

## 論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻  
平成 24 年度博士課程単位取得退学

氏名 長峯 啓佑  
指導教員名 石川 幸男

論文題目 キボシカミキリ *Psacotha hilaris* における変態の制御に関する研究

完全変態昆虫の終齢幼虫は、蛹、成虫と変態し、その過程で形態、食性、行動を劇的に変化させることにより、その生活史を多様化させている。終齢幼虫の変態は、血中の幼若ホルモン (JH) の濃度低下とそれに続くエクダイソンの分泌により誘導される。エクダイソンは *Broad-Complex* 遺伝子 (*BR-C*) をはじめとする一次応答遺伝子群を誘導し、*BR-C* が蛹形質の発現に必要な二次応答遺伝子群を誘導する。JH、エクダイソン、*BR-C* の働きは完全変態昆虫に共通すると考えられている。一般に、終齢におけるエクダイソンの少量の分泌 (コミットメントピーク) をもって変態の開始とされることが多いが、コミットメントピークよりも前に蛹化へのプロセス、つまり血中 JH の減少は始まっている。鱗翅目のタバコスズメガ *Manduca sexta* では血中 JH の減少以降のプロセスは不可逆的で、血中 JH が減り始めた時点で蛹化の時期が決まる (蛹化運命決定)。タバコスズメガの終齢幼虫が最適な環境条件下で成長する場合、体重が *critical weight* と呼ばれる値に達すると血中 JH の減少、すなわち蛹化のプロセスが始まる。*critical weight* に達した後は摂食してもしなくても、蛹化タイミングは変わらない。つまり、*critical weight* に達した時点で蛹化運命が決定したことになる。一方、エンマコガネ類の 1 種 *Onthophagus taurus* などの鞘翅目の終齢幼虫では、絶食により蛹化運命が決定する現象、*starvation-induced pupation* (SIP) が知られている。SIP では、終齢幼虫は絶食タイミングにかかわらず、絶食から一定時間後に蛹化する。以上、

蛹化の開始が体重によって決まる昆虫と、絶食をキューとして蛹化へのプロセスが開始される昆虫を挙げたが、このように蛹化のプロセスの開始要因が明らかになっている昆虫種はきわめて限られている。また、ホルモンによる変態の制御機構、変態に関わるホルモンの生合成、代謝、シグナル伝達は今日までに盛んに研究されてきた一方で、いつ何をきっかけに蛹化運命が決定するのかに焦点を当てた研究は多くない。

キボシカミキリ *Psacotha hilaris* (鞘翅目：カミキリムシ科) はクワとイチジクの害虫であり、幼虫は幹や枝を、成虫は葉を食害する。本州、四国、九州に分布するキボシカミキリについては、その前胸背斑紋の形状の違いから、西日本型と東日本型に分けられている。キボシカミキリの蛹化、変態に及ぼす温度、日長、そして餌条件の影響は西日本型を用いて詳細に調べられており、鞘翅目昆虫における変態の制御に関する研究のモデルとして有利な条件を備えている。本研究は、西日本型のキボシカミキリにおける変態の制御機構を明らかにしようとしたものであり、まず、蛹化運命決定済の指標となりうる *Broad-Complex* 遺伝子について、そのクローニング、系統解析、発現解析を行った。これに続いて、キボシカミキリの終齢 (5 齢) 幼虫における蛹化運命決定タイミングを、絶食実験を駆使して詳細な解析を行った。

#### 1. キボシカミキリにおける *Broad-Complex* 遺伝子のクローニング、系統解析、発現解析

西日本型キボシカミキリの幼虫を 25°C、長日条件で飼育すると、一部の個体は 4 齢を終齢として蛹化するが、残りの個体は 5 齢を終齢として蛹化する。このように、環境が一定であっても終齢は一つの齢には固定していない。長日飼育下のキボシカミキリ 4 齢幼虫について、観察個体の発育運命—幼虫脱皮に向かうのか蛹化に向かうのか—を外見から判断することは、蛹化に向かう幼虫がガットパーシしない限りできない。観察個体の発育運命を判別する手法を確立できれば、変態の研究において実験の精度が向上すると期待できる。そこで、蛹化に必須の働きを持つ *BR-C* の発現レベルを判別基準として利用することを考えた。鞘翅目昆虫における *BR-C* の研究例はコクヌストモドキ *Tribolium castaneum* しかなく、カミキリムシ科の昆虫では *BR-C* に関する知見がまだない。*BR-C* が持つ zinc finger ドメインの変異型は昆虫種間で多様であるため、コクヌストモドキの知見をキボシカミキリに適用することはできない。そこでまず、キボシカミキリの *BR-C* をクローニングし、構造解析、系統解析を行った。つづいて、キボシカミキリ 4 齢幼虫における変態の進行を示す分子マーカーとして、*BR-C* 発現を利用するための基礎的知見を得ることを目的に発現解析を行った。

キボシカミキリから *Broad-Complex* 遺伝子 (*PhBR-C*) の 7 つの mRNA アイソフォームをクローニングした。それぞれのアイソフォームは異なる zinc finger ドメイン (Z1, Z2, Z3, Z2/Z3, Z4, Z5/Z6, Z6) を持っていた。Z5/Z6 アイソフォームには zinc finger ドメインの直前に未成熟終止コドンが存在していた。公開データベースに登録されている昆虫の *BR-C* について解析したところ、Z1~Z4 のアミノ酸配列は本種を含め、昆虫種間で高く保存されていた。Z5 はこれまでに、チャバネゴキブリ *Blattella germanica* やミカンキイロアザミウマ *Frankliniella occidentalis*, コクヌストモドキなどから発見されている。Z6 はこれまでに、不完全変態昆虫であるチャバネゴキブリからしか発見されていない。Z6 がキボシカミキリに存在し、全ゲノムが解読されているキイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* やカイコ *Bombyx mori* に存在しないことから、完全変態昆虫が進化する過程でゲノムから消失したことが示唆された。また、Z6 がキボシカミキリに存在し、全ゲノムが解読されているコクヌストモドキに存在しないことから、Z6 は鞘翅目が分岐した後にも、ゲノムから消失したことが示唆された。

異なる給餌条件で飼育した幼虫の脳、唾液腺、表皮において *PhBR-C* の発現量を測定したところ、*PhBR-C* はそれぞれの組織においてガットパージ後に発現のレベルが上昇し、前蛹期に高発現していた。これとは対照的に、脳においては恒常的な低い発現がみられた。キボシカミキリ 4 齢の蛹化が早期に誘導される給餌条件 (4 齢脱皮後 4 日間摂食させた後に絶食) では、表皮において早期の発現上昇がみられた一方、全く脱皮せずに死んでしまう条件 (4 齢脱皮直後から絶食) では、どの組織においても発現レベルの目立った変化は見られなかった。

## 2. キボシカミキリ 5 齢幼虫における蛹化運命決定タイミング

キボシカミキリの 5 齢幼虫は、脱皮直後に絶食させると餌を与え続けた場合より早期に蛹化する。これは、絶食させたキボシカミキリで SIP が惹起された可能性を示している。SIP は鞘翅目の昆虫 3 種で報告されているが、カミキリムシ科の昆虫では蛹化運命決定タイミングは研究されていなかった。そこで、キボシカミキリ 5 齢幼虫の蛹化運命決定タイミングを特定し、この種でも SIP が惹起されるのかを調べた。

キボシカミキリ 5 齢幼虫を様々なタイミングで絶食させ、絶食開始から蛹化までにかかる日数 (days to pupation : DTP) を調べた。DTP は絶食開始タイミングに対して一定ではなく、その関係は 5 齢 6 日目を境に 2 群に分けられた。6 日目以後では、絶食開始タイミングに関わらず DTP は一定であり、ゆえに SIP が惹起されたと考えられた。一方、6 日目前に

絶食開始した場合、絶食開始が遅くなるほど DTP が短くなり、これは既知の SIP とは異なっていた。次に、6 日目以後と以前で蛹化運命を決定するのに必要な絶食時間を調べ、比較した。6 日目以後は、いずれのタイミングで絶食開始させても一定の絶食時間後に蛹化運命を決定した。6 日目以前に絶食を開始した場合の蛹化運命決定に必要な絶食時間は、6 日目以後のそれに比べて長かった。これらの結果から、6 日目以前に絶食を開始した場合には 6 日目までは SIP が抑制され、6 日目から一定時間の絶食により SIP が惹起されたと結論づけた。これで、SIP は 4 種の鞘翅目昆虫、すなわちエンマコガネ類の一種 *O. taurus* (コガネムシ科)、セモンホソオオキノコムシ *Dacne picta* (オオキノコムシ科)、マメハンミョウ *Epicauta gorhami* (ツチハンミョウ科)、キボシカミキリ (カミキリムシ科) で見つかった。SIP は鞘翅目昆虫で共通に見られる蛹化運命決定機構なのかもしれない。その一方で、キボシカミキリ 5 齢幼虫では SIP の抑制期間がある点が他の鞘翅目昆虫の SIP とは異なっており、SIP にも多様性があることが示された。

キボシカミキリの 5 齢幼虫を自由に摂食させ続けると、自発的に摂食を終了し蛹化する。自発的な摂食の終了から蛹化までの日数と、6 日目以後に絶食させた個体の DTP を比較すると有意差は認められなかった。この結果から、自発的な摂食終了であっても強制的な絶食であっても、摂食を終了することが蛹化運命決定のキューとなっている可能性が強く示された。自発的な摂食終了と強制的な絶食から蛹化までのプロセスが同じであるとすれば、絶食から蛹化までを研究対象とすることで、過不足なく蛹化のプロセスを研究できると期待できる。

以上、本研究は、第 1 にキボシカミキリにおける *BR-C* の構造、系統進化、発現タイミングを明らかにしたものであり、*PhBR-C* の zinc finger ドメインの変異型は他の鞘翅目昆虫と比較しても多様であることが示された。また、表皮における *PhBR-C* の発現を変態の進行を判別するための分子マーカーとして利用できる可能性を示した。第 2 に、キボシカミキリにおいては 5 齢 6 日目以前には SIP は生じず、6 日目以後に限って SIP が生じることを明らかにした。SIP が見られる昆虫において、終齢に SIP が生じない期間が存在する例は他に見つかっていない。すなわち、本研究では新しいタイプの SIP を発見した。昆虫の変態制御に関与するホルモンや転写因子はおそらく完全変態昆虫で共通しているが、その利用方法は種により多様である。変態のしくみを統合的に解釈し、変態の進化史を説明するためには、より多くの昆虫種について解析する必要がある。