

平成30年6月5日現在

機関番号：12201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18626

研究課題名(和文)真社会性膜翅目昆虫におけるカースト決定機構の遺伝子基盤の解明

研究課題名(英文)Genetic basis of caste determination in eusocial Hymenoptera

研究代表者

宮川 美里(岡本)(Misato, Miyakawa)

宇都宮大学・バイオサイエンス教育研究センター・学振特別研究員

研究者番号：00648082

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000円

研究成果の概要(和文)：真社会性の進化を理解する上で、繁殖または労働カーストの決定機構の解明は重要である。しかしカーストは発生初期に識別できないか決定していないことが多く、責任因子の特定は難しい。申請者はカーストが遺伝的に決定しているアリ種を利用し、カーストごとに各発生ステージにおけるトランスクリプトームデータを得る手法と発生組織学的な違いを観察する手法を確立した。さらに現在は体内の幼若ホルモン(JH)量の測定手法の確立をはじめている。遺伝子発現、発生組織学的知見、JHの測定結果から、既にカーストが決定した個体を利用した遺伝子発現解析だけでは分からなかったカースト分化機構の総合的理解が進みつつある。

研究成果の概要(英文)：Understanding the caste determination mechanisms is critical topics in sociobiology. Using high-throughput sequencing technologies, differential gene expression patterns between castes (queens and workers) have been well studied. However, it is difficult to detect responsible genes because caste destinies of individuals used for these analyses are already decided. For comprehensive understanding of caste determination mechanisms, we have developed protocols for comparative gene expression analysis, histological study and measuring juvenile hormone titer at each castes and developmental stages using ants with genetic caste determination system.

研究分野：社会生物学

キーワード：社会性昆虫 カースト決定機構

1. 研究開始当初の背景

アリやハチを含む真社会性膜翅目昆虫の特徴の1つに、不妊カースト(ワーカー)の存在がある。通常、有性生殖で生産された雌はワーカー又は女王に発生する(図1A)。雌カーストの運命は幼虫期の環境シグナル(栄養量・温度など)が体内の幼若ホルモンを介在し伝達されることで決定づけられ、ホルモン量が一定値より高ければ女王に、低ければワーカーになる[1]。しかし今日まで、カースト決定に関わる遺伝子基盤の解明には至っていない。その主な理由として、1)カースト決定機構とカースト維持機構が混同して扱われていること、および2)女王かワーカーのどちらに発生するかを幼虫初期に予想できないことがあげられる。近年、次世代シーケンセスを用いたゲノム解析が真社会性膜翅目昆虫の研究にも取り入れられるようになり、カースト決定に関わる遺伝子基盤の解明が進められている。しかし、これらの研究は主に成虫を用いた女王とワーカー間の発現解析やメチローム解析であり、既にカースト分化が終了した個体に注目している[2][3]。したがって、カースト決定時に重要な因子ではなく、カースト維持に関連する因子を見ている。このように既にカーストが決定している個体に注目せざるを得ないのは、幼虫初期の形態からカースト運命が識別できない膜翅目昆虫特有の問題に起因する。上記の問題を克服するため、申請者はカーストが遺伝的に決定しているココミアリやウメマツアリに注目し(図1B)、カースト分化の遺伝子基盤の解明を目指した。

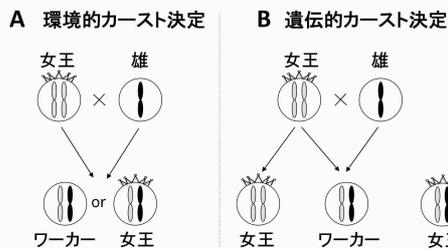


図1 雌カーストが(A)後天的に、(B)遺伝的に決定する機構。(B)幼若ホルモン類似体(JHA)の投与で、遺伝的にはワーカーに発生する個体を女王に誘導することが可能。

2. 研究の目的

本研究では当初、カーストが遺伝的に決定している種の利点を活かし、幼若ホルモン類似体(JHA)を用いて人為的にカーストを誘導し、発生運命を決定づけた幼虫を用いてカースト決定遺伝子の解明を目指した。

申請者はココミアリを用いた先行研究として、有性生殖で生産されワーカーへの発生が運命付けられている幼虫と、それらにJHAを塗布して女王に誘導された個体において、発生ステージごとに発現解析を行った。しかしJHAを塗布された個体を全て女王に誘導するために高濃度のJHAを用いたため、発

現解析の結果はカーストの違いよりもJHAの影響が非常に大きく、殺虫剤などの外部からの化合物に対する解毒に関与する遺伝子の変動が目立った[4]。

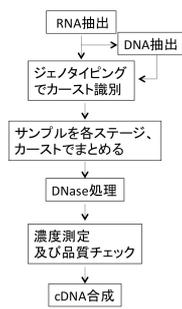
そこで、JHAを用いなくてカースト決定に関与する責任遺伝子を探索するため、本研究では個体のカーストを遺伝子マーカーを用いて識別し、各発生ステージにおいてカースト間のトランスクリプトームを比較することで、カースト決定に関与する責任遺伝子の探索を行う方法に変更した。本研究はサンプルの維持や管理がより容易なウメマツアリを用いて行った。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子発現解析のためのサンプル調整

本研究では卵から蛹まで各発生ステージにおいて、1個体からRNAとDNAを同時に抽出した。RNAはトランスクリプトーム解析用、DNAはカースト識別のためのジェノタイピング用である。抽出ではISOGEN II及び

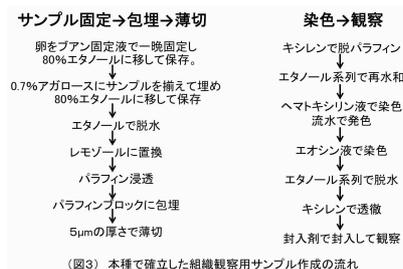
図2 サンプル作成の流れ



(nippongene)を利用した液相分離による方法を用いており、RNA抽出過程に生じる沈殿からDNAを抽出した。外見ではカーストが判別できない発生初期のステージでも、マイクロサテライトマーカーによるカーストの特定を試みた。一方で、卵や1~2齢幼虫のようにサイズの小さい発生ステージでは、1個体から抽出したRNAサンプルは測定ができないほど濃度が低かった。よって、ジェノタイピングによってカーストを識別し、各ステージ・カーストでサンプルをまとめた後に、DNase処理や精製過程でサンプルを濃縮した(図2)。

(2) 発生状態の確認

真社会性昆虫では外見からカーストを判断することはできない発生ステージでも、不妊カーストと繁殖カーストへの分化を判断する上で重要な発生組織の違いは生じている。そこで、発生ステージごとに薄切切片を作成し、ヘマトキシリン・エオシン染色で組織を観察する手法を確立した(図3)。



(3) カースト決定への関与が示唆されている遺伝子における発現解析

近年、キイロハダカアリにおけるカースト間での遺伝子発現を比較した研究によると、発生後期において *doublesex* (*dsx*) の発現が女王とワーカー間で異なることが示された [5]。 *dsx* は多くの昆虫で性分化制御因子としての機能が保存されており、雌雄間で異なるスプライシングアイソフォームが合成される。本研究では、ウメマツアリにおける *dsx* のアイソフォームや発現量をカースト間で比較するため、女王とワーカーからそれぞれ RNA を抽出し、RACE 法を用いて *dsx* の mRNA の全長を取得した。発現量はリアルタイム PCR で比較した。

同様に *dsx* の上流にあると予想される *fem* (*feminizer*) の全長も取得し、カースト間で発現量を比較した。

4. 研究成果

現在までにウメマツアリの各発生ステージにおいてカースト間でトランスクリプトームを比較する上で必要なライブラリ作成が可能になった。サイズの小さい発生初期の個体でも、1 個体から抽出した DNA を用いたマイクロサテライト解析によってカーストの識別が可能であった (図 4)。

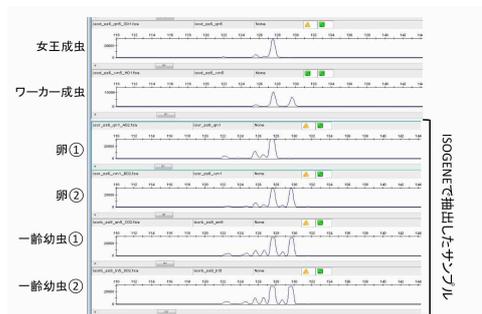


図4 カースト識別用のマイクロサテライト解析の結果
女王は母親のゲノムを受け継ぐため本領域ではホモ型になり、ワーカーは両親のゲノムを受け継ぐため、ヘテロ型になる。抽出したサンプルのうち卵①は女王、それ以外はワーカーと予想できる。

なお、申請者は 2017 年 3 月から 9 月末まで研究を中断していたため、次世代シーケンスを用いた遺伝子発現解析は今年度以降に行う。

また、外見ではカーストを識別できない発生初期のステージにおける組織を観察する手法を確立したことにより (図 5)、トランスクリプトーム解析の結果に加えて、卵巣発

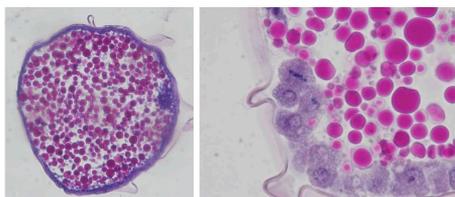


図5 発生初期の卵で薄切切片を作成し、ヘマトキシリン・エオシン染色したもの。分裂装置の観察が可能ほど発生状態を詳細に知ることが可能になった。

達の有無や各器官のサイズの違いなど、組織学的な知見を得るための基盤も構築した。

さらに本研究ではトランスクリプトーム解析によるカースト間の遺伝子発現の比較に加えて、他種においてカースト間での発現の違いが報告されていた遺伝子 *dsx* や *fem* の発現にも注目した。しかし、どちらの遺伝子も性特異的なスプライシングバリエーションは得られたものの、カースト間での違いは見られなかったことから、*dsx* や *fem* がカースト決定に関与していないことが示唆された。

上記の研究に加え、現在では LC-MS を用いて体内の幼若ホルモン (JH) 量の測定手法の確立をはじめ、カーストやステージごとに JH 量の測定を目指している。本種の場合、カーストは遺伝的に決定しているが、本来はワーカーに発生する個体に幼若ホルモン類似体 (メトプレン) を塗布することで女王に発生する。したがって、本種のカースト決定においても他のアリ種の知見と同様に幼若ホルモンが重要な働きを持つことが示されている。

以上より、今後は遺伝子発現、発生組織学的知見、JH の測定結果から、カースト分化機構の総合的な理解が期待できる。

<引用文献>

- [1] E. Abouheif and G. A. Wray, "Evolution of the gene network underlying wing polyphenism in ants," *Science* (80-), vol. 297, no. 5579, pp. 249-252, 2002.
- [2] A. Chittka, Y. Wurm, and L. Chittka, "Epigenetics: The making of ant castes," *Curr. Biol.*, vol. 22, no. 19, 2012.
- [3] B. a Harpur, C. F. Kent, D. Molodtsova, J. M. D. Lebon, A. S. Alqarni, A. a Oways, and A. Zayed, "Population genomics of the honey bee reveals strong signatures of positive selection on worker traits.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, no. 7, pp. 2614-9, 2014.
- [4] N. Liu, M. Li, Y. Gong, F. Liu, and T. Li, "Cytochrome P450s - Their expression, regulation, and role in insecticide resistance," *Pestic. Biochem. Physiol.*, vol. 120, pp. 77-81, 2015.
- [5] A. Klein, E. Schultner, H. Lowak, L. Schrader, J. Heinze, L. Holman, and J. Oettler, "Evolution of Social Insect Polyphenism Facilitated by the Sex Differentiation Cascade,"

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 1 件)

① Misato Miyakawa, Koji Tsuchia, Hitoshi Miyakawa, The doublesex gene integrates multi-locus complementary sex determination signals in the Japanese ant, *Vollenhovia emery*, Insect Biochemistry and Molecular Biology (査読有), 94 (2018), p42-49.

<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2018.01.006>

[学会発表] (計 3 件)

① 宮川 (岡本) 美里、土田浩治、宮川一志 (口頭) 膜翅目昆虫における複数化した性分化初期シグナルを統合する機構。日本生態学会第 65 回大会、札幌。2018 年 3 月 14 日-3 月 18 日。

② 宮川 (岡本) 美里 (口頭) *doublesex* はウメマツアリにおける複数化した性決定初期シグナルを統合するか? 第 7 回オプトバイオシンポジウム、宇都宮。2017 年 12 月 13 日。

③ 宮川 (岡本) 美里、土田浩治、○宮川一志 (ポスター) ウメマツアリにおける近親交配のコストを抑制する性決定初期遺伝子の複数化とその分子遺伝学的機構。日本進化学会第 19 回大会、京都。2017 年 8 月 24 日-8 月 26 日。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮川 美里 (MIYAKAWA, Misato)

宇都宮大学・バイオサイエンス教育研究センター・日本学術振興会特別研究員 (PD)

研究者番号: 00648082

(2) 研究協力者

① 宮川 一志 (MIYAKAWA, Hitoshi)

宇都宮大学・バイオサイエンス教育研究センター・准教授

研究者番号: 30631436

② 鈴木 智大 (SUZUKI, Tomohiro)

宇都宮大学・バイオサイエンス教育研究センター・准教授

研究者番号: 30631436