

## 【序論】

無毒な生物種（擬態種）が有毒な種（モデル種）の紋様や行動を似せて捕食を回避するベイツ型擬態は広範な動物に見られる。アゲハチョウには様々なベイツ型擬態が見られるが、メスのみが擬態する種が多く、中でもメスに擬態型と非擬態型の種内多型が存在する種はダーウィンの時代から興味を持たれてきた。これまで行動学や生態学の分野でメス限定ベイツ型擬態は研究されてきたが、「なぜメスのみが擬態できるのか」、「擬態型と非擬態型の違いは何か」といった疑問の背景にある分子機構はほとんど不明だった。南西諸島などに生息するシロオビアゲハ (*Papilio polytes*) では、擬態型のメスのみがモデル種ベニモンアゲハ (*Pachliopta aristolochiae*) に擬態し、その後翅の中央部には白色紋様、辺縁部に複数の赤色のスポット紋様が見られる (図 1 上)。それに対し非擬態型のメスではオスと同様に後翅に白色の帯状紋様が見られる。シロオビアゲハの擬態型の表現型は 1 遺伝子座 ( $H$  locus) によって制御され (Fryer, 1914)、また擬態型 ( $H$ ) は非擬態型 ( $h$ ) に対して優性であることが遺伝学的に示されている (Clarke and Sheppard, 1972)。一方、シロオビアゲハに近縁なナガサキアゲハ (*Papilio memnon*) でもメスに二型があり、擬態型メスのみがオオベニモンアゲハ (*Atrophaneura polyeuctes*) などのモデル種に擬態し、擬態型 ( $A$ ) が非擬態型 ( $a$ ) に対して優性であることが知られている (図 1 下) (Wallece, 1865)。いずれのアゲハでも擬態型の表現型は 1 遺伝子座 (各々  $H$ ,  $A$  locus) で制御されており、古くからその原因遺伝子が何であるかに興味をもたれてきた。また、遺伝学的な解析からこれらのベイツ型擬態は、複数の遺伝子が一団となって挙動する「supergene」により制御されると提唱されていた (Clarke and Sheppard, 1968, 1972) が、その実体は不明のままだった。そこで本研究では、まず全ゲノム構造解析 (東京工大・伊藤武彦らとの共同研究)、連鎖解析を介して両アゲハ種の擬態の原因遺伝子座を解明し、そこに含まれる遺伝子の構造と発現、擬態型と非擬態型に対応した構造の多型性を解明した。これを基に supergene の実体とメス限定ベイツ型擬態の進化プロセスを論じる (第 1 章)。次に、 $H$ ,  $A$  両遺伝子座に含まれる *doublesex* (*dsx*) がメス限定ベイツ型擬態を中心に制御していると考え、*dsx* アイソフォームの機能解析、*dsx* の標的遺伝子の探索と機能解析から、*dsx* が擬態紋様形成においてどのような役割を果たしているかを明らかにした (第 2 章)。

## 【結果・考察】

## 1. アゲハチョウ二種におけるメス限定ベイツ型擬態の原因領域の解明

## アゲハチョウ二種におけるベイツ型擬態の原因領域の同定

堀寛・名大名教授の先行研究により、シロオビアゲハ  $H$  座の原因領域は第 25 染色体の 1Mb 程度の領域まで絞られていた。そこで、ゲノム情報を基に一塩基多型 (SNP) マーカーを候補領域内に多数設計し、野外の非擬態型メス 28 匹、擬態型メス 26 匹について塩基の多様性と表現型の連関を調べた。その結果、擬態の原因領域が *doublesex* (*dsx*) の近傍約 200kb に絞られた (図 2a)。一方、シロオビアゲハ全ゲノム解析の結果、ゲノム中に 100kb 以上にわたって相同性の低い (90%以下) 領域 (以下 highly diversified region, HDR) が 15 箇所見つかった。そのうち 14 箇所は ZW 染色体上にマップされたが、1 箇所は連鎖解析と同じ第 25 染色体の *dsx* 近傍領域 (以下 *dsx*HDR) に由来することが判明した。擬態型メスおよび非擬態型メスで得られた RNA-seq リードを、2 種類の *dsx*HDR 配列を含むそれぞれの scaffold にマップしたところ、各 *dsx*HDR

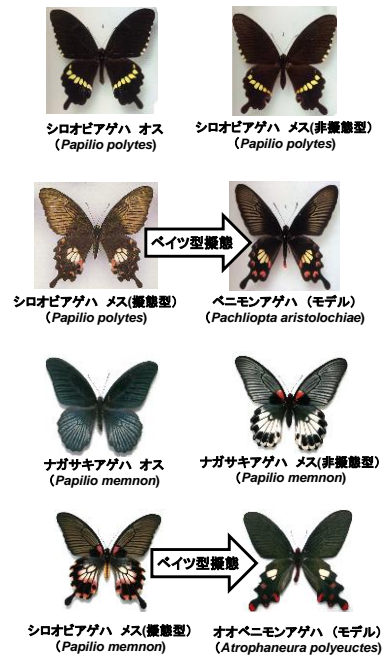


図 1 アゲハチョウ二種におけるベイツ型擬

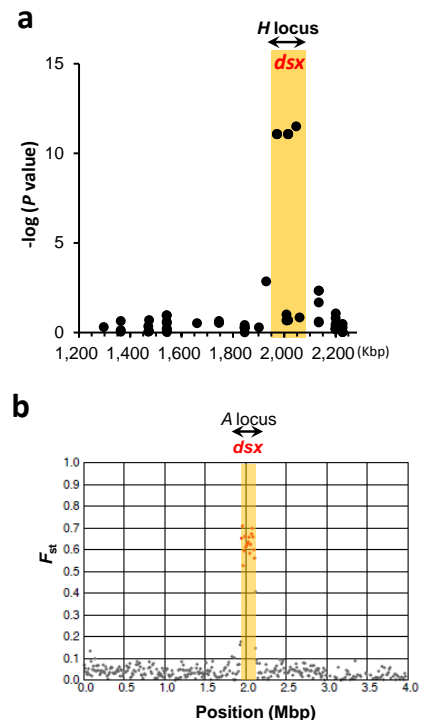


図 2 SNP を用いた連鎖解析による原因領域の同定

(a) シロオビアゲハの連鎖解析により用いた遺伝子マーカーの位置(黒点)と表現型と塩基の多様性との相関( $P$  value)を示している。(b) ナガサキアゲハの連鎖解析により用いた SNPs の位置(黒点)と表現型と塩基の多様性との相関 ( $F_{st}$ )を示している。どちらも同定された原因領域内で *dsx* 近傍の SNPs の多型が擬態型表現型と連関している。

擬態型メスおよび非擬態型メスで得られた RNA-seq リードを、2 種類の *dsx*HDR 配列を含むそれぞれの scaffold にマップしたところ、各 *dsx*HDR

(*H*と*h*)は、擬態型と非擬態型の表現型に必ず対応して一致した。この結果は、原因領域で100kb以上にわたり構造が異なる2種類の第25染色体(*H*, *h*)があり、*H*が擬態型表現型形成に関与していることを強く示唆した。ナガサキアゲハでは、台湾由来の擬態型と非擬態型メスの全10個体の全ゲノム配列を決定し、SNPの多型を基に連鎖解析を行ったところ、*dsx*近傍の領域に原因遺伝子座*A*が同定された(図2b)。また、ゲノム中のHDR領域を探索したところ、シロオビアゲハと同様に擬態型と非擬態型に完全に対応する2種類の配列(*A*と*a*)が*dsx*近傍領域で見つかった。この結果は、シロオビアゲハとナガサキアゲハで同様の構造と機構により、メス限定ベイツ型擬態が生じていることを予想させた。

#### アゲハチョウ二種におけるベイツ型擬態原因領域の構造の比較

アゲハ二種の擬態原因領域でなぜ2種類の配列が生じているのだろうか?この疑問に答えるために、まずシロオビアゲハの*H*と*h*の*dsx*HDR領域の両端を同定した(図3a)。その結果、シロオビアゲハの*dsx*HDRの長さは約130kbpで、その中に完全長の*dsx*遺伝子が含まれていた。興味深いことに、*dsx*遺伝子の方向性は*H*と*h*で異なっており、両*dsx*HDRはその末端で染色体逆位を起こしていた。石垣島、沖縄本島、ラオスなどの複数個体を用いてゲノムPCRで確認したが、全ての個体で*H*と*h*間で染色体逆位が生じていた。逆位のため、*H*と*h*間の配列相対性は、*dsx*HDR内部では極めて低いが、外側ではほぼ100%だった。しかし、同じ向きで比較しても*H*と*h*間の*dsx*HDR内部の相対性は低かった(図3a)。染色体逆位はその領域での相同組換えを抑制すると考えられている。従ってこの結果は、染色体逆位が起こった後*H*と*h*に多数の突然変異が蓄積し、組換え抑制により変異が固定して両者の構造と機能が分化したと推測される。一方、ナガサキアゲハの*dsx*HDRの左端(*Prospero*に近い側)はシロオビアゲハと同じ位置で全長は約168kbpだった(図3b)。しかし、予想外にナガサキアゲハの*dsx*HDRには染色体逆位が見られなかった。全ゲノム配列および*dsx*HDRにおけるトランスポゾン・反復配列の割合を調べたところ、*A*, *a*ともに他のゲノム領域に比べて多数のトランスポゾン・反復配列が挿入されていることが分かった。組換えが抑制された領域にはトランスポゾンや反復配列が多数存在し(Sniegowski and Charlesworth, 1994)、逆に多数のトランスポゾン・反復配列の挿入は組換えを抑制する(Gorelick, 2003)と報告されていることから、ナガサキアゲハではシロオビアゲハと異なるメカニズムにより*dsx*HDRの二型が生じ、維持されてきた可能性がある。

#### ベイツ型擬態原因領域内に存在する遺伝子の構造と発現解析

次に、上記の擬態遺伝子座が複数の遺伝子で構成される「supergene」である可能性を検証するために、RNA-seqデータを用いて*dsx*HDR近傍の転写状況を調べ、正確な遺伝子構造を明らかにすることにした。*dsx*HDRで大部分を占める*Dsx*は性分化に関与する転写因子で、2種類の主要ドメイン(DNA結合ドメイン・多量体化ドメイン)を含み、シロオビアゲハでは*H*と*h*間で最大15箇所(アイソフォームによって異なる)、ナガサキアゲハでは*A*と*a*間で4箇所のアミノ酸変異が存在した。両者の変異の多くは主要ドメイン外に見られたが、シロオビアゲハでは1箇所、ナガサキアゲハでは2箇所が多量体化ドメイン内のアミノ酸が置換していた。アゲハ二種の擬態型(*H*と*A*)の*Dsx*(以下*Dsx-H*, *Dsx-A*)のアミノ酸変異(の一部)が擬態形質の誘導に関与している可能性があるが、変異箇所は両者で一致しておらず今後検証していく必要がある。興味深いことに蛹期初期(P2)の擬態型メス(*Hh*, *Aa*)の後翅においては*dsx-H*, *dsx-A*が*dsx-h*, *dsx-a*に比べてそれぞれ強く発現しており、アゲハ二種で擬態型*dsx*の発現誘導が擬態形質に関与している可能性が示唆された(図4)。

*dsx*以外の遺伝子に関しては、両アゲハ種の*dsx*HDRの左端に、広範な生物種で保存されている*ubiquitously expressed transcript*(*UXT*)の5'UTRが存在していた。*UXT*のORFはHDRの外側にありタンパク質構造に違いは生じないが、転写開始点はHDRの内部にあるため、擬態型と非擬態型で発現の制御が異なることが予測された(図3b)。また、シロオビアゲハでは*H*にのみ*UXT*の右側に3つのエ

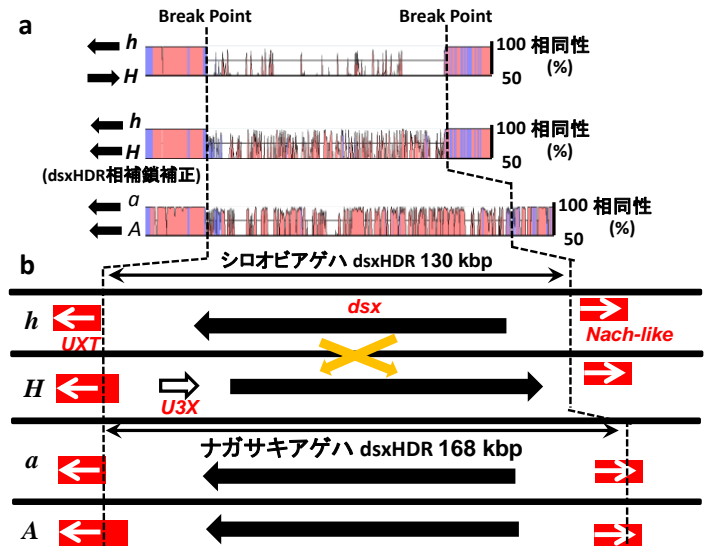


図3 ベイツ型擬態原因領域(*dsx*HDR)周辺の二型構造と両者の配列相対性の比較

(a) *h*の方向性を基準として、*h*と*H*(順向き)、*h*と*H*(逆向き)および*a*と*A*の*dsx*HDR領域における配列相対性(%)をプロットした。(b) *dsx*HDR周辺の二型構造を模式的に示している。点線はBreakpointを示し、白色矢印は*UXT*, *Nach-like*のORFを示している。

クソンを持つ non-coding RNA、*Unknown-3-exons (U3X)*が存在した。一方、ナガサキアゲハの *dsxHDR* の右端には Breakpoint を跨ぐ形でナトリウムチャンネル様遺伝子 *Nach-like* が存在し、*dsxHDR* 内の領域で *A* と *a* でアミノ酸配列が 10 箇所異なっていた。*Nach-like* の発現は卵巣での発現量に比べて低く、ほとんど検出できなかったが、*UXT* と *U3X* は非擬態型メス (*hh, aa*) に比べ擬態型メス (*HH, AA*) の後翅 (P2 期) で強く発現しており (図 4)、擬態形質の形成に関与している可能性が示唆された。以上の結果から、両種のベイツ型擬態の原因領域には複数の遺伝子が存在していることが明らかとなった。鱗翅目昆虫の *Dsx* では、一般にメスで 3 種 (F1-F3)、オスでは 1 種の isoform が存在するが、アゲハ二種においても各 isoform が確認された。isoform の発現の違いが擬態形質に影響している可能性が考えられたので、*dsx* の各 isoform の発現量を計測した。その結果、シロオビアゲハの擬態型メス (*HH*) および非擬態型メス (*hh*) では F1, F2 に比べて F3 が高い発現を示し、F3 において擬態型メス (*HH*) では非擬態型メス (*hh*) に比べて高い発現を示した。また擬態型メス (*HH*) の後翅の紋様領域ごとに定量したところ、赤色スポット紋様で F3 の高い発現が見られた。以上のことから、シロオビアゲハでは isoform F3 が擬態紋様形成に主に関与している可能性が示唆された (図 5a)。ナガサキアゲハでは全ての isoform が強く発現していたが、F3 が非擬態型 (*aa*) に比べ擬態型 (*AA*) で強く発現していた (図 5b)。一方、オスの翅では、精巣と比べ、genotype に関わらず両種でオス型 *dsx* の発現はほとんど見られなかった (図 5c, d)。この結果は、オスの後翅では *dsx-H*, *dsx-A* が発現しないため擬態紋様が形成されない可能性を示唆する。

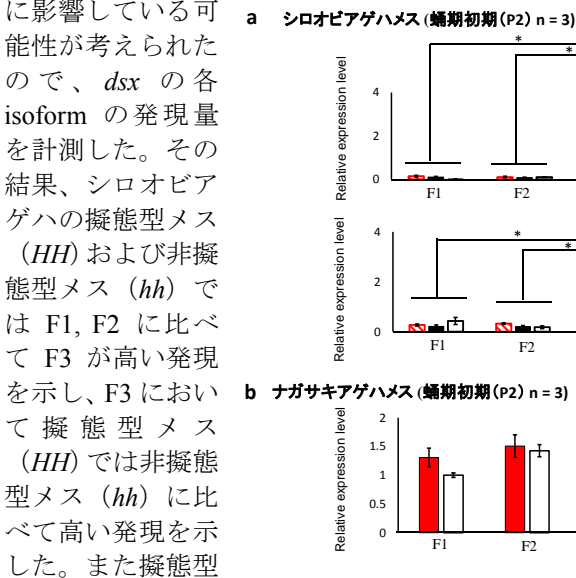
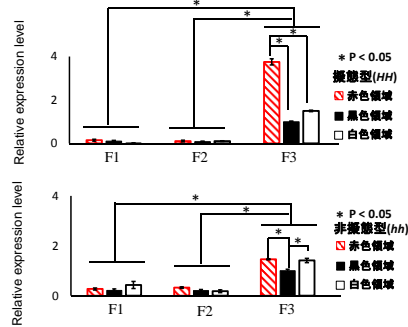


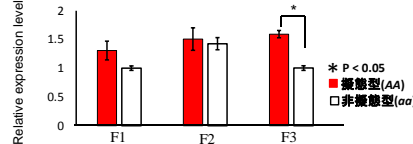
図 4 *dsxHDR* 内の遺伝子発現量の比較

(a)シロオビアゲハにおける非擬態型メスの発現量を 1 とした 3 遺伝子 (*dsx*, *UXT*, *U3X*) の相対発現量。 (b)ナガサキアゲハ非擬態型メスおよび卵巣での *Nach-like* の発現量を 1 とした 3 遺伝子 (*dsx*, *UXT*, *Nach-like*) の相対発現量。\* $P < 0.05$ , Student's t-test (ND, Not detected)。

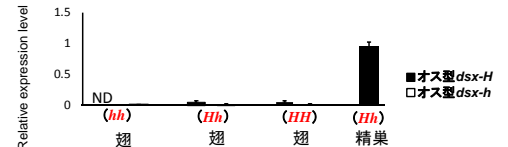
a シロオビアゲハメス (蛹期初期 (P2) n = 3)



b ナガサキアゲハメス (蛹期初期 (P2) n = 3)



c シロオビアゲハオス (蛹期初期 (P2) n = 3)



d ナガサキアゲハオス (蛹期初期 (P2) n = 3)

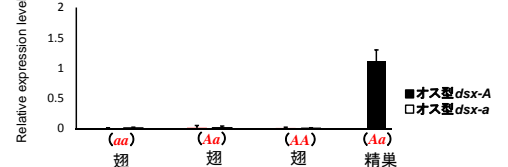


図 5 アゲハチョウ二種における *dsx* isoform ごと の翅での発現

(a)シロオビアゲハ擬態型メス (*HH*) と非擬態型メス (*hh*) における黒色領域での isoform F3 の発現量を 1 とする isoform F1-3 の相対発現量、(b)ナガサキアゲハ非擬態型メス (*aa*) の isoform F3 の発現量を 1 とした isoform F1-3 の相対発現量、(c)シロオビアゲハオス (*HH, Hh, hh*)、(d)ナガサキアゲハオス (*AA, Aa, aa*) における精巣の発現を 1 としたオス型 *dsx* の相対発現量を示している。\* $P < 0.05$ , Student's t-test (ND, Not detected)。

2. シロオビアゲハにおける *Dsx* を介した擬態紋様形成の制御機構

当研究室の西川は *in vivo* エレクトロポレーション法を用いて、シロオビアゲハの擬態型メス蛹翅に擬態型 *dsx-H* 及び非擬態型 *dsx-h* に対する siRNA を導入したところ、前者の場合にのみ擬態型の表現型が抑えられ非擬態型の表現型が生じることを確認した (Nishikawa et al. 2015)。この結果は、*dsx-H* が擬態紋様を制御していることを示すが、各 isoform の機能解析は行われていなかった。そこで、*dsx* の各 isoform を標的とした siRNA を設計して擬態型メスの翅でノックダウンした結果、擬態型 *dsx* F3 に対する siRNA のみで、擬態型の表現型が抑えられ、非擬態型の表現型が確認された。この結果は上記の発現解析と合わせ、擬態型 *dsx* F3 が翅の擬態紋様形成に重要な役割を果たしている可能性を支持する。

擬態型 *Dsx* はどのような下流遺伝子を介して擬態紋様を制御しているのだろうか？この疑問に答えるために以下の手法を確立した。シロオビアゲハ擬態型メスの蛹化直後の後翅に *in vivo* エレクトロポレ

ーション法を用いて擬態型 *dsx* を標的とする siRNA を導入し、1~3 日後 (P1~P3) にノックダウンされた翅と通常翅の間で RNA-seq データを取得・比較することで、*Dsx* の制御下で発現変動する遺伝子を探索する。この方法により得られた多数の変動遺伝子の中で、P1~P3 の複数の時期で発現量が減少した 2 遺伝子 (*Wnt1*, *Wnt6*) および P1 に発現上昇する遺伝子 (*abdA*) に着目した。定量 RT-PCR で 4 遺伝子 (*dsx*, *Wnt1*, *Wnt6*, *abdA*) の経時的な遺伝子発現を調べると、*Wnt1*, *Wnt6* は *dsx* と同様に擬態型メスのみ P1~P2 に急速に誘導される一方、*abdA* は非擬態型の P1 で高い発現が見られた (図 6a)。更に、擬態型 *dsx* をノックダウンした場合、2 遺伝子 (*Wnt1*, *Wnt6*) では発現が低下し、*abdA* では発現が上昇した (図 6b)。この結果は、3 遺伝子が *Dsx* によって制御されていることを示唆する。*abdA* をノックダウンすると、非擬態型メスでは辺縁部の紋様に変化が生じたが、擬態型メスの翅では変化がなかったことから、*abdA* は非擬態型の翅紋様に関与している可能性が高い。一方、擬態型メスで *Wnt1* をノックダウンすると、非導入部に比べ赤色スポット紋様が委縮・消失し、中央部の白色紋様も消失する表現型が確認された (図 7a)。*Wnt6* ノックダウンでは赤色スポット紋様が委縮・消失する表現型が確認された (図 7b)。*Wnt1* と *Wnt6* をダブルノックダウンすると赤色スポット紋様が委縮・消失し、中央部白色紋様も消失する表現型が確認された (図 7c)。以上の結果より、白色紋様は *Wnt1*、また赤色スポット紋様は *Wnt1* と *Wnt6* によって制御されていることが機能的に示された。この結果を支持するように、*Wnt1* は白色領域で、*Wnt1* と *Wnt6* は赤色スポット紋様で領域特異的に発現している。*dsxH* のノックダウンにより *Wnt1* と *Wnt6* の発現量は低下したが、*Wnt1* と *Wnt6* をノックダウンした場合には *dsxH* の発現量に変化がなかったことから、*Wnt1* と *Wnt6* は *dsxH* の制御下にあると考えられる。

### 【結論】

本研究から、近縁な二種の蝶シロオビアゲハとナガサキアゲハのメス限定ベイツ型擬態の原因遺伝子座の構造が明らかとなった。両原因遺伝子座は常染色体上の同一の位置にあり、①擬態型と非擬態型に対応した相同性の低い二種類の配列が存在する、②複数の遺伝子 (*UXT*, *U3X*, *dsx*, *Nach-like*) から構成される supergene 構造をもつ、③擬態型の遺伝子は擬態型メスで強く発現している、などの共通の性質が見られた。しかしシロオビアゲハに見られる染色体逆位構造はナガサキアゲハにはなく、二型構造の発生と維持は異なるメカニズムに依存している可能性が高い。一方、擬態型 *Dsx* に関しては、①シロオビアゲハでは isoform-3 が主に機能している、②その発現は、非擬態型メス、オスの後翅では抑制されている、③その下流で *Wnt1*, *Wnt6*, *abdA* が紋様形成に関与している、等の結果からメス限定ベイツ型擬態の制御機構が明確となった。

### 【発表論文】

1. \*H. Nishikawa, \*T. Iijima, R. Kajitani et al.: A genetic mechanism for female-limited Batesian mimicry in *Papilio* butterfly. *Nat genet* 47, 405-409. (2015) (\*, equally contributed)
2. \*T. Iijima, \*R. Kajitani, S. Komata, C.-P. Lin, T. Sota, T. Itoh, H. Fujiwara: Parallel evolution of Batesian mimicry supergene in two *Papilio* butterflies, *P. polytes* and *P. memnon*, submitted. (\*, equally contributed)

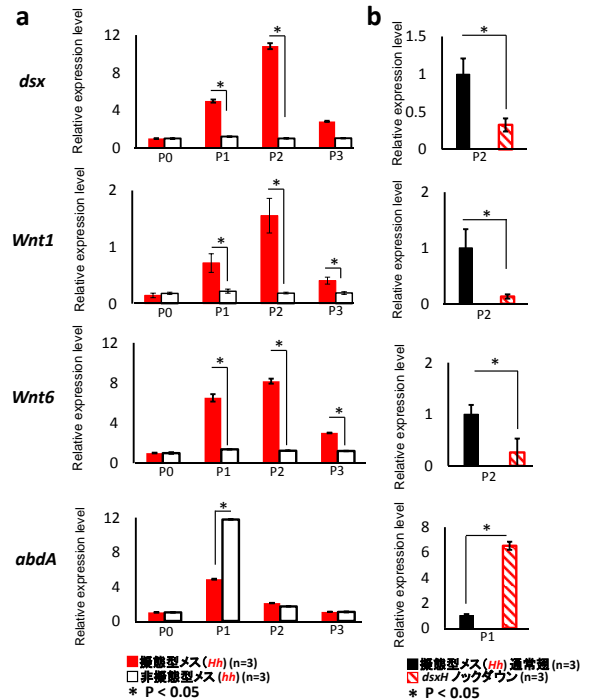


図 6 擬態型 *dsx* の制御下にある候補遺伝子の発現変動

4 遺伝子 (*dsx*, *Wnt1*, *Wnt6*, *abdA*) における (a)シロオビアゲハ擬態型メス (*Hh*) と非擬態型メス (*hh*) における P0 の発現量を 1 とした経時的 (P0-3) な相対発現量。 (b)シロオビアゲハ擬態型メス (*Hh*) 通常翅での発現量を 1 とした *dsx-H* ノックダウンにおける相対発現量。 \* $P < 0.05$ , Student's t-test.

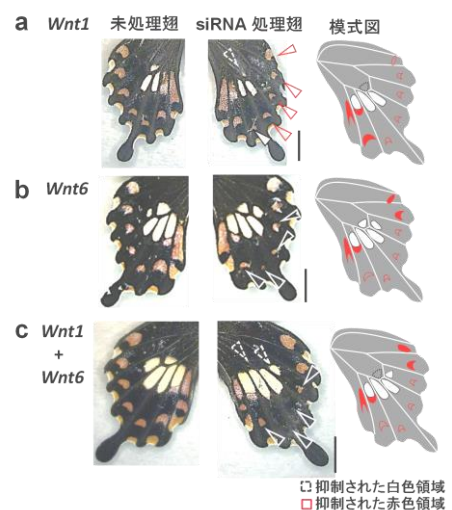


図 7 *Wnt1*, *Wnt6* ノックダウンによる擬態型メスの表現型の変化 Scale bars: 1cm.