

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660264

研究課題名(和文)多胚性寄生蜂を用いた胚子増殖関連遺伝子の探索

研究課題名(英文)The search for polyembryogenesis-related genes from the polyembryonic parasitoid

研究代表者

岩淵 喜久男(iwabuchi, kiku)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：00203399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：多胚生殖は、1卵から無性的に多数のクローン個体が発達する生殖様式である。しかし、その分子メカニズムについては未解明である。多胚性寄生蜂では1卵から2000頭以上の胚子が発達することが知られている。この寄生蜂の胚子増殖の開始期ならびに胚子増殖の促進誘導時に発現変動する遺伝子をトランスクリプトーム解析により調べた結果、細胞周期、代謝に関わる遺伝子群のほか、複数の新規遺伝子が発現増加していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Polyembryony is a unique style of development in which many embryos are clonally produced from a single egg. To date, the genetic mechanisms underlying polyembryogenesis is not clear. In the polyembryonic parasitoid, more than 2000 adults are produced from a single egg. The transcriptome analysis at the onset of polyembryogenesis or the induction of polyembryogenesis of this parasitoid showed many differentially expressed genes, such as cell cycle, cellular adherence, metabolism, and several novel genes.

研究分野：応用昆虫学

キーワード：多胚生殖 寄生蜂

1. 研究開始当初の背景

多胚生殖は、偶発的に起こるものとしてはヒトの一卵性双生児に代表されるが、通常の生殖様式として多胚生殖をおこなうものは少なく、哺乳類では唯一ココノオビアルマジロ、それ以外では一部の寄生性昆虫で知られるにすぎない。多胚生殖が起こるメカニズムの解明は発生生物学において極めて重要な課題であるが、これまでほとんど未解明の状態にある。本研究で対象とする多胚性寄生蜂は、通常の生殖様式として1卵から無性的に2,000頭以上のクローン個体を形成するもので、多胚増殖の程度と材料の取り扱いやすさで群を抜いている。多胚性寄生蜂は、害虫の生物的防除資材として使われてきた歴史があることから、一般的な事項についてはすでに多くの知見が得られている。トビコバチ科の多胚性寄生蜂では、宿主に産卵された1卵から多数(約2,000個)の遺伝的に同一なクローン胚子を無性的に作り出す。胚子は、宿主が終前齢(5齢)になった時に形態形成を開始し、終齢2日目に成虫まで発育する生殖幼虫となる。申請者は、これまで本寄生蜂の胚子培養法の研究、宿主胚子への分子擬態による親和的侵入機構の解明研究、さらに一部の胚子は早熟的に兵隊幼虫になるが、この幼虫の機能の解明研究、などを世界に先駆けて行ってきた。これらの研究を通して、培養条件下で胚子増殖の制御が可能になるなど、多胚増殖の機構解明に向けた挑戦が可能となった。

2. 研究の目的

桑実胚は、64個の胚細胞群を最外膜細胞が包み込んだ形状をしており、胚子の分裂による増殖は、最外膜細胞が胚細胞群に向けて陥入することで起こる。発生の過程で、最初の胚子分裂は、寄生後60時間後(桑実胚形成後48時間後)に起こる。これまでの研究で、この過程は培養条件下で再現可能であり、さらに胚子分裂は幼若ホルモンによって促進されることを明らかにしてきた。多胚生殖は、桑実胚の繰り返し起こる分裂と長期

にわたる totipotency の維持によって起こると考えられる。そこで本研究では、これら胚子増殖に関わる遺伝子の探索を目的とした。具体的には、次世代シーケンサーを用いて、胚子分裂前後に現れる発現変動遺伝子群をトランスクリプトーム比較解析により明らかにするとともに、関連候補遺伝子を特定する。

キンウワバトビコバチを含む非モデル生物では、ゲノムが解読されておらず、オミックス解析を行うためのリファレンス情報が乏しいため、トランスクリプトームの網羅的解析は困難とされてきた。しかし、近年ではこのようなリファレンス情報の乏しい非モデル生物でも、2種類のサンプル比較から、関連遺伝子群を網羅的に解析することが可能になってきている。これまで申請者は、次世代シーケンサーを用いて、カイコ幼虫脂肪体のトランスクリプトーム解析を行い、培養条件下で起こる遺伝子発現の変化を網羅的に解析してきた。そこで本研究は、この経験を生かして、次世代シーケンサーを用いて、胚子分裂に向かう桑実胚と、胚子分裂抑制下の桑実胚との間で、発現量が変動した遺伝子を得る目的でトランスクリプトーム比較解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 供試虫

寄主は東京都府中市ならびに千葉県香取市で採取したキクキンウワバ *Thysanoplusia intermixta* を実験室内で累代飼育して実験に用いた。寄生蜂キンウワバトビコバチ *Copidosoma floridanum* は千葉県香取市、東京都東村山市のゴボウ畑で採集したキンウワバ亜科昆虫の幼虫から羽化したものを累代飼育して使用した。寄主は 21 ± 1 、16L8D の条件下で飼育した。成虫は内側にパラフィン紙を巻いた直径17cm、高さ23cmのガラス製の広口ビン内に、羽化後2日目の雄5頭、雌6頭を入れ、脱脂綿に染み込ませた10%三

温糖水溶液を与えて飼育した。卵は3%ホルマリン水溶液で30分間表面殺菌し、その後、流水で30分間水洗した。卵から3齢までは直径9cmのプラスチック製シャーレ内で40~50頭ずつ、25、16L8Dで、3齢以降は長さ20cm、幅16cm、高さ5cmのプラスチック製容器内で20~25頭ずつを、21±1、16L8Dで人工飼料(川崎ら, 1987を一部改変)を与えて飼育した。寄生蜂は、9cmシャーレに入れた寄主卵50~100個に対して、キンウワバトビコバチ成虫を50~60頭を放すことで寄生させ、被寄生寄主は未寄生寄主と同様の条件下で飼育した。寄主幼虫体内で蛹化したキンウワバトビコバチは直径3cm、長さ19.5cmの大型試験管内に移し、羽化までは25、羽化後は15、16L8Dで飼育した。餌には脱脂綿に染み込ませた50%蜂蜜水溶液を与えた。雌雄判別は、実体顕微鏡(Leica EZ4D)下で、産卵管と雄性交尾器の差異によって行った。

(2)キンウワバトビコバチの桑実胚と多胚からのRNAの抽出

寄主から抽出した桑実胚と多胚からのRNA抽出

寄生には羽化後10日以内のキンウワバトビコバチの未交尾雌を用い、産下16~17時間目の寄主卵に雄卵を寄生させた。被寄生寄主卵は、寄生後20時間目(桑実胚)および70時間目(多胚)にそれぞれ、70%エタノールで10分間表面殺菌後、クリーンベンチ内の無菌条件下で、ろ紙上で風乾した。その後、クリーンベンチ内で、35mmペトリディッシュ(FALCON^R 1008)中に滴下した10μLの改変MGM450培地(Iwabuchi, 1991)中で解剖した。実体顕微鏡(CARL ZEISS)下で微針(No.251シガ微針、志賀昆虫普及社)を用いて卵殻と漿膜を取り除き、倒立顕微鏡(Nikon TMS)下で、マイクロディスペンサー(Drummond^R 10μL)に装着したガラスキャピラリーを用いて、キンウワバトビコバチ桑

実胚を、1.5mLのチューブ内に入れた改変PBS(50μL)中に回収した。多胚回収時は、実体顕微鏡下で解剖し、倒立顕微鏡下で多胚が存在するのを確認し、ピンセットで1.5mLのチューブに寄主胚子ごと回収した。その後、チューブ内に300μLのTRIzol LS(Invitrogen, CA, USA)を添加後ホモジナイズし、RNA抽出まで-80℃下で保存した。寄生蜂の胚子は寄主の卵黄あるいは寄主胚子体内より解剖によって抽出しているため、寄主由来の細胞及びRNAが混入している可能性がある。そこで、寄主のRNA情報を差分することを考え、キクキンウワバ胚子は未寄生の卵を用い、キンウワバトビコバチ胚子回収法と同様に、クリーンベンチ内で解剖し、産下後37時間目、87時間目の胚子を、改変PBS入り1.5mLチューブ内に回収した。その後、300μLのTRIzol LS(Invitrogen, CA, USA)を添加後ホモジナイズし、RNA抽出まで-80℃下で同様に保存した。添加したTRIzolの1/5量のクロロホルムをチューブに添加し、室温で15秒間振盪した。その後室温で2分間放置した後、4、15,000×gで15分間遠心し、透明な上清のみを新しい1.5mLチューブに移した。移した上清と同じ量の70%エタノールを添加しピペティングにより混和した。この液体をillustra RNAspin(GE Healthcare)のRNAバインディングカラムに添加し、マニュアルに従ってtotal RNAを精製した。桑実胚サンプルは4区画、多胚サンプルは3区画、寄主胚子サンプルはそれぞれ1区画ずつtotal RNAを精製した。精製したtotal RNAはNanoDropとAgilent 2200 TapeStation(Agilent Technologies)で品質を確認した。

培養条件下でのJH添加効果

本種の多胚形成は培養条件下で幼若ホルモン(JH)により促進される(Iwabuchi, 1996)。2細胞期よりJH(5μl)を培地に添加し、培養2日目のトランスクリプトームを比較した。

培地、RNA の抽出方法等は上記と同様である。

(3) トランスクリプトーム解析

全てのサンプルは、TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation Kit (Illumine, San Diego, CA, USA) を用い、マニュアルに従って行った。Poly-T 磁気ビーズによって、0.1~1 µg の total RNA から mRNA を精製した。精製した mRNA を断片化し、cDNA に逆転写した。ライブラリ調整後、Agilent 2200 TapeStation (Agilent Technologies) を用いて品質確認を行った。その結果、全てのサンプルがシーケンスに十分な品質と量があることを確認した。また、シーケンスライブラリの平均塩基長についても確認した。シーケンス反応は NextSeq 500 (Illumina) を用いて行った。調整したシーケンスライブラリを解析することで、その核酸配列及び配列断片量を解析した。シーケンス反応で得られた配列 (リード) の品質確認は、FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) を用いて行った。確認後、データのトリミングとリードの除去を行った。

寄生蜂キンウワバトビコバチ、寄主キクキンウワバはともにこれまでゲノム配列は決定されていない。一方、前述のように桑実胚と多胚のサンプルには寄主由来の配列情報が混入している可能性がある。そこで、寄主と寄生蜂の配列情報が混在しているとの想定下でアセンブルを行い、その後寄主の配列情報を基に、寄主由来と考えられるリードを除去することで、寄生蜂胚子のトランスクリプトームリファレンス配列を取得することにした。クオリティコントロールを行ったサンプルデータをもとにして、velvet、velvetg (<http://www.ebi.ac.uk/~zerbino/velvet/>)、oases (<https://www.ebi.ac.uk/~zerbino/oases/>) を用いてアセンブルを行った。アセンブルした配列に対

し、Bowtie (Langmead et al., 2009) を用いてマッピングした (オプション: `-n 2 -l 36 -best`)。その後、寄主胚子サンプル由来のリードがマッピングされたコンティグを寄主由来のものとして除外し整理することで、寄生蜂トランスクリプトーム解析用リファレンス配列を構築した。発現定量解析は、マッピングの結果から、コンティグごとにマップされた寄生蜂由来のリード数を算出することで行った。発現比較解析は、発現定量解析の結果をもとに、統計解析ソフト R (ver. 3.1.0) の TCC (Sun et al., 2013) パッケージを用い、統計的に有意な発現変動遺伝子 (FDR<0.05) であるものを抽出した。発現変動遺伝子に機能アノテーションを付与するために、寄生蜂キョウソヤドリコバチの mRNA をデータベースとして、BLAST+ (ver. 2.2.30) の tblastx による配列類似性検索を行った (e-Value<10 でカットオフ)。

4. 研究成果

(1) total RNA の精製とシーケンスライブラリの調整

桑実胚については 90 個 × 4 サンプル、多胚は 70 個 × 3 サンプルから total RNA を精製した。寄主胚子は産下後 37 時間目のものを 90 個体分、産下後 87 時間目のものを 60 個体分から total RNA を精製した。桑実胚サンプルからは 100ng の total RNA から、その他のサンプルは 1 µg の total RNA から、TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation Kit のプロトコールに従い mRNA を精製し、シーケンス用の cDNA ライブラリを構築した。

(2) アセンブルとマッピング

velvet/oases によってアセンブリした結果、リード長は n50=226 であり、最大長が 5002 であった。また、総塩基数は 46,155,398 本であった。アセンブルした配列に対して、Bowtie を用いてマッピングを行った。マップ

率は、寄主胚子で 22.19%、桑実胚で 28.00%、多胚で 27.43%であった。寄主胚子のリードがマッピングされたコンティグを、寄主由来のものとして除外し整理することで、寄生蜂トランスクリプトーム解析用のリファレンスを得た。

(3) 寄主情報の差分条件の検討

マッピング時にリード数の許容範囲を 0~10 まで変化させ、寄生蜂の遺伝子由来のコンティグ数を推定した。寄主のリード数を 5 本まで許した場合、ピークが 2ヶ所に現れ、寄主由来の情報が除去できていないことが推察された。そこで、寄主のリード数の許可を 0 本までとし、寄主胚子のコンティグに 1 本でもマッピングされたコンティグは寄主由来の遺伝子とした。そのため、寄主と同じ配列をもつ遺伝子は、寄生蜂が持っていた場合でも除外されることになる。この条件で、寄生蜂の発現遺伝子数は 37480 個であった。桑実胚では 33902 個、多胚では 24431 個の遺伝子が発現していた (図 1)。

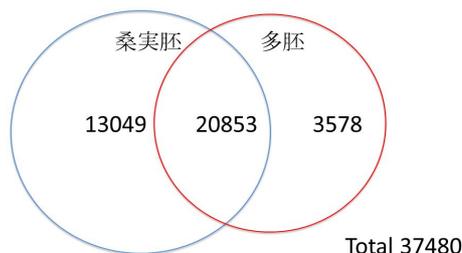


図 1. 桑実胚と多胚における発現遺伝子数

(4) 発現定量と比較解析

マッピングの結果から得られたコンティグごとに、マップされた寄生蜂由来のリード数を算出した。その結果をもとに、統計解析ソフト R の TCC を利用し解析を行った。TCC では trimmed mean of M values (TMM) 正規化 (Robinson and Oshlack, 2010) が実装されている。TMM 正規化は、少数の高発現遺伝子を取り除き正規化を行った。TCC を用いて行った有意検定で

は、False discovery rate (FDR) が 0.05 未満であった発現変動遺伝子として、306 個の遺伝子を得ることができた。MA プロット (図 2) の横軸と縦軸はそれぞれ下記で示される。

$$M = \log_2(G2) - \log_2(G1)$$

$$A = (\log_2(G2) + \log_2(G1)) \cdot 1/2$$

G1: 多胚サンプル群

G2: 桑実胚サンプル群



図 2. 桑実胚と多胚の発現変動遺伝子解析

グラフの上部に、桑実胚で発現量を増加させた遺伝子が、下部に多胚で発現量を増加させた遺伝子がプロットされている。片方の実験区でリード数が 0 の遺伝子は対数変換できないため、便宜的に、 $M = -1.8$ 付近にプロットした。桑実胚で発現量が増加していた遺伝子は計 10 個、多胚で発現量が増加していた遺伝子は 296 個であった。

(5) 配列類似性検索

抽出した発現変動遺伝子、306 個について、キョウソヤドリコバチの mRNA をデータベースとして tblastx による配列類似性検索を行った。その結果、306 個中 305 個の発現変動遺伝子に対して、アノテーションを付与することができた。

桑実胚で発現が増加していた遺伝子を個別に見ると、heat_shock_protein、doublesex_(Dsx)、transcript_variant_1、broad-complex_core_protein_isoforms_1/2/3/4/5-like、dystonin、transcript_variant_X1、ADAM_17-like_protease、transcription_factor_Ken、enolase-phosphatase_E1-like、ERI1_

exoribonuclease_3-like、WD_repeat-containing_protein_7、transcript_variant_X6であった。このうち、transcription_factor_Kenとheat_shock_protein_68-likeは桑実胚でのみ発現していた。一方、多胚で発現が増加していた遺伝子を見てみると、トリプシンをはじめとするセリンプロテアーゼファミリーやチトクローム P450 関連因子、血管内皮増殖因子受容体や多くの金属結合性タンパク質の発現がみられた。

また、多胚増殖が停止し、形態形成にスイッチが切り替わる時期の発現変動遺伝子についても調べた結果、桑実胚期と多胚期の発現変動遺伝子には、複数の新規の遺伝子の発現が含まれていた。これらの中には totipotency の維持、多胚分裂に関わる遺伝子が含まれている可能性が考えられる。

(6) JH による多胚形成促進の影響

培養した 2 細胞期胚は 10 時間で桑実胚となり、培養開始から 4 日目に多胚形成に向かう最初の胚子分裂が起こる。一方、JH を培地に添加した場合には 3 日目に胚子分裂が起こり、多胚形成率も高くなる。そこで、2 日目に RNA を抽出し、発現変動を解析した結果、glycerol-3-phosphate dehydrogenase、innexin、M-phase inducer phosphatase-like などの遺伝子で発現が高くなっていることが明らかとなった。この結果から、JH 添加による多胚形成の促進は、多胚形成に特異的な遺伝子よりも、代謝と細胞間接着など、通常の遺伝子の発現が増強されることで誘導されていることが示唆された。

多胚現象は、多くの昆虫の発生過程で発現する遺伝子の異時的発現と多胚特異的遺伝子の発現の両者が関わっている可能性があり、本研究で得られた遺伝子群がそれらの候補になるものと考えられる。

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)

[学会発表](計 3 件)

1. 坂本卓磨、岩淵喜久男、キンウワバトビコバチの多胚期における 20-Hydroxyecdysone の効果、日本応用動物昆虫学会第 61 回大会、2017 年 3 月 28 日、東京農工大学(東京都・小金井市)

2. 坂本卓磨、岩淵喜久男、多胚る多胚形成の分子メカニズムの解明、日本応用動物昆虫学会第 60 回大会、2016 年 3 月 28 日、大阪府立大学(大阪府・堺市)

3. 坂本卓磨、緒方法親、岩淵喜久男、多胚性寄生蜂の桑実胚と多胚における発現変動遺伝子の解析、日本応用動物昆虫学会第 59 回大会、2015 年 3 月 27 日、山形大学(山形県・山形市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩淵喜久男 (IWABUCHI, KIKUO)
東京農工大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号：00203399

(2) 研究分担者

天竺桂弘子 (TABUNOKI, HIROKO)
東京農工大学・大学院農学研究院・講師
研究者番号：80434190