

学位論文題名

Developmental regulatory mechanisms of mandible
growth in the stag beetle

(クワガタムシにおける大顎発達の発生制御機構)

学位論文内容の要旨

昆虫の形態は極めて多様であり、古今東西問わず多くの研究者の興味を惹いてきた。共通のボディプランを持つ昆虫では、体サイズに対する各部位の比率を変えることで多様な形態を生み出している。そのため、部位サイズ制御機構の解明は昆虫の形態の多様性を理解する上で欠かせない重要な課題の1つである。

クワガタムシ(甲虫目クワガタムシ科)の多くの種は顕著な性的二型を示す。特にオスは個体間闘争に用いられる非常に発達した大顎を持つ。一方、メスではそのような大顎発達は見られない。また、オスの間でも生育環境条件に依存した大顎サイズの多型が見られる。この現象は部位サイズの改変の極端な例として、古くから注目を浴びてきたが、その多型の根底にある発生機構はほとんど明らかになっていない。そこで本研究ではクワガタムシにおけるオス多型と性的二型を生み出す2つの異なる大顎サイズ制御機構の解明を目指し、あらゆる昆虫の中でも最も大きな大顎を持つメタリフェルホソアカクワガタ *Cyclommatus metallifer* を材料に、生理学的・遺伝学的・分子発生の研究を行った。

Chapter 1. オスにおける環境条件依存的な大顎発達の制御

オスでは幼虫期の環境条件に依存して、成虫の体サイズ・大顎サイズが可塑的に変化することが知られる。この環境条件に依存した大顎サイズ制御の背景には、内分泌因子を介した生理状態の改変があると予想された。そこで多くの昆虫で表現型多型の制御への関与が知られる幼若ホルモン(juvenile hormone: 以下 JH)に注目し、大顎発達が起こる前蛹期における体液 JH 濃度を測定したところ、大型オスでは小型オスよりも体液 JH 濃度が高く、体サイズと体液 JH 濃度には有意な正の相関が見られた。さらに前蛹期において JH 類似体(JHA)処理を行うと、体サイズの変化を伴わない大顎特異的な伸長が誘導された。一方でメスでは体内 JH 濃度にオスと有意な違いはなく、JHA 処理による大顎発達も誘導されなかった。これらの結果より、オスの大顎サイズは前蛹期の体液 JH 濃度によって制御されていること、また体液 JH 濃度は体サイズ依存的に変化し体サイズに即した大顎発達が実現されていることが示唆された。

Chapter 2. オスの大顎サイズ制御に対する遺伝的影響

第1章で示されたように、環境条件は JH の作用を介して大顎サイズに大きく影響する。一方で大顎サイズ決定に対しては遺伝的な影響も存在すると予想されたため、第2章ではオスにおける大顎の絶対的なサイズ(絶対大

顎サイズ) と、体サイズを考慮に入れた大顎サイズ (相対大顎サイズ) の遺伝率を測定し、遺伝的影響の有無を検証した。結果、絶対大顎サイズについては有意な遺伝的影響は検出されなかったが、相対大顎サイズの遺伝率は 0.58 ± 0.19 であり統計的に有意かつ高い値であった。これより、大顎の絶対的なサイズは環境条件に強く影響されるものの、体サイズと大顎サイズの関係性は遺伝的影響を強く受けると考えられる。

Chapter 3. 大顎発達に関与する分子機構

第3章では、オス間の多型に加えて雌雄の大顎発達の差異を生み出す分子発生機構の解明を目指し、発生・形態形成への関与が知られる遺伝子群に注目し、計17個の遺伝子オルソログについて機能・発現解析を行った。機能解析の結果、雌雄のいずれにおいても、付属肢形成に関わる *dachshund* 遺伝子と *Fat signaling* 経路が、大顎の正常なパターンニングと成長に必要であると示唆された。一方、大型オス、小型オス、メスの3者間で大顎における発現パターンを比較したところ、大きな差が認められた遺伝子は少なかった。これより、クワガタムシの大顎の形態形成には、昆虫で一般的に用いられる付属肢形成遺伝子が関与していると考えられるが、そのサイズ制御メカニズムはより上流の制御因子による入力を受けていると示唆された。

Chapter 4. 性決定遺伝子による大顎の性特異的な発達の制御機構

第4章ではもう1つの多型である性的二型に注目した。第3章の結果より、大顎形成を担う分子機構は雌雄で大きく異なることが示唆されている。また、第1章の結果より、オスの大顎発達には *JH* が関与しているが、雌雄で体内 *JH* 濃度に違いはなく、またメスに *JHA* 処理をしても大顎の発達は誘導されない。そのためこれらの発生機構よりも上流に、性特異的な大顎発達制御機構の存在が予想された。そこで、性特異的な大顎発達の制御機構を明らかにするため、昆虫全般で広く機能が保存されている性決定遺伝子である *doublesex (dsx)* 遺伝子の発現・機能解析を行った。材料種から *dsx* ホモログの全長配列を単離したところ、オス特異的に発現するアイソフォームと、メス特異的に発現するアイソフォームが2つずつ同定された。すべてのアイソフォームの共通部位で *dsRNA* を合成・注射することで全 *dsx* アイソフォームの機能阻害をした個体では、全身で雌雄両方の特徴が発現した。特に大顎サイズは機能阻害の影響を強く受け、*dsx* 阻害処理により、メスでは大顎の発達が起これ、オスでは大顎の発達が抑制された。これより、大顎の顕著な性的二型の発現への *dsx* の関与が明らかとなった。さらに *dsx* の機能阻害個体への *JHA* 処理実験を行ったところ、本来 *JHA* 処理により大顎発達が誘導されないメスであっても、*dsx* の機能阻害下では *JHA* 処理にตอบสนองして大顎の発達誘導が起こった。以上の結果から、*dsx* は大顎細胞の *JH* への応答性を性特異的に制御することで、大顎サイズの性的二型を生み出している可能性が示唆された。

本研究の結果から、クワガタムシではオス間では環境条件に依存した内分泌因子の制御が、雌雄間では性決定経路の制御が、下流の発生経路を改変することで、大顎多型が生じていると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 准教授 三 浦 徹
副 査 教 授 木 村 正 人
教 授 大 原 雅
教 授 枋 内 新(大学院理学研究院)

学位論文題名

Developmental regulatory mechanisms of mandible growth in the stag beetle

(クワガタムシにおける大顎発達の発生制御機構)

生物は、外的刺激に応じて表現型を可塑的に変化させることで変動する環境に対応することができる。同一の遺伝型から環境に応じて異なる表現型が生じる表現型可塑性は、変わりやすい環境に対して生物が編み出した巧みな適応戦略であり、近年盛んにその発生制御機構の解明に向けて研究が行われている。多くの生物では雌雄で同程度の可塑性を示すが、中には、雌雄の片方のみ著しい可塑性を持つ、「可塑性の性的二型性」を示す生物種が存在する。この「可塑性の性的二型性」の発生学的背景には、性決定／性分化の制御機構と可塑性の制御機構の間の発生学的リンクが重要だと考えられる。しかし、これらの2つの制御機構は従来発生学の中でも異なるテーマとして扱われてきたこともあり、両者間の発生学的リンクの実体は殆ど明らかになっていない。

クワガタムシ(甲虫目クワガタムシ科)ではオスのみで著しい大顎の発達が見られ、そのサイズは幼虫時の生育条件により可塑的に大きく変化する。一方でメスでは大顎の発達はほとんど見られず、可塑性も小さい。本研究では「可塑性の性的二型性」を示すモデルとしてこのクワガタムシの大顎多型に注目し、その発生制御機構の解明を目指した。材料には実験室での飼育・繁殖が容易で世代時間が短いメタリフェルホソアカクワガタ *Cyclommatus metallifer* を用いた。

第1章では、オスの可塑的な大顎発達機構の解明を目指した。まず幼虫期において飼育容器と餌量を変えることで容易に大型オス、小型オスを誘導可能な系を確立した。次いで、環境条件を媒介する内分泌因子として幼若ホルモン(以下 JH)に注目した。大顎の形態形成が起こる前蛹期において、大型オスと小型オスの間で体液 JH を測定・比較したところ、大型オスでは小型オスよりも体液 JH 濃度が高かった。さらに、前蛹期の小型オスに JH 類似体を処理したところ、大顎の過度な発達が誘導された。一方、メスでは JH 類似体処理による大顎発達は誘導されなかった。これらの結果より、オスの大顎サイズは前蛹期の体液 JH 濃度により制御されること、また体液 JH 濃度は体サイズ依存的に変化し体サイズに即した大顎発達を実現すると唆された。

第2章では、大顎発達に対する環境の影響とその発生制御を扱った第1章を補完する形で、オスの大顎サイズ制御における遺伝的影響を解析した。オスにおける大顎の絶対的なサイズ(絶対大顎サイズ)と、体サイズを考慮に入れた大顎サイズ(相対大顎サイズ)の遺伝率を測定し、遺

伝的影響の有無を検証した。結果、絶対大顎サイズについては有意な遺伝的影響は検出されなかったが、相対大顎サイズの遺伝率は 0.58 ± 0.19 であり統計的に有意かつ高い値であった。これより、大顎の絶対的なサイズは環境条件に強く影響されるものの、体サイズと大顎サイズの関係性は遺伝的影響を強く受けると考えられる。

第3章では、オス間・雌雄間の大顎発達の差異を生み出す分子発生機構の解明を目指し、発生・形態形成への関与が知られる遺伝子群に注目し、計17個の遺伝子オルソログについて発現・機能解析を行った。結果、大型オス、小型オス、メスの3者間で大顎における発現パターンを比較したところ、明瞭な雌雄差が認められた遺伝子は少なかった。RNAi を用いた機能解析の結果、雌雄のいずれにおいても、付属肢形成に関わる *dachshund* 遺伝子と Fat signaling 経路が、大顎の正常なパターンニングと成長に必要であると示唆された。これより、クワガタムシの大顎の形態形成には、昆虫で一般的に用いられる付属肢形成遺伝子が関与すると考えられる。ただし、使用される遺伝子セットに雌雄で大きな違いはなく、より上流の制御因子による入力に雌雄差・オス間差の形成に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

第4章では、可塑性の性的二型性の分子発生制御機構を明らかにするため、性決定/性分化機構の解析を行い、可塑性を制御する JH 経路 (第1章) との発生学的リンクについて検証した。まず、昆虫全般で広く機能が保存されている性決定遺伝子である *doublesex (dsx)* 遺伝子に注目し、発現・機能解析を行った。材料種から *dsx* ホモログの全長配列を単離したところ、オス特異的に発現するアイソフォームと、メス特異的に発現するアイソフォームが2つずつ同定された。すべてのアイソフォームの共通部位で dsRNA を合成・注射することで全 *dsx* アイソフォームの機能阻害をした個体では、全身で雌雄両方の特徴が発現した。特に大顎サイズは機能阻害の影響を強く受け、*dsx* 阻害処理により、メスでは大顎の発達が起り、オスでは大顎の発達が抑制された。これより、大顎の顕著な性的二型の発現への *dsx* の関与が明らかとなった。さらに第1章の結果より、雌雄で大顎の JH への応答性が異なっていることが示唆されており、「*dsx* が大顎の JH への応答性を性特異的に制御している」という仮説が立てられた。これを検証するため、*dsx* の機能阻害個体への JH 類似体処理実験を行ったところ、本来 JH 類似体処理により大顎発達が誘導されないメスであっても、*dsx* の機能阻害下では JH 類似体処理に反応して大顎の発達が起こった。この結果から、*dsx* は大顎細胞の JH への応答性を性特異的に制御していると示唆され、JHへの応答性をもつオスでのみ大顎サイズに可塑性が見られると考えられた。

本学位論文では、クワガタムシに見られる可塑性の性的二型性について、その発生制御機構の一端を明らかにした。特に、性決定カスケードからの入力特定の内分泌因子への応答性を制御するという知見は昆虫ではこれまでにほとんど知られていないものである。今後、性決定機構と内分泌機構を結ぶネットワークの詳細や、今回解析を行っていない他の内分泌因子の役割などについても解析を行うことで、性特異的な可塑性の制御機構の理解が進むと期待される。審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、また、自らの興味をかき立てる生命現象の解明に多彩な手法を取り入れながら貪欲に取り組む研究姿勢、大学院博士課程における研鑽や修得単位などもあわせ、申請者が博士 (環境科学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。