

博士論文（要約）

アゲハチョウ二種におけるメス限定ベイツ型擬態の
分子機構に関する研究

飯島択郎

目次

序論	1-10
材料と方法	11-23
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	
背景	24-25
結果	25-35
考察	35-38
Figure and Tables	39-69
2. シロオビアゲハにおけるメス限定ベイツ型擬態への <i>H allele</i> がもたらす影響	
2-1. シロオビアゲハにおける <i>Dsx</i> を介した擬態紋様形成の制御機構	
背景	70-71
結果	71-75
考察	75-76
Figures and Tables	77-93
2-2. シロオビアゲハにおける <i>H allele</i> がもたらす成育への影響	
背景	94
結果	94-97
考察	98-99
Figures and Tables	100-106
総合考察	107-108
謝辞	109
参考文献	110-118
Supplementary Figures and Tables	119-139

序論 Introduction

地球上の生物は生き残るために様々な生存戦略を編み出してきた。中でも、昆虫は自然界における食物連鎖の下位に位置し、絶えず捕食者に狙われ、攻撃を受けている。絶え間ない捕食圧の環境下を生き抜くために、昆虫は様々な防衛手段を取得・発達させてきた。例えば、翅や皮膚に特徴的な紋様（目玉模様等）を生じさせ、捕食者の眼をそらせることで攻撃を回避する（Janzen et al., 2010）、体内で毒素を生産・蓄積することで捕食対象とならないようにする（Wray et al., 1983; Nishida and Fukami, 1989）、などが知られる。このような防衛手段の中でも、モデルに似せることで捕食者などをだます「擬態」は、紋様形態・模倣様式において非常に多様性に富んでおり、進化生物学、生態学、動物行動学など様々な分野で古くから着目されてきた（Darwin, 1872）。昆虫における擬態様式では枯葉や枝など周囲の環境に似せて形質を変化させることで捕食者をだます「隠蔽型擬態」が良く知られるが、系統的に離れた種に似せることで捕食者を欺く擬態も存在する。典型的な例として、無毒（つまりまずくない）な種が、系統的に離れた有毒種あるいは味が悪いモデル種に紋様・形態などが似ることによって、捕食者からの捕食を免れる現象であるベイツ型擬態が知られる（Bates, 1862）。有毒種は派手な色彩を示すなど捕食者の眼につくような警戒色を示し（Mallet and Joron, 1999）、捕食者に自身が危険であることを認識させ、それを避けるように学習させる効果があると考えられている。ベイツ型擬態は、有毒種と同じ生息域に属する無毒種が捕食圧にさらされた結果、有毒種を模倣するものが選択されて生じた擬態であると考えられる。ベイツ型擬態は昆虫だけでなく、両生類・魚類・爬虫類など広範な生物種に認められ、またモデル種と擬態種が明瞭であり、紋様や形態をよく似せることから研究者のみならず多くの人目を引いてきた。アゲハチョウには様々なベイツ型擬態が見られるが、メスのみ擬態する種が多く見られるという特徴がある（Fig. 1）（Brower, 1962; Turner 1978; Kunte, 2009）。例としては、アフリカに生息するオスジロアゲハ（*Papilio dardanus*）が知られる。オスジロアゲハはシロモンマダラ（*Amauris*

niavius : 有毒種または鳥が嫌うまずい味がする種) に対して擬態していると考えられているが、一部のメスに擬態するタイプ (擬態型) が出現し、その中には少なくとも 6 種類の多型が存在しており、それぞれが別のマダラチョウに擬態していることが観察されている (Ford, 1936 ; Timmermans et al., 2014)。また、北米に生息するアオジャコウアゲハ (*Battus philenor*) はウマノスズクサという毒草を幼虫期の食草とすることで体内に毒素を蓄積している有毒種である。このチョウにベイツ型の擬態をするチョウとしては、クスノキアゲハ (*Papilio troilus*) とトラフアゲハ (*Papilio glaucus*) が知られている (Brower, 1958; Scriber et al., 1996)。クスノキアゲハは雌雄ともにアオジャコウアゲハに似た翅紋様を示す擬態型となるが、トラフアゲハではメスにおいてのみ、オスと同様の翅紋様を示す擬態しないメス (非擬態型) とアオジャコウアゲハに似た翅紋様を示す擬態型メスとの種内多型が現れる。アゲハチョウ族 (Papilionini) には、キアゲハ (*Papilio machaon*) やナミアゲハ (*Papilio xuthus*) など擬態をしない種も存在するが、メスに擬態型と非擬態型の種内多型が存在する種は、性にリンクして擬態形質が見られることなどから、その分子機構と進化的なプロセスについて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 (Uesugi, 1996, 上杉 1999; Ohsaki, 2005; 大崎 2009; Sekimura et al., 2014; Kitamura and Imafuku, 2015)、 「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。そこで本研究ではメスに擬態型と非擬態型の種内多型が存在する種として知られるシロオビアゲハ (*Papilio polytes*)、およびナガサキアゲハ (*Papilio memnon*) の二種のアゲハチョウに着目し、研究することとした。

シロオビアゲハは東南アジアの熱帯地域から南アジアにかけて広く分布し、日本では沖縄など南西諸島に生息するチョウである。シロオビアゲハは有毒なチョウであるベニモンアゲハ (*Pachliopta aristolochiae*) にベイツ型擬態をすることでよく知られる (Euw et al., 1968; Uesugi, 1996) (Fig. 2)。シロオビアゲハでは一部のメス (擬態型) だけが、ベニモ

ンアゲハに似て中心部分に白色紋様を生じ、辺縁部に多数の赤色スポット紋様を示す。一方、オスと擬態しないメス（非擬態型）は後翅に白い帯状の紋様を示す。従って、メスにおいてのみ非擬態型および擬態型の種内多型が存在するベイツ型擬態である。シロオビアゲハの擬態型とベニモンアゲハの翅紋様は似通っているが系統的には離れており（Condamine et al., 2012）、系統的に離れた種間の紋様の類似性がどのように獲得されてきたのかは興味深い（Fig. 3）。シロオビアゲハは比較的飼育が容易であり、ミカン類を用いて研究室でも累代飼育することが可能であるため、実験に使用しやすい。シロオビアゲハのベイツ型擬態に関しては、いくつか興味深い事実が報告されている。八重山諸島の個体群変動調査によると、ベニモンアゲハの生息する島では擬態型メスと非擬態型メスの寿命は同じだが、ベニモンアゲハの生息しない島では非擬態型メスに比べて擬態型メスの寿命が短いと報告されている（Uesugi, 1991）。この結果は温室での飼育個体でも同様の傾向が見られており（擬態型メスの方が生理的な寿命が短い）、またオスと比べた場合、非擬態型メスはオスよりも寿命が長い、擬態型メスはオスと同等の寿命であると報告されている（Ohsaki, 2005）。更に、南西諸島にベニモンアゲハが分布し始めたのは最近（1960年代とされる）とのことだが、ベニモンアゲハが同所的に生息し、数が増えると、擬態型メスが新たに出現しはじめ、数が増える（モデルとなる毒蝶の数に対応する）ことが知られる（上杉 1999）。配偶行動においては、オスは非擬態型メスを好むが、メスはオスを選ばない（人為的に作製した紋様個体とも交尾する）ことが報告されている（大崎 2009; Sekimura et al., 2014）。更に行動観察の結果から、シロオビアゲハ擬態型メスはベニモンアゲハの飛び方を似せていると報告されている（Kitamura and Imafuku, 2015）。さらに、シロオビアゲハの擬態型では紋様のプレパターンおよび色素合成系の両方が変化していることが近年明らかとなった（Nishikawa et al., 2013）。このように、シロオビアゲハにおいてベイツ型擬態が生殖行動や行動擬態にも関与しているなど、複雑で高度な適応形質が明らかになりつつあるが、その実体については全く不明である。

シロオビアゲハに近縁な種であるナガサキアゲハは、東インドから台湾・日本までの東南アジア全域に広く分布しており、シロオビアゲハと同様にメスに擬態型・非擬態型の二型が存在する (Fig. 4) (Clarke et al., 1968; Yagi et al., 1999; Zakharov et al., 2004)。また、日本では擬態型メスの報告例は九州・沖縄でのごく少数に限られており、非擬態型メスのみ生息するとされている (Clarke et al., 1968; 福田 二町, 1985)。オスは翅全体が黒色の鱗粉に覆われているが、メスでは後翅中央部に白色紋様を生じ、その辺縁部に赤色紋様を示す。さらに、擬態型のメスではオス及び非擬態型メスにはない尾状突起を生じ、また腹部の側面を橙色に着色することで、系統的に離れたオオベニモンアゲハ (*Atrophanaura polyeuctes*) などのベニモンアゲハ属 (*Pachliopta*)・ジャコウアゲハ属 (*Atrophanaura*) に擬態していると言われている (白水, 1966; Clarke et al., 1968; Clarke and Sheppard, 1971; Condamine et al., 2012) (Fig. 3)。

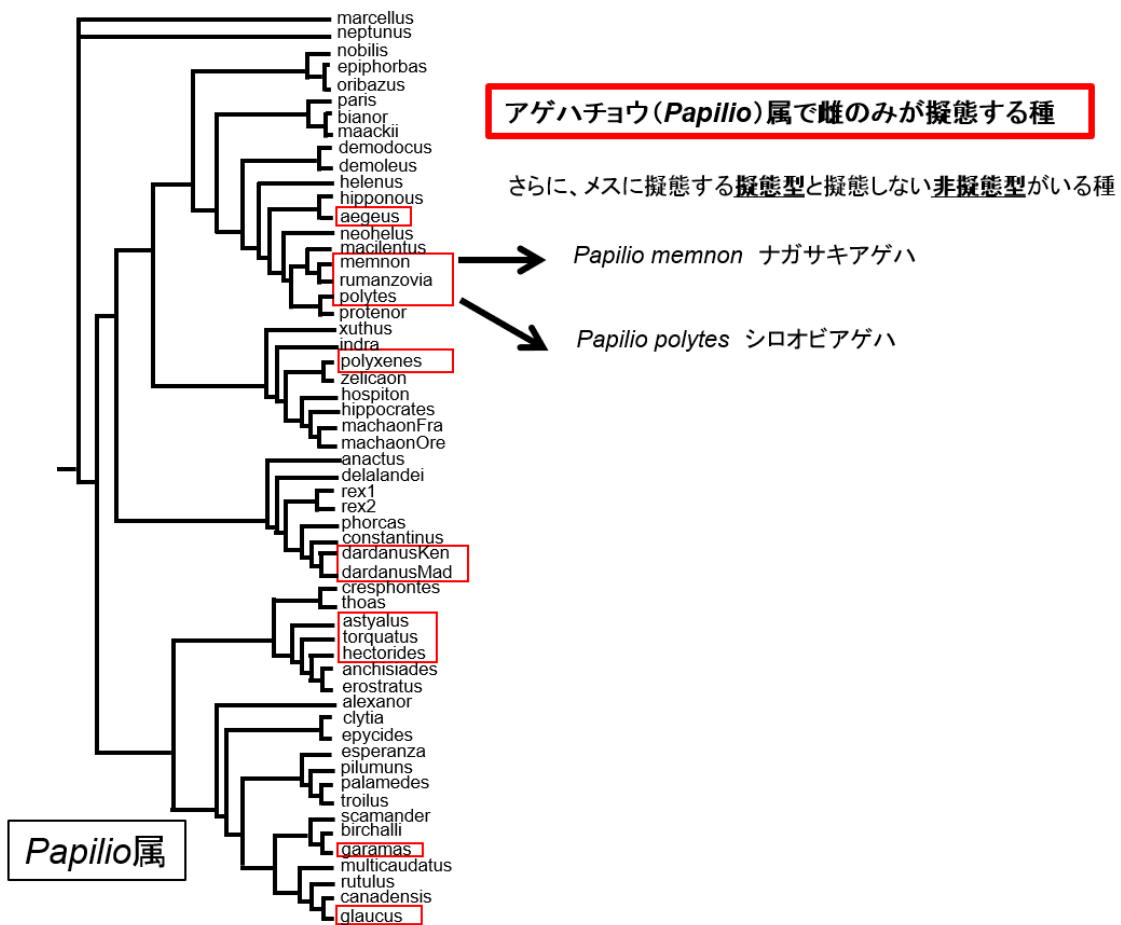
遺伝学的な背景として、いずれのアゲハでも擬態型の表現型は1遺伝子座(各々 *H, A* locus) で制御されており (Fryer, 1914; Clarke et al., 1968; Clarke and Sheppard, 1972)、擬態型 (*H/A*) が非擬態型 (*h/a*) に対して優性であることが知られている (Clarke and Sheppard, 1972; Wallace, 1865)。ナガサキアゲハにおける擬態の遺伝子座名についてはこれまでの論文では明記されていないため、当論文ではシロオビアゲハの *H* 遺伝子座と区別する目的で以降 *A* 遺伝子座と命名し使用している。興味深い点として、両種のオスは遺伝型に関わらず擬態しない。また、翅紋様だけでなく、尾状突起などの翅の形状や飛行行動など複数の形質が擬態の影響を受けていることである。複数の適応形質を制御する仮説として、複数の遺伝子が染色体の一部として挙動を共にする「超遺伝子 (supergene)」により制御されるという仮説が古くから提唱されている (Darlington and Mather, 1949; Clarke and Sheppard, 1960)。Supergene 仮説は鳥の羽毛多型や魚の隠蔽紋様多型、植物の長短花柱多型など様々な種での多型の制御機構として報告されており (Schwander et al., 2014)、更には、オスジロアゲハ (Nijhout, 2003; Timmermans et al., 2014) のベイツ型

擬態、ドクチョウのミューラー型擬態 (Joron et al., 2011) などチョウの翅紋様において *supergene* の関与が示されている。アゲハ二種のベイツ型擬態においても *supergene* により制御されると提唱されており (Clarke et al., 1968; Clarke and Sheppard, 1972)、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が、その実体は不明のままだった。従って、アゲハ二種に関してベイツ型擬態の分子の実体が明らかにできれば、*supergene* のような進化上の大きなコンセプトに肉薄できる可能性がある。アゲハ二種のベイツ型擬態において特筆すべき点は、同種・同性内に二型を生じることである。このことは、分子遺伝学的なアプローチや、最新のゲノム科学の手法を動員し、擬態型と非擬態型のゲノム構造比較により有用な情報が得られることを意味し、メス限定ベイツ型擬態の分子メカニズムに迫れる可能性がある。また、近縁な二種の原因領域を比較することで、ベイツ型擬態の進化プロセスが明らかになると期待された。

このような研究背景のもと、2012年より本研究室が中心となり次世代シーケンサーを用いたシロオビアゲハ・ナガサキアゲハ・ナミアゲハ (*Papilio xuthus*) の *de novo* でのゲノム解析が行われてきた。その結果、現時点で極めて精度の高いゲノム配列が得られており (Nishikawa et al., 2015)、本研究に活用できることが期待された。また、鱗翅目全体を見てみても、カイコ (*Bombix mori*) (The International Silkworm Genome Consortium, 2008)、オオカバマダラ (*Danaus plexippus*) (Zhan et al., 2011) など他の鱗翅目昆虫のゲノム情報を利用できる環境がある程度整っており、鱗翅目昆虫の進化の過程において、原因遺伝子座内でどのようなゲノムの変化が起きているのかを調べることも容易であると考えられた。

そこで本研究では、まず全ゲノム構造解析 (東京工業大学・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 (1章)。

次に、*H* 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的に制御していると考え、シロオビアゲハを用いた *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 (2 章 1 節)。これまでの生態学・行動学の分野での実験結果から、複合的な擬態形質の存在が指摘されてきており、また、擬態型メスの寿命へ影響があるとの報告から *H* を持つことでの擬態型メスの成育への不利益が予想された。そこで最後に、シロオビアゲハを用いて遺伝子型 (*HH*、*Hh*、*hh*) ごとに雌雄で掛け合わせを行い、蝶区ごとに、産卵数・孵化率・5 齢幼虫までの生存率を算定して、雌雄の遺伝子型ごとの成虫・幼虫への影響を調べ、*H* がもたらす成育への影響を明らかにした。また、人為的な *HH* 個体作製過程において発見した興味深い現象 (*Hh* 個体との紋様の差異および室内・野外集団での *HH* メス個体の出現頻度) について、これまでの結果を踏まえて考察し、論じた (2 章 2 節)。



Kunte *et al.*, 2009を改変

Figure 1. アゲハチョウ族におけるベイツ型擬態 アゲハチョウ族における系統関係を示した図であり、アゲハチョウ族にはメスのみ擬態する種(赤枠)が多く見られるという特徴がある。その中で、メスに擬態する擬態型と擬態しない非擬態型がいる種であり、系統的に近縁なシロオビアゲハとナガサキアゲハに着目した。Kunte *et al.*, 2009 より改変。

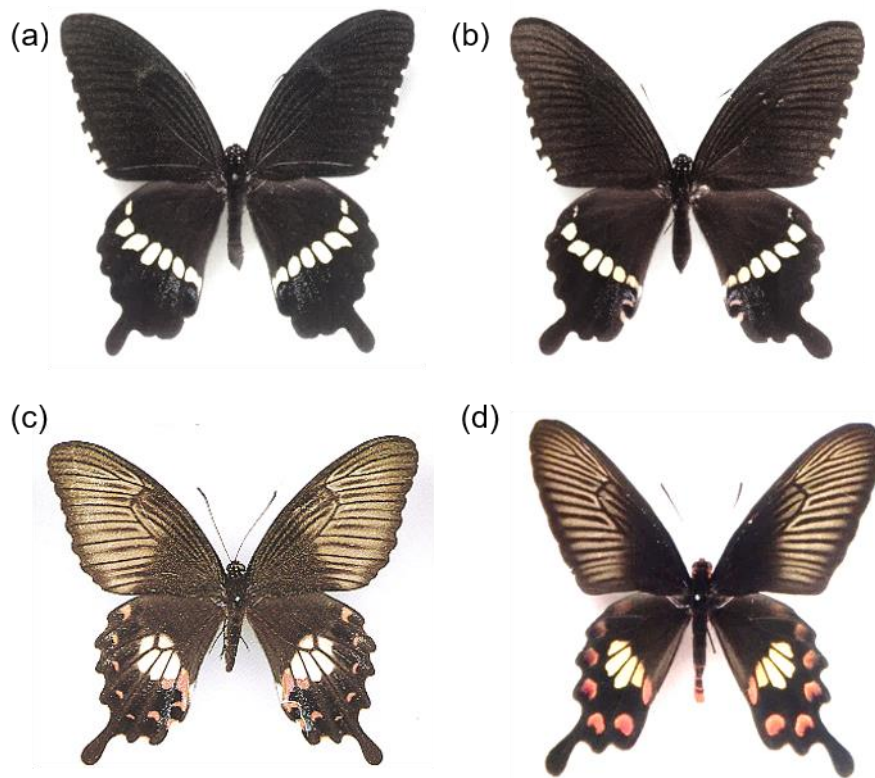


Figure 2. シロオビアゲハとベニモンアゲハの成虫の翅紋様 (a)シロオビアゲハのオス (b)シロオビアゲハ非擬態型のメス (c)シロオビアゲハ擬態型のメス (d)ベニモンアゲハを表している。

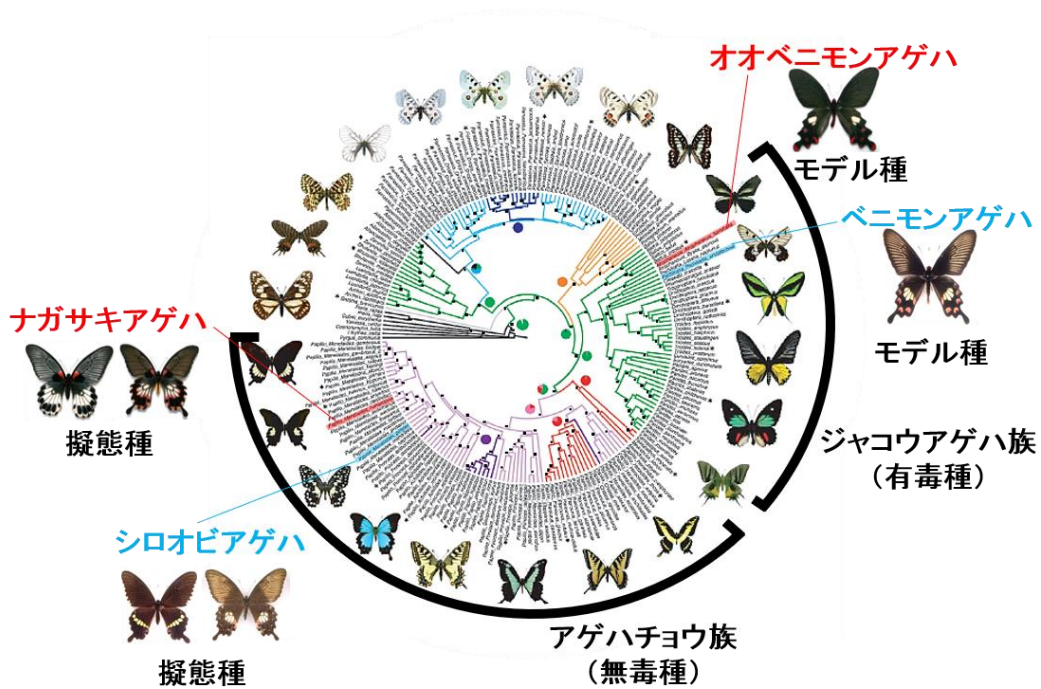


Figure 3. アゲハチョウ族とジャコウアゲハ族の系統関係 アゲハチョウ上科における系統関係を示した図である。ベイツ型擬態を示す種であるシロオビアゲハおよびナガサキアゲハはアゲハチョウ族に、モデル種であるベニモンアゲハおよびオオベニモンアゲハはジャコウアゲハ族に属しており、系統的に離れている。Condamine et al., 2012 より改変 (License number: 4275071301760)。

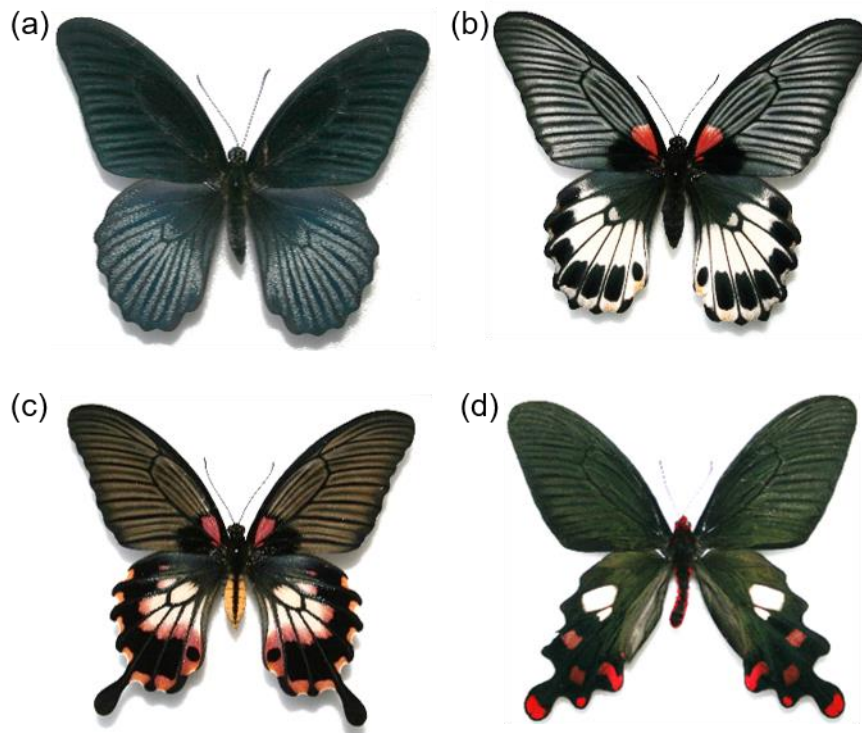


Figure 4. ナガサキアゲハとオオベニモンアゲハの成虫の翅紋様 (a)ナガサキアゲハのオス (b)ナガサキアゲハ非擬態型のメス (c)ナガサキアゲハ擬態型のメス (d)オオベニモンアゲハを表している。写真は京都大学 理学研究科 生物科学専攻 動物学教室 自然史学講座の小俣慎也氏より提供して頂いたものである。

材料と方法 Materials & Methods

実験材料

シロオビアゲハ (*Papilio polytes*) は蝶館カビラ (沖縄、日本) から成虫を購入し、採卵後、墨代飼育したものをを用いた。シロオビアゲハの幼虫は餌としてナツミカン (ミカン科) *Citrus natsudaidai* (Rutaceae) の生葉もしくは人工飼料を与え、25°C長日条件 (16 時間明期、8 時間暗期) で飼育した。成虫は市販のカルピスウォーターを給仕し、15°C下で飼育した。ナガサキアゲハ (*Papilio memnon*) は共同研究として京都大学 理学研究科 生物科学専攻 曾田貞滋教授らよりサンプルを提供して頂いた。ナガサキアゲハの成虫は台湾の 9 都市 (苗栗 (Miaoli)、新竹 (Hsinchu)、台北 (Taipei)、宜蘭 (Yilan)、花蓮 (Hualien)、屏東 (Pingtung)、高雄 (Gaoxiong)、嘉義 (Jiayi)、台中 (Taichung)) から集められたものを使用した。ナガサキアゲハの幼虫は餌としてグレープフルーツ (ミカン科) *Citrus paradisi* (Rutaceae) の生葉を与え、25°C長日条件 (14 時間明期、10 時間暗期) で飼育したものを使用した。調査と回収の許可は台湾の地方自治体より得ており、蝶類の輸入・飼育は、農林水産省の植物防疫所の許可を得て行われた。

人工飼料作製

人工飼料はナツミカンの葉粉末とインセクタ F-II (日本農産工業、神奈川) を混合して作製している。ナツミカンの葉は東京大学大学院農学生命科学研究科、嶋田透教授のご協力の下、東京大学農学部弥生キャンパス内にある無農薬栽培下のナツミカンの木より採集したものを使用した。採集した葉の汚れを手作業で洗浄した後、ハサミを用いて細かく裁断し、一昼夜乾燥させることで葉の表面の水気を飛ばした。次に葉を完全に乾燥させるため、シリカゲルの顆粒 (青色、球場大粒、ナカライテスク、京都) と刻んだ葉をビニール袋に入れ、4°C下で静置し、吸湿させた。吸湿能力が低下したシリカゲルは赤色に変化する

ため、赤色になったシリカゲルを交換することで常に吸湿される条件を保った。完全に乾燥した葉は磁器製ボールミルポット（アズワン、大阪）にアルミナボール（大、中、小、

アズワン、大阪) ととも に入れ、ボールミルで 2 日間回転させることで葉 を粉碎し、粉末状にした。	幼虫 齢期	1-2齢	3-5齢
	容量	10シャーレ分	10シャーレ分
	夏ミカン粉末 (g)	8	4
	インセクタF-II (g)	8	12
	DDW (ml)	56	56
	10%ホルマリン(μl)	1440	1440
	クロラムフェニコール (g)	0.2	0.2

人工飼料の組成を Table にまとめた。尚、幼虫の齢によって異なる配合のものを作製し、与えている。

シーケンス解析用ゲノム Polymerase Chain Reaction (PCR) 反応

9.5 μl の PCR 反応溶液 (10 × PCR Buffer: 1 μl, 0.2 mM dNTP mix: 0.8 μl, 10 mM 5'-primer: 0.5 μl, 10 mM 3'-primer: 0.5 μl, 0.25 U Extaq DNA polymerase (TaKaRa、日本) : 0.05 μl) に対して、0.5 μl のゲノム DNA (1 ng / μl ~ 100 μg / μl) をテンプレートとして用いた。PCR 反応のアニーリング温度はプライマーセットの低い方の melting temperature (Tm 値) に合わせ、伸長時間は 1 kb / 1 分として設定した。サイクルは 30-35 サイクル反応を、サーマルサイクラー-DICE (TaKaRa、神奈川) で行った。各反応液から等量 (2 μl) を 1%アガロースゲル電気泳動で分離後、エチジウムブロマイド染色することで可視化し、PCR 反応によるバンド長の確認を行った。

シーケンス解析

BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems (ABI)、米国) を使用し、ABI3130 ジェネティックアナライザー (Applied Biosystems) および ABI3500 ジェネティックアナライザー (ABI、米国) を用いて塩基配列決定を行った。得られた配列データの解析には、Vector NTI Contig Express (InforMax) を用いて解析した。

ゲノム DNA の抽出

あらかじめ液体窒素で冷やしておいた乳鉢の中に個体を入れ、乳棒を用いて粉状になるまでよくすりつぶした。次に乳鉢と一緒に冷やしておいた薬さじを用いて、1.5 ml のサンプルチューブに粉末状のサンプルを移し、重量をはかった。DNA 抽出バッファー (150 mM NaCl, 10 mM Tris - HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 0.1 % SDS, 100 µg / ml Proteinase K (MERCK) をサンプル量の 10-20 倍加え、55°C 下で 4 時間〜一晩置き、10,000 × rpm、5 分間、4°C で遠心分離し、上清を新しい 1.5 ml チューブに移した。等量の Tris 飽和フェノール (pH 8.5) を加え、2 時間〜一晩、Mini Disk Rotor BC-710 I (BIO CRAFT、東京) を用いてゆっくりと反転・攪拌させた (フェノール抽出)。15,000 rpm、15 分間、4°C で遠心分離し、上層を新しい 1.5 ml チューブに移し、等量の phenol chloroform isoamyl alcohol (phenol : chloroform : isoamyl alcohol = 25 : 24 : 1) を加え、20-40 分間、Mini Disk Rotor を用いて反転させながら攪拌した (フェノール/クロロホルム抽出)。15,000 rpm、15 分間、4°C で遠心分離し、上層を新しい 1.5 ml チューブに移した。上層と等量のイソプロパノールを加え攪拌した後、室温で 10 分間静置し、15,000 rpm、5 分、室温で遠心分離した (イソプロパノール沈殿)。上清を除き、沈殿物を 70 % エタノールで洗浄後、乾燥させ、300-600 µl の TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) に溶かし、4°C で保存した (エタノール沈殿)。最後に、RNase を終濃度 40 µg / ml となるように加え、37°C 下で 1 時間処理した後、フェノール/クロロホルム抽出、イソプロパノール沈殿、エタノール沈殿を行い、DNA を再度精製した。

SNP マーカーの作製と SNPs 解析

ゲノム情報を基に SNP マーカーを候補領域内に 20 種類設計した。SNP マーカーの作製に使用した遺伝子は、Papiliobase のトランスクリプトームとの双方向の BLAST 検索によって互いに最も相同性の高い遺伝子同士としてヒットすることを確認している。作製した

SNP マーカーを使用し、石垣島由来の非擬態型メス 28 匹、擬態型メス 26 匹のゲノムを用いて PCR を行った。PCR 産物は PCR ダイレクトシーケンス法によって個体ごとに配列解析を行い、個体間の SNPs の同定に使用した。個体間の SNPs は、シーケンス解析の波形を肉眼で確認し、波形の重なりからホモ・ヘテロを区別し、ゲノム上の位置、塩基を記録した。各 SNP の種類と頻度の累計結果より、非擬態型メスの SNP の多様性と擬態型メスでの SNP の多様性とを比べて統計的に等しいかどうかをカイ二乗検定で検証した。最終的に本研究で使用した SNP を含むプライマーセットは Table. 4 にまとめた。

RNA-seq データのゲノムへのマッピング

RNA-seq データは本研究室に所属する西川博士による RNA-seq 解析により得られたシロオビアゲハショートリードデータ (Table. 2) を利用した。ゲノム配列は本研究室が中心となって行われているアゲハゲノムプロジェクトより得られたシロオビアゲハ擬態型メスおよび非擬態型メスドラフトゲノム情報を利用した。マッピングは Tophat 2.06 (Kim et al., 2013; <http://tophat.cbcb.umd.edu/>) を用い、研究室内の共通パソコン Linux サーバー hcps01 上でマッピングを行うとともに、Cufflinks Ver. 2.1.1 (Trapnell et al., 2010; <http://cufflinks.cbcb.umd.edu/>) を用いて splice junction の位置の推定、および転写産物構造の予測を行った (Trapnell et al., 2012)。

Tophat では RNA-seq のデータはイルミナ社によるリードデータを使用した。`--solexa-quals` というパラメーターで、形式を `solexa-quals` に指定した。`-o $desktop` パラメーターを使用し、出力ディレクトリをデスクトップ上に指定した。`$bowtie-index` には、予測遺伝子セットから予め `bowtie-build` コマンドで作成した bowtie インデック名を記述し、`$fq_R_1`、`$fq_R_2` は、それぞれフォワード、リバーズリードを収めた fastq ファイル名を指定した。

コマンドライン : `tophat --solexa-quals -o $desktop $bowtie-index $fq-R_1.fq $fq-R_2.fq`

出力されたファイル (accepted_hits.bam) を cufflinks のパラメーターとして与えた。また、-o \$desktop パラメーターを使用し、出力ディレクトリをデスクトップ上に指定した。

コマンドライン : cufflinks -o \$desktop \$accepted_hits.bam

Tophat から出力されたファイルは samtools (<http://samtools.sourceforge.net/>) という変換ソフトを用いて以下のコマンドで BAM ファイルをソート (accepted_hits_sorted.bam) した。

コマンドライン : samtools sort \$ accepted_hits.bam \$ accepted_hits_sorted

インデックスファイルを作成し (accepted_hits_sorted.bam.bai.)、Integrative Genomics Viewer (IGV) 2.2.1 (<http://www.broadinstitute.org/igv/>) で可視化した。

コマンドライン : samtools index \$accepted_hits_sorted.bam

RNA-seq データの遺伝子へのマッピング

RNA-seq データは前述した西川博士による RNA-seq 解析により得られたシロオビアゲハショートリードデータ (Table. 2) を利用した。ゲノム配列は前述した転写産物の構造予測から得られたシロオビアゲハ擬態型メスおよび非擬態型メスでの予測遺伝子セットを使用した。マッピングは Bowtie Ver. 2.1.0 (Langmead et al., 2009; <http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml>) というマッピングソフトを用い、研究室内の共通パソコン Linux サーバー hcps01 上でマッピングおよびショートリード数のカウントを行った。ショートリードは paired-end sequence より得られたリードデータを使用し、最初の 32 bp をマッピングに用いて、2 塩基以内のミスマッチングを許容する条件で以下のようにして行った。また、擬態型メスおよび非擬態型メスでの予測遺伝子セット間で共通するショートリードについては 50% の確率でランダムにマッピングされるように設定した。

\$bowtie-index には、予測遺伝子セットから予め bowtie-build コマンドで作成した bowtie インデック名を記述し、\$fq_F、\$fq_R は、それぞれフォワード、リバースリードを収めた

fastq ファイルを指定した。

```
コマンドライン : bowtie -l 32 -n 2 $bowtie-index -1 $fq_F -2 $fq_R > output.txt
```

出力されたテキストファイル (output.txt) は、3 列目に記載されるヒットした遺伝子名の情報から遺伝子名ごとの重複回数をカウントすることで、マップされたカウント数を得ることができる。そこで、以下のコマンドを実行し、遺伝子名とカウント数の 2 列からなる出力ファイル (count.txt) を得た。

```
コマンドライン : more output.txt | awk -F "\t" '{print $3}' | sort | uniq -c | awk '{print $2"\t"$1}'> count.txt
```

Join というコマンドを使用し、出力ファイル (count.txt) を予測遺伝子セットから遺伝子名だけを抽出したファイル (genelist.txt) に結合し、count.txt に含まれない遺伝子名には、カウント数 0 を記述するようにした (final.txt)。

```
コマンドライン : join -1 1 -2 1 -a 1 -a 1 genelist.txt count.txt | awk '{print $1"\t"$2+0}'> final.txt
```

得られたカウントデータ (final.txt) は MS-Excel で整形し、サンプル間の発現量比較を行うため、カウントデータを転写産物の長さとし総リード数で割って正規化した値、

FPKM (Fragments Per Kilobase of exon Model per million mapped fragments : 1 kbp の長さの遺伝子が 1 M fragment (ペアエンドで読んだときの 2 つの Read を 1 組とした単位) あたり何カウントされたか) の算出を行った。

* FPKM (Fragments Per Kilobase of exon Model per million mapped Fragments)

$$* \text{ FPKM} = \underbrace{\text{mapped reads} \times \frac{1,000,000}{\text{All reads}}}_{\text{FPM}} \times \frac{1,000}{\text{length of transcript}}$$

RNA 抽出

解剖台 (パラフィンをシャーレに固めて作成したもの) を使用し、実体顕微鏡下で個体

の解剖を行った。摘出したサンプルは phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄後、1.5 ml のサンプルチューブに移し、500 μ l の TRI reagent (Sigma, 米国) 中でホモジナイズした。次に 80 μ l のクロロホルムを加え、vortex-2 (Scientific Industries, 米国) を用いてよく混合し、15,000 rpm、4°C、10 分間の遠心分離にかけた。上清を別のチューブに回収後、上清と等量のイソプロパノールを加えよく混合し、10 分室温で静置した。静置した後、15,000 rpm、10 分間遠心分離にかけた。上清を取り除いた後、500 μ l の 80%エタノールを加え、15,000 rpm、5 分間遠心分離にかけた。上清を捨てた後、5 μ l の Nuclease free 水に溶解した。Nuclease free 水に溶解した RNA は分光光度計 NanoDrop D-1000 (Thermo Scientific, 神奈川) を用いて濃度を計測し、2×ホルムアミド Dye を用いたアガロースゲル電気泳動により分解していないか確認した。

DNase I 処理

まず抽出した RNA に対し DNase I 処理を行い、DNA を分解した。DNase I 処理は 5 μ l の系 (DNase I reaction Buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl) 1.5 μ l, Nuclease free water 2.6 μ l, RNase Inhibitor 0.4 μ l, DNase I (5U/ μ l) 0.5 μ l (TaKaRa, 神奈川) に 100 ng/ μ l の RNA を 2 μ l 加え、37°C、15 分間反応させた。反応液に 1 μ l の 10 mM EDTA を加え、65°C、10 分間で失活させた。

cDNA 合成

DNase I 反応液を鋳型として Verso cDNA synthesis kit (Thermo Fisher Scientific, 神奈川) を用いて cDNA 合成を行った。42°C、30 分逆転写反応を行い、95°C 2 分で失活させた後、終濃度 500 ng/ μ l となるよう DDW で希釈し、テンプレートとして使用した。

定量的 RT-PCR (qRT-PCR)

上述の方法に従い、サンプル組織から cDNA を調製し、これをテンプレートに用いた。定量的 RT-PCR は StepOne™ Real-Time PCR System (ABI、米国) を使用し、添付の解析ソフト StepOne™ Software v2.1 を用いて、相対標準曲線法で解析を行った。PCR 反応は Power SYBR Green PCR Master Mix (ABI、米国) を使用し、95°C、15 秒、60°C、1 分間を 40 サイクルの条件で行った。内部標準としてシロオビアゲハおよびナガサキアゲハ Ribosomal protein L3 (RpL3) を用いた。定量的 RT-PCR に用いたプライマーにおいて、複数のエキソンにより構成される遺伝子の場合はイントロンをまたぐ二つのエキソン領域内に設計して使用した。定量的 RT-PCR に用いたプライマーは Table. 4 にまとめて示した。発現量の違いはそれぞれの領域および個体ごとに t 検定を行うことで、有意差の有無の確認を行った。測定した数値に関しては全て Supplementary Tables として記載した。

In vivo electroporation 法を用いた翅での RNA interference (RNAi) による機能解析

インジェクションする siRNA は、siRNA 設計支援ソフト siDirect version 2.0 (<http://sidirect2.rnai.jp/>) を用いて設計した (Ui-Tei et al., 2004; Yamaguchi et al., 2011)。目的の遺伝子の ORF 領域の配列を PapilioBase およびナガサキアゲハドラフトゲノム情報より取得後、配列情報をもとに siDirect で候補となる配列を検索した。オフターゲット効果を少なくするために、PapilioBase の BLAST 検索機能を利用し、設計した配列のターゲット遺伝子への特異性を調べ、特異性の高いものを候補配列より選択した。siRNA の合成は、株式会社ファスマックに依頼した。作製した siRNA の詳細は Table. 4 にまとめて記載した。siRNA は、500 μM になるように Annealing Buffer (100 mM CH₃COOK, 2 mM Mg(CH₃COO)₂, 30 mM HEPES-KOH pH 7.4) で溶解し、これをさらに 250 μM に希釈してインジェクションに用いた。インジェクションにはマイクロインジェクター FemtoJet (Eppendorf) を使用し、インジェクション用のガラス針は、芯入りガラス管 (NARISHIGE、

G-1) を、プーラー (NARISHIGE、PP-830) を用いて加工し、作製したものを使用した。上記の siRNA をガラス針に充填し、ガラス針を実体顕微鏡下にセットしたマイクロマニピュレーターM401 (SURUGASEIKI) にセット後、蛹の後翅辺縁部より翅脈に沿って 1 μ l 注入した。インジェクション後、エレクトロポレーター (Ando and Fujiwara, 2013) を用いて電気刺激をかけ、siRNA を導入した (5 square pulses of 15 V, 280 ms width)。その際、緩衝液として後翅と電極の間には 1% Phosphate buffered saline (PBS) のゲルおよび PBS の水滴を置いた。詳細な方法は Figure 28 に示した (Fujiwara and Nishikawa, 2016)。機能解析を行ったすべての個体の写真は Supplementary Figures としてまとめて記載した。

シロオビアゲハ後翅における *dsx-H* ノックダウン時に発現が変動する遺伝子の網羅的探索

実験手法としては以下の解析手順で行った (Fig. 36)。まず *in vivo* electroporation 法を用いてシロオビアゲハ蛹化直後 (P0) 個体の後翅に *dsx-H* を標的とする siRNA を導入することで、ノックダウン解析を行った。このとき、siRNA は水溶液中ではマイナスに電離しているので、プラス極側に誘引されると考えられる。その為、後翅のプラスに帯電した PBS 領域にモザイク状に siRNA が導入されていると考えられた。そこでデジタルカメラ AxiCam (Carl Zeiss、ドイツ) を用いて後翅での PBS 滴下領域を撮影し、*si dsx-H* 導入領域を把握した。蛹化直後から 1 日目-3 日目 (P1-3) に、撮影した画像を基に後翅での PBS 滴下領域をサンプリングし、RNA を上述の方法で抽出・精製した。翅脈の位置から *si dsx-H* 未処理翅でも同様の位置を特定できるため、*si dsx-H* 未処理翅でも同様に PBS 滴下領域をサンプリングし、RNA を上述の方法で抽出・精製した。次に、精製した RNA から cDNA を調整し、定量的 RT-PCR を行うことで、*si dsx-H* 未処理翅に比べて *si dsx-H* 処理翅で *dsx-H* 発現量が低下するサンプルを選出し、RNA-seq 解析用のサンプルとした (P1-3 で各 n=1 個体)。RNA-seq 解析には BGI JAPAN 株式会社の受託解析を利用した。シーケンスは

Illumina HiSeq 2500 のプラットフォームを用い、paired-end: 100 bp でシーケンスした。得られたリードデータを解析ソフト Bowtie2 (Langmead and Salzberg, 2012) を用いて Ppolytes.v1.0.0.transcriptome (Nishikawa et al., 2015) にマッピングした。解析ソフト DESeq (Anders and Huber, 2010) を用いてマッピングの状況から遺伝子発現量を比較することで、*dsx-H* の制御下で発現変動する遺伝子を得た。各遺伝子発現量を FPKM 値として算出後、*sidsx-H* 未処理翅と *sidsx-H* 処理翅間で P 値が 0.05 以下となる遺伝子を優位に発現変動する遺伝子として選別した。*sidsx-H* 導入により発現量が低下した遺伝子は Table 8 に、発現量が上昇した遺伝子は数が多いため更に上位 100 遺伝子に絞り、Table 9 にリスト化した。

系統樹の作成

Nach-like の塩基配列は生物種ごとに以下のデータベースから取得した: カイコ (*Bombyx mori*) (KAIKObase: <http://sgp.dna.affrc.go.jp/KAIKObase/>)、オオカバマダラ (*Danaus plexippus*) (Monarchbase: <http://monarchbase.umassmed.edu>)、ヤママユガ (*Manduca sexta*) (Manduca Base: <http://agripestbase.org/manduca/>)、ヘリコニウス (*Heliconius melpomene*) (Butterfly Genome Database: <http://www.butterflygenome.org>)、シロオビアゲハ (*Papilio polytes*) およびナミアゲハ (*Papilio xuthus*) (PapilioBase: <http://papilio.bio.titech.ac.jp/>)、キアゲハ (*Papilio machaon*) およびトラフアゲハ (*Papilio glaucus*) (RefSeq database: <http://lepbase.org>)。また、ショウジョウバエにおいて *Nach* のホモログとして知られる *pickpocket* (*ppk*) 1-6 の塩基配列は FlyBase (<http://flybase.org>) より取得した。Clustal_W (Thompson et al., 1997) を使用して配列同士のアライメントを行った。系統樹は MEGA5 プログラム (Tamura, et al., 2011) を利用し、GTR+G モデル (a gamma model for rate heterogeneity)、最尤法で作成した。系統関係の信頼性はブートストラップ値 (1000 回試行) で判断した。

遺伝型の決定 (ジェノタイピング)

シロオビアゲハのドラフトゲノム情報より *dsx* の exon1-2 間の *inrton* に存在する Insertion / deletion (InDel) を挟むようにプライマーを設計することで、増幅したバンド長から *H*、*h* を判断できるプライマーを作製した (Table. 4)。次に、クルードサンプル (血液や細胞培養液などゲノム以外の不純物を多く含むサンプル) からの PCR 増幅法に着目し、終齢幼虫 (5 齢幼虫) の体液および成虫脚の粗抽出液からの PCR 増幅による Genotyping 法を確立した (Fig. 42)。この手法では PCR のテンプレートとして有頭シガ昆虫針 00 号 (最上質ステンレス製) (志賀昆虫普及社、東京) を用いて腹脚の付け根より体液を 1 μ l 回収後、ヘパリンで傷口を塞ぐことにより、幼虫は生存可能な状態で飼育を継続できる。PCR 反応は、KOD FX Neo (TOYOBO、大阪) を用いて各 10 μ l のスケールで行った。9 μ l の PCR 反応溶液 (2 \times KOD FX Neo Buffer: 5 μ l, 2 mM dNTP mix: 2 μ l, 10 mM 5'-primer: 0.15 μ l, 10 mM 3'-primer: 0.15 μ l, 1 U KOD FX Neo DNA polymerase: 0.2 μ l) に対して、1 μ l のアゲハ体液をテンプレートとして用いた。PCR 反応のアニーリング温度はプライマーセットの低い方の melting temperature (T_m 値) に合わせ、伸長時間は 1 kb / 1 分として設定した。サイクルは 30-35 サイクル反応を、サーマルサイクラー DICE (TaKaRa、神奈川) で行った。各反応液から等量 (2 μ l) を 1-3% アガロースゲル電気泳動で分離後、エチジウムブロマイド染色することで可視化し、PCR 反応によるバンド長の確認を行った。PCR 産物の増幅バンドの形成パターンにより、遺伝子型 (*HH* / *Hh* / *hh*) を判断した。シロオビアゲハにおいて、*H* を持つ場合、primer 8-3 なら 192 bp のバンドが、primer 8-5 なら 714 bp のバンドが生じる。一方、*h* を持つ場合、primer 8-3 なら 162 bp のバンドが、primer 8-5 なら 910 bp のバンドが生じる。ホモ個体 (*HH* / *hh*) ならば単一のバンドが生じ、ヘテロ個体 (*Hh*) ならば二種類のバンドが検出されることで区別した。尚、ナガサキアゲハにおいては、サンプル提供元である京都大学 理学研究科 生物科学専攻 曾田貞滋教授らによるジェノタイピング解析が行われており (Komata et al., 2016)、そちらの結果を使用し

ている。

Image J を用いた後翅での紋様領域の定量化

成虫メス (HH: n=8, Hh: n=6, hh: n=5) およびオス (HH: n=3, Hh: n=4, hh: n=4) の後翅を羽化後 1 日目に翅の付け根から切除し、デジタルマイクロスコープ VH-5500SP1344 (キーエンス、大阪) を用いて個体ごとに後翅全体を撮影した。撮影した画像を解析ソフト Image J (Schneider et al., 2012) に取り込み、後翅全面積における擬態型メス後翅の紋様領域 (赤色・白色・黒色) の割合および非擬態型メス及びオス後翅の紋様領域 (白色・黒色) の割合を算出した。まず、Image J の写真の輝度から翅紋様の中で規定した色 (今回は赤を規定) 部分のみを認識させ、認識された領域の面積を算出した。次に、写真を白黒 (8 bit image) に変換することで、白色領域と黒色領域のみ (赤色領域は黒色領域に変換される) にし、白色領域および黒色領域の面積を算出した。算出した面積より、赤色領域の面積および白色領域の面積を翅全体の面積で割った値を、後翅における赤色領域の面積の割合および後翅における白色領域の面積の割合とした。また、面積の違いはそれぞれの領域および個体ごとに t 検定を行うことで、有意差の有無の確認を行った。

シロオビアゲハにおける遺伝子型ごとの蝶区による飼育実験

上述のジェノタイピング解析により遺伝子型の判明した幼虫区から飼育した各遺伝子型 (HH, Hh, hh) の雌雄の成虫を用意し、ハンドペアリング法 (チョウにおける人為的な交配手法) によりすべての組み合わせの 9 蝶区 (HH♂×HH♀、HH♂×Hh♀、HH♂×hh♀、Hh♂×HH♀、Hh♂×Hh♀、Hh♂×hh♀、hh♂×HH♀、hh♂×Hh♀、hh♂×hh♀) を作製した。まず、夏ミカン (ミカン科) *Citrus unshiu* (Rutaceae) の苗木を使用して、25℃下で作製した蝶区ごとにメス個体から卵を採卵し、総産卵数をプロットした。産卵後のメス個体は上述の飼育方法の通り、カルピスウォーターを給仕し、15℃下で飼育

し、死亡するまで採卵し続けた。通常シロオビアゲハの卵は 2-3 日で孵化するため、7 日経過後に孵化していなかったものを未発生卵とみなし、作製した蝶区ごとに未発生卵数と 1 齢幼虫の個体数をプロットした。次に、シロオビアゲハ幼虫の各齢 (1-5 齢) は 25°C 飼育下において約 1 週間で切り替わるため、約 1 週間ごとに各齢 (1-5 齢) の生存個体および死亡個体数をプロットした。幼虫個体は全て人工飼料を与え、25°C 長日条件 (16 時間明期、8 時間暗期) で飼育した。終齢幼虫 (5 齢幼虫) 2 日目よりジェノタイプ解析が行えるため、上述のジェノタイプ解析により各蝶区の生存幼虫の遺伝子型を判別し、プロットした。最後に、蛹期において将来の生殖器構造が形成される蛹下腹部での雌雄判別ができるため、蛹期での雌雄判別をし、プロットした。その後、羽化した成虫の雌雄を目視で確認し、プロットと一致していることを確認した。以上の飼育実験は、飼育個体数の関係で二回 (1 回目:2016/0712 から約二か月間、2 回目:2017/0621 から約二か月間) に分けて行った。またプロットした数値は Table 10 にまとめた。各蝶区でまとめたプロットデータから産卵数 (総産卵数)・孵化率 ($(\text{総産卵数} - \text{未発生卵数}) / \text{総産卵数} \times 100$)・各齢の生存率 (各齢の生存個体数 / $(\text{総産卵数} - \text{未発生卵数}) \times 100$) を算出した。雌雄における遺伝子型の各値への影響を確認するために、統計ソフト StatView 5 (Apple、米国) を用いて二元配置分散分析を行った。独立変数 (影響を与える因子) に雌雄の遺伝子型を指定し、従属変数 (影響を受ける現象) に産卵数・孵化率・5 齢までの生存数を指定し、統計にかけた。また、Bonferroni による多重比較法によって産卵数・孵化率・5 齢までの生存数における蝶区ごとの有意差の有無を確認した。

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

背景

シロオビアゲハおよびナガサキアゲハの擬態型の表現型は常染色体上の 1 遺伝子座（それぞれ *H* locus / *A* locus）のメンデル遺伝に従い（Fryer, 1914; Clarke and Sheppard, 1968, 1972）、擬態型（*H* / *A*）が非擬態型（*h* / *a*）に対し優性であることが遺伝学的にわかっている（Clarke and Sheppard, 1972; Wallace, 1865）。しかし、両遺伝子座がどの染色体上に位置し、またその内部にどのような遺伝子が存在しているのかについては明らかとなっていない。

先行研究として、共同研究者の名古屋大学名誉教授 堀寛博士はシロオビアゲハ (*Papilio polytes*) オス個体及びオナシシロオビアゲハ (*Papilio alphenor*: フィリピンに生息するシロオビアゲハの亜種) 擬態型メス個体の掛け合わせによる F1 交雑個体を用い、Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) を利用した連鎖解析を行うことにより、*H* 遺伝子座の絞り込みを試みた。その結果、擬態の表現型と完全にリンクする AFLP マーカーが同定された (Fig. 5)。本研究に先立ち、ナミアゲハは松戸市内で採取された終齢幼虫 (野外個体) を使用し、シロオビアゲハは四世代近親交配個体の終齢幼虫 (室内継代個体・遺伝子型不明) を使用し、国立遺伝学研究所およびかずさ DNA 研究所と共同してゲノム解読が行われた。シーケンスは Illumina HiSeq 2000 および HiSeq 2500 のプラットフォームを用い、paired-end sequence: 300 bp、500 bp、800 bp の条件で行われ、得られたアゲハ 2 種のゲノムリードを基に、共同研究者である東京工業大学大学院 生命情報専攻 梶谷博士により、Platanus assembler (Version 1.2.4) (Kajitani et al., 2014) を使用してアゲハ 2 種のドラフトゲノムが構築された (Table 1)。同定された遺伝子マーカーの連鎖群と、本研究室のシロオビアゲハゲノム解読により得られたドラフトゲノムの情報とを比較すると、堀博士の同定した部位はシロオビアゲハ第 25 番染色体上の 800 kbp に相当する領域であることが判明した (Fig. 5)。次に、野外集団から採取した個体のゲノムを使ってさらに責

任領域を絞り込めないかと考えた。

野外での個体間の一塩基多型 (Single nucleotide polymorphism: SNP) の多様性を利用したゲノム上の責任領域の特定はいくつかの成功例が報告されている。例えば、トゲウオ (*Gasterosteus aculeatus*) が淡水または海水へ適応するのに関与した 84 のゲノム領域を、21 の野外個体のゲノム解読から特定した例 (Jones et al., 2012) や、ヌマタドクチョウ (*Heliconius numata*) の翅紋様の地域多型の原因領域をゲノム配列の比較から同定した例が報告されている (Joron et al., 2011)。本研究室には、沖縄本島や石垣島の各地で採取した数十個体のシロオビアゲハ擬態型メスおよび非擬態型メスのゲノムが保存されており、シロオビアゲハの擬態形質において同様の解析方法を利用できる可能性がある。そこで、本研究では、メスのみを解析対象とし、擬態型の表現型を持つ個体群 (*Hh*、または、*HH*) と、擬態型の表現型を持たない個体群 (*hh*) とで、ゲノム上の複数の場所での SNP の多様性 (出現する塩基の種類と頻度) を比較し、両者の間に差があるゲノム領域を探索することにした。もし、調べているゲノム領域が擬態の形質を出現させることと無関係ならば、個体間の SNP の多様性が検出されたとしても、擬態型-非擬態型の間に特別な偏りは見られないと考えられる。一方、擬態の形質を出現させる *H* 遺伝子座に近いゲノム領域の場合は、擬態型の個体群において個体間の SNP の多様性が少なくなることが期待される。そのため、非擬態型メスおよび擬態型メス間での SNP の多様性を比較して有意に偏りがあるゲノム領域を原因遺伝子の候補領域として同定していくことにした。

結果

シロオビアゲハにおけるベイツ型擬態の原因領域の同定

ゲノム情報を基に SNP マーカーを候補領域内に 20 種類設計し、野外の非擬態型メス 28 匹、擬態型メス 26 匹のゲノムを用いて配列解析を行い、個体間の SNPs を同定した (Table 2)。個体間の各 SNP の種類と頻度の累計結果より、非擬態型メスの SNP の多様性と擬態

型メスでの SNP の多様性とを比べて統計的に等しいかどうかをカイ二乗検定で検証し、P 値を算出した。得られた P 値の対数の逆数を縦軸（値が大きいほど擬態型の表現型と連鎖していることを示す）に、横軸をゲノム上でのマーカーの位置としてプロットすることで SNP の多様性と表現型の連関を調べた。その結果、*doublesex* (*dsx*) 内部に作製した 3 種類の SNP マーカー（8 カ所の SNP を検出）において、非擬態型メスおよび擬態型メス間での SNP の多様性に有意に偏りが生じた。このことから擬態の原因領域である *H* 遺伝子座が *dsx* の近傍約 200kb にあると同定した (Fig. 6)。

一方、共同研究者である東京工業大学大学院 生命情報専攻 伊東武彦教授らによるシロオビアゲハ全ゲノム解析の結果、興味深いことが発見された。ほとんどのゲノム領域では父方、母方由来の相同染色体は相同な配列で構成されていたが、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 (Fig. 7)。そのうち 14 箇所は性染色体である 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。このことから、*H* 遺伝子座は *dsx*HDR と一致しており、また *dsx*HDR には相同性の低い 2 種類の配列が存在していることが分かった。全く独立に行った、連鎖解析の結果 (*dsx* の近傍に原因がある) とゲノム解読の結果 (*dsx* の近傍に他には見られない配列が大きく異なる 2 種類の配列がある) が極めてよく一致しているから、この *dsx*HDR 自体がベイツ型擬態の原因を生み出している可能性が考えられた。また、*dsx* は広範な生物種で保存されている性分化に関与する転写因子として知られていることから (Nagoshi *et al.*, 1988)、メス特異的な擬態への関与が強く示唆された。

ナガサキアゲハにおけるベイツ型擬態の原因領域の同定

単行本または雑誌掲載等の形で刊行される予定のためインターネット公表できません。

RNA-seq ショートリードのマッピング解析による *H*、*h* 配列の同定

これまでの結果からアゲハチョウ二種の擬態の原因領域が共に dsxHDR に存在していることが分かったが、dsxHDR における相同性の低い 2 種類の配列とは何を意味するのだろうか？この疑問に答えるために、まずシロオビアゲハにおいて dsxHDR 近傍のゲノム構造を詳細に解析したところ、配列の異なる 2 種類の scaffold (scaffold 651,938) が存在した。シロオビアゲハのゲノム解読では、研究室内で 5 世代継代飼育したメス幼虫 1 匹のゲノムを使用して行った（幼虫時には擬態型か非擬態型かは判別できなかった）。ゲノムを読んだシロオビアゲハメス個体の遺伝子型が *Hh* であったと仮定すると、この配列の異なる 2 種類の scaffold はそれぞれ *H* および *h* に対応している可能性が強く示唆された。そこで次にこの 2 種類の scaffold の構造を精査し、scaffold の由来を明らかにしようと考えた。当研究室の西川博士が中心となり RNA-seq 解析が進められ、シロオビアゲハにおける様々な時期における翅由来の mRNA のショートリードが利用できる状況にある (Table. 3)。RNA-seq のショートリードは 2 本の染色体に由来する。そのため、遺伝子型が *Hh* となる擬態型メスのショートリードは *H*、*h* 由来の 2 種類から構成されると考えられ、遺伝子型が *hh* のみである非擬態型メスのショートリードは *h* 由来の 1 種類のみと考えられる。もし 2 種類の scaffold のうちの片方が *H* に対応しているのならば、*H* を持つ擬態型メス由来のショートリードではマップされ、非擬態型メス由来のショートリードはマップされないはずであり、マップの仕方に違いが表れると考えられる。このアイデアが正しければ、より明確に 2 種類の scaffold の由来を把握することができ、かつ、この領域の特異性の証明になると考え、ショートリードのマッピング解析を行うこととした。

解析ソフト Tophat (Kim et al., 2013) を使用して、まずは非擬態型メス (*hh*) 由来のショートリードを scaffold 651、scaffold938 配列のそれぞれにマップした。その結果、片方の scaffold 651 だけにマップされた (Fig. 9a, b)。同様に擬態型メス (*Hh*) 由来のショートリードを scaffold 651、938 にマップしたところ、scaffold 651、938 両方にマップされ

た (Fig. 9c, d)。この結果は、scaffold 651 は非擬態型 *h* に対応し、scaffold 938 は擬態型 *H* に対応していると考えられた。そこで、前者を dsxHDR-h、後者を dsxHDR-H と呼ぶことにした (Fig. 9e)。

単行本または雑誌掲載等の形で刊行される予定のためインターネット公表できません。

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

前述の結果から、dsxHDR には相同性の低い 2 種類の配列が存在し、擬態型の配列 dsxHDR-H, dsxHDR-A が擬態型表現型を生じさせていることを示唆した。アゲハ二種の擬態原因領域でどのようにして 2 種類の配列が生じ、維持されているのだろうか？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 dsxHDR 領域の両端を同定することにした。シロオビアゲハの *H* と *h* の dsxHDR 領域に関して解析ソフト VISTA を用いて比較解析したところ、シロオビアゲハの dsxHDR の長さは約 130 kbp 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、配列比較から両 dsxHDR はその末端で染色体逆位を起こしていた (Fig. 10a)。石垣島、沖縄本島の南西諸島系統、ラオスの複数地域の個体を用いたゲノム PCR で両 dsxHDR 末端配列を確認したが、地域に関係なく相同性の低下する位置は一致しており、地域によらず全ての個体で *H* と *h* 間で染色体逆位が生じていると考えられた (Fig. 11)。逆位のため、*H* と *h* 間の配列相同性は、dsxHDR 内部では極めて低い、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 dsxHDR 内部の相同性は低かった (Fig. 10b)。これらの結果から、配列の相同性が低くなる点を Breakpoint と定めた (Fig. 11)。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 (Hoffmann et al., 2004)。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た。シロオビアゲハとナミ

アゲハは約 4000 万年前に種分化したと報告されている (Zakharov et al., 2004)。このことから、ナミアゲハにおける *dsxHDR* 相同配列と *dsxHDR-h* とを配列比較し、*dsxHDR-H* と *dsxHDR-h* との相同性を比較することで種の分岐年代から逆位が生じた年代をある程度予測できるのではないかと考えた。そこでナミアゲハとの配列の相同性を比較・確認したところ、ナミアゲハとの相同性はシロオビアゲハの擬態型と非擬態型間の配列相同性と同程度低かった (Fig. 10c)。このことから、両種の分岐年代 (約 4000 万年前) に近い時期に逆位が起こった可能性が考えられた。

単行本または雑誌掲載等の形で刊行される予定のためインターネット公表できません。

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

単行本または雑誌掲載等の形で刊行される予定のためインターネット公表できません。

当研究室ではシロオビアゲハにおける様々な時期における翅由来の mRNA のショートリードが利用できる状況にある (Table. 3)。そこで、*dsxHDR* を構成する 4 遺伝子について、擬態型メス (終齢幼虫 wandering 期および P2 期、各 3 個体、遺伝子型: *Hh*) およびオス (終齢幼虫 wandering 期および P2 期、各 1 個体、遺伝子型: *Hh*) のショートリードを利用し、解析ソフト Bowtie (Langmead et al., 2009) を用いて発現量を計測し、雌雄での発現に差が見られるか否かを確認することにした (Fig. 22)。*Nach-like* に関しては、ショートリードがマッピングされなかったことから、時期によらず翅での発現は雌雄ともに見られないと判断した。*dsx* では *dsx-H*、*dsx-h* 共にオスではほとんど発現しておらず、擬態型メスで高い発現が見られた。これらの結果は qRT-PCR の結果と一致している。*U3X*、*UXT* はオスに比べて擬態型メスで発現が高い傾向が見られた。また、時期による影響を見ると、*dsx*、*U3X* は P2 期に発現量が高い傾向が見られ、*UXT* は wandering 期に高い傾向が見られた。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おり、擬態型の遺伝子は擬態型メスで高い発現を示すことが明らかとなった。更にオス 1 個体 (終

齢幼虫 wandering 期、遺伝子型：*Hh*) 由来の 6 組織 (精巣、翅原基、脂肪体、頭、中腸、皮膚) におけるショートリードも利用可能であったため、各組織の発現について調査した (Fig. 23)。4 遺伝子のオスの組織ごとの発現量の比較から、*dsx*、*Nach-like* は擬態型、非擬態型共に精巣で発現が高く、他組織では発現が低い傾向が見られた。*U3X* の発現は翅での発現が一番高く、頭と中腸の順に発現が見られた。*UXT* は精巣での発現が一番高く、翅以外の組織でもまんべんなく発現していた。このことから、*Nach-like*、*UXT*、*U3X* は翅以外の組織で発現が見られるため、翅紋様以外の擬態形質にも関与している可能性が考えられた。最後に、シロオビアゲハで見られた組織特異的な発現が他の鱗翅目昆虫でも見られるか否かを調査した。調査するにあたり、鱗翅目昆虫の中で最も研究がなされているカイコに着目し、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) Sequence Read Archive (DRA) 並びに SilkBase (URL: <http://silkbases.ab.a.u-tokyo.ac.jp/cgi-bin/index.cgi>) を利用した。初期胚および 5 齢幼虫の 6 組織 (脳、内部生殖巣、脂肪体、中腸、皮膚、絹糸線 (中部・後部)) についての発現は SilkBase を用いて HDR 上での被覆率 (どれだけショートリードが張り付いたかの尺度) で示した (Fig. 24)。また、翅での発現量に関しては、DDBJ の DRA より、①4 齢前翅 (DRA Accession ID: SRR2156424)、②4 齢後翅 (DRA Accession ID: SRR2156423)、③5 齢 6 日目・前蛹・蛹化直後の翅の混合サンプル (DRA Accession ID: SRR1535663) の 3 種類を取得し、解析ソフト Bowtie を用いて発現量を計測した (Fig. 25)。4 遺伝子のうち、*U3X* は *H* にのみ見られる転写産物であり、カイコには存在しなかった。残りの 3 遺伝子についてカイコでの発現を調べると、*dsx* は初期胚、内部生殖巣、5 齢前蛹までの翅で非擬態型メスと同等の発現が見られた。*UXT* は脂肪体、絹糸線 (中部)、4 齢翅以外の組織で発現が見られ、*Nach-like* は初期胚、内部生殖巣で発現していた。以上の結果から、シロオビアゲハ擬態型メスにおける翅での *dsx-H*、*U3X* の高発現はカイコには見られず、擬態型メス特異的であることが分かった。*UXT* に関しては 5 齢前蛹までの翅でシロオビアゲハ擬態型メスの翅と同等の FPKM 値を示しているが、時期の異なる 3 個体を混

合しているためにこのような値になったと考えられ、1 個体でのサンプルによる更なる精査が必要と考えた。*Nach-like* はカイコ、シロオビアゲハ共に生殖巣での発現が見られ、また擬態型と非擬態型に関係なく生殖巣で発現が見られることから、鱗翅目における生殖巣の機能に關与している可能性が考えられた。

考察

単行本または雑誌掲載等の形で刊行される予定のためインターネット公表できません。

Table 1 本研究室で解読されたアゲハゲノムの詳細

単行本または雑誌掲載等の形で刊行される予定のためインターネット公表できません。

Table 2 SNPs を用いた領域の絞り込みの詳細

プライマー名	SNPs	P-value	H locus scaffold上での 位置	PCR primer Forward	Reverse
Pp_No58SNP000	AG	0.495035897000	1,298,969	GGGTCGTTGGGATTTTGCTC	ATGAAGATGGCGCGCATAAA
Pp_papilin_SNP66	AG	0.893488555000	1,362,995	GCAGAGACTTCAGTGGTGCT	CGGAATAAACACGGGCTCTT
同上	AG	0.228484244000	1,363,169	同上	同上
同上	AG	0.728372228000	1,363,217	同上	同上
同上	CT	0.898389543000	1,470,614	同上	同上
Pp_intermediate1_exon1	CT	0.445352628000	1,470,658	TTTAACTGCACCCTCATTA	AGGATTCCATACGAAAAGTT
Pp_intermediate2_exon1	AT	0.199991739000	1,473,204	AATTTCTCTCCTATTCACT	GCTCACAACTCTTGGA
同上	AG	0.844674397000	1,473,297	同上	同上
Pp_egl9_SNP245	CT	0.622315363000	1,542,049	TGACCCCTGGCAGATCTCA	ACGGAACACCAACGACAAGA
同上	AT	0.156229673000	1,542,097	同上	同上
同上	CT	0.609848048000	1,542,185	同上	同上
同上	AT	0.245137627000	1,542,275	同上	同上
同上	AC	0.098445932000	1,542,314	同上	同上
同上	AT	0.109254520000	1,542,319	同上	同上
同上	CT	0.333844457000	1,542,341	同上	同上
同上	CT	0.110260966000	1,542,421	同上	同上
同上	CT	0.296413453000	1,542,436	同上	同上
同上	CT	0.913040861000	1,542,451	同上	同上
同上	AC	0.515324210000	1,542,461	同上	同上
同上	CG	0.913040861000	1,542,469	同上	同上
同上	CG	0.277576821000	1,542,485	同上	同上
同上	AT	0.632470026000	1,542,493	同上	同上
Pp_Rab_exon3	GT	0.294551292000	1,659,953	CGACTATTTGTTCAAACCTC	TGATCTGTGAGTCATAAAC
同上	GT	0.301699582000	1,660,009	同上	同上
NEW550901	CT	0.287592371000	1,745,992	GAATTATGTGCGGCCAACTTC	ATATGTCTCCGGCTCGTTTG
同上	CT	0.229073498000	1,746,076	同上	(same as above)
同上	CT	0.279694105000	1,746,141	同上	(same as above)
NEW650_02	AG	0.381255428000	1,845,807	CGTTTGTGAACCTTAAGCCTTTTG AC	CGTTTGTGAACCTTAAGCCTTTTGAC
同上	CG	0.532328497000	1,845,826	同上	同上
同上	CT	0.532328497000	1,845,827	同上	同上
同上	AG	0.532328497000	1,845,828	同上	同上
同上	CT	0.970765513000	1,845,830	同上	同上
同上	CG	1.000000000000	1,901,209	同上	同上
Pp_prospero_exon1-2	GT	0.882548133000	1,901,241	CTAGTGTGCGCCCTAATATG	ACGCTGAGATCTCGTTTTTA
同上	CT	0.507917534000	1,901,458	同上	同上
同上	AG	1.000000000000	1,901,463	同上	同上
同上	CT	0.761368555000	1,901,493	同上	同上
Pp_pros_SNP625	CT	0.115879685000	1,922,601	gccaccaactcagatacg	tgfgcagaataaaaattcaggfga
NEW734481	AG	0.001409776000	1,929,652	TTACGACGCCAATCACACTC	TGCTTGTAAACCAGCCACAAC
Pp_dsx_SNP673	CT	0.000000000008	1,971,673	GCGAGACTGCTTAAAGTTTACG	TCAGTAATAAACTACCGGTGCCAATA ATA
同上	GT	0.000000000008	1,971,689	同上	同上
同上	AG	0.000000000008	1,971,690	同上	同上
Pp_dsx_ori_1_3	AT	0.100048534000	2,008,560	GCAATTGATAATTTGACACAATG	CCCCTAAGTAATCTTGTGTTAATAG
同上	CT	0.213021190000	2,008,758	同上	同上
Pp_dsx_SNP718	CT	0.000000000008	2,015,218	GAGTGTGCGCGACACGT	AAACTGGTCGTAATCTTGTGTTAATA G
同上	AC	0.000000000008	2,015,226	同上	同上
同上	AG	0.207128598000	2,015,261	同上	同上
同上	AC	0.000000000008	2,015,289	同上	同上
同上	CT	0.000000000008	2,015,297	同上	同上
Pp_dsx_SNP851new	LS*	0.000000000008	2,046,501	CCCAGGCGCAAGACGAG	ATGGTGTCCGTAGGCGCG
NEW864651	indel	0.145055372000	2,059,767	CTCGGCCTCAAATCCATAAA	CTCGAGAAATCTGGCGAACC
Pp_No52_SNP842	AG	0.341000400000	2,134,396	GGCAACAGAGCACATGCTAA	GCCGTGGTGTCTTATTTTC
同上	CT	0.243511364000	2,134,397	同上	同上
同上	AC	0.004578135000	2,134,414	同上	同上
同上	CT	0.004578135000	2,134,418	同上	同上
同上	AT	0.088909268000	2,134,571	同上	同上
同上	AG	0.270470133000	2,134,590	同上	同上
同上	CT	0.020768771000	2,134,655	同上	同上
Pp_No98_SNP908	CT	0.155619454000	2,200,427	GGATTAATGGAACCTGGAGGT	ATACCGCCGTTCATCTTCAC
同上	AG	0.459396950000	2,200,441	同上	同上
同上	GT	0.629882351000	2,200,514	同上	同上
同上	AG	0.097539557000	2,200,528	同上	同上
同上	AT	0.651264445000	2,200,538	同上	同上
同上	GT	0.622589830000	2,200,554	同上	同上
同上	GT	0.622589830000	2,200,555	同上	同上
同上	AG	0.336310706000	2,200,574	同上	同上
同上	AG	0.085992113000	2,200,586	同上	同上
同上	CT	0.640720975000	2,200,599	同上	同上
Pp_kif_SNP935	AG	0.933475787000	2,227,144	TGTTTGCAGTTTGGATCTTTTCC	TGCCAGCTCTTTTATCTGCAC
同上	AG	0.933475787000	2,227,208	同上	同上
同上	AG	0.933475787000	2,227,215	同上	同上
同上	AC	0.516601383000	2,227,217	同上	同上
同上	AG	0.331335261000	2,227,251	同上	同上
同上	AT	0.953922857000	2,227,257	同上	同上
同上	AG	0.115245876000	2,227,264	同上	同上

Table 3 本研究で用いた RNA-seq リードデータの詳細

Sample ID	種名・性別	表現型	遺伝子型	サンプル部位	サンプル時期	Total size (bp)
Sample_130207_Hiseq1B_I3_05	シロオビアゲハ・メス	擬態型	<i>Hh</i>	後翅	終齢幼虫 (Wandering 期)	16,331,221
Sample_130207_Hiseq1B_I3_06	シロオビアゲハ・メス	擬態型	<i>Hh</i>	後翅	終齢幼虫 (Wandering 期)	21,878,252
Sample_130207_Hiseq1B_I3_15	シロオビアゲハ・メス	擬態型	<i>Hh</i>	後翅	終齢幼虫 (Wandering 期)	16,036,900
Sample_130125_Hiseq3A_I7_09	シロオビアゲハ・メス	擬態型	<i>Hh</i>	後翅	蛹2日目	22,401,448
Sample_130125_Hiseq3A_I7_25	シロオビアゲハ・メス	擬態型	<i>Hh</i>	後翅	蛹2日目	24,458,836
Sample_130207_Hiseq1B_I3_07	シロオビアゲハ・メス	擬態型	<i>Hh</i>	後翅	蛹2日目	18,554,345
Sample_130130_Hiseq2B_I1_01 1	シロオビアゲハ・メス	擬態型	<i>Hh</i>	後翅	蛹10.5日目	34,513,832
Sample_130207_Hiseq1B_I3_19	シロオビアゲハ・メス	擬態型	<i>Hh</i>	後翅	蛹10.5日目	22,666,622
Sample_130207_Hiseq1B_I3_01	シロオビアゲハ・メス	擬態型	<i>Hh</i>	後翅	蛹10.5日目	24,070,742
Sample_130125_Hiseq3A_I7_1	シロオビアゲハ・オス	非擬態型	<i>Hh</i>	後翅	終齢幼虫 (Wandering 期)	64,228,272
Sample_130125_Hiseq3A_I7_3	シロオビアゲハ・オス	非擬態型	<i>Hh</i>	後翅	蛹2日目	105,621,100
Sample_120316_HiseqB_3	シロオビアゲハ・オス	非擬態型	<i>Hh</i>	精巢	終齢幼虫 (Wandering 期)	305,136,236
Sample_120316_HiseqB_4	シロオビアゲハ・オス	非擬態型	<i>Hh</i>	翅原基	終齢幼虫 (Wandering 期)	261,529,208
Sample_120316_HiseqB_5	シロオビアゲハ・オス	非擬態型	<i>Hh</i>	脂肪体	終齢幼虫 (Wandering 期)	125,779,992
Sample_120316_HiseqB_6	シロオビアゲハ・オス	非擬態型	<i>Hh</i>	頭	終齢幼虫 (Wandering 期)	141,938,268
Sample_120316_HiseqB_7	シロオビアゲハ・オス	非擬態型	<i>Hh</i>	中腸	終齢幼虫 (Wandering 期)	140,877,248
Sample_120316_HiseqB_8	シロオビアゲハ・オス	非擬態型	<i>Hh</i>	上皮	終齢幼虫 (Wandering 期)	100,929,684
♀_I_r860	ナガサキアゲハ・メス	擬態型	<i>Aa</i>	全身	蛹7日目	4,018,429,334
♂_I_r861	ナガサキアゲハ・オス	非擬態型	<i>aa</i>	全身	蛹7日目	3,966,944,159

Table 4 本研究で用いたプライマーおよび siRNA の詳細

単行本または雑誌掲載等の形で刊行される予定のためインターネット公表できません。

Table 5 ナガサキアゲハゲノム PCR による逆位構造の有無の調査結果-1

単行本または雑誌掲載等の形で刊行される予定のためインターネット公表できません。

Table 6 ナガサキアゲハゲノム PCR による逆位構造の有無の調査結果-2

単行本または雑誌掲載等の形で刊行される予定のためインターネット公表できません。

Table 7 ナガサキアゲハにおける Breakpoint 近傍のインサート配列の詳細

単行本または雑誌掲載等の形で刊行される予定のためインターネット公表できません。

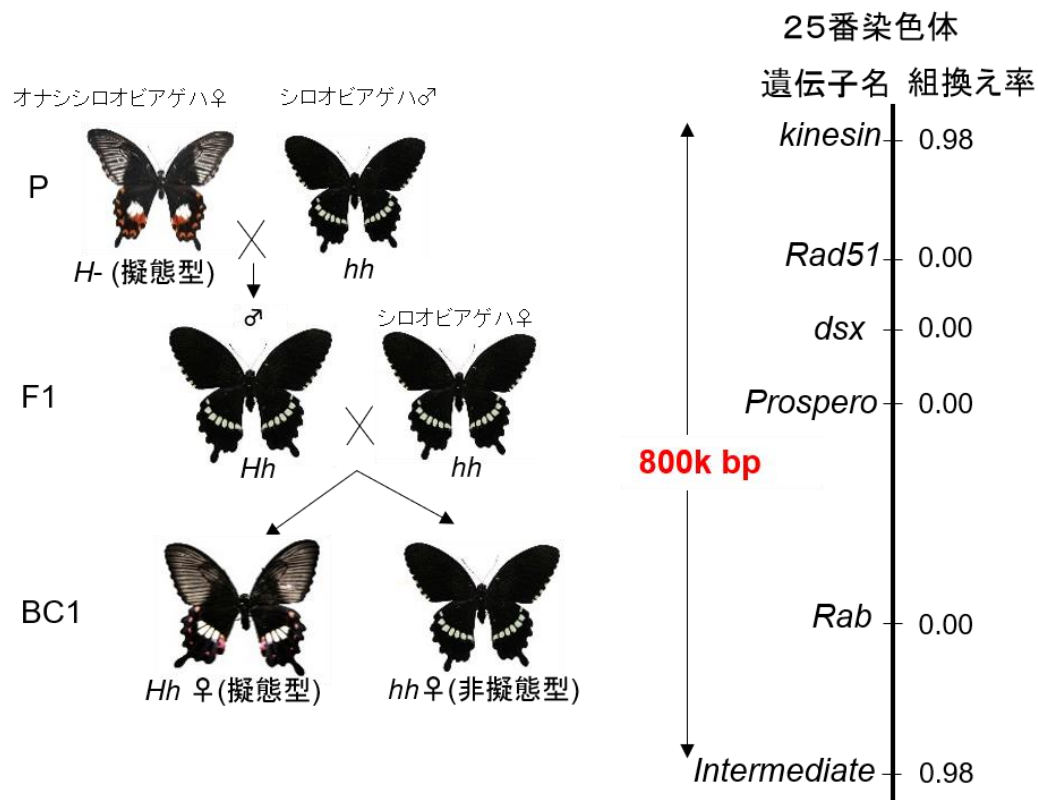


Figure 5. 連鎖解析による H 遺伝子座の絞り込み 先行研究として、共同研究者の名古屋大学名誉教授 堀寛博士によりシロオビアゲハ (*Papilio polytes*) オス個体及びオナシシロオビアゲハ (*Papilio alphenor*: フィリピンに生息するシロオビアゲハの亜種) 擬態型メス個体の掛け合わせによる F1 交雑個体が作製され、Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) を利用した連鎖解析による H 遺伝子座の絞り込みが行われた。その結果、擬態の表現型と完全にリンクする AFLP マーカーが同定された。この結果を踏まえ、同定された遺伝子マーカーの連鎖群を基に、本研究室のシロオビアゲハのドラフトゲノムの情報 (Table 1) を用いることで、シロオビアゲハ第 25 番染色体上の 800 kbp に相当する領域であることを確かめた。Nishikawa et al., 2015 より改変。

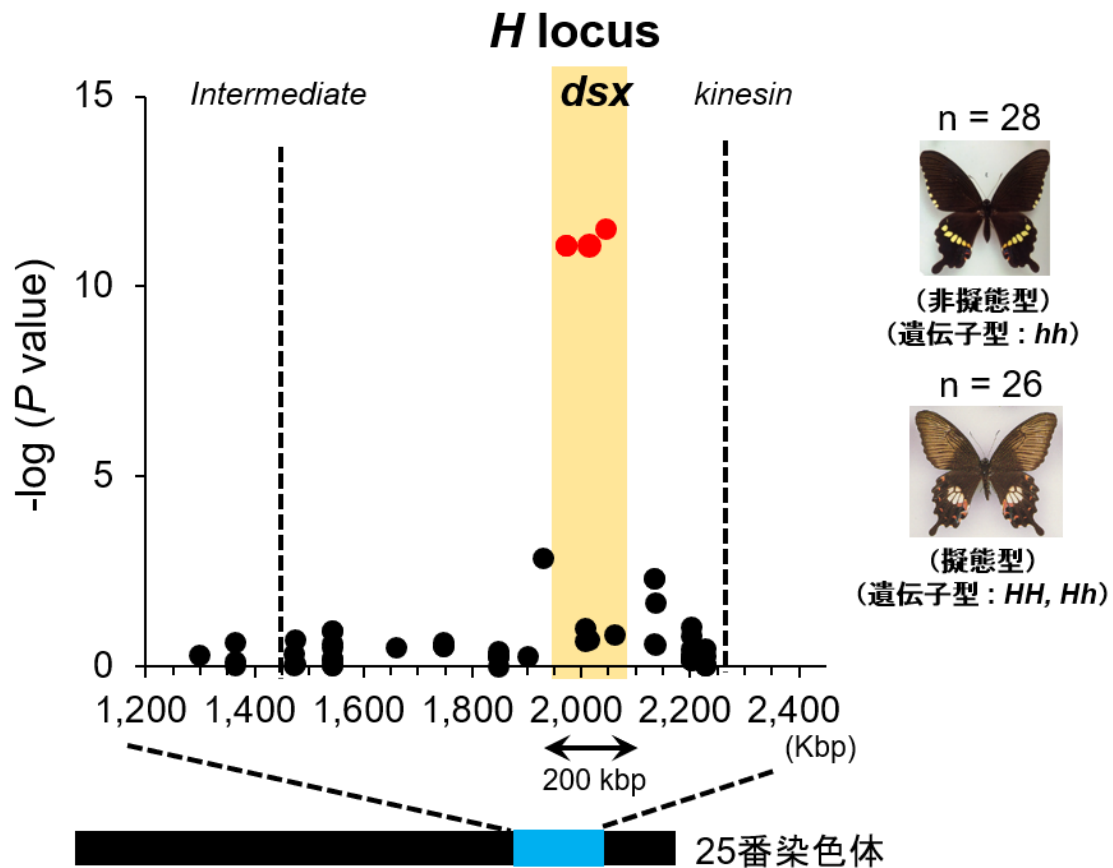


Figure 6. シロオビアゲハにおける SNP を用いた Association 解析による原因領域の同定
シロオビアゲハの連鎖解析で用いた遺伝子マーカーの位置(黒点)と表現型と塩基の多様性との
相関(-log(P value))を示している。非擬態型メス(遺伝子型:hh)28 匹、擬態型メス(遺伝子型:Hh,
HH) 26 匹を用いて連鎖解析を行った。同定された原因領域内で dsx 近傍の SNPs マーカーが
擬態型表現型と関連している(赤点:8 カ所(左から 3 カ所、4 カ所、1 カ所、一部の点が重なって
いる)ことから、擬態の原因領域である H 遺伝子座が dsx の近傍約 200kb にあると同定した。SNPs
の詳細は Table 2 にまとめて記載している。

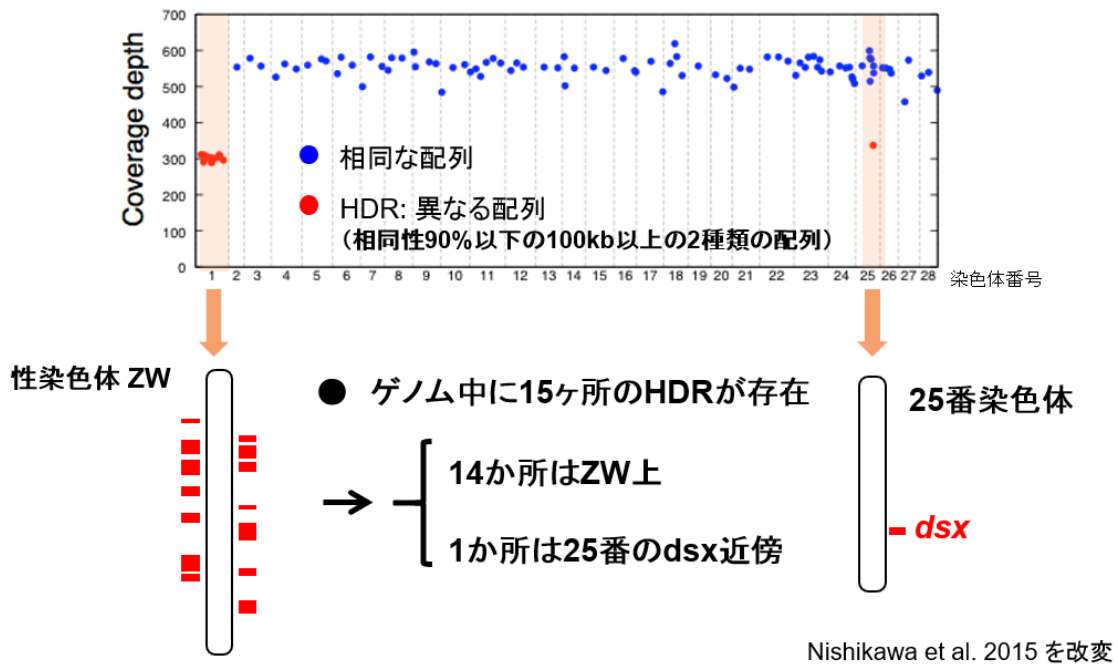
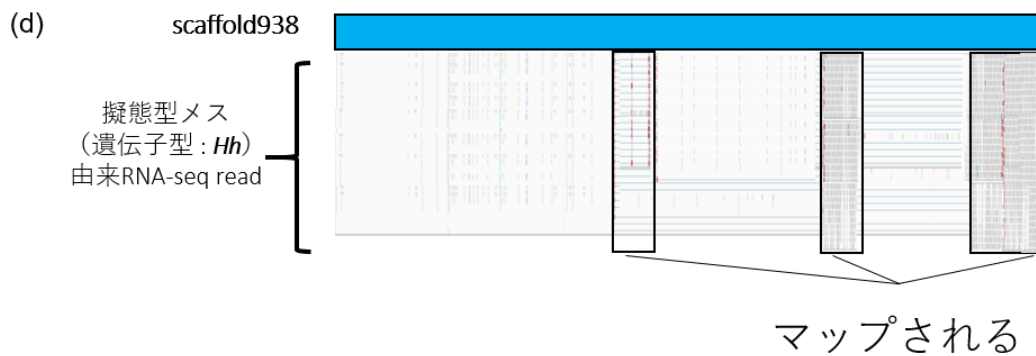
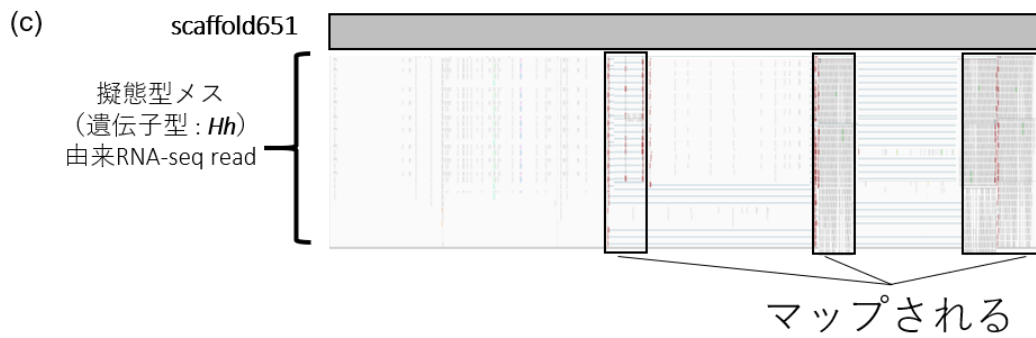
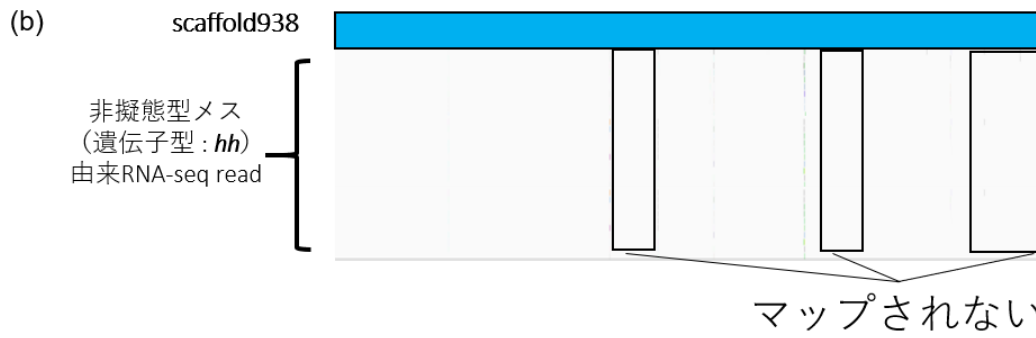
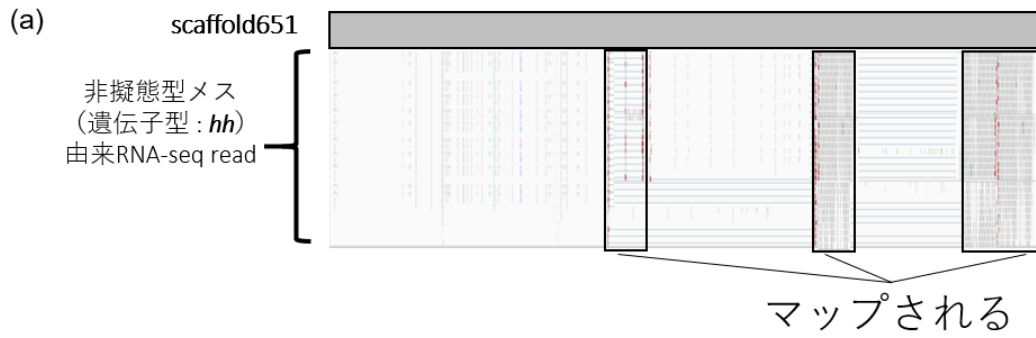
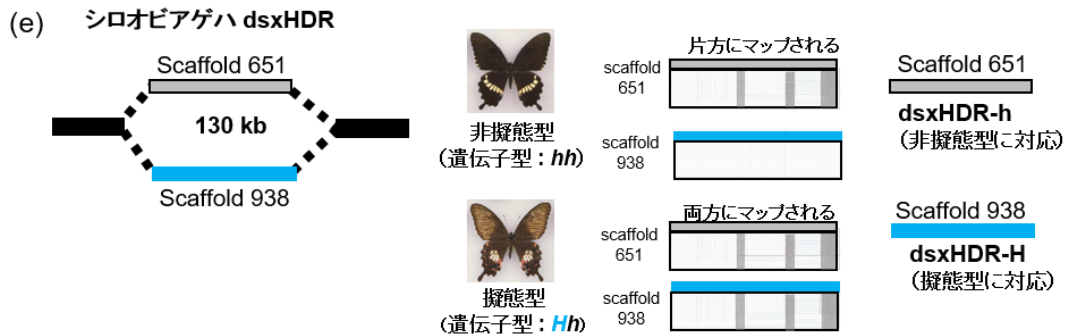


Figure 7. シロオビアゲハ・ゲノムに見つかった highly diversified region (HDR)

共同研究者である東京工業大学大学院 生命情報専攻 伊東武彦教授らによるシロオビアゲハ全ゲノム解析の結果、ほとんどのゲノム領域では相同染色体は相同な配列で構成されていたが、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(赤箱)。そのうち14箇所は性染色体である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 dsxHDR)に由来することが判明した。この結果は、共同研究者である梶谷博士によるものである。

Figure 8. 単行本または雑誌掲載等の形で刊行される予定のためインターネット公表できません。





(f) 単行本または雑誌掲載等の形で刊行される予定のためインターネット公表できません。

Figure 9. RNA-seq ショートリードのマッピング解析による *H*、*h* 配列の同定 シロオビアゲハ dsxHDR 近傍のゲノム構造を詳細に解析したところ、配列の異なる 2 種類の scaffold (scaffold 651, 938) が存在した。ゲノムを読んだシロオビアゲハメス個体の遺伝子型が *Hh* であったと仮定すると、この配列の異なる 2 種類の scaffold はそれぞれ *H* および *h* に対応している可能性が強く示唆された。解析ソフト Tophat (Kim et al., 2013) を使用して、まずは非擬態型メス (*hh*) 由来のショートリードを scaffold 651 (a)、scaffold 938 (b) 配列にマップした。その結果、片方の scaffold 651 だけにマップされた (a、b、マップされたリードは灰色で表示)。同様に擬態型メス (*Hh*) 由来のショートリードを scaffold 651、938 にマップしたところ、scaffold 651、938 両方にマップされた (c、d、マップされたリードは灰色で表示)。この結果は、scaffold 651 は非擬態型 *h* に対応し、scaffold 938 は擬態型 *H* に対応していると考えられ、前者を dsxHDR-h、後者を dsxHDR-H とした (e)。

単行本または雑誌掲載等の形で刊行される予定のためインターネット公表できません。

Figure 10. 単行本または雑誌掲載等の形で刊行される予定のためインターネット公表で
きません。

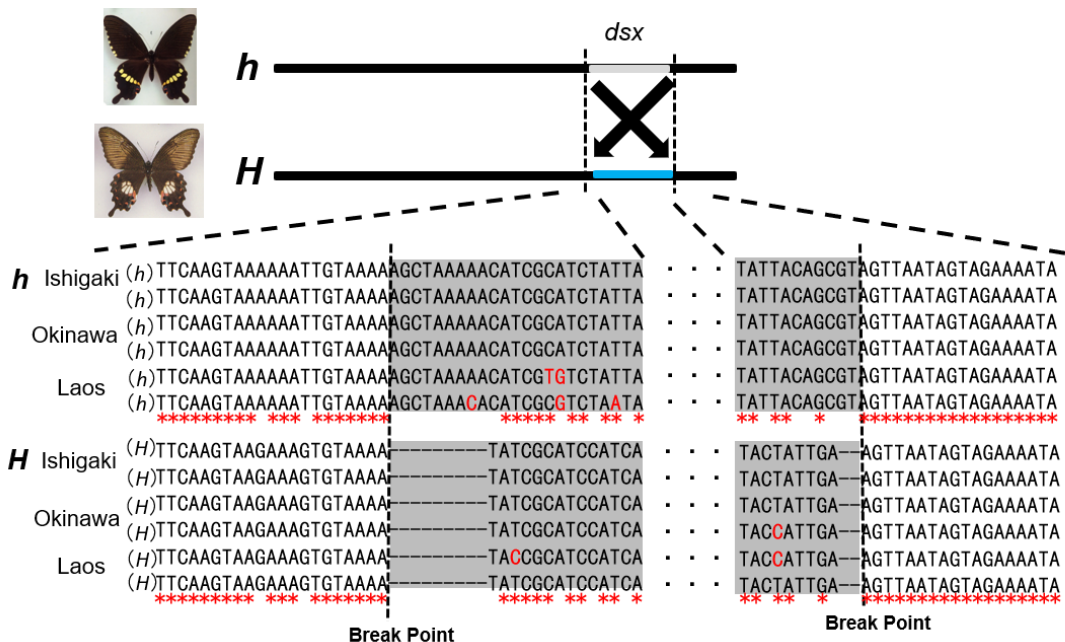


Figure 11. シロオビアゲハゲノムシーケンス解析による地域間での逆位構造の有無の調査
 石垣島、沖縄本島の南西諸島群並びに沖縄と約 2700km 離れたラオスの個体のゲノムを用いて dsxHDR の Breakpoint 周辺配列をシーケンス解析し、比較した。縦黒点線は Breakpoint を、赤字は SNP の位置を、* は *H* と *h* 間で相同な配列をそれぞれ示している。その結果、地域に関係なく相同性の低下する位置は一致しており、地域によらず逆位が生じているためと考えられた。

Figure 12. 単行本または雑誌掲載等の形で刊行される予定のためインターネット公表で
きません。

Figure 13. 単行本または雑誌掲載等の形で刊行される予定のためインターネット公表できません。

Figure 14. 単行本または雑誌掲載等の形で刊行される予定のためインターネット公表で
きません。

Figure 15. 単行本または雑誌掲載等の形で刊行される予定のためインターネット公表で
きません。

Figure 16. 単行本または雑誌掲載等の形で刊行される予定のためインターネット公表で
きません。

Figure 17. 単行本または雑誌掲載等の形で刊行される予定のためインターネット公表できません。

Figure 18. 単行本または雑誌掲載等の形で刊行される予定のためインターネット公表で
きません。

Figure 19. 単行本または雑誌掲載等の形で刊行される予定のためインターネット公表で
きません。

Figure 20. 単行本または雑誌掲載等の形で刊行される予定のためインターネット公表で
きません。

Figure 21. 単行本または雑誌掲載等の形で刊行される予定のためインターネット公表で
きません。

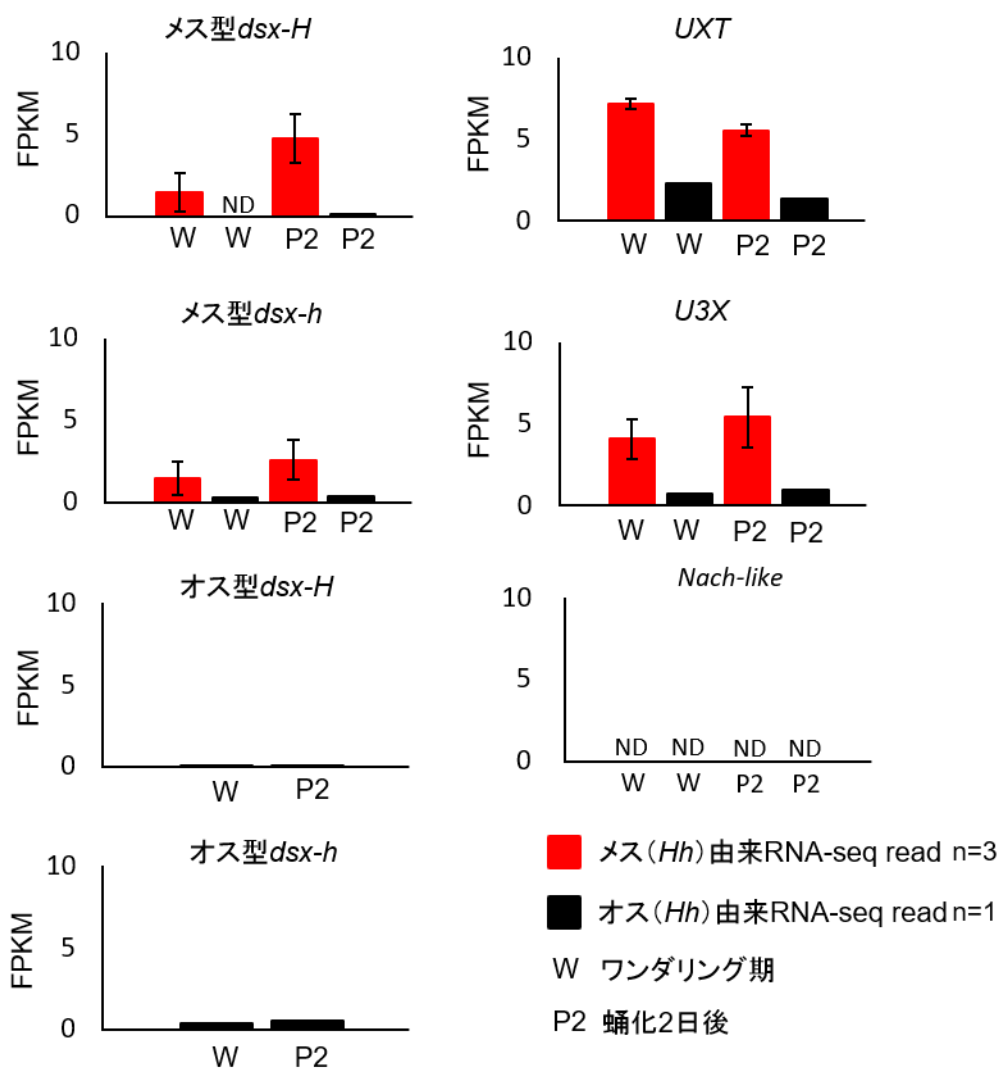


Figure 22. シロオビアゲハ雌雄の RNA-seq リードを用いた *dsx*, *UXT*, *U3X*, *Nach-like* の発現解析 擬態型メス (*Hh*: 赤色 Box) 及びオス (*Hh*: 黒色 Box) 後翅由来の RNA-seq リードを用いて FPKM 値を算出し、比較した。W、P2 はそれぞれワンダリング期、蛹化 2 日後を示している。擬態型メスの後翅においてオスに比べて、*dsx*, *UXT*, *U3X* は高発現していることが分かった。ND: Not detected.

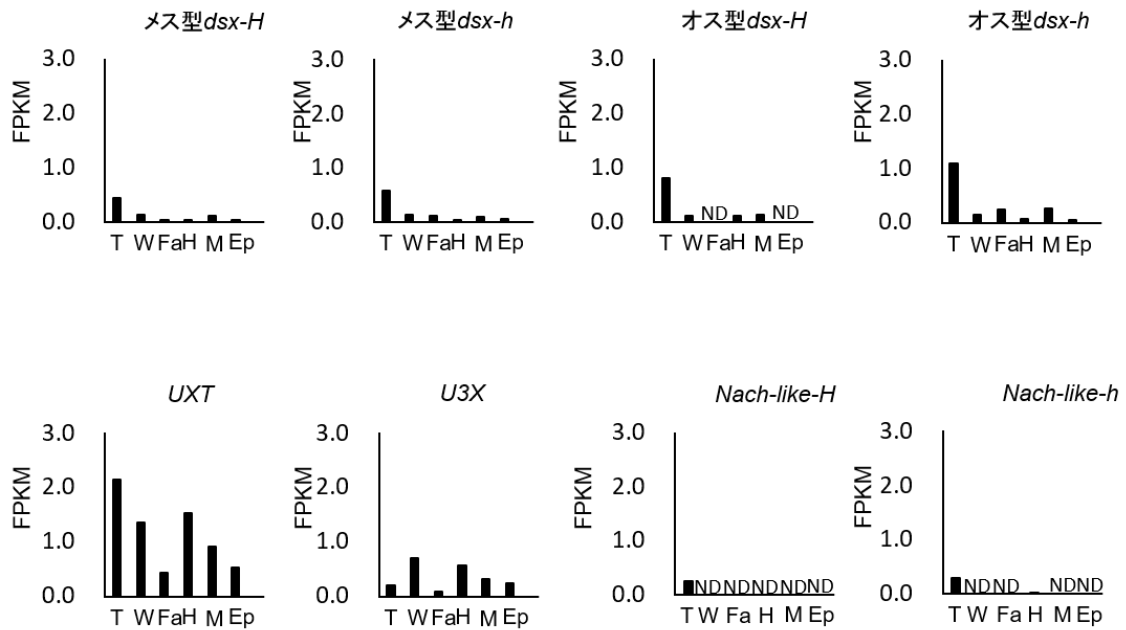


Figure 23. シロオビアゲハ雄複数組織由来の RNA-seq リードを用いた *dsx*, *UXT*, *U3X*, *Nach-like* の発現解析 ワンダリング期のオス (*Hh* : 黒色 Box) 複数組織由来の RNA-seq リードを用いて FPKM 値を算出し、比較した。T、W、Fa、H、M、Ep はそれぞれ精巣、翅原基、脂肪体、頭、中腸、上皮を示している。*dsx* は精巣以外での発現量は低いことが分かった。*UXT*、*U3X* は複数の組織での発現が見られたが、*Nach-like* は精巣でのみ発現していた。ND: Not detected。

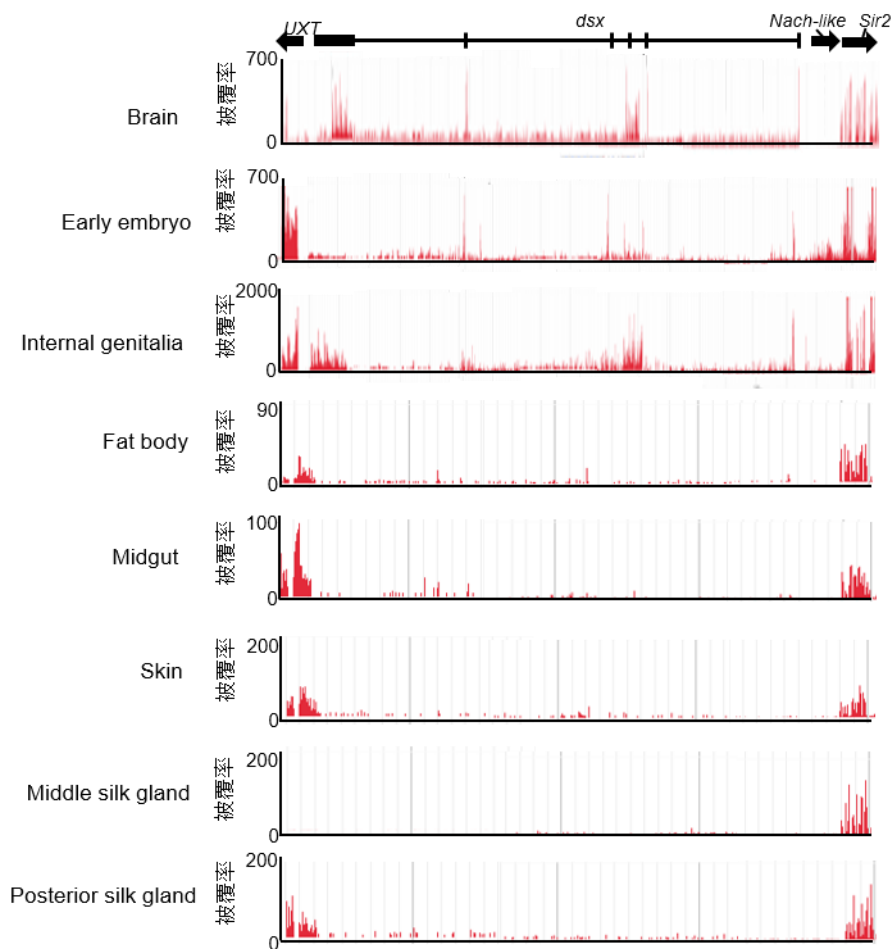


Figure 24. カイコ複数組織での dsxHDR 周辺遺伝子の発現解析 SilkBase (URL: <http://silkbases.ab.a.u-tokyo.ac.jp/cgi-bin/index.cgi>) を利用し、初期胚および 5 齢幼虫の 6 組織 (脳、内部生殖巣、脂肪体、中腸、皮膚、絹糸線 (中部・後部)) についての発現を HDR 上での被覆率 (どれだけショートリードが張り付いたかの尺度) で示した。縦軸は被覆率を示し、リードが張り付く領域は赤色で示している。また、上部に模式的な遺伝子配置を示している。

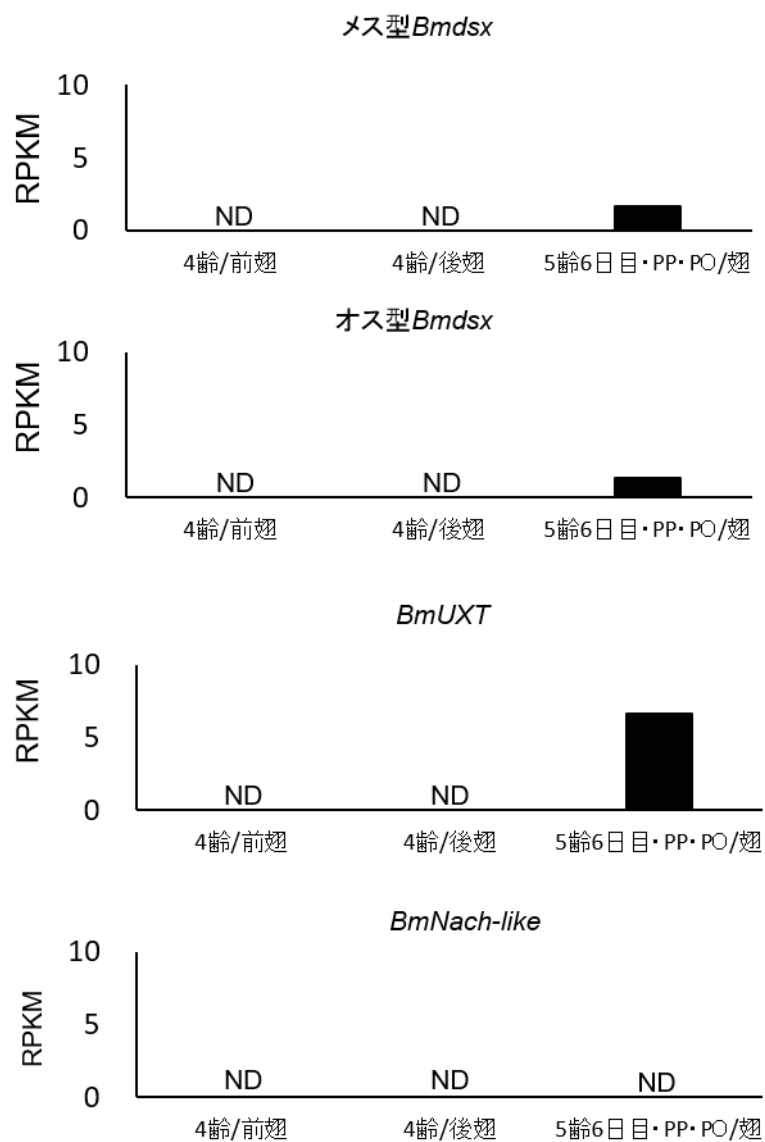


Figure 25. カイコ翅由来の RNA-seq リードを用いた *dsx*, *UXT*, *Nach-like* の発現解析 ①4 齡前翅 (DRA Accession ID: SRR2156424) 、②4 齡後翅 (DRA Accession ID: SRR2156423) 、③5 齡 6 日目・前蛹・蛹化直後の翅の混合サンプル (DRA Accession ID: SRR1535663) の 3 種類の RNA-seq リードを用いて FPKM 値を算出し、比較した。すべて n = 1。ND: Not detected。

Figure 26. 単行本または雑誌掲載等の形で刊行される予定のためインターネット公表で
きません。

Figure 27. 単行本または雑誌掲載等の形で刊行される予定のためインターネット公表できません。

2. シロオビアゲハにおけるメス限定ベイツ型擬態への *H allele* がもたらす影響

2-1. 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

単行本または雑誌掲載等の形で刊行される予定のためインターネット公表できません。

2-2. シロオビアゲハにおける *Hallele* がもたらす成育への影響

単行本または雑誌掲載等の形で刊行される予定のためインターネット公表できません。

総合考察

単行本または雑誌掲載等の形で刊行される予定のためインターネット公表できません。

謝辞 Acknowledgements

本研究を進めるにあたり、終始適切なお助言並びに懇切丁寧にご指導していただきました藤原晴彦教授、小嶋徹也准教授に心から御礼申し上げます。また、先行研究に携わり、本研究テーマの礎を築いてくださった名古屋大学名誉教授の堀寛氏に深く感謝致します。さらに、アゲハ二種のゲノム解析においてドラフトゲノムの構築および全ゲノム解析を行って頂いた東京工業大学大学院 生命理工学研究科 生命理工科学部 生命情報専攻 知能情報分野の伊藤武彦教授、梶谷嶺博士に深く感謝致します。ナガサキアゲハの台湾個体の入手および RNA-seq データ、写真を提供して頂きました、京都大学 理学研究科 生物科学専攻 動物学教室 自然史学講座の曾田貞滋教授、小俣慎也博士に深く感謝致します。シロオビアゲハの RNA-seq データおよび翅での機能解析のデータを提供していただくとともに、シロオビアゲハの飼育法について懇切丁寧ご教示くださり、終始適切なアドバイスをいただいた西川英輝博士に深く感謝致します。研究活動を通して終始適切なアドバイスをいただくとともに、懇切丁寧に実験方法を指導していただいた山口淳一博士、安藤俊哉博士に深く感謝致します。最後に多くのご助力やご指摘、議論をいただいた遺伝システム革新学分野の皆さんに深く感謝致します。

参考文献 References

上杉 兼司 シロオビアゲハが語る昆虫のベイツ型擬態の進化 擬態 だましあいの進化論 築地書館 (1999).

大崎 直太 擬態の進化 ダーウィンも誤解した 150 年の謎を解く 海遊舎 (2009).

加藤泰彦、Dang Nong Quang、渡邊 肇 ミジンコの性決定遺伝子を活性化する長鎖ノンコーディング RNA の機能解析 第 39 回日本分子生物学会年会 ポスター発表 パシフィコ横浜 (2016 年 11 月 29 日~12 月 2 日).

白水 隆 世界のアゲハチョウ (9) —パピリオ属の諸形質、特に尾状突起の遺伝—、昆虫と自然 1 (9) : 2-11 pl.1-2 (1966).

西川英輝 シロオビアゲハのベイツ型擬態に関わる紋様の進化プロセスの解明 博士論文 (2014).

福田 晴夫、二町 一成 日本産ナガサキアゲハの有尾型雌について (第 1 報) 鹿児島県立博物館研究報告書:1-21 (1985)

Anders, S., Huber, W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* **11**: R106 (2010).

Ando, T., Fujiwara, H. Electroporation-mediated somatic transgenesis for rapid functional analysis in insects. *Development* **140**: 454-458 (2013).

Averof, M., Akam, M. Hox gene and the diversification of hexapod and crustacean body plans. *Nature* **376**: 420-423 (1995).

Baker, B. S., Wolfner, M. F. A molecular analysis of *doublesex*, a bifunctional gene that controls both male and female sexual differentiation in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev* **2**: 477-489 (1988).

Bates, H. W. Contributions to an insect fauna of the Amazon valley. Lepidoptera: Heliconidae. *Trans. Linn. Soc.* **23**, 495-566 (1861).

Brower, L. P., Brower, J. V. Z. The relative abundance of model and mimic butterflies in natural populations of the battus philenor mimicry complex. *Ecology* **43**: 154-158 (1962).

Brower, J. V. Z. Experimental studies of mimicry in some North American butterflies: Part II. *Battus philenor* and *Papilio troilus*, *P. polyxenes* and *P. glaucus*. *Evolution* **12**: 123-136 (1958).

Clarke, C. A., Sheppard, P. M. Supergene and mimicry. *Heredity* **14**: 175-185 (1960).

Clarke, C. A., Sheppard, P. M., Thornton, I. W. B. The genetics of the mimetic butterfly *Papilio memnon* L. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **254**: 37-89 (1968).

Clarke, C. A., Sheppard, P. M. Further studies on the genetics of the mimetic butterfly *Papilio memnon* L. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **263**: 35-70 (1971).

Clarke, C. A., Sheppard, P. M. The genetics of the mimetic butterfly *Papilio polytes* L. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B, Biol. Sci.* **263**: 431-458 (1972).

Condamine, F. L., Sperling, F. A., Wahlberg, N., Rasplus, J. Y., Kergoat, G. J. What causes latitudinal gradients in species diversity? Evolutionary processes and ecological constraints on swallowtail biodiversity. *Ecol. Lett.* **15**: 267-277 (2012).

Darlington, C. D., Mather, K. The elements of genetics. George Allen and Unwin Ltd., London (1949).

Darwin, C.R. The origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life. London: John Murray. 6th edition; with additions and corrections (1872).

Dohrmann, C. E., Nijhout, H. F. Development of the wing margin in *Precis coenia* (Lepidoptera: Nymphalidae). *J. Res. Lepid.* **27**: 151-159 (1988).

Euw, J.V., Reichstein, T., Rothschild, M. Aristolochic acid-I in the swallowtail butterfly *Pachlioptera aristolochiae* (Fabr.) (Papilionidae). *Israel J. Chem.* **6**: 659-670 (1968).

Ferrandon, D., Imler, J. L., Hoffmann, J. A. Sensing infection in *Drosophila*: Toll and

beyond. *Semin. Immunol.* **16**: 43-53 (2004).

Ford, E. B. The genetics of *Papilio dardanus* Brown (Lep.). *Trans. R. ent. Soc. Lond.* **85**: 435-466 (1936).

Fryer, J. C. F. An investigation by pedigree breeding into the polymorphism of *Papilio polytes*, Linn. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B, Biol. Sci.* **204**: 227-254 (1913).

Gorelick, R. Transposable elements suppress recombination in all meiotic eukaryotes, including automictic ancient asexuals: a reply to Schon and Martens. *J. Nat. Hist.* **37**: 903-909 (2003).

Fujiwara, H., Nishikawa, H. Functional analysis of genes involved in color pattern formation in Lepidoptera. *Curr. Opin Insect Sci.* **17**: 16-23 (2016).

Hoffmann, A. A., Sgro, C. M., Weeks, A. R. Chromosomal inversion polymorphisms and adaptation. *Trends Ecol. Evol.* **19**: 482-488 (2004).

Janzen, D. H., Hallwachs, W., Burns, J. M. A tropical horde of counterfeit predator eyes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **107**: 11659-65 (2010).

Jones, F. C., Grabherr, M. G., Chan, Y. F., Russell, P., Mauceli, E., Johnson, J., et al. The genomic basis of adaptive evolution in threespine sticklebacks. *Nature* **484**:55-61 (2012).

Joron, M., Frezal L., Jones, R. T., Chamberlain, N. L., Lee, S. F., Haag, C. R., et al. Chromosomal rearrangements maintain a polymorphic supergene controlling butterfly mimicry. *Nature* **477**: 203-206 (2011).

Kajitani, R., Toshimoto, K., Noguchi, H., Toyoda, A., Ogura, Y., Okuno, M., et al. Efficient *de novo* assembly of highly heterozygous genomes from whole-genome shotgun short reads. *Genome Res.* **24**: 1384-1395 (2014).

Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., Salzberg, S. L. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.* **14**: R36 (2013).

Kitamura, T., Imafuku, M. Behavioural mimicry in flight path of Batesian intraspecific polymorphic butterfly *Papilio polytes*. *Proc. Biol. Sci.* **282**:20150483 (2015).

Kodama, R., Yoshida, A., Mitsui, T. Programmed cell-death at the periphery of the pupal wing of the butterfly, *Pieris rapae*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **204**: 418-426 (1995).

Komata, S., Lin, C. P., Iijima, T., Fujiwara, H., Sota, T. Identification of *doublesex* alleles associated with the female-limited Batesian mimicry polymorphism in *Papilio memnon*. *Sci Rep.* **6**: 34782 (2016).

Kopp, A. *Dmrt* genes in the development and evolution of sexual dimorphism. *Trends Genet.* **28**: 175-184 (2012).

Kopp, A., Duncan, I., Carroll, S. B. Genetic control and evolution of sexually dimorphic characters in *Drosophila*. *Nature* **408**: 553-559 (2000).

Kunte, K. The diversity and evolution of batesian mimicry in *Papilio* swallowtail butterflies. *Evolution* **63**: 2707-2716 (2009).

Kunte, K., Zhang, W., Tenger-Trolander, A., Palmer, D. H., Martin, A., Reed, R. D., et al. *doublesex* is a mimicry supergene. *Nature* **507**: 229-232 (2014).

Küpper, C., Stocks, M., Risse, J. E., dos Remedios, N., Farrell, L. L., McRae, S. B., et al. A supergene determines highly divergent male reproductive morphs in the ruff. *Nat genet.* **48**: 79-83 (2016).

Lamichhaney, S., Fan, G., Widemo, F., Gunnarsson, U., Thalmann, D. S., Hoepfner, M. P., et al. Structural genomic changes underlie alternative reproductive strategies in the ruff (*Philomachus pugnax*). *Nat genet* **48**: 84-88 (2016).

Langmead, B., Salzberg, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods.* **9(4)**: 357-359 (2012).

Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., Salzberg, S. L. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* **10**: R25 (2009).

Mallet, J., Joron, M. Evolution of diversity in warning color and mimicry: polymorphism, shifting balance, and speciation. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **30**: 201-233 (1999).

Martin, A., Reed, R. D. Wnt signaling underlies evolution and development of the butterfly wing pattern symmetry systems. *Dev. Biol.* **395**: 367-378 (2014).

Nagoshi, R. N., McKeown, M., Burtis, K. C., Belote, J. M. Baker, B. S. The control of alternative splicing at genes regulating sexual differentiation in *D. melanogaster*. *Cell* **53**: 229-236 (1988).

Neumann, C. J., Cohen, S. M. Long-range action of Wingless organizes the dorsal-ventral axis of the *Drosophila* wing. *Development* **124**: 871-880 (1997).

Nijhout, H. F. The development and evolution of butterfly wing patterns. Smithsonian institution press (1991).

Nijhout, H. F. Polymorphic mimicry in *Papilio dardanus*: mosaic dominance, big effects, and origins. *Evol. Dev.* **5**: 579-592 (2003).

Nishida, R., Fukami, H. Ecological adaptation of an Aristolochiaceae-feeding swallowtail butterfly, *Atrophaneura alcinous*, to aristolochic acids. *J. chem. Ecol.* **15**: 2549-2563 (1989).

Nishikawa, H., Iga, M., Yamaguchi, J., Saito, K., Kataoka, H., Suzuki, Y., et al. Molecular basis of wing coloration in a Batesian mimic butterfly, *Papilio polytes*. *Sci. Rep.* **3**:3184 (2013).

Nishikawa, H., Iijima, T., Kajitani, R., Yamaguchi, J., Ando, T., Suzuki, Y., et al. A genetic mechanism for female-limited Batesian mimicry in *Papilio* butterfly. *Nat genet.* **47**:405-409 (2015).

Ohsaki, N. A common mechanism explaining the evolution of female-limited and both-sex Batesian mimicry in butterflies. *J. Anim. Ecol.* **74**:728-734 (2005).

Razaval, C., Pavlou, H. J., Dornan, A. J., Chan, Y. B., Kravitz, E. A., Goodwin, S. F. Neural circuitry underlying *Drosophila* female postmating behavioral responses. *Curr.*

Biol. **22**:1155-1165 (2012).

Schneider, C. A., Rasband, W. S., Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat methods* **9**: 671-675 (2012).

Scriber, J. M., Hagen, R. H., Lederhouse, R. C. Genetics of mimicry in the tiger swallowtail butterflies, *Papilio glaucus* and *P. canadensis* (Lepidoptera: Papilionidae). *Evolution* **50**: 222-236 (1996).

Scwander, T., Libbrecht, R., Keller, L. Supergenes and complex phenotypes. *Curr Biol.* **24**: R288-294 (2014).

Sekimura, T., Fujihashi, Y., Takeuchi, Y. A model for population dynamics of the mimetic butterfly *Papilio polytes* in the Sakishima Islands, Japan. *J. Theor. Biol.* **361**: 133-140 (2014).

Sniegowski, P. D., Charlesworth, B. Transposable element numbers in cosmopolitan inversions from a natural population of *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* **137**: 815-827 (1994).

Su, S. K., Li, C. Y., Lei, P. J., Wang, X., Zhao, Q. Y., Cai, Y., et al. The EZH1-SUZ12 complex positively regulates the transcription of NF- κ B target genes through interaction with UXT. *J. Cell Sci.* **129**: 2343-2353 (2016).

Süffert, F. Die Ausbildung des imaginalen Flügelschnittes in der Schmetterlingspuppe. *Z. Morphol. Okol. Tiere* **14**: 338-359 (1929).

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **28**: 2731-2739 (2011).

The international silkworm genome consortium. The genome of a lepidopteran model insect, the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **38**: 1036-1045 (2008).

Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D. G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided

by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **24**: 4876-4882 (1997).

Thompson, M. J., Jiggins, C. D. Supergenes and their role in evolution. *Heredity* **113**: 1-8 (2014).

Timmermans, M. J., Baxter, S. W., Clark, R., Heckel, D. G., Vogel, H., Collins, S et al. Comparative genomics of the mimicry switch in *Papilio dardanus*. *Proc. R. Soc. B. Biol. Sci.* **281**: 20140465 (2014).

Trapnell, C., Williams, B. A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., van Baren, M. J., et al. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol.* **28**: 511-515 (2010).

Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D. R., et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc.* **3**: 562-578 (2012).

Turner, J. R. G. Why male butterflies are non-mimetic: natural selection, sexual selection, group selection, modification and sieving. *Biol. J. Linn. Soc.* **10**: 385-432 (1978).

Uesugi, K. Temporal change in records of the mimetic butterfly *Papilio polytes* with establishment of its model *Pachliopta aristolochiae* in the Ryukyu islands. *Jpn. J. Ent.* **59**: 183-198 (1991).

Uesugi, K. The adaptive significance of Batesian mimicry in the swallowtail butterfly, *Papilio polytes* (Insecta, Papilionidae): associative learning in a predator. *Ethology* **102**:762-775 (1996).

Ui-Tei, K., Naito, Y., Takahashi, F., Haraguchi, T., Ohki-Hamazaki, H., Juni, A. et al. Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. *Nucleic Acids Res.* **32**: 936-948 (2004).

Wallace, A. R. On the phenomena of variation and geographical distribution as illustrated by the Papilionidae of the Malayan Region. *Trans. Linn. Soc. (Lond.)* **25**: 1-71 (1865).

- Williams, T. M., Carroll, S. B. Genetic and molecular insights into the development and evolution of sexual dimorphism. *Nat. Rev. Genet.* **10**: 797-804 (2009).
- Wray, V., David, R. H., Nahrstedt, A. Biosynthesis of cyanogenic glycosides in butterflies and moths: incorporation of valine and isoleucine into linamarin and lotaustralin by *Zygaena* and *Heliconius* species (Lepidoptera). *Z. Naturforsch.* **38**: 583-588 (1983).
- Yagi, T., Sasaki, G., Takebe, H. Phylogeny of Japanese papilionid butterflies inferred from nucleotide sequences of the mitochondrial ND5 gene. *J. Mol. Evol.* **48**: 42-48 (1999).
- Yamaguchi, J., Mizoguchi, T., Fujiwara, H. siRNAs Induce Efficient RNAi Response in *Bombyx mori* Embryos. *PLoS ONE* **6**: e25469 (2011).
- Yamaguchi, J., Banno, Y., Mita, K., Yamamoto, K., Ando, T., Fujiwara, H. Periodic Wnt1 expression in response to ecdysteroid generates twin-spot markings on caterpillars. *Nat Commun* **4**:1857 (2013).
- Zakharov, E. V., Caterino, M. S., Sperling, F. A. Molecular phylogeny, historical biogeography, and divergence time estimates for swallowtail butterflies of the genus *Papilio* (Lepidoptera: Papilionidae). *Sys. Biol.* **53**: 193-215 (2004).
- Zecca, M., Basler, K., Struhl, G. Direct and long-range action of a wingless morphogen gradient. *Cell* **87**: 833-844 (1996).
- Zhan, S., Merlin, C., Boore, J. L., Reppert, S. M. The monarch butterfly genome yields insights into long-distance migration. *Cell* **147**: 1171-1185 (2011).
- Zhang, W., Li, B., Singh, R., Narendra, U., Zhu, L., Weiss, M. A. Regulation of sexual dimorphism: mutational and chemogenetic analysis of the *doublesex* DM domain. *Mol. Cell. Biol.* **26**: 535-547 (2006).
- Zhou, Y., Ge, R., Wang, R., Liu, F., Huang, Y., Liu, H., et al. UXT potentiates angiogenesis by attenuating Notch signaling. *Development.* **142**:774-786 (2015).

Zecca, M., Basler, K., Struhl, G. Direct and long-range action of a *wingless* morphogen gradient. *Cell* **87**: 833-844 (1996).

Supplementary Figures and Tables

単行本または雑誌掲載等の形で刊行される予定のためインターネット公表できません。