

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H05550・20K20461

研究課題名（和文）周期ゼミの羽化年決定機構と周期分化のゲノム基盤

研究課題名（英文）The mechanism of life-cycle control and the genomic basis of life-cycle divergence in periodical cicadas

研究代表者

曾田 貞滋（Sota, Teiji）

京都大学・理学研究科・教授

研究者番号：00192625

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 19,800,000円

研究成果の概要（和文）：*Magicicada*属の周期ゼミは13年・17年の幼虫期を持ち、個体間で同調して周期的に発生する。その生活史制御に関する4年時計に基づく仮説を検証するために、コホート年数11年から16年の17年ゼミ幼虫の齢構成、体重、変態の指標となる眼色、年齢・眼色による遺伝子発現の変化を調査した。また、幼虫期の長さ（=周期）の遺伝的基盤と各種群における周期分化歴史的過程を解明するために、17年ゼミ*M. cassini*のゲノムを参照ゲノムとして周期ゼミ3種群7種のゲノムをリシーケンスしてSNPを抽出し、幼虫期の長さの違いに関係する遺伝子の推定、系統解析、デモグラフィ推定を行なった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

周期ゼミやタケに見られる2年を超える年数での周期的生活史がどのように制御されているかは生物学上の大きな疑問である。本研究は4年を測る体内時計を仮定して13年・17年の生活史が制御される仮説を検証したもので、いくつかの状況証拠を得ており、難問解明への手がかりをもたらしただ点で意義がある。また、予定された年に起こる周期ゼミの大発生は米国のみならず世界のマスメディアに取り上げられてひろく一般の関心を集めており、その仕組みを解明して一般社会に紹介することは意義がある。

研究成果の概要（英文）：Periodical cicadas (*Magicicada*) have synchronized 13- or 17-year life cycles. To explore the mechanism of life-cycle control based on the 4-year clock hypothesis, we investigated nymphal populations of 17-year cicadas from 11th to 16th year of cohort age for instar composition, body weight, eye color (an indicator of emergence timing), gene expression changes with age and eye color differences. We also studied the genetic basis of the difference in the nymphal period and historical process of divergence into 13- and 17-year life cycles using single-nucleotide polymorphisms (SNPs) obtained genome re-sequencing data.

研究分野：進化生態学

キーワード：生活史進化 周期生物 周期ゼミ 生活史制御 全ゲノム解析 臨界体重 生物時計 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

生活史の多様性は、生物多様性を支える最も主要な要素である。しかし可塑性に富む生活史進化の遺伝的基盤を解明することは困難であり、ゲノム解析を基軸とした現代の進化生物学・進化生態学にとって挑戦的な課題である。

北米の周期ゼミ (*Magicicada* 属) は 3 種群 7 種を含み、昆虫で最長の幼虫期を持つ。1 力所では 1 つの年級群 (ブルード) だけが存在して、南部では 13 年、北部では 17 年ごとに成虫が発生する (図 1)。13 年ゼミと 17 年ゼミの分布域は百年以上にわたり安定している。同時発生するブルードには通常 3 種群からの 3 種が含まれている。周期ゼミの進化史においては、その共通祖先で 2 つの発生周期に分化する共通の遺伝的基盤が進化したと推測される。しかし 2 つの周期 (幼虫期の長さ) の制御機構は全く分かっていない。

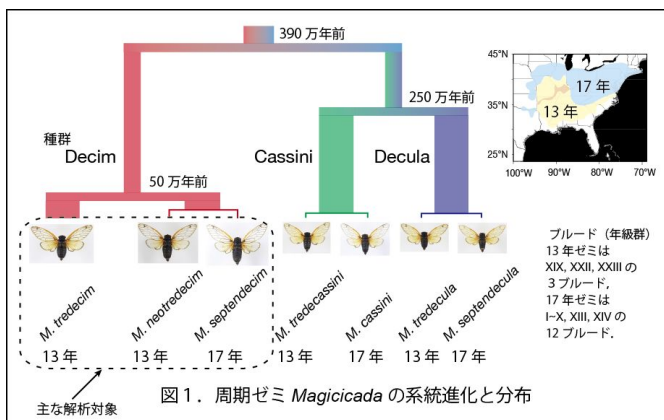


図 1. 周期ゼミ *Magicicada* の系統進化と分布

これまでの研究から、13 年ゼミの幼虫発育成長速度が 17 年ゼミより平均的には速いと推定されている [文献 1,2]。しかし、個体間のバラツキは非常に大きく [文献 1,3]、13 年ゼミ・17 年ゼミとも、予定年より 4 年早く、または遅く羽化するはぐれ者が存在する [文献 4]。これは平均より早く (遅く) 臨界体重 [文献 5] に達した個体が、予定された羽化年より早く (遅く) 羽化したものと考えられる。13 年と 17 年の差は 4 年で、13 と 17 のいずれも 4 の倍数に 1 を加えた数である [文献 6]。これらのことを合わせて考えると、幼虫は 4 年単位で時間をカウントし、4 年ごとに変態するかどうかを決めている可能性が高い。

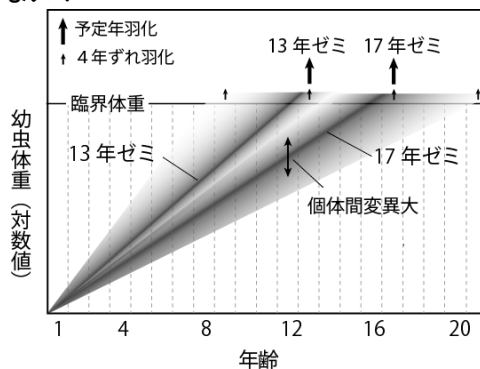


図 2. 13 年・17 年ゼミの幼虫の成長と臨界体重を超えた個体の 4 年ごとの羽化。

生物が 1 年を越える年数をカウントすることは 1 回繁殖のタケや、数年周期で開花する多年生植物でも示唆されており、タケでは 15 年単位でカウントしているという仮説がある [文献 5]。セミ類では、4 年、8 年ごとに発生する別の周期ゼミの存在が北インドとフィジーから知られており、4 年単位の時間カウントが仮説は荒唐無稽とも限らない。昆虫の変態タイミングが幼虫の体重によって制御されており、また変態ホルモンの応答は特定の閉鎖時間帯でのみ起こることが完全変態のタバコスズメガで示されている [文献 5]。これに相当する仕組みが周期ゼミにも存在し、発育成長速度が遺伝的に決まっていれば、特定の年数に変態タイミングを合わせることは可能である。

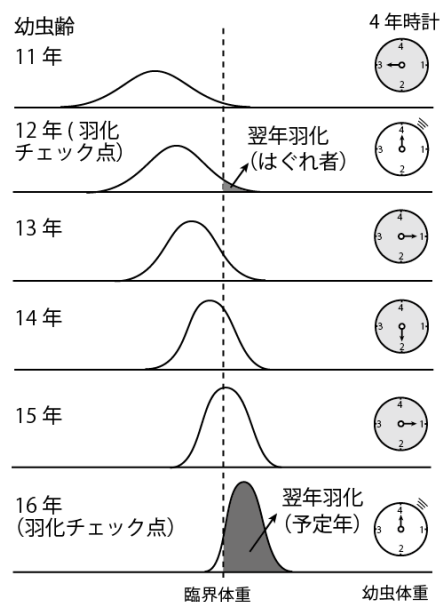


図 3. 17 年ゼミの幼虫年齢 11 年～16 年の体重分布と 4 年ごとに起こる成虫羽化に向けた反応。

以上の考察から、本研究では次のような周期ゼミの生活史制御仮説を提唱した (文献 9 参照)。(1) 幼虫は 4 年周期の時計を持ち、生息地点の気候条件に特異的な臨界体重を持つ。体サイズが臨界値を超えた個体は 4 年ごとの羽化閉鎖のいずれかで変態準備を整え翌年に羽化する。4 年ごとの羽化閉鎖の存在により、幼虫間での発育のバラツキにも関わらず羽化の同調が可能になる。(2) 13 年周期と 17 年周期の違いは、発育成長速度の遺伝的な差異による (図 2)。幼虫発育には個体間変異が生じるが、4 年ごとの羽化閉鎖により、12 年目秋または 16 年目秋までにプールされた臨界体重を超えた個体が、翌年 (13 年目、17 年目) 一斉に羽化する (図 2, 3)。同じコホートの幼虫間の発育状態のバラツキが大きい場合、早く臨界体重に到達した 17 年ゼミの幼虫が、1 つ前の羽化閉鎖を通過して 13 年目に羽化する現象が生じうる (図 3)。これにより 4 年早く羽化するはぐれ者の存在が説明できる。

同じコホートの幼虫間の発育状態のバラツキが大きい場合、早く臨界体重に到達した 17 年ゼミの幼虫が、1 つ前の羽化閉鎖を通過して 13 年目に羽化する現象が生じうる (図 3)。これにより 4 年早く羽化するはぐれ者の存在が説明できる。

文献

- 1) White & Lloyd 1975, Am. Midl. Nat. 94:127-143.
- 2) Koyama et al. 2015, J. Evol. Biol. 28:1270-1277.
- 3) Maier 1996, Frontiers Plant Sci. 48 (2): 3-6.
- 4) Marshall et al. 2011, Ann. Ent. Soc. Am. 104: 443-450; 2017, Kansas Entomol. Soc. 90: 211-226.
- 5) Nijhout et al. 2006. J. Biol. 5:16.
- 6) Hayes 2004, Am. Scientist 92: 401-405.
- 7) Veller et al. 2015. Ecol. Lett. 18: 653-659.
- 8) Bryce & Aspinwall 1975, Am. Midl. Nat. 93: 450-454; Maier 1980, Ann. Ent. Soc. Am. 73:147-1526.
- 9) Sota 2022, Ecol Res 37:686-700.

2. 研究の目的

本研究の目的は上記の生活史制御仮説を検証することである。周期ゼミの幼虫期は長く、飼育・交配実験は困難なため、野生の幼虫個体群の調査とゲノム比較による仮説検証を試みる。上記の生活史制御仮説に基づいて、成虫変態への臨界体重が周期ゼミの終齢(5 齢)幼虫に存在し、4 年ゲート年に相当する年(12 年め, 16 年め, 等)にそれを越えた個体が越冬前に赤眼に変わっているかを確認する。また赤眼の個体は変態へ向けた遺伝子発現を示すことを白眼幼虫とのトランスクリプトーム比較で確認する。さらに、同一種群の 13 年ゼミと 17 年ゼミのゲノム比較により、生活史制御仮説で想定される、成長発育速度の違いに関連した遺伝子(ゲノム領域)における変異を検出する。

3. 研究の方法

(1) 臨界体重・4 年毎羽化閉門仮説の検証

終齢(5 齢)幼虫は羽化 7~11 ヶ月前に白眼から赤眼になることが知られており、眼色が変態準備完了の指標になる。終齢幼虫に変態の臨界体重が存在し、4 年単位の年数カウントに基づいて 4 の倍数年に成虫への変態準備が行われるとすると、赤眼で体重が一定値(臨界体重と解釈される)を越えた個体が 4 の倍数年に現れ、その間の年には体重が一定値を越えていても白眼のままであると予想される。また、赤眼個体は変態ホルモン関連遺伝子等の発現が見られるが、白眼個体は体重に関わらず変態ホルモン関連遺伝子等の発現は見られないと予想される。

2019 年から 4 年間に、米国東部地域において 17 年ゼミのブルード IX, X, XIII, XIV および 13 年ゼミのブルード XXII を調査した。17 年ゼミについては、幼虫年齢(実際にはコホートの年齢)11~16 年(羽化予定年の 6 年前~1 年前)の 17 年ゼミ幼虫を秋(10~11 月)に掘り出し、体サイズ(体重, 各部の長さ)を測定、眼の色を記録、RNA later により組織を固定し、RNA, DNA を抽出した。種特異的な COI 配列をプローブとした定量 PCR により種を同定した上で、代表サンプル(各コホートの異なる年齢・眼色の個体 2 雄 2 雌ずつ)につき、RNAseq を行った。得られたデータにおいて幼虫の年齢と体重・眼の色・遺伝子発現の関係を調べた。

(2) 発育成長速度差をもたらすゲノム配列変異・遺伝子領域の探索

発生周期以外には形態・行動差がほとんどない種群内(Decim, Cassini, Decula 種群)の 17 年ゼミと 13 年ゼミ 2 種の間でゲノムワイド関連解析を行い、周期間で分化している領域・遺伝子・配列変異を検出する。本研究では Cassini 種群の 17 年ゼミ *M. cassini* の全ゲノム配列を参照ゲノム配列とした。ゲノムシーケンス, アセンブル, 遺伝子予測によるアノテーションは、先進ゲノム支援により行われた。3 種群 7 種 60 個体について、ゲノムの約 15 倍のカバレッジのリシーケンスを行い、上記の *M. cassini* ゲノムを参照配列として、SNP データを取得し各種群内の周期, ブルードのゲノムの分化, デモグラフィについて分析した。さらに、種群内の 13 年ゼミ・17 年ゼミの分化についてゲノムワイド関連解析 GWAS を行ない、周期分化の責任ゲノム領域を探索した。

4. 研究成果

(1) 幼虫の発育成長と遺伝子発現

2019 年から 2022 年 10~11 月に、米国バージニア州, ウェストバージニア州, オハイオ州, イリノイ州において、Brood IX, X, XIII, XIV, XXII の幼虫の発掘調査を行なった。17 年ゼミのブルードについては、得られた幼虫は主に *M. cassini* で、*M. septendecim* は少数であった。また *M.*

septendecula は 2ヶ所でわずかな個体只得られただけだった。羽化予定年(17年め)の前の11年めから16年めの幼虫集団では、*M. cassini*, *M. septendecula* とともに終齢(5齢)が殆どを占めていた。羽化予定年前年(16年め)には、殆どすべての終齢が赤眼となっていたが、羽化予定年の4年前(13年め)の前年(12年め)にも、*M. cassini* では10~16%の個体が赤眼となっており、また、*M. septendecim* でも5~6%の個体が赤眼となっていた。11, 13, 14, 15年めでは、赤眼個体はごく稀であった。幼虫体重には性差があり、雌は雄より平均体重が重い。性別にみると、12年めに比較的多くの赤眼が出現した *M. cassini* では (Bemis Woods の Brood XIII, Batavia の Brood XIV), 出現した赤眼の個体は同じコホートの全5齢幼虫の中で上位の体重を持っており、白眼より平均体重が重かった。

5齢幼虫の頭部組織から抽出したRNAをシーケンスして遺伝子発現を調べたところ、白眼と赤眼の幼虫の間で、*M. cassini* では3154個、*M. septendecim* では1657個の発現変動遺伝子が見出された。発現変動パターンによって遺伝子をクラスタリングした結果、*M. cassini* では6個、*M. septendecim* では5個のクラスターに分けられた。両種で発現が赤眼でアップしている遺伝子は814個(アノテーションされている遺伝子696個)、ダウンしている遺伝子は157個(アノテーションされている遺伝子132個)みられた。発現量が赤眼でアップしている遺伝子は、Signaling receptor/response to stimulus, cuticle development/pigmentation に関わる遺伝子などがエンリッチされていた。Signaling receptor/response to stimulus に関わる発現変動遺伝子としては、例えば、*arrestin 1*, *rhodopsin 3* があげられる。一方、発現がダウンしていた遺伝子は、*muscle development* の遺伝子などがエンリッチされていた。赤眼個体の変態に向かう生理状態にあるかを見るために、*broad*, *E93* の発現量をみると、*M. cassini* では両遺伝子とも赤眼で高発現していた。*broad* は幼虫形質の維持、*E93* は変態を促進するといわれている。*M. septendecim* では発現傾向は同じだが、有意差はなかった。これらの結果は、越冬前の赤眼幼虫は、変態に備えた外界刺激への応答などの準備をしているものの、変態過程には入っていないものと考えられた。

これらの結果は、4の倍数年に臨界体重を超えたかによって、変態への移行をチェックするゲートがあり、超えていた個体は白眼から赤眼に変わって変態準備状態となるという、4年時計・4年ゲート仮説と整合性があると考えられた。

(2) 全ゲノム解析

アセンブルされた17年ゼミ *M. cassini* のメスのゲノムサイズは6006 Mbで、BUSCOスコアはcomplete, 95.1% (single 92.8%; 2.3% duplicated), fragmented, 3.7%, missing, 1.2%であった。ゲノムアノテーションの結果、20910個のタンパクコード遺伝子が予測された。

3種群7種60個体について、ゲノムの約15倍のカバレッジのリシーケンスを行い、上記の *M. cassini* ゲノムを参照配列として、SNPデータを取得した。PCA解析の結果、3つの種群間では大きな遺伝的分化があるが、種群内の13年ゼミ17年ゼミの分化は相対的に非常に小さいことが確認された。60個体全部について欠落のないSNPのみを集めたデータを用いて最尤法による系統解析を行なった結果、種群内の13年ゼミ17年ゼミの分岐回数は限られていることが判明した。*Cassini* 種群では1回、*Decim* 種群では2回(*M. tredecim* と *Neosep* グループ [*M. septendecim* + *M. neotredecim*]) の分岐および *M. septendecim* と *M. neotredecim* の分岐)、*Decula* 種群では2回 (*M. septendecula* の一部と *M. tredecula* の分岐および *M. tredecula* から *M. septendecula* の一部への分岐)。SMC++によるデモグラフィック推定の結果、各種群での周期分化は約9万年前から2万年前までの最終氷期を含む期間に起こっており、有効集団サイズの減少の後に周期分化が起こってその後集団サイズが上昇するパターンが見られた。幼虫期の長さ(13年, 17年)に関するゲノムワイド連関解析GWASを行い、有意なSNPを検出した。ここではその詳細については省略する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Simon, C., Cooley, J.R., Karban, R., Sota, T.	4. 巻 67
2. 論文標題 Advances in the Evolution and Ecology of 13- and 17-Year Periodical Cicadas	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annual Review of Entomology	6. 最初と最後の頁 457-482
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1146/annurev-ento-072121-061108	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Karagyan, G., Golub, N. and Sota, T.	4. 巻 117
2. 論文標題 Cytogenetic characterization of periodical cicadas (Hemiptera: Cicadidae: Magicicada)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Entomology	6. 最初と最後の頁 474-480
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14411/eje.2020.050	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Sota, T.	4. 巻 37
2. 論文標題 Life-cycle control of 13- and 17-year periodical cicadas: A hypothesis and its implication in the evolutionary process	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Ecological Research	6. 最初と最後の頁 686-700
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1440-1703.12354	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Saito, N., Yamamoto, S., Kakishima, S., Okuzaki, Y., Rasmussen, A., Kritsky, G., Cooley, J., Simon, C., Sota, T.
2. 発表標題 周期ゼミ幼虫におけるトランスクリプトーム解析
3. 学会等名 第69回日本生態学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 曾田貞滋
2. 発表標題 周期ゼミの生活史：その進化過程と制御機構
3. 学会等名 日本昆虫学会第82回大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔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	山本 哲史 (Yamamoto Satoshi) (10643257)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農業環境研究部門・研究員 (82111)	
研究分担者	藤澤 知親 (Fujisawa Tomochika) (10792525)	滋賀大学・データサイエンス教育研究センター・助教 (14201)	

	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
研究協力者	クーリー ジョン (Cooley John R.)		
研究協力者	クリツキー ジーン (Kritsky Gene)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	サイモン クリス (Simon Chris)		
研究協力者	齊藤 奈美歩 (Saito Namiho)		
研究協力者	柿嶋 聡 (Kakishima Satoshi)		
研究協力者	奥崎 穰 (Okuzaki Yutaka)		
研究協力者	荒木 祥文 (Araki Yoshifumi)		
研究協力者	伊藤 武彦 (Ito Takehiko)		
研究協力者	豊田 淳 (Toyoda Atsushi)		

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			
米国	University of Connecticut	St Joseph University		