

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月28日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23770274

研究課題名（和文） シロアリにおける防衛方法の多様性と分子進化に関する研究

研究課題名（英文） Studies of the diversity and molecular evolution of defensive mechanism in termites

研究代表者

北條 優 (HOJO MASARU)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・研究員

研究者番号：80569898

研究成果の概要（和文）：

シロアリ類の防衛方法の多様性進化を明らかにするために、兵隊の頭部前方の突起構造「nasus」からジテルペンを噴射して攻撃する最も派生的なタカサゴシロアリを用いて、nasusの発生に関わる遺伝子やジテルペン合成に関わる遺伝子の探索を行った。その結果、昆虫の付属肢の遠位部形成に関わる *Distal-less* 遺伝子が nasus の発生に関わっていることを突き止めた。また、次世代シーケンサーを用いた解析では、ジテルペンの前駆物質であるゲラニルゲラニル二リン酸を合成するまでの全ての遺伝子が同定でき、中でもゲラニルゲラニル二リン酸合成酵素遺伝子の重複、機能改変の可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

To clarify the diversity and evolutionary mechanisms of termite defensive system, I searched for the genes involved with the development of horn-like frontal projection (nasus) and the synthesis of cembrene-derived polycyclic diterpenes by using *Nasutitermes takasagoensis* which is the most derived termite species. The results indicated that a homeobox gene *Distal-less* is related to the development of the nasus. Moreover, all genes involved with the precursor of diterpene were determined using next generation sequencer. Especially, *geranylgeranyl diphosphate synthase* genes were duplicated repeatedly. These results suggest that the synthesis of diterpene is to contribute to the acquisition of a novel defensive system in a termite lineage, coupled with the acquisition of adaptive defensive behaviors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：機能進化、*Distal-less*、ジテルペン合成、ゲラニルゲラニル二リン酸、RNA-Seq

1. 研究開始当初の背景

生物進化の中で最も多様化したグループに昆虫類が挙げられるが、その中で極めて高度な社会性を進化させたのが真社会性昆虫である。真社会性昆虫のコロニー内には、労働を分担する様々なカーストが存在する。中でもシロアリには、防衛のみに特化した表現

型を示す兵隊カーストが存在するのが、他の真社会性昆虫には見られない特徴である。シロアリの繁栄にはニッチをめぐる様々な生物間での競争に勝ち抜いてきたことが関係しており、兵隊カーストによる防衛方法の多様性進化がシロアリの繁栄に重要な役割を果たしてきたと言える。

シロアリ兵隊の防衛方法は非常に多様化しており、大顎を発達させ物理的に攻撃するものや、「額腺」というシロアリ特有の外分泌器官から化学物質を放出して攻撃するものもある。これまでの進化系統学的研究から、化学的防衛を行うシロアリは、大顎を用いた方法から派生的に進化してきたと考えられている。中でも、最も派生的なシロアリ科テングシロアリ亜科の兵隊は、「nasus」と呼ばれる突起構造が頭部前方に発達し、額腺で合成される揮発性の高いモノテルペンや粘性のあるジテルペンなどの混合物を nasus から噴射するという特徴的な防衛行動を示す。テングシロアリの分泌物に含まれるジテルペンはセンブレン由来の多環式のドーム型構造を形成しており、このような複雑な構造のジテルペンを合成できる動物は他には知られていない。またテングシロアリの兵隊は大顎が退化しており、防衛方法の最も進化した形と言える。

額腺や nasus は兵隊特異的な器官であるが、その進化的起源は明らかにされていない。またテングシロアリが合成する特殊なジテルペンの合成経路も明らかになっていない。

2. 研究の目的

テングシロアリ類の防衛システムに見られる特徴として、額腺や nasus の発達、大顎の退縮、防衛物質の合成経路の獲得などがあげられる。これまでの進化系統学的研究から、これら様々なイベントはそれぞれ独立に生じたと示唆されている。

本研究では、現在のテングシロアリの防衛システムに至るまでの進化メカニズムを解明することを目指し、カースト分化に伴う額腺や nasus の形成、変化に関わる分子機構、兵隊特異的な防衛物質であるジテルペンの生合成経路に関わる分子機構などの至近要因の解明を目的とした。

3. 研究の方法

日本に生息する唯一のテングシロアリ類であるタカサゴシロアリを用いて、以下の研究を行った。

(1) まずは nasus や額腺の形態形成に関わると考えられる Distal-less 遺伝子 (*Dll*) の配列を候補遺伝子アプローチにより決定し、免疫組織染色法やリアルタイム定量 PCR による発現解析、RNA 干渉法を用いた遺伝子のノックダウンを行うことにより機能解析を行った。

(2) 次に、動物では未知であるジテルペンの合成に関わる遺伝子を特定するために、次世代シーケンサー (454 GS Junior およびイルミナ HiSeq2000) を用いて、額腺特異的に発現する遺伝子を網羅的に特定し、コンピューター上でのアノテーション解析、比較発

現解析により候補遺伝子を絞り、それらについてリアルタイム定量 PCR で詳細な発現解析を行うことにより、ジテルペン合成経路に関わる遺伝子を特定した。

(3) さらに、ジテルペンの直接的な前駆物質となるゲラニルゲラニルニリン酸 (GGPP) を合成する酵素 (GGPPS) は、タカサゴシロアリで多数のコピーがあることがわかっており、兵隊の額腺で発現していることもわかっている。GGPPS のホモログ遺伝子配列を、日本に生息する各系統のシロアリ (ネバダオオシロアリ、コウシュンシロアリ、ヤマトシロアリ、イエシロアリ、タイワンシロアリ、ニトベシロアリ、タカサゴシロアリ) からクローニングし、分子進化系統解析を行った。

4. 研究成果

(1) タカサゴシロアリの兵隊は、小ワーカーから前兵隊を経て分化するので、nasus の形成に関わる遺伝子を特定するために、前兵隊に分化する直前の小ワーカーから RNA を抽出した。その後、昆虫の付属肢の遠位部形成に関わる *Dll* 遺伝子のプライマーを作成し、逆転写 PCR 法により配列を決定したところ、173bp の配列を得ることができた。決定した断片配列を用いて 3' RACE を行い、868bp の配列を得た。翻訳したアミノ酸配列を用いて、既知の *Dll* タンパク質との配列比較から、得られた遺伝子はタカサゴシロアリの *Dll* 遺伝子であることが示唆された。

得られたアミノ酸配列から *Dll* タンパク質の抗体を作成し、免疫組織染色法により *Dll* タンパク質の存在部位を確認したところ、nasus の原基では存在が見られたが、額腺細胞では見られなかった。

RNA 干渉法により、前兵隊に分化する直前の小ワーカーの *Dll* 遺伝子をノックダウンしたところ、顕著に nasus の短い前兵隊が生じた。RNA 干渉を行った個体の *Dll* 遺伝子の発現をリアルタイム定量 PCR により確認したところ、有意に発現が下がっていることが認められた。これらの結果から、*Dll* 遺伝子が nasus の形成に関与していることが明らかになった。

タカサゴシロアリでは防衛方法の改変に伴い、*Dll* 遺伝子が nasus の発生に関与するという新しい機能を獲得した可能性が示唆された。

(2) 動物ではセンブレン由来のジテルペンの合成に関する遺伝子は明らかになっていないため、次世代シーケンサーを用いて額腺で発現する遺伝子を網羅的に探索した。

まずは 454 GS Junior を用いて、額腺およびその周辺組織で発現する遺伝子の探索を行った。GS Junior から出力された断片配列をアセンブリしたところ、774 遺伝子 (1111 コンティグ) の配列が得られた。これ

らの遺伝子についてアノテーション解析を行ったところ、既知のジテルペン合成経路の酵素うち、ヒドロキシメチルグルタリル CoA 合成酵素(HMGS)、ヒドロキシメチルグルタリル CoA レダクターゼ(HMGR)、ファルネシルニリン酸合成酵素(FPPS)、GGPPS がライブラリーに含まれていることがわかった。これらのうち、一般的なイソプレノイドの代謝に関わるメバロン酸経路において重要な役割を果たす HMGS と HMGR についてリアルタイム定量 PCR により発現解析を行ったところ、ワーカー頭部に比べて兵隊頭部で顕著に発現が高く、兵隊頭部の中でも額腺を含む組織で有意に発現が高いことが明らかになった。

これらの結果から、ジテルペンの前駆物質を合成するメバロン酸経路が兵隊の額腺で行われている可能性が強く示唆された。

(3) GS Junior は特定できた遺伝子数が少なく、ジテルペン合成経路の全ての遺伝子を得ることが出来なかったため、次にイルミナ HiSeq2000 を用いて解析を行った。タカサゴシロアリの兵隊はオスのカーストが分化するため、HiSeq2000 での解析では、額腺組織だけでなく、兵隊頭部、前兵隊頭部、小ワーカー頭部、オス生殖虫頭部からも RNA を抽出し、ライブラリーを作成し、比較トランスクリプトーム解析 (RNA-seq) を行った。

HiSeq2000 で得られた断片配列を *de novo* アセンブリングし、重複配列などを除去したところ、約 4 万個の配列を得ることができた。これらについてアノテーション解析を行ったところ、GGPP までの全ての酵素の遺伝子がライブラリーに含まれていることがわかった。その中でも GGPPS は、他の動物ではシングルコピーであるのに対して、タカサゴシロアリのライブラリーには 9 種類もの配列が含まれており、かなり多くのコピー遺伝子が存在する可能性が示唆された。

各カースト間での発現比較解析を行ったところ、GGPPS 以外の遺伝子は、兵隊の額腺での発現が有意に高いが、他のカーストでも発現していた。一方 GGPPS は、多くのコピー遺伝子は兵隊の額腺で顕著に発現が高かったが、全てのカーストでほぼ一定の発現が見られたコピーが 1 つだけあった。

これらの結果から、もともと一般的なイソプレノイド合成に使われていた経路の遺伝子の機能が改変したり、GGPPS など一部の遺伝子では重複した遺伝子が新しい機能を獲得することにより、額腺で特異的に見られる特殊なジテルペンの合成を行うようになったものと考えられた。

(4) 動物において GGPP は、プレニル化タンパク質の合成などに使われていることが分かっており、他のシロアリでも GGPPS 遺伝子が存在していることが予想される。GGPPS 遺伝子の分子進化系統解析を行うために、こ

れまで得られたタカサゴシロアリの GGPPS 遺伝子の配列や、他の昆虫の GGPPS 遺伝子の配列から保存されている領域を探索し、GGPPS 遺伝子に特異的なプライマーを作成し、逆転写 PCR 法により、日本に生息する系統の異なる 7 種のシロアリの GGPPS 遺伝子のホモログ遺伝子をクローニングした。

その結果、額腺を持たないネバダオオシロアリ、コウシュンシロアリ、タイワンシロアリからは 1 つのみの配列を得ることができたが、額腺を持つヤマトシロアリ、イエシロアリ、ニトベシロアリ、タカサゴシロアリからは多く異なる配列を得ることができた。これらの結果から、GGPPS 遺伝子は額腺の進化に伴い、額腺を持つ派生的な系統で複数回重複したことが考えられた。しかし、今回用いたサンプルの中で、イエシロアリだけは額腺を持つがジテルペンを合成していないため、重複した GGPPS 遺伝子が二次的に機能変化した可能性も考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

(1) M. Hojo, K. Maekawa, S. Saitoh, S. Shigenobu, T. Miura, Y. Hayashi, G. Tokuda, H. Maekawa (2012) Exploration and characterization of genes involved in the synthesis of diterpene defense secretion in nasute termite soldiers. *Insect Molecular Biology* 21: 545-557. 査読有

(2) K. Toga, M. Hojo, T. Miura, K. Maekawa (2012) Expression and function of a limb-patterning gene *distal-less* in the soldier-specific morphogenesis in the nasute termite *Nasutitermes takasagoensis*. *Evolution and Development* 14: 286-295. 査読有

(3) 北條優 (2011) 日本のシロアリの様々な防衛方法, しろあり 156: 19-27. 査読無.

[学会発表] (計 11 件)

(1) 北條優, タカサゴシロアリにおけるトランスクリプトーム解析から見てきた攻撃方法の進化, 日本昆虫学会第 72 回大会, 2012 年 9 月 16 日, 玉川大学.

(2) M. Hojo, Exploration and characterization of genes involved in the diterpene synthetic pathway for defensive secretion in nasute termite soldiers, XXIV International Congress of Entomology, 2012 年 8 月 19 日-25 日, Daegu, Korea.

(3) 北條優, タカサゴシロアリの兵隊におけるテルペン合成遺伝子の発現解析, 日本昆虫学会第71回大会, 2011年9月19日, 信州大学.

[図書] (計1件)

(1) 北條優 (2012) 「4.4. テングシロアリの兵隊におけるジテルペンの合成」. 『シロアリの事典』, 吉村剛 (編), 海青社, 152-162.

[その他]

平成 24 年度熱帯生物圏研究センター市民公開講座・展示. 「知られざる兵隊シロアリの攻撃方法」 沖縄県立博物館・美術館. 2012 年 9 月 2 日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北條 優 (HOJO MASARU)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・研究員

研究者番号: 80569898

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し