

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450494

研究課題名(和文) 次世代シーケンシング技術を利用したアブラムシ社会の分子基盤および進化に関する研究

研究課題名(英文) Molecular and evolutionary analyses of social aphids by using next generation sequencing techniques

研究代表者

沓掛 磨也子 (Kutsukake, Mayako)

国立研究開発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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、階級分化、社会行動、分業といった興味深い生物現象を示す社会性アブラムシを対象にRNAseq解析をおこない、兵隊階級の分化や社会機能に関わる分子基盤およびその進化について解析した。その結果、調べた4種すべての兵隊で共通して発現亢進する遺伝子など、多数の興味深い遺伝子を同定した。兵隊特異的かつ大量に発現していたカテプシンB遺伝子およびカルパイン遺伝子については、その分子進化プロセスについても明らかにした。また、同一ゲノムから生じたゴール世代と2次寄主世代の比較から、両世代の兵隊において共通の遺伝子、特に筋肉やクチクラに関わる遺伝子が高発現していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Social insects show interesting biological phenomena such as caste differentiation, social behavior and division of labors. In this study, in order to understand a molecular basis of aphid social systems more deeply, RNA sequencing (RNA-seq) of four eusocial aphids were performed. As a result, we obtained a number of soldier-specific genes that were expressed in a soldier specific manner. Some of them were highly expressed in soldier nymphs of all species examined. In addition, we clarified molecular evolutionary processes of two soldier-specific genes, a cathepsin B gene and a calpain gene, and found that both genes have experienced same evolutionary events such as gene duplications and gain of the soldier-specific expression pattern. It was also found that two kinds of soldier caste that occurred in a gall generation and a secondary generation of a single aphid species utilized common genes, especially muscle- and cuticle-related genes, for their caste differentiation.

研究分野：社会性昆虫学、昆虫分子生物学

キーワード：社会性アブラムシ 兵隊階級 RNAseq

1. 研究開始当初の背景

近年、次世代シーケンサーが開発され、シーケンシング技術が飛躍的に進展したことにより、生物のゲノムおよび転写産物の配列情報を大量に取得することが格段に容易になった。これにより、これまで現象としては面白いにもかかわらず、遺伝子解析には限界があった非モデル生物においても、きわめて容易かつ実現可能な費用で、大規模かつ網羅的な遺伝子解析がおこなえるようになった。

ハチ、アリ、シロアリに代表される社会性昆虫は、その現象の面白さから、古くから研究の対象となってきた。従来は、生態学的、行動学的視点からの研究が数多くおこなわれてきたが、近年、ゲノム配列が解読されたミツバチを中心に社会ゲノム学 (Sociogenomics) が隆興し、階級分化や労働分業を制御する遺伝メカニズムが次第に明らかになってきた。しかし、昆虫類における社会性の進化を包括的に理解するためには、社会性起源が異なる様々な分類群について研究し、その共通性と多様性を明らかにすることが必須である。そこで本研究課題では社会性アブラムシに着目した。

社会性アブラムシのコロニーには、繁殖に専念する普通の個体と自己犠牲的な社会行動を示す兵隊という2つの階級が存在する (図1)。兵隊は、自分たちの仲間を守るために外敵を攻撃するほか、一部の種においてはゴール (巣) 内の清掃や壊れたゴールの修復といった労働をおこなう。真社会性の種では、兵隊は形態的に特殊化し、脱皮・成長せず、不妊である。ところが興味深いことに、アブラムシは単為生殖によって繁殖するため、兵隊と普通個体は同一ゲノムを持つ遺伝的クローンである。つまり、階級間に見られる形態、妊性、行動面での違いは、すべて遺伝子発現の差異によって生じると言える。ではどのような遺伝子が兵隊特異的に発現し、兵隊の分化や社会機能に関わっているのだろうか。これまでこの分野においては、兵隊特異的に発現する攻撃毒プロテアーゼの存在が明らかになっていたが (Kutsukake et al. 2004, 2008)、それ以外の知見は皆無であった。

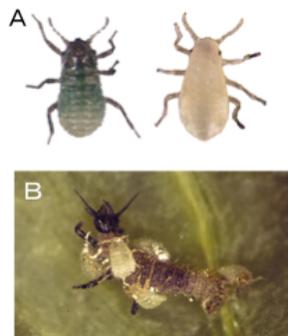


図1 社会性アブラムシにおける階級分化
A: 兵隊幼虫 (左) と普通幼虫 (右)
B: 外敵 (中央) を攻撃する兵隊幼虫

2. 研究の目的

本研究課題では、階級分化、社会行動、分業といった興味深い生物現象を示す社会性アブラムシを対象に、次世代シーケンシング技術を駆使したトランスクリプトーム解析 (RNAseq 解析) をおこない、アブラムシ社

会の基盤となる分子機構およびその進化について、より深い理解を得ることを目的とする。これを達成するため、以下の課題について取り組んだ。

(1) 兵隊の階級分化や生物機能に関わる遺伝子基盤の解明

真社会性アブラムシ4種を対象に、階級間で発現変動している遺伝子、特に兵隊階級で発現亢進している遺伝子を網羅的に同定する。これらの生物学的機能や表現型との関連について解析するとともに、種間比較から、その共通点と相違点を明らかにする。

(2) 兵隊の攻撃毒タンパク質の多様性と進化の解明

兵隊の攻撃毒として知られるカテプシン B プロテアーゼに着目し、社会性アブラムシにおけるこの遺伝子の進化と起源について明らかにする。また、カテプシン B 以外の攻撃毒候補遺伝子を探索し、攻撃毒の多様性や進化についての洞察を得る。

(3) 同一ゲノムから生じる2種類の兵隊のトランスクリプトーム比較

寄主転換をおこなうササコナフキツノアブラムシを対象に、エゴノキに寄生するゴール世代とササに寄生する2次寄主世代の兵隊における発現遺伝子レパートリーを比較し、アブラムシ類における兵隊階級の進化を遺伝子レベルで考察する。

3. 研究の方法

(1) cDNA ライブラリー作製およびシーケンス解析

本研究で用いた社会性アブラムシは、ヒラタアブラムシ亜科 (Hormaphidinae) ツノアブラムシ族 (Cerataphidini) に属する以下の真社会性アブラムシ4種5サンプルである。

- ハクウンボクハナフシアブラムシ (*Tuberaphis styraci*), ゴール世代
- ササコナフキツノアブラムシ (*Ceratovacuna japonica*), ゴール世代および2次寄主世代
- ウラジロエゴノキアブラムシ (*Ceratoglyphina styracicola*), ゴール世代
- ジャムリツエゴアブラムシ (*Cerataphis jamuritsu*), ゴール世代

Total RNA は、単一コロニーから、様々な発生段階または階級 (兵隊幼虫、普通幼虫、無翅成虫、翅芽幼虫、有翅成虫など) を10~100個体程度選別し、RNAiso Plus および RNeasy Mini キットを用いて抽出した。cDNA ライブラリーは、RNA 1 µg から TruSeq™ RNA Sample Preparation キットを用いて、添付マニュアルに従い作成した。Biological replicate

は N=3 とした。RNA および cDNA ライブラリーは、Agilent 2100 バイオアナライザーを用いて品質をチェックした。各ライブラリーを 10 μM になるように混合し、HiSeq2000/2500 で paired end, 100 bp のシーケンス解析をおこなった。

(2) データ解析

データ解析は、遺伝研が公開しているデータ解析システム Maser (<https://cell-innovation.nig.ac.jp/members/maser3/top.do>) を主に使用した。まず、シーケンス解析で得られた配列を Trinity を用いて *de novo* アセンブルし、次に、得られた contig に対してリードのマッピングとカウントをおこない、遺伝子発現量 FPKM (Fragments Per Kilobase of exon per Million mapped fragments) を算出した。マッピングには BWA-mem を使い、必要に応じて Integrative Genomics Viewer (IGV) を用いて可視化し、結果を精査した。2 群間での遺伝子発現の有意差検定は EdgeR および DEGseq を用いて、両者ともに $p < 0.05$ を満たした contig を発現差がある遺伝子と評価した。本研究ではこれに加えて、兵隊での遺伝子発現量が他の各群 (普通幼虫、無翅成虫、翅芽幼虫) よりも 2 倍以上高かった遺伝子を兵隊特異的発現遺伝子とみなした。配列のアノテーションは Blast 検索により、E-value $< 1e^{-5}$ の条件でおこなった。Gene Ontology (GO) 解析は Blast2GO を用いておこなった (<https://www.blast2go.com>)。

(3) 分子系統解析

分子系統樹は、各遺伝子のアミノ酸配列を ClustalW によりアラインメントした後、MEGA6 を用いて作成した。系統樹推定 NJ 法を用い、繰り返しは 1000 回おこなった。

(4) 分子生物学的解析

リアルタイム RT-PCR: 鋳型となる cDNA は、兵隊および普通幼虫の Total RNA から PrimeScript RT Master Mix を用いて合成した。リアルタイム PCR は SYBR Premix ExTaq II を用いて Mx3000p により解析した。内部標準遺伝子は Elongation factor 1α 遺伝子を用いた。

ウエスタンブロッティング: SDS-PAGE および PVDF 膜への転写は一般的な方法を用いておこなった。カルパインの特異的ペプチド抗体は、抗原性予測の結果をもとに合成したペプチド LFYSKRPKYQITW をウサギに免疫して作製した。抗体反応のシグナル検出には Elite ABC キットを使用した。

4. 研究成果

(1) ゴール世代兵隊に特異的発現する遺伝子の同定

シーケンス解析および *de novo* アセンブリの結果の概要を図 2 に示す。全体的に良質かつ十分量のデータが得られたので、さらに詳細な解析をおこなった。

サンプル	ハクウンボクハナフシアブラムシ	ササコナフキツノアブラムシ	ウラジロエゴノキアブラムシ	ジャムリツエゴアブラムシ
	ツニアブラムシ族 ヤドリキアブラムシ属	ツニアブラムシ族 コナフキツノアブラムシ属	ツニアブラムシ族 カタツアブラムシ属	ツニアブラムシ族 ヒラツアブラムシ属
	ゴール世代	ゴール世代 二次寄生世代	ゴール世代	ゴール世代
HiSeqリード数	290.1M	253.0M	266.3M	112.2M
Contig数	144,385	125,958	142,374	107,809
N50 (bp)	3,550	2,934	3,150	3,429
ショウジョウバエの遺伝子と 相関性あり (%)	44.9	43.3	44.1	41.7
エンドヒゲナガアブラムシ の遺伝子と相関性あり (%)	61.2	61.0	60.3	58.5

図2 RNAseq解析の概要

それぞれの種において兵隊特異的発現遺伝子を抽出した結果、ハクウンボクハナフシアブラムシで 154 個、ササコナフキツノアブラムシで 94 個、ウラジロエゴノキアブラムシで 308 個、ジャムリツエゴアブラムシで 171 個の遺伝子が同定された。GO 解析から、これらは主に single-organism process, metabolic process, cellular process に関わる遺伝子であった。Local blast 検索により 4 種に共通して兵隊特異的発現する遺伝子を調べたところ、リパーゼ、CG9572、drop dead、シトクロム P450 に相関性を示す遺伝子であることがわかった。これらはいずれも 2 齢兵隊幼虫で特に高い発現量を示した (図 3)。兵隊で高発現している理由については、リパーゼは兵隊が攻撃や労働をおこなうために必要なエネルギー生産に関与しているものと考えられる。drop dead はショウジョウバエでクチクラの発達に関与することから、兵隊の外骨格のクチクラ化に関与している可能性がある。またシロアリでは、シトクロム P450 をコードする *Neofem4* が女王特異的な匂い物質の生産に関与することが知られており、アブラムシにおいても階級特異的の化学物質の生産や個体間化学コミュニケーションに関わっている可能性が考えられる。

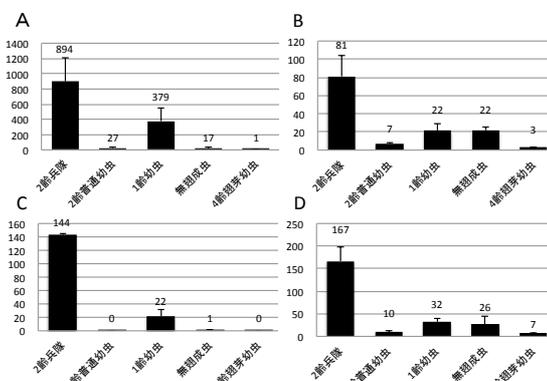


図3 社会性アブラムシ4種に共通して兵隊で発現亢進している遺伝子

A: リパーゼ, B: CG9572, C: drop dead, D: シトクロム P450

グラフの縦軸は遺伝子発現量 FPKM。いずれもハクウンボクハナフシアブラムシでの結果を示した。

(2) 攻撃毒カテプシン B 遺伝子の起源と進化

先行研究から、ハクウンボクハナフシアブラムシのカテプシン B は兵隊特異的に発現し、攻撃毒として機能するプロテアーゼである (Kutsukake et al. 2004)。本研究では、この攻撃毒カテプシン B 遺伝子の進化と起源について詳細に解析した。まず、得られた contig からカテプシン B 様配列を探索したところ、ハクウンボクハナフシアブラムシから 13 種類、ササコナフキツノアブラムシから 15 種類、ウラジロエゴノキアブラムシから 12 種類、ジャムリツエゴアブラムシから 11 種類の配列が見つかった (図 4)。これらの遺伝子発現について調べたところ、ハクウンボクハナフシアブラムシにおいては、攻撃毒カテプシン B 遺伝子は兵隊特異的かつ大量に発現していたが、それ以外のカテプシン B 遺伝子はすべて構成的 (どの個体でも同程度に発現) に発現し、攻撃毒タイプよりも発現レベルは低かった。一方、ハクウンボクハナフシアブラムシ以外の 3 種においては、攻撃毒タイプを含めたすべてのカテプシン B 遺伝子が構成的かつ低レベルで発現していた。以上の結果から、1) 社会性アブラムシでは少なくとも 11~15 個のカテプシン B 遺伝子がゲノム上で多重遺伝子族を形成しており、2) そのうちの 1 コピーが兵隊特異的発現パターンを獲得し、おそらくその後攻撃毒という新規機能を獲得した、3) この分子進化イベントはハクウンボクハナフシアブラムシ (を含む一部の系統群) に限定して起きた、ということが明らかになった。興味深いことに、ジャムリツエゴアブラムシの攻撃毒カテプシン B 遺伝子は、途中でストップコドンを含む偽遺伝子に変化していた。このように、カテプシン B 遺伝子は、遺伝子が重複していく過程で、発現様式の変化、新規機能の獲得、偽遺伝子化といったイベントを経験し、ダイナミックに変化してきたことが明らかになった (図 4)。

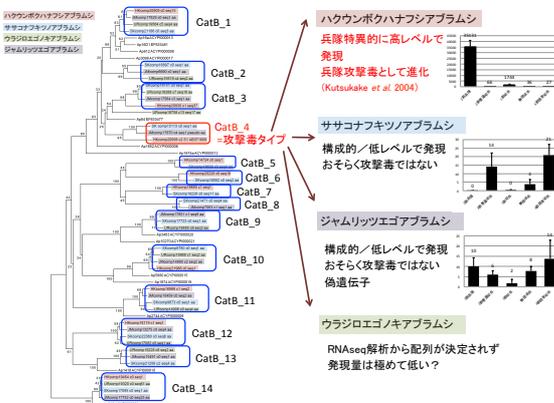


図4. 攻撃毒カテプシンB遺伝子の分子進化
ハクウンボクハナフシアブラムシのCatB_4のみ兵隊特異的に発現し、それ以外の遺伝子はすべて構成的に発現した。

(3) カテプシン B 以外の攻撃毒候補遺伝子

RNAseq 解析のデータを精査したところ、攻撃毒カテプシン B 遺伝子のように、兵隊特異的かつ大量に発現している遺伝子が見つ

かった。ササコナフキツノアブラムシにおいてはカルパインというプロテアーゼ遺伝子が、ウラジロエゴノキアブラムシとジャムリツエゴアブラムシにおいてはショウジョウバエ CG9701 に相同性を示す糖加水分解酵素遺伝子が、それぞれ兵隊において顕著に発現亢進していることがわかった (図 5)。これらは兵隊の社会機能に直接重要な役割を果たしている可能性が考えられる。今回は、カルパイン遺伝子について以下の詳細な解析をおこなった。

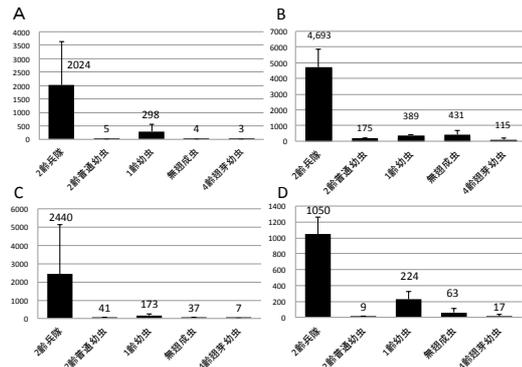


図5. 兵隊特異的かつ大量発現している遺伝子
(A) ササコナフキツノアブラムシのカルパイン遺伝子, (B) ジャムリツエゴアブラムシのCG9701様遺伝子, (C, D) ウラジロエゴノキアブラムシCG9701様遺伝子。(C)と(D)は異なる遺伝子

カルパイン遺伝子の定量 RT-PCR をおこなったところ、兵隊で普通 2 齢幼虫の約 500-800 倍高い発現量を示し、RNAseq の結果とほぼ一致した。SDS-PAGE による解析では、推定分子量に近い約 90kD のタンパク質が兵隊に多く存在し、特異的ペプチド抗体を用いたイムノブロット解析においてシグナルが検出された。さらに、この遺伝子の分子進化について解析した。ササコナフキツノアブラムシにおいては、4 種類のカルパイン遺伝子が存在した。図 5A のカルパイン遺伝子は兵隊で高発現していたのに対し、それ以外の 3 遺伝子は、構成的かつ低レベルで発現していた (図 6)。一方、ササコナフキツノアブラムシ以外の 3 種においては、カルパイン遺伝子は 3 コピー存在し、いずれも構成的かつ低レベルでの発現量を示した (図 6)。興味深いことに、ササコナフキツノアブラムシ兵隊特異的タイプのオーソログ遺伝子は、これらの種からはまったく見つからなかった。よって、オーソログ遺伝子がゲノム上に存在し

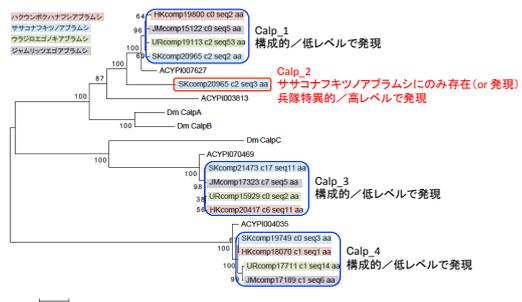


図6. カルパイン遺伝子の分子進化と遺伝子発現
RNAseq解析の結果、それぞれの種から3~4個のカルパイン遺伝子が同定された。ササコナフキツノアブラムシで見つかったカルパイン遺伝子(Calp_2)だけが兵隊特異的に高レベルで発現していた。

ない、またはほとんど発現していないという可能性が考えられた。以上の結果を踏まえて考察すると、社会性アブラムシには3~4コピーから成るカルパイン多重遺伝子族が存在し、その中の1コピーがササコナフキツノアブラムシにおいて兵隊特異的に発現するようになったと考えられた。このような分子進化パターンは、攻撃毒カテプシンBのそれと極めて似ており、カルパイン遺伝子が兵隊で非常に高い発現量を示すことも考慮すると、この遺伝子の産物が兵隊の新たな攻撃毒として使われている可能性も十分に考えられる。今後、発現組織解析や様々な分子解析を通じて、その生物学的機能について明らかにしていく予定である。

(4) ゴール世代と2次寄主世代のトランスクリプトーム比較

ササコナフキツノアブラムシは1年のうちで2種類の寄主植物を利用する真社会性アブラムシで、ゴール世代と2次寄主世代の両世代において、進化起源および特徴の異なる兵隊を産生する。これらの兵隊階級は、同一ゲノムを持つにもかかわらず、形態、攻撃方法、齢期など様々な面で多型を示す。

ササコナフキツノアブラムシのゴール世代と2次寄主世代でトランスクリプトーム比較をおこなった。RNAseq解析の結果、2次寄主世代においては、197の遺伝子が兵隊特異的に発現しており、そのうち24遺伝子はゴール世代の兵隊でも特異的に発現していた。2次寄主世代兵隊で特に高発現していたのは、ミオシン、アクチン、トロポニンといった筋肉関連遺伝子やクチクラタンパク質遺伝子であり、このことは2次寄主世代兵隊に特徴的な攻撃方法、すなわち顕著に肥大化/クチクラ化した前脚で相手に組みつきツノで刺すという行動に密接に関わっていると考えられた(図7A-C)。また、これらの遺伝子はゴール世代兵隊においても過剰に発現している傾向にあった(図7D-F)。これまでの様々な研究から、本種の兵隊階級はまずゴール世代で進化し、その後2次寄主世代でも進化したと考えられている。このことから、進化の過程において、ゴール世代兵隊ですでに発現していた兵隊分化に関わる遺伝子が2次寄主世代の一部の個体においても発現するようになったという可能性が示唆された。このように、同一ゲノムに由来する進化起源が異なる兵隊階級の分化機構に

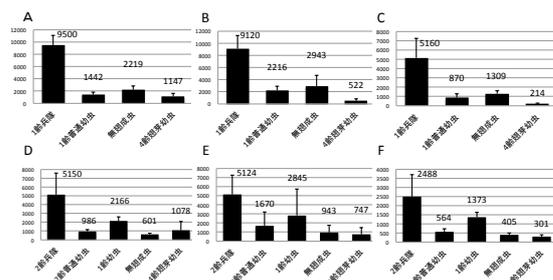


図7. ササコナフキツノアブラムシのゴール世代と2次寄主世代の兵隊で共通して高発現する遺伝子 (A, D) ミオシン(軽鎖)遺伝子 (B, E) アクチン遺伝子 (C, F) トロポニン遺伝子 (A-C) 2次寄主世代、(D-F) はゴール世代

において、多数の遺伝子が共通して使い回されているということが本研究で明らかになった。その一方で、ゴール世代兵隊で顕著に高い発現量を示したカルパイン遺伝子は、2次寄主世代兵隊ではほとんど発現していなかった。このことから、カルパイン遺伝子はゴール世代兵隊に特異的な生物機能に関わっている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計5件)

- ① 査掛磨也子ら、兵隊アブラムシで特異的に発現する攻撃毒タンパク質の進化、日本動物学会第86回大会、2015年9月17日、新潟コンベンションセンター朱鷺メッセ(新潟県)
- ② 査掛磨也子ら、兵隊アブラムシで特異的に発現する攻撃毒タンパク質の進化、第59回日本応用動物昆虫学会、2015年3月28日、山形大学(山形県)
- ③ 査掛磨也子ら、昆虫社会の成立・維持機構と進化に関する研究、日本動物学会第84回大会、2013年9月27日、岡山大学(岡山県)
- ④ 査掛磨也子ら、RNAseq法による社会性アブラムシにおける表現型多型の分子基盤解析、日本動物学会第84回大会、2013年9月26日、岡山大学(岡山県)

[その他]

産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門 生物共生進化機構研究グループ HP
<http://staff.aist.go.jp/t-fukatsu/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

査掛磨也子 (KUTSUKAKE MAYAKO)
 国立研究開発法人 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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

重信秀治 (SHIGENOBU SHUJI)
 大学共同利用期間法人 自然科学研究機構
 基礎生物学研究所
 生物機能解析センター 生物機能情報解析室
 特任准教授
 研究者番号: 30399555