

機関番号：12605

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20380032

研究課題名（和文） 社会性寄生蜂における兵隊カースト比の性特異的調節機構

研究課題名（英文） Sex specific regulation of the soldier caste ratio in the social parasitoid

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

研究成果の概要（和文）：社会性寄生蜂では、他の社会性膜翅目昆虫と異なり、雌雄に兵隊カーストが存在する。カースト構成の制御は雌雄で異なることが推察されたことから、雌雄の兵隊カーストの機能と量的調節について調べた。兵隊幼虫は雌雄とも競争者に対する攻撃能を有していた。カースト構成は雌雄とも遺伝的に決定されるが、雌では環境の影響によりフレキシブルに調節されていることが明らかとなった。環境要因による調節は、要因の種類によって機構が異なることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Unlike other eusocial Hymenoptera, social parasitoids are unique in that they have evolved sociality involving a soldier caste in both sexes. The function and the regulation of the soldier caste ratio were examined. Soldiers of both sexes have ability to defend against heterospecific competitors. The caste composition was genetically determined, while in females it was affected by environmental factors. The mechanism of environmental regulation was likely to be different with different environmental factors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2009 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2010 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	12,800,000	3,840,000	16,640,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：昆虫行動

1. 研究開始当初の背景

社会性昆虫は、繁殖個体のほかに非繁殖個体を生産することが最大の特徴である。非繁殖個体のなかで、兵隊個体はシロアリとアザミウマでは雌雄両方で発達するが、アリなど社会性ハチ目昆虫では雌でのみ発達する。そして雌雄両方で兵隊が発達するのはハチ

では多胚性寄生蜂に限られることから、雄兵隊個体の発達には何らかの特別な理由があるものと理解されてきた。

トビコバチ科の多胚性寄生蜂では、宿主に産卵された受精卵または未授精卵は、いずれも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が、

その際に胚子の一部は分化して形態的に異なる兵隊幼虫になり、それ以外は成虫まで発達する繁殖幼虫になる。兵隊幼虫は繁殖幼虫がまだ胚子増殖期のうちに早熟的に出現する。

申請者らがこれまでに行なった研究では、同じ宿主個体内でコマユバチ科の幼虫寄生蜂との種間競争がある場合には、常に多胚性寄生蜂が勝つことが示された。その際、競争者排除には兵隊幼虫が使われるが、コマユバチ寄生に対して、多胚性寄生蜂は兵隊幼虫の数を増員して対抗することを明らかにした。また、この現象は雌に限定されること、さらに兵隊幼虫の増員分だけ繁殖幼虫が減少することを明らかにした。一方、雄では、それとは無関係に兵隊幼虫の出現に早晩の変異が存在することが明確になってきた。すなわち、雌と雄では、兵隊カースト比の調節機構が基本的に異なることが強く示唆された。

社会性昆虫は、競争の強さや資源量の多寡などの環境要因によって兵隊カーストへの投資量を調節していると予測されてきたが、それが実証された例はない。また、これまで社会性昆虫の兵隊カーストの機能ならびにカースト比の調節は雌雄で差異のないものとして扱われてきた。本研究は、兵隊カースト比の雌雄で異なる調節機構の解明を目的とするもので、社会性昆虫全体でも最初の例となる。

2. 研究の目的

多胚性寄生蜂では雌と雄とで兵隊幼虫数の調節機構に違いが想定されたことから、本研究は雌雄それぞれの兵隊幼虫の量的調節機構の解明を目的とする。具体的には、兵隊幼虫の性的に異なる量的調節の原因とも考えられる機能における性的差異の解析、雌雄それぞれに固有ないし共通の量的調節機構の解析をおこなうことで、その全体像を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 兵隊カーストの機能解析の実験方法

①供試虫

多胚性寄生蜂としてキンウワバトビコバチ (以下 Cf と記す)、宿主としてミツモンキンウワバを用いた。飼育には人工飼料を与え、25℃、16L-8D の条件下で飼育した。

ンウワバを用いた。飼育には人工飼料を与え、25℃、16L-8D の条件下で飼育した。

②競争者に対する攻撃

ミツモンキンウワバを共通の宿主とする3種類の寄生蜂 (コマユバチの一種 *Glyptapanteles pallipes*, キアシヤガサムライコマユバチ、ギンケハラボソコマユバチ) ならびにモンシロチョウ幼虫を宿主とするアオムシコマユバチを用い、それらに対する Cf の攻撃行動を調べた。観察は、IPL-41 培地を用いた無菌の培養条件下で行なった。Cf の兵隊幼虫と競争者寄生蜂の1齢幼虫をそれぞれ1頭ずつ培地に入れ、2時間の観察を行ない、行動を調査した。

③その他の実験方法

マイクロサテライト DNA の作製は、Cf より抽出した DNA をもとにビーズ法により行なった。電子顕微鏡による解析は、種々の発生段階の Cf を宿主幼虫より抽出し、グルタルアルデヒド、オスミウム酸、パラホルムアルデヒドで固定、Epon で包埋した。60-70 μm の切片を作製し、H-7100 TEM により観察した。

(2) 兵隊カーストの量的調節の実験方法

①米国系統との比較

M.R. Strand 教授の協力により、双方で交互寄生実験を行なった。宿主には、ミツモンキンウワバのほか、候補として近縁のキクキンウワバ、イチジクキンウワバ、キクギンウワバ等を用いた。

②量的遺伝学的解析

岩手、千葉、東京、長野、福岡、熊本の6ヶ所で宿主を採集し、そこから得られた Cf を対象に兵隊幼虫数について地理的変異ならびに家系間変異を調べた。統計解析はすべて R(ver. 2.10.0)で行なった。兵隊幼虫数の遺伝率 (広義) の推定は、full-sib 分析を用いて行いた。解析は線形混合モデルおよび制限付き最尤法 (REML 法) を用い、データに対してモデル式をあてはめ、推定されたパラメータを用いて遺伝率を推定した。

③兵隊幼虫数に及ぼす共寄生ならびに人工異物等の注入の影響

G. pallipes との共寄生、人工異物としてのガラスファイバーの挿入、グラム陽性菌 *Micrococcus luteus*, グラム陰性菌

Escherichia coli の注入、氷冷麻酔、高温下での飼育などが兵隊幼虫数およびカースト比にどのような影響を及ぼすか調べた。共寄生と高温条件での飼育は、宿主が2齢と4齢、その他の刺激は4齢の時にを行い、6齢(終齢)になったときに解剖し、兵隊幼虫数を計数した。また、宿主が死亡し、Cfが羽化した後に生殖個体数を計数し、カースト比を算出した。vasa 抗体の作製は、ショウジョウバエ等の vasa 遺伝子情報をもとにプライマーを設計、Cfの成虫より抽出して得た核酸をテンプレートとして *Cfvasa* の塩基配列を解析し、それをもとに合成したペプチドに対してポリクローナル抗体を作製した。

④性特異性機構の分子解析

Cfの桑実胚より total RNA を抽出し、SMART法により完全長 cDNA ライブラリーを作製した。得られた塩基配列データについて BLAST を用いて検索を行ない、性特異性に関連する候補遺伝子を探索した。

4. 研究成果

(1) 兵隊カーストの機能における性的差異

兵隊幼虫の量的調節における性的差異を考える場合、機能的な違いを伴っている可能性がある。最近、米国で行われた研究では、Cfの雄ソルジャーは、雌と異なり攻撃能がないことが明らかとなった。以前の研究では、雄ソルジャーの出現様式は雌と異なり、宿主が終齢になってから少数現れるにすぎないことが示されていることから、機能と出現時期とは相関のあることが推察される。我々が日本産の Cf で調べた研究では、雌雄とも出現時期は早く、宿主が1齢の時期には出現が始まる。しかし、これまで日本系統では兵隊幼虫の機能ならびにその性的差異については明らかではなかった。そこで、培養条件下で雌雄それぞれの兵隊幼虫の競争者に対する攻撃行動を観察により調べた。実験には、自然競争者として、コマユバチの一種 *Glyptapanteles pallipes*, キアシヤガサムライコマユバチ、ギンケハラボソコマユバチ、人為競争者としてアオムシコマユバチを用いた。なお、あらかじめ行った実験では、供試した3種類の自然競争者と Cf を同一宿主ミツモンキンウワバに共寄生させた場合に

は、いずれの場合も Cf の性に関わらず Cf が勝つことが示された。改変 MGM450 培地を用いて行った2時間の観察の結果、Cfの兵隊幼虫は雌雄とも競争者に対して噛みつく攻撃行動をとり、死に至らしめることが明らかとなった。この結果は、雄の兵隊幼虫には攻撃能がない米国系統とは対照的である。しかし、本研究においても、雌雄の兵隊幼虫の行動には若干の違いがあり、雄では攻撃開始まで長い時間がかかること、噛みついた後、競争者が動かなくなっても長時間噛み続けるなどの行動的差異が認められた。これは雄の兵隊幼虫による競争者排除効率が低いことを示すものであるが、単寄生蜂に対しては十分な機能と考えられ、また、雌に比べて雄の Cf はより強い液性の排除因子を持つことから、実際の場面では、これらが相乗的に作用して競争者を排除しているものと考えられる。この排除因子については、分子レベルの解明には至っていないが、熱に不安定なタンパク質である。

これらの結果より、日本産 Cf の社会性は、雌雄の兵隊カーストが異種競争者に対する攻撃能をもつことから、多胚性故に雌雄それぞれが同胞メンバーと高い血縁度 ($r=1$) のもとで進化してきたことが推察される。これは、実質的に雄の兵隊カーストをもたない米国産 Cf の社会性が、同一宿主内に雌雄混在した結果、雌雄間で生じる性的競争のもとでの進化と対象的である。日本産 Cf における雌雄間の競争の有無については不明であるが、野外における宿主内の性比は約 70%が雌に偏った雌雄混在で、米国産 Cf とほぼ一致した値であることから、同様の状況は生じていたものと推測される。また、雌雄間の競争では、血縁間での識別が重要で、これには多胚の外膜の関与が示唆されてきた。電子顕微鏡を用いて解析した結果、外膜は胚子間ならびに宿主細胞との接着に重要であること、形態形成後、幼虫になるまで外膜に覆われていることなどが明らかとなり、胚子期を通して外膜分子による識別がされていることが裏付けられた。本種の社会性進化にいずれの淘汰も可能性はあるが、どちらが実質的に強く作用したかについては、寄生蜂ギルド等、環境要因が大きく関わっていることが推察

され、今後の課題である。また、本研究では、雌雄間の競争に強く関わると考えられている血縁関係の有無の指標となるマイクロサテライト DNA 8 種類を作製し、Cf での研究手法として開発した。

Cf の異種昆虫への対応における性的差異は、宿主幼虫に対しても認められる。Cf による宿主への侵入は分子擬態によって組織親和的に行われるが、胚子増殖期以降は、宿主の数種の組織で Cf による退行が進むなど、宿主による生体防御を誘発する現象が見られるようになる。兵隊幼虫の関与の詳細については不明であるが、兵隊幼虫による宿主組織の摂食については明らかなことから、関与が想定される。また、宿主による血球による免疫応答を回避している可能性があることから、総血球数ならびに血球比への Cf 寄生の影響を調べた。血球種の構成は、他のチョウ目昆虫と同様、プラズマ細胞、顆粒細胞、小球細胞、エノシトイド、原白血球の 5 種類であった。血球比への影響には Cf の雌雄差は見られなかったが、*G. pallipes* との共寄生を受けた宿主では、*G. pallipes* によって起こる顆粒細胞数の減少が、雄の Cf の共寄生によって低下、すなわち、*G. pallipes* の影響が減少することが明らかとなった。この競争者の影響低下は、雄の Cf の液性排除因子と兵隊幼虫の機能によるものと考えられる。*G. pallipes* による宿主への影響低下については、Cf にはポリドナウイルスの機能低下をもたらす因子の存在が予想され、新規な機能性因子の探索が期待される。

(2) 兵隊カーストの量的調節における性的差異

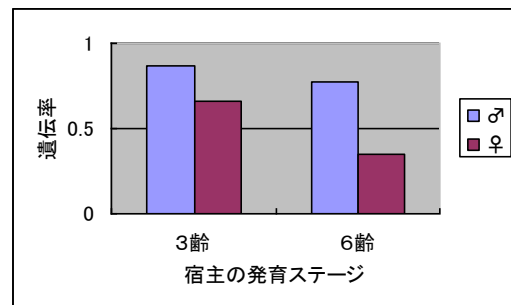
① 米国系統との比較

社会性は遺伝的に支配されるが、個々の特徴の発現には、後生的に環境要因などの影響を受ける。Cf のカースト構成の遺伝的背景は不明であるが、雄の兵隊幼虫の出現時期は、日本産と米国産では大きく異なる。すなわち、日本産 Cf の兵隊幼虫は、雌雄とも宿主が 1 齢幼虫の時から出現するが、米国産の場合、雌では同様に早熟的に出現するものの、雄の兵隊幼虫は終齢になるまで現れず、その数も少ない。そこで、これらが兵隊カーストの量

的解析に使用可能か検討した。その結果、両者は宿主範囲が微妙に異なり、調べた範囲では、共通の宿主を持たないことが判明した。さらに、交尾は可能であるが、2 世代目以降で不妊となり、交配系統の作製が不可能であることが明らかとなるなど、遺伝要因の解析には使用できないものと判断された。

② 兵隊カーストの量的遺伝学的解析

そこで国内 6 ヶ所から採集してきた宿主幼虫から得られた Cf について、兵隊幼虫の量に関する地理的変異を調べた。その結果、岩手、千葉、東京、長野、福岡、熊本の 6 ヶ所の間で、兵隊幼虫数に明確な地理的変異は認められなかった。この結果より、カースト構成に影響をあたえる選択圧に大きな地理的差異がないこと、ならびに日本の Cf は単一の交配集団であること、などが推察された。後者については、親子判定の手法として開発したマイクロサテライト DNA を用いた解析によっても強く示唆された。



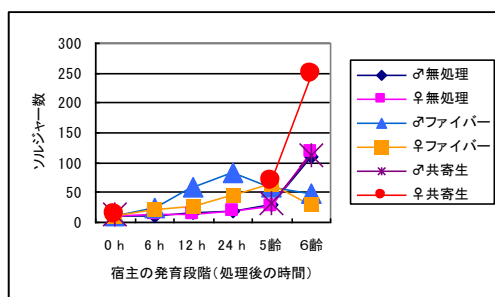
一方、同一地域内の家系間では兵隊幼虫数に明確な違いが認められた。同一家系内では、雌雄の兵隊幼虫数の間で正の相関が認められた。さらに個体ごとに次世代の兵隊幼虫数との比較を宿主幼虫が 3 齢及び 6 齢時に調べ、推定した結果、雄の兵隊幼虫についてはいずれの場合も高い遺伝率を示した。これに対し、雌では宿主が 3 齢時には高い遺伝率を示したが、6 齢時のものでは遺伝率が低いことが示された。この結果は、雌のカースト構成は環境の影響を強く受けることを示唆するもので、異種競争者 *G. pallipes* の共寄生が雌でのみ兵隊幼虫を増員するという以前の我々の研究結果と符合する。本結果は、環境適応能には性的差異があり、雌のほうがフレキシブルに対応することができること

を強く示唆するもので、進化生態学、免疫生態学、環境生態学等の発展に広く資するものと考えられる。

③環境要因が兵隊幼虫数に及ぼす影響と性的差異

コマユバチの一種 *G. pallipes* の共寄生、宿主幼虫への人工異物（ガラスファイバー）ならびに生物異物（細菌）の注入、冷温処理、不適温度条件下での飼育、などの環境ストレスを与えることによる兵隊幼虫数ならびに兵隊カースト比への影響を調べた。*G. pallipes* による共寄生の作用は、宿主が1-2齢の時に共寄生させた場合に見られ、雌でのみ終前齢以降の兵隊幼虫数の増加ならびに生殖個体の減少、すなわちカースト比の変化が認められた。雌で性特異的に起こる兵隊幼虫の増加は、2齢から高温条件で飼育した際にも見られた。これらの効果は中齢以降の宿主に対しては見られないことから、桑実胚期から多胚形成初期の胚子でのみ起こる現象と考えられる。

一方、人工異物の注入と短時間の冷温処理では、性に関係なく12時間から48時間後に兵隊幼虫の増加が見られた。この増加は、中齢の宿主に対する処理で見られ、終齢期にはむしろ減少した。また、生殖個体数には変化は見られなかった。すなわち、これらの処理で起こる兵隊幼虫の増加は、急性かつ一過性のもので、すでに数が決まった兵隊幼虫胚子の形態形成が促進、あるいは孵化前で停止している胚子の一斉孵化によるもので、前述の雌特異的な兵隊幼虫の増加とは異なる機構によるものと考えられる。



また、細菌の注入の場合には、グラム陽性菌とグラム陰性菌とで反応が異なり、この場合の兵隊幼虫の増加には、免疫応答の機構が関与している可能性が示唆された。

以上の結果から、環境による兵隊幼虫の量的変化の機構は一様ではなく、環境要因の種類によって、少なくとも3種類に大別されることが推察される。このうち、初期発生時に起こる性特異的な兵隊幼虫の増加は、多胚性寄生蜂の胚子発生機構の変化によって起こるものと考えられる。Cfでは、細胞質に生殖質を持つ細胞を含む胚子は生殖個体となり、持たない胚子が兵隊幼虫になることが知られている。生殖質の存在は、生殖細胞決定因子の1つ *vasa* 遺伝子の発現あるいは *vasa* タンパク質の局在で知ることが出来る。*vasa* を指標に調べた研究では、胚子中の *vasa* は途中で消失することが推察されている。環境要因はこのような変化を促進し、それによって兵隊幼虫を増加させている可能性がある。本研究では、日本産 Cf の *vasa* 遺伝子を解析し、米国産 Cf の *vasa* 遺伝子情報と比較したところ、塩基配列が一ヶ所異なるものの、ほぼ同一であることを確認した。さらにこの遺伝子情報からアミノ酸配列を推定し、それを基に *vasa* 抗体を作製した。さらに *vasa* 抗体を用いた免疫組織化学的手法による胚子レベルのカースト識別法を作製した。

④性特異性機構の分子解析

以上の結果より、雌に特異的な兵隊幼虫の増員は、多胚形成あるいは多胚増殖の初期における環境ストレスが原因となって起こるものであることが推察された。一般に、胚は発生プランだけでなく、予測される環境変化に対応して生き延びる防衛能力も持っている。Cfでは、兵隊カーストの制御には兵隊幼虫の胚子の増殖促進、および生殖幼虫胚子から兵隊幼虫胚子への転換の両方が関わり、間接的には免疫応答に関連する機構も関与していることが示唆された。したがって、この現象における雌特異性の機構を知るためには、胚子発生の初期に発現している遺伝子の解析が重要であることを示している。そこで桑実胚期の胚子について遺伝子解析を試みた結果、すでにこの時期に性決定遺伝子が発現していることが明らかとなった。これは、環境因子に対する応答に性特異性を与える条件となるものと考えられ、本種で見つかった性特異的な兵隊カーストの制御の分子基

盤の解明につながるもので、今後の研究が期待される。

以上、社会性における兵隊カーストの機能、量的調節、環境応答には性的差異があり、本研究はその全体像を解明し、さらに機構の一部まで踏み込んで明らかにすることができた。これまで社会性昆虫は、競争の強さや資源量の多寡などの環境要因によって兵隊カーストへの投資量を調節していると予測されてきたが、それが実証された例はきわめて少ない。本種では、環境要因の内容については今後の研究を待たなければならないが、種間ならびに種内の競争の強さと兵隊カーストへの投資量の関係が実験的に示唆されたことから、今後、この問題のモデル生物として利用できるものと思われる。また、本種は、兵隊カースト比の調節機構が雌雄で異なる点でもユニークであり、本研究の成果は、社会生物学や行動生態学の発展への貢献が期待できるだけでなく、免疫生態学、生態発生学の発展に資するもので、今後、性決定との関係解明が重要な研究課題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)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Takahashi-Nakaguchi, A., Hiraoka, T., Iwabuchi, K., An ultrastructural study of polyembryonic parasitoid embryo and host embryo cell interactions. *Journal of Morphology*, 271: 750-758. (2010) 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① 西出雄大、渡辺賢太、岩淵喜久男、多胚性寄生蜂キンウワバトビコバチにおけるカースト構成の量的遺伝学的解析と交配集団数の推定、日本応用動物昆虫学会第55回大会、2011年3月28日、九州大学
- ② 宇賀大祐、岩淵喜久男、多胚性寄生蜂キンウワバトビコバチで見られる兵隊幼虫の攻撃行動における性差、日本応用動物昆虫学会第54回大会、2010年3月26日、千葉大学

- ③ 渡辺賢太、西出雄大、岩淵喜久男、社会性寄生蜂におけるカースト構成の量的遺伝学的解析、日本生態学会第57回大会 2010年3月20日 東京大学

[その他]

ホームページ等

日本応用動物昆虫学会ポータルサイト「むしむしコラム・おーどーこん」
http://column.odokon.org/2010/1213_181037.php

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

佐藤 令一 (SATO RYOICHI)
東京農工大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号：30235428

(3) 連携研究者

佐藤 俊幸 (SATO TOSHIYUKI)
東京農工大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号：80242238