

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19264

研究課題名（和文）世代を超えて時間を測るアブラムシの季節タイマーの謎を解く

研究課題名（英文）Transgenerational seasonal timer in an aphid

研究代表者

沼田 英治（NUMATA, Hideharu）

京都大学・理学研究科・教授

研究者番号：70172749

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：エンドウヒゲナガアブラムシにおいて、短日による両性生殖虫の出現を抑制する季節タイマーは、世代数でなく日数を数えること、温度に依存するが日長には依存しないことがわかった。札幌と京都における自然の日長と温度での飼育により、季節タイマーには、温暖な春に起こり得る両性生殖虫の誘導を防ぐという生態的な意義があることが明らかになった。季節タイマーが切れた後に短日で育った個体では、季節タイマーが切れる前の個体や、切れた後に長日で育った個体と比べ、ヒストン修飾関連遺伝子の発現量が増加した。さらにオープンクロマチン領域の解析結果から、生殖多型の決定や季節タイマーにエピジェネティック修飾が関与すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

さまざまなアブラムシで個別に報告されてきた季節タイマーの生理学的性質を、エンドウヒゲナガアブラムシというモデル種で統一して明らかにした。これまでは推定にすぎなかった季節タイマーの生態的意義「春の早い時期に間違えて両性生殖虫を生み出すことを阻止する」を、世界で初めて実験的に立証した。長年の間まったく謎であった季節タイマーの分子機構について、RNA-seqやATAC-seqといった21世紀の技術を用いることで、エピジェネティック修飾が関与する可能性を提示することができた。

研究成果の概要（英文）：In the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, a seasonal timer that suppresses induction of sexual morphs by short days did not count the number of generations but that of days, and its period depended on temperature but not on photoperiod. The results of rearing aphids under natural temperatures and photoperiods showed that the seasonal timer prevents untimely emergence of sexual morphs in warm spring. Aphids with an expired seasonal timer showed transcriptional up-regulation of genes related to histone modifications. Moreover, the results of analysis in open-chromatin regions suggested that epigenetic modifications might be involved in a mechanism of maternal switching from the parthenogenetic to sexual morph production.

研究分野：動物生理学

キーワード：昆虫 生理学 時間生物学 光周性 季節適応 アブラムシ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 多くのアブラムシでは、春から夏の間、胎生メスが単為生殖によって増殖するが(以下、単為生殖虫)、秋になると短日に反応してオスと卵生メスを産み、それらが交尾して産卵する(以下、両性生殖虫)。しかし、春の早い時期の単為生殖虫を短日に移しても何世代にもわたって両性生殖虫が現れないことが知られている。これまでに、さまざまなアブラムシにおいて、世代を超えて一定期間、短日による両性生殖虫の出現を抑制する機構(季節タイマー)が存在することが、明らかになっている(図1)。とりわけ、*Megoura viciae* ではこの現象が詳細に研究され、季節タイマーによって決まる「短日による両性生殖成虫の出現が抑制される期間」は世代数ではなく日数で決まること、その進行速度に概日時計のような温度補償性はなく温度に依存すること、それまでの条件が長日であるか短日であるかに影響されないことが明らかになっている(文献)

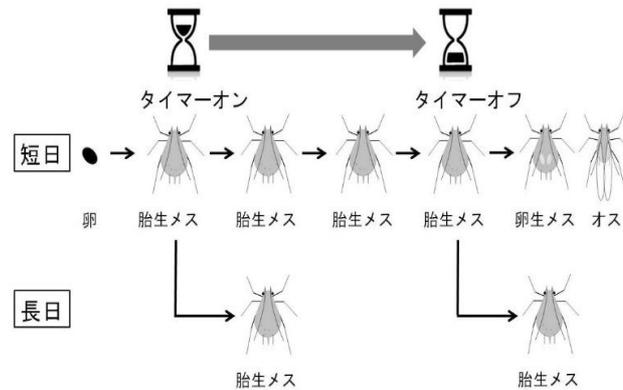


図1 アブラムシの季節タイマーの概念図

(2) これまでに知られている生物時計は、もっぱら一個体の一生の間に時間を測るもので、世代を超えて時間を測るしくみは他に知られていない。そして、この季節タイマーの分子機構はまったく研究されていない。また、季節タイマーには、「春の早い時期の短日下で間違ってもオスと卵生メスを生み出すことを阻止する役割がある」と指摘されているが、それを実証した研究はない。

(3) 季節タイマーは現象として興味深い、その分子機構に挑む方法のない状態が長く続いた。近年になってトランスクリプトーム解析が容易にできるようになったほか、ホソヘリカメムシにおいて光周性に時計遺伝子が関わっていることが RNA 干渉によって明らかになった(文献)。これより、時計遺伝子が季節タイマー関与する可能性も考えられる。さらに、キョウソヤドリコバチでは、母親の経験した光周期が子世代に休眠をもたらす現象において、DNA のメチル化が重要な役割を果たしていることが示され(文献)、世代を超える現象に関係するエピジェネティックな変化を研究することが可能になった。

2. 研究の目的

本研究は、アブラムシの世代を超えて一定期間、短日による両性生殖成虫の出現を抑制する季節タイマーについて、以下の3つの疑問に答えることを目的とする。

季節タイマーは春先に短日による両性生殖虫の出現を阻止するか？

季節タイマーにどんな遺伝子が関係しているか？

季節タイマーにエピジェネティックな変化が関係しているか？

3. 研究の方法

(1) 対象とする昆虫の種と系統

本研究ではエンドウヒゲナガアブラムシ *Acyrtosiphon pisum* の札幌系統を対象とする。その理由は、まず、本種は全ゲノムが判明しており、さまざまな研究に活用されているモデル生物であること(文献)。さらに、この系統では明瞭な光周性の存在が既に明らかになっていることである(文献)。

(2) 実験室飼育実験

エンドウヒゲナガアブラムシの季節タイマーが、*M. viciae* などのアブラムシで報告されているさまざまな生理学的性質をすべて示すかどうかを検証するため、さまざまな光周期と温度のもとで幹母(越冬した卵が孵化して生まれた単為生殖虫)とその子孫を継代飼育し、両性生殖虫がいつ出現するのかを観察する。

(3) 自然条件飼育実験

幹母と、それから長い期間単為生殖による世代を重ねて季節タイマーがオフになった単為生殖虫を、春に、この系統の本来の生息地である札幌と、それより温暖な京都において自然の温度、光条件で飼育し、それらから生まれた子世代に両性生殖虫が出現するかどうかを調べる。

(4) RNA 干渉による時計遺伝子の発現抑制

RNA 干渉によって特定の遺伝子の発現抑制を行うことは、近年、遺伝子改変が容易でない生物における遺伝子レベルの研究を著しく発展させてきた。エンドウヒゲナガアブラムシでも、RNA 干渉を行った論文が出ているが（文献 ）、わが国ではまだ成功例を見ない。そこで、まず本種における RNA 干渉の方法を確立し、そののちに時計遺伝子の光周性と季節タイマーへの関与について検討する。

(5) トランスクリプトーム解析

幹母の産んだタイマーオンの単為生殖成虫と、単為生殖で長い期間世代を繰り返したタイマーオフの単為生殖虫を、長日および短日下で飼育する。これらの虫の季節タイマーや、光周性の中枢が存在すると考えられる頭部から RNA を抽出し、RNA-Seq により発現量に違いがみられる遺伝子を網羅的に探索し、データベースを使ってそれらの遺伝子の機能を推定する。

(6) クロマチン構造の網羅的解析

世代を超える現象が DNA メチル化、ヒストン化学修飾などエピジェネティックな変化をともなう可能性は高い。そこで、オープンクロマチン領域を網羅的に解析する ATAC (Assay for Transposase-Accessible Chromatin)-seq を行う。

(7) エピジェネティックな修飾の薬理的抑制

DNA メチル化を阻害する 5-azacytine、あるいはヒストンアセチル化を阻害する trichostatin A を幼虫に摂食させ、それが季節タイマーの進行にどう影響するのかを調べる。

4. 研究成果

(1) 季節タイマーの生理学的性質

季節タイマーは幹母の孵化から 2 ~ 3 カ月の間、世代数にかかわらず両性生殖虫の産出を抑制した。この結果は、本種の季節タイマーが幹母からの世代数でなく日数を数えることを示している。さらに、季節タイマーが測る期間の長さは温度に依存する一方で、日長には依存しなかった（図 2）。したがって、本種の季節タイマーは *M. viciae* など他のアブラムシで過去に報告された性質をすべて備えていることが明らかになった。

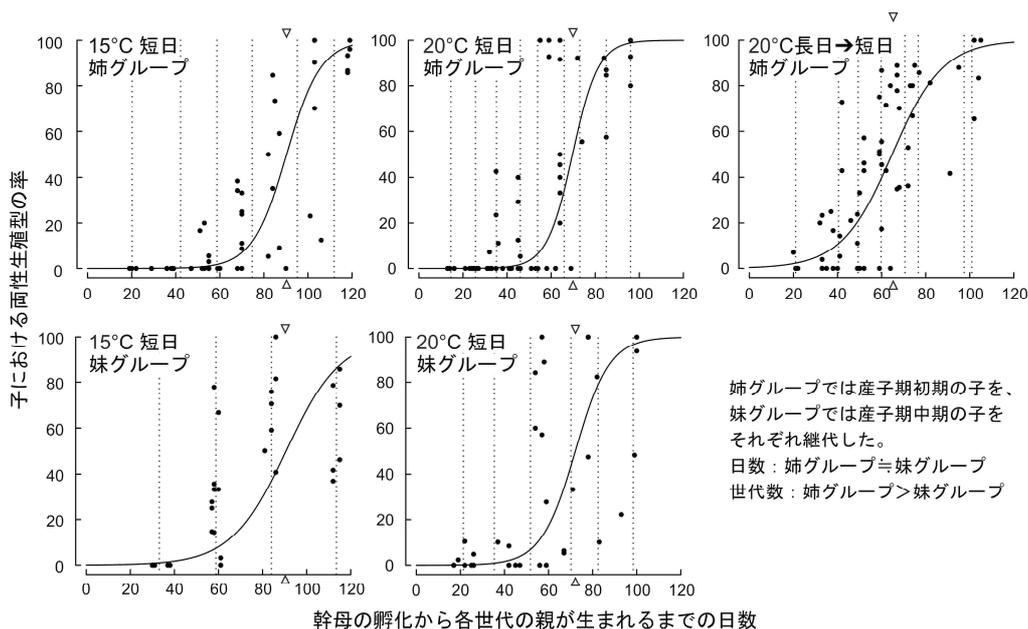


図 2 幹母の孵化から両性生殖成虫の出現に要する期間

(2) 季節タイマーの生態的意義

本来の生息地である札幌の春には、季節タイマーがオン・オフにかかわらず単為生殖虫のみを産んだ。これに対し、より温暖な京都の春には、季節タイマーがオンの個体が単為生殖虫のみを産んだ一方、季節タイマーがオフの個体は両性生殖虫もある程度産んだ。しかし、札幌では季節タイマーがオン・オフにかかわらず単為生殖虫のみを産んだ。これらの結果から、季節タイマーは温暖な春に起こり得る間違っただ両性生殖虫の出現を防ぐことが明らかになった。

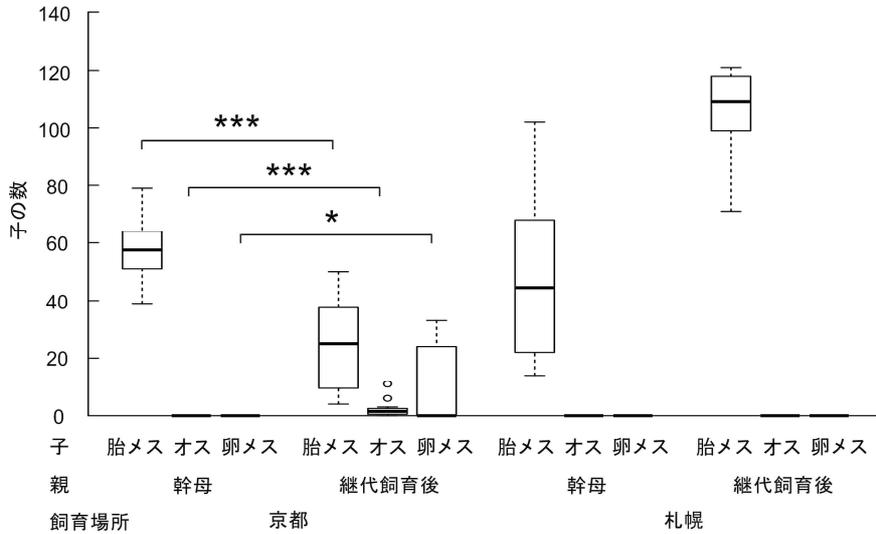


図3 自然の日長と温度の下で育てられた親が産んだ子の数

(3) 時計遺伝子の役割

時計遺伝子 *period* および *cycle* の二本鎖RNAを、3齢幼虫の腹部への注射あるいは1齢幼虫の摂食により体内へ導入したが、いずれも子の生殖型への明瞭な影響は見られなかった。また、対象とする遺伝子の発現量にも明瞭な減少は見られなかった。したがって、本種において、この方法によるRNA干渉は有効でなく、RNA干渉により時計遺伝子の役割を調べることはできなかった。

(4) 遺伝子発現レベルの網羅的比較

季節タイマーが切れた後に短日で育った個体は、季節タイマーが切れる前の個体や、切れた後に長日で育った個体と大きく異なる遺伝子発現パターンを示した(図4)。発現量が変動した遺伝子についてGO解析による機能推定を行ったところ、季節タイマーが切れた後に短日で育った個体で高発現した遺伝子群(図4中のA)に、ヒストン修飾を調節する遺伝子が多く含まれてい

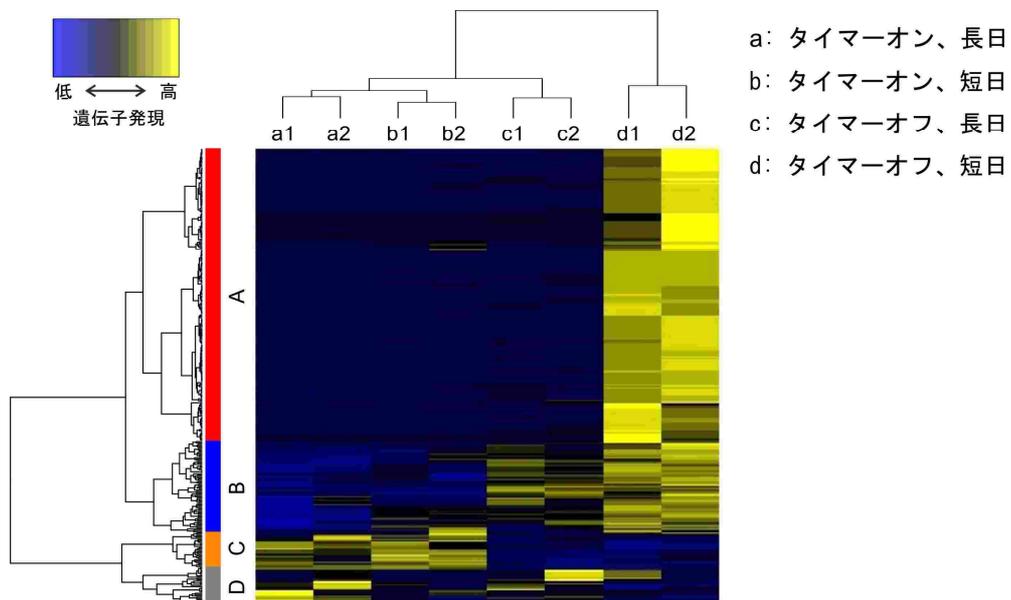


図4 季節タイマーと日長に依存した遺伝子発現パターン

た。これらの結果から、アブラムシの生殖多型にエピジェネティック修飾が関与すると考えられる。

(5) オープンクロマチン領域の網羅的解析

まず ATAC-seq ライブラリを作成し、次世代 DNA シーケンサーにより塩基配列データを取得した。共生細菌のゲノム由来のものを除いてアブラムシのゲノムに由来する配列を選別したうえで領域の解析を行った結果、季節タイマーが切れることでオープンになる転写調節領域が検出された。このことから、季節タイマーの進行がエピジェネティック修飾の変化をともなうことが示された。しかし、塩基配列データの処理の過程で信頼性の低いデータを除いたため、解析に用いることができたデータは全体のごく一部であった。ライブラリ作製やデータ解析方法に改善の余地がある。

(6) エピジェネティックな修飾の季節タイマーへの関与

5-azacytizineあるいはtrichostatin Aを1齢幼虫に摂食させたが、子世代の生殖型への明瞭な影響は見られなかった。さらに高い薬剤濃度では子の発生異常が増加したため、この方法はエピジェネティックな修飾の関与を検証するに不適であることがわかった。

< 引用文献 >

Lees, A.D. (1960) The role of photoperiod and temperature in the determination of parthenogenetic and sexual forms in the aphid *Megoura viciae* Buckton—II. The operation of the “interval timer” in young clones. *J. Insect Physiol.* **4**: 154–175.

Ikeno, T., Tanaka, S.I., Numata, H. and Goto, S.G. (2010) Photoperiodic diapause under control of circadian clock genes in an insect. *BMC Biol.* **8**: 116.

Pegoraro, M., Bafna, A., Davies, N.J., Shuker, D.M. and Tauber, E. (2016) DNA methylation changes induced by long and short photoperiods in *Nasonia*. *Genome Res.* **26**: 203-210.

IAGC (2010) Genome sequence of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *PLoS Biol.* **8**: e1000313.

Kanbe, T. and Akimoto, S.I. (2009) Allelic and genotypic diversity in long-term asexual populations of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* in comparison with sexual populations. *Mol. Ecol.* **18**: 801–816.

Mutti, N.S., Park, Y., Reese, J.C. and Reeck, G.R. (2006) RNAi knockdown of a salivary transcript leading to lethality in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *J. Insect Sci.* **6**: 38.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsuda, N., Kanbe, T., Akimoto, S. and Numata, H.	4. 巻 101
2. 論文標題 Transgenerational seasonal timer for suppression of sexual morph production in the pea aphid, <i>Acyrtosiphon pisum</i> .	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Insect Physiology	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jinsphys.2017.06.008	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 Matsuda, N., Kanbe, T., Endo, J., Akimoto, S. and Numata, H	4. 巻 45
2. 論文標題 Suppression of autumnal sexual morph production in spring by a seasonal timer in an aphid.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Physiological Entomology	6. 最初と最後の頁 未定
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/phen.12322	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hideharu Numata
2. 発表標題 Adaptation to seasonal changes in insects.
3. 学会等名 Sapporo Symposium on Biological Rhythm in 2018（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松田直樹・沼田英治・宇高寛子
2. 発表標題 エンドウヒゲナガアブラムシの季節タイマーに関連した発現変動遺伝子の探索
3. 学会等名 第63回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松田直樹・沼田英治・神戸崇・秋元信一
2. 発表標題 エンドウヒゲナガアブラムシの世代を超えた季節タイマーの性質
3. 学会等名 第23回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松田直樹・神戸崇・秋元信一・沼田英治
2. 発表標題 季節タイマーが切れたエンドウヒゲナガアブラムシは春に両性生殖型を産む
3. 学会等名 第62回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松田直樹・神戸崇・遠藤淳・秋元信一・沼田英治
2. 発表標題 エンドウヒゲナガアブラムシの季節タイマーは春に両性生殖型の産出を防ぐ
3. 学会等名 日本昆虫学会第79回大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Matsuda, N. and Numata, H.	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Hokkaido University Press	5. 総ページ数 97-105
3. 書名 Transgenerational seasonal timer in aphids. In: Biological Rhythms: Proceedings of the Sapporo Symposium on Biological Rhythm July 14-15, 2018. Honma, K. and Honma S. (eds.)	

〔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
研究分担者	神戸 崇 (Kanbe Takashi) (40648739)	北海道大学・農学研究院・専門研究員 (10101)	
研究協力者	松田 直樹 (MATSUDA Naoki)	京都大学・理学研究科・大学院生 (14301)	
研究協力者	秋元 信一 (AKIMOTO Shin-ichi) (30175161)	北海道大学・農学研究員・教授 (10101)	
研究協力者	宇高 寛子 (UDAKA Hi roko) (60534609)	京都大学・理学研究科・助教 (14301)	
研究協力者	遠藤 淳 (ENDO Jun)	京都大学・理学研究科・研究員 (14301)	