

令和元年6月17日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07511

研究課題名(和文) シロアリにおける性特異的な兵隊分化の至近機構の解明

研究課題名(英文) Proximate mechanism of sex-specific soldier differentiation in termites

研究代表者

前川 清人 (Maekawa, Kiyoto)

富山大学・大学院理工学研究部(理学)・准教授

研究者番号：20345557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：防衛のための高度に特殊化した兵隊の存在は、社会性昆虫のシロアリが持つ大きな特徴である。系統的に祖先的なグループでは、兵隊の性が一方に偏ることはない。しかし派生的なグループでは、兵隊の分化経路に明瞭な性差がみられる種が多く存在する。この違いが生じる至近的理由を明らかにするために、性決定にかかわる遺伝子経路の特定を試みた。経路の末端にある転写因子は、これまで他種昆虫で知られている既知の遺伝子とは、配列や発現の特徴が大きく異なる可能性が示された。更に、雌雄ともに兵隊に分化する祖先的な分類群の兵隊分化に注目することで、兵隊分化を規定し、顕著な形態変化を引き起こす遺伝子群を特定することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

代表的な社会性昆虫のシロアリには、ほぼ全種で兵隊が存在する。兵隊は、基本的にどの個体からも脱皮して分化できるが、巨大な大顎等の特徴的な武器をもつ。この特殊な形態変化を伴う脱皮を調節するしくみは未解明である。種によっては片方の性のみが兵隊に分化するので、性情報が重要な役割を担う可能性がある。本研究の解析の結果、一般に昆虫で知られている性決定遺伝子は、配列や発現の仕方が特徴的に変化していることが明らかになった。更に、網羅的な遺伝子の発現解析により、兵隊に分化予定の個体で特異的に発現するいくつかの重要な遺伝子が見出された。それらが相互に働くことで、他の昆虫にはない特殊な脱皮が進行すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：One of the most important characteristics of termites is the existence of soldiers with highly specialized weapons. Soldier sex ratio is not biased in most of the basal species, but there are many species with strongly biased soldier sex ratio in the phylogenetically apical taxa. To clarify the proximate mechanism of these differences, we tried to identify the sex-determinant gene cascade in some termite species. The results suggested that the gene sequence and expression patterns of the transcription factor in the cascade were specifically changed during the course of termite evolution. Moreover, we could identify some important candidates of the determinant for soldier differentiation and regulatory factor for specific morphogenetic changes.

研究分野：昆虫生態学, 進化発生学

キーワード：社会性昆虫 カースト分化 兵隊 幼若ホルモン 脱皮ホルモン 性決定遺伝子 次世代DNAシーケンサ
- (NGS) RNA-seq

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

社会性昆虫が示すカースト分化は、表現型多型の代表例である。特に、形態や行動が防衛に特殊化したシロアリの兵隊は、社会性昆虫がもつ最も特殊なカーストである。二次的に失った一部の種を除いて、全ての種が兵隊を保有しており、兵隊の獲得はシロアリの共通祖先で一度だけ生じたと考えられている。系統的に祖先的な種では、兵隊の性比に差が見られる種も存在するが、一方の性だけに偏ることはない。しかし、最も派生的なシロアリ科には、兵隊の分化経路に明瞭な性差が見られる種が数多く存在する。例えば、キノコシロアリ亜科には雌の兵隊しか存在しない種が多いが、テングシロアリ亜科には雄の兵隊しか存在しない種が殆どである。系統的に祖先的な種において、兵隊の性比が偏る究極要因としては、体サイズにおける性的二型の有無が関係する可能性が指摘されている。しかし、兵隊の性が一方に偏る派生的な種では必ずしも当てはまらず、雌雄の各個体が全く異なる分化経路を持つ至近的な理由は未だ完全に未知である。シロアリの兵隊分化に関しては、幼若ホルモン (JH) が中枢因子であることが古くから知られている。職蟻体内の JH 量が上昇すると、前兵隊を経て兵隊に分化する。一部の種では、職蟻に JH (あるいは類似体) を処理することにより、前兵隊への分化を人為的に誘導できることが確かめられている。したがって、兵隊の分化経路に明瞭な性差が見られる種では、性情報と JH シグナルに密接な関係性があると考えられる。例えば、昆虫類が共通して保有する性決定遺伝子経路が、各個体の体内 JH 量や JH に対する応答性に影響する可能性が考えられる。不完全変態昆虫類で、性決定遺伝子が機能的にも正確に特定された例はないが、2014年に2種のシロアリのゲノム配列が公表され、申請者の研究グループも別種のゲノム解読や大規模なトランスクリプトーム解析を進めている。これらの情報を利用すれば、シロアリでの候補遺伝子の特定や機能解析が遂行できると考えられる。

2. 研究の目的

防衛のための高度に特殊化した兵隊の存在は、社会性昆虫のシロアリが持つ大きな特徴である。系統的に祖先的なグループでは、兵隊の性が一方に偏ることはない。しかし派生的なグループでは、兵隊の分化経路に明瞭な性差がみられる種が多く存在する。兵隊分化は、職蟻の幼若ホルモン (JH) 量の上昇に応じて起こるため、兵隊の分化経路に明瞭な性差が見られる種では、性情報と JH シグナルに密接な関係性があると考えられる。そこで、兵隊の性に明瞭な違いがみられ、系統的に重要な複数の種を用いて、性情報と JH シグナルとの関係性を調べ、如何なる共通性と多様性があるのかを明らかにする。昆虫の性決定遺伝子経路の最下流の転写因子は、シロアリで失われている可能性が指摘されるが、その役割を担う未知因子の特定も目指す挑戦的な課題である。

3. 研究の方法

(1) 系統的に祖先的な種 (ネバダオオシロアリ *Zootermopsis nevadensis*, ヤマトシロアリ *Reticulitermes speratus*) および派生的な種 (タカサゴシロアリ *Nasutitermes takasagoensis*) を主な材料とし、性決定にかかわる可能性のある遺伝子 (特にカスケードの末端にある転写因子) の特定を目指す。この転写因子がもつ2つの保存ドメインを手掛かりに、ゲノムやトランスクリプトーム情報が豊富なシロアリや近縁なゴキブリで探索する。得られた配列を用いて分子系統解析を行い、遺伝子の進化を考察する。

(2) ゲノムが解読済みのネバダオオシロアリを用いて、兵隊分化時に働く遺伝子を網羅的にピックアップする。本種は、創設直後のコロニーに注目することで、自然条件下の兵隊分化を観察することができる唯一の種であるため、特定された遺伝子の機能解析も遂行可能である。重要遺伝子が得られた場合には、兵隊分化に性差の見られる他種でホモログを取得し、役割の違いを明らかにする。

4. 研究成果

(1) 性決定にかかわる可能性のある遺伝子、特にカスケードの末端にある転写因子の特定を目指した。しかし、ゲノムデータを利用できる3種 (ネバダオオシロアリ、ヤマトシロアリ、ナタルオオキノコシロアリ *Macrotermes natalensis*) のデータから、2つの保存ドメインをもつ遺伝子を見つけることは出来なかった。シロアリや近縁群では、配列が特徴的に変化している可能性が考えられた。そこで、カースト間のトランスクリプトームデータも利用できるヤマトシロアリを用いて、各保存ドメイン毎にさらに丁寧に探索を続けたところ、一方の保存ドメインのみをもつ遺伝子を複数得ることができた。一部は部分配列だったため、RACE法を用いて全長を取得した。取得された配列情報を用いて他種のシロアリや近縁の昆虫類でもホモログを探索し、分子系統解析を行った。その結果、得られた遺伝子の1つは、他種昆虫の既知の性決定に関係する遺伝子と極めて類似性の高いドメイン配列をもっていることが示された。ヤマトシロアリを用いて、雌雄個体間で発現の違いを調べたところ、明瞭な性差があることがわかった。今後、様々な発生ステージでの発現パターンや機能解析を行い、性決定への関与を確かめる必要がある。

(2) 祖先的なグループであるネバダオオシロアリにおいて、JH処理による兵隊分化の人為的な

誘導系を利用して、ホルモンのシグナル伝達経路の各遺伝子の発現・機能解析を遂行した。その結果、脱皮ホルモン(20E)が兵隊分化のみならず、兵隊を特徴付ける形態形成にも影響することが明らかになった。次に、JH 処理による兵隊分化の誘導過程において、JH 受容体遺伝子(Met)のノックダウンを行ったところ、兵隊分化が抑制されることが示された。したがって、JH-Met シグナルの下流に、脱皮と形態変化を司る 20E シグナル経路の存在が予想された。兵隊分化過程において Met の RNAi によって発現が低下する 20E 関連遺伝子を取得し、個別に機能解析を行ったところ、形態変化のみに影響が現れる転写調節遺伝子が見出された。これらを含む 20E シグナルの新しい使われ方の獲得が、シロアリの兵隊の進化を促した可能性がある(発表論文)。

(3) ネバダオオシロアリにおいて、基礎生物学研究所の共同利用機器である次世代 DNA シーケンサー(採択済の課題番号: 16-204, 17-202, 18-422)を用いて、兵隊分化時に特異的に発現する遺伝子を網羅的に解析し、各遺伝子群の特徴を調べた。本種の初期巣では、最も成長が進んだ 3 齢個体(第 1 幼虫とする)が、女王と王から腸内容物を高頻度に受け渡された結果、前兵隊とよばれる中間段階を経て兵隊に分化することがわかっている。一方、第 1 幼虫よりも若い個体(第 2 幼虫以降)は、女王や王からの腸内容物の受け渡し頻度は少なく、やがて 4 齢ワーカーに脱皮する。それぞれの幼虫の発現遺伝子を網羅的に比較したところ、兵隊に分化する第 1 幼虫では、ワーカーに脱皮する第 2 幼虫と比較して、ホルモンシグナルや形態形成遺伝子経路の特徴的な活性化が明らかになった(発表論文)。

次に、第 1 および第 2 幼虫の発生初期で発現する遺伝子群を網羅的に比較した。その結果、第 1 幼虫で特異的に高発現する遺伝子が見出された。この遺伝子は、フェロモンなどの難水溶性の物質を運搬する働きを持つリポカリタンパク質をコードすることが明らかになった。遺伝子データベースを使って調べたところ、基本的にどの昆虫もこの遺伝子をもっていた。ただし、各昆虫がもつ遺伝子を比較すると、シロアリとキゴキブリ *Cryptocercus punctulatus* (シロアリに最も近い現生のゴキブリ)では、配列が特徴的に変化していた。この遺伝子がコードするリポカリタンパク質の局在を調べたところ、第 1 幼虫の腸の上皮細胞に存在することがわかった。さらに、RNA 干渉を用いて、第 1 幼虫での遺伝子の働きを抑制したところ、第 1 幼虫の半数以上がワーカーに脱皮し、兵隊の分化率が有意に減少した。撮影された動画を用いて、この時期の幼虫の行動を観察すると、ワーカーに脱皮した第 1 幼虫では、女王からの腸内容物の受け渡し頻度が著しく減少していた(発表論文)。

最後に、第 1 幼虫から前兵隊、前兵隊から兵隊への脱皮過程と、第 2 幼虫から 4 齢ワーカーへの脱皮過程で発現する遺伝子群を網羅的に比較した。その結果、第 1 幼虫から前兵隊への脱皮時に、特異的に高発現する複数の遺伝子が特定された。RNA 干渉を用いて、それぞれの遺伝子の働きを抑制して機能を解析したところ、動物で広く保存されている細胞増殖経路(TGF シグナル)に関係する 2 つの遺伝子の結果が特に注目された。これらの遺伝子の働きを抑制したワーカーから脱皮した個体は、前兵隊であるにもかかわらず、堅固な表皮を持ちながら攻撃性も高く、まるでふつ々の兵隊のように行動した。これらの遺伝子は、JH によって発現が促され、20E の下流のシグナル遺伝子の発現を促進することで、兵隊分化に影響することが明らかになった(発表論文)。

以上より、第 1 幼虫が兵隊に分化するためのスイッチや、JH と 20E による兵隊分化の制御メカニズムが初めて明らかになった。ただし、雌雄とも兵隊に分化する祖先的な種での解析しか行うことができていないため、派生的な種における性情報との関係や役割の違いは未だに不明である。今後、これらの遺伝子群を起点にした詳細な解析を各種で進めることにより、兵隊分化のしくみの全容が解明されることが期待できる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件) 全て査読有り

Yaguchi H, Suzuki R, Matsunami M, Shigenobu S & Maekawa K (2019) Transcriptomic changes during caste development through social interactions in the termite *Zootermopsis nevadensis*. *Ecology and Evolution*, 9: 3446-3456.

DOI: <https://doi.org/10.1002/ece3.4976>

Matsunami M, Nozawa M, Suzuki R, Toga K, Masuoka Y, Yamaguchi K, Maekawa K, Shigenobu S & Miura T (2019) Caste-specific microRNA expression in termites: insights into soldier differentiation. *Insect Molecular Biology*, 28: 86-98.

DOI: <https://doi.org/10.1111/imb.12530>

Masuoka Y, Toga K, Nalepa CA & Maekawa K (2018) A crucial caste regulation gene detected by comparing termites and sister group cockroaches. *Genetics*, 209: 1225-1234.

DOI: <https://doi.org/10.1534/genetics.118.301038>

Yaguchi H, Shigenobu S, Hayashi Y, Miyazaki S, Toga K, Masuoka Y & Maekawa K (2018) A lipocalin protein, Neural Lazarillo, is key to social interactions that promote termite soldier differentiation. *Proceedings of the Royal Society B*, 285: 20180707.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2018.0707>
Masuoka Y, Yaguchi H, Toga K, Shigenobu S & Maekawa K (2018) TGF signaling related genes are involved in hormonal mediation during termite soldier differentiation. *PLOS Genetics*, 14: e1007338.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007338>

[学会発表](計13件)

増岡裕大, 前川清人 (2019年3月26日) シロアリの兵隊分化制御因子 HR39 の上流経路と標的遺伝子の探索. 第63回日本応用動物昆虫学会(筑波大学)
甲斐啓馬, 宮崎智史, 林良信, 前川清人 (2018年12月9日) シロアリ類で見られる性決定遺伝子の進化. 平成30年度日本動物学会中部支部大会(名古屋大学).
甲斐啓馬, 宮崎智史, 林良信, 前川清人 (2018年9月13日) ヤマトシロアリにおける性決定遺伝子 doublesex の機能と進化. 第89回日本動物学会(札幌コンベンションセンター). [開催中止, 発表認定, 1P156]
前川清人 (2018年9月10日) シロアリの親子関係とカースト分化の調節機構. 第78回日本昆虫学会(名城大学).
Masuoka Y & Maekawa K (7 Aug, 2018) A role of JH-Met signaling activity during soldier differentiation in the termite *Zootermopsis nevadensis*. The 18th Congress of International Union for the Study of Social Insects (Guarujá, São Paulo, Brazil).
Maekawa K & Masuoka Y (7 Aug, 2018) Evolution of sterile caste in termites: missing link between the functions of JH and ecdysone. The 18th Congress of International Union for the Study of Social Insects (Guarujá, São Paulo, Brazil).
Yaguchi H, Suzuki Ryu, Matsunami M, Shigenobu S & Maekawa K (6 Aug, 2018) Transcriptomic signatures during soldier differentiation through the regulation of social interactions in termites. The 18th Congress of International Union for the Study of Social Insects (Guarujá, São Paulo, Brazil).
増岡裕大, 前川清人 (2018年3月26-27日) シロアリの兵隊分化において脱皮と形態変化を両立させる機構の探索. 第62回日本応用動物昆虫学会(鹿児島大学).
甲斐啓馬, 宮崎智史, 増岡裕大, 鈴木隆太郎, 前川清人 (2017年9月21日) シロアリにおける性決定遺伝子 *doublesex* の探索および発現解析. 第88回日本動物学会(富山県民会館).
矢口甫, 鈴木隆太郎, 松波雅俊, 重信秀治, 前川清人 (2017年9月21日) ネバダオオシロアリの兵隊分化過程における遺伝子発現プロファイリング. 第88回日本動物学会(富山県民会館).
増岡裕大, 前川清人 (2017年9月21日) シロアリの兵隊分化にかかわる幼若ホルモン応答遺伝子の探索. 第88回日本動物学会(富山県民会館).
前川清人, 矢口甫, 増岡裕大 (2016年11月17日) 社会性昆虫におけるカースト分化の分子基盤: シロアリの兵隊の作り方. 第87回日本動物学会(沖縄コンベンションセンター).
Maekawa K, Yaguchi H & Masuoka Y (30 Sep, 2016) Gene expression and transcriptome analyses reveal the proximate mechanism underlying caste differentiation of lower termites. The 25th International Congress of Entomology (Orlando, Florida, USA).

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

報道関連情報

- 富山大学プレスリリース(2018年4月27日) シロアリの兵隊分化の鍵遺伝子を発見
<https://www.u-toyama.ac.jp/outline/publicity/pdf/2018/20180418.pdf>
- 富山大学プレスリリース(2018年7月26日) シロアリの兵隊分化を決定する遺伝子の発見～女王とのかかわり合いが生み出す分化のしくみ～
<https://www.u-toyama.ac.jp/outline/publicity/pdf/2018/20180726.pdf>
- 富山新聞(2018年4月19日) シロアリ兵隊分化の鍵遺伝子 前川富大准教授ら確認
- 北日本新聞(2018年4月19日) 兵隊アリ誕生 鍵の遺伝子発見 富山大学院グループ
- 日本経済新聞(2018年8月6日) 兵隊アリに育つ遺伝子を特定 富山大学
- 北日本新聞(2018年7月27日) 富山大シロアリ研究 兵隊アリ決める遺伝子を発見

ホームページ等

- Research Topics XIV(2018年3月16日) 兵隊特異的な形態形成における JH 受容体遺伝

- 子 (Met) の役割 <http://www.sci.u-toyama.ac.jp/bio/maekawa-lab/research14.html>
- Research Topics XV (2018 年 3 月 16 日) カースト特異的なクチクラ形成の分子メカニズム
△ <http://www.sci.u-toyama.ac.jp/bio/maekawa-lab/research15.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名 :

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 :

部局名 :

職名 :

研究者番号 (8 桁) :

(2)研究協力者

研究協力者氏名 : 矢口 甫

ローマ字氏名 : Yaguchi Hajime

研究協力者氏名 : 増岡 裕大

ローマ字氏名 : Masuoka Yudai

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。