

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：32639

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580079

研究課題名(和文) 昆虫類における多型発現のエピジェネティクス

研究課題名(英文) Epigenetics of insect polymorphism

研究代表者

佐々木 哲彦 (Sasaki, Tetsuhiko)

玉川大学・学術研究所・教授

研究者番号：60235257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：ミツバチの働きバチと女王バチへのカースト分化、およびアブラムシの有翅・無翅型の多型発現におけるエピジェネティックな制御機構を明らかにすることを目的として、セイヨウミツバチとエンドウヒゲナガアブラムシのDNAメチル化をゲノムワイドに解析した。ミツバチではカースト間でメチル化の状態が異なる1,717サイトのCpGを同定した。興味深いことに、カースト間でメチル化度の異なる遺伝子の中には、幾つかの性決定遺伝子が含まれており、カースト分化に性決定遺伝子が関与している可能性が示唆された。アブラムシでは、有翅型と無翅型でメチル化度の異なる226サイトのCpGサイトを同定した。

研究成果の概要(英文)：Many insects exhibit polymorphism, producing different forms from the same genome. Such examples include queen and worker caste differentiation in honeybees and development of alate (winged) and apterous (non-winged) morphs in aphids. To investigate the epigenetic mechanisms underlying the occurrence of polymorphism, genome-wide methylation profiles were analyzed in the European honeybee, *Apis mellifera*, and in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. In the honeybee, 1,717 CpG sites were found to be differently methylated between the two castes. Interestingly, differently methylated genes included several sex-determining genes, implying that genes for sex determination might be also involved in caste differentiation. In the aphids, 226 were differently methylated between the two morphs.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：エピジェネティクス ミツバチ アブラムシ 多型発現 カースト分化

1. 研究開始当初の背景

DNA のメチル化は細菌から植物、動物まで生物界全体で普遍的に見られ、真核生物ではおもに CpG ジヌクレオチドのシトシンがメチル化される。哺乳類では、DNA メチル化はヒストンの修飾とともに、染色体の構造や遺伝子発現を調節し、発生、分化、老化、疾患など、重要な現象に深く関与することが知られている。

一方、無脊椎動物の大きなグループである昆虫の DNA メチル化は、代表的なモデルであるショウジョウバエやカイコのゲノムで CpG のメチル化がほとんど検出されないことから、これまであまり注目されることはなかった。しかし、2006 年に膜翅目昆虫のミツバチで CpG メチル化システムが機能していることが明らかにされ、その後ミツバチ以外の膜翅目昆虫でも CpG メチル化が起こることが報告された。膜翅目昆虫は半数倍数性の性決定様式をもち、受精卵からメス、未受精卵からオスが発生し、社会性を獲得した種では、メスが女王とワーカーにカースト分化する。DNA のメチル化は、個体発生における長期的な遺伝子発現調節機構となりえることから、半数倍数性の性決定に関連する遺伝子量補償や、カースト分化における遺伝子発現調節に関与していることが想定される。実際、2008 年に幼虫期に RNAi 法でメチル化酵素の発現を抑制すると、働きバチに分化すべき幼虫が女王化することが報告された。膜翅目以外では、半翅目アブラムシのゲノムが CpG のメチル化修飾を受ける。アブラムシも動物としては例外的な生殖様式をもつ昆虫で、春から秋にかけて卵胎生単為生殖でメスだけが生産され、晩秋に有性生殖する雌雄が出現して越冬卵を産む。また、単為生殖世代では繁殖力の高い無翅型と、移動能力も備えた有翅型という多型がみられる。DNA のメチル化は、このような複雑な生活史や多型発現の制御に関わっていると予想される。

2. 研究の目的

セイヨウミツバチでは、カースト分化に DNA メチル化が関与していることが示されているが、どのような遺伝子がメチル化

修飾を受けるのか、また、働きバチと女王バチでメチル化パターンがどのように異なるのかは、明らかにされていない。そこで、本研究では、ミツバチゲノムのメチル化の全体像を明らかにすると同時に、カースト間でメチル化パターンが異なる遺伝子を同定することを目的とし、女王バチと働きバチに分化することが運命づけられた幼虫を材料として、次世代シーケンシング法を利用したゲノムワイドな DNA のメチル化パターンの解析を行った。アブラムシでは有翅型と無翅型で、ゲノムメチル化パターンを比較した。

3. 研究の方法

(1) ミツバチゲノムのメチル化パターンの解析

セイヨウミツバチ (*Apis mellifera*) のメスの幼虫が働きバチに分化するか女王バチに分化するかは、孵化してから約 3 日後に不可逆的に決定される。そこで、女王バチと働きバチへの分化が決定した後の 4 日齢の幼虫から DNA を抽出した。

DNA メチル化の解析は塩基単位でメチル化修飾の有無を検出できるバイサルファイト法で行った。女王バチと働きバチの幼虫から抽出した DNA をバイサルファイト処理し、Solid 4 システムによる次世代シーケンシングに供した。得られた配列をミツバチのゲノムデータベース (Amel 4.0) にマッピングし、ゲノム中の全 CpG サイトにおけるメチル化の程度を算定した。

(2) アプリコン解析によるカースト決定期前後のメチル化パターンの解析

孵化後 3 日齢、4 日齢、5 日齢の働きバチと女王バチの幼虫から DNA を抽出し、バイサルファイト変換を施した。ゲノムメチル化パターンの解析結果をもとに、働きバチと女王バチでメチル化の程度が異なる CpG サイトを含む 8 つの領域を PCR 法で増幅し、Roch GS Junior Titanium による次世代シーケンシングを行った。得られたシーケンシングリードをレファレンス配列にマッピングし、各 CpG サイトのメチル化度を算定した。

(3) *transformer 2* の選択的スプライシングの定量的解析

まず *transformer 2* (*tra 2*) の第 6 エクソンで選択的なスプライシングが起こることを確認するために、選択的スプライシングを受ける可能性のある領域を含むように PCR プライマーを設計した。設計したプライマーを用いた逆転写 PCR により、long type と short type の *tra 2* mRNA が作られることが確認されたので、2 つのバリエーションを特異的に増幅する PCR プライマーと、その PCR 産物を検出する Taq-Mann probe を設計した。

3 日齢、4 日齢、5 日齢の働きバチと女王バチの幼虫から RNA を抽出し、一定量を逆転写した。合成された cDNA を鋳型として、ABI Prism 7000 で定量 PCR を行った。

(4) アブラムシ無翅型と有翅型のゲノムメチル化パターンの比較

ゲノム情報を利用できるエンドウヒゲナガアブラムシ *Acyrtosiphon pisum* を供試虫とした。翅原基の有無により無翅型と有翅型を区別できるようになる 4 齢の若虫から、DNA を抽出した。バイサルファイト処理した DNA を HiSeq2000 による次世代シーケンシングに供し、Aphid base から取得したアブラムシゲノム assembly 2_scaffolds.fasta にマッピングした。ゲノムアノテーションには、AphidBase_OGC2.lb_withCDS.gff3.bz2 を用いた。

4. 研究成果

(1) ミツバチゲノムのメチル化パターンの解析

孵化後 4 日齢の働きバチと女王バチの幼虫から DNA を抽出し、バイサルファイト処理を施した後に、次世代シーケンスで解析を行った。働きバチからは 226,815,366 リード、女王バチからは 218,019,317 リードを得た。これらのリードをミツバチゲノム (Amel 4.0) にマッピングしたところ、働きバチでは 166,728,267 リード、女王バチでは 152,181,114 リードがマッピングされた。ミツバチのゲノムは約 230 Mbp で、平均カバレッジは働きバチで 16.8、女王バチで 15.0 であった。

メチル化修飾を受けていないシトシンは、バイサルファイト処理によりウラシルに変

換され、その後の PCR によって T に変換される。一方、メチル化されたシトシンは、バイサルファイト処理してもシトシンのまま残る。したがって、個々の CpG サイトについて、マッピングされたリードの C 塩基の数と、T 塩基の数から、そのサイトのメチル化度を算定することができる。しかし、実際にはバイサルファイト処理が不完全であるためにメチル化されていないシトシンがシトシンのまま残ることもある。そこで、このようなバイサルファイト処理の未反応率を、メチル化修飾を受けないことが分かっているミトコンドリアの配列にマップされたリードの C 塩基の総数から算定した。その結果、働きバチと女王バチの未反応率は、それぞれ 2.11% と 3.65% であった。

ミツバチのゲノム (Amel 4.0) には、9,164,972 個の CpG サイトが存在する。これらのサイトにマッピングされたリードの C 塩基数と T 塩基数を 2 項検定により検定し、未反応率と比べ C/T 比が有意に高いサイトを抽出したところ、働きバチでは 96,639 サイト、女王バチでは 68,732 サイトが有意にメチル化されるサイトとして同定された。すなわち、ミツバチゲノム上に存在する 900 万個以上の CpG サイトのほとんどはメチル化されることはなく、メチル化されるのは、全 CpG サイトの約 1% 程度であることが示された。メチル化されるサイト数は女王バチのほうが働きバチより少ないという結果は、幼虫期に DNA メチル化酵素の発現を RNAi 法により抑制すると、働きバチが女王化するという報告と合致する。

次いで、カースト間でメチル化の程度が異なる CpG サイト (Differently methylated site) を検索したところ、1,717 サイトで有意な差が検出された (Fisher の正確確率検定、FDR<0.05)。これら DMS のうち 1,314 サイトは働きバチでのメチル化度が有意に高く、女王バチのほうがメチル化の程度が高いサイトは 403 サイトであった。1 つの遺伝子内に 2 個以上の DMS が含まれることもあり、カースト間でメチル化パターンの異なる遺伝子は 985 個であった。

興味深いことに、カースト間でメチル化パターンの異なる遺伝子には、幾つかの性決定に関わる遺伝子が含まれていた。具体的には、*dosage compensation regulator maleless, males absent on the first, doublesex,*

*transformer 2 sex determining protein, sex lethal homolog, complementary sex determination (CSD)*が、カースト間でメチル化度が異なる遺伝子として同定された。このことは、雌雄の分化を制御する性決定関連遺伝子が、雌のカースト分化にも関与していることを示唆しているのかもしれない。社会性の進化は本来産卵能力をもつメスの個体から不任化したワーカーを分化させることであり、性決定関連遺伝子がカースト分化の分子メカニズムの一部に組み込まれている可能性は十分に考えられることである。

(2) アンプリコン解析によるメチル化パターンの継時的変化の解析

カースト間でメチル化の程度が異なる CpG サイトを含む 8 つの領域について、アンプリコン解析を行い、メチル化パターンの継時的な変化を調べた。孵化後 3 日齢、4 日齢、5 日齢の働きバチと女王バチの幼虫から DNA を抽出し、バイサルファイト処理し、解析する 8 つの領域を PCR で増幅した。PCR 産物は Roch GS Junior Titanium による次世代シーケンシングで解析した。8 領域に含まれる合計 48 個の CpG サイトのメチル化度の経時変化から、ほとんどメチル化されないサイトは、3 日齢、4 日齢、5 日齢を通じて、メチル化度は低いままであり、中程度以上にメチル化されるサイトでは、その程度が大きく変動することが示唆された。また、9 サイトでは、女王バチでのみ加齢にともなってメチル化度が低下する傾向が見られ、ここでもメチル化の抑制が女王化を促すという既報と一致する結果が得られた。

(3) *transformer 2* の選択的スプライシングの定量的解析

カースト間でメチル化パターンの異なる性決定関連遺伝子のうち、*transformer 2* では、女王バチのほうが働きバチより高度にメチル化されたサイトが第 6 エクソンに 3 個集中していた。一般に、性決定遺伝子の転写では性選択的なスプライシングが起こることが多い。また、2012 年にミツバチの DNA メチル化の機能の一つとして、スプライシングの制御に関与していることを示唆する論文が発表された。

そこで、*transformer 2* の第 6 エクソンのスプライシングがカースト間で異なる可能性を検討した。まず、働きバチ、雄バチ、女王バチの幼虫から抽出した RNA を逆転写して合成した cDNA を鋳型として、第 5 エクソンと第 6 エクソンを挟むプライマーで PCR を行ったところ、この部分で選択的スプライシングが起こり、long type と short type の mRNA が合成されることが示された。そこで、これら 2 つのバリエーションを特異的に増幅できる定量 PCR 用のプライマーを設計し、蛍光プローブを用いた逆転写定量 PCR を行った。

3 日齢、4 日齢、5 日齢の働きバチと女王バチから RNA を抽出し、働きバチと女王バチそれぞれ 6 匹ずつについて解析を行い、long type と short type の比を比較してみたが、残念ながら *tra 2* のカースト特異的な選択的スプライシングを明示する結果は得られなかった。しかし、カースト間でメチル化の度合いの異なる CpG サイト近辺で選択的スプライシングが起こることが実証され、また、このような領域でのスプライシングパターンを定量的に解析する実験系が確立された。今後、他の性決定遺伝子について同様の解析を継続する。

(4) アブラムシ無翅型と有翅型のゲノムメチル化パターンの比較

無翅型と有翅型のアブラムシのゲノムメチル化パターンを比較するため、4 齢若虫から抽出した DNA をバイサルファイト処理し、HiSeq2000 による次世代シーケンシング解析を実施した。無翅型、有翅型ともに 1 億 2 千万以上のリードが出力され、そのうち 7000 万以上がアブラムシゲノムにマッピングされた。アブラムシのゲノム (Aphid Base scaffold_2) には 13,903,655 個の CpG サイトが存在する。これらのうち、10 リード以上でカバーできたサイトは全体の約 4 分の 1 で、無翅型では 2,960,758 サイト、有翅型では 3,279,088 サイトであった。アブラムシのゲノムサイズは 475M bp で、ミツバチゲノムの 2 倍ほどあるため、カバレッジがやや低い結果となった。

Fisher の正確確率検定により多型間でメチル化の程度が有意に異なるサイトを抽出した結果、226 個の CpG サイトが同定された (FDR<0.05)。カバレッジが低かったた

めに、多型間で有意差が検出された CpG サイト数は少なくなりましたが、遺伝子単位でみると、有意差のある 3 個以上の CpG サイトを含む 14 個の遺伝子が同定された。今後、これらの遺伝子について詳細な解析を進める。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Furukawa S., Tanaka K., Ikeda T., Fukatsu T. and Sasaki T. (2012) Quantitative analysis of the lytic cycle of WO phages infecting *Wolbachia*. *Applied Entomol. Zool.* 47, 449-456. DOI: 10.1007/s13355-012-0142-6

(査読付き原著論文)

Ikeda T., Furukawa S., Nakamura J., Sasaki M. and Sasaki T. (2011) CpG methylation in the hexamerin 110 gene in the European honeybee *Apis mellifera* L. *J. Insect Science* 11, Article 74. (査読付き原著論文)

Ikeda T., Nakamura J., Furukawa S., Chantawannakul P., Sasaki M. and Sasaki T. (2011) Transduction of baculovirus vectors to queen honeybees, *Apis mellifera* L. *Apidologie* 42, 461-471. DOI: 10.1007/s13592-011-0014-z

(査読付き原著論文)

〔学会発表〕(計 6 件)

坂本洋典、緒方法親、佐々木哲彦(2014) 「セイヨウミツバチ働きバチの脳における DNA メチル化解析」日本応用動物昆虫学会第 58 回大会 (3月26日~28日(発表27日), 高知大学, 高知市)

Sakamoto H., Suzuki M. and Sasaki T. (2013) Comparison of genome-wide DNA methylation pattern between queen larvae and worker larvae in the European honeybees. The 2nd Global Conference on Entomology (Nov. 8-12, Kuching, Malaysia)

坂本洋典、鈴木美穂、佐々木哲彦(2013) 「セイヨウミツバチの女王と働きバチのゲノムメチル化の比較」第三回NGS(Next Generation Sequence)現場の会 (9月4日~5

日)、神戸国際会議場, 神戸市)

坂本洋典、鈴木美穂、佐々木哲彦(2013) 「セイヨウミツバチのカースト間におけるゲノムメチル化の比較」日本応用動物昆虫学会第57回大会 (3月27日~29日、日本大学、藤沢市)

Sakamoto H., Suzuki M. and Sasaki T. (2012) DNA methylation during the caste determination in the European honeybees, *Apis mellifera*. The 24th International Congress of Entomology (Aug. 19-25, Daegu, Korea)

石井進之輔、佐々木哲彦、鈴木美穂(2012) 「セイヨウミツバチのカースト決定期におけるDNAメチル化の解析」日本応用動物昆虫学会第56回大会 (3月27日~29日、近畿大学、奈良市)

〔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〕

ホームページ等

http://libds.tamagawa.ac.jp/dspace/bitstream/11078/97/1/7_04.pdf

6 . 研究組織

(1)研究代表者

佐々木 哲彦 (SASAKI, Tetsuhiko)
玉川大学・学術研究所・教授
研究者番号: 60235257

(2)研究分担者 (0 人)

(3)連携研究者 (0 人)