

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：17201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14777

研究課題名(和文) 昆虫のストレス耐性を決める遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of genes serving as major mediators required for stress tolerance

研究代表者

早川 洋一 (Hayakawa, Yoichi)

佐賀大学・農学部・教授

研究者番号：50164926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：アワヨトウを用い遺伝的選抜によって群生相様黒色系統を作出した。この選抜黒色系統と非選抜系統の幼虫の生理的諸特性を比較した。選抜系統は非選抜系統に比べ熱ストレス感受性が高いことが分かった。その要因を明らかにすべく、両系統幼虫の体液中活性酸素種濃度を測定した。選抜系統は非選抜系統よりもストレスの有無に拘らず高い値を示した。さらに、抗酸化酵素(catalaseやSOD)活性を測定した結果、両酵素活性とも非選抜系統で高い事が分かった。また、酵素活性の差がその遺伝子発現レベルの差に因る事も確認した。両系統の交配実験によりストレス耐性は母性遺伝する事、さらに、抗酸化酵素遺伝子発現の重要性が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The armyworm *Mythimna separata* has two larval phenotypes depending on rearing densities, a black-colored gregarious type and pale solitary type. We developed a black-colored (BL) strain by repeating genetic selection in our laboratory. BL strain larvae was found to be more sensitive to heat stress compared to non-selected control (CTL) strain. Hemolymph reactive oxygen species (ROS) levels were higher in BL strain than in CTL strain before and after heat stress. Activities of antioxidant enzymes, catalase and superoxide dismutase (SOD), increased in the fat body of CTL strain larvae after heat treatment but not in BL strain. The differences in these antioxidant enzyme activities were due to differences in expression levels of these enzyme genes. The stress resistance similar to CTL strain larvae was confirmed in the offspring between CTL females and BL males. Expression levels of antioxidant enzyme genes of the former offspring were found to be similar to those of CTL strain.

研究分野：昆虫生理・生化学

キーワード：アワヨトウ 相変異 黒色系統 活性酸素 抗酸化酵素

## 1. 研究開始当初の背景

動物、特に昆虫では、生息環境の変化に伴って同一種の個体間でも形態・色彩・行動などの著しい差異が出現することが知られている。こうした現象は相変異と呼ばれる。例えば、普段は飛ばない孤独相のワタリバツが大発生すると体色や体型を大きく変えて群生相となり群れし大移動する現象は良く知られた代表例である。すなわち、これは個体密度の増加に伴う相変異と言える。形態や行動は大きく変化する相変異であるが、果たして生理的特性にどの程度の影響を及ぼしているかについては必ずしも十分に研究がなされていないのが現状である。そこで、本研究では、バツに類似した個体密度依存的な相変異が知られているアワヨトウに着目し、遺伝的な選抜によって高密度個体群様系統を作出した。この遺伝的選抜系統と非選抜系統の各個体を用いて生理的諸特性を比較することによって、相変異が昆虫個体の生理レベルへ及ぼす影響とその背景について分子レベルでの一連の解析を遂行した。

## 2. 研究の目的

アワヨトウ幼虫では、幼虫期の飼育密度条件による相変異が知られ、それは体色変化に現れる。低密度下に飼育された個体表皮は白っぽく、対して、高密度飼育した場合には黒色傾向が強くなる。我々は、通常の(中程度密度での)継代飼育中に現れる黒っぽい幼虫個体の選抜を200世代以上に渡って繰り返し黒色系統を確立した(図1)。



得られた黒色系統幼虫は飼育密度に因らず黒色外皮を維持する。こうして得られた選抜系統と非選抜系統に熱ストレスを与えたところ、意外にも、黒色選抜系統幼虫は高感受性を示すことが分かった。そこで、本研究では、まず、両系統の生理的諸特性を調べ、さらに、上記のストレス感受性の差異を産む主要因を明らかにすることを目的とした。また、予備的な遺伝的解析によって、この選抜によるストレス高感受性が母性遺伝することを確認した。したがって、親世代とF1世代における生化学的な比較分析を行うことによって、ストレス感受性とミトコンドリア

との関連性についても考察を加えたい。

## 3. 研究の方法

先行研究によって得られた選抜黒色系統の幼虫発育速度、成虫寿命、産卵数などの諸性質を計測し、両系統の基礎的な生理特性を把握した。

次に、以下のように、熱ストレス感受性について調べた。

1) 与える熱ストレスの温度と時間を変化させることによって、様々な熱ストレス条件下での両系統幼虫の生存率を測定した。こうした緻密なストレス実験によって、両系統の熱ストレスへの感受性の差異を明確にした。

2) 両系統幼虫の体液中の活性酸素種(reactive oxygen species (ROS))と抗酸化活性を測定した。前者は、基質としてdichlorofluoresceinを用い、ROSによって生産されるdichlorofluoresceinの蛍光をEx/Em = 485nm/530 nmで測定した。後者は、2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)を基質に用いるABTS法によって測定した。

3) 両系統幼虫の抗酸化酵素, catalase と superoxide dismutase (SOD), 活性を種々の時間の熱ストレスを与えた幼虫の脂肪体で測定した。前者はMcCord and Fridovichの方法<sup>1</sup>、後者はJohansson & Borgの方法<sup>2</sup>に沿って測定した。

<sup>1</sup> McCord, J. M. and Fridovich, I. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055

<sup>2</sup> Johansson, L.H. and Borg, L.A.H. *Anal. Biochem.* 174, 331-336 (1988).

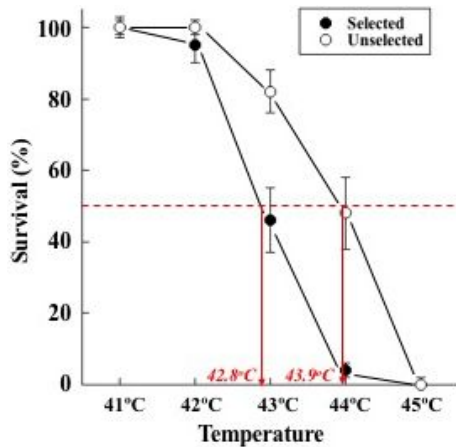
4) 両系統のcatalase, SOD1, SOD2遺伝子の発現レベルを種々の時間の熱ストレスを与えた幼虫脂肪体でリアルタイムPCRによって定量測定を行った。測定は、Light-Cycler 1.3 instrument (Roche Applied Science)により、以下のPCRプライマーを用いた: *catalase*, AAAGGAGCTGGAGCTTT & TGGTGGTGGTGGTGGT; *SOD1*, TGGCTGCATGTCGTC & AGATCATCGGCATCGG; *SOD2*, ATCTTCTGGCAGAACC & CGTTCTTGTACTGCAG; *rp49*, TGACAACTCAAGCGTAACTGGCG & TTGCGGAAACCATTGGGCAG.

5) 非選抜系統と選抜黒色系統のオス・メスをそれぞれ組み合わせて交配し、F1世代を得た。この世代の幼虫に熱ストレスを与えて、そのストレス耐性を観察すると共に、ストレス付与後の幼虫脂肪体における、catalase, SOD1, SOD2遺伝子発現レベルをリアルタイムPCRによって定量した。これらの結果と、親世代の遺伝子発現レベルを比較することによって考察を加えた。

## 4. 研究成果

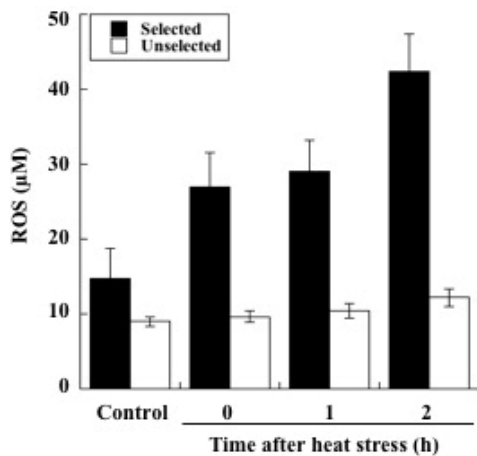
1) アワヨトウ非選抜及び選抜黒色系統幼虫の熱ストレス耐性

非選抜系統と選抜黒色系統の終齢1日目幼虫に41℃から45℃の各種温度の熱ストレスを1時間与え、24時間後の生存率を測定した結果が下図となる。50%致死となる温度は、非選抜と選抜系統がそれぞれ42.8℃と43.9℃となり、約1℃の違いがあることが明らかになった。



2) 非選抜及び選抜黒色系統幼虫の体液中のROS濃度と抗酸化活性の測定

アワヨトウ両系統幼虫の体液中 ROS 濃度を測定した結果、熱ストレスを負荷しない幼虫においても選抜系統は非選抜系統の約1.5倍高い濃度であり、43℃/1hの熱ストレス供与後2時間ではその差が約3.5倍に広がっていることが明らかになった(下図)。

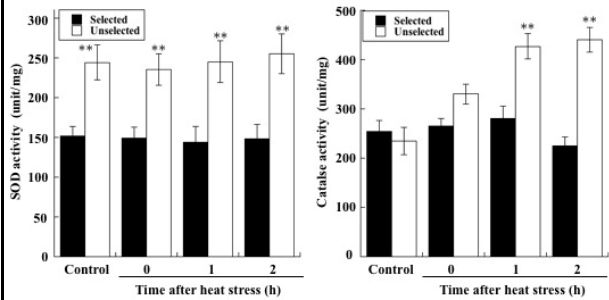


アワヨトウ幼虫選抜・非選抜系統幼虫の体液中抗酸化活性についても測定を行った。その結果、熱ストレス非負荷条件下では両系統に明瞭な差は見られないものの、熱ストレス後1~2時間にかけて非選抜系統では抗酸化活性が有意に上昇することが分かった。一方、選抜系統ではそうした活性上昇は見られず、むしろ、やや減少傾向を示すことが明らかになった。

3) 非選抜及び選抜黒色系統幼虫の脂肪体の

抗酸化酵素活性の測定

熱ストレス非負荷及びストレス負荷後の両系統幼虫脂肪体の SOD 活性と catalase 活性を測定した。その結果、熱ストレス非負荷時の脂肪体 SOD 活性は非選抜系統が有意に高く、さらに、ストレス後、徐々に上昇することが分かった(下左図)。一方、catalase 活性は、非ストレス条件下で選抜、非選抜両系統に有意差は見られなかったものの、熱ストレス後、非選抜系統では顕著な上昇が観察されたが、選抜系統ではそうした活性上昇はなかった(下右図)。

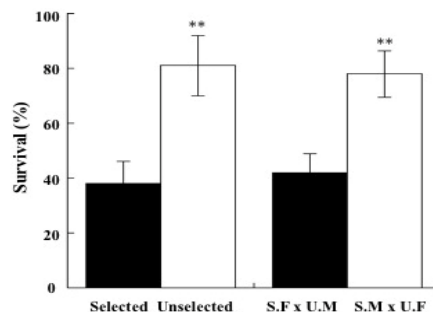


4) 非選抜及び選抜黒色系統幼虫の脂肪体の抗酸化酵素遺伝子の発現の測定

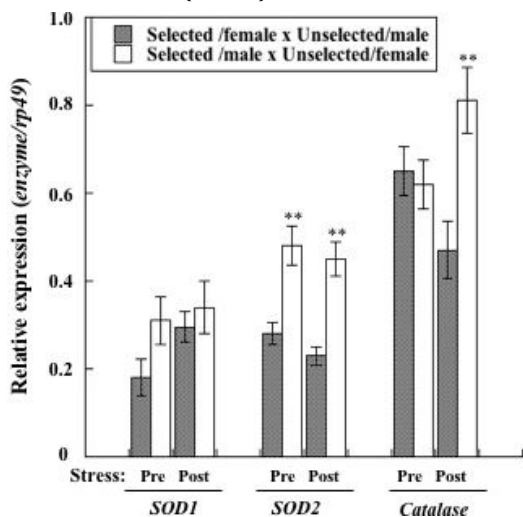
熱ストレス非負荷及びストレス負荷後の両系統幼虫脂肪体における SOD1, SOD2 と catalase 遺伝子発現レベルを測定した。SOD 1 遺伝子発現は、非ストレス条件、ストレス後とも非選抜系統で有意に高く、さらに、ストレス後の上昇も検出された。選抜系統では、ストレス後の上昇も見られなかった。SOD2 遺伝子発現も非ストレス条件、ストレス後、共に非選抜系統が約3倍高い発現レベルを維持したが、ストレス後の発現上昇は両系統においても見られなかった。Catalase 遺伝子発現については、熱ストレス非負荷条件下では、選抜、非選抜両系統で有意な差は見られなかったが、ストレス後の発現レベルは、非選抜系統で上昇が見られたが、選抜系統では検出されなかった。

5) 非選抜系統と選抜黒色系統の交配実験

非選抜系統、選抜系統の雌雄をそれぞれ交配して得られた F1 世代の熱ストレス耐性を測定した結果、非選抜雌 x 選抜雄の F1 は非選抜雄 x 選抜雌の F1 よりも有意に高い耐性を示すことが明らかになった(下図)。



F1 世代における幼虫脂肪体での抗酸化酵素 SOD1, SOD2, catalase 遺伝子の発現レベルを非ストレス条件と熱ストレス後 2 時間で測定した結果、非選抜雌 x 選抜雄の遺伝子発現レベルは非選抜系統の親世代の遺伝子発現レベルに近く、中でも SOD2 の発現レベルの傾向が最も似たものであることが明らかになった。一方、非選抜雄 x 選抜雌の遺伝子発現レベルは、選抜系統の親世代に近い傾向が見られた（下図）。



以上の結果、ストレス耐性が母性遺伝すること、また、母性遺伝によって高いストレス耐性を有する F1 世代の SOD2 遺伝子発現レベルが親世代のそれに近いことが明らかになった。SOD2 はミトコンドリア局在性で知られている抗酸化酵素であることは、ストレス耐性が一種の遺伝形質としてミトコンドリアを介して子孫に伝播する可能性を示唆した結果と解釈できる。

#### 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）

〔雑誌論文〕(計 6 件)

- 1, Stephen B. Shears, Yoichi Hayakawa, 2018, The *Drosophila* cytokine, GBP: A model that illuminates the yin-yang of inflammation and longevity in humans? Cytokine, *in press*
- 2, Matsumura, T., Nakano, F., Matsumoto, H., Uryu, O., Hayakawa, Y., 2018, Identification of a cytokine combination that protects insects from stress. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 97, 19-30.
- 3, Ryuda, M., Tabuchim M., Matsumoto, M., Matsumura, T., Ochiai, M., Hayakawa, Y., 2017, A gene-driven recovery mechanism: *Drosophila* larvae increase feeding activity for post-stress weight recover. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 96:e21440.
- 4, Sung, E.G., Ryuda, M., Matsumoto, M., Uryu, O., Ochiai, M., Cook, M.E., Young Yi, Wang, H., Putney, J.W., Bird, G.S., Shears, S.B., Hayakawa, Y., 2017. Cytokine signaling through *Drosophila* Mthl10 ties

lifespan to environmental stress. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 107, 13786-13791.

5. Matsumura, T., Matsumoto, H., Hayakawa, Y., 2017, Heat stress hardening of oriental armyworms is induced by a transient elevation of reactive oxygen species during sublethal stress. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 96:e21421.
6. Furihata, S., Matsumura, T., Hirata, M., Mizutani, T., Nagata, N., Kataoka, M., Katayama, Y., Omatsu, T., Matsumoto, H., Hayakawa, Y., 2016, Characterization of venom and oviduct components of parasitoid wasp *Asobara Japonica*. *Plos One*, 11(7), e0160210.

〔学会発表〕(計 6 件)

- 1, 小野雅弥, 早川洋一, 吉賀豊司, 非寄生性線虫 *Caenorhabditis elegans* による昆虫血球の捕食, 応用動物昆虫学会, 2018. 3
- 2, 松村崇志, 早川洋一, 昆虫サイトカイン Stress responsive peptide (SRP) の発現機構と生理機能, 応用動物昆虫学会, 2018. 3
- 3, 小野雅弥, 早川洋一, 吉賀豊司, *Caenorhabditis elegans* の体表脂質による昆虫血球の活性化抑制, 日本線虫学会, 2017, 9
- 4, Yoichi Hayakawa, Functional roles of insect cytokine growth-blocking peptide (GBP), International Insect Hormone Workshop, 2017. 7
- 5, 松村崇志, 早川洋一, アワヨトウにおけるストレス順応性獲得分子機構, 応用動物昆虫学会, 2017. 3
- 6, 小野雅弥, 早川洋一, 吉賀豊司, 線虫の体表物質による昆虫血球の活性化抑制, 日本線虫学会, 2016, 12

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別： 国内  
取得状況 (計 0 件)

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

〔その他〕

ホームページ等

<http://extwww.cc.saga-u.ac.jp/~hayakayo/FRAME/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

早川 洋一 (HAYAKAWA, Yoichi)  
佐賀大学・農学部・教授  
研究者番号：50164926

### (2) 研究協力者

松本 均 (MATSUMOTO, Hitoshi)  
佐賀大学・農学部・非常勤研究員

瓜生 央太 (URYU, Outa)  
佐賀大学・農学部・非常勤研究員