

機関番号：82626

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21770260

研究課題名（和文） 社会性アブラムシにおける階級分化・分業を制御する分子基盤の解明

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of caste differentiation and division of labor in social aphids

研究代表者

沓掛 磨也子 (KUTSUKAKE MAYAKO)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究員

研究者番号：90415703

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、社会性アブラムシを対象に、兵隊の階級分化、社会行動、分業に関わる分子基盤に関する総合的な理解をめざして、兵隊・非兵隊間での cDNA サブトラクションおよび二次元電気泳動をおこない、兵隊に特異的または優勢的に発現する遺伝子やタンパク質を多数得ることに成功した。また、ゴール修復という兵隊の社会行動に関わる新規タンパク質について機能解析をおこなった。

研究成果の概要（英文）：To understand the molecular bases of caste differentiation, social behavior, division of labors in social aphids, many genes and proteins that expressed specifically or dominantly in soldiers were obtained from a cDNA subtraction experiment and 2D-PAGE analysis between soldiers and non-soldiers. Also, biological function of a novel protein that is involved in a social behavior, gall repair, was analyzed in this study.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：社会性昆虫、兵隊アブラムシ、階級分化、社会行動、分業、兵隊特異的遺伝子

1. 研究開始当初の背景

社会性昆虫に見られる高度かつ巧妙な社会がどのように成立し、維持され、また進化してきたのかを知ることは、進化生物学における興味深いテーマである。これまで研究担当者らは社会性アブラムシに着目して、集団から個体、生態から行動、生理、細胞、分子といった幅広いアプローチからの研究を遂行してきた。

アブラムシの社会には、繁殖を行う普通個体と、自己犠牲的な社会行動を示す兵隊という二つの階級が存在する。アブラムシは単為

生殖により繁殖するため、兵隊と普通幼虫は同一ゲノムをもつ遺伝的クローンであるが、兵隊は普通幼虫と比べて、形態、妊性、行動など様々な点で異なっている。これらの表現型の違いは、外部要因に誘導された遺伝子の発現パターンの違いによって生じると考えられる（図1）。

これまで研究担当者らは、ハクウンボクハナフシアブラムシの兵隊で特異的に発現するカテプシンBプロテアーゼ遺伝子を発見し、攻撃毒としての生物学的機能や分子進化過程を明らかにしてきた。しかしながら、この

攻撃毒プロテアーゼ遺伝子は、数多く存在することが予想される兵隊特異的発現遺伝子群のうちの一つにすぎない。よって、兵隊分化経路の全体像を理解するためには、分化初期に発現する遺伝子も含めて、より広範囲に兵隊特異的発現遺伝子を探索、同定していく必要があった。

一方、研究担当者らは、兵隊によるゴール修復という社会行動の分子基盤についての研究もおこなってきた。モンゼンイスアブラムシはゴール（巣）が壊されたとき、兵隊が自分の体液を放出して脚で混ぜ固め、ゴールにあけられた穴を迅速に塞ぐ（図2）。これまでの研究から、このゴール修復時の分泌液凝固反応には、兵隊体内で発現が上昇しているフェノール酸化酵素および内部繰り返し配列をもつ新規タンパク質の、少なくとも2種類の因子が関与していることがわかっていった。フェノール酸化酵素は体液のメラニン化に関わることが知られているが、新規タンパク質については、その生物学的機能はまったくわかっていなかった。

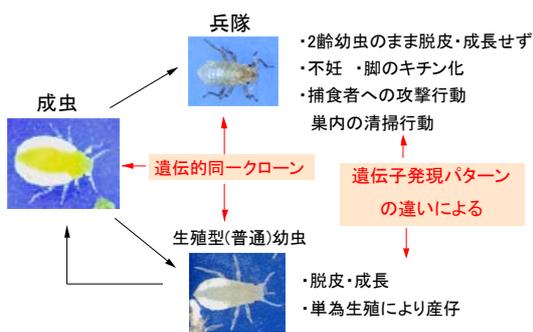


図1 ハクウンボクハナフシアブラムシにおける兵隊分化



図2 モンゼンイスアブラムシ兵隊によるゴール修復行動 (矢印は兵隊が放出した分泌液)

2. 研究の目的

本研究課題では、社会性アブラムシに見られる兵隊階級の分化、分業、社会行動に着目し、兵隊で特異的または優勢的に発現する遺伝子群の網羅的な同定、発現解析、機能解析をおこなうことにより、兵隊の階級分化および生物機能に関わる分子基盤について明らかにする。具体的には、以下の項目について取り組んだ。

- (1) 兵隊特異的発現遺伝子群の網羅的探索と発現解析
- (2) 兵隊-普通個体間のプロテオーム比較解析
- (3) 兵隊の社会行動に関わる新規タンパク質の機能解析

(1), (2)は、真社会性ハクウンボクハナフシアブラムシを対象に、カテプシンBプロテアーゼ以外の兵隊特異的発現する遺伝子やタンパク質を同定する。(3)は、ゴール修復行動を示すモンゼンイスアブラムシの兵隊において優勢的に発現する新規タンパク質について、組換えタンパク質を利用した機能解析をおこない、ゴール修復における役割について考察する。

3. 研究の方法

- (1) 兵隊特異的発現遺伝子群の網羅的探索と発現解析

兵隊特異的に発現する遺伝子群はcDNA サブトラクション法により選別した。実験はキット (Clontech PCR-Select cDNA Subtraction Kit) のプロトコールに従っておこない、Tester cDNA にはハクウンボクハナフシアブラムシの2 齢兵隊幼虫、Driver cDNA には2 齢普通幼虫を用いた。これまでの経験から、cDNA サブトラクションにより得られるクローンのうち約7 割はカテプシンBプロテアーゼ遺伝子であることがわかっていった。今回はこれを出来る限り排除するため、サブトラクション後のcDNA ライブラリーのインサートチェック時に、通常用いるベクター配列のプライマーに加えて、カテプシンB 特異的プライマーを混合し、カテプシンB のクローンをあらかじめ識別できるようにした。非カテプシンB と判断されたクローンについて塩基配列を決定し、BLAST 検索および出現頻度の解析をおこなった。

発現解析は、出現頻度が高かった5 種類の遺伝子について、兵隊と普通幼虫における発現量の比較をリアルタイム定量 RT-PCR 法によりおこなった。標準化するためのコントロール遺伝子には、エロンゲーション 1 α 遺伝子およびリボソームタンパク質 L40 遺伝子の2 種類を用いた。なお、#3 遺伝子については、2 種類の類似配列 (図3 では#3*と表記) が存在したが、遺伝子発現解析においては、両方の共通領域にプライマーを設計して定量をおこなった。

- (2) 兵隊-普通個体間のプロテオーム比較解析

兵隊および2 齢普通幼虫におけるタンパク

質発現パターンを二次元電気泳動法により比較解析し、兵隊に特異的または優勢的に発現しているスポットを検出した。また、それらのスポットについてN末端アミノ酸配列解析をおこなった。

(3) 兵隊の社会行動に関わる新規タンパク質の機能解析

モンゼンイスアブラムシ兵隊由来の新規タンパク質の組換えタンパク質は、発現ベクターpET15bを用いて大腸菌 BL21 (DE3)pLysSにおいて発現させ、ニッケルカラムで精製した。この組換えタンパク質を用いて、ゴール修復時の分泌液凝固反応を人為的に再現する *in vitro* 凝固実験をおこなった。この実験では、組換えタンパク質 (4.5 μg/μl)、フェノール酸化酵素(カビ由来標品, 0.5 U/μl)、および反応基質としてL-ドーパ(8.3mM)を混合して、室温で反応させ、1) 反応液が実際に凝固するか、2) 反応過程でこの新規タンパク質がどのような動態を示すのか、について調べた。なお、本実験系は、Suderman *et al.* (2006)を参考にして構築した。

4. 研究成果

(1) 兵隊特異的発現遺伝子群の網羅的探索と発現解析

兵隊 cDNA から普通幼虫 cDNA を差し引き(サブトラクト)した cDNA ライブラリーから、上述の方法により、2352 個のクローンをインサートチェックしたところ、803 クロオンが非カテプシン B クロオンと判断された。これらをシーケンスしたところ、実際に非カテプシン B クロオンであったのは 485 クロオンであった。これらの配列をショウジョウバエおよびエンドウヒゲナガアブラムシの遺伝子配列に対して BLAST 検索し、同じ遺伝子にヒットしたものを出現頻度順に並べた (図 3a, b)。

さらに出現頻度が上位で、かつ興味深いと思われた 5 つの遺伝子 (#1, #2, #3serpin-like, #4, #9JH-esterase-like : 図 3 a, b 左側に表記) について定量 RT-PCR をおこない、兵隊と普通幼虫における遺伝子発現量を 2 つのコロニーにおいて比較した。その結果、#2 以外の 4 つの遺伝子については、兵隊における遺伝子発現量が普通幼虫に比べて約 5 倍から約 15 倍上昇していることが明らかになった (図 4)。ただし JH-esterase (幼若ホルモン分解酵素) に相同性を示した #9 遺伝子に関しては、コロニー 1 において、兵隊での発現量が普通幼虫での発現量に対して 500 倍以上と顕著に発現上昇していることがわかった。

なお、コントロール遺伝子として 2 つの遺伝子 (エロンゲーション 1α 遺伝子とリボソ

ームタンパク質 L40 遺伝子) を用いたが、両者の結果に大きな違いは見られなかった。

クローン数	遺伝子	E-value
#1	19 CG32438-PB:Smc5	2.3
#2	17 CG32223-PA:CG32223	3
#4	14 CG10449-PA:Catecholamines-up	8.00E-06
9	CG14207-PB:CG14207	9.00E-49
9	CG1443-PA:CG1443	4.00E-04
9	CG7692-PA:CG7692	0.77
7	CG1242-PA:Heat-shock-protein-83	1.00E-38
#9	7 CG6414-PA:CG6414	5.00E-20
6	CG3869-PA:Marf	8.00E-15
5	CG11314-PA:CG11314	6.00E-07
#3*	4 CG10913-PA:Serine-protease-inhibitor-6	3.00E-17
4	CG11635-PA:CG11635	0.14
4	CG12051-PA:Actin-42A	1.00E-52
4	CG32829-PA:CG32829	4.00E-12
#3*	4 CG9453-PD:Serine-protease-inhibitor-4	2.00E-21
3	CG10992-PA:CG10992	8.00E-19
3	CG15226-PA:CG15226	0.8
3	CG16908-PA:CG16908	3
3	CG31760-PA:CG31760	4.4
3	CG33519-PB:Unc-89	3.00E-43
3	CG33967-PA:CG33967	0.12
3	CG5526-PA:Dynein-heavy-chain-at-36C	2.2
3	CG6642-PA:antennal-protein-10	1.00E-05
3	CG9358-PA:Pherokine-3	3.00E-19

図 3a ショウジョウバエの遺伝子データベースに対する BLAST 検索の結果

クローン数	遺伝子	E-value
#1	17 ACYP1000639-PA:cytochrome-P450-CYP6A11-protein	3.2
#2	14 ACYP132459-PA:hypothetical-protein	2.4
#3*	11 ACYP1005016-PA:serine-protease-inhibitor-4-serpin-4	4.00E-42
#4	10 ACYP1002185-PA:hypothetical-protein	0.003
10	ACYP155709-PA:hypothetical-protein	6.00E-09
9	ACYP1003907-PA:heat-shock-protein-hsp21.4-isoform-1	9.00E-71
7	ACYP1002010-PA:Heat-shock-protein-83	3.00E-51
#9	7 ACYP1008270-PA:juvenile-hormone-esterase	7.00E-77
6	ACYP1004374-PA:Dynein-heavy-chain-at-36C	0.65
6	ACYP147960-PA:similar-to-CG11314	4.00E-27
5	ACYP1000093-PA:hypothetical-protein	8.00E-23
5	ACYP120741-PA:similar-to-CG1443	1.00E-06
5	lcl hmm265373:Marf	2.00E-46
4	ACYP1000064-PA:Actin-5C	2.00E-52
4	ACYP1007783-PA:drop-dead	3.00E-21
4	ACYP1009881-PA:hypothetical-protein	5.00E-41
#3*	3 ACYP1008381-PA:alaserpin-partial	6.00E-05
3	ACYP1008736-PA:Unc-89	8.00E-99
3	ACYP129249-PA:CG6560	1.00E-16
3	ACYP130077-PA:hypothetical-protein	8.00E-12
3	ACYP131510-PA:CG32778	0.28
3	ACYP137822-PA:hypothetical-protein	5.00E-25
3	ACYP138469-PA:hypothetical-protein	3.3
3	ACYP153304-PA:hypothetical-protein	5.00E-23
3	ACYP154675-PA:hypothetical-protein	1.00E-05
3	ACYP155830-PA:CG1443	2.00E-31

図 3b エンドウヒゲナガアブラムシの遺伝子データベースに対する BLAST 検索の結果

遺伝子	elongation factor 1a		ribosomal protein L40	
	コロニー-1	コロニー-2	コロニー-1	コロニー-2
#1	9.84	5.89	6.78	7.15
#2	1.66	3.25	1.15	3.94
#3	12.96	9.58	8.94	11.64
#4	9.34	4.80	6.44	5.83
#9	781.75	13.04	539.10	15.83

図 4 5 つの遺伝子の兵隊における相対的発現量。兵隊または普通幼虫における各遺伝子の発現量をコントロール遺伝子の発現量 (エロンゲーション 1α 遺伝子またはリボソームタンパク質 L40 遺伝子) で標準化し、普通幼虫における発現量を 1 とした時の兵隊における発現量を比で示した。

(2) 兵隊-普通個体間のプロテオーム比較解析

兵隊と普通幼虫における二次元電気泳動像を比較したところ、カテプシンBも含めて計10個の兵隊特異的または優勢的なスポットを検出した(図5)。これらのうち、5つの新規スポットについてN末端アミノ酸解析をおこない、3スポットのアミノ酸配列を決定することができた。

- HK-2: XTAKLEDEQALV (Xは同定不可の残基)
- HK-3: XGFAGDDAPXAV (Xは同定不可の残基)
- HK-4: ATAKLAEASQAA

しかしながら、これらのタンパク質はいずれも発現量がそれほど多くなかったため、次に予定していた内部アミノ酸配列解析については、十分量のサンプル確保が困難であると判断して実施を見送ることにした。

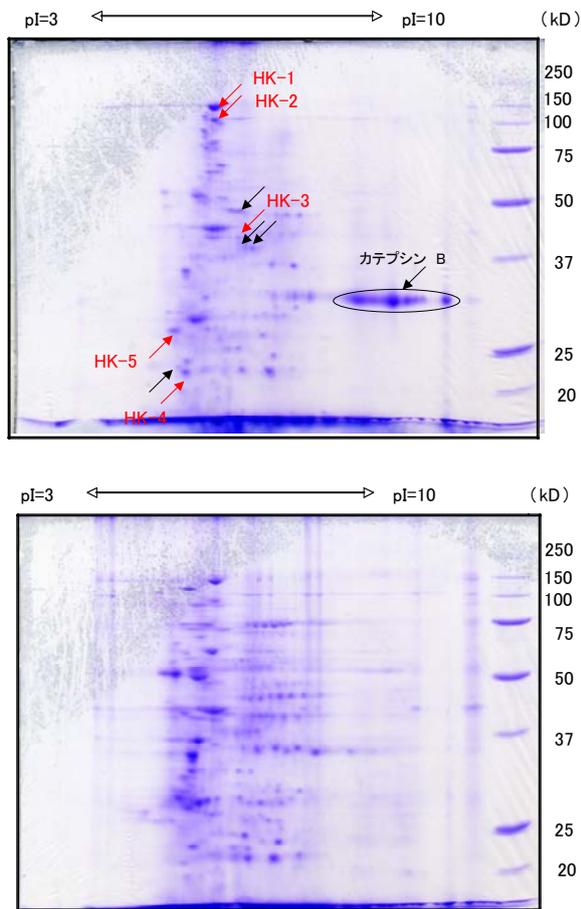


図5 兵隊-普通幼虫間のプロテオーム比較。上は兵隊、下は普通幼虫の二次元電気泳動像。矢印は兵隊に特異的または優勢的に発現しているスポットを示す。赤矢印のスポットについてはN末端アミノ酸配列解析をおこなった。

(3) 兵隊の社会行動に関わる新規タンパク質の機能解析

組換えタンパク質を用いた *in vitro* 凝固実験の結果、反応液はフェノール酸化酵素によりメラニン化して黒化したものの、一晚経過しても反応液は凝固しなかった。一方、反応液を経時的に回収し、SDS-PAGEで解析したところ、この新規タンパク質はフェノール酸化酵素により架橋されて高分子化することが明らかになった(図6)。これらの結果は、この新規タンパク質がゴール修復の分泌液凝固の過程においても架橋されて高分子化している可能性を示唆している。

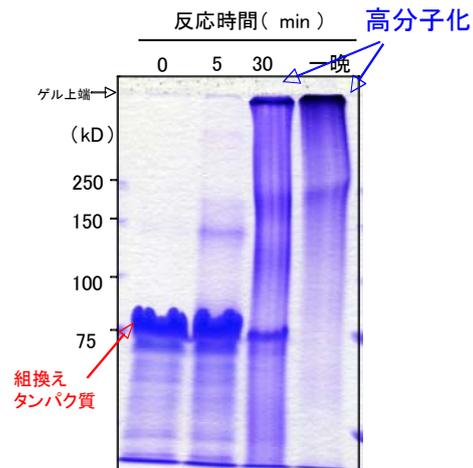


図6 ゴール修復兵隊由来の新規タンパク質の組換えタンパク質を用いた *in vitro* 凝固実験

(4) まとめ

本実験では、社会性アブラムシに見られる階級分化、社会行動、分業の分子基盤を解明することを目的に、遺伝子およびタンパク質レベルでの解析をおこなった。以下に、考察と今後の予定・展望について述べる。

① 兵隊特異的発現遺伝子群の網羅的探索と発現解析

本研究課題では、兵隊で特異的または優勢的に発現する遺伝子を多数発見した。その中でも興味深いのは、セリンプロテアーゼインヒビターである serpin に相同性を示す#3 遺伝子と幼若ホルモン分解酵素である JH-esterase に相同性を示す#9 遺伝子である。#3 serpin 様遺伝子に関しては、その生物学的機能として様々な可能性が考えられるが、セリンプロテアーゼインヒビターはヘビ毒として報告されていることから、カテプシンBとともに兵隊の攻撃毒物質を構成している可能性が考えられる。また、#9 JH-esterase 様遺伝子については、他の社会性昆虫と同様、社会性アブラムシの階級分化に幼若ホルモンが関わっている可能性を示唆するもので

ある。今後、兵隊体内の JH 濃度の測定や、人工飼料飼育系を用いた幼若ホルモンによる兵隊分化誘導系の確立が重要と考えられる。

② 兵隊-普通個体間のプロテオーム比較解析

本実験では、兵隊で特異的または優勢的に発現しているタンパク質を複数同定し、一部については N 末端アミノ酸配列を決定した。いずれもタンパク発現量がそれほど多くなかったため、これ以上の解析は当面おこなわないことにしたが、いずれ本種のゲノム情報が利用できるようになれば、当該遺伝子の同定は容易になると期待される。

③ 兵隊の社会行動に関わる新規タンパク質の機能解析

本実験結果から、ゴール修復をおこなうモンゼンイスアブラムシ兵隊で大量に発現する新規タンパク質は、分泌液凝固反応の過程で、酵素反応の基質として架橋され、高分子化することが明らかになった。(ただし、今回の結果は、フェノール酸化酵素についても組換えタンパク質を作成して確認する必要がある。) このタンパク質のアブラムシにおける本来の機能は不明だが、体液凝固系にかかわる因子である可能性を考えており、今後、ゲノム情報が利用可能なエンドウヒゲナガアブラムシ等を用いて研究を継続する予定である。

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4件)

- ① 査掛磨也子, 社会性アブラムシにおける兵隊特異的な攻撃毒プロテアーゼ ー分子レベルから見た兵隊アブラムシの進化・行動・生態ー, 日本生態学会第58回大会 自由集会 (招待講演), 2011年3月8日, 札幌コンベンションセンター (札幌)
- ② 査掛磨也子ら, 社会性アブラムシの兵隊階級によるゴール修復の分子基盤, 日本動物学会第81回大会, 2010年9月23日, 東京大学 (東京)

[その他]

○研究室ホームページ

<http://staff.aist.go.jp/t-fukatsu/index.htm>

6. 研究組織

査掛 磨也子 (KUTSUKAKE MAYAKO)
独立行政法人産業技術総合研究所・
生物プロセス研究部門・研究員
研究者番号: 90415703

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし