

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07210

研究課題名(和文)アリ随伴がアブラムシ共生微生物の進化・系統に与えた影響

研究課題名(英文)The effects of ant attendance on evolution and phylogeny of symbionts in aphids

研究代表者

八尾 泉 (Yao, Izumi)

北海道大学・農学研究院・農学研究院研究員

研究者番号：70374204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：アブラムシの体内にはブフネラという微生物が共生しており、必須アミノ酸を宿主アブラムシに供給している。また、ボルバキアという微生物の役割は多岐にわたっている。数種のアブラムシからもボルバキアが検出されているが、その役割は不明である。本研究で扱ったカシワホシブチアブラムシからはブフネラとボルバキアの両方が検出された。そこで、それらの役割を推定するための参考として、両微生物の季節による密度(個体数)変化を調べた。ブフネラには季節的な増減が見られたが、ボルバキアは季節を通して変化はなかった。ブフネラは植物の季節的な変化から影響を受けているが、ボルバキアはアブラムシの栄養状態とは独立していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Aphids have Buchnera, a symbiont provisioning indispensable amino acids to the host aphid through conversion of amino acid in the phloem sap. Besides Buchnera, Wolbachia has been found in various animals and its role displays wide aspects. Wolbachia has been found in several species of aphids, but its role in the host remains unclear. *Tuberculatus macrotuberculatus*, which feeds on *Quercus dentata*, daimyo oak, has Buchnera and Wolbachia. This study examines seasonal trends of densities of Buchnera and Wolbachia to reveal their roles in the host aphids. While Buchnera density changed seasonally, Wolbachia density showed no seasonal trends, indicating that while Buchnera could be influenced by seasonal nutritional changes in host plant, Wolbachia could be independent from aphid nutritional status.

研究分野：進化生態学

キーワード：微生物 アリ アブラムシ カシワ 遺伝子 アミノ酸代謝 自然選択

1. 研究開始当初の背景

微生物 *Buchnera* (以下ブフネラとする) は、全てのアブラムシに内在し、植物篩管液のアミノ酸から必須アミノ酸を合成し、宿主アブラムシに供給している。コナラ属樹木の葉内アミノ酸含有量は、盛夏に著しく減少する。それにも関わらず、アリ随伴アブラムシは、アリに甘露を供給し続けなければならない、共生微生物ブフネラのアミノ酸代謝にも大きな負荷をかけていると予想される。このことから、アリ随伴アブラムシとブフネラの関係は、アリ非随伴アブラムシとブフネラの関係に比べて、より密接に進行してきたと考えられる。本研究は、*Tuberculatus* 属アブラムシ 23 種を対象に、ブフネラの中立遺伝子とアミノ酸代謝・糖代謝遺伝子の進化速度を比較することにより、アリ随伴アブラムシのブフネラが強い選択圧の下で進化してきたという仮説を検証する。また *Wolbachia* (以下ボルバキアとする) とよばれる微生物は昆虫類だけではなく、他の無脊椎動物からも発見され、その役割は寄生的なものから共生的なものまで多岐にわたっている。近年、数種のアブラムシからも検出されているが、その役割は未解明なままである。

2. 研究の目的

(1) ブフネラの DNA

ブフネラは、全てのアブラムシ種が保有する必須共生微生物であり、アブラムシ体内では菌細胞に包まれて存在している。ブフネラは、アブラムシ体内で窒素リサイクリング経路を確立し、アミノ酸が乏しい植物篩管液から必須アミノ酸を合成し、宿主アブラムシに供給している。ブフネラは大腸菌と同じプロテオバクテリア・ガンマ亜族に属し、染色体 DNA の他に環状プラスミド DNA も持っている。中立的な遺伝子は主に染色体 DNA に、アミノ酸代謝に関わる遺伝子は染色体 DNA とプラスミド DNA の両方に存在している (1-2)。

(2) 分散が制限されているアリ随伴アブラムシ

コナラ属樹木に寄生する *Tuberculatus* 属アブラムシは、同属内にアリ随伴種とアリ非随伴種 (以下、非随伴種とする) を含む。先行課題において、同所的に分布するアリ随伴種・非随伴種の集団遺伝構造および野外トラップ実験の比較を行った結果、アリ随伴種は平均対立遺伝子数が少なく且つホモ接合度が高くなる等の局所的な特徴を示し、分散が狭い範囲に制限されていることを示唆した (3-5)。アリ随伴種にとって分散の制限は、季節を通じて寄主植物上で過ごすことを意味する。一般に、植物のアミノ酸濃度・水分は 5~6 月が最も高く、8 月の盛夏には著しく減少する。実際に夏季のアリ随伴種は、体サイズや胚子数が減少し、季節進行による寄主植物の栄養劣化を受けている。それにも関わらず晩秋までコロニーを維持し続けてい

る。一方、非随伴種は、系統を考慮した種間比較において、アリ随伴種より相対的に体サイズが小さく、翅にかかる荷重 (wing loading) が小さく、頻繁に飛翔分散していることが示唆された (6)。

(3) ブフネラへの依存度

非随伴種は、捕食者回避のために、篩管液をあまり吸汁せず、短時間で幼虫を産み、そして飛翔する戦略を採っていると考えられる。つまり、アリ随伴種に比べて、非随伴種の栄養代謝はブフネラへの依存度が低いと考えられる。一方、アリ随伴種のブフネラは、植物の栄養レベルが低い盛夏時においても、アリに甘露を要求される宿主アブラムシに必須アミノ酸を供給し続けなければならない。この依存度の違いは、アリ随伴種-非随伴種間で、ブフネラの保有量や栄養代謝に関わる遺伝子領域の変異の差として現れると予想される。また、二次共生微生物 *Rickettsiella* がアブラムシの体色を変化させている事例も報告されており (7)、ブフネラの栄養代謝を通じて宿主アブラムシの生理状態が変化し、その副産物として表現型 (例えば、体色や翅の色など) が変化することも期待される。

本研究の特色は、アリ随伴アブラムシと非随伴アブラムシそれぞれのブフネラの遺伝的変異・宿主内保有量を比較することで、宿主アブラムシがアリ随伴を獲得した時に、必須共生微生物ブフネラが受けた選択圧を推定することにある。アブラムシ-アリの 2 者間関係に関しては、多くの論文が発表されてきたが、この 2 者間に共生微生物を介在させた論文は極めて少数で (8-9)、アリ随伴・非随伴アブラムシと必須共生微生物ブフネラの関係に焦点を当てた研究は皆無である。アリ-アブラムシ共生関係は、強固なアブラムシ-ブフネラ共生関係を基盤として成立していることに着目した点は独創的といえるだろう。ブフネラの系統・分化は、アブラムシが新規に寄主植物を獲得した進化的背景にもつながっており、本研究は寄主植物-ブフネラ-アブラムシ-アリという階層的関係を統合的に理解するための重要な足がかりとなるであろう。

参考文献

1. Bracho AM, Martineztorres D, Moya A, & Latorre A (1995) Discovery and molecular characterization of a plasmid localized in *Buchnera* sp., bacterial endosymbiont of the aphid *Rhopalosiphum padi*. *J. Mol. Evol.* 41, 67-73.
2. Sandstöm J & Moran N (1999) How nutritionally imbalanced is phloem sap for aphids? *Entomol. Exp. Appl.* 91, 203-210.
3. Yao I (2010) Contrasting patterns of genetic structure and dispersal ability in

ant-attended and non-attended *Tuberculatus* aphids. Biol. Lett. 6, 282-286.

4. Yao I & Kanbe T (2012) Unique haplotypes in ant-attended aphids and widespread haplotypes in non-attended aphids. Ecol. Evol. 2, 2315-2324.

5. Yao I (2012) Ant attendance reduces flight muscle and wing size in the aphid *Tuberculatus quercicola*. Biol. Lett. 8, 624-627.

6. Yao I (2011) Phylogenetic comparative methods reveal higher wing loading in ant-attended *Tuberculatus* aphids (Hemiptera: Aphididae). Can. Entomol. 143, 35-43.

7. Tsuchida T, Koga R, Horikawa M, Tsunoda T, Maoka T, Matsumoto S, Simon JC, & Fukatsu T (2010) Symbiotic bacterium modifies aphid body color. Science 330, 1102-1104.

8. Erickson DM, Wood EA, Oliver KM, Billick I, & Abbot P (2012) The effect of ants on the population dynamics of a protective symbiont of aphids, *Hamiltonella defensa*. Ann. Entomol. Soc. Am. 105, 447-453.

9. Katayama N, Tsuchida T, Hojo MK, & Ohgushi T (2013) Aphid genotype determines intensity of ant attendance: do endosymbionts and honeydew composition matter? Ann. Entomol. Soc. Am. 106, 761-770.

3. 研究の方法

(1) プフネラの複数遺伝子のシーケンスおよび dN/dS の推定

プフネラ染色体 DNA 上に存在するアミノ酸代謝遺伝子の TrpB, ilvD, leuC, 糖代謝遺伝子の pgi, そして中立遺伝子の dnaB と groEL 領域のシーケンスを行う。実験の初期段階では, *Tuberculatus* 属 23 種各種に対して 1 匹ずつ(計 23 サンプル)のシーケンスを行う。

非同義置換と同義置換の割合 (dN/dS) を上記 6 遺伝子で算出し, dN/dS < 1 なら負の自然淘汰 (機能的制約), dN/dS = 1 なら中立的な進化状態 (機能的制約のゆるみ), dN/dS > 1 なら正の自然淘汰 (適応的な進化) と推測できる (1)。さらにフリーソフトの relaxation を用いて, アリ随伴グループと非随伴グループとの間で, 各遺伝子が自然選択から解放されているかどうかをテストした。

< プフネラとボルバキアの季節的定量 >

野外のカシワから定期的に採集した *Tuberculatus macrotuberculatus* (*T. quercicola* から種名変更; 発表論文) のプフネラとボルバキアを, 寄主植物の季節的な変化を考慮して保有量を調べた。本課題では, プフネラとボルバキアの 16S-rRNA 遺伝子を

リアルタイム PCR で増幅・定量し, その初期コピー数をプフネラ・ボルバキアの保有量とする。定量方法は絶対定量法を適用する。スタンダードとして, プフネラ・ボルバキアの 16S-rRNA 遺伝子を用いて, 10 倍希釈系列の検量線を作成する。その検量線から, 各種の DNA 抽出液 1 μL にどのくらいの同遺伝子が含まれていたか (初期コピー数) を定量する。

参考文献

1. 松井淳, Rakotondraparany F, 宝来聡, 長谷川政美 (2008) 霊長類のミトコンドリア DNA における進化速度. 統計数理 56, 101-116.

4. 研究成果

23 種について各遺伝子の塩基配列決定後に, 非同義置換 / 同義置換の割合である dN と dS の比 dN/dS (=) を推定した。続いて, アリ共生種クレードと非共生種クレードの各々を算出したモデルと, 系統樹内の全枝で進化速度一定とするモデルとの尤度の差を, カイ二乗テストで検定した。その結果, ilvD 遺伝子に対してのみ, アリ共生・非共生クレードの を算出したモデルが有意に高かった。アリ共生・非共生クレードの は共に < 1 を示し, 強い純化淘汰の状況にあることが分かった。さらに選択圧が解放されているかどうかを分子系統樹を考慮した方法で行った。その結果 ilvD 遺伝子のみがアリ共生アブラムシで自然選択が緩和していることが有意に示された。アリ随伴によって, 篩管液中のアミノ酸が甘露に流入してしまい, アブラムシは栄養不良の状態になっており, その結果 ilvD は代謝されないようになったと考えられる。

また *T. macrotuberculatus* のプフネラとボルバキアを季節を通じて定量した結果, プフネラ密度は 8 月下旬に有意に低くなり, 季節的变化が見られた。一方, ボルバキアは季節变化が見られなかった。プフネラは植物の季節变化を宿主アブラムシを通じて影響を受けているが, ボルバキアはアブラムシの栄養状態から独立していることが示唆された。

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 3 件)

Yoshizawa K, Johnson KP, Yao I,

Casasola Gonzalez JA, Bess E and Garcia

Aldrete AN (2017) Multiple

trans-Beringia dispersals of the

barklouse genus *Trichadenotecnum*

(Insecta: Psocodea: Psocidae).

Biological Journal of the Linnean

Society 121, 501-513. 査読有り

Yoshizawa K, Yao I, and Lienhard C
(2016) Molecular phylogeny reveals
genital convergences and reversals in
the barklouse genus *Trichadenotecnum*
(Insecta: Psocodea: 'Psocoptera':
Psocidae). **Molecular Phylogenetics and
Evolution** 94, 358-364. 査読有り

Watanabe T, Yao I, and Akimoto S (2015)
Taxonomic revision of the *Tuberculatus
quercicola* group (Hemiptera: Aphididae:
Drepanosiphinae), myrmecophilous
aphids associated with *Quercus* species,
based on morphometric and molecular
phylogenetic studies. **Entomological
Science** 18, 55-65. 査読有り

[学会発表](計 4 件)

八尾泉 (2015) 「アリ随伴アブラムシ共生
微生物ブフネラの遺伝的変異」第 62 回 日本
生態学会 (2015.3/19 鹿児島大学郡元キャン
パス(鹿児島県・鹿児島市))

八尾泉 (2016) 「アリ共生型・非共生型ア
ブラムシの微生物 *Buchnera* におけるアミノ
酸代謝遺伝子の選択強度と進化速度差」
2015 年度日本応用動物昆虫学会・日本昆虫学
会共催支部大会 (2016. 1/19 北海道大学農
学部(北海道・札幌市))

八尾泉 (2016) 「アリ共生型・非共生型
アブラムシの微生物 *Buchnera* におけるアミ
ノ酸代謝遺伝子の選択強度と進化速度差」日
本昆虫学会第 76 回大会・第 60 回日本応用動
物昆虫学会合同大会 (2016. 3/29 大阪府立
大学中百舌鳥キャンパス(大阪府・堺市))

八尾泉 (2017) 「アリ随伴アブラムシ共生
細菌ブフネラのアミノ酸代謝遺伝子にかか
る選択圧と強度」第 64 回日本生態学会
(2017.3/16 早稲田大学早稲田キャンパス
(東京都・新宿区))

[図書](計 1 件)

Stockan, J.A., Robinson, E.J.H., Trager,
J., Yao, I. & Seifert, B. (2016). 1.
Introducing wood ants: evolution,
phylogeny and distribution. pp. 1-36. Wood

Ant Ecology and Conservation. Stockan, J.A.
and E.J.H. Robinson, Eds. Cambridge,
Cambridge University Press.

[その他]
ホームページ
<https://sites.google.com/site/baweiquan/home>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
八尾 泉 (Yao Izumi)
北海道大学・農学研究院・農学研究院研究員

研究者番号 : 70374204