

令和元年6月26日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07798

研究課題名(和文)キノコ栽培を行うシロアリの菌床維持機構を制御する分子基盤

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of social behavior involved with maintenance of fungus comb in fungus-growing termite

研究代表者

北條 優 (HOJO, Masaru)

琉球大学・研究推進機構・特命講師

研究者番号：80569898

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：キノコを栽培するシロアリであるキノコシロアリ(台湾シロアリ)について、主に西表島、沖縄島、台湾島におけるフィールド調査およびDNA解析から、その栽培菌であるオオシロアリタケ属菌の地理的分布パターンを明らかにした。また日本ではこれまで知られていなかったオオシロアリタケ属菌の子実体を発見した。

台湾シロアリの行動解析では、大小2型のワーカー間に菌園管理における分業が見られることが明らかになった。

台湾シロアリの全カーストを用いた遺伝子の網羅的発現比較解析では、セルロース類の消化や菌園管理に関わる可能性のある遺伝子を特定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シロアリにおけるキノコ栽培は、人間の農耕よりもはるかに歴史が長く、その進化にはシロアリが社会性を獲得したと大きく関係していると考えられる。シロアリとキノコの両サイドから網羅的な遺伝子発現解析することで、両方で補完されている代謝経路などがわかり、栽培共生進化の解明にも近づけた。

また、オオシロアリタケの子実体は大変美味しいが、シロアリなしでの培養が難しい。菌園内のシロアリの行動解析やその分子機構を理解することで、オオシロアリタケキノコの人工培養にも道が開ける。

研究成果の概要(英文)：Our field researches and DNA analyses elucidated that the distribution pattern of *Termitomyces* spp. cultivated by fungus-growing termite, *Odontotermes formosanus*, in Iriomote, Okinawa and Taiwan islands. A new fruiting body lacking pseudorhiza of *Termitomyces* species was identified at Iriomote, Ishigaki and Okinawa islands. It was revealed by behavioral analyses that the polyethism between two workers of *O. formosanus* in maintenance of fungus comb was exist. Some candidate genes related to the digestion of cellulosic materials and the maintenance of fungus comb were identified by comprehensive gene expression analysis of all caste of *O. formosanus*.

研究分野：分子生態学

キーワード：キノコシロアリ オオシロアリタケ 栽培共生 台湾シロアリ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

代表的な真社会性昆虫であるシロアリのコロニー内には、労働を分担する様々なカーストが存在する。シロアリのエサとなる植物枯死体は動物にとって分解しにくいリグノセルロースから成っているが、祖先的なシロアリでは腸内に原生動物を共生させることによってこの問題を解決している。一方、派生的に進化したグループであるキノコシロアリの仲間、それとは異なる巧妙な戦略でセルロース類を分解し栄養を摂取している。働きアリ(ワーカー)が木をかじり取り未消化のまま腸を通過して出した糞で菌床(菌園)を作り、そこで担子菌(オオシロアリタケ *Termitomyces*) を栽培し、それらにセルロース類を分解させている。

このようなキノコ農業は、同じように社会性を進化させたアリ類でも報告されている。アリではゲノム科学的手法が進んでおり、キノコ栽培の進化に関して比較ゲノム解析が可能であるが、シロアリ類ではゲノムサイズの大きさ等の問題もあり、ゲノム解読は遅れている。また、キノコシロアリを含む派生的なシロアリグループ(シロアリ科)が亜熱帯・熱帯域のみに分布し、複雑な社会構造、食性の多様化から飼育が難しいといった問題もあり、行動学的解析も遅れている。

日本には、唯一のキノコシロアリ類であるタイワンシロアリ *Odontotermes formosanus* が沖縄県の八重山諸島および沖縄島の一部地域に分布している。研究代表者はフィールド研究を精力的に行うことでサンプル入手の問題を解決することができたことから、本研究を計画した。

2. 研究の目的

(1) タイワンシロアリの菌園管理における社会行動の解明

地中から掘り出した菌園はシロアリを取り除くと、数日のうちに雑菌に覆い尽くされてしまう。つまり、雑菌抑制などの菌園内の環境制御にシロアリが直接関与していることを示唆している。またシロアリではワーカーの仕事の分担(分業)が食物摂取に重要な役割を担っていることが知られている。しかし、これまで菌園管理におけるシロアリの関与や社会的分業についてはほとんど明らかになっていなかった。

フィールドでの菌園内、および室内での野生に近い状態で飼育した菌園内におけるタイワンシロアリの行動観察を行い、菌園構築、菌糸の刈り取りにおけるワーカーの年齢間、カースト間での役割分担を明らかにした。また、子実体形成に関わるワーカーの関与も明らかにした。

(2) タイワンシロアリのトランスクリプトーム解析による菌園構築の分子機構

日本のタイワンシロアリを用いて、全カーストの RNA-seq を行った。日本のタイワンシロアリは大小2型のワーカーが存在しており、本研究では、特にワーカー間の比較トランスクリプトーム解析を行うことで、雑菌の抑制やセルロース類の消化に関わると思われるカテゴリーの遺伝子群を調べ、菌園構築における分子機構を明らかにした。

(3) タイワンシロアリの栽培するオオシロアリタケ類の地理的分布パターン

日本のタイワンシロアリは2種のオオシロアリタケ属菌を栽培していることが菌園内の菌糸の DNA 解析から知られているが、オオシロアリタケ子実体からの DNA 解析は行われておらず、菌園内の菌と子実体の関係性は明らかにされていなかった。

八重山および沖縄島において、菌園の DNA 解析および子実体からの DNA 解析を行い、両者の対応を調査することで、日本におけるオオシロアリタケ属菌の分布状況を明らかにした。また、タイワンシロアリは台湾にも分布しており、台湾におけるオオシロアリタケ属菌の分布調査を行うことで、タイワンシロアリおよびオオシロアリタケの地理的分布パターンを推定した。

3. 研究の方法

(1) タイワンシロアリの菌園管理および子実体形成における社会行動の観察

タイワンシロアリのコロニーを、琉球大学熱帯生物圏研究センター西表研究施設の圃場内で調査し、フィールドでのビデオカメラ撮影にて、菌園内部の菌園の状況およびシロアリの行動を記録した。また、菌園を実験室に持ち帰り、飼育ケースにて飼育し、各カーストの菌園形成における社会行動を理解するために、ビデオカメラを用いた長期間観察を実施した。実験室での観察のポイントは以下の点である。

- ・ワーカー間(大小2型)での行動の違い(雑菌の抑制やオオシロアリタケ菌糸の管理など)。
- ・菌園の形成過程(シロアリが糞をしてから菌糸がはびこり、菌糸塊が形成され、シロアリによって回収されるまで)。
- ・子実体発生に関わるワーカーの行動、および子実体の形成過程。

(2) タイワンシロアリのトランスクリプトーム解析による菌園構築に関わる遺伝子の探索

タイワンシロアリの各種ワーカーから RNA を抽出し、イルミナ HiSeq を用いて RNA-seq を行った。特に大小2型のワーカー間の比較トランスクリプトーム解析から、菌園構築に関わると思

われるカテゴリーの遺伝子群に着目し、ゲノムが読まれた他のシロアリの遺伝子情報も用いて、それら遺伝子の分子進化学的解析を行った。

(3) オオシロアリタケ類の地理的分布調査

西表島および沖縄島のタイワンシロアリの生息地にて、地中から菌園を採集した。菌園が掘れない場合は、オオシロアリタケ子実体の発生時期に子実体を採取した。また、並行してタイワンシロアリの蟻道からシロアリの個体を採集した。菌園、子実体およびシロアリの腸内から、オオシロアリタケの DNA を抽出し、PCR によりリボゾーム DNA の内部転写スペーサー (ITS) 領域を増幅し、キャピラリーシークエンサーを用いて塩基配列を決定した。分子系統解析により、共生しているオオシロアリタケ属菌分布状況を調べた。

4. 研究成果

(1) 菌園管理および子実体形成における社会行動の観察

野外のタイワンシロアリのコロニーから採集した菌園を実験室内に持ち帰り、ビデオカメラを用いて菌園内を長期間撮影した (図 1)。撮影したビデオを用いて、菌園構築のための糞をする頻度、餌となる菌系塊の収穫頻度、菌園表面の菌糸の刈り取り頻度について、詳細に行動を記録した。その結果、大小 2 型のワーカー間に、いずれの行動も大ワーカーが頻繁に行っていることが明らかになった。菌園内における分業は大ワーカーが主に行っていることが示唆された。

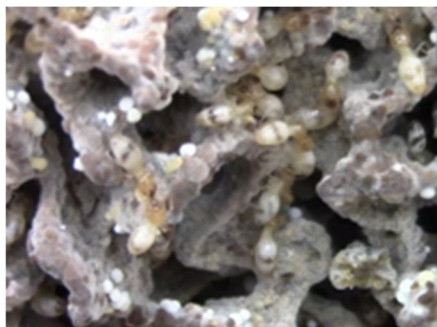


図 1: ビデオ撮影による菌園内部の観察

また、子実体発生時期にフィールドにて菌園内の直接観察を行った。その結果、子実体発生前の菌園からは一時的にワーカーがいなくなることが確かめられた。子実体発生に伴い、菌園の菌糸の状態が変化し、それによりシロアリの行動が変化すると考えた。

(2) 比較トランスクリプトーム解析による菌園構築に関わる遺伝子の探索

タイワンシロアリの各種カーストの個体を用いて RNA-seq を行った。クオリティの高い配列を用いて、*de novo* でアセンブリングし、発現している遺伝子 (コンティグ) 配列のカタログを作った。各カーストのリードをコンティグ配列にマッピングし、張り付いたリードをカウンティングすることで、カースト間の遺伝子の発現量を比較した。主に大小 2 型のワーカー間で発現が異なる遺伝子から、セルロース消化に関わる遺伝子を特定した。また、日本に生息する他の系統のシロアリを用いて RNA-seq を行い、注目する遺伝子のホモログ配列を特定した。

(3) オオシロアリタケ類の地理的分布調査

日本のオオシロアリタケの DNA を用いて、電気泳動のみで種判別ができる診断 PCR 法を開発した。その手法を用いて、西表島および沖縄島のタイワンシロアリの生息地におけるオオシロアリタケの種分類調査を行なった。その結果、西表島では 2 種のオオシロアリタケが各地域に同様の頻度で分布しているのに対して、沖縄島では、一部地域のみで 2 種が混在し、それ以外の地域では 1 種のみしか存在しないことが明らかになった。また、その結果から、それぞれのオオシロアリタケの生息地において子実体の発生調査を行なったところ、日本で知られていなかったオオシロアリタケ子実体の発見に至った (Hojo and Shigenobu 2019)。これまで日本には 3 種の名義種のオオシロアリタケ子実体が報告されていたが、DNA 解析からそれらは全て同種である可能性も示唆された。

台湾におけるフィールド調査では、日本と同種のタイワンシロアリが台湾全土に分布していることが確かめられ、それらは日本に生息する 2 種を含む 3 種のオオシロアリタケ属菌を栽培していることが、子実体およびシロアリの腸内の DNA 解析で明らかになった (図 2)。また、こ

これらの3種が台湾全土で地理的に棲み分けて生息していることも明らかになった。



学名：*Termitomyces* sp. Type A
和名：イケハラオオシロアリタケ
撮影地：西表島

学名：*Termitomyces intermedius*
=*Termitomyces* sp. Type B
和名：シロアリシメジ
撮影地：西表島

学名：*Termitomyces robustus*
中国名：粗柄蟻巢傘
撮影地：台湾島（台南）

図2:タイワンシロアリが栽培するオオシロアリタケの子実体

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3件)

Masaru Hojo, Shuji Shigenobu, Kiyoto Maekawa, Toru Miura, Gaku Tokuda (2019) Duplication and soldier-specific expression of geranylgeranyl diphosphate synthase genes in a nasute termite *Nasutitermes takasagoensis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 査読有. 印刷中.

Masaru Hojo, Shuji Shigenobu (2019) A new finding of small fruiting bodies lacking pseudorhiza of *Termitomyces* (Basidiomycota, Agaricales, Lyophyllaceae) associated with Japanese fungus-growing termite *Odontotermes formosanus* (Arthropoda, Blattodea, Termitidae). *The Biological Magazine Okinawa* 査読有. 57: 51-64.

北條優 (2017) シロアリの兵隊カーस्टで進化した化学的防衛. *昆虫と自然* 52. 査読無. 5-8.

〔学会発表〕(計 4件)

北條優、重信秀治、前川清人、三浦徹、徳田岳. ゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素遺伝子がシロアリ兵隊の防衛戦術を進化させた. 日本昆虫学会第78回大会(名城大学). 2018年9月9日.

北條優、保坂健太郎、重信秀治. 日本のキノコシロアリが育てるもう1種のオオシロアリタケ属きのこ. 日本菌学会第62回大会(信州大学). 2018年5月27日.

北條優、重信秀治、前川清人、三浦徹、徳田岳. シロアリの特殊な防衛物質「ジテルペン」の合成経路の進化. 日本進化学会第18回大会ワークショップ. 2016年8月25日.

北條優、重信秀治. 日本のキノコシロアリ働きアリの菌床管理における分業. 日本昆虫学会第75回大会(九州大学). 2015年9月21日.

〔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:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：重信秀治
ローマ字氏名：SHIGENOBU, Shuji
所属研究機関名：基礎生物学研究所
部局名：新規モデル生物開発センター
職名：教授
研究者番号（8桁）：30399555

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。