

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21085

研究課題名(和文)シロアリの兵隊分化における幼若ホルモンによる分化運命決定に関する分子発生学的解析

研究課題名(英文)Soldier determination mechanisms by juvenile hormone in termite

研究代表者

梅 浩平 (TOGA, Kouhei)

日本大学・文理学部・助手

研究者番号：10726798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：シロアリの兵隊は、防衛に特殊化した形態をしている。兵隊への発生は、遺伝的に決定されるものではなく、環境要因によって後胚発生の過程で決定され、昆虫のホルモンの一つ幼若ホルモンによって制御される。本研究では、ショウジョウバエでは翅原基で発現するMsh遺伝子が、タカサゴシロアリではホルモンの下流で兵隊特異的な形態変化に関わる遺伝子であることがわかった。この他にも他の昆虫では翅の形成に関わる遺伝子が兵隊への発生過程で発現上昇していることも突き止めた。以上のように、シロアリのカースト分化決定には、翅で働く転写因子が深く関わることを示唆する結果を初めて得た。

研究成果の概要(英文)：Morphologies of termite soldiers are specialized for colony defense. Developmental determination for soldiers is regulated by environmental factors during post-embryonic development. Juvenile hormone (JH) mediate this developmental processes. This study showed that Msh gene, which is expressed in wing disc of *Drosophila melanogaster*, plays a central role in soldier-specific morphological changes. Furthermore, this study showed that some wing developmental genes such as vestigial gene increased during presoldier development. These results suggest that the genes involved in wing formation plays a central role in termite soldier development.

研究分野：進化発生学，生態発生学，社会生物学

キーワード：幼若ホルモン シロアリ 形態形成

1. 研究開始当初の背景

生物は環境に応答して表現型を変化させる能力を持つ。顕著な場合は、同種とは思えないほど異なる二つ以上の表現型を示す場合まであり、この現象は表現型多型と呼ばれる。環境シグナルの入力から表現型改変に至る生理発生機構に関する研究は昆虫を用いて多く行われている。環境シグナルはホルモン量に変換され、それにより各組織で発生運命が決定される(Nijhout 2001)。つまりホルモンは発生段階のタイミングを決定する役割を担っている。しかし、表現型多型を示す昆虫において、ホルモンがどのように発生段階を特徴付けるのかに関する詳細は未だ不明である。

シロアリには、主に3つのカースト(職蟻, 兵隊, 生殖虫)が巣内で分業しており、カースト分化は表現型多型の好例である。兵隊は職蟻や幼虫から前兵隊を経て分化する。兵隊への分化は、幼若ホルモン量の増加が必須であり、カースト分化における幼若ホルモン(juvenile hormone: JH)の機能を明らかにする上で重要なモデルとなる。

タカサゴシロアリの兵隊分化過程では、頭部にはツノ様の突起構造、頭部内には外分泌腺(額腺)が形成されるとともに口器は退縮する。本種の兵隊は、額腺で合成された防衛物質をツノの先端から噴出することで防衛する。兵隊特異的な形態変化に関する遺伝子群をRNA干渉(RNAi)法により特定してきた過程で、*Muscle segment homeobox (Msh)*と呼ばれる翅原基で発現する遺伝子が前兵隊の発生段階を特徴付けることを示唆する結果を得た。このことより、翅形成に関わる遺伝子を含む転写因子は、シロアリの兵隊の発生運命の決定に関わる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、*Msh* を含めた翅形成遺伝子やホルモン関連遺伝子を対象として、シロアリの兵隊分化において、幼若ホルモンのシグナル伝達に関わる遺伝子の探索とその機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)シロアリの兵隊は、幼若ホルモンの類似体を職蟻に塗布することで人為的に効率的に前兵隊を誘導可能である。本研究の主な材料であるタカサゴシロアリは、ハイドロプレレン投与により効率的に前兵隊を誘導可能である。本研究では、この誘導系とRNAiによる遺伝子ノックダウンを組み合わせ、タカサゴシロアリの兵隊分化における*Msh*の機能を明らかにする。

(2)前兵隊分化の誘導系を利用して、職蟻や前兵隊、兵隊のサンプルを経時的にサンプリングし、RNA抽出を行った。これを用いて、リアルタイム定量PCRにより、ホル

モン関連の遺伝子の発現量解析を行い、*Msh*の制御下にあるホルモン関連の遺伝子の探索を行った。

(3)社会性昆虫以外のモデル昆虫(コクヌストモドキ)を用いて、タカサゴシロアリで明らかになった*Msh*の機能は、社会性昆虫以外ではどのような機能を持つのかを調査した。

(4)*Msh*はキイロショウジョウバエでは、翅原基で発現することが知られる。したがって、タカサゴシロアリの兵隊分化と翅形成遺伝子は関連があることが予想される。*Msh*以外の翅形成に関わる遺伝子について、発現量解析やRNAiによる機能解析を行った。

4. 研究成果

(1)ハイドロプレレン投与した職蟻に*Msh*の二本鎖RNAを注射することで、*Msh*のノックダウンを行った。注射の時期はハイドロプレレン投与直後や日数をあけて注射した。ハイドロプレレン投与から10日程度経過してから注射した後に脱皮した前兵隊は、通常より頭部に黒色を呈し、大顎や上唇は過度に退縮していた。この形態は、前兵隊というより兵隊に類似していた。このことは、本来ならば前兵隊の形態になる予定が、発生段階をスキップして兵隊になったのではないかと考えられる。ハイドロプレレン投与開始と二本鎖RNAの注射を同時に行った場合は、頭部の着色や大顎や上唇の形態が職蟻のようになった。注射時期を変えて行ったノックダウンの結果から、*Msh*は前兵隊の形態形成に関わると結論づけられる。また、異なる二つの時期で働く遺伝子であると予想された。

*Msh*の二本鎖RNAの注射時期を変えることで二つの表現型が生じたことから、*Msh*は高発現する時期が二つであると予想される。兵隊分化の誘導系を利用して、*Msh*の経時的な発現量解析を行った結果、*Msh*が高発現している時期は、ハイドロプレレン投与から3日後とガットパージ期であった。ガットパージとは昆虫が脱皮前に起こす腸内容物の放出である。タカサゴシロアリでは、前兵隊への脱皮前に腸内容物の放出や脂肪体の蓄積によって腹部が白くなることで、視認することができる。上述した*Msh*のRNAiによって生じる二つの表現型は、この二つの*Msh*の発現のピークが関係していることが示唆される。

(2)これまでのカースト分化決定にはホルモンが重要な働きを担うことがわかっていた。*Msh*はこのホルモンのシグナルを仲介する遺伝子であると考えられる。なぜなら、ホルモンが引き起こす体全体的な形態変化が*Msh*のRNAiによって抑制されたからである。昆虫の発生制御は、幼若ホルモンとエクダイソンが重要な働きを担うが、シロアリの兵隊

分化において、これらホルモンのシグナル伝達がどのような役割を担っているのか不明であった。まずは、幼若ホルモンやエクダイソンの受容体遺伝子やシグナル伝達遺伝子の発現量解析を行った。幼若ホルモンの受容体遺伝子 *Met* は兵隊分化過程において変動しており、一貫した発現変動の変化は見られなかった。幼若ホルモンのシグナル伝達遺伝子とエクダイソン受容体遺伝子 (*EcR*) は類似した発現パターンを示した。具体的には、ハイドロプレレン投与後数日で発現が上昇し、一旦発現量が低下するが、その後前兵隊にかけて発現が徐々に上昇した。ハイドロプレレン投与による誘導された前兵隊分化過程において、*Met* 及び *EcR* の RNAi によるノックダウンを行うと、前兵隊の形態形成が起こらず、職蟻のような形態になった。この形態は、*Msh* のノックダウンと類似した形態である。

この他にもエクダイソンのシグナル伝達に関わる *E75* や *E63*, *E93*, *Broad* などの遺伝子についてノックダウンによる機能解析を行った。ハイドロプレレン投与後の職蟻において、*E93* のノックダウンを行うと、前兵隊の大顎形成が阻害され、職蟻のようになった。これまでに他の昆虫において、*E93* は成虫化に必要な遺伝子として知られており、この結果は昆虫の発生の調節機構においても興味深い結果である。今後は、これらの遺伝子と *Msh* との発現制御関係を明らかにすることが必要となる。

(3) 上述したタカサゴシロアリで明らかになった *Msh* の機能がカースト分化特異的な機能なのかを明らかにするため、単独性で RNAi による遺伝子の機能解析が効率的に行えるコクヌストモドキを用いて、*Msh* のノックダウンを予備的に行った。コクヌストモドキの終齢幼虫に二本鎖 RNA を注射し、蛹及び成虫の形態を観察したが、外部形態に異常は観察されなかった。このことは、*Msh* によるホルモンのシグナル伝達はシロアリ特異的な機能の可能性があるが、詳細な解析を行う必要がある。

(4) *tolkin* はコクヌストモドキにおいて、鞘翅の形成に関与する遺伝子である。タカサゴシロアリで、ハイドロプレレン投与後の職蟻に *tolkin* の二本鎖 RNA を注射した。その結果、前兵隊の形態形成が阻害された。発現部位解析から、この遺伝子は脳やエクダイソンの合成器官である前胸腺で発現していることがわかった。この他にも、発現量解析から翅形成において重要な役割を担う *Vetigial* の発現が、前兵隊分化過程で上昇することも明らかとなった。ただし、この遺伝子については、RNAi による機能解析は行っていないため、どのような形態形成を制御するかは不明である。しかし、これらの結果は、シロアリの兵隊分化は翅形成遺伝子と深い関係があることを示唆している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

(1) Toga K, Minakuchi C, Maekawa K (2017) Soldiers are differentiated from male larval stages in incipient colonies of *Nasutitermes takasagoensis* (Isoptera: Termitidae). *Applied Entomology and Zoology*, 52: 329-335. 査読有

(2) 榎 浩平, 前川 清人 (2017) シロアリのカースト特異的な形態形成の分子機構. *生物科学*, 68:177-184. 査読有

(3) 榎 浩平 (2017) タカサゴシロアリの兵隊分化における生理・発生機構. *昆虫と自然*, 52: 41-42. 査読無

(4) Toga K, Hanmoto S, Suzuki R, Watanabe D, Miura T & Maekawa K (2016) Sexual difference in juvenile-hormone titer in workers leads to sex-biased soldier differentiation in termites. *Journal of Insect Physiology*, 87: 63-70. 査読有

[学会発表] (計5件)

(1) 榎 浩平 (2018) タカサゴシロアリの兵隊分化過程で発現する mRNA および miRNA. 昆虫ソシオゲノミクス研究会(基礎生物学研究所・招待講演).

(2) 榎 浩平 (2018) 個体間相互作用を介した表現型調節機構. ROIS-DS-JOINT 共同研究集会-昆虫のゲノムデータベースとそれを活用したデータ解析(東京大学).

(3) Homma Y, Toga K, Shinoda T, Togawa T (2017) PTEN-like phosphatase (Plip), a novel enzyme involved in juvenile hormone synthesis. The 3rd International insect hormone workshop (Nasu, Japan).

(4) 榎 浩平, 水口 智江可, 外川 徹 (2017) タカサゴシロアリの兵隊分化における small-RNA シーケンス解析. 第 61 回日本応用動物昆虫学会(東京農工大学).

(5) 榎 浩平 (2016) シロアリの兵隊分化に関する分子発生的研究. 第 10 回昆虫ワークショップ(富士箱根ランド).

[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〕

<http://kenkyu-web.cin.nihon-u.ac.jp/Profiles/129/0012835/profile.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅 浩平 (TOGA, Kouhei)
日本大学・文理学部・助手
研究者番号：10726798

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

水口智江可 (MINAKUCHI, Chieka)