

平成 30 年 8 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2013～2017

課題番号：25221206

研究課題名(和文)ロイヤル・エピジェネティクス：社会性昆虫の超長寿化の分子基盤

研究課題名(英文)Royal Epigenetics: Molecular basis of the extended longevity of reproductives in social insects

研究代表者

松浦 健二 (Matsuura, Kenji)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：40379821

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 167,100,000円

研究成果の概要(和文)：シロアリの王・女王、ミツバチの女王の長寿を可能にする分子基盤について検討し、次の結果を得た。ヤマトシロアリの全カーストのトランスクリプトーム解析により、カースト・性・年齢特異的に発現する免疫遺伝子、DNA修復遺伝子、エピジェネティック修飾遺伝子を特定した。シロアリ女王の高い抗酸化能をもたらす抗酸化酵素遺伝子を特定した。ワーカーの抗酸化物質が尿酸であることを特定した。シロアリのゲノムインプリンティングによるカースト決定機構を特定した。ミツバチ女王の長寿が、ヒストン修飾を介したヘテロクロマチン化、および脂肪酸の酸化を利用した効率の良いエネルギー代謝と密接に関係することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have examined the molecular basis of the long longevity of reproductive castes of social insects (termite kings and queens, and honeybee queens) and obtained the following results. 1) We identified caste-, sex- and age-specific expression of chemoreceptor genes, immune-related genes, DNA-repairing genes and epigenetic modification genes by performing a transcriptome analysis of all castes of the termite *Reticulitermes speratus*. 2) We found antioxidant enzymes including catalase, peroxiredoxin and superoxide dismutase underlying the efficient antioxidant system of a long-lived termite queen. 3) We identified uric acid as an important antioxidant compound in termite workers. 4) We demonstrated that parental phenotypes influence the social status of offspring through genomic imprinting in termites. 5) We found that heterochromatinization through histone modification and effective energy metabolism using beta oxidation of fatty acids are related to the long longevity of honeybee queens.

研究分野：昆虫生態学

キーワード：社会性昆虫 寿命 ゲノムインプリンティング 単為生殖 抗酸化能 代謝 シロアリ ミツバチ

1. 研究開始当初の背景

複雑で多様な寿命の仕組みを解き明かすことは、生物学の究極の課題である。従来の寿命研究では、線虫やショウジョウバエ、マウスなど各分類群の中でも短命なモデル生物を対象としており、劇的な「長寿」の分子機構については未開拓である。アリ・ハチ、シロアリなどの真社会性昆虫では、女王の寿命が数十年に上る種が稀ではない。さらに、同じ遺伝子でも社会役割が異なれば遺伝子発現の違いにより、数十倍もの寿命差が生じており、寿命を制御する分子基盤の解明に絶好の材料である。

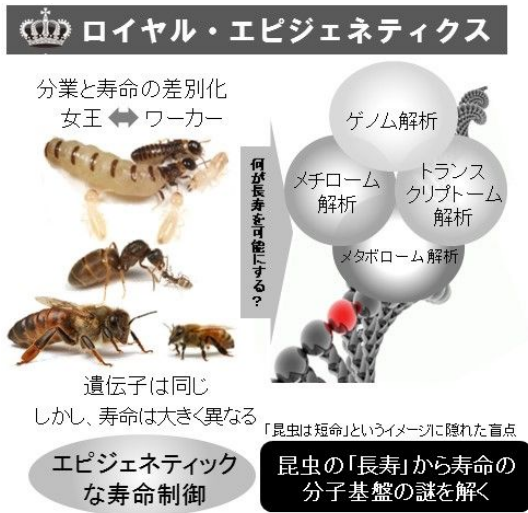


図1 研究の全体スキーム

2. 研究の目的

本研究では、ゲノム・メチローム・トランスクリプトーム解析など最新の分子生物学的手法を駆使し社会性昆虫の繁殖カーストの圧倒的な「長寿」を可能にする分子基盤を解明し、寿命の進化ダイナミズムの統合的理解を目指す(図1)。

3. 研究の方法

シロアリの王と女王の長寿の分子基盤

女王の遺伝的不老不死化と王の超長寿化をもたらした「単為生殖による女王継承システム(AQS)」の分子基盤の解明と、寿命の性差やカースト差に関わる遺伝子の探索と機能解明を行う。トランスクリプトーム解析により発現量の異なる遺伝子を探索方向と、ゲノム解析・メチローム解析によりプロモーター領域も含めたメチル化の全貌を明らかにする方向の両側からアプローチし、既知の寿命関連因子との照合にとどまらず、新規の長寿因子を含めて網羅的に探索する。さらに、老化の原因となる活性酸素に対する王と女王の対抗戦術を解明するため、活性酸素発生を抑える代謝機構とそれを除去する抗酸化能の解析を行う。

ミツバチ女王の長寿の分子基盤

ロイヤラクチンを摂取させた後のミツバチ

の染色体の網羅的なメチローム解析、さらにメチル化因子と寿命との関係についての解析を実施し、ロイヤラクチンによるエピジェネティック制御と寿命との関係を明らかにする。また、寿命とクロマチンのアセチル化との関係についても解析する。さらに、女王蜂分化を再現したショウジョウバエ飼育モデル系を用いて、ロイヤラクチン投与/過剰発現後の脂肪体から分布される液性因子をハエの脂肪体のトランスクリプトーム解析により寿命を制御する内因性因子を同定する。

4. 研究成果

(1) ヤマトシロアリの全カーストの遺伝子発現データベースの構築

ヤマトシロアリの王、女王、雌雄のワーカー、雌雄の兵アリ、雌雄の有翅虫の全 mRNA 解析を行い、10,238 個の発現遺伝子からなる遺伝子リストが完成した。シロアリの王・女王の長寿の分子基盤を理解する上で最も重要な遺伝子情報基盤が整った。この発現遺伝子リストに基づく発現比較を行い、着目する遺伝子の発現量のカースト間差、性差、年齢依存性を速やかに調べることのできるデータベースを構築した。

RNA-seqにより53種類の化学受容に関わる遺伝子が見つかり、そのうち41種類が化学受容体(嗅覚受容体22種類、味覚受容体7種類、イオノトロピック型受容体12種類)であり、12種類が輸送タンパク(匂い分子結合タンパク9種類、化学感覚タンパク3種類)であった。発現比較解析により、これらのうち、約81%は発現量にカースト間差が見られ、約8%は性差が見られた(図2)。また、王または女王でのみ顕著に発現する遺伝子が明らかになり、約62%の遺伝子は、王または女王の年齢に応じて発現量が変化していた(図2)。

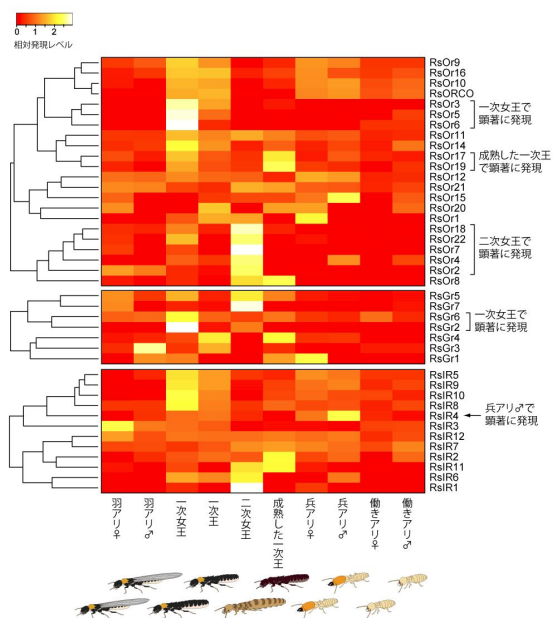


図2 各カースト・性における化学受容体遺伝子の発現比較

(2) シロアリのカースト、性、および年齢特異的な免疫関連遺伝子発現の解明

全カーストの RNA-seq により、40 種類のパターン認識タンパク、97 種類のシグナルタンパク、60 種類のエフェクタータンパクの遺伝子を含む計 197 種類の免疫関連遺伝子が見つかり、そのうち 174 遺伝子の発現がカースト特異性を示した。また、各カースト内の雌雄差を調べたところ、生殖カーストだけでなく、ワーカーや兵蟻にも免疫関連遺伝子発現に有意な性差が認められた。さらに、162 遺伝子が年齢によって異なる発現を示した。これらの結果から、寿命差も含めた高度なカースト分業にはそれぞれの社会役割に特異的な免疫システムが存在し、コロニー全体の社会免疫システムを構築していることが明らかになった。

(3) シロアリの王における高い DNA 修復関連遺伝子発現の特定

まず、ヤマトシロアリの RNA-seq データより、127 種類の DNA 修復関連遺伝子を同定した。そして、トランスクリプトーム解析を行い、ヤマトシロアリの王で特異的に発現する 21 個の DNA 修復関連遺伝子を特定した。さらに、この王で特異的な遺伝子について、カースト間および組織間の発現量を定量リアルタイム PCR で比較解析し、相同組み替えを介した DNA 修復経路の制御遺伝子の一つである Breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1) が王の体組織と生殖組織で高発現していることを特定した。BRCA1 は、ヒトの女性の乳がんや卵巣がんの原因遺伝子として数多くの研究がなされている一方、その生理的役割については不明な点が多い。本研究による成果は、長寿命であるシロアリの王が高い BRCA1 遺伝子発現量を持つことを明らかにしただけでなく、優れた DNA 修復システムが生物の長寿に与える可能性を示すものである。

(4) カースト特異的なエピジェネティック修飾関連遺伝子発現の特定

シロアリの遺伝子発現のカースト間差をもたらす要因として、DNA のメチル化やヒストン修飾などのエピジェネティック修飾が重要であることが明らかになりつつある。RNA-seq により、3 つの DNA メチルトランスフェラーゼ、7 つのサーチイン遺伝子、48 の TrxG、16 の PcG 遺伝子の計 74 種類のエピジェネティック修飾関連遺伝子が見つかった。これらのうち 15 遺伝子の発現は王特異的であり、さらに 52 遺伝子は女王と王の年齢特異的な発現を示した (図 3)。また、定量リアルタイム PCR により、DNA メチルトランスフェラーゼ DNMT3 が王の精巢と脂肪体で顕著に発現することが分かった。

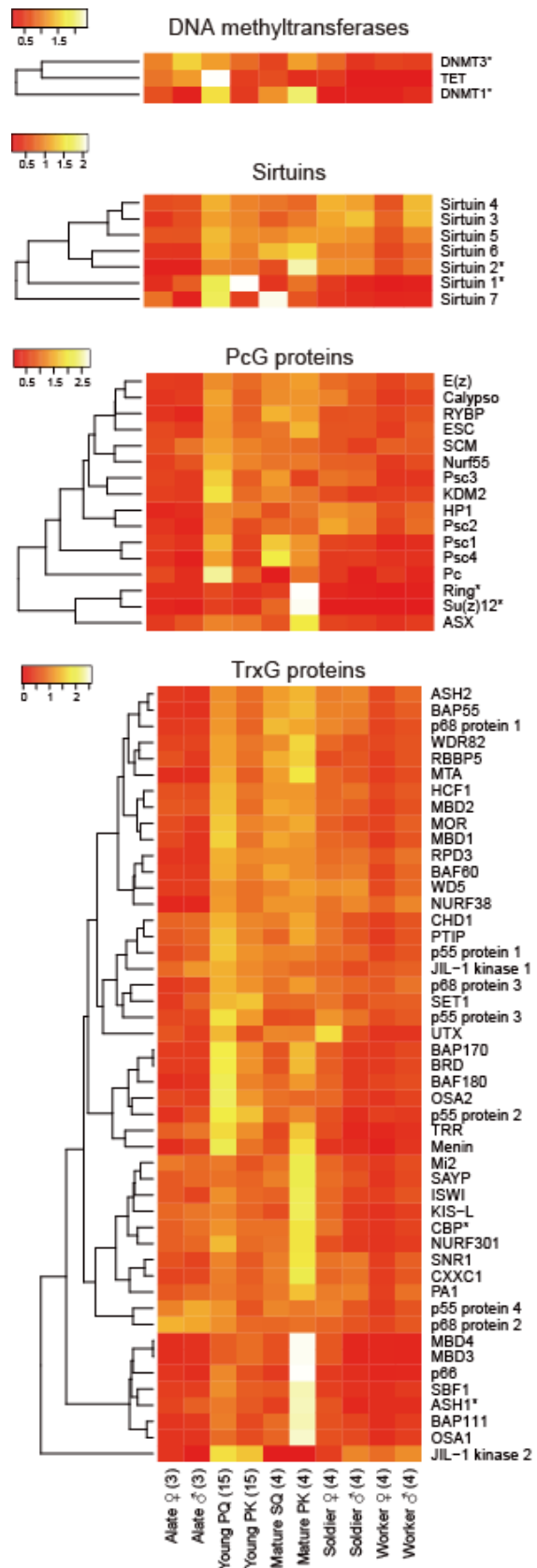


図 3 各カースト、性におけるエピジェネティック修飾関連遺伝子の発現比較

(5) シロアリ女王の高い抗酸化能の解明

ヤマトシロアリの女王と他のカースト間で酸化ストレスによるタンパク質、DNA および脂質の傷害レベルを比較し、女王が他のカーストに比べて生体分子の傷害を受けにくいことを明らかにした。また、抗酸化酵素活性のカースト間比較により、カタラーゼ (CAT) およびスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) のうちのひとつ Cu/Zn-SOD において、女王が他のカーストより有意に高い活性を示した。このシロアリ女王のカタラーゼ活性は、ショウジョウバエ、カイコガ、オオカマキリ、ムネアカオオアリ、キイロスズメバチなど他の昆虫と比較しても有意に高いことが分かった (図 4A)。さらに、RNA-seq とリアルタイム PCR により抗酸化酵素遺伝子の発現量比較を行ったところ、カタラーゼ遺伝子の発現が女王で有意に高いことが確認された (図 4B, C)。シロアリの王・女王の長寿と抗酸化システムが密接につながっていることを示すきわめて重要な結果が得られた。

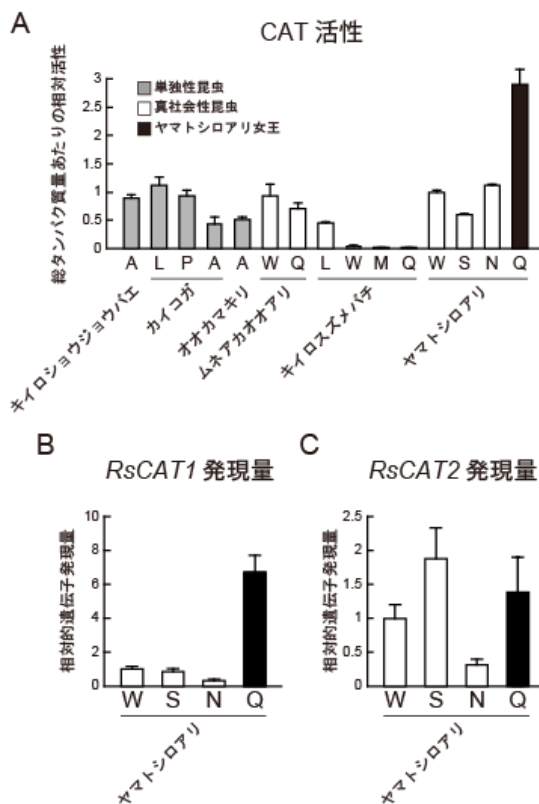


図 4 カタラーゼ活性およびカタラーゼ遺伝子の発現比較 (Q: 女王、N: ニンフ、W: ワーカー、S: 兵蟻)

(6) シロアリの高い抗酸化能をもたらす抗酸化物質の特定

ワーカーの可溶性抽出液中のフリーラジカル消去活性を調べたところ、ヤマトシロアリが顕著に高い抗酸化能をもつことがわかった。また、個体の頭部、胸部、腹部、消化管に分けてフリーラジカル消去能を調べた

ところ、消化管を除く腹部に局在していることがわかった。このことから、腸内に存在する共生微生物ではなく、ヤマトシロアリ本体が持つ抗酸化能であることが示唆された。さらに、HPLC と LC-MS/MS を用いた物質の同定を行い、その抗酸化物質は尿酸であることを突き止めた。尿酸合成阻害剤アロプリノールを与えたワーカーは濃度依存的に生存率が低下した。尿酸量の違うワーカーおよびソルジャーに活性酸素検出試薬 DHR123 をマイクロインジェクションし、紫外線照射ののち蛍光顕微鏡で酸化ストレスを測定した結果、尿酸量の多い個体では酸化ストレスが抑制されていることがわかった。これらの結果から、尿酸が実際にシロアリ生体内で酸化ストレス軽減に働いている主要な抗酸化物質であることを明らかにした。

(7) シロアリが有性生殖と単為生殖を切り替える仕組みを解明

ヤマトシロアリの女王は、自らの後継女王を単為生殖で生産することで、遺伝的な不老不死化を実現しているが、王の存在下で有性生殖から単為生殖に切り替える仕組みは謎に包まれていた。本研究によりシロアリの女王が卵の表面にある卵門 (卵の表面にある精子が通るための孔) を閉じることによって、有性生殖から単為生殖に繁殖様式を切り替えることを明らかにした。この全く新しい単為生殖へのスイッチの仕組みは、メスがオスからの干渉を受けることなく単為生殖を行うことができることを意味しており、昆虫の単為生殖の新しい進化経路を示すものである。

(8) シロアリのゲノムインプリンティングによるカースト決定システムの解明

ヤマトシロアリのカースト決定にゲノムインプリンティングが関与していることを明らかにし、数理モデルによって子のカースト運命にかかるインプリンティングの効果を定量的に予測することを可能にした。また、インプリンティング強度と DNA メチル化酵素遺伝子 DNMT1 および DNMT3 の発現パターンが一致することから、インプリンティング因子として DNA のメチル化が関与していることが示唆された。

(9) シロアリの兵蟻における年齢依存的労働分業の発見および世界初の兵蟻フェロモンの特定

シロアリの社会における個体の年齢と役割分業の関係を分析し、高齢の兵隊アリが死亡リスクの高い最前線で天敵と戦う役割を担い、若い兵隊アリは死亡リスクの低い巣の中心部で王や女王の近衛兵としての役割を担っていることを明らかにした。余命の短い個体が死亡リスクの高い仕事を引き受けることによって巣全体として機会損失を最小化し、防衛力を効率的に維持していることが

示唆された。

さらに、長年謎に包まれていたシロアリの兵蟻フェロモンが、(-) - エレメンであることを世界で初めて特定し、さらにこの物質が、兵蟻分化の抑制だけでなく、ワーカーを兵蟻の側に引き留めておく機能と、昆虫病原菌の成長を抑える機能も有することを明らかにした。

(10) ミツバチ女王の長寿の分子基盤

羽化直後の天然の女王蜂と天然の働き蜂におけるクロマチン修飾の違いを解析した結果、ヒストン H3K4 のトリメチル化の割合が働き蜂に比べ女王蜂で減少しており、この H3K4 のメチル化の減少は、全身で見られた。また、ヒストン H3K27 のトリメチル化の割合が働き蜂に比べ女王蜂で全身において増加していた。この様に、女王蜂では働き蜂に比べクロマチン修飾を介したヘテロクロマチン化が進行していることが明らかとなった。また、女王蜂におけるヘテロクロマチン化は、ミツバチの長寿命化と正の相関があることも系統間の解析により明らかになった。

RNA-seq 解析の結果、働き蜂に比べ女王蜂で H3K4 メチル化酵素の遺伝子発現の減少と H3K27 脱メチル化酵素の遺伝子発現の減少が見られた。従って、女王蜂でのヘテロクロマチン化には、ヒストン修飾酵素が関与していることが明らかとなった。

さらに、RNA-seq 解析の結果から、女王蜂の解糖系、TCA サイクル、電子伝達系に關与する多くの因子の遺伝子発現が働き蜂に比べ低下しており、その発現低下は羽化6か月の女王蜂でも維持されていた。また、抗酸化に關与する遺伝子群の発現が女王蜂で働き蜂に比べ増加していた。これらの結果から、女王蜂では、エネルギー代謝関連酵素の発現を抑制することで省エネルギー仕様となり、さらに抗酸化機能を獲得することで寿命を延長している可能性が示唆された。

一方、脂肪酸の酸化に關与する因子の遺伝子発現は女王蜂で増加していた。女王蜂では電子伝達系の因子の遺伝子発現が低下していたが、生命維持活動のための ATP は生産する必要がある。電子伝達系で ATP を生産するためには、NADH などの還元力が必要である。また、TCA サイクルを止めないためにもアセチル CoA の供給も必要である。酸化での反応では、NADH などの還元力やアセチル CoA が供給される。女王蜂ではこの酸化が亢進しており、それにより NADH が十分供給されることで電子伝達系での ATP 生産を維持し、アセチル CoA を供給することで TCA サイクルも維持しているものと考えられた。これらの結果から、女王蜂では、糖質代謝や電子伝達系の関連酵素の発現を低下させているが、NADH やアセチル CoA を適宜供給することで効率よく ATP 生産を行い、無駄にエネルギーを消費することなく寿命を延長させている可能性が示唆された。これまでの寿命研究において、

寿命延長のメカニズムとしてエネルギー代謝を低下させることが第一の要因であると考えられており、今回の結果はその概念に沿うものである。女王蜂でのエネルギー代謝に關する因子の遺伝子発現の低下の倍率が顕著であったことから、女王蜂の長寿はエネルギー代謝の効率の高さが要因であることが示唆された。これらの結果から、女王蜂では働き蜂に比べクロマチン修飾を介したヘテロクロマチン化が進行し、これが女王蜂の長寿命化に關与していること、また、女王蜂の寿命増加は、エネルギー代謝の効率を高めることに起因している可能性が明らかとなった。

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 26件)

Matsuura K, Mizumoto N, Kobayashi K, Nozaki T, Fujita T, Yashiro T, Fuchikawa T, Mitaka Y, Vargo EL (2018) A Genomic Imprinting Model of Termite Caste Determination: Not Genetic but Epigenetic Inheritance Influences Offspring Caste Fate. *American Naturalist* 191: 677-690. DOI 10.1086/697238. 査読有

Yanagihara S, Suehiro W, Mitaka Y, Matsuura K (2018) Age-based soldier polyethism: old termite soldiers take more risks than young soldiers. *Biology Letters* 14: 20180025. DOI:10.1098/rsbl.2018.0025. 査読有

Tasaki E, Kobayashi K, Matsuura K, Iuchi Y (2018) Long-lived termite queens exhibit high Cu/Zn-superoxide dismutase activity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Volume 2018, Article ID 5127251. DOI: 10.1155/2018/5127251. 査読有

Mitaka Y., Mori N, Matsuura K. (2017) Multifunctional roles of a soldier-specific volatile as a worker arrestant, primer pheromone and an antimicrobial agent in a termite. *Proceedings of the Royal Society B* 284:20171134. DOI: 10.1098/rspb.2017.1134. 査読有

Tasaki E, Sakurai H, Nitao M, Matsuura K, Iuchi Y (2017) Uric acid, an important antioxidant contributing to survival in termites. *PLoS ONE* 12(6): e0179426. DOI:10.1371/journal.pone.0179426. 査読有

Mitaka Y, Kobayashi K, Matsuura K (2017) Caste-, sex-, and age-dependent expression of immune-related genes in a

Japanese subterranean termite, *Reticulitermes speratus*. *PLoS ONE* 12(4): e0175417. DOI:10.1371/journal.pone.0175417. 査読有

Tasaki, E., Kobayashi, K., Matsuura, K. & Iuchi, Y. (2017) An efficient antioxidant system in a long-lived termite queen. *PLoS ONE* 12, e0167412. DOI:10.1371/journal.pone.0167412. 査読有

Matsuura K. (2017) Evolution of the asexual queen succession system and its underlying mechanisms in termites. *Journal of Experimental Biology* 220, 63-72. DOI:10.1242/jeb.142547. 査読有

Yasuda, K., Yogo, Y., Sugimoto, H., Mano, H., Takita, T., Ohta, M., Kamakura, M., Ikushiro, S., Yasukawa, K., Shiro, Y., Sakaki, T. (2017) Production of an active form of vitamin D2 by genetically engineered CYP105A1. *Biochem Biophys Res Commun.* 486, 336-341. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.03.040.

Dedeine F, Dupont S, Guyot S, Matsuura K., Wang C, Habibpour B Bagnères AG, Mantovani B, Luchetti A (2016) Historical biogeography of *Reticulitermes* termites (Isoptera: Rhinotermitidae) inferred from analyses of mitochondrial and nuclear loci. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 94, Part B: 778-790. DOI: 10.1016/j.ympev.2015.10.020. 査読有

Mitaka Y, Kobayashi K, Mikheyev A, Tin MMY, Watanabe Y, Matsuura K (2016) Caste-specific and sex-specific expression of chemoreceptor genes in a termite. *PLoS ONE* 11(1): e0146125. DOI:10.1371/journal.pone.0146125. 査読有

Yashiro T and Matsuura K (2014) Termite queens close the sperm gates of eggs to switch from sexual to asexual reproduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 111 (48): 17212-17217. DOI:10.1073/pnas.1412481111. 査読有

〔学会発表〕(計 9 8 件)

松浦健二, シロアリのゲノム刷り込みによるカースト決定システム, 第 62 回日本応用動物昆虫学会, 2018 年

田崎英佑・小林和也・松浦健二・井内良仁 長寿昆虫シロアリ女王の優れた抗酸化システム. 第 71 回日本酸化ストレス学会 第 18 回日本 NO 学会 合同学術集会, 2018

Tasaki E, Kobayashi K, Matsuura K, Iuchi Y. Long-lived termite queens have an efficient antioxidant system. 第 62 回日本応用動物昆虫学会, 2018 年

Matsuura, K. Genomic imprinting and the evolution of caste determination system in termites, Annual Meeting of Population Ecology, 2017

松浦健二, シロアリの繁殖システムの進化と寿命, 第 36 回分子病理学研究会, 2017 年

Matsuura K. Sex and asex in termite societies. XXV International Congress of Entomology, 2016

〔図書〕(計 3 件)

Matsuura K. Sex, Genomic Imprinting and Social Evolution. In *Encyclopedia of Animal Behavior 2nd Ed.* (Jae Choe ed.), Elsevier, Oxford (in press).

〔その他〕

ホームページ等

京都大学昆虫生態学研究室 HP

<http://www.insecteco.kais.kyoto-u.ac.jp>

松浦健二: 京都大学 教育研究活動データベース

<http://kyouindb.iimc.kyoto-u.ac.jp/j/pR0zO>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松浦 健二 (MATSUURA, Kenji)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号: 40379821

(2) 研究分担者

鎌倉 昌樹 (KAMAKURA, Masaki)

富山県立大学・工学部・講師

研究者番号: 60363876

(3) 研究分担者

ミケエエヴ アレクサンダー (MIKHEYEV, Alexander)

沖縄科学技術大学院大学・生態・進化学

ユニット・准教授

研究者番号: 90601162

(4) 研究分担者

井内 良仁 (IUCHI, Yoshihito)

山口大学・大学院創成科学研究科・准教授

研究者番号: 60272069