

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14796

研究課題名(和文) ジャイアントミルワームにおける混み合いによる変態制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation mechanisms of metamorphosis depending to crowded condition

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)：ジャイアントミルワームは、集団が高密度状態だと変態のタイミングが抑制される。密度を操作した飼育法により、本種の幼虫は、隔離状態によって始まるタイマーを体内に保有しており、高密度条件はこのタイマーをストップすることで、変態を遅延していることがわかった。高密度による変態の遅延は、昆虫の脱皮ホルモンの上昇が起これないことに起因していた。関与する遺伝子群を明らかにするため、RNAシーケンス解析を行い、隔離や高密度に应答して発現が上昇する遺伝子を特定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ジャイアントミルワームの密度に依存した変態の抑制は、高密度で起こりやすい共食いを避ける機構である。密度は自身だけでなく他の個体の行動に依存して変動しうる。本研究は、周囲の密度に合わせて自身の成長を適切にフィットさせるのに必要な遺伝子とは何かを明らかにするものである。

明らかになった遺伝子は、昆虫の成長制御に関わるものであり、農業で昆虫の成長制御剤のターゲットになりうる。実際に、明らかになった遺伝子の中に、odorant binding proteinが入っており、これは殺虫剤のターゲットとして注目されている。

研究成果の概要(英文)：Metamorphic transition in *Zophobas atratus* is dependent on population density. We showed that larvae of *Z. atratus* maintained the information of isolated experience rather than canceled the experience during the re-crowding. In other words, larva of this species possess the timer program, which starts responding to isolated condition but stops responding to crowded condition. The present study suggests that regulation of ecdysteroid level rather than juvenile hormone is more crucial in the density dependent metamorphosis in *Z. atratus*. Highly expressed genes responding to isolated condition or crowded condition were identified in this study by RNA sequencing.

研究分野：生態発生学

キーワード：変態 密度依存 昆虫 RNA-seq 発生の可塑性

1. 研究開始当初の背景

生物は様々な環境変化に適応するように、行動、発生、生理状態を変化させることができる。温度、飢餓などの耐性に関する生理および分子機構は様々な生物で明らかになりつつある(例えば Grutenko and Raushenbach 2008)。一方で、そのような外的要因だけでなく、天敵、競争者、棲息密度などの生物的要因も重要な外的要因になりうる。ヒトの社会でも人間関係が様々な影響を及ぼすことでも容易に想像できる。生物は、自分以外の他個体由来する悪影響をどのような生理発生機構を介して適応的に回避するのだろうか。

昆虫には完全変態昆虫と呼ばれ、幼虫から蛹を経て成虫になるグループが存在する。ジャイアントミルワームを代表とするいくつかの甲虫類では、高密度条件では幼虫から蛹への変態が抑制され、幼虫から幼虫への脱皮を繰り返すが、隔離により変態のスイッチが入る(Tschinkel and Willson 1971)。ジャイアントミルワームは高密度状態では蛹期に他の幼虫に捕食される。つまり、高密度での変態抑制は捕食から逃れるための生存戦略である。この現象は、高密度によって生じる悪影響を発生学的に回避する機構を理解する上で有用なモデルケースである。

2. 研究の目的

本研究では、ジャイアントミルワームを用いて混み合いを変態の切り替えに反映する分子発生機構を明らかにすることを目的とする。

変態の制御には昆虫のホルモン(幼若ホルモンとエクダイソン)が中心的な役割を担うが、本種でも同様である(Quenedey et al 1995)。本研究では、密度の違いが、どのような生理状態の違いに反映され、変態の開始を調節しているのかを明確にする。ジャイアントミルワームは研究に使われる混み合いにより変態抑制の現象が同様に知られるカシミアルコクヌストモドキより極めて大型で、形態組織観察やサンプリングに適していると同時に、RNAi に必要な注射も容易に行うことができるため材料として選択した。

3. 研究の方法

A) 密度を操作する飼育系の開発

本研究を遂行するためには、密度の違いによって変化する幼虫の生理状態をクリアに検出する必要がある。高密度で飼育した幼虫(ストック)を隔離条件に移し、再び高密度に移す飼育系をデザインした。これにより、隔離から高密度に移った際に変動する生理状態を検出できると考えた。

B) 網羅的な遺伝子発現解析による関連する遺伝子群の特定

A) で確立した飼育系を利用して、隔離条件を維持し変態を誘導した幼虫と再度高密度に移した幼虫との間で、RNA シーケンス解析による網羅的な遺伝子発現解析を行った。これにより、関係する遺伝子群を一気に特定することを試みた。

C) ホルモンによる変態制御機構

A) で確立した飼育系を利用して、経時的に幼虫をサンプリングし、ホルモン関連遺伝子の発現解析や、昆虫ホルモンの測定を行った。

4. 研究成果

A) 密度を操作する飼育系の開発

ジャイアントミルワームの幼虫が隔離してから 8-10 日で変態を開始することを明らかにした(当研究室の条件下)。隔離から 1-5 日後に再び高密度条件に移すと、1-4 日後では完全にその後の変態を抑制した。これにより隔離から 4 日後までに高密度に移せば、変態を抑制できる飼育系を確立できた。このことは、隔離から変態までの間の途中で受けた高密度刺激によって、変態が抑制されることを示唆しており、この時に何らかの変態抑制に必要な生理状態の変化が起きていると予想される。

高密度条件の期間の長さの違いが蛹化開始のタイミングに与える影響を調べるために、集団飼育から 2 日間隔離後にそれぞれ 2、4、6 日間一時的に高密度にし、再び隔離する実験を行った。結果、2、4、6 日間一時的に高密度にしたすべての条件で、隔離のみの場合と比べて、蛹化開始が有意に遅延した。また蛹化開始までの日数は高密度にいた期間のみ遅延することが回帰分析により明らかとなった。これらのことから蛹化開始に必要な隔離日数は一時的な高密度の期間に関わらず一定であることが分かった。次に、高密度を受ける前の隔離期間の長さの違いが蛹化開始に与える影響を調べるため、集団飼育からそれぞれ 1、2、3、4、5 日間隔離後、2 日間一時的な高密度にし、再び隔離する実験を行った。結果、最初に 1-5 日間隔離したすべての条件で、隔離のみの場合に比べ、変態開始日数が有意に遅延したが、1-5 日間隔離の各条件間では蛹化開始の日数に有意な差が見られなかった。このことは

再隔離後にどのタイミングで高密度を感受しても、蛹化に必要な隔離日数は一定であることがわかった。以上の結果より、ジャイアントミルワームが密度環境の変化にさらされても、結局蛹化開始に必要な隔離期間は変わらず、組み合わせの期間分だけ蛹化が遅延することが明らかとなった。この現象は、隔離にตอบสนองして進み、かつ高密度にตอบสนองして停止するタイマーの存在によって説明可能である。本種において野外では成長の進んだ幼虫は集団から離れる傾向にある。このタイマーは、集団から離れたあとも不連続的に同種と遭遇する可能性がある自然環境下で、速やかに蛹化することに有利に働くと考えられる。

B) 網羅的な遺伝子発現解析による関連する遺伝子群の特定

再度高密度に移した幼虫と隔離状態を維持した幼虫との間で、RNA シーケンス解析による網羅的な比較発現解析を行った。その結果、再度高密度に移した幼虫と隔離維持の幼虫のどちらかで有意に高い発現を示した遺伝子を多数特定した。高密度において、複数の odorant binding protein 遺伝子 (*obp*) が有意に高い発現を示した。このうちの一つの *obp* を RNAi によるノックダウンをした後、高密度条件で飼育した結果、低確率ではあるが変態を開始する幼虫が存在した。このことからこの *obp* が高密度によって変態開始の遅延に関係することが明らかとなった。一般的に *obp* は触角で発現するニオイ受容に関わるタンパク質をコードする遺伝子である。ただ、複数の *obp* の遺伝子コピーが存在するカイコにおいては、発現組織が調べられており、触角以外で発現する *obp* が存在することが示されている。本研究で明らかになった *obp* もニオイ受容とは異なる機能により、変態開始を遅延している可能性が考えられる。

C) ホルモンによる変態制御機構

これまでに、ジャイアントミルワームでは幼若ホルモンやエクダイソンにより変態が調節されていることが示唆されていた。本研究では、A) で確立した飼育系を利用して、これらのホルモンに関する遺伝子発現解析やホルモン量の測定を行った。

幼若ホルモン量の上昇は一般的に変態を抑制する。*Krüppel homolog 1* 遺伝子 (*Kr-h1*) は、幼若ホルモンの量にตอบสนองして発現が変動する遺伝子である (Minakuchi et al., 2009; Kayukawa et al., 2012)。リアルタイム定量PCRによる発現量解析の結果、この *Kr-h1* は隔離および高密度条件で発現が変動しなかった。このことは、密度に依存した変態の調節には幼若ホルモンが影響しないことを示唆する。高密度条件で飼育中の幼虫で *Kr-h1* の RNAi によるノックダウンを行ったが、変態が誘導されることはなかった。このことは、幼若ホルモンが密度に依存した変態抑制に関わらないことを支持する。

幼若ホルモン量の低下に伴い、脱皮ホルモンが上昇すると一般的に変態は促進される。ジャイアントミルワームの脱皮ホルモン (20E) のตอบสนอง遺伝子について、リアルタイム定量PCRによる発現量解析を行った。その結果、隔離条件に比べ、高密度条件においてこれらの遺伝子の発現が低下する傾向にあった。この発現量解析の結果を裏付けるように、20Eの量は、高密度条件で低下していた。さらに、高密度条件の幼虫に、20Eを体内に注入すると、高密度条件にも関わらず変態が促進された。以上の結果から、高密度は幼虫の体内の20Eの低下を誘導することで、変態を遅延していることを突き止めた。

当初、高密度にตอบสนองして幼若ホルモン関連遺伝子の発現上昇と、20E関連遺伝子の発現の低下が起きることを予想していた。しかし、実際は、20Eの増減がこの密度に依存した変態抑制に特に重要であることが明らかとなった。

上述した *obp* と 20E の増減との関係は不明である。今後は、明らかになった因子の制御関係を明確にしていくことで、密度に依存した変態抑制の機構を解明していく。

< 引用文献 >

Gruntenko, N.E., Rauschenbach, Y. 2008. Interplay of JH, 20E and biogenic amines under normal and stress conditions and its effect on reproduction. *J. Insect Physiol.* 54, 902-908.

Kayukawa, T., Minakuchi, C., Namiki, T., Togawa, T., Yoshiyama, M., Kamimura, M., Mita, K., Imanishi, S., Kiuchi, M., Ishikawa, Y., Shinoda, T., 2012. Transcriptional regulation of juvenile hormone-mediated induction of *Krüppel homolog 1*, a repressor of insect metamorphosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 11729-11734.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1204951109>.

Minakuchi, C., Namiki, T., Shinoda, T., 2009. *Krüppel homolog 1*, an early juvenile hormone-response gene downstream of Methoprene-tolerant, mediates its antimetamorphic action in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Dev. Biol.* 325, 341-350.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.10.016>.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Masuoka Y., Yaguchi H., Toga K. Shigenobu S., Maekawa K.	4. 巻 14
2. 論文標題 TGF signaling related genes are involved in hormonal mediation during termite soldier differentiation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1007338
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Masuoka Y., Toga K., Nalepa CA., *Maekawa K.	4. 巻 209
2. 論文標題 A crucial caste regulation gene detected by comparing termites and sister group cockroaches.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genetics	6. 最初と最後の頁 1225-1234
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Matsunami M, Nozawa M, Suzuki R, Toga K, Masuoka Y, Yamaguchi K, Maekawa K, Shigenobu S & Miura T.	4. 巻 28
2. 論文標題 Caste-specific microRNA expression in termites: insights into soldier differentiation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Insect Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 86-98
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Kouhei Toga, Yuri Homma, Toru Togawa	4. 巻 473
2. 論文標題 Control of the ecdysteroid level plays a crucial role in density-dependent metamorphosis in the giant mealworm beetle <i>Zophobas atratus</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental biology	6. 最初と最後の頁 71-79
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ydbio.2021.01.014	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 Yuri Homma, Kouhei Toga, Takaaki Daimon, Tetsuro Shinoda, Toru Togawa	4. 巻 530
2. 論文標題 A mitochondrial phosphatase PTPMT1 is essential for the early development of silkworm, Bombyx mori.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and biophysical research communications	6. 最初と最後の頁 713-718
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.07.124	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 梅 浩平, 外川 徹
2. 発表標題 ツヤケシオオゴミムシダマシにおける組み合わせによる変態抑制に関わる遺伝子の探索
3. 学会等名 日本動物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅 浩平, 外川 徹
2. 発表標題 組み合わせにより変態が抑制されるツヤケシオオゴミムシダマシにおけるホルモン関連遺伝子の発現解析
3. 学会等名 日本動物学会関東支部大会 第71回
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>日本大学文理学部教員紹介 http://kenkyu-web.cin.nihon-u.ac.jp/Profiles/129/0012835/profile.html</p>
--

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------