

# 論文内容の要旨

## 論文題目

Molecular mechanisms of mimicry in larval body marking  
of the swallowtail butterfly, *Papilio xuthus*  
(アゲハ幼虫の擬態紋様形成を制御する分子機構)

氏名 二橋 亮

### はじめに

昆虫は、外敵から身を守ったり、獲物を捕えたりするために、さまざまな方法で自らを他に似せる「擬態」を行なっている。擬態に関する研究は、生態学・行動学的な面から進められてきているが、擬態紋様を作り出す分子機構については、これまでほとんど明らかにされていない。

アゲハの幼虫（図 1）は、4 齢までは全身の大部分を黒色部が占め、鳥のフンに擬態している。しかし、5 齢になると全身が緑色になって周囲の草木に擬態する。また、胸部には目玉模様が生じ、自分と同程度の相手を威嚇する効果があると考えられている。私は、幼虫体表の紋様が脱皮直前に形成される点に着目し、アゲハの 3 回目の脱皮と 4 回目の脱皮を比較することで、擬態紋様形成に関わる具体的な遺伝子の同定を試みた。また、紋様の切り替えが脱皮を介して行われることから、脱皮・変態に関わる 2 種の昆虫ホルモン（エクジソン、幼若ホルモン）が紋様形成に与える影響も検討した。



図 1. アゲハ幼虫の齢による紋様変化

## 第1章 cDNA サブトラクション法を用いた紋様形成に関わる新規遺伝子の探索

紋様形成に関わる新規遺伝子を得るため、cDNA サブトラクション法により、4 回目の脱皮（4 眠）時に発現の変化する遺伝子を探索した。終齢候補遺伝子、若齢候補遺伝子のスクリーニングをそれぞれ 1,044 および 1,028 クローンから行い、終齢特異的遺伝子、若齢特異的遺伝子の候補として、それぞれ 31 種、64 種の遺伝子が得られた。得られた候補遺伝子については、RT-PCR によって、4 眠時に特異的に発現が増加もしくは減少しているかを判定した。実際に 4 眠時に特異的に発現が増加すると判断された遺伝子の中には、青色色素の結合に関わる *insecticyanin* 相同遺伝子が見られたが、その発現領域

を *in situ* hybridization で解析したところ、4 眠時で緑色の部分特異的に強く発現していた（図 2A）。また、若齢特異的に発現する遺伝子の中には、若齢幼虫のイボ状突起特異的に発現するクチクラ蛋白質が複数得られた（図 2B）。以上の結果から、実際に齢特異的に、アゲハ幼虫の体色や形態の変化に関わる遺伝子を複数同定することに成功した。

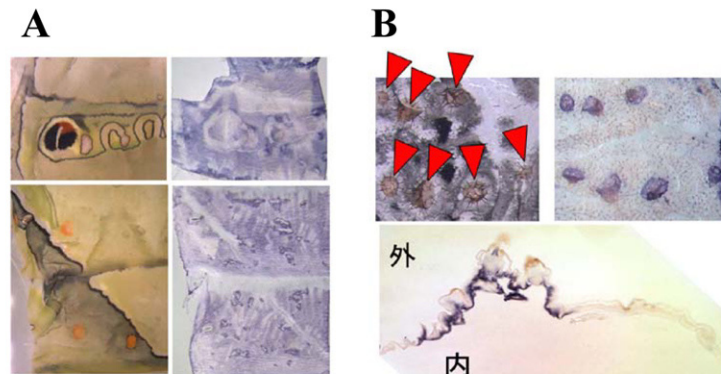


図 2. 齢特異的遺伝子の発現解析の例. A: 終齢特異的遺伝子(Fsg02)の発現解析. 左は 5 齢幼虫. *insecticyanin* 相同遺伝子である Fsg02 は 5 齢時に緑色になる領域で特異的に発現する(右). B: 若齢特異的遺伝子(Jsg12)の発現解析. 左上は若齢幼虫の皮膚(矢頭はイボ状突起). Jsg12 はイボ状突起の部分で特異的に発現する(右上, 下は皮膚切片).

## 第2章 クチクラの黒色紋様領域は melanin 合成遺伝子の共局在によって制御されている

アゲハの若齢幼虫は、体の大部分が黒色部で占められるのに対して、終齢幼虫の黒色部は胸部の目玉模様や腹部の帯状紋の部分に限定される。黒色色素は、体表のクチクラ表面に沈着するが、黒色紋様は、クチクラを産生する真皮細胞内の melanin 前駆体の分布の局在が変化するためと考えられる。クチクラは体液中の phenylalanine もしくは tyrosine を基質に作られるが、melanin も tyrosine が基質になっている。黒色領域を制御する機構としては、melanin 前駆体の合成が真皮細胞で領域特異的に行われるという可能性と、melanin 前駆体の真皮細胞への取り込みが領域特異的に行われるという 2 つの可能性が想定された。そこで、黒色紋様の領域決定に関わる分子機構を解明するた

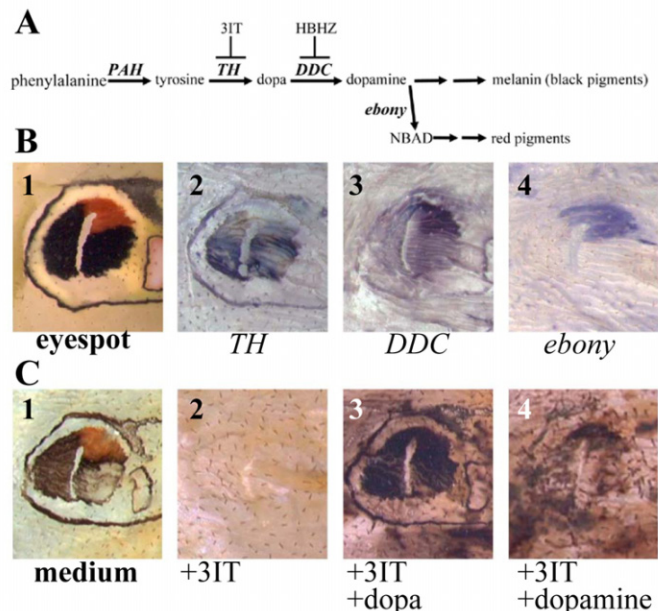


図 3. melanin 合成に関わる遺伝子の解析. A: melanin 合成の各ステップに関わる遺伝子. B: 各遺伝子の発現解析 (*in situ* hybridization). C: 培養条件下における着色の様子.

め、アゲハにおいて melanin 合成に関わる酵素 (*phenylalanine hydroxylase (PAH)*, *tyrosine hydroxylase (TH)*, *dopa decarboxylase (DDC)*, *ebony*) のクローニングを行った (図 3A)。これらの酵素の発現部位を *in situ hybridization* で解析したところ、*PAH* は一様に発現が見られたのに対して、*TH* と *DDC* は目玉模様 (図 3B1) などの黒色領域でのみ強く発現することが確認された (図 3B2-3)。さらにその発現領域は、3 眠時と 4 眠時で大きく異なっており、どちらも将来の黒色部に対応して発現することが確認された。また、*ebony* 遺伝子はアゲハの幼虫では目玉模様の赤色部の領域でのみ発現が確認された (図 3B4)。

次に melanin 前駆体の真皮細胞への取り込みが領域ごとに制御されているかどうかを検証した。まず、着色前の皮膚を培養条件下で正常な着色を生じさせる系を確立した (図 3C1)。培養液に *TH* もしくは *DDC* の阻害剤を加えると、黒の着色は完全に阻害されたことから、黒色形成に *TH* と *DDC* が必須であることが確認された (図 3C2)。培養液に *TH* 阻害剤を加えた状態でさらに *dopa* を投与すると、着色が再現されただけでなく、皮膚全体が黒色化することが確認された (図 3C3)。さらに、*TH* 阻害剤を加えた状態で *dopamine* を投与した場合は、皮膚全体が黒色化して、通常見られる黒色紋様は不明瞭になることが確認された (図 3C4)。培養液中への前駆体の投与によって紋様が不明瞭になることは、melanin 前駆体の取り込みに領域特異性が少ないことを意味する。以上の結果から、黒色紋様の領域は、基本的には真皮細胞中の酵素の局在によって制御されており、*TH* と *DDC* が発現する細胞は黒いクチクラを、*TH* と *DDC* に加えて *ebony* も発現する細胞は赤いクチクラを産生することが明らかになった (図 4)。

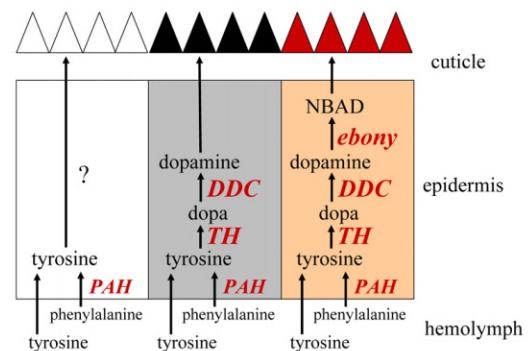


図 4. クチクラの着色領域の決定に関わるメカニズム。真皮細胞は体液中の phenylalanine もしくは tyrosine を基質にクチクラを産生するが、*TH* と *DDC* の発現する細胞は黒いクチクラを、*TH*、*DDC* に加えて *ebony* も発現する細胞は赤いクチクラを産生すると考えられる。

### 第 3 章 GTPCHI は isoform 特異的に紋様形成を制御する

真皮細胞で一様に発現する *PAH* と黒色紋様特異的に発現する *TH* は、その酵素活性を得るためには、補因子として  $BH_4$  を必要とするが、 $BH_4$  の合成には Guanosine triphosphate-cyclohydrolase I (*GTPCHI*) の酵素活性が必須である。他の生物では *GTPCHI* と黒色紋様との関連が示唆されていたが、その領域特異性については報告例がなかった。培養系において、*GTPCHI* の阻害剤を加えると着色は阻害され、*dopa* を加えることで着色および皮膚全体の黒化が引き起こされた。この結果は *TH* と非常に類似していたため、紋様との関連について解析した。興味深いことに、*GTPCHI* はアゲハ幼虫皮膚から 2 つの isoform が単離されたので、それぞれについて発現部位の解析を行ったところ、一方の isoform は一様に、もう一方は黒色紋様特異的に発現することが明らかになった。この結果は、isoform ごとの発現パターンを変化させることで、全体的に発現する *PAH* と紋様特異的に発現する *TH* の両方に十分量の  $BH_4$  を供給することを意味しており、黒色紋様制御がメラニン合成に直接関わる酵素以外のステップでも多段階で制御されていることが示唆された。



## 第4章 エクジソンのパルスが色素合成遺伝子の転写を制御する

アゲハ幼虫紋様の色素合成は脱皮直前に行われるが、この時期はエクジソンのパルスの直後に相当するため、エクジソンのパルスが色素合成に関わる遺伝子の転写を誘導することが予想された。エクジソンと色素合成遺伝子の関連を確かめるため、脱皮前にエクジソンを局所的に投与したときの幼虫紋様の変化、および色素合成遺伝子の発現の変化を解析した。エクジソンの下降する時期に投与を行い、その濃度を高め続けると、投与した部分の黒色部や緑色部の形成が顕著に阻害された。これらの個体で、メラニン合成に関わる *TH*, *DDC*, *ebony* や緑色形成に関わると予想される *Fsg02*, *Fsg20* の発現の変化を *in situ* hybridization で解析したところ、いずれの遺伝子も紋様部分での発現が抑制されており、エクジソンによって色素合成遺伝子の転写が制御されていることが実際に確認された。

## 第5章 幼若ホルモンが紋様パターンの決定を制御する

アゲハ幼虫は3眠時と4眠時で紋様パターンを大きく変化させるが、このパターンの変更が、どの時点で決定されるのかを調べる目的で、アゲハの脱皮時期を人為的に変化させたときの影響を解析した。アゲハ4齢幼虫は通常約4日後に5齢へと脱皮するが、エクジソン投与により、4齢脱皮後すぐに強制脱皮させると若齢型の5齢になり、脱皮時期が通常の5齢脱皮に近づくにつれ、紋様が終齢型へ連続的に変化することが確認された。この結果は、4齢になってから、紋様パターンの決定に関わる因子が連続的に変化することを意味する。次に、4齢幼虫初期に幼若ホルモンを投与したところ、高い確率で若齢型の5齢が現れたことから(図5)、幼若ホルモンが紋様パターンの決定に関わっていることが示唆された。幼若ホルモンは、昆虫一般的に濃度の高いときに幼虫脱皮を引き起こし、濃度の低いときに蛹への変態を引き起こすが、今回の結果から、アゲハでは4齢になってから幼若ホルモン濃度が徐々に減少し、その濃度に応じて5齢の斑紋パターンが決定される可能性が考えられた(図5)。幼若ホルモン処理を行った個体で色素合成遺伝子の発現パターンを調べたところ、実際に4眠時での発現パターンが通常の3眠型に変化することも確認された。以上の結果から、幼若ホルモンがアゲハ幼虫のパターンの決定を制御していることが確認された。

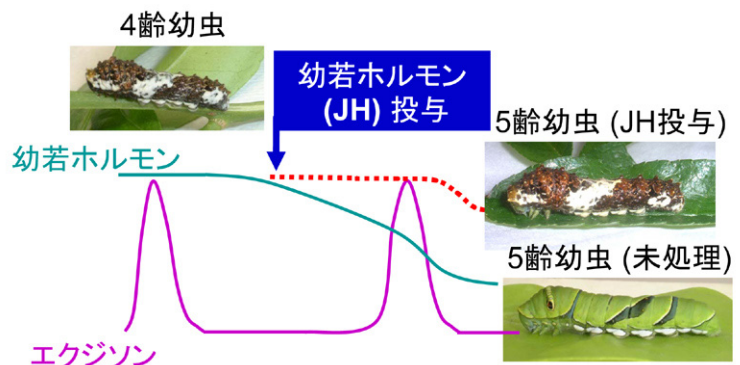


図5. 幼若ホルモンによる5齢幼虫の紋様パターンの変化。幼若ホルモン処理により若齢型の5齢幼虫を誘導できる。予想されるアゲハ幼虫体内におけるホルモン濃度変化を図示した。

## まとめ

本研究から、従来ほとんど不明であった擬態紋様形成に関わる具体的な遺伝子が複数見出された。また、紋様形成にはパターン形成と色素合成の二面性があるが、幼若ホルモンとエクジソンが、それぞれのステップに関わる遺伝子を制御していることが確認された。本研究の結果が、昆虫の擬態紋様に関わる分子機構の解明につながることを期待される。