

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：12201

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19338

研究課題名（和文）侵略アリで進化した近親交配の回避をもたらす繁殖様式における遺伝子基盤の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of the reproductive system for avoiding inbreeding evolved in the invasive ant

研究代表者

宮川 一志（Miyakawa, Hitoshi）

宇都宮大学・バイオサイエンス教育研究センター・准教授

研究者番号：30631436

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：ウメマツアリは新女王（雌）は母系のみ、雄は父系のゲノムのみ受け継ぎ生産される（雄性発生）ため、雌雄間に実質的な遺伝子交流がなく近親交配でも不妊雄は生じない。本研究ではRNA-seqなどの分子生物学実験に必要となる、1個体からのRNA抽出方法、DAPI染色で産卵直後の前核の様子を観察する方法、抗チューブリン抗体を用いた免疫染色で分裂装置を観察する方法、核酸染色試薬のマイクロインジェクションによる核のライブ観察手法などの確立に成功した。本研究によって、父系母系双方の繁殖個体の出現過程をワーカー卵と比較解析することが可能となり、特殊な繁殖様式の進化遺伝学的背景を明らかにする実験基盤が整った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アリ類は世界中に分布しており、IUCNが公表した世界の侵略的外来種ワースト100のうち5種を占めるほど生態系や人への影響が大きい生物種である。日本でもヒアリの侵入・拡大が問題になり、昨年はウメマツアリ同様に雄性発生を行う侵略的外来種コカミアリの国内初侵入も報告された。侵略種は繁殖力や他種との競争力の強さ、環境適応能力に注目が集まるが、本研究で取り扱った雄性発生のような近親交配の回避に繋がる形質もまた、アリ類の管理施策を行う上で重要な要素である。本研究を継続し雄性発生に関わる遺伝的変異が明らかになれば、他種での保存性の確認や、近親交配の回避に繋がる形質の進化にも迫ることができるだろう。

研究成果の概要（英文）：In *Vollenhovia emeryi*, female queens are produced by inheriting only the maternal genome (parthenogenesis) and males by inheriting only the paternal genome (androgenesis), so there is no substantial genetic exchange to produce reproductives between the sexes and inbreeding does not produce diploid sterile males. In this study, we established a method for extracting RNA from individuals necessary for molecular biology experiments such as RNA-seq, observing the pronucleus immediately after spawning by DAPI staining, observing the mitotic apparatus by immunostaining with an anti-tubulin antibody, and live nuclear observation using microinjection of a nucleic acid staining reagent. This research enables analysis of the developmental processes of both reproductives (queens and males) in comparison with worker eggs, establishing an experimental basis for understanding the evolutionary genetic background of this unique reproductive strategy.

研究分野：環境生理学

キーワード：雄性発生 ウメマツアリ 近親交配回避 染色体挙動 繁殖戦略

### 1. 研究開始当初の背景

アリの性別は単一の遺伝子座で制御され、二倍体ヘテロ型は雌、単数体ヘミ型は雄になる。この単数倍体生の性決定機構は雌が受精卵(雌)か未受精卵(雄)を産み分けられる一方、近親交配で子の50%が不妊雄(性決定遺伝子座がホモ型の雄)になる弱点がある(図1a)。しかし、日本から米国への侵入したウメツアリやコカミアリなど複数の侵略種では、遺伝的多様性が非常に低いまま侵入地で集団を拡大し続けている。これらの種は近親交配の回避が可能な特殊な繁殖様式(図1b)を独立に獲得し、不妊のワーカー(働きアリ)は有性的に、新女王(雌)は母系のみ、雄は父系のゲノムのみ受け継ぎ生産されるため、雌雄間に実質的な遺伝子交流がなく兄妹間の交尾でも不妊雄は生じない(図1b)。

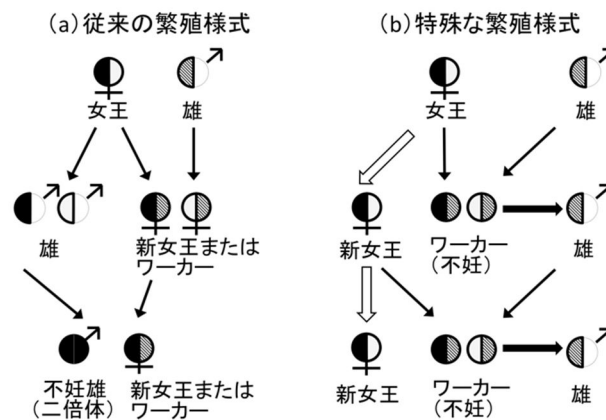


図1(a)従来の繁殖様式. 近親交配で二倍体不妊雄が生じる弱点がある。(b)特殊な繁殖様式. 理論上、近親交配で二倍体不妊雄は生じない。

特殊な繁殖様式が報告された2005年当初は、雌ゲノム消失の原因が父系因子やウイルス感染だと予想された(Fournier et al. 2005 Nature)。しかし、従来の繁殖様式(図1a)と特殊な繁殖様式(図1b)の両方を持つコカミアリの交配実験の結果、雌ゲノムの消失が雌自身の形質であることや、2)アリ類のウイルス感染は繁殖様式に限らず確認されたことから、進化の鍵は雌にあると考えられるようになった。私たちを含む国内外の研究者は、アリ類で蓄積されているゲノムやトランスクリプトームデータを用いて、繁殖様式の異なる種間や集団間の比較により、繁殖様式の特殊化をもたらす責任遺伝子候補の選択を試みた。しかし、バルクデータの解析からは特定の遺伝的変異を見つけることはほぼ不可能であった。雌雄卵のみを産ませることはできないため、特殊な繁殖様式の遺伝学的基盤だけでなく胚発生過程の継時的な観察もできず、特殊な繁殖様式の細胞学的理解は進まなかった。今日まで研究が停滞した理由は社会性昆虫であるアリ類特異的な障壁のためである。アリ類の研究は社会性に注目したものが中心で、モデル生物では数十年前に解明された胚発生や性決定に関する研究や実験手法の確立が進んでいない。また、社会性生物の卵や幼虫の単独飼育は困難で、コロニー維持に必須なワーカー卵は常に生まれるため、新女王卵や雄卵生産だけを誘導できないという難しさがある。

### 2. 研究の目的

ウメツアリ *Vollenhovia emeryi* の雄卵発生に伴う雌ゲノム消失や、単為生殖による新女王卵形成を制御する分子機構およびその進化過程の解明を最終目標とし、そのために必要な発生過程のステージングや遺伝子発現解析手法、初期胚における染色体挙動の解析手法といった実験手法を確立する。

### 3. 研究の方法

#### (1) ウメツアリ雌雄ゲノムのリシークエンス

微量組織や細胞から個体の性の判定に用いる遺伝マーカーの作成や、分子生物学的手法の適用に有用となる正確なゲノム配列データを作成するために、近親交配で生じた雌および二倍体雄をそれぞれ50個体からDNAを抽出し、ゲノムリシークエンスを行った。シークエンスはNovaSeq6000を用いて取得し、得られたリードはウメツアリドラフトゲノム(Miyakawa & Mikheyev 2015)にマップした。

#### (2) DAPI染色による初期発生卵の核の観察

産卵2時間以内の卵をブリーチ液に浸して卵膜を除去し、PBTで3回洗浄した。固定液4%PFA:Heptane = 1:4)に置換し、室温で30分間固定した。固定後の卵をHepatan:MeOH = 1:1で洗浄し卵黄を取り除いた。その後100% MeOHで洗浄3回し、70% MeOH/PBT 50% MeOH 30% MeOH PBTと置き換え、最後にPBTで3回した後に1 μg/mL DAPI/PBTで15分間染色した。染色後VECTOR SHELDEDで封入し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

#### (3) 抗-チューブリン抗体を用いた初期発生卵の分裂装置の観察

上記(2)の手順で固定、洗浄、PBTへの置換をした後に、ブロッキング液(5% BSA/PBT)で2時間、4でブロッキングした。ブロッキング液で400倍に希釈した一次抗体(抗-チューブ

リン抗体)で4℃で一晩反応させた。PBTで10分×2回、4℃で洗浄した後に、ブロッキング液で500倍に希釈した二次抗体(Alexa Fluor 488 標識抗ウサギ IgG 抗体)で4℃で一晩反応させた。PBTで10分×2回、4℃で洗浄した後に(2)と同様の手順でDAPI染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

#### (4) OliGreen dye のマイクロインジェクションによる初期発生卵の核のライブ観察

産卵2時間以内の卵をスライドガラス上に並べ、シリカゲルを敷き詰めた箱内に30分間入れて乾燥させた。OliGreen dyeをPEM80(80mM PIPES, pH6.8, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM EGTA)で3倍希釈したものを、ガラスニードルとマイクロインジェクターを用いて卵にインジェクションし、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

#### (5) 産卵から羽化までの発生過程のステージング

飼育コロニーから幼虫を無作為に100匹サンプリングし、実体顕微鏡下で写真を撮影して頭幅と体長を測定した。また産卵2時間以内の卵をワーカーのみを入れた新しい巣に移し、毎日観察することで発生にかかる時間を計測した。

### 4. 研究成果

#### (1) ゲノム中の性特異的領域の決定

雌雄のシークエンスデータのマッピング結果から、性の判別に使用できるSNPマーカーを複数見出すことができた。また、特異な繁殖様式との関連が疑われる性特異的なゲノム領域を同定した。

#### (2) 固定初期発生卵における核の観察系の確立

DAPI染色により発生初期の雌性前核の様子を観察することに成功した。雌性前核は卵表面付近に位置し、産卵後およそ1時間の時点で既に精子核と融合していることが明らかとなった(図2)。雄卵における雌ゲノムの消失はこれ以前に生じることが予想されるため、その様子の観察には産卵後数分の極めて早い時期の卵を観察する必要があると考えられる。

#### (3) 固定初期発生卵における分裂装置の観察系の確立

(2)のDAPI染色に加えて抗-チューブリン抗体を用いた免疫染色で分裂装置の様子を観察することに成功した(図3)。この手法を用いて産卵後数分の極めて早い時期の卵を観察することで、雌ゲノム消失時に雌ゲノムを移動させる力学的なメカニズムに迫ることができると期待される。

#### (4) 初期発生卵の核のライブ観察系の確立

初期卵に対するマイクロインジェクション実験系の確立に成功した。確立した技術を用いて高感度核酸染色試薬のOliGreen dyeを卵内に導入したところ、核の様子の時間変化を観察することができた(図4)。分裂装置とのライブ二重染色を行うべく、蛍光標識チューブリンをOliGreen dyeとともに導入する実験も試みたが、核の蛍光像しか得られなかった。ライブ標識可能な他のチューブリン染色方法を検討する必要がある。また、現在の手法は採卵から観察まで最短でも1時間ほどはかかってしまうため、その間に雌ゲノム消失などの観察したいイベントは終了してしまう可能性が高い。そのため、今後は観察までの手順を全て氷上で行うことで発生を遅らせるなどの手順を踏む必要があると考えられる。

#### (5) 発生過程のステージング

雌雄の形態形成過程を理解するために、産卵から羽化までのステージングをおこなった。まず、女王や雄、ワーカーなどそれぞれの形態的特徴がつけられる幼虫期に着目し、ウメマツアリの幼虫期がいくつの齢で構成されるかを

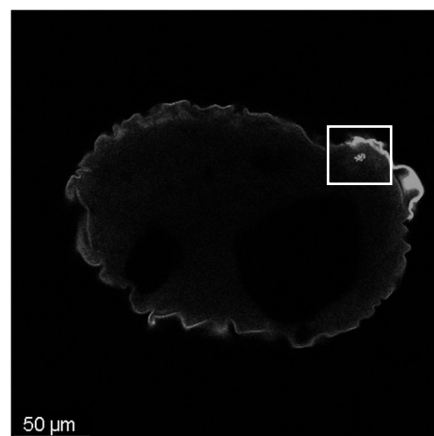


図2 初期発生卵のDAPI染色像。卵表面付近に雌性前核が観察できる(枠内)。

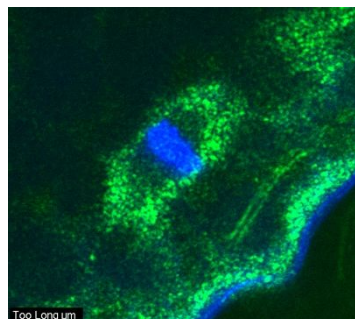


図3 初期発生卵のDAPIとチューブリンの二重染色像。

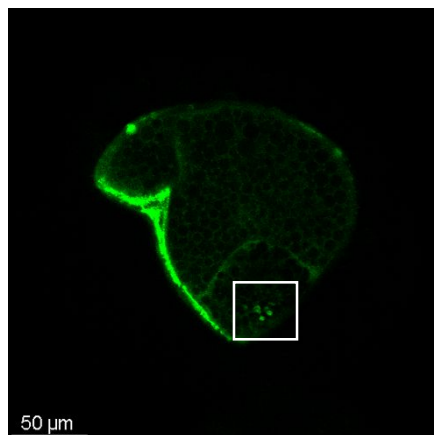


図4 初期発生卵の核のライブ染色像。分裂途中の核が観察できる(枠内)。左上の輝点はインジェクションした部位。

調べた。アリ類では一般的に齢の進行と頭幅が最もよく相関して成長することが知られているため、頭幅と体長の分布から齢を推定可能か検討した。しかしながら予想外なことに、多くのアリ類と異なりウメマツアリの頭幅は齢と共に増大する傾向は見られず、むしろ幼虫期を通じてほとんど変化しないことが明らかとなり、他のアリ類とは全く異なる方法でステージングを行う必要があることが判明した。そこで、産卵直後から同じ個体を追跡観察し続けることで、発生のタイムスケールが以下のようなものであることを明らかにした。

卵の期間：247～257 時間（約 10 日間）  
幼虫期間：650～737 時間（= 27～31 日間）  
前蛹期間：72～113 時間（= 3～5 日間）  
蛹の期間：391 時間（約 16 日間）

これらに加えて、本研究では RNA-seq 等に必要となる 1 個体を部位ごとに分けた微小組織から RNA を安定的に抽出する手法の確立にも成功している。これらの結果は今後女王や雄が生じる際に働く分子機構の解明に有用であると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Misato O. Miyakawa, Hitoshi Miyakawa	4. 巻 156
2. 論文標題 Transformer gene regulates feminization under two complementary sex determination loci in the ant, <i>Vollenhovia emeryi</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Insect Biochemistry and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 103938
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ibmb.2023.103938	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 宮川（岡本）美里	4. 巻 4
2. 論文標題 侵略アリで進化した繁殖様式と性決定機構がもたらす脅威	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 40-43
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 無
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0件

〔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
研究分担者	宮川 美里 (岡本)  (Miyakawa-Okamoto Misato)  (00648082)	宇都宮大学・バイオサイエンス教育研究センター・博士研究員    (12201)	

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