

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370008

研究課題名(和文)原始的眞社会性種の繁殖制御：遺伝子から行動まで

研究課題名(英文)Regulation of reproduction in primitively eusocial insects: from gene to behavior

## 研究代表者

土田 浩治(Tsuchida, Koji)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：00252122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：フタモンアシナガバチの、巣上の行動、血中のJH濃度、脳内アミンの動態、遺伝子発現、体表炭化水素について調査し、女王と産卵ワーカーとの違いを明らかにする事を目的とした。その結果、(1)ワーカーでは、相対日令と、尻振り行動(wagging)、外役頻度、産卵頻度間に有意な正の関係が認められた、(2)産卵ワーカーと女王のJH濃度には違いが見られなかった、(3)脳内アミンにはJH処理の効果が認められた、(4)産卵ワーカーと女王の間には遺伝子発現に明瞭な違いが認められた、(5)産卵ワーカーと女王の間に体表炭化水の明瞭な違いが認められた。以上の事から、産卵ワーカーは生理的に女王と異なる事が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We analyzed and clarified the differences of frequencies of each behavioral category, JH titer in hemolymph, biogenic amines, gene expression, and cuticular hydrocarbons between queens and reproducing workers in *Polistes shinensis antennalis*. The results were, (1) there were positive associations between relative age in workers and each of their frequencies of wagging, foraging trips, and ovipositions, (2) there was no significant difference in JH titer between queens and reproducing workers, (3) topical application of JH had a significant positive effect in increment of biogenic amine (Dopamine), (4) there were clear differences in 8 gene expressions between queens and reproducing workers, and (5) there were clear differences in the profiles of cuticular hydrocarbons between queens and reproducing workers. These results clearly suggest that reproducing workers are physiologically different from queens.

研究分野：昆虫生態学

キーワード：社会性昆虫 ワーカー繁殖 遺伝子発現 脳内アミン JHホルモン 体表炭化水素 カスト分化

### 1. 研究開始当初の背景

昆虫の社会性の進化は、単独性昆虫の母親に見られる**産卵と養育の行動セット**から、社会性昆虫に見られる**産卵の行動セット**(女王)と**養育の行動セット**(ワーカー)への2極化である。しかし、原始的真社会性昆虫には、ワーカー産卵という女王の行動セットがワーカーにも観察され、それが起きるメカニズムは全く解明されてこなかった。今回は、3つのレベル(**遺伝子発現レベル・内分泌レベル・行動レベル**)での違いを分析し、その制御機構の分化を明らかにする。それによって、原始的真社会性種の産卵制御メカニズムにおける、女王とワーカー間での分化程度を明らかにする事を目的とした。

### 2. 研究の目的

本研究では、昆虫社会の最大の特徴である産卵における女王とワーカー間の機能分化を、社会性の初期段階にあるアシナガバチ類で明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究では、原始的真社会性種であるフタモンアシナガバチを用いて、女王とワーカー間の遺伝子発現・内分泌・行動の違いを明らかにする。そのために次の分析を女王、産卵ワーカー、非産卵ワーカー、新女王に行った。

#### (1) 行動観察による巣上の行動の定量化とその比較

12の女王が生存するコロニーに対して、101.6時間観察を行った。巣上の行動として、優位行動、劣位行動、尻振り行動(wagging)、産卵、出巣回数を記録した。コロニーは3日に1回回収し、新しく羽化したすべての個体にマーキングを施した。また、頭幅をノギスで測定した。

#### (2) LC-MS 法による血リンパ中の JH 量の定量

生きた成虫の頭部を切り離し、頭部は液体窒素に入れて固定した。胸部と腹部を切り離し、胸部の腹部側の切り口と腹部末端を粘性の高い瞬間接着剤(アロンアルファ ハイスピード EX)を使って塞いだ。胸部の羽の付け根の後方から前方に押し出すように圧迫し、滲出した血リンパ液をマイクロシリンジ(Hirschmann Ringcaps 5 $\mu$ l 用)とマイクロピペッター(Hirschmann Ringcaps 用)を用いて回収した。回収した体液は氷中のバイアル管(マルエムマイテーパーバイアル No.3)の中に入れた。腹部第2節から第5節の節間膜に鋭利なピンセット(Dumont No. 5)で、合計18カ所程度の穴を開けた。600 $\mu$ l のチューブの底に穴を開け、そのチューブに処理した腹部を入れ、さらにそれを1.5 ml のチューブに入れた。これを遠心分離器に掛けて、4 $^{\circ}$ C の条件で、4000-4200rpm の条件で5分間遠心し、滲出した血リンパ液を先の

バイアル管に回収した。回収方腹部をもう一度遠心分離にかけて、血リンパ液を回収した。血リンパ液の回収が終わった胸部と腹部は、解剖のために-80 $^{\circ}$ C で保存した。回収した血リンパ液17 $\mu$ l に内部標準として10ng の Fenoxycarb が入った90 $\mu$ l の MeOH と90 $\mu$ l の Isooctane を加え、30秒間ボルテックスを行い、室温で30分間放置した。バイアルの蓋を外して、パラフィルムで覆って8500rpm で15分間遠心分離を行った。Isooctane 相(上層)を別のバイアルに移した。残った MeOH 層をボルテックスし、バイアルの蓋を外して、パラフィルムで口を覆って10000rpm で30分間遠心分離し、MeOH 層を Isooctane 層が入ったバイアルに移した。Isooctane 層/MeOH 層を真空エバポレータで乾燥後、20 $\mu$ l の MeOH を加えて濃縮した。この濃縮液の5 $\mu$ l を LC-MS で Cornette et al. (2008)と同様な方法で分析した。

(3) HPLC-ECD 法による脳内アミン量の定量  
同じ日に羽化したメス成虫2匹を、一方にはアセトン2 $\mu$ l(コントロール区)、もう一方に50 $\mu$ g/ $\mu$ l(溶媒アセトン)の2 $\mu$ l 溶液をハミルトンシリンジで局所施用した(処理区)。処理区とコントロール区の個体は、別々のクリーンカップに移し、約一時間の間、暗条件で静置した後、巣に戻した。処理4日後と処理8日後の個体をコロニーからとりだし、速やかに頭部を液体窒素で固定、分離し、液体窒素中で保存した。そのサンプルから、低温条件下(4 $^{\circ}$ C)で解剖し、脳を取り出し、Sasaki & Nagao (2001)の方法に従って、脳内アミンの分析を行った。

(4) 定量的 PCR による8つの遺伝子の発現物質の定量  
液体窒素で固定し、-80 $^{\circ}$ C で保存した頭部から、Trizol 試薬を使って RNA を抽出した。これらの RNA から、逆転写酵素を使い、cDNA を合成した。これらの cDNA のサンプルから、定量的 PCR 実験を行った(TAKARA, Thermal Cycler Dice TP760)。

(5) GC-MS 法による卵と体表の炭化水素 CHC プロフィールの測定  
卵表面の炭化水素に、パスツールピペットを加工した容器を作製した。作製した容器はバイアル(胴径15mm $\phi$ ×全高50mm、容量3ml、スペシメンバイアル、アサヒテックノグラス株式会社製)に入れて使用した。この容器に無水ヘキサン(99%以上、シグマアルドリッチジャパン株式会社製)50 $\mu$ l を分注し、回収した卵を浸漬した。-20 $^{\circ}$ C で24時間静置した後、卵のみをとりだし、抽出液は-20 $^{\circ}$ C で保存した。成虫は個別にバイアル(胴径15mm $\phi$ ×全高40mm、容量3ml、NEG スクリューバイアル、ニチデン理科ガラス株式会社製)に入れ、-80 $^{\circ}$ C で保存した。成虫の体表炭

化水素の抽出は、成虫の腹部を無水ヘキササン(99%以上、シグマアルドリッチジャパン株式会社製)100 $\mu$ l でリンスし、抽出液は、卵と同様に、容器に入れて-20 $^{\circ}$ Cで保存した。リンス後、腹部を解剖し卵巣の発達度合いを調査した。体表炭化水素組成の分析にはGC-MS(質量分析計 HP-5973、ヒューレット・パッカード株式会社製、ガスクロマトグラフィー HP-6890、ヒューレット・パッカード株式会社製)を使用した。カラムはキャピラリーカラム HP-5MS(カラム内径 0.25mm、皮膜厚 0.25 $\mu$ m、長さ 30cm;アジレントテクノロジー株式会社製)を用い、キャリアーガスはヘリウムを用いた。気化室内温度は325 $^{\circ}$ Cに設定した。昇温条件は Dani et al. (1996)を参考にして、初期温度 150 $^{\circ}$ Cを2分間保持し、325 $^{\circ}$ Cまで毎分 7 $^{\circ}$ C 上昇、325 $^{\circ}$ Cを5分間に設定した。分析には体表炭化水素の抽出物 1/200 等量を用いた。得られたマススペクトルより抽出物中の炭化水素成分の構造を推測した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 行動観察による巣上の行動の定量化とその比較

12コロニーの女王が存在するコロニーの巣上のワーカーの行動を、101.6時間観察し、GLMで分析した。その結果、コロニーのワーカーの平均日令に対する自身の日令(相対日令)が重要な要素であり、相対日令が上がるにつれて、腹部を激しく左右に振動させる行動(wagging)の頻度、外役の頻度、産卵の頻度が上昇する有意な傾向が認められた(Table 1)。そこで、産卵ワーカーと非産卵ワーカーの相対日令を比較した。その結果、両者の間には有意な差が認められ、産卵ワーカーは非産卵ワーカーよりも日令が高い個体である事が明らかとなった(Fig. 1)。以上の事から、フタモンアシナガバチのワーカーは、日令が進むにつれて、卵巣発育が促進されるとともに、が外役の頻度も上昇する事が明らかとなった。

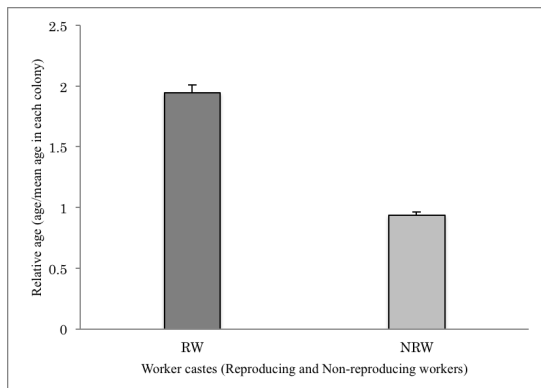


Fig. 1 The difference in relative age between reproducing workers and non-reproducing workers. The difference between 2 classes was statistically significant.

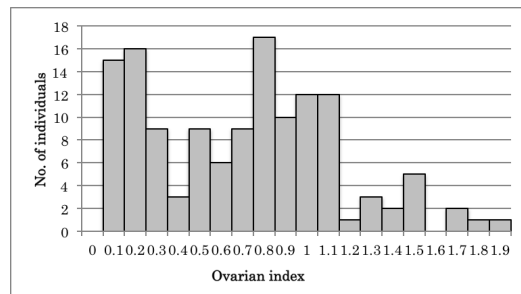
Table 1. Generalized linear models for the each behavioral categories of workers.

	Relative age	P
<i>Wagging</i>	<i>0.311±0.053</i>	<i>8.54e<sup>-9</sup></i>
Dominance	0.007±0.005	0.1457
Subordinate	0.035±0.042	0.4058
<i>Foraging</i>	<i>0.094±0.032</i>	<i>0.0031</i>
<i>Oviposition</i>	<i>0.029±0.008</i>	<i>0.0001</i>

Each behavior with italic letters indicates highly significance

##### (2) LC-MS 法による血リンパ中の JH 量の定量

巣を創設し、ワーカーが羽化する前のコロニーの女王(F; foundress)、ワーカーが羽化した後のコロニーの女王(Q; queen)、産卵ワーカー(RW; reproducing workers)、非産卵ワーカー(NRW; non-reproducing workers)の4つのクラスに分けて JH を測定した。産卵ワーカーと非産卵ワーカーの区別は、最も発達した2卵の長径と短径を掛け合わせで加算した卵巣インデックスが 0.4 を超える個体を産卵ワ



ワーカー、それ以下の個体を非産卵ワーカーとした(Fig. 2)。

Fig. 2. Frequency distribution of ovarian index for workers.

LC-MS の分析には、17 $\mu$ l 以上の血リンパ液が無いと分析結果が不安定であったため、4つのクラス別に個体毎の血リンパを混合し、分析に十分な血リンパ液を確保した。また、NRWとRWにそれぞれ1サンプルずつ、極端に高い値を示す個体が観察されたので、Smirnov-Grubbs 検定で外れ値の検定を行った。その結果、それらの個体は  $P < 0.05$  で外れ値である事が判明したので、その2サンプルのデータは除外し解析を行った。また、NRWのうち、2日令の個体のみをとりだし、2NRWと言うクラスを新たに作製し、5クラスのデータで一元配置の分散分析を行った結果、クラスは JH 濃度に対して有意な効果が認められた( $F_{4,51}=4.470$ ,  $P=0.0036$ )。その結果を Fig. 3 に示した。

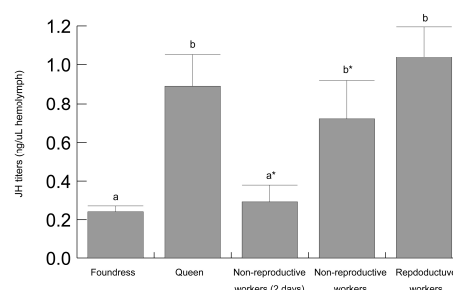


Fig. 3. JH titer for each class of individuals. The statistical comparison between 2NRW and NRW was not conducted because the samples in the former class was included in those in the latter class.

創設女王の JH 濃度が最も低く、女王、NRW と RW の JH 濃度は同じように高い値を示した。女王と、NRW と RW の間には有意な差は認められなかった(Bonferroni/Dunn 検定)。NRW の中の 2日令だけのクラスである 2NRW は創設メスとの間に有意差が認められず、また、女王と RW との間にも有意差が認められた。以上の事から、創設メスの JH 濃度は低い事、ワーカーは羽化直後は JH 濃度が低いが、やがて上昇し、女王との差が認められなくなる事が明らかとなった。

(3) HPLC-ECD 法による脳内アミン量の定量  
2012 年に 5 コロニーのワーカーについて脳内アミン(OA; octopamine, DA; dopamine, TA; tyramine, 5HT; serotomine, NADA; N-acetyldopamine (dopamine の代謝物質))を調査した所、dopamine (DA)と NADH で、処理間で有意差が認められた(Fig. 4)。Wilcoxon-test で検定した結果(Table 2; 省略)、4 日令の DA は 2つのコロニーで、また、NADA は一つのコロニーで有意差が認められ、JH 処理により、これらの bionomic amine の量が増加していた。また、8 日令では、C12010 コロニーを含めると、4つのコロニーで、dopamine で有意差が認められた。また、NADA でも、2コロニーで有意差が見られた。以上の事から、JH 処理はドーパミンの上昇につながり、特に、8日令でその傾向が顕著である事が明らかとなった。NADA はドーパミンの代謝産物である事から、ドーパミンの上昇に連動する様にして上昇したものと考えられた。

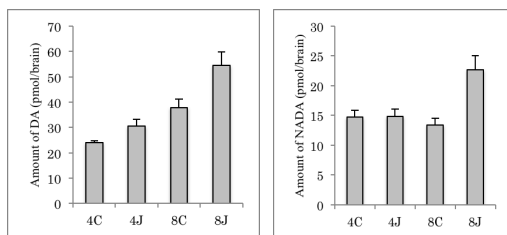


Fig. 4. Mean±SE level of dopamine (left) and NADA (right) in workers of each treatment in colony 12004 (4C; 4 days old control, 4J; 4days old JH treatment, 8C; 8 days old control, 8J; 8 days old JH treatment).

創設メスと女王間で脳内アミンを比較した所、有意差は認められなかった(Fig. 5)。創設メスと女王のドーパミン量は、およそ 80pmol であり、ワーカーの値より高い傾向にあった。また、NADA の量は 25pmol 程度であり、ワーカーの値より高い傾向にあった。

すべての脳内アミンの変数を用いて、判別分析を行った(Fig. 6, 7; 省略)。関数 1 は大

きいほど DA が少なく、関数 2 は大きいほど TRP (Tryptophan) が少ない事を示している。女王の方が DA の量が多い事を示していた。

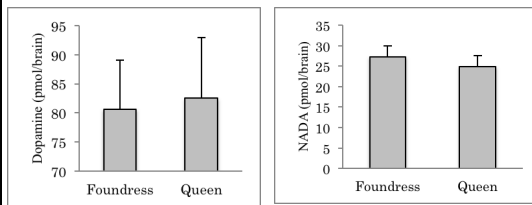


Fig. 5. Mean±SE level of dopamine (left) and NADA (right) in both foundress and queen.

#### (4) 定量的 PCR による 8 つの遺伝子の発現物質の定量

8 つの遺伝子の発現量を定量した(Fig. 8; 省略)。malV 遺伝子と ILR2 遺伝子の発現量は新女王で高く、逆に For 遺伝子と D1 遺伝子は、新女王で低かった。また、Vg 遺伝子の発現量は女王で高かった。これらのデータを元に、UPGMA 法によって dendrogram を作製した(Fig. 9)。

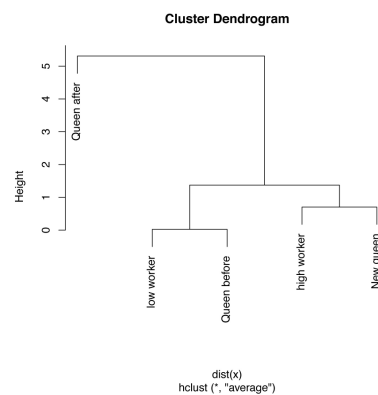


Fig. 9. Dendrogram for 8 gene expression levels for foundress (queen before), queen (queen after), gyne (new queen), reproductive workers (high workers), and non-reproductive workers (low workers)

創設メスは非繁殖ワーカーに近く、また、新女王は繁殖ワーカーに近い所に位置した。女王は他のクラスの個体とは大きく異なった所に位置しており、遺伝子発現が異なっている事を示していた。

#### (5) GC-MS 法による卵と体表の炭化水素 CHC プロファイルの測定

卵表面の炭化水素の 26 成分のうち、多変量判別分析によって得られた関数 1 と関数 2 を下の表に示した。卵表面の炭化水素の 26 成分のうち、多変量判別分析によって得られた関数 1 と関数 2 を下の表に示した。これらのデータを元に、関数 1 と関数 2 を元に 2 次元空間上にプロットした(Fig. 10)。

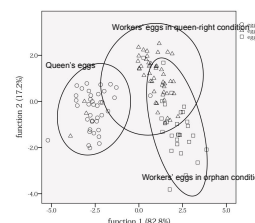


Fig. 10. Scatter plots for hydrocarbons on eggs laid by queens (circle), workers in queen-right (triangle), and those in orphan condition (square).

女王の卵の体表炭化水素のプロフィールは、ワーカーの物から明瞭に区別され、それは女王の有無に影響を受けなかった。特に、11-, 15-, 13-, 17-dimeC<sub>31</sub>、x-meC<sub>32</sub>、11-, 15-, 13-, 17-dimeC<sub>33</sub>の3成分が判別関数に相関が高い事が明らかとなった。成虫の体表面の炭化水素の26成分のうち卵表面の炭化水素の26成分のうち、多変量判別分析によって得られた関数1と関数2を下の表に示した。

関数1と関数2を元に2次元空間上にプロットした(Fig. 11)。女王の体表炭化水素のプロフィールは、産卵ワーカーと非産卵ワーカーから明瞭に区別され、重複する事は無かった。判別関数1と判別関数2と相関係数が高かった物質は、11-, 13-, 15-meC<sub>31</sub>、11-, 13-, 15-, 17-meC<sub>31</sub>、11-, 15-, 13-, 17-meC<sub>33</sub>、n-C<sub>28</sub>の4成分であった。卵と体表の双方に共通した成分は11-, 15-, 13-, 17-meC<sub>33</sub>であった。

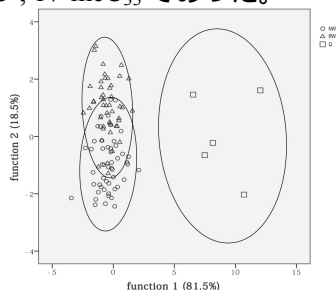


Fig. 11. Scatter plots for cuticular hydrocarbons for reproductive workers (circle), non-reproductive workers (triangle), and queens (square).

## 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 15件)

1. Matsuyama, S. Nagao T. Sasaki K. (2015) Consumption of tyrosine in royal jelly increases brain levels of dopamine and tyramine and promotes transition from normal to reproductive workers in queenless honey bee colonies. *General and Comparative Endocrinology* 211: 1-8. 査読有り. DOI: 10.1016/j.ygcen.2014.11.005.
2. Okada Y. Sasaki K., Shimoji H. Tsuji K. Miura T. (2015) Social dominance and reproductive differentiation mediated by dopaminergic signaling in a queenless ant. *Journal of Experimental Biology* 218: 1091-1098. 査読

有り. DOI: 10.1242/jeb.118414.

3. Blankenburg S. Balfanz S. Hayashi Y. Shigenobu S. Miura T. Baumann O. Baumann A. Blenau W. (2015) Cockroach GABA-B receptor subtypes: Molecular characterization, pharmacological properties and tissue distribution. *Neuropharmacology* 88: 134-144. 査読有り. DOI:10.1016/j.neuropharm.2014.08.022.
4. Tsuchida K. Kudi K. Ishiguro N. (2014) Genetic structure of an introduced paper wasp *Polistes chinensis antennalis* (Hymenoptera, Vespidae) in New Zealand. *Molecular Ecology* 23:4018-4034. 査読有り. DOI: 10.1111/mec.12852.
5. Miyazaki S. Okada Y. Miyakawa H. Tokuda G. Cornette R. Koshikawa S. Maekawa K. Miura T. (2014) Sexually dimorphic body color is regulated by sex-specific expression of yellow gene in ponerine ant, *Diacamma* sp. *PLoS one* 9: e92875. 査読有り. DOI: 10.1371/journal.pone.0092875.
6. Watanabe D. Gotoh H. Miura T. Maekawa K. (2014) Social interactions affecting caste development through physiological actions in termites. *Frontiers in Physiology* 5: 127. 査読有り. DOI: 10.3389/fphys.2014.00127.

[学会発表](計 12件)

1. 土田浩治・大島沙織 ニュージーランドに侵入したフタモンアシナガバチの形質変化. 第59回日本応用動物昆虫学会 2015年3月28日 山形大学(山形市・山形県).
2. Farkhary S. I. Sasaki K. Koyama S. Satoh T. The effect of dopamine on fighting behavior of honey bee virgin queens 第59回日本応用動物昆虫学会 2015年3月28日 山形大学(山形市・山形県).
3. Koyama S. Matsui S. Satoh T. Sasaki K. Octopamine regulates social behaviors between genetically unrelated ant queens. 2014年7月13日~7月18日 International Congress of IUSSI 2014 Australia (Cairns).

[図書](計 0件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況(計 0件)

名称:

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

土田 浩治 (TSUCHIDA Koji)  
岐阜大学・応用生物科学部・教授  
研究者番号：00252122

### (2) 研究分担者

三浦 徹 (MIURA Toru)  
北海道大学・地球環境科学研究科(研究院)・准教授  
研究者番号：00332594

佐々木 謙 (SASAKI Ken)  
玉川大学・農学部・准教授  
研究者番号: 40387353

高橋 純一 (TAKAHASHI Jun-ichi)  
京都産業大学・総合生命科学部・准教授  
研究者番号: 40530027