

論文内容の要旨

論文題目 武器甲虫の形態形成と表現型可塑性

氏名 小澤高嶺

【背景と目的】

生物が生息する環境は多くの場合予測不可能であり、絶え間なく変動している。生物の表現型は、ゲノム情報によって一義的に決まるわけではなく、こうした環境変動に応じて柔軟に変化し（表現型の可塑性）、変動環境を生き抜くことを可能にしている。表現型の可塑性は、個体レベルでは適応的な表現型の変化をもたらし、集団レベルでは多様な表現型を生み出すことで、環境変動に対する個体の頑丈性や個体群レベルでの生存戦略において重要な役割を果たしている。環境と表現型可塑性は今日大きな注目を集めている課題であるが、両者を結び付ける具体的な分子機構の存在には未解明であり、統合的な理解には至っていない。そこで本研究は、環境条件と表現型可塑性をつなぐ連携機構に着目した。

環境と表現型可塑性を解明するためには、既存のモデル生物ではなく、可塑性の解析に適した性質を持つ非モデル生物を用いることが有効だと考えられる。しかしながら、非モデル生物は飼育や維持が困難な種が多く、加えて、ゲノム情報が未知であることや、遺伝学的な解析手法も確立されておらず、分子生物学的手法の適応には実験系を新規に構築する必要がある。近年、次世代シーケンサーやRNA干渉法、ゲノム編集技術などの発展から、非モデル生物の遺伝解析が可能になり、非モデル系を活用した研究が活発化し始めている。本研究では、環境要因と表現型可塑性の連携機構の解明に適した新た

なモデル系として、武器甲虫を用いた新しい実験系の構築を行った。

小型の武器甲虫であるオオツノコクヌストモドキは、カブトムシやクワガタムシなどにみられる角や大顎といった武器形質（大顎）を持ち、他の武器甲虫と同様に、本種オスの大顎は幼虫時の栄養によって顕著な形態変化を示す。また、本種には幼虫の密度が高い環境では終齢幼虫の蛹化が抑制される、という変態過程の環境依存的な可塑性がある。この性質によって蛹化の進行を人為的に操作することができ、個別に隔離することで蛹化（変態）を任意のタイミングで誘導することが可能である。加えて、成虫の体長は3~4mm程度と小型であり、世代時間が約1か月半と短い。害虫でもある本種は、全粒粉によって大量の通年維持が可能である。本種は以上のような優れた性質を持ち、従来のモデル生物とは異なる性質を持つ新たな“武器昆虫のモデル系”として発展する可能性がある。

これら背景のもと、本研究では、環境要因と表現型可塑性を繋ぐ生体メカニズムの解明を目的とし、オオツノコクヌストモドキを新しいモデル系として用いた。本研究では、本種が示す変態過程の密度依存性についての生理学的解析、栄養環境と武器形質の形態可塑性の制御機構について解析を行った。

個体密度による蛹化時期の決定機構では、本種の個体間相互作用に注目した。本種の蛹化時期を決定する要因について、同種の性別や密度、異種の影響、物理的接触刺激の影響を検証した。さらに蛹化時期の可塑性の適応的意義を探るため、蛹化の遅延による共食い回避、捕食回避効果を検証した。

栄養環境と武器形質の形態可塑性の制御機構の解析では、栄養条件と表現型の間を取り持つ分子メカニズムを解析した。非モデルである本種に次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析を最大限に活用し、ターゲット遺伝子の配列や発現情報を得るとともに、本種における遺伝子機能解析手法としてRNAi法による標的遺伝子のノックダウン法を確立し、これらを組み合わせた分子実験のパイプラインを確立した。第一部では大顎形態の可塑性を担う分子機構としてエピゲノム制御に注目し、解析を行った。さらには、栄養条件と雌雄間で、形態形成時期に頭部で発現する遺伝子について比較トランスクリプトーム解析を行い、武器形成の分子発生的な基盤を解明した。

【結果および考察】

1. 個体密度による蛹化時期の決定機構

蛹化時期の決定要因について、異種の影響を始め、同種の性別、環境中に広くみられる接触刺激の影響について調べた。さらに発生の遅延による共食い、捕食に対する回避効果について発生段階ごとの脆弱性を評価した。本種の幼虫を、同種の幼虫と成虫、異種であるコクヌストモドキの成虫の存在下で維持した時、前蛹期に到達するまでの期間に顕著に延長した。また幼虫の性環境は蛹化時期に影響しなかった。これらの結果は、蛹化時期の決定要因は性別や種に特異的ではなく、他種を含めた広範な刺激が蛹化抑制

に関わることを明らかにした。

加えて、ガラスビーズをぶつけることによる物理的な接触刺激が蛹化を抑制することを発見した。また、捕食回避能力の解析からは、本種は幼虫期に比べ、前蛹期と蛹期が共食いや捕食に対し脆弱であることも見つけた。これらの結果から本種の幼虫は蛹化の決定に生物種非特異的な接触刺激を用いることを示した。こうした物理刺激への応答性は共食いだけでなく捕食者に対するより一般的な防御機能と考えられる。これらの解析は、個体間相互作用と蛹化時期決定メカニズムを解明するのみならず、本種の変態過程の制御機構を解明することで、発生過程を操作する実験系の構築にも貢献している。

2. 栄養環境と武器形質の形態可塑性の制御機構

分子実験系の確立

RNAi 法の有効性の検証実験には、形態変化の予測が容易なホメオティック遺伝子 *Proboscipedia* 遺伝子を用いた。*Proboscipedia* 遺伝子に RNAi によるノックダウンを行い、形態への影響を確認した。この結果から、本種においても、RNAi を用いた分子発生学的な操作実験が効率的に実施可能であることがわかった。

次に、次世代シーケンサーを用いて本種の遺伝子配列情報の取得を行った。発現する遺伝子の種類は発生段階や部位で異なることが予想されるため、幼虫、オスの蛹、オスの成虫のそれぞれの全身、さらに武器形質の形態形成に関わる終齢幼虫と前蛹期の頭部から全 RNA を精製し、発現する遺伝子について *de novo* RNA-seq を用いて解析した。得られた遺伝子配列についてデータベースを用いた相同性検索を行った。その結果、4878 の新規遺伝子配列を取得した。これら結果から、本種における分子実験系の確立に成功した。

武器形質の形態形成におけるエピゲノム制御

武器形質の形態形成へのエピゲノム制御の関与の可能性を検証するため、まず終齢幼虫にヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤 TSA を注射し、成虫の武器サイズへの影響を調べた。その結果、TSA 処理群において、体サイズに対して相対的な大顎サイズの増大が観察された。この結果から、大顎のサイズ決定に前蛹期の HDAC が何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。

次に、大顎の形態形成への HDAC の機能を調べた。上記の *de novo* RNA-seq 実験で同定した遺伝子リストの中に HDAC1/2、HDAC3、HDAC4/5、HDAC6/10、HDAC11 の 5 種類の HDAC ファミリー遺伝子を見出した。各 HDAC ファミリー遺伝子について RNAi によるノックダウンを行い、対照群とともに蛹段階の個体について大顎などの形態観察を行った。その結果、HDAC4/5、HDAC6/10、HDAC11 処理個体では、形態への影響はほとんど観察されなかったが、HDAC1/2 RNAi 処理個体では顕著な大顎の縮小が観察された。また、HDAC3 処理個体では逆に顕著な大顎の増大が見られた。

次に、各 HDAC ファミリー遺伝子について RNAi を行い、得られた成虫について形態への影響を調べた。この場合も、HDAC4/5、HDAC6/10、HDAC11 RNAi 処理群では体サイズに対する大顎サイズの影響は見られなかった。一方、HDAC1/2 RNAi 処理群では体サイズに対する相対的な大顎サイズが減少することが、再度確認された。さらに、HDAC3 処理個体では RNAi 処理群では、体サイズに対する相対的な大顎サイズが増大することが判明した。

オスの栄養条件間の遺伝子発現プロファイルの比較

大顎の形態形成に最も関わると考えられる前蛹前期と前蛹中期において、遺伝子発現プロファイルをオスの栄養条件間で比較した。前蛹前期、前蛹中期における発現変動の大きい上位 50 遺伝子について、それぞれクラスタリング解析を行った。それらの結果、前蛹前期では 344 個、前蛹中期では 31 個の遺伝子が栄養応答遺伝子として同定された。この中には武器形質の形成に関与が示唆されるインスリン/mTOR 経路の mTOR が含まれていた。

大顎形態形成への関与が示唆された HDAC と因子について栄養間での個々の遺伝子の発現変動について調べた。その結果、HDAC ファミリー遺伝子について、HDAC1/2、HDAC6/10 は前蛹前期中期ともに栄養条件間での発現変動はみられなかった。HDAC3、HDAC4/5 は、前蛹前期で発現変動が見られた。HDAC3 と HDAC11 は大型群で発現が高い傾向が見られ、HDAC4/5 は小型群発現が高い傾向が見られた。インスリン/mTOR 経路の因子については、前蛹前期において、mTOR、RICTOR、RAPTOR、IRS の発現が小型群で高い傾向が見られた。また、前蛹中期では、mTOR と IRS の発現が小型群で高い傾向が見られた。

インスリン経路に関わる各遺伝子群について、網羅的 RNAi スクリーニングを開始した。まず、InR、mTOR、RAPTOR に対する dsRNA をマイクロインジェクションし、蛹形態への影響を観察したところ、InR、mTOR、RAPTOR の RNAi において、大顎の縮小が観察された。

このように本研究では、次世代シーケンサーを用いて遺伝子情報を取得し、遺伝子機能解析手法として RNAi 法を確立し、これらを組み合わせた分子発生的実験系を確立することに成功した。この分子実験系を用い、武器形質の形態形成に HDAC が関与することを初めて明らかにし、表現型可塑性とエピゲノム機構の重要性が示されたことになる。さらに、武器形成過程の栄養応答遺伝子やインスリン経路/mTOR 経路の栄養応答性や下流経路の機能について初めて明らかにし、武器形成経路の分子基盤について重要な知見を得た。