

令和元年6月7日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18591

研究課題名(和文)シロアリ類における不妊化遺伝子の進化

研究課題名(英文)Evolution of sterilization genes in termites

研究代表者

林 良信 (HAYASHI, Yoshinobu)

慶應義塾大学・法学部(日吉)・助教

研究者番号：70626803

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：シロアリは、多数の個体が集合して社会を形成する。その社会では個体間での分業がおこなわれており、繁殖に専念する繁殖個体(女王・王)や、繁殖をせずに他個体への給餌等の利他行動を行う非繁殖個体(ワーカーなど)などが存在する。本研究ではシロアリの分業に関わる遺伝子、とくに非繁殖個体の個体発生に関わる遺伝子(不妊化遺伝子)を同定するため、交配実験や全ゲノム情報を利用した解析をおこなった。その結果、不妊化遺伝子が存在するゲノム領域の候補を絞り込むことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

社会性の進化は、単細胞生物から多細胞生物細菌への進化と並ぶ、生物進化の大イベントであり、生物進化について理解を深めるために探究すべき重要な現象である。本研究では、特に複雑で巨大な社会を構築するシロアリにおいて、その社会性がどのような遺伝子によって生み出されるのかを解明することを目的とした。本研究の結果、シロアリの社会性に関わる遺伝子の候補を選定することができた。今後、それらの遺伝子の機能解析を行うことで、社会性を生み出す分子機構の解明につながる。

研究成果の概要(英文)：In termites, many individuals cooperatively form a society. The society involves division of labor among individuals, where some individuals (queens and kings) devoted to breeding, and the other individuals (workers etc.) do not reproduce and exhibit altruistic behavior such as feeding to other individuals. In this study, in order to identify genes involved in the division of termites, especially those related to development of workers (social genes), mating experiments and analyses using whole genome information were carried out. As a result, the candidates of the genomic regions for the social genes.

研究分野：進化ゲノム学

キーワード：シロアリ 遺伝子 進化 社会性

1. 研究開始当初の背景

単独性生物から社会性生物への進化は、単細胞生物から多細胞生物の進化と並ぶ生物進化の歴史上の大イベントである (Maynard-Smith and Szathmáry 1995)。社会性の進化に伴い、「個体と個体集合 (社会)」という明確な階層構造 (それは緊密な個体間相互作用に起因する) が生じたことで、生命現象において全く新たな複雑性が生み出された (Okasha 2011)。社会性は細菌からヒトまで様々な分類群の生物で見られるものであり、生物進化について理解を深めるためには、高次の複雑性をもつ“社会”の構成や形成過程、進化メカニズムを解明することが不可欠である。

社会性に関して理解を深めるには、社会を形成するために不可欠な事象について研究をすることが最も重要である。社会を形成する生物は、個体間相互作用や階層性と関連し、単独性の生物では決してみることのできない性質を数多く進化させている (例えば、社会性昆虫の不妊個体の存在や、ヒトのきわめて高度な言語コミュニケーションなど)。それらの性質の多くは、社会の形成に不可欠であり、そのため社会性を理解するために探究すべき最も重要なものである。

社会性生物のなかでも、真社会性昆虫と呼ばれるシロアリやアリなどは、特に複雑で巨大な調和のとれた社会を進化させており、もっとも興味深い社会性生物の一つである (Oster & Wilson 1978)。そして、真社会性昆虫で見られる繁殖に関する個体間分業 (ここでは“不妊個体と繁殖個体の分業”をいう) は、昆虫の真社会性の根幹をなすもので、一部の個体が示す“不妊化”は昆虫の社会性を理解するための鍵となる重要な現象である。

真社会性昆虫の不妊という性質 (すなわち、極端な利他性) の進化の究極要因は、これまで進化生物学上の大きな謎となっており、古くから研究されてきた。チャールズ・ダーウィンは著書「種の起源」の中で、不妊という性質の進化は、より仔をたくさん残すような性質が選択され進化するという自然選択説に反しており、その説の妥当性をおびやかすものと述べた。しかしその後、Hamilton (1964) は、不妊個体は繁殖可能な血縁者を介して、それらが共有する遺伝子を間接的に次世代に残せることに注目して、不妊形質も含む“利他性”に関わる遺伝子の進化の理論的条件 (“血縁選択説”と呼ばれる) を見事に見出し、ダーウィン以来の謎に対する1つの解答を得た。Hamilton が提唱したこの血縁選択説は様々な社会性生物に適用できることが明らかになりつつあるが、一方で、利他性に関わる遺伝子はこれまでにほとんど同定されておらず、現在の進化生物学上の最大の謎の1つとなっている

(Thompson et al. 2013)。

日本に広く分布する社会性昆虫であるヤマトシロアリ (*Reticulitermes speartus*) では、交配実験によって不妊形質が性染色体上の1遺伝子座2対立遺伝子によって決定されることを明らかになっている (Hayashi et al. 2007)。この発見によって、いわゆる“順遺伝学 (forward genetics)”の手法により不妊形質に関わる遺伝子を同定する絶好の機会がもたらされたが、膨大なゲノムの中からこの遺伝子を同定することは、これまでは技術・労力的に困難であった。

しかし、最近になって普及し始めた“次世代 DNA シークエンサー”と呼ばれる、新技術を用いた塩基配列解析装置を用いれば、これまでに考えられなかったような莫大な量の遺伝子塩基配列データが容易に得られるため、網羅的ゲノム解析をおこなうことが可能となり、今ではこの遺伝子の同定は難しくなくなった。

2. 研究の目的

本研究では、交配実験による遺伝子連鎖解析や野外採集した不妊個体と繁殖個体の遺伝的違いを検出して解析することにより、ヤマトシロアリの不妊化を制御する遺伝子 (不妊化遺伝子) を同定する。また、全ゲノム・トランスクリプトーム情報を利用した生物情報解析によって、シロアリの進化過程で急速に進化したゲノム領域を特定する。これらの解析によって、どのような遺伝子がシロアリの社会性を生み出すのに貢献しているのかを明らかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

本研究の遺伝解析をおこなうためには、はじめにシロアリとシロアリの姉妹群であるゴキブリのゲノムもしくはトランスクリプトームの情報を利用する必要があるため、まずゲノムもしくはトランスクリプトーム解析をおこなった。そして、それらの情報を利用してヤマトシロアリの不妊形質を制御する遺伝子 (不妊化遺伝子) (Hayashi et al. 2007) の同定をおこなうため、交雑個体を用いて不妊化遺伝子の連鎖解析をして、その遺伝子が位置するゲノム領域の候補の絞りこみをおこなった。また同時に野外で採集した繁殖個体と非繁殖個体の遺伝的違いを検出するため、次世代 DNA シークエンサーを用いた RAD-seq (Restriction Site Associated DNA Sequencing) によるゲノムワイド DNA 多型解析をおこなった。それらの解析結果を

利用して不妊化遺伝子の候補ゲノム領域を絞り込んだ。さらに、ヤマトシロアリの不妊化遺伝子は性決定因子との強い相互作用があることが示唆されているため、その機能解析をする際にはシロアリにおける性決定因子との相互作用を調べる必要がある。本研究ではゲノム解析によって、性特異的な遺伝子配列の同定を試みた。

また、シロアリの系統的姉妹群であるキゴキブリ属の一種 *Cryptocercus punctulatus* のトランスクリプトーム解読によってその遺伝子配列情報を得ることで、複数種のシロアリやシロアリ以外の昆虫のゲノム情報を利用した進化的解析をおこなった。これによってシロアリ類の祖先系統で急速に進化した遺伝子の特定を試みた。

4. 研究成果

本研究では、札幌産・屋久島産のヤマトシロア리를交配させ、F1 世代を得てさらに、それらの交配によって F2 世代を得ることができた。これらのうち、雄の繁殖系列個体 3 3 個体と雄の非繁殖系列個体 3 3 個体から DNA を抽出して、RAD-seq をおこなった。また、野外で採集した繁殖系列個体と非繁殖系列個体の RAD-seq もおこなった。それらの結果得られた遺伝子情報を解析し、繁殖系列個体と非繁殖系列個体の遺伝的違いを検出して、不妊化に関わる遺伝子の候補を選び出すことができた。その遺伝子領域において、繁殖系列個体と非繁殖系列個体の間で遺伝的に分化した座位に PCR プライマーを設計したところ、実際に繁殖系列個体と非繁殖系列個体を区別することができる遺伝マーカーを作成することができた。今後はこれらの遺伝子領域の近傍を解析することによってヤマトシロアリの不妊化遺伝子を特定することができると期待される。また、これらの RAD-seq の結果から、雌雄を区別する遺伝マーカーも作成することができた (Hayashi et al. 2017)。ヤマトシロアリを含むいくつかのシロアリ種では、繁殖系列個体と非繁殖系列個体の分化において、性決定因子も関与すると予想されている。本研究で作製した性別別遺伝マーカーを利用することにより、初期胚の性分化期において雌雄判別することが可能になり、またそれによって性分化期における性間の遺伝子発現比較をおこなうことが可能になった。今後の研究で、その比較をおこない、性決定因子を同定することができれば、さらに包括的にシロアリの不妊化の分子機構が解明される。また、シロアリの系統的姉妹群であるゴキブリにおいて性決定因子を同定することで、性決定機構の進化と、シロアリで新たに獲得された不妊化という現象の関連付けをおこなうことができ、シロアリの社会性進化の包括的理解に大きく貢献する。

次に、本研究の遺伝子情報解析に必要となる、キゴキブリ属の一種 *Cryptocercus punctulatus* のトランスクリプトーム解読をおこなった。キゴキブリの老齢幼虫と成虫の雌雄の全身から RNA を抽出し、Illumina HiSeq による RNA-seq をおこなった。それによって得られたショートリード配列をアセンブリングしてトランスクリプトームの再構築をおこなった (Hayashi et al. 2017)。その結果、132,191 個の遺伝子配列を得ることができた。それらの遺伝子配列には昆虫で広く保存されている遺伝子の 99% 以上が含まれていることが、遺伝子配列類似度解析によって明らかになり、非常に高品質なトランスクリプトームデータが得られたといえる。このトランスクリプトームデータをさらに解析し、キゴキブリの DNA メチル化レベルの推定をおこなった。DNA メチル化は、表現型多型を生み出すメカニズムの一つである可能性があり、シロアリの繁殖系列個体と非繁殖系列個体の分化にもかかわる可能性があるため、それらの分化の分子機構を解明するためには、DNA メチル化についても解析する必要がある。解析をおこなった結果、キゴキブリの DNA メチル化レベルは、すでに報告されているシロアリの DNA メチル化レベル (Hayashi et al. 2013) と大きな違いはないことが明らかになった。つまり、シロアリの社会性進化の過程で、ゲノムの全体的な DNA メチル化レベルは大きな変化をしなかったことが明らかになった。ただし、DNA メチル化の微細な変化もしくは少数の遺伝子のメチル化の調節機構の進化が社会性進化に影響を及ぼした可能性もあるので、DNA メチル化については今後さらに解析を進める必要がある。

このトランスクリプトームデータとシロアリ 3 種のゲノムデータを利用することで、シロアリの祖先系統で正の自然選択圧を受けた遺伝子の同定をおこなった。系統樹上の各枝におけるアミノ酸の同義置換率と非同義置換率を推定した解析によって、シロアリの祖先系統において製の自然選択を受けた遺伝子と、純化淘汰の緩和があった遺伝子がそれぞれ 5 遺伝子、29 遺伝子見つかった。これらの遺伝子はシロアリの社会性進化に伴い、新たな機能を獲得した可能性があるため、今後はこれらの遺伝子の機能解析をおこない、シロアリの社会性に関わる遺伝子を明らかにする。

また、シロアリとゴキブリの全ゲノムアラインメントによる比較ゲノム解析もおこなった。この解析によって、中立進化モデルとより遅い・速い進化をしているゲノム領域の特定をおこなった。その結果、タンパク質コード領域以外にも全種において高度に保存された領域や進化速度の速い領域が見つかった。今後さらにシロアリの祖先系統において急速に進化した領域を明らかにしていく必要があるが、そのためにはシロアリの姉妹群であるキゴキブリの全ゲノム情報が必要になる。本研究では、キゴキブリの全ゲノム解読にも着手しており、すでに Illumina HiSeq による全ゲノムシーケンシングが完了している。さらにロングリードシーケンサーの PacBio Sequel でのシーケンシングもおこなう予定であり、高品質な全ゲノム情報の構築を目指している。さらにヤマトシロアリにおいても全ゲノムシーケンシングをおこなっており、N50

値が1.9 Mbという高品質なゲノムアセンブリを構築することができている。この結果を利用し、比較ゲノム解析をおこなうことによって、シロアリの社会性進化に伴うゲノム進化の過程を解明することができ、社会性の遺伝的基盤の解明に近づく。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2件)

Hayashi Y, Oguchi K, Yamaguchi K, Kitade O, Maekawa K, Miura T, Shigenobu S (2017) Male-specific molecular genetic markers in the Japanese subterranean termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Insectes Sociaux* 64: 357-364. 査読有 .

Hayashi Y, Maekawa K, Nalepa CA, Miura T, Shigenobu S (2017) Transcriptome sequencing and estimation of DNA methylation level in the subsocial wood-feeding cockroach *Cryptocercus punctulatus* (Blattodea: Cryptocercidae). *Applied Entomology and Zoology* 52: 643-651. 査読有 .

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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：

ローマ字氏名：

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。