

論文の内容の要旨

Molecular mechanisms underlying metamorphosis and color formation in dragonflies.

(トンボの変態と体色形成を制御する分子基盤)

氏名 奥出 絃太

【序論】

昆虫は、現在記載されている生物種の半分以上を占め、地球上で最も多様化した分類群と見なされている。昆虫繁栄の大きな要因の一つに、「変態」機構の獲得により幼虫と成虫の間で形態や生態を変化させ、様々な環境や食性に適応できるようになった点が挙げられる。

昆虫の変態機構とその進化を理解するにあたって、変態を行う最も祖先的な昆虫群のひとつであるトンボ目 (Odonata) は非常に重要な分類群である。トンボは、蛹の時期をもたない不完全変態昆虫であるが、他の多くの不完全変態昆虫とは異なり、幼虫(水中生活)から成虫(陸上生活)に変態する際に、生活環境の変化に伴って形態や生態が劇的に変化する(図1)。また、トンボの成虫は、主に視覚で周囲の環境および他個体を認識するため、色鮮やかな体色や斑紋をもつ種が多い。

しかし、トンボは、①生きた餌しか食べず、実験室内での飼育・継代が難しい、②幼虫の各齢の期間や変態の進行過程などの基礎的な情報が不足している、③遺伝子の機能解析系が確立されていない、など困難な点が多く、遺伝子レベルでの研究は、世界的にもほぼ皆無であった。



アオモンイトンボ

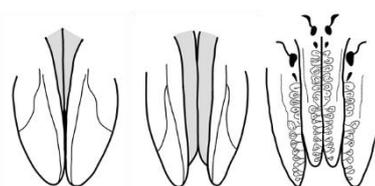
ヨツボシトンボ

図1: トンボの変態。矢印は幼虫の抜け殻を示す。

本研究では、まず第1章・第2章において、各種トンボにおける変態進行過程の詳細な記載と、RNAi法を用いた遺伝子機能解析系の確立を行った。これらの基礎的な情報や実験系を用いて、関東地方で普通に見られるアオモンイトトンボ *Ischnura senegalensis* とコシアキトンボ *Pseudothemis zonata* をモデル種に、第3章・第4章ではトンボの変態を制御する分子機構について、第5章・第6章・第7章では成虫の体色形成を制御する分子基盤について、網羅的な解明に取り組んだ。

【第1章：トンボ14科49種における変態進行過程の比較解析】

日本には約200種のトンボが生息するが、それらの幼虫形態は、生息環境に応じて極めて多様である。私は修士課程において、アオモンイトトンボにおける脱皮・変態過程の詳細な記載を行った(Okude et al. 2017 *Zool Sci*)。本章では、終齢幼虫期の変態に伴う形態変化がトンボの種間でどの程度共通であるかを解明することを目指し、日本に生息するトンボ種の約1/4にあたる14科49種158個体について、終齢幼虫を毎日撮影し、変態の進行過程を詳細に記録した。その結果、観察したほぼ全ての種・個体において、終齢幼虫は翅の形態から3つのステージに分類できることを提唱した(図2)。一方で、複眼の形態変化や口器下唇の退縮などは、特定の分類群において発生ステージングに有用であることも明らかにした。以上の結果から、多様なトンボ種で変態進行過程のステージングが可能となった。



ステージ1 ステージ2 ステージ3

図2. 全てのトンボの終齢幼虫に共通した翅の形態変化に基づく3つの発生ステージ。徐々に翅が膨らみ、羽化直前に模様が見える。

あたる14科49種158個体について、終齢幼虫を毎日撮影し、変態の進行過程を詳細に記録した。その結果、観察したほぼ全ての種・個体において、終齢幼虫は翅の形態から3つのステージに分類できることを提唱した(図2)。一方で、複眼の形態変化や口器下唇の退縮などは、特定の分類群において発生ステージングに有用であることも明らかにした。以上の結果から、多様なトンボ種で変態進行過程のステージングが可能となった。

【第2章：RNAiによる遺伝子機能解析系の改良】

私は修士課程において、ハッチョウトンボ *Nannophya pygmaea* を材料に、エレクトロポレーションを併用したRNAi法により、表皮において局所的に遺伝子の機能阻害が可能であることを報告した(Okude et al. 2017 *Appl Entomol Zool*)。本章では、採集や個別飼育が比較的容易なアオモンイトトンボやコシアキトンボを材料に、RNAi実験系のさらなる条件検討を行った。その結果、siRNA (small interfering RNA)だけでなく、より安価なdsRNA(double-stranded RNA)も使用可能であり、終齢幼虫のステージ1(図2参照)にRNAi処理を行うことで、表皮に対してはほぼ100%の効率で遺伝子の機能阻害が可能であることを示した。さらに、本手法が複数種のトンボに適応可能であることを明らかにした。

【第3章：トンボの変態を制御する遺伝子群の同定】

トンボの変態を制御する遺伝子の解明をめざし、アオモンイトトンボを材料に、様々な発生ステージおよび部位の遺伝子発現をRNAseq法(計82サンプル)により網羅的に比較解析した。その結果、8つの幼虫特異的発現遺伝子と7つの成虫特異的発現遺伝子を同定し、これら全ての遺伝子についてRNAiによる機能阻害実験を行ったところ、3種類の転写因子 *Krüppel homolog 1 (Kr-h1)*, *E93*, *broad* のRNAi部位で特徴的な表現型が観察された。*Kr-h1* と *E93* は変態を制御するマスター転写因子として他の昆虫から知られており、トンボにおいて

も *Kr-h1* の RNAi による成虫化と *E93* の RNAi による幼虫化が観察された。また、多くの昆虫で *Kr-h1* の発現を制御することが知られている幼若ホルモン (JH) の影響を解析するため、JH 受容体である *Methoprene tolerant (Met)* の RNAi を行ったところ、*Kr-h1* 同様に成虫化が確認された。すなわち、変態を獲得した最も祖先的な昆虫であるトンボにおいても、*Met*、*Kr-h1* および *E93* による JH シグナルを介した変態制御機構が保存されていることを示した。一方で、*broad* は、完全変態昆虫では蛹の形態形成に、不完全変態昆虫では翅の発達に重要であることが知られていたが、トンボの *broad* の RNAi 部位では幼虫とも成虫とも異なる特異な表現型が観察された。RNAi 部位の RNAseq 法による網羅的な遺伝子発現解析から、トンボでは *broad* が表皮において幼虫から成虫への変態を部分的に制御するという、他の昆虫から報告されていなかった知見を得た。

【第4章：トンボの着色に関与する脱皮ホルモン関連転写因子の同定】

昆虫の変態は、主に JH と脱皮ホルモン (20E) によって内分泌制御されている。前章では JH シグナルに関わる転写因子の解析を行ったが、本章では 20E シグナルに関わる転写因子、および変態時に発現が変動する転写因子に着目して解析を行った。その結果、20E シグナルに関わる 5 つの転写因子の RNAi 部位で着色阻害が見られた。その中で最も表現型が顕著であった核内受容体の一種 *ftz transcription factor 1 (ftz fl)* について、RNAi 部位の RNAseq 法によってターゲット遺伝子の探索を行ったところ、メラニン合成遺伝子の発現時期が変化することが確認された。20E による着色への影響は、他の昆虫からも報告例があったが、着色に関わる遺伝子を制御する具体的な分子機構はほぼ未解明であった。今回、成虫の局所 RNAi を用いることで、20E による昆虫の着色制御に関する具体的な制御機構の一端を明らかにした。

【第5章：トンボの黄色の体色形成に関与する遺伝子群の同定】

第3章および第4章でトンボの変態に関わる遺伝子群を複数同定することに成功したが、それらの影響は、表皮における局所的な機能解析という性質上、多くは成虫の着色阻害という表現型として観察された。一方でその基盤となる、トンボ成虫の色鮮やかな体色形成に関わる分子基盤は、ほとんど未解明であった。そこで本章ではコシアキトンボをモデル種として、多くのトンボで見られる黄色の体色形成に着目した。種々の溶媒への溶解特性と LC-MS による分析により、多くのトンボの黄色はプテリジン色素に由来することを確認した。次に、3 種類のトンボ (コシアキトンボ、ノシメトンボ *Sympetrum infuscatum*、ホンサナエ *Shaogomphus postocularis*) について、羽化直後の着色中の個体から表皮の黄色領域と黒色領域を切り分けてサンプリングし、RNAseq 法による網羅的な遺伝子発現解析を行った。3 種に共通した黄色領域特異的な遺伝子について、コシアキトンボを用いて RNAi による機能解析を行い、7 つの遺伝子の RNAi 部位において黄色の着色阻害を確認した。これらの中には、他の昆虫でプテリジン色素の合成や輸送に関与する報告のある遺伝子のみならず、体色への関与の報告がない遺伝子も含まれていた。さらに、独自のスクリーニング基準を設定して

コシアキトンボで黄色領域特異的に発現する転写因子を探索した結果、2つの遺伝子のRNAiで黄色領域が黒色領域に変化することを確認した(図3)。

【第6章：トンボの水色の体色形成に関与する遺伝子群の同定】

本章では、アオモンイトトンボなど多くの種で見られる水色の体色形成に着目した。まずアオモンイトトンボ腹部色素の種々の溶媒への溶解特性を確認したところ、水色はプテリジン色素とオモクローム色素から構成されることが示唆された。また、羽化直後の着色中の個体から腹部第8節(水色斑部分)と腹部第4・5節(水色斑なし)を切り分けて、RNAseq法による網羅的な遺伝子発現解析を行ったところ、水色部でオモクローム色素やプテリジン色素の合成・輸送に関与する複数の遺伝子が特異的に発現していることを見出した。これらの水色領域特異的遺伝子についてRNAi法による発現阻害実験を行い、複数の遺伝子のRNAi部位において水色の着色阻害を確認した。また、前章でコシアキトンボの黄色形成への関与を示した転写因子についても機能解析を行ったところ、RNAiによって黄色領域だけでなく、水色領域も黒色へと変化することが判明し(図3)、種や色をこえて、トンボの体色・紋様形成を制御する新規な転写因子であることを明らかにした。

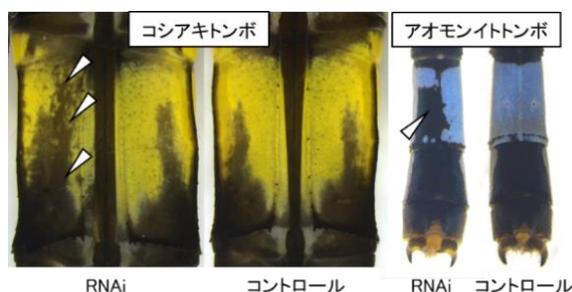


図3. 黄色・青色特異的転写因子のRNAiにより黄色・青色領域が黒色領域へとそれぞれ変化する

【第7章：異なる体色多型をもつトンボ2種間の人為的な種間雑種の作出】

最後に、トンボの種内および種間における体色多様性に関わる分子基盤の解明に取り組んだ。同種内にメス多型があり、種間で水色斑の有無が異なるアオモンイトトンボとマンシュウイトトンボ *Ischnura elegans* に着目した。本章では、これら2種間で人為的に種間雑種を作出することに成功し、子孫の表現型観察により、メスの腹部青色斑の有無が種間雑種で抑制されることを見出した。今後、本実験系を用いた交配実験により体色多型の原因領域の推定が可能となると期待され、腹部青色斑を制御する分子基盤の解明のためのモデル系の作出に成功した。さらに性分化に関わる遺伝子の機能解析の結果から、雌雄やメス多型間における体色の違いに関わる候補遺伝子を同定した。

【まとめと展望】

本研究では、200サンプル以上のRNAseq法による遺伝子発現解析と200遺伝子以上に対するRNAi実験を駆使して、トンボの変態と体色形成を制御する遺伝子群の同定に成功した。これらの中には、他の昆虫から類似の報告例がない結果が多く含まれていた。本研究成果により、昆虫の変態および体色形成の分子基盤とその進化に関する理解が深まることが期待される。