

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年5月24日現在

機関番号：34506

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15200

研究課題名(和文)アリ科女王において長期間の精子貯蔵を可能にする分子基盤の解明

研究課題名(英文)Identification of molecules related to long-term sperm storage in ant queens

研究代表者

後藤 彩子(Gotoh, Ayako)

甲南大学・理工学部・講師

研究者番号：70734680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：多くの種の女王アリでは、交尾後に、オスから受け取った精子を受精嚢の中で10年以上にもわたって保存することが知られている。本研究では、この長期間の精子貯蔵に関わる分子を探るため、受精嚢の機能と貯蔵精子の生理状態を明らかにすることを目的とした。研究期間中に、これまでに明らかとなっていた、受精嚢での高発現遺伝子の全長配列の決定とRNAi法の準備をおこなった。また、貯蔵後5年経過した精子でも、受精嚢内で不動化されたままであることを明らかにした。貯蔵精子を受精嚢外に取り出すと動き出したことから、受精嚢内に不動化させる物質があること、精子は鞭毛の機能を損なわない状態で貯蔵されていることも明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

精子が常温で10年以上生存するという事は、細胞生物学の常識を覆すものであり、生物のもつ能力の可能性を考える上で興味深い。また、本研究を進めることで将来的には、家畜やヒトの精子保存方法の開発という応用的な研究にもつながることが期待できる。現在、家畜やヒトの精子保存は液体窒素による冷却が必須であり、安定的に精子を保存できる技術が求められている。精子の基本構造は各動物で共通しているため、本研究の遂行により家畜やヒトで低エネルギーかつ高品質な精子貯蔵技術へ応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Females of social Hymenoptera mate only at the beginning of their adult lives and produce offspring until their death without additional mating. In most ant species, queens live for over a decade, indicating that ant queens can store large numbers of spermatozoa throughout their long lives. To reveal molecular function of the spermatheca, I had previously identified highly expressed genes in the ant spermatheca relative to those in body sample. In this study, I obtained and analyzed full-length sequence of interesting genes selected from the spermatheca genes, and synthesized dsRNA for RNAi experiment. Sperm cells are immotile in the spermatheca of queens at 5 years after mating. The immotile spermatozoa begin to swim when they are ejected from the spermatheca. This indicates that spermatozoa do not lack flagellum functions and continue to survive even after storage for 5 years.

研究分野：昆虫学、分子生態学

キーワード：受精嚢 精子貯蔵 女王アリ アリ

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

## 1. 研究開始当初の背景

社会性ハチ目昆虫（アリ、ハチ）では、女王とオスは羽化後の限られた時期にしか交尾をせず、女王はその時に受け取った精子を「受精嚢」という袋状の器官に寿命が続く限り貯蔵し、産卵時に必要な数の精子を取り出し受精させている。アリ科女王は他昆虫と比較して極めて長寿であることが知られており、多くの種で10年以上、記録では29年生存する種も報告されている。これはつまり、アリ科女王は体のみならず、巨大コロニーメンバーを生産するだけの大量の精子を受精嚢内で長寿化させていると言い換えられる。通常、動物のオスの精子は交尾後数時間から数日で著しく劣化し、受精能力も低下することを考えると、アリ科女王の精子貯蔵能力は極めて特殊であり、高度な社会性をもつアリの繁殖戦略を考える上でも興味深い。しかし、その分子メカニズムは明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、アリ科女王の長期間の精子貯蔵メカニズムを明らかにするために、以下の課題について取り組んだ。

### (1) 受精嚢機能の分子レベルでの解明

受精嚢は精子を直接する保護している器官であること、社会性ハチ目昆虫の中でもアリ科女王の受精嚢形態は特殊であること(Gotoh et al., 2008)から、受精嚢の機能が長期間の精子貯蔵に大きく寄与していると考えられるが、受精嚢の詳細な機能については不明である。これまでに、RNA-seq法により、アリ科女王（キイロシリアゲアリ *Crematogaster osakensis* を使用)において体全体よりも受精嚢で多く発現している遺伝子を約3000個特定した。さらにこれらの遺伝子の発現比や他の生物との相同性、および *in situ* hybridization 法による発現パターンの確認から、受精嚢特異的な12遺伝子に加え、興味深い発現パターンを示した13遺伝子の計25遺伝子に着目した (Gotoh et al., 2017)。本研究課題では、これらの遺伝子およびタンパクの機能を明らかにすることを目指した。

### (2) オスアリの付属腺における高発現遺伝子の解析

昆虫では、精子とともにメスに受け渡される精液がメスの生理状態や行動を変化させることや、精子の運搬や保護に関わっていることが知られている。アリにおいても精液が精子の生存に大きく関与していることが考えられるため、精液を合成する器官であるオスの付属腺における重要な遺伝子を明らかにすることを目的に、体と比較して付属腺で高発現している遺伝子を特定した。

### (3) 受精嚢内に貯蔵されている精子の生理状態の解明。

アリ科女王の長期間の精子貯蔵メカニズムを探るためには、精子を貯蔵する側の受精嚢だけではなく、貯蔵される側の精子についても理解する必要がある。貯蔵している精子が運動することは、活性酸素の発生や物理的な損傷につながるため、不動化されていることが長期間の精子貯蔵に重要な要素であると仮説を立てた。本研究課題では、これを検証するために、受精嚢内での貯蔵時および、交尾直後の精子が受精嚢に入る時と産卵時に出る時の精子運動を観察した。

## 3. 研究の方法

### (1) 受精嚢機能の分子レベルでの解明

これまでにおこなった RNA-seq 法では、キイロシリアゲアリがゲノム未解読のため、de novo assembly したことにより塩基配列を得ている。そのため、最初にサンガーシーケンス法による配列の確認および、全長が得られていない遺伝子については RACE 法を用いた全長配列の決定をおこなった。

#### (2) オスアリの付属腺における高発現遺伝子の解析

受精嚢での RNA-seq 解析と同様に、得られた contig に対してリードを Bowtie2 によりマッピングした後、eXpress を用いてカウントした。DESeq2 により、オスの体と付属腺で発現している遺伝子を比較した。興味深い遺伝子については *in situ* hybridization をおこない、確かに付属腺で発現していることを確認した。

#### (3) 受精嚢内に貯蔵されている精子の生理状態の解明。

貯蔵されている精子が運動しているか否かを調べるために、精子貯蔵後（交尾後）1、3、5 年経過した女王アリから受精嚢を取り出し、微分干渉顕微鏡による観察と動画撮影をおこなった。さらに、交尾直後に受精嚢内に向かう際、および、産卵時に受精嚢から精子が出る際に、精子が遊泳しているか否かを調べるため、交尾後 6 時間以内の個体および産卵中の個体を解剖した。精子が不動化している場合、それが解剖の影響で劣化してしまっているのではないことを示すため、観察後、受精嚢から精子を取り出し、PBS 溶液に入れ、運動することを確認した。

### 4. 研究成果

#### (1) 受精嚢機能の分子レベルでの解明

現在、注目しているほとんどの遺伝子の全長配列を決定した。全長を決定した遺伝子が本当に当該遺伝子であるかを確認するために、5'および3'側の配列に RNA プローブを設計し、*in situ* hybridization をおこない、すでに調べられている発現パターンと比較し、一致するかを検証している。今後は、これらの配列情報を元にタンパク質を合成後、精子とともに培養し、精子の生存状態を確認することで、これらの遺伝子の重要性を確認する。また、RNA 干渉法による遺伝子発現阻害実験をおこなうための二本鎖 RNA を作成した。

#### (2) オスアリの付属腺における高発現遺伝子の解析

RNA-seq 解析の結果、付属腺 / 体の発現比が上位の 100 遺伝子中 93 遺伝子は他の生物と相同性のある遺伝子が見つからなかった。生殖にかかわる遺伝子の分子進化は性選択や性的対立などによる自然選択によってより早く生じていると考えられており、本種でもその可能性が考えられるが、ただ単純に近縁種でゲノムが解読されていないことが原因である可能性もあるため、今後慎重に調べる必要がある。さらに、同種の女王アリで見つかった受精嚢特異的な 3 遺伝子がオスの付属腺でも高発現していることが分かった。これらの遺伝子の機能は不明だが、雌雄が協調して精子を生存させるシステムが存在するのかもしれない。

#### (3) 受精嚢内に貯蔵されている精子の生理状態の解明。

受精嚢内の精子は交尾後 5 年経過していても不動化されていた。受精嚢外に取り出すと運動したことから、女王アリが精子のべん毛の機能を保ったまま精子を少なくとも 5 年にもわたり生存させていることが明らかとなった。現在、受精嚢内での精子不動化メカニズムを調べており、低 pH や浸透圧が原因ではないことを示すデータが得られた。

交尾直後の女王アリの内部生殖器官を観察したところ、精子は交尾嚢とよばれる受精嚢の手前から受精嚢内に到るまですべての位置で不動化されていた。このことから、精子は女王の腹部の筋肉の収縮などで受動的に受精嚢まで運ばれていることが予想される。一般に、多くの生き物で、メスが複数のオスと交尾をする際には、メスの体内でライバルのオス精子よりも早く

ぐように精子の形質が進化していると考えられてきた。キイロシリアゲアリ女王も複数のオスと交尾するため、この結果は予想と反するものであった。しかし、精子が運動すると精子細胞へのダメージが発生するリスクがあると考えられることから、本種では、ライバルのオス同士で競争して自身の精子の生存率を下げてしまうことより、女王アリの体内で自身の精子を長期にわたって生存させるために精子を不動化させることを優先していることが考えられる。

受精時に、受精囊から出た精子が運動するか否かを明らかにするために、産卵中の女王アリの内部生殖器内の観察も試みたが、技術的な困難さから、判断することができなかった。しかし、長期間貯蔵された精子もべん毛の機能を維持していることから、交尾から受精に至るまで一貫して精子が不動化されているとは考えにくく、受精囊から出された後は卵に向かって精子運動が生じると予想している。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

後藤 彩子 (2018) アリ科女王の長期間にわたる精子貯蔵メカニズム 比較生理化学会誌 35: 150-157

Gotoh, A., Shigenobu, S., Yamaguchi, K., Kobayashi, S., Ito, F. and Tsuji, K. (2018) Transcriptome characterization of male accessory glands in ants to identify molecules involved in their reproductive success. *Insect Molecular Biology* 27: 212-220

Gotoh, A. and Furukawa, K. (2018) Journey of sperms from production by males to storage by queens in *Crematogaster osakensis* (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Insect Physiology* 105: 95-101

後藤 彩子 (2017) 昆虫におけるメスの精子貯蔵器官の機能に関わる分子 甲南大学紀要(理工学編) 64: 1-16

Gotoh, A., Shigenobu, S., Yamaguchi, K., Kobayashi, S., Ito, F. and Tsuji, K. (2017) Transcriptome profiling of the spermatheca identifies genes potentially involved in the long-term sperm storage of ant queens. *Scientific Reports* 7:5972

[学会発表] (計 6 件)

鎌田 智也、後藤 彩子 「膜翅目昆虫における受精囊機能の進化」、第 66 回日本生態学会大会 (2019 年 3 月・神戸)

Ayako Gotoh 「Role of queen's spermatheca for long-term sperm storage in ants」、Symposium of Behavioral Ecology: Social Insects and Beyond

行動生態学シンポジウム —社会性からその先へ— (2019 年 2 月・京都)

後藤 彩子 「女王アリの長期間にわたる精子貯蔵メカニズムの解明に向けて」第 49 回 精子研究会 (2018 年 12 月・下田)

後藤 彩子 「女王アリの精子貯蔵システム～交尾後の精子の動態～」第 4 回 幹細胞・細胞分化に関する合同リトリート (2018 年 8 月・淡路)

Ayako Gotoh 「Evolution of sperm storage functions in social Hymenoptera」Advances in imaging, quantifying, and understanding the evolution of ant phenotypes (2018 年 3 月・沖縄)

後藤 彩子 「女王アリの貯蔵精子の不動化メカニズム」第 3 回 幹細胞・細胞分化に関する合同リトリート (2017 年 8 月・淡路)

[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

- 2018年9月5日、産経新聞（朝刊・23面）「女王アリ 驚きの精子貯蔵 10年以上体内に 甲南大、メカニズム研究」
- 2018年3月2日、関西テレビ放送 「よ〜いドン」となりの人間国宝さん 甲南大学岡本キャンパス<アリの生殖器の研究を...>
- 2017年10月、テルモ財団 生命科学 DOKI DOKI 研究室、第36回 「女王アリの精子貯蔵メカニズム解明を目指す」
- 2017年9月30日、朝日新聞（夕刊・9面）「挑む！ 女王アリの研究者 後藤彩子さん 長寿の秘密 数万匹飼いだる」
- 2017年9月24日、日本経済新聞（朝刊・30面）「体内に精子 10年以上保存 女王アリの遺伝子特定 甲南大など」
- 2017年8月28日、産経新聞（夕刊・3面）特集・WOMEN（ウイミン）の24hoursのコーナー
- 2017年8月14日、神戸新聞（朝刊・21面）「女王アリの生殖 鍵の遺伝子特定」
- 2017年7月21日、沖縄タイムス「女王アリがたくさん生めるのは？」
- 2017年7月21日、日刊工業新聞「甲南大、女王アリの精子貯蔵器官で働く特定遺伝子を発見」
- 2017年7月6日、北海道新聞（苫小牧版）「ニュース虫めがね」のコーナー「ヒアリってどんなアリ？」
- 2017年4月26日、神戸新聞朝刊「女王アリは体内で精子 10年超貯蔵」
- 2017年3月、公益財団法人ひょうご科学技術協会、事業報告書 Hyogo Science 「世界に先駆けて女王アリにおける精子の長期貯蔵メカニズムを探る」
- 2017年2月26日、読売新聞（朝刊）サイエンス面「サイエンス View」『18種の『汗』仲間判別』

#### アウトリーチ活動

- 後藤 彩子「小さなアリの大きなヒミツ」甲南大学キッズフェスティバル特別講演（2018年11月・神戸）
- 理系でミライ無限大！甲南サイエンス体感イベント、アリの巣の展示（2018年10月17日～11月18日・大阪）
- 後藤 彩子「女王アリとは何者か？」甲南大学夏期公開講座（2018年6月・東京）

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。