

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 29 日現在

機関番号：82626
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23770278
 研究課題名（和文）社会性アブラムシにおけるゴール修復行動の分子・細胞・発生基盤の解明
 研究課題名（英文）Molecular, cellular and developmental bases of gall repair in a social aphid.
 研究代表者
 沓掛 磨也子（KUTSUKAKE MAYAKO）
 独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員
 研究者番号：90415703

研究成果の概要（和文）：

本研究課題では、モンゼンイスアブラムシの兵隊幼虫が示す自己犠牲的なゴール修復行動に着目し、ゴール修復の分子基盤、および兵隊体内で特殊化した巨大顆粒細胞の機能と発生起源について明らかにする。この目的を達成するため、兵隊分泌液に存在する主要タンパク質成分の解析と、巨大顆粒細胞における網羅的な遺伝子発現解析をおこなった。その結果、巨大顆粒細胞で発現亢進する遺伝子として、メラニン合成、生体防御、脂質や糖の代謝に関わる遺伝子が多数同定され、ゴール修復に関与することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we focused on self-sacrificing gall repair performed by soldier nymphs in the social aphid, *Nipponaphis monzeni*. In order to clarify a molecular basis of this social behavior and to gain insights into functional roles and a developmental origin of soldier's specialized cells, namely, large globular cells, we analyzed major proteinaceous components in the soldier's secretion and identified genes expressed in the large globular cells comprehensively. It was revealed that a number of genes related to melanin synthesis, host defense and metabolism of lipid and sugar were expressed dominantly in the large globular cells, suggesting these genes were involved in the gall repair.

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	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：社会性昆虫、兵隊アブラムシ、ゴール修復、体液凝固、メラニン

1. 研究開始当初の背景

社会性昆虫に見られる高度で巧みな社会システムの成立・維持機構やその進化について明らかにすることは、進化生物学における重要な課題である。従来、社会性昆虫の研究は、生態学、行動学を中心に進められてきたが、近年の様々な解析技術の進展により、ミ

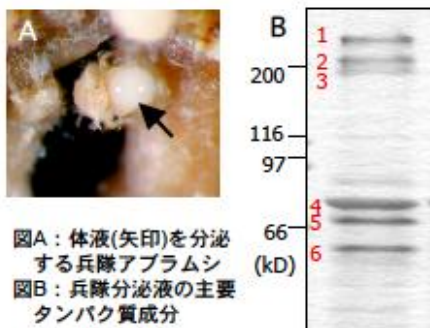
ツバチを中心に、その至近メカニズムについても様々な知見が得られてきた。しかし、昆虫社会についての一般的理解を深めるためには、様々な生物群を対象とした広範囲かつ総合的な研究が必要である。本研究課題では、社会性アブラムシの利他的な兵隊階級が示すゴール修復という社会行動に着目し、その

至近メカニズムについて、分子、細胞、発生レベルの様々な視点から解明し、この社会行動の進化について考察する。

社会性種のモンゼンイスアブラムシは、宿主植物であるイスノキに完全閉鎖型のゴールを形成し、その中で生活する。成長中のゴールは壁が柔らかく、しばしばガ幼虫などの捕食者に襲われ、食い破られてしまうが、これに対して本種の兵隊幼虫は、あけられた穴の周辺にすばやく集合して、尾部から大量の白い液体を分泌し、脚で混ぜて塗りのぼす行動を示す(図A)。すると分泌液は次第に粘性を増して固まり、穴を完全に塞ぐ。この兵隊幼虫による一連の行動により、ゴールの傷は修復され、その後も存続可能となる。ここで疑問となるのは、どのような分子メカニズムにより兵隊の分泌体液は凝固するのかという点である。

これまでの研究から、以下の知見が明らかになっていた。兵隊の分泌体液には6種類の主要タンパク質成分が多量に存在する(図B)。そのうちの1つはフェノール酸化酵素であり(図Bバンド4)、もう1つは内部にリピート配列を有し、そのリピート数が多型を示す機能未知のタンパク質である(図Bバンド5, 6)。これらのタンパク質は、兵隊分泌液中に極めて多量に存在していることから、ゴール修復に関与している可能性が考えられた。特にフェノール酸化酵素に関しては、メラニン合成の鍵酵素であることから、メラニン合成の反応過程で起きる周辺タンパク質の架橋反応が兵隊分泌液の凝固に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

一方、兵隊は分子レベルだけでなく細胞レベルにおいても特殊化している。兵隊の体腔内は巨大で顆粒を含む特殊な細胞(以下「巨大顆粒細胞」と呼ぶ)で満たされており、これらはゴール修復時に体液とともに角状管から外部に放出される。この際、破裂した巨大顆粒細胞から様々な因子が放出され、凝固反応が開始すると考えられる。



図A: 体液(矢印)を分泌する兵隊アブラムシ
図B: 兵隊分泌液の主要タンパク質成分

2. 研究の目的

本研究課題では、これまでの研究をさらに発展させ、モンゼンイスアブラムシの兵隊幼虫が示すゴール修復行動に関する分子、細胞、

発生基盤の全貌について明らかにすることを目的とする。さらに、これらの結果から、この社会行動の進化について考察する。具体的には、以下の研究を遂行する。

- (1) 兵隊分泌液の主要タンパク質成分のうち、未解析の高分子量タンパク質(図Bバンド1-3)を同定する。
- (2) 兵隊体内で特殊化した巨大顆粒細胞における発現遺伝子をRNAseq解析により網羅的に解析する。
- (3) これらの結果から、ゴール修復の分子基盤の全貌を明らかにするとともに、兵隊体内で特殊化した巨大顆粒細胞の機能的役割と発現起源、ゴール修復行動の進化について考察する。

3. 研究の方法

- (1) 兵隊分泌液中の高分子量タンパク質の同定

兵隊分泌液の主要タンパク質成分のうち、高分子量を示す未解析のタンパク質を同定するため、SDS-PAGEゲルから200kD以上のバンドをまとめて切り出し、リジルエンドペプチダーゼで消化後、解析可能な複数の断片についてN末端アミノ酸配列を決定した。この配列を(2)のRNAseq解析で得られた遺伝子配列に対して相同性検索し、完全一致する配列を探索した。さらに、この遺伝子に対する特異的ペプチド抗体を作成し、イムノブロットによりタンパク質レベルで確認した。

- (2) 巨大顆粒細胞で発現が亢進する遺伝子の網羅的探索

巨大顆粒細胞で発現が亢進する遺伝子を探索するため、6種類のcDNAライブラリーを作成し、RNAseq解析をおこなった。まず、同一ゴール由来の個体を用いて、1齢兵隊の体全体、3齢幼虫の体全体、成虫の体全体、胚、成虫(胚を除く)、1齢兵隊の巨大顆粒細胞の計6種類のtotal RNAを抽出し、Illumina TruSeq RNA Sample Preparation Kitに従ってライブラリーを調整した。これらを次世代シーケンサーIllumina HiSeq 2000で解析し、続いて*de novo*アセンブリ、contig作成、マッピング、発現量解析、相同性検索をおこない、各ライブラリーにおける遺伝子発現量を算出した。巨大顆粒細胞で発現亢進している遺伝子の選別については、巨大顆粒細胞における発現量が兵隊の体全体と比較して10倍以上高いことを基準とした。さらにこれらの遺伝子を発現量の多い順に並び替え、カイコの血球および脂肪体のESTデータと比較し、巨大顆粒細胞での発現する遺伝

子レポーターが示す特徴について検討した。

(3) 巨大顆粒細胞における脂質と糖の検出

巨大顆粒細胞内における脂肪の存在については、兵隊幼虫および胚の凍結切片に対するオイルレッドO染色により確認した。また、巨大顆粒細胞内における糖の存在については、兵隊幼虫および胚のパラフィン切片に対するPAS染色により確認した。いずれも対比染色としてヘマトキリシン染色をおこなった。

4. 研究成果

(1) 兵隊分泌液中の高分子量タンパク質の同定

兵隊分泌液中に存在する主要タンパク質成分のうち、分子量 200kD 以上のタンパク質を対象として内部アミノ酸配列解析をおこなったところ、ある断片から DLLSNILK という配列を得ることに成功した。この配列を次項(2)の RNAseq 解析で得られた遺伝子配列に対して相同性検索をおこなったところ、脂肪酸合成酵素の配列が完全一致でヒットした。この遺伝子に対する特異的ペプチド抗体を用いてイムノブロット解析をおこなった結果、このタンパク質は主要タンパク質成分 No. 3 であることが判明した (図 B 参照)。

(2) 巨大顆粒細胞で特異的発現する遺伝子の網羅的探索

RNAseq 解析の結果、巨大顆粒細胞において顕著に発現が亢進している遺伝子が多数見つかった。これらの中で発現量が多い遺伝子に着目したところ、2つの大きな特徴が明らかになった。

第一に、巨大顆粒細胞においては、フェノール酸化酵素や yellow といったメラニン合成に関わる酵素や、セリンプロテアーゼ、serpin, Toll といった生体防御系に関わる遺伝子が発現亢進していることがわかった (図 1)。このことは、これまでにわかっていたフェノール酸化酵素だけでなく、その他のメラニン合成に関わる遺伝子も巨大顆粒細胞において発現亢進していることを示している。

本実験で得られたもう一つの大きな知見は、脂質や糖の合成・分解に関わる多数の遺伝子が巨大顆粒細胞で発現亢進していたことである。脂質代謝関連遺伝子としてはリパーゼや脂肪酸合成酵素などが、糖代謝関連遺伝子としては 1,4-alpha-glucan branching enzyme や phosphoenolpyruvate carboxylase などが、巨大顆粒細胞において高レベルで発現していた (図 2)。このことは、巨大顆粒細胞において、脂質や糖の分解・合成が活発におこなわれていることを示唆している。

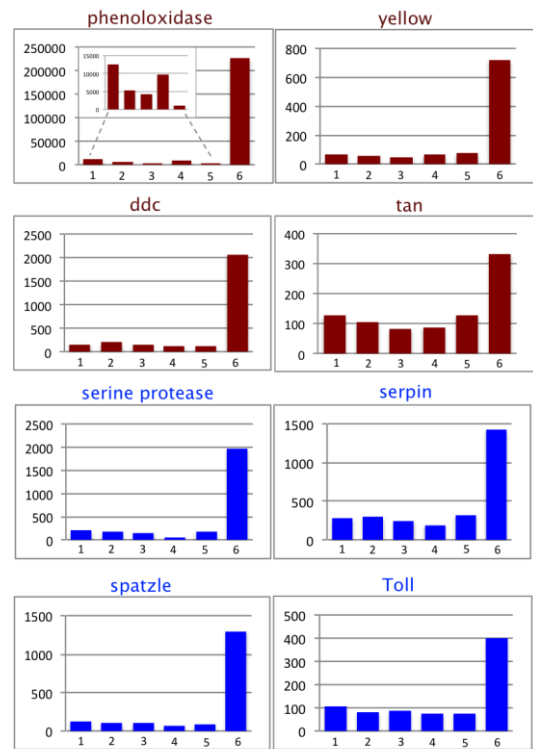


図1 巨大顆粒細胞で遺伝子発現が亢進している遺伝子(1)
 グラフの縦軸は遺伝子発現量、横軸はサンプルを示す。1: 1齢兵隊幼虫・体全体、2: 3齢幼虫・体全体、3: 成虫・体全体、4: 胚・体全体、5: 胚を除く成虫、6: 1齢兵隊幼虫・巨大顆粒細胞
 上の4つのグラフ(赤)はメラニン合成に関わる遺伝子、下の4つのグラフ(青)はその他の生体防御系に関わる遺伝子。

(3) 巨大顆粒細胞における脂質と糖の検出

RNAseq 解析の結果を受けて、巨大顆粒細胞

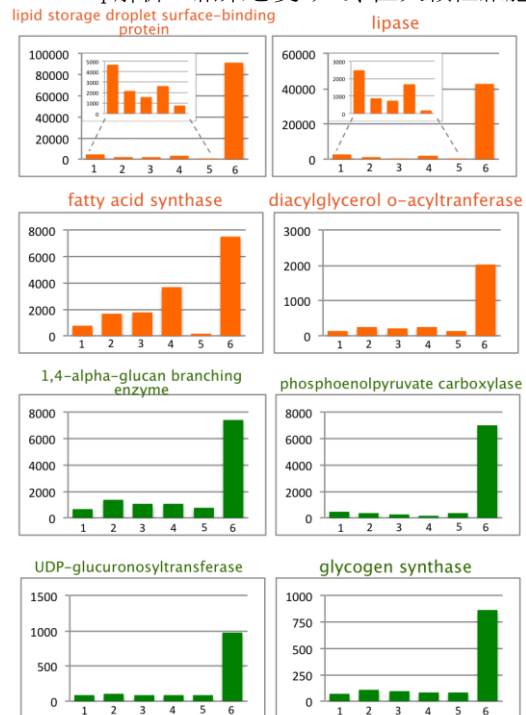


図2 巨大顆粒細胞で遺伝子発現が亢進している遺伝子(2)
 グラフの見方は図1に同じ。上の4つのグラフ(橙)は脂質の代謝に関わる遺伝子、下の4つのグラフ(緑)は糖の代謝に関わる遺伝子。

に実際に脂質や糖が局在するかどうかを調べた。脂質を検出するオイルレッドO染色の結果、兵隊幼虫および胚の巨大顆粒細胞が赤

く染色されたことから、確かに巨大顆粒細胞に脂質が存在することが確認された(図3)。また、糖を検出するPAS染色の結果、胚の巨大顆粒細胞が赤紫色に染色されたが、1齢幼虫の巨大顆粒細胞は染色されなかった(図4)。このことは、胚期の巨大顆粒細胞においては糖が多量に存在するが、1齢幼虫へと発生が進むにつれて、次第に分解されることを示唆している。

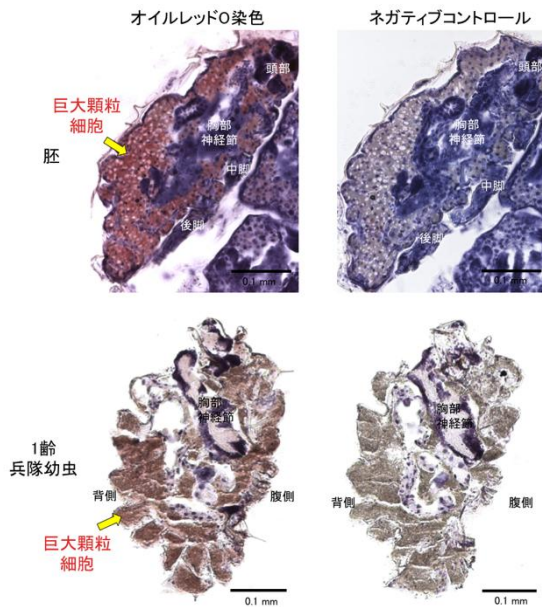


図3 巨大顆粒細胞における脂質の検出
胚および1齢兵隊幼虫の体腔内に充滿している巨大顆粒細胞が、オイルレッドO染色により赤く染色された(左側)。ネガティブコントロールはヘマトキシリン染色のみおこなったもの(右側)。

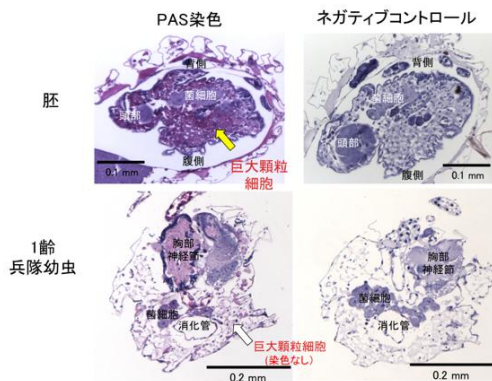


図4 巨大顆粒細胞における糖の検出
胚期の巨大顆粒細胞はPAS染色により染色されたが(左上)、1齢兵隊幼虫の巨大顆粒細胞は染色されなかった(左下)。ネガティブコントロールはヘマトキシリン染色のみおこなったもの(右側)。

(4) 巨大顆粒細胞の機能的役割と発生起源

これらの結果から、巨大顆粒細胞の機能と発生起源を考察する。まず、RNAseq解析の結果から、巨大顆粒細胞においては、メラニン合成や生体防御系に関わる遺伝子の発現が亢進していた。さらに、今回のRNAseq解析の結果をカイコ血球のESTデータと比較したところ、巨大顆粒細胞で高発現していたフェノール酸化酵素、yellow、UDP-glucuronosyltransferaseなどの遺伝子

は、カイコ血球でも高発現している遺伝子であることがわかった。これらの結果から、巨大顆粒細胞の発生起源が血球である可能性が考えられた。

その一方で、RNAseq解析および組織染色の結果から示唆された、巨大顆粒細胞における脂質や糖の合成・分解という機能に着目すると、このようなエネルギー物質の代謝をおこなう器官は、一般的には昆虫の脂肪体であることから、巨大顆粒細胞の発生起源は脂肪体であるという可能性も考えられた。RNAseqの結果をカイコ脂肪体ESTデータと比較したところ、巨大顆粒細胞で高発現していたgelsolin、spark、ade5など遺伝子は、カイコ脂肪体でも同じく高発現していることが明らかになった。

これらの結果を総合的に考えると、巨大顆粒細胞は、血球と脂肪体の両方の特徴を併せ持つと考えられ、その発生起源についても血球または脂肪体のいずれかではないかと考えられる。これらはいずれも昆虫の生体防御に重要な役割を担うことから、ゴール修復というコロニーレベルでの防御は、個体レベルの生体防御システムを、分子・細胞レベルで増強・転用することによって進化させてきたものであると考えることができる。

今回の研究成果から生じた新たな疑問として、巨大顆粒細胞で蓄積している脂質や糖が、ゴール修復にどのように関わっているかという点が挙げられる。一般的に、アブラムシの角状管には、角状管細胞という脂肪体細胞から分化したと考えられる細胞が存在し、脂質を合成、蓄積する。この脂質は、角状管分泌物として体外に分泌されるが、体外に分泌されると瞬時に固化することが知られている。これらの知見を考慮すると、モンゼンイスアブラムシの兵隊幼虫によるゴール修復においても、巨大顆粒細胞内の脂質成分が、体外に放出された後、固化している可能性が考えられる。兵隊分泌液の凝固反応には、タンパク質成分に加えて、脂質成分も関与しているものと推測される。

(5) まとめ

本研究課題では、兵隊アブラムシが示す自己犠牲的なゴール修復に関して、分泌液凝固の分子基盤およびゴール修復に特化した巨大顆粒細胞の機能と発生起源を探るため、様々な解析をおこなった。兵隊の分泌体液における主要タンパク質成分の解析では、これまで未解析だった高分子量タンパク質の一つが脂肪酸合成酵素であることが判明した。この酵素は、巨大顆粒細胞において発現し、脂質合成に関与するものと考えられる。またRNAseq解析からは、巨大顆粒細胞において、メラニン合成、生体防御、脂質および糖の代謝に関わる多数の遺伝子が発現亢進してい

ることが明らかになった。これらの結果は、ゴール修復にメラニン合成系が重要な役割を果たすというこれまでの結果を支持するとともに、タンパク質成分に加えて脂質成分も分泌体液の凝固に関与している可能性を示唆するものである。巨大顆粒細胞の発生源については、発現している遺伝子の機能的特徴から、血球または脂肪体である可能性が示唆された。

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2件)

- ① 杓掛磨也子、兵隊アブラムシによる自己犠牲的なゴール修復 -分子基盤とその進化-、査読有、63巻、2012、p.131-140
- ② 杓掛磨也子、分子レベルで見た兵隊アブラムシの行動と進化、査読無、66巻、2012、p.77-81

[学会発表] (計7件)

- ① Kutsukake M. Molecular and cellular mechanisms of self-sacrificing gall repair by soldier nymphs in the social aphid. XXIV International Congress of Entomology, Symposium “Evolutionary genomics of social behavior”, 2012年8月23日、The EXCO-Daegu Convention Center (大邱、韓国)
- ② 杓掛磨也子ら、分子レベルから見た兵隊アブラムシによるゴール修復行動の進化、第56回日本応用動物昆虫学会大会小集会「昆虫の適応形質進化へのゲノム化学的アプローチ」、2012年3月28日、近畿大学(奈良県)
- ③ 杓掛磨也子ら、ゴール修復する兵隊アブラムシにおいて特殊化した巨大顆粒細胞の発生源、日本動物学会第82回大会、2011年9月21日、旭川市大雪クリスタルホール(北海道)
- ④ Kutsukake M. Gall repair and regeneration by soldier aphids., 44th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, Symposium “Development of extended phenotype”, 2011年5月21日、沖縄コンベンションセンター(沖縄県)

[図書] (計1件)

- ① 杓掛磨也子、深津武馬(協力)、ニュートンプレス、ニュートン別冊 生き物の超能力 おどろきの超機能、不可思議な生態、2012、p.96-97

[その他]

研究室ホームページ

<http://staff.aist.go.jp/t-fukatsu/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杓掛磨也子 (KUTSUKAKE MAYAKO)

独立行政法人産業技術総合研究所

生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号：90415703