

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02964

研究課題名(和文) 遺伝的クローンであるアリの適応的な表現型個体差を産み出す分子機構の解明

研究課題名(英文) On molecular mechanism to produce phenotypically adaptive variation among genetic clones of ants

研究代表者

遠藤 俊徳 (Toshinori, Endo)

北海道大学・情報科学研究院・教授

研究者番号：00323692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,000,000円

研究成果の概要(和文)：昆虫は機械的な動きを示すことが多く、遺伝子が行動を司るなら同一遺伝子をもつ個体の行動閾値は同じになることが期待される。同巣のワーカーが共通の遺伝子セットをもつクローンであるイカリゲシワアリについて、行動閾値の初期値と条件付けによる変化を観察し、個体間のゲノムの差異を調べたところ、違いは見いだせなかった。この多様性がDNAメチル化のエピジェネティクスによって制御されているかどうかを確かめるため、行動閾値の異なる個体のメチル化状態の違いを解析したが、対象範囲ではメチル化状態に違いがないことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子が行動を司るとしたら、同一遺伝子をもつ個体の行動閾値は同じになることが期待される。社会性昆虫のアリの多くは、同巣のワーカーが共通の遺伝子セットをもつクローンなので、この条件に当てはまる。実際には個体間のゲノムには違いが見られないにもかかわらず行動閾値は多様であることがトカラウロコアリについて報告されている。この多様性が遺伝子そのものの変化でなく、DNAメチル化のエピジェネティクスによって制御されていることを示すため、イカリゲシワアリを用いて実験と解析を行なった。

研究成果の概要(英文)：Insects often exhibit mechanical movements, and if genes govern behavior, it is expected that individuals with the same genes will have the same behavioral threshold. We observed initial and conditioning-induced changes in behavioral thresholds in the Icaridae, clones of the same nest worker with a common gene set, and examined genomic differences between individuals and found no differences. To ascertain whether this diversity is regulated by DNA methylation epigenetics, we analyzed differences in methylation status among individuals with different behavioral thresholds and found no differences in methylation status within the target range.

研究分野：バイオインフォマティクス

キーワード：行動閾値 イカリゲシワアリ 遺伝的クローン エピジェネティクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

1) 多遺伝子座の遺伝マーカーを用いた予備的な分析で、イカリゲシワアリのコロニー内ワーカー間のゲノムプロファイルの一致率は、遺伝的クローンであるアブラムシ個体間のそれと有意差がなく、有性生殖をしている他種のアリと比較すると、有意に高い事がわかっており(図1)、イカリゲシワアリのコロニーが遺伝的クローン集団であることが判明している。

2) メレジットースの濃度に対して、各ワーカーは飲むかどうかに関値反応を示し、それは個体間で正規分布では説明できない分散を示した(図2)。したがって、この分散は、発生過程のノイズや群前生じた物ではなく、それを作り出す何らかの機構の存在が推測される。同様の遺伝システムを持つトカラウロコアリでは、各個体の閾値は時間と共にランダムな方向に変化し、閾値決定システムとして、エピジェネティクスによる、同一遺伝子型からの表現型変異の精製が利用されていると推測された(Hasegawa et al 2018)。

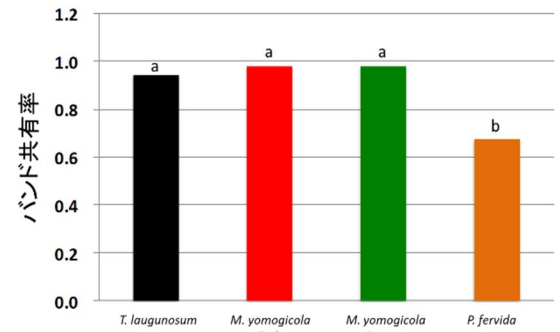


図1 制限バンドの種間一致率

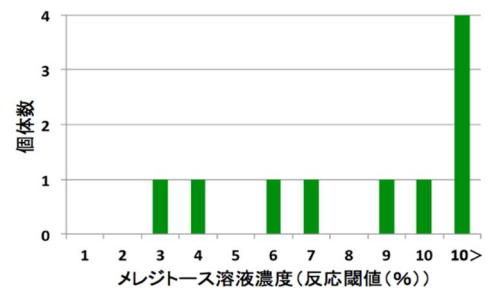


図2 糖溶液に対する反応閾値の個体差

## 2. 研究の目的

本研究計画では、コロニー内の全メンバーが遺伝的クローンであるイカリゲシワアリ (*Tetramorium lanuginosum*) を材料に用い、各ワーカーの表現型の一つである糖に対する反応閾値(個々の個体がどの濃度からメレジットース溶液を飲み始めるかの値)の個体間変異を測定し、個体間変異と集団内分布が存在することを示す。さらに、集団内の反応閾値分布が、時間と共に環境に適応的に変化することを示し、その変化がどのような分子的機構によって出現するかを特定し、無性生殖の生物の適応的な表現型分散が遺伝子型ではなく、その塩基配列上に起こる化学的修飾に基づくエピジェネティクスによって制御されている事を示すことを目的とする。

## 3. 研究の方法

すでに解読されているミツバチのゲノム情報から、アリの好む糖、メレジットース受容体の遺伝子配列が判明している。これと他のアリの決定済みゲノム配列情報に基づいて、味覚・嗅覚受容体の推定を行ない、これを用いて以下の実験を行い、上記の目的を達成する。

### 実験1: 閾値分布の環境変化に対する応答

1-1.40~50匹のワーカーを含むイカリゲシワアリのコロニーを10個用意し、各ワーカーの0~10%濃度のメレジットース溶液に対する反応閾値を1%刻みで測定する(方法については、Yamamoto & Hasegawa 2017, RSOS,4:170097 参照)。以降、全ての実験で、個体識別できるように各個体をマーキングする。

**1-2.** コロニーを 2 群に分け、片方には、1～3%のメジトース溶液を、もう一方の群には7～9%のメジトース溶液を、日によりランダムな順で与え、タンパク源としては、ヨーロッパイエコオロギを週 1～2 回の頻度で与え、飼育する。

**1-3.** 1 ヶ月後、マークした個体で生き残った個体のメジトース濃度に対する閾値を再測定する。

予想される結果:アリはコロニーの閾値分布を用いて、資源の価値判断を行っており( Yamamoto & Hasegawa 2017 ) また、資源分布に対して判断の正確性を最大化する閾値分布の型も明らかになっている( Hasegawa et al 2018, Sci.Rep.,7:14436 )。上記の 2 群の閾値分布は、両者の条件の違いに応じた、それぞれ最適な閾値分布に変化していくと予想される。このとき、閾値が変化した個体については、その変化の方向と大きさが、サイズ、齢等の生態パラメータとリンクしているかどうかを、一般線形化モデル( GLM ) および一般線形化混合モデル( GLMM ) を用いて調べておく。

実験 2 : イカリゲシワアリのゲノム解読とメジトース受容体遺伝子の特定

**2-1.** 個体間変異のノイズを最小化するため、同一コロニーの遺伝的クローンであるワーカー 50 匹から、DNA 抽出し、それを用いて、次世代シーケンサーにおけるゲノム DNA 配列の解読を行う。そして、ミツバチのメジトース受容体遺伝子と相同な領域を配列比較により特定し、さらに、すでにゲノムシーケンスが判明している数種類のアリの相同領域周辺の配列比較により、当該遺伝子を丸ごと増幅できる PCR プライマーを設定する。

**2-2.** PCR 領域を通常の方法でシーケンス決定し、そこが目的の領域であることを確認する。

実験 3 : 当該遺伝子のメチル化パターンの検出と、閾値との関係の特定

**3-1 :** 閾値を数タイプに分け、異なる閾値のワーカーから個々に DNA を抽出し、バイアルファイトシーケンス法を用いて得たシーケンスと、通常シーケンスの結果を比較し、それぞれの配列内のどこのシトシン( C )がメチル化されているかを特定する。C の位置に遺伝子の上流側から順番にダミー変数( 1 , 2 , … , N )を与え、各個体の閾値の大きさにどの位置の C がメチル化されることが影響を与えているかを、GLM, GLMM を用いて検出する。また、同じ閾値を示す個体間で、修飾のパターンが一致するかどうか調べる。

**3-2 :** あるエサ条件で 1 ヶ月以上飼育した 5 つほどのコロニーを用意し、各コロニーを閾値分布が同様になるように 2 群に分け、一方は、各個体の実験開始時での閾値と、その時の当該遺伝子領域における C のメチル化のパターンを調べておく、もう片方は予備期間とは別のエサ条件で 2 ヶ月飼育し、閾値の再測定および、当該遺伝子領域の C のメチル化のパターンを上記方法で特定し、始めに同一閾値を示した個体の修飾パターンと、それが変化した後の当該遺伝子領域の修飾パターンを比較し、閾値の特定の変化が、当該遺伝子の修飾パターンとリンクした形で起こることを確認する。

実験 4 : 個体の閾値変化に、コロニー内の他個体の閾値状態が与える影響の評価

**4-1 :** コロニー内を最適な閾値分布状態にするためには、自分の閾値を、他個体も含めて作り出す、コロニー全体の分布が最適になるように変化させなければならない。

15 個のコロニーを同一エサ条件で 1～2 ヶ月飼育し、各コロニーが与えたメジトース資源価値分布に最適化された閾値分布になっていることを確認する。

**4-2 :** 次に、各コロニーから異なる閾値範囲を持つ個体のみを抜き出し、最適分布から、異なる

必要閾値集団(メレジトース濃度に対する閾値が低い、中程度、高い)が抜けているコロニーを5個ずつ作る。各コロニーを前期と同様なエサ条件でさらに1ヶ月飼育し、閾値分布が復元するかどうかを見る。

**4-3:** その際、残っている個体の、どのような閾値分布を持つ個体が、欠損した閾値帯を埋めるように変化するのかを調べる。

**4-4:** 閾値が変化した個体の当該遺伝子領域のメチル化パターンを調べ、実験3

の結果と合わせ、コロニーレベルでの最適閾値分布を復元するときに、メチル化パターンが必要最小限のメチル化座位パターンの変化で起きるのか、それとも、それとは異なる変化パターンで起こるのかを明らかにする。

実験5: 閾値分布復元時に、閾値が変化する個体がコロニー内でどのような情報を用いているかの推定

**5-1:** あるエサ条件に最適化された閾値分布を持つコロニーを2つ用意し、同じ閾値領域の個体を抜き出し、閾値復元実験を行う。

**5-2:** このとき、閾値復元期間の1ヶ月間、各日の特定の時間帯に、コロニーを実体顕微鏡下でビデオ撮影し、最終的に、閾値分布を復元させるように閾値を変化させた個体が、他個体とどのような接触パターンを示したかをデータとして取り出す。特に、どのような閾値を持った個体と口移しでのエサの分け合い(吐き戻し)を、どのような個体からどれだけ受けたかに注意を払う。

**5-3:** 閾値が全体の分布を復元するように変化させた個体の当該領域のメチル化のパターンを調べ、実験3のデータを利用し、元々の状態からの変化に、コロニー内での他個体とのどんな接触が影響を与えているかを、**GLM, GLMM**, ベイズ推定を使って検証する。

**5-4:** これらの実験結果を統合的に解析することで、コロニー内の他個体の情報をどうやって知り、自分の閾値を全チアが適応的になるように変化させるのかについての機構を推定し、今後検証すべき課題を特定していく。

以上の実験1~5の結果を統合的に解析し、遺伝的クローンであるイカリゲシワアリが、コロニーの生存に必要な閾値分散という表現型の多様性を、どのようなメカニズムによって生成し、それにより、個体の適応性を確保しているかを明らかにする。

#### 4. 研究成果

本研究計画では、コロニー内の全メンバーが遺伝的クローンであるイカリゲシワアリ (*Tetramorium lanuginosum*) を材料に用い、各ワーカーの表現型の一つである糖に対する反応閾値(個々の個体がどの濃度からメレジトース溶液を飲み始めるかの値)の個体間変異を測定し、個体間変異と集団内分布が存在することを示す。さらに、集団内の反応閾値分布が、時間と共に環境に適応的に変化することを示し、その変化がどのような分子的機構によって出現するかを特定し、無性生殖の生物の適応的な表現型分散が遺伝子型ではなく、その塩基配列上に起こる化学的修飾に基づくエピジェネティクスによって制御されている事を示すことを目的とする。令和元年度は【実験1】閾値分布の環境変化に対する応答、と【実験2】イカリゲシワアリのゲノム解読とメレジトース受容体遺伝子の特定を行った。

【実験1】イカリゲシワアリがメレジトース(糖)にはほとんど反応せず、環境変化にも応答しないことが判明した。そこで、アミノ酸や脂質に対する量的応答がある可能性模索し、ミールワーム抽出液に対する応答を見出した。しかし実験用コロニー維持がやや難しく、この段階で多くの

コロニーが死滅したため、残存 4 コロニーのみを 2 群に分けて検定した。その結果、高濃度、低濃度の抽出液にそれぞれ慣らした個体群は反応閾値が各方向へ有意にシフトしていることが観察された。しかし、各コロニーの個体数も減ったので再現実験を要する。

【実験 2】ゲノムデータを取得し嗅覚受容体を探索したところ、一般的な **GPCR** 型受容体では特別な多様性が見つからず、脂質やアミノ酸の化学受容体は異なるタイプが示唆された。探索幅を広げたところ、脂質受容体と考えられる遺伝子の部分配列が見つかった。しかし、既知の相同遺伝子とやや構成が異なっており、種固有の嗜好を反映したものと考えられる蛾、さらなる検証が必要である。なお、**NGS** によるゲノム配列決定を行い、対応する嗅覚受容体候補を推定できた。これによりアリの行動多様性を探る幅が広がった。

令和 2 年は、前年の結果から誘因餌をミルワーム抽出液を行動判定に用ると反応閾値の変化が起こることが示唆されていたので、サンプル数を増やして実験を繰り返し、反応閾値の変化が偶然によらないことを検証した。また、**NGS** による全ゲノムドラフト解読結果に基づいて探索し、嗅覚受容に関わる遺伝子の候補について、多数のエクソンから構成される遺伝子であることが推定されたので、点変異、オルタナティブスプライシング、エピジェネティックな変化という視点からデータ解析を進めた。しかし、標本のアリは非常に小型であり、**DNA** 抽出に際して固有の夾雑物を除ききれず、**NGS** 解析に必要な品質の確保が難しかったことに加え、コロナ禍となったために再採集にも困難を来たして、採集可能な時期が過ぎてしまったため、年度内の進捗が限られた。また、嗜好性が近縁種とは異なるためか、リファレンスゲノムの相同配列部分は見つかったものの相同性がやや低く、機能的保存領域の同定が難航した。

標本のアリは非常に小型であり、**DNA** 抽出に際して固有の夾雑物を除ききれないという問題が生じて、**NGS** 解析に必要な品質の確保が難しかったため、数回、**DNA** 抽出のやり直しをした。また、当該年度のほとんどがコロナ禍となったために、再採集にも困難を来たし、採集可能な時期が過ぎてしまったために年度内の進捗が限られた。嗜好性が近縁種とは異なるためか、リファレンスゲノムの相同配列部分は見つかったものの相同性がやや低く、機能的保存領域の同定が難航した。また、コロナ禍のために、オンライン講義準備等に多くの時間を要したことに加え、研究活動にも大きな制約がかかり、進捗に困難があった。

令和 3 年は、前年の結果から誘因餌をミルワーム抽出液を行動判定に用いると反応閾値の変化が起こることが示唆されていたので、サンプル数を増やして実験を繰り返し、反応閾値の変化が偶然によらないことを検証した。また、**NGS** による全ゲノムドラフト解読結果に基づいて探索し、嗅覚受容に関わる遺伝子の候補について、多数のエクソンから構成される遺伝子であることが推定されたので、点変異、オルタナティブスプライシング、エピジェネティックな変化という視点からデータ解析を進めた。しかし、標本のアリは非常に小型であり、**DNA** 抽出に際して固有の夾雑物を除ききれず、**NGS** 解析に必要な品質の確保が難しかったことに加え、コロナ禍で再採集にも困難を来たしたが解析を行った。行動閾値に伴う変化に関する遺伝的変化の同定はできなかった。また **RNA** 抽出も試みたが、サイズ・技術的に難しく、実現できなかった。**DNA** メチル化によるエピジェネティックな変化については、リファレンスゲノムとの比較からバイサルファイトシーケンスの設計を行い、設備をもつ業者に委託したものの、有効な変化を同定するに至らなかった。成果に結びつけるためさらなる再実験に取り組んでいる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	長谷川 英祐  (Hasegawa Eisuke)  (40301874)	北海道大学・農学研究院・准教授    (10101)	
研究分担者	伊藤 文紀  (Ito Fuminori)  (50260683)	香川大学・農学部・教授    (16201)	
研究分担者	里村 和浩  (Satomura Kazuhiro)  (90815804)	北海道大学・情報科学研究院・特任助教    (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関