

論文の内容の要旨

論文題目

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

氏 名 西川 英輝

序論

昆虫は鳥などの捕食者から常に狙われているが、様々な戦略を用いてそれを回避している。「何かに似せて捕食者を欺く」擬態は広範な動物にみられる。中でも、無毒な種（擬態種）が有毒な種（モデル種）の紋様や行動をまねるベイツ型擬態は、適応的な形質の進化を理解する上で極めて興味深い現象である。これまで、ベイツ型擬態は生態学や行動学の対象として研究されてきたが、擬態種やモデル種の表現形質の形成や進化に関わる分子機構はほとんどわかっていない。この原因として、擬態種とモデル種で系統的に離れていることが多く、研究の切り口が見つけにくいことがあげられる。沖縄などに生息するシロオビアゲハ (*Papilio polytes*) は、ベイツ型擬態を示す蝶として

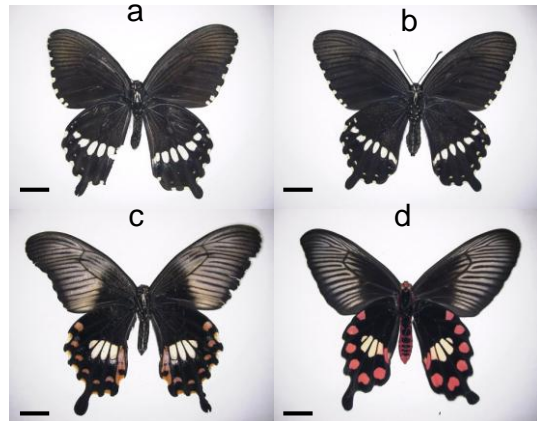


図1 シロオビアゲハとベニモンアゲハの成虫の翅の紋様パターン (a) シロオビアゲハの♂。(b) シロオビアゲハの非擬態型の♀。(c) シロオビアゲハの擬態型の♀。(d) ベニモンアゲハ。スケールバーは1cmを表している。

よく知られる。シロオビアゲハのメスの翅には2種類の紋様多型がある。非擬態型のメスはオスに似て後翅に横一筋の淡黄色紋様を示すが(図1 a、b)、擬態型のメスは毒チョウであるベニモンアゲハ (*Pachliopta aristolochiae*) の翅に似て、後翅の中央部に淡黄色紋様が局在し、辺縁部に赤いスポット状の紋様が形成される(図1 c、d)。擬態型表現型は1遺伝子座 (H 遺伝子座) のメンデル遺伝に従い、擬態型が非擬態型に対し優性であることが遺伝学的に示されている (Fryer, 1913、Clarke and Sheppard, 1972)。シロオビアゲハは同種・同性内で紋様多型が見られるので、シロオビアゲハとモデルのベニモンアゲハの紋様形成機構を比較することにより、擬態紋様がどのように進化してきたかを解明できる可能性がある。そこで本研究では、シロオビアゲハとモデルであるベニモンアゲハを用いて、紋様の着色に必須な色素の生合成機構を比較して、擬態紋様がどのような分子メカニズムで獲得されたかを明らかにすることを目的とした。翅の紋様は背景の黒色 (メラニン) を除くと、主に淡黄色紋様と赤色紋様の2つで構成されているので、

この2種類の紋様領域の色素合成を調べることで、擬態紋様形成機構の進化の解明にアプローチした。

結果と考察

1節 蛹期の後翅の発生と着色

まず翅の紋様がどのように発生・着色するのかを決定するために、蛹期の翅の着色過程の観察を行った。シロオビアゲハの蛹期は12日、ベニモンアゲハの蛹期は16日であった。シロオビアゲハでは、蛹の9日目(P9)からP10にかけて淡黄色紋様が着色し、P10.5に擬態型の赤色紋様が着色し、最後に黒色領域が着色した(図2:シロオビアゲハ)。ベニモンアゲハでは、P12からP13に淡黄色紋様が着色し、続いてP14からP15にかけて赤色紋様が、P16に黒色が着色した(図2:ベニモンアゲハ)。このように、紋様が着色する順序は2種で保存されていることが分かった。

領域特異的な着色は主に淡黄色と赤色の2種類による。そこで、淡黄色と赤色の両方で具体的にどういった色素・色素合成経路を用いているのかを調べることにした。

2節 淡黄色領域の色素合成機構

シロオビアゲハの非擬態型メス後翅の淡黄色領域から色素を単離・抽出すると、383nmに最大吸収波長が観察された。これはアゲハチョウ族に特有な色素 papiliochrome II (kynurenine と N-β-アラニルドーパミン(NBAD)が結合した物質)と同じだった。次にこの色素を HPLC により分離すると、主に3つのピークがあり、色素は3種類の物質の混合物であることが示唆された(図3a)。精密質量計を用いてこれらの物質の質量数と原子組成を計測したところ、ピーク1は papiliochrome II (図3b)、ピーク2は m/z 653.2933、C₃₂H₄₀N₆O₉ (図3c)、ピーク3は m/z 875.3944、C₄₃H₅₄N₈O₁₂ (図3d) であることが明らかとなった。MS/MS のフラグメントパターンからピーク2は kynurenine に NBAD の2量体が結合した構造の物質、ピーク3は kynurenine に

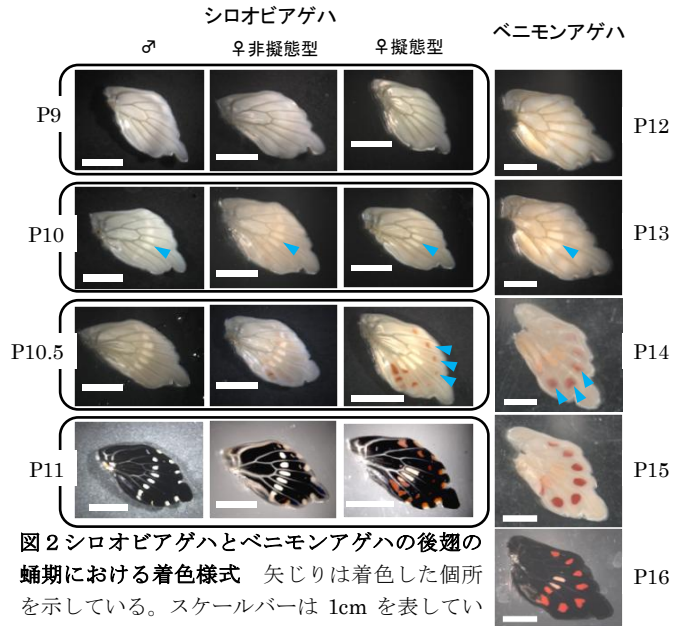


図2 シロオビアゲハとベニモンアゲハの後翅の蛹期における着色様式 矢じりは着色した個所を示している。スケールバーは1cmを表している。

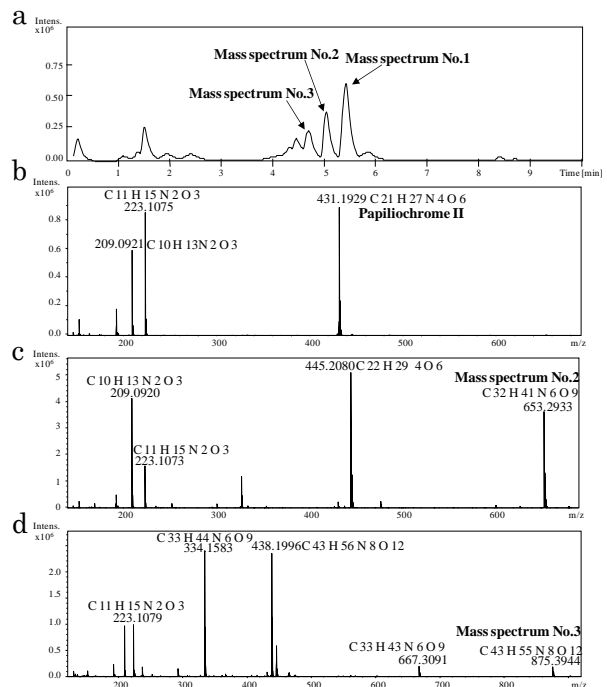


図3 LC/MSによるシロオビアゲハの淡黄色色素の同定 (a) シロオビアゲハ非擬態型メスの淡黄色色素粗抽出物のクロマトグラフ。主に3つのピークが観察された。(b-d) ピーク1、2、3の精密質量分析からの分子量と原子組成。

NBAD の 3 量体が結合した構成の物質であることが示唆された。以上より、シロオビアゲハの非擬態型の淡黄色色素は、kynurenine と NBAD が結合した複数の物質によって形成されていることが初めて明らかとなった。興味深いことに、シロオビアゲハの擬態型やベニモンアゲハ後翅中央部の淡黄色領域はこれらの色素は含まれていなかった。qRT-PCR で kynurenine と NBAD 合成酵素群の各遺伝子発現を調べると、非擬態型の淡黄色領域では全遺伝子が発現誘導されているのに対し、擬態型やベニモンアゲハの淡黄色領域ではこれらの合成系の遺伝子発現が抑制されていた。また、紫外線による照射を行うと、非擬態型の淡黄色領域では蛍光が見られるのに対し、擬態型やベニモンアゲハではそのような蛍光は見られなかった。これらの結果から、シロオビアゲハの非擬態型と擬態型では、淡黄色形成の領域特異性だけでなく、色素合成系そのものが異なっていることが示唆された。また擬態型と非擬態型の淡黄色領域の切り替えにより、擬態型では二次的にこの色素の発現を抑制し、別の色素によりベニモンアゲハに似た着色領域の形や物理化学的性質を似せることに成功した可能性が考えられた。

3 節 赤色領域の色素形成

(A) シロオビアゲハ擬態型メスの赤色色素形成機構

シロオビアゲハの赤色領域を様々な溶媒で処理し

表 1 RNA-sequencing において赤色領域で発現上昇していた遺伝子を抜粋したもの

遺伝子	Evalue	Gene ontology	FPKM value		Fold change	q value
			擬態型赤色領域	非擬態型赤色相同領域		
<i>vermilion</i>	7E-179	catabolic process to kynurenine	185.62	32.1	5.78	0.00000
<i>Kynurenine formamidase</i>	6E-33	catabolic process to kynurenine	220.25	46.43	4.74	0.00002
<i>snake</i>	1E-47	Toll signaling pathway	1.39	0.03	51.47	0.00000
<i>Spatzle-like</i>	3E-09	Toll signaling pathway	8.26	0.02	394.49	0.00004
<i>gastrulation-defective</i>	4E-15	Toll signaling pathway	3.05	0.11	27.11	0.04935
<i>proPO-1</i>	0	dopamine metabolic process	34.57	3.81	9.06	0.04851
<i>yellow-d</i>	0	melanin biosynthetic process	28.85	1.68	17.15	0.00000
<i>GTP-CH1 isoformA</i>	3E-166	tetrahydrobiopterin biosynthetic process	45.65	12.42	3.68	0.00038

関与している代謝系を類推するために、RNA sequencing により赤色予定領域で発現している遺伝子を網羅的に探索した。シロオビアゲハのメスの擬態型の赤色予定領域と非擬態型の赤色相同領域を P10.5 の赤色着色期にサンプリングしてシーケンスを行い、すべてのシーケンスリードを基に transcriptome 配列を構築した。遺伝子の発現量計測と発現変動遺伝子の抽出を行った結果、擬態型赤色領域で特異的に発現上昇している遺伝子として kynurenine 合成に関わる *vermilion*、*kynurenine formamidase* や NBAD 合成に関わる *GTP-CH1 isoform A* や *Toll signaling pathway* に関わる *snake*、*gastrulation-defective*、*spatzle-like* が発現上昇していることが明らかとなった (表 1)。さらに qRT-PCR で発現解析を行うと、赤色領域において kynurenine と NBAD 合成に関わる遺伝子が時期・領域特異的に発現しており、上記の結果を支持した。シロオビアゲハではメスにのみ紋様多型が存在しているため、性分化に関与する遺伝子が擬態紋様の制御に関与していることが考えられる。そこで *doublesex* の発現を観察したところ、擬態型メス由来のメス個体でのみ、翅の赤色領域付近にスポット状の発現が計測された。オス個体や非擬態型メス由来のメス個体ではこのような発現上昇は観察されなかった。このことから擬態型の赤色紋様は *doublesex* により制御されていることが示唆された。

シロオビアゲハの赤色色素合成に関してまとめると、まず幼虫期後期に *doublesex* が赤色領域特異的に発現上昇する。続いて、蛹期後期に *snake* や *gastrulation-defective* や *spatzle-like* が赤色領域で発現し、Toll 様シグナルが活性化される。この活性化した Toll によって、下流で働くと考えられる、メラニンの重合に関わる遺伝子や kynurenine や NBAD 合成に関わる遺伝子の発現上昇を引き起こし、結果として、キヌレニンや NBAD を前駆体とした重合した赤色色素を合成するようになった可能性が考えられた。

(B) ベニモンアゲハの赤色色素形成機構

モデル種のベニモンアゲハの赤色色素は 70 %メタノールで抽出され、503nm に最大吸収波長をもつことが判明した。HPLC で分離すると、503nm に吸収を持つピークは主に 2 つあることが分かった。2 つのピークは、質量分析で m/z 658 と m/z 688、さらに精密質量分析により、それぞれ C₃₀H₃₄N₄O₁₁S、C₃₁H₃₆N₄O₁₂S であることがわかった。MS/MS によりそのフラグメントパターンを形成すると、硫酸基を保持していること、NBAD が構成要素として含まれていることが明らかとなった。さらに、ベニモンアゲハの赤色色素の生合成に関与した遺伝子を予測するために、P14 (赤色色素が着色してくる時期) の蛹翅の赤色予定領域と翅基部の黒色予定領域の RNA サンプルを用いて RNA sequencing を行い、発現量の計測と発現変動遺伝子の抽出を行った。予想通り、赤色予定領域では NBAD 合成や硫酸基合成に関わる遺伝子群の発現が上昇しており、化学分析の結果を強く支持することが明らかとなった。

今回の解析により、ベニモンアゲハの赤色とシロオビアゲハの赤色のスポットが出現する領域は互いに似通っているものの、着色している物質自体は全く異なっていることが示された。このことから、擬態種とモデル種では色素や色素合成様式が大きく異なっており、擬態紋様に特徴的な赤色形成がモデルとは別のメカニズムによって収斂的に生じた形質であることが示唆された。

総括

本研究から、非擬態型と擬態型の淡黄色領域の色素や物理化学的な性質は異なっていることが明らかとなった。非擬態型と擬態型で、淡黄色の着色領域と色素自体を切り替え、モデルであるベニモンアゲハと似た性状の着色をしていることが示唆された。これにより擬態型の擬態効果が上昇していると考えられた (図 4)。赤色領域に関しては、ベニモンアゲハの赤色とシロオビアゲハの赤色のスポットが出現する領域は互いに似通っているものの、着色している物質自体は全く異なっていることが示された。このことから、擬態紋様に特徴的な赤色形成は収斂的な形質

として獲得されたことが推察された (図 4)。

本研究により、今まで全く不明だったベイツ型擬態における紋様形成機構に関して、擬態種とモデル種の両者について重要な情報を得ることができた。また、ベイツ型擬態型に関わる紋様がどのような進化プロセスに基づいて擬態種で獲得されてきたか、その分子的な手掛かりを初めて示した報告である。



図 4 本研究のまとめ