

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H05048

研究課題名（和文）性を維持する分子基盤の解明

研究課題名（英文）Genetic basis for maintaining sexual reproduction

研究代表者

小林 和也 (Kobayashi, Kazuya)

京都大学・フィールド科学教育研究センター・講師

研究者番号：00648280

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 19,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、スギオシロアリを用いて性の維持メカニズム解明を目指し、未受精卵の発生開始を決定する遺伝子と性決定遺伝子をゲノム・トランスクリプトーム解析によって探索し、それぞれの候補遺伝子を得た。前者については未受精卵の遺伝子発現量の解析により発現量の異なる10の遺伝子のうち、発生確率の高い卵で高発現していた3つの遺伝子を発見し、後者についてはドラフトゲノムに発現遺伝子の配列と性表現とリンクしている遺伝子マーカーの配列をマッピングすることで連鎖している遺伝子を特定した。また、理論研究として有性生殖が生物種の性質、個体群動態、ひいては群集動態に与える影響をモデル化した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

配偶子の発生開始や性決定は受精卵の極めて初期に生じる発生の重要イベントであるが、これらがどのように生じるのか、またこのメカニズムがどのように進化してきたのかに関する知見は少なく、昆虫では主にショウジョウバエやミツバチ、カイコに代表されるモデル生物に限られている。これらの昆虫は比較的最近になって分岐した分類群（完全変態昆虫）であり、より祖先的な不完全変態昆虫では研究が遅れている。本研究は不完全変態昆虫の一種であるスギオシロアリを用いて性決定や未受精卵の発生開始を決める遺伝的メカニズムを解明しようとするものであり、今回の成果はその糸口となりうる。

研究成果の概要（英文）：This research aim to elucidate the maintenance mechanism of sexual reproduction using the Ryukyu drywood termites (*Neotermes sugioi*). We searched for genes determining the initiation of unfertilized egg development and sex-determining genes by transcriptome analysis and construction of draft genome. For the former, we identified that three genes were highly expressed in unfertilized eggs with a high probability of development. For the latter, mapping RNA-seq data to the draft genome with genetic markers linked to sexual phenotype, we identified several linked genes. In addition, as a theoretical study, I modeled the effects of sexual reproduction on the traits of species, population dynamics, and ultimately community dynamics and structure.

研究分野：昆虫生態

キーワード：シロアリ 有性生殖 ゲノム 性決定 単為生殖

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

有性生殖は自然界で普遍的に見られる現象でありながら、その分子基盤がどのように進化し、維持されているのかは、ほとんど分かっていない。特に、配偶子の発生開始や性決定は受精卵の極めて初期に生じる重要なイベントであるが、これらの進化プロセスに関する知見は少なく、昆虫では主にショウジョウバエやミツバチ、カイコに代表されるモデル生物とその一部の近縁種に限られている。これらの昆虫は比較的最近になって分岐した分類群(完全変態昆虫)であり、シロアリを含むより祖先的な不完全変態昆虫では研究が遅れている。また、これらの遺伝子の進化的挙動が他種や生態系に与える影響はほとんど研究されていない。

### 2. 研究の目的

有性生殖は自然界で普遍的に見られる現象でありながら、その分子基盤がどのように進化し、維持されているのかは、ほとんど分かっていない。例えば、性決定は、動物の発生初期にその個体の発生運命を決定づける重要な分化プロセスでありながら、ショウジョウバエ・カイコ・ミツバチなどの完全変態昆虫で明らかとなった性決定の最上流因子は互いに全く異なる遺伝子であった。このような性決定遺伝子に見られる多様性がどのように進化し、維持されているのかについてはほとんど知見が無い。特にシロアリ・バッタ・アブラムシなど多くの害虫を含み、より祖先的な不完全変態昆虫では、1)ゲノムサイズが大きく近交系がない 2)卵において雌雄を判別する手段がない のいずれか、あるいは両方の理由により性決定遺伝子自体が未解明なままである。

我々はスギオシロアリ(コウシュンシロアリ)において、単為生殖能力を発見し(Kobayashi & Miyaguni 2016 Scientific Reports)、ゲノム全体がホモ接合となるクローン集団を作成に成功していた。加えて、性と関連するマイクロサテライト遺伝子(NK14-8 と NK12-1)を発見しており(下表)、初期胚においても性判定を可能であった。これらをもちいて不完全変態昆虫で初となる性決定遺伝子の同定を目的の一つとした。

スギオシロアリは性決定メカニズム解明に有用なだけでなく、単為生殖の進化という視点でも興味深い材料である。一般に単為生殖能力を持つ昆虫では、ほぼ全ての未受精卵が孵化するが、本種ではおよそ半数の未受精卵が孵化する。このデータは本種が単為生殖能力を獲得する進化の途上にいることを示唆しており、単為生殖の進化プロセスを研究する上で極めて良い材料である。そこで、未受精卵で発現している RNA を調べることで胚発生に必要な遺伝子を特定することも目的とした。

これらの遺伝子の進化が当該種にとってどのような意味を持つのかだけでなく、多種との相互作用や地域の生物群集・生態系に与える影響はどの程度なのかはほとんど研究されていない。そこで、有性生殖とその関連形質の進化がその種の個体群や地域の生物群集に与える影響を理論モデルで推定することも目的に加えた。

### 3. 研究の方法

#### (1) ドラフトゲノム構築

脱皮直後のスギオシロアリから長鎖の DNA を抽出し、Chromium System を用いたライブラリ作製および次世代シーケンサーを用いた塩基配列決定を行った。得られたデータを国立遺伝学研究所のスーパーコンピュータシステムを用いて解析し、ドラフトゲノム構築を試みた。

#### (2) 未受精卵の RNA-seq による発現遺伝子比較

雌雄ペアとメス 2 匹のペアで巣を創設させ、受精卵と未受精卵の孵化率をそれぞれ確認したところ、未受精卵の孵化率に極端な種内変異が存在することを再確認した。得られた結果から、メス 2 匹のペアのうち、特に孵化率の高いペアと全く孵化しなかったペアを取り出し、それぞれが産んだ発生初期の未受精卵を用いて、発現している遺伝子(RNA)を抽出し、逆転写したのち、次世代シーケンサー用のライブラリを作成し、HiSeq によって配列決定した。

得られたデータを国立遺伝学研究所のスーパーコンピュータシステムを用いて解析した。Trimmomatic で配列のクオリティチェックを行ったのち、Trinity でアセンブルし、hisat2 で上記のドラフトゲノム上にマッピングを行った。また、各 RNA 配列は TransDecoder により ORF 探索を行ってアミノ酸配列を推定し、Pfam、uniprot、ショウジョウバエのタンパク配列と同源性検索を行い、機能推定を行った。

また、孵化率の異なったペア間で発現量の異なる遺伝子を解析し、孵化率に関わっている遺伝子を探索した。性と関連するマイクロサテライト遺伝子をドラフトゲノム上にマッピングすることで、近傍にある機能遺伝子との連鎖を調べた。

#### (3) 地域変異の探索

未受精卵の孵化率と性決定遺伝子の変異を探索するため、これまでの調査対象であった沖縄本島以外の石垣島・西表島・与那国でもスギオシロアリを採集し、性比やコロニー内のカースト組成を沖縄本島と比較した。

#### (4) 有性生殖とその関連形質の進化が地域の生物群集に与える影響の理論モデル

有性生殖とその関連形質は、個体数に直結する性質であり、加えて自分自身で雌雄の配偶子を生産し受精させない限りは個体間相互作用を伴う。この点に着目し、配偶行動や性比をめぐる種

内の個体間相互作用についてゲーム理論をベースとした数理モデルを構築した。また、個体群動態のフィードバックを考慮した個体ベースのシミュレーションを作成し、これを多種系へと拡張した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ドラフトゲノム構築

HiSeq から Read 数 400M pairs 平均 138bp の Read を得た。推定ゲノムサイズ 1.5Gb に対し、ややカバレッジが低かったものの、これを用いてドラフトゲノム構築を行った。10kbp を超える Scaffolds が 14920、Contig N50 が 37.60Kb、Total 870Mb のドラフトゲノムを得た。これはゲノムのおよそ 6 割弱をカバーしていると推測される。ゲノムのカバー率は低いものの、性と関連するマイクロサテライト遺伝子の一部はドラフトゲノム上にマッピングすることに成功した。

##### (2) 未受精卵の RNA-seq による発現遺伝子比較

メス 2 匹のペアで巣を創設させ、未受精卵の孵化率に極端な種内変異が存在することを再確認し、特に孵化率の高いペアと全く孵化しなかったペア(各 5 ペアずつ)で発現量の異なる遺伝子を FDR<0.05 でスクリーニングしたところ該当する遺伝子が 10 個見つかった。相同性検索ではこれらの遺伝子のうち多くは遺伝子発現を抑制する機能を持っていると推察された。今後はこれらの遺伝子が胚発生に関わっているかどうか調べる必要がある。

Trinity でアセンブルした配列はドラフトゲノム上にマッピングを行い、上記の性と関連するマイクロサテライト遺伝子が存在する Contig 上に幾つかの機能遺伝子配列を確認できた。これらの遺伝子が性決定に関わっているかどうかの検証が必要である。

##### (3) 地域変異の探索

未受精卵の孵化率と性決定遺伝子の変異を探索するため、これまでの調査対象であった沖縄本島以外の石垣島・西表島・与那国でもスギオシロアリを採集し、性比やコロニー内のカースト組成を沖縄本島と比較したところ、十分な個体数が得られた石垣島では、カーストを問わず性比の偏りが沖縄本島より弱いこと、一般的な働きアリに相当する擬職蟻のみオスに偏った性比を示すこと、沖縄本島で性と関連性が示されたマイクロサテライト遺伝子の一部が石垣では性と関連していないことが判明した。

##### (4) 有性生殖とその関連形質の進化が地域の生物群集に与える影響の理論モデル

有性生殖とその関連形質は、個体数に直結する性質であり、加えて自分自身で雌雄の配偶子を生産し受精させない限りは個体間相互作用を伴う。この点に着目し、配偶行動や性比をめぐる種内の個体間相互作用についてゲーム理論をベースとして構築した数理モデルは、相互作用頻度の増加に伴って個体数を減少させる効果を予測した。また、この数理モデルを応用して、個体群動態のフィードバックを考慮した個体ベースのシミュレーションを作成し、これを多種系へと拡張したところ、既存の理論では難しいとされていたニッチを共有する多種の共存が実現可能であることが示唆された。加えて、シミュレーションで再現された地域の生物群集構造は実際に野外で観察されている生物群集の構造と類似性があることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kobayashi Kazuya	4. 巻 61
2. 論文標題 Sexual reproduction and diversity: Connection between sexual selection and biological communities via population dynamics	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Population Ecology	6. 最初と最後の頁 135 ~ 140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1438-390X.1029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Kazuya	4. 巻 107
2. 論文標題 Sexual selection sustains biodiversity via producing negative density dependent population growth	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Ecology	6. 最初と最後の頁 1433 ~ 1438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1365-2745.13088	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Kazuya	4. 巻 108
2. 論文標題 Conditions for kin selection to bring cooperation and improve population growth: A response to Iritani	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Ecology	6. 最初と最後の頁 14 ~ 16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1365-2745.13281	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kobayashi, Kazuya
2. 発表標題 性淘汰が維持する生物多様性 - 身勝手な競争が集団サイズを安定化させる
3. 学会等名 日本生態学会 第66回全国大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林 和也
2. 発表標題 多種共存原理としての性選択：進化ゲーム理論における密度効果について
3. 学会等名 日本動物行動学会第37回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kobayashi, Kazuya
2. 発表標題 Sex as a maintenance mechanism of biodiversity
3. 学会等名 Biodiversity estimation in time and space: macroecological perspective of community assembly and diversity patterns
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kobayashi, Kazuya
2. 発表標題 Mating competition and biodiversity connected by multilevel selection
3. 学会等名 Symposium of Behavioral Ecology: Social Insects and Beyond
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuya KOBAYASHI, Eisuke HASEGAWA
2. 発表標題 Do communities dream of eternity?
3. 学会等名 日本生態学会 第67回全国大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----