム解析における取得データ

Trinity および KAAS で取得したデータを、(A) Miseq、(B) Hiseq についてそれぞれ示した。

id_annotation	オス前蛹前期		オス前蛹中期	
	p.value	相対発現量(栄養小/大)	p.value	相対発現量(栄養小/大)
HDAC1/2	0.712	0.966	0.791	1.057
HDAC3	0.001	0.731	0.823	0.957
HDAC4/5	0.003	1.501	0.091	1.500
HDAC6/10	0.144	1.145	0.524	1.152
HDAC11	0.010	0.693	0.553	0.871
INSR	0.079	1.196	0.355	1.220
FRAP(mTOR)	0.002	1.783	0.000	2.569
RICTOR	0.000	1.620	0.198	1.319
RAPTOR	0.000	1.552	0.263	1.325
AKT	0.618	1.052	0.773	1.059
RPS6KB	0.302	1.113	0.241	1.273
EIF4EBP	0.051	2.295	1.000	0.985
IRS1	0.046	1.242	0.031	1.553
PTEN	0.642	1.047	0.618	1.103
PIK3C3, VPS34	0.756	1.055	0.093	1.891
PIK3R4, VPS15	0.102	1.208	0.102	1.456
PIK3R	0.128	1.141	0.929	1.018

表 2-3 HDAC ファミリー遺伝子、インスリン経路遺伝子のオスの栄養条件間での発現変動

前蛹前期と前蛹中期において、発現変動遺伝子を表中の黄色で示した (P<0.05)。

ヒストンアセチル基転移酵素 (HAT)	
HAT1, KAT1; histone acetyltransferase 1 [EC:2.3.1.48]	
TIP60, KAT5, ESA1; histone acetyltransferase HTATIP [EC:2.3.1.48]	
MYST4, KAT6B; histone acetyltransferase MYST4 [EC:2.3.1.48]	
MYST2, HBO1, KAT7; histone acetyltransferase MYST2 [EC:2.3.1.48]	
MYST1, MOF, KAT8; histone acetyltransferase MYST1 [EC:2.3.1.48]	
NCOAT, MGEA5; protein O-GlcNAcase / histone acetyltransferase [EC:3.2.1.169]	
PCAF, KAT2, GCN5; histone acetyltransferase [EC:2.3.1.48]	
ヒストンメチル化酵素	
ASH2; Set1/Ash2 histone methyltransferase complex subunit ASH2	
ASH1L; histone-lysine N-methyltransferase ASH1L	
DOT1L, DOT1; histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-79 specific	
EHMT; euchromatic histone-lysine N-methyltransferase	
EZH2; histone-lysine N-methyltransferase EZH2	
MLL1; histone-lysine N-methyltransferase MLL1	
MLL3; histone-lysine N-methyltransferase MLL3	
MLL5; histone-lysine N-methyltransferase MLL5	
WHSC1, MMSET, NSD2; histone-lysine N-methyltransferase NSD2	
ヒストン脱メチル化酵素	
FBXL10, 11; F-box and leucine-rich repeat protein 10/11	
JHDM1D, E, F; JmjC domain-containing histone demethylation protein 1D/E/F	
KDM3; lysine-specific demethylase 3	
JMJD2, JHDM3; jumonji domain-containing protein 2	
UTX, UTY; histone demethylase	
JMJD6; histone arginine demethylase JMJD6	
JARID1; histone demethylase JARID1	
JARID2, JMJ; protein Jumonji	
AOZF2, LSD1; lysine-specific histone demethylase 1	
DNAメチル基転移酵素	
DNMT1, dnm; DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1 [EC:2.1.1.37]	
TRDMT1, DNMT2; tRNA (cytosine38-C5)-methyltransferase [EC:2.1.1.204]	
クロマチンリモデリング因子	
DEK; protein DEK	
ERCC6, CSB, RAD26; DNA excision repair protein ERCC-6	
MYO1; myosin I	
POL5, MYBBP1A; DNA polymerase phi [EC:2.7.7.7]	
SF3B1, SAP155; splicing factor 3B subunit 1	
MTA; metastasis-associated protein MTA	
BPTF, E(bx); nucleosome-remodeling factor subunit BPTF	
BPTF, E(bx); nucleosome-remodeling factor subunit BPTF	
NURF38; nucleosome-remodeling factor 38 kDa subunit [EC:3.6.1.1]	
ACTL6A, INO80K; actin-like protein 6A	
ポリコムタンパク質群	
CBX8, PC3; chromobox protein 8	
PCGF2, RNF110; polycomb group RING finger protein 2	
PCGF4, BMI1; polycomb group RING finger protein 4	
PHC1, EDR1; polyhomeotic-like protein 1	
RNF1, 2; E3 ubiquitin-protein ligase RNF1/2	
SCMH1; polycomb protein SCMH1	
EED; polycomb protein EED	
SUZ12; polycomb protein SUZ12	
RBBP4, HAT2, CAF1, MIS16; histone-binding protein RBBP4	
EZH2; histone-lysine N-methyltransferase EZH2	
AEBP2; zinc finger protein AEBP2	
ASXL; additional sex combs-like protein	
PCGF3; polycomb group RING finger protein 3	
MTF2, PCL2; polycomb-like protein 2	
YY; transcription factor YY	
YAF2; YY1-associated factor 2	

表 2-4 オオツノコクヌストモドキのエピジェネティック遺伝子の一例

参考文献

- Aird SD, Watanabe Y, Villar-Briones A, Roy MC, Terada K, Mikheyev AS (2013) Quantitative high-throughput profiling of snake venom gland transcriptomes and proteomes (*Ovophis okinavensis* and *Protobothrops flavoviridis*). *BMC genomics* 14: 790
- Alabi T, Michaud JP, Arnaud L, Haubruge E (2008) A comparative study of cannibalism and predation in seven species of flour beetle. *Ecological Entomology* 33: 716-726
- Alland L, David G, Shen-Li H, Potes J, Muhle R, Lee H-C, et al. (2002) Identification of Mammalian Sds3 as an Integral Component of the Sin3/Histone Deacetylase Corepressor Complex. *Molecular and cellular biology* 22: 2743-2750
- Barak AV, Burkholder WE (1977) Studies on the biology of *Attagenus elongatulus* Casey (Coleoptera: Dermestidae) and the effects of larval crowding on pupation and life cycle. *Journal of Stored Products Research* 13: 169-175
- Barker DJP, Osmond C (1986) INFANT MORTALITY, CHILDHOOD NUTRITION, AND ISCHAEMIC HEART DISEASE IN ENGLAND AND WALES. *The Lancet* 327: 1077-1081
- Barrangou R (2012) RNA-mediated programmable DNA cleavage. *Nature Biotechnology* 30: 836-838
- Beldade P, Rudd S, Gruber J, Long A (2006) A wing expressed sequence tag resource for *Bicyclus anynana* butterflies, an evo-devo model. *BMC genomics* 7: 130
- Bhaskara S, Chyla BJ, Amann JM, Knutson SK, Cortez D, Sun Z-W, et al. (2008) Deletion of Histone Deacetylase 3 reveals critical roles in S-phase progression and DNA damage control. *Molecular cell* 30: 61-72
- Bogdanović O, Veenstra G (2009) DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma* 118: 549-565
- Bradley EW, Carpio LR, Westendorf JJ (2013) Histone Deacetylase 3 Suppression

Increases PH Domain and Leucine-rich Repeat Phosphatase (Phlpp)1 Expression in Chondrocytes to Suppress Akt Signaling and Matrix Secretion. *The Journal of Biological Chemistry* 288: 9572-9582

Cho Y, Griswold A, Campbell C, Min K-T (2005) Individual histone deacetylases in *Drosophila* modulate transcription of distinct genes. *Genomics* 86: 606-617

Claeys I, Simonet G, Poels J, Van Loy T, Vercammen L, De Loof A, et al. (2002) Insulin-related peptides and their conserved signal transduction pathway. *Peptides* 23: 807-816

Clemmons D, Robinson IC, Christen Y (2010) IGFs: local repair and survival factors throughout life span. Springer.

Clouaire T, de las Heras JI, Merusi C, Stancheva I (2010) Recruitment of MBD1 to target genes requires sequence-specific interaction of the MBD domain with methylated DNA. *Nucleic Acids Research* 38: 4620-4634

Collins JP, Cheek JE (1983) Effect of Food and Density on Development of Typical and Cannibalistic Salamander Larvae in *Ambystoma tigrinum nebulosum*. *Integrative Comparative Biology*: 77-84

Consortium TGS (2008) The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature* 452: 949 - 955

De Ruijter A, Van Gennip A, Caron H, Kemp S, van Kuilenburg A (2003) Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochemical Journal* 370: 737-749

Dixon AFG (2000) *Insect Predator-Prey Dynamics. Ladybird Beetles and Biological Control*. Cambridge University Press, Cambridge.

Eberhard W (1979) The function of horns in *Podischnus agenor* (Dynastinae) and other beetles. *Sexual selection and reproductive competition in insects* 463, 231-258.

Emlen DJ (2000) Integrating Development with Evolution: A Case Study with Beetle Horns. *BioScience* 50: 403 - 418

Emlen DJ, Nijhout H (1999) Hormonal control of male horn length dimorphism in the dung beetle *Onthophagus taurus* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Insect*

Physiology 45: 45 - 53

Emlen DJ (1994) Environmental control of horn length dimorphism in the beetle *Onthophagus acuminatus* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Proceedings of the Royal Society of London Series B*: 131-136

Emlen DJ, Warren IA, Johns A, Dworkin I, Lavine LC (2012) A Mechanism of Extreme Growth and Reliable Signaling in Sexually Selected Ornaments and Weapons. *Science* 337: 860-864

Feng Q, Zhang Y (2001) The MeCP1 complex represses transcription through preferential binding, remodeling, and deacetylating methylated nucleosomes. *Genes & Development* 15: 827-832

Fox LR (1975) Cannibalism in Natural Populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 6: 87-106

Fuchikawa T, Okada K (2013) Inter- and intrasexual genetic correlations of exaggerated traits and locomotor activity. *Journal of Evolutionary Biology* 26: 1979-1987

Furumai R, Matsuyama A, Kobashi N, Lee K-H, Nishiyama M, Nakajima H, et al. (2002) FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases. *Cancer research* 62: 4916-4921

Gallinari P, Marco SD, Jones P, Pallaoro M, Steinkuhler C (2007) HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics. *Cell Research* 17: 195-211

Gilbert SF, Epel D (2009) *Ecological developmental biology: integrating epigenetics, medicine, and evolution*. 1st edition, Sinauer Associates Sunderland.

Gotoh H, Cornette R, Koshikawa S, Okada Y, Lavine LC, Emlen DJ, et al. (2011) Juvenile Hormone Regulates Extreme Mandible Growth in Male Stag Beetles. *PLoS ONE* 6: e21139

Gotoh H, Miyakawa H, Ishikawa A, Ishikawa Y, Sugime Y, Emlen DJ, et al. (2014) Developmental Link between Sex and Nutrition; *doublesex* Regulates Sex-Specific Mandible Growth via Juvenile Hormone Signaling in Stag Beetles. *PLoS Genetics*

10: e1004098

Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, et al. (2011) Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. *Nature biotechnology* 29: 644-652

Gregorette I, Lee Y-M, Goodson HV (2004) Molecular Evolution of the Histone Deacetylase Family: Functional Implications of Phylogenetic Analysis. *Journal of Molecular Biology* 338: 17-31

Grozinger CM, Schreiber SL (2002) Deacetylase Enzymes: Biological Functions and the Use of Small-Molecule Inhibitors. *Chemistry & Biology* 9: 3-16

Guenther MG, Barak O, Lazar MA (2001) The SMRT and N-CoR Corepressors Are Activating Cofactors for Histone Deacetylase 3. *Molecular and cellular biology* 21: 6091-6101

Guenther MG, Yu J, Kao GD, Yen TJ, Lazar MA (2002) Assembly of the SMRT-histone deacetylase 3 repression complex requires the TCP-1 ring complex. *Genes & Development* 16: 3130-3135

Haas BJ, Papanicolaou A, Yassour M, Grabherr M, Blood PD, Bowden J, et al. (2013) De novo transcript sequence reconstruction from RNA-Seq: reference generation and analysis with Trinity. *Nature protocols* 8: 10.1038/nprot.2013.1084

Hartfelder K, Emlen DJ (2011) Endocrine control of insect polyphenism. *Insect Endocrinology* L. I. Gilbert: 464-522

Hassig CA, Tong JK, Fleischer TC, Owa T, Grable PG, Ayer DE, et al. (1998) A role for histone deacetylase activity in HDAC1-mediated transcriptional repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 3519-3524

Hendrich B, Tweedie S (2003) The methyl-CpG binding domain and the evolving role of DNA methylation in animals. *Trends in Genetics* 19: 269-277

Hinton HE (1946) The "gin-traps" of some beetle pupae; a protective device which appears to be unknown. *Transactions of the Royal Entomological Society of London* 97: 473-496

Hinton HE (1955) Protective Devices of Endopterygote Pupae. *Transactions of*

Society for British Entomology 12: 49-92

Ikmi A, McKinney SA, Delventhal KM, Gibson MC (2014) TALEN and CRISPR/Cas9-mediated genome editing in the early-branching metazoan *Nematostella vectensis*. *Nature Communications*,5

Ito Y, Harigai A, Nakata M, Hosoya T, Araya K, Oba Y, et al. (2013) The role of doublesex in the evolution of exaggerated horns in the Japanese rhinoceros beetle. *EMBO reports*, 14(6), 561-567.

Jaenisch R, Bird A (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature genetics* 33: 245-254

Jenuwein T, Allis CD (2001) Translating the histone code. *Science* 293: 1074-1080

Jones PA, Baylin SB (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Reviews Genetics* 3: 415-428

Jones PL, Jan Veenstra GC, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, et al. (1998) Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nature Genetics* 19: 187-191

Joung JK, Sander JD (2013) TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14: 49-55

Kaati G, Bygren LO, Edvinsson S (2002) Cardiovascular and diabetes mortality determined by nutrition during parents' and grandparents' slow growth period. *European journal of human genetics: EJHG* 10: 682-688

Kaelin WG, McKnight SL (2013) Influence of Metabolism on Epigenetics and Disease. *Cell* 153: 56-69

Karino K, Seki N, Chiba M (2004) Larval nutritional environment determines adult size in Japanese horned beetles *Allomyrina dichotoma*. *Ecological Research* 19: 663-668

Kijimoto T, Costello J, Tang Z, Moczek AP, Andrews J (2009) EST and microarray analysis of horn development in *Onthophagus* beetles. *BMC genomics* 10: 504

Kijimoto T, Moczek AP, Andrews J (2012) Diversification of doublesex function

- underlies morph-, sex-, and species-specific development of beetle horns. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 20526-20531
- Klose RJ, Bird AP (2006) Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends in Biochemical Sciences* 31: 89-97
- Kopp A (2012) Dmrt genes in the development and evolution of sexual dimorphism. *Trends in Genetics* 28: 175-184
- Kotaki T, Fujii H (1995) Crowding inhibits pupation in *Tribolium freemani*: contact chemical and mechanical stimuli are involved. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 74: 145-149
- Koyama T, Mendes C, Mirth CK (2013) Mechanisms regulating nutrition-dependent developmental plasticity through organ-specific effects in insects. *Frontiers in Physiology* 4
- Kucharski R, Maleszka J, Foret S, Maleszka R (2008) Nutritional Control of Reproductive Status in Honeybees via DNA Methylation. *Science* 319: 1827-1830
- Lagger G, O'Carroll D, Rembold M, Khier H, Tischler J, Weitzer G, et al. (2002) Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression. *The EMBO journal*, 21(11), 2672-2681.
- Lass S, Spaak P (2003) Chemically induced anti-predator defences in plankton: a review. *Hydrobiologia* 491: 221-239
- Lassmann T, Hayashizaki Y, Daub CO (2009) TagDust—a program to eliminate artifacts from next generation sequencing data. *Bioinformatics* 25: 2839-2840
- Lucas É, Coderre D, Brodeur J (2000) Selection of Molting and Pupation Sites by *Coleomegilla maculata* (Coleoptera: Coccinellidae): Avoidance of Intraguild Predation. *Environmental Entomology* 29: 454-459
- Müller CB, Williams IS, Hardie J (2001) The role of nutrition, crowding and interspecific interactions in the development of winged aphids. *Ecological Entomology* 26: 330-340
- Matson CK, Zarkower D (2012) Sex and the singular DM domain: insights into sexual regulation, evolution and plasticity. *Nature Reviews Genetics* 13: 163-174

Minucci S, Pelicci PG (2006) Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nature Reviews Cancer* 6: 38-51

Miyatake T, Katayama K, Takeda Y, Nakashima A, Sugita A, Mizumoto M (2004) Is death-feigning adaptive? Heritable variation in fitness difference of death-feigning behaviour. *Proceedings of the Royal Society - biological sciences* 271: 2293-2296

Moczek AP (2009) On the origins of novelty and diversity in development and evolution: A case study on beetle horns. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*: 289-296

Montgomery RL, Davis CA, Potthoff MJ, Haberland M, Fielitz J, Qi X, et al. (2007) Histone deacetylases 1 and 2 redundantly regulate cardiac morphogenesis, growth, and contractility. *Genes & Development* 21: 1790-1802

Montgomery RL, Potthoff MJ, Haberland M, Qi X, Matsuzaki S, Humphries KM, et al. (2008) Maintenance of cardiac energy metabolism by histone deacetylase 3 in mice. *The Journal of Clinical Investigation* 118: 3588-3597

Nakakita H (1982) Effect of Larval Density on Pupation of *Tribolium freemani* HINTON (Coleoptera : Tenebrionidae). *Applied entomology and zoology* 17: 269-276

Nishi A, Imamura T, Miyanoshita A, Morimoto S, Takahashi K, Visarathanonth P, et al. (2004) Predatory abilities of *Amphibolus venator* (Klug)(Hemiptera: Reduviidae), a predator of stored-product insect pests. *Applied entomology and zoology* 39: 321-326

Okada K, Miyanoshita A, Miyatake T (2006) Intra-sexual Dimorphism in Male Mandibles and Male Aggressive Behavior in the Broad-Horned Flour Beetle *Gnatocerus cornutus* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Insect Behavior* 19: 457-467

Okada K, Miyatake T (2009) Genetic correlations between weapons, body shape and fighting behaviour in the horned beetle *Gnatocerus cornutus*. *Animal Behaviour* 77: 1057-1065

Okada K, Miyatake T (2010a) Effect of losing on male fights of broad-horned flour beetle, *Gnatocerus cornutus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 64: 361-369

Okada K, Miyatake T (2010b) Plasticity of size and allometry in multiple sexually selected traits in an armed beetle *Gnatocerus cornutus*. *Evolutionary Ecology* 24: 1339-1351

Okada Y, Gotoh H, Miura T, Miyatake T, Okada K (2012) Juvenile hormone mediates developmental integration between exaggerated traits and supportive traits in the horned flour beetle *Gnatocerus cornutus*. *Evolution & Development* 14: 363-371

Pflum MKH, Tong JK, Lane WS, Schreiber SL (2001) Histone deacetylase 1 phosphorylation promotes enzymatic activity and complex formation. *Journal of Biological Chemistry* 276: 47733-47741

Polis GA (1981) The Evolution and Dynamics of Intraspecific Predation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 12: 225-251

Razidlo DF, Whitney TJ, Casper ME, McGee-Lawrence ME, Stensgard BA, Li X, et al. (2010) Histone Deacetylase 3 Depletion in Osteo/Chondroprogenitor Cells Decreases Bone Density and Increases Marrow Fat. *PLoS ONE* 5: e11492

Riggs AD, Russo VEA, Martienssen RA (1996) *Epigenetic mechanisms of gene regulation*. Plainview, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Rhainds M, Gries G, Chinchilla C (1995) Pupation site and emergence time influence the mating success of bagworm females, *Oiketicus kirbyi*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 77: 183-187

Savvidou N, Bell CH (1994) The effect of larval density, photoperiod and food change on the development of *Gnatocerus cornutus* (F.) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Stored Products Research* 30: 17-21

Segré CV, Chiocca S (2010) Regulating the regulators: the post-translational code of class I HDAC1 and HDAC2. *BioMed Research International* 2011

Sengupta N, Seto E (2004) Regulation of histone deacetylase activities. *Journal of Cellular Biochemistry* 93: 57-67

Shahbazian MD, Grunstein M (2007) Functions of Site-Specific Histone Acetylation and Deacetylation. *Annual Review of Biochemistry* 76: 75-100

- Shingleton AW, Frankino WA (2013) New perspectives on the evolution of exaggerated traits. *BioEssays* 35: 100-107
- Shukla JN, Nagaraju J (2010) Two female-specific DSX proteins are encoded by the sex-specific transcripts of *dsx*, and are required for female sexual differentiation in two wild silkmoth species, *Antheraea assama* and *Antheraea mylitta* (Lepidoptera, Saturniidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40: 672-682
- Snell-Rood EC, Cash A, Han MV, Kijimoto T, Andrews J, Moczek AP (2011) Developmental decoupling of alternative phenotypes: insights from the transcriptomes of horn-polyphenic beetles. *Evolution; international journal of organic evolution* 65: 231-245
- Snell-Rood EC, Troth A, Moczek AP (2013) DNA Methylation as a Mechanism of Nutritional Plasticity: Limited Support From Horned Beetles. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* 320: 22-34
- Strahl BD, Allis CD (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* 403: 41-45
- Sun J, Nishiyama T, Shimizu K, Kadota K (2013) TCC: an R package for comparing tag count data with robust normalization strategies. *BMC bioinformatics* 14: 219
- The Honeybee Genome Sequencing C (2006) Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* 443: 931-949
- Thomas Park DBM, Wladyslaw Grodzinski and Tadeusz Prus (1965) Cannibalistic Predation in Populations of Flour Beetles. *Physiological Zoology* 38: 289-321
- Tollrian R, & Harvell, C. D. (Eds.) (1999) The ecology and evolution of inducible defenses. Princeton University Press
- Tomoyasu Y, Denell R (2004) Larval RNAi in *Tribolium* (Coleoptera) for analyzing adult development. *Development Genes and Evolution* 214: 575-578
- Tsai S-C, Seto E (2002) Regulation of histone deacetylase 2 by protein kinase CK2. *Journal of Biological Chemistry* 277: 31826-31833
- Tschinkel WR (1981) Larval dispersal and cannibalism in a natural population of *Zophobas atratus* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Animal Behaviour* 29: 990-996

- Tschinkel WR, Willson CD (1971) Inhibition of pupation due to crowding in some tenebrionid beetles. *Journal of Experimental Zoology* 176: 137-145
- Tsuda Y, Yoshida T (1985) Population biology of the broad-horned flour beetle, *Gnathocerus cornutus* (F.) II. Crowding effects of larvae on their survival and development. *Researches on Population Ecology* 27: 77-85
- Vijendravarma RK, Narasimha S, Kawecki TJ (2013) Predatory cannibalism in *Drosophila melanogaster* larvae. *Nature Communications* 4: 1789
- Waddington CH (1942) The epigenotype. *Endeavour* 1: 18–20.
- Wadhwa PD, Buss C, Entringer S, Swanson JM (2009) Developmental Origins of Health and Disease: Brief History of the Approach and Current Focus on Epigenetic Mechanisms. *Seminars in reproductive medicine* 27: 358-368
- Wakahara M (1995) Cannibalism and the Resulting Dimorphism in Larvae of a Salamander *Hynobius retardatus*, Inhabited in Hokkaido, Japan. *Zoological Science* 12: 467-473
- Wang X, Kang L (2014) Molecular Mechanisms of Phase Change in Locusts. *Annual Review of Entomology* 59: 225-244
- Warren IA, Gotoh H, Dworkin IM, Emlen DJ, Lavine LC (2013) A general mechanism for conditional expression of exaggerated sexually-selected traits. *BioEssays* 35: 889-899
- Watanabe T, Ochiai H, Sakuma T, Horch HW, Hamaguchi N, Nakamura T, et al. (2012) Non-transgenic genome modifications in a hemimetabolous insect using zinc-finger and TAL effector nucleases. *Nature Communications* 3: 1017
- Waterland RA, Jirtle RL (2003) Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Molecular and cellular biology* 23: 5293-5300
- Watt F, Molloy PL (1988) Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes & Development* 2: 1136-1143
- West-Eberhard M (2003) *Developmental Plasticity and Evolution*.

Wolfson NA, Pitcairn CA, Fierke CA (2013) HDAC8 Substrates: Histones and Beyond. *Biopolymers* 99: 112-126

Wu Q, Brown MR (2006) SIGNALING AND FUNCTION OF INSULIN-LIKE PEPTIDES IN INSECTS. *Annual Review of Entomology* 51: 1-24

Yang X-J (2004) Lysine acetylation and the bromodomain: a new partnership for signaling. *BioEssays* 26: 1076-1087

Yang X-J, Seto E (2003) Collaborative spirit of histone deacetylases in regulating chromatin structure and gene expression. *Current Opinion in Genetics & Development* 13: 143-153

Yoshida M, Kijima M, Akita M, Beppu T (1990) Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *Journal of Biological Chemistry* 265: 17174-17179

Young AM (1970) Predation and Abundance in Populations of Flour Beetles. *Ecology* 51: 602-619

Zhang Y, Ng H-H, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Bird A, Reinberg D (1999) Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes & Development* 13: 1924-1935

謝辞

Dsx と proboscipedia の遺伝子配列情報のご供与と実験方法についても貴重なアドバイスをくださいました名古屋大学大学院生命環境農学研究科の新美輝幸助教、コクヌストモドキをご供与と論文執筆の際に貴重なアドバイスをくださいました岡山大学大学院環境学研究科の岡田賢祐助教に感謝いたします。次世代シーケンサーの解析について、ご協力と貴重なアドバイスを賜りましたかずさ DNA 研究所の久郷和人博士に感謝いたします。

本研究の立ち上げに尽力してくださいました東京大学大学院総合文化研究科水原誠子氏に深く感謝いたします。

東京大学大学院総合文化研究科岡田泰和助教には、研究の計画から実験、博士論文の作成に渡り基礎から丁寧なご指導をして頂きました。心より厚く御礼申し上げます。

この研究を行うにあたり、東京大学大学院総合文化研究科太田邦史教授には、研究の計画から博士論文の作成に渡り、広くご指導を賜りました。心より厚く御礼申し上げます。

また、研究の過程で貴重なアドバイスを頂き、多くの面でお世話になりました東京大学大学院総合文化研究科太田研究室の皆様方にこの場を借りて御礼申し上げます。