

平成21年6月22日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18770222

研究課題名（和文） 社会性アブラムシの兵隊階級にみられるゴール修復の分子基盤の解明

研究課題名（英文） Molecular analysis of gall repair by soldier nymphs in a social aphid.

研究代表者 沓掛 磨也子

独立行政法人産業技術総合研究所・生物機能工学研究部門・研究員

研究者番号：90415703

## 研究成果の概要：

社会性昆虫であるモンゼンイスアブラムシの兵隊幼虫は、ゴール（巣）が捕食者に襲われた時に生じる穴を自分の体から放出した液体によって埋め固めて修復するという、自己犠牲的なゴール修復行動を示す。本研究では、このゴール修復現象について、兵隊分泌液が凝固する分子基盤を解明するとともに、兵隊による修復が行われた後に起こるゴール側の現象について調査を行い、昆虫-ゴール間の相互作用について明らかにした。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,700,000	0	1,700,000
2007年度	1,000,000	0	1,000,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	300,000	4,000,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：社会性昆虫、兵隊階級、モンゼンイスアブラムシ、ゴール修復、体液凝固、メラニン合成、植物組織再生、創傷治癒

## 1. 研究開始当初の背景

前社会性種であるモンゼンイスアブラムシは、宿主植物であるイスノキに完全閉鎖型のゴール（巣）を形成するが、春期の成長途中のゴール組織は薄く柔らかいため、鱗翅目幼虫などの捕食者の侵入を受けやすい。本種の兵隊（単型の1齢幼虫）は、このような侵入に対して、ゴール壁に穴があくとすばやく集合して、尾部にある角状管から多量の分泌液を放出し、脚で混ぜ合わせる行動を示す。するとその分泌液は次第に固化して、穴は完全に塞がれてしまう（図 a）。さらに、しばらく

くの後、ゴール内側においては、兵隊分泌液による修復後の穴の周辺ゴール組織が伸長し、傷を上から覆い隠す。このような一連の修復の結果、ゴールは有翅虫が分散する秋まで存続可能となる。ゴール修復過程には、分泌液凝固や植物組織の再生といった現象がみられることから、本種の兵隊分泌液中には凝固活性因子や植物細胞活性化因子の存在が強く示唆される。しかしながら、このようなゴール修復・再生に関わる因子（または生化学反応）についての研究はまったく行われていなかった。



図 a  
モンゼンイスアブラムシのゴール。中央付近に兵隊(白い点)が分泌液で修復した跡が見える。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、モンゼンイスアブラムシの兵隊幼虫が示すゴール修復行動に着目し、社会性昆虫に見られる利他的行動の分子基盤を包括的に解明することを目的とする。具体的には、以下の目的に掲げて研究を遂行する。

### (1) 分泌液凝固に関わる分子基盤の解析

ゴールに開けられた穴を修復するために兵隊が分泌する体液は、脚でかき混ぜられると次第に凝固する。なぜ分泌液は固まるのか？凝固の過程ではどのような生化学的反応が起きているのか？このような疑問を解明するため、分泌液を構成するタンパク質成分の同定および機能解析を行う。

### (2) ゴール組織再生に関わる生理活性物質の探索

兵隊による迅速な穴の修復の後、ゴールの内側では、傷周辺のゴール組織が増殖・再生し、傷を完全に覆い隠す。これにより、ゴール内壁は傷が生じる前と同じ状態に復元する。植物組織が再生する背景には、兵隊分泌液中に何らかの生理活性物質が存在し、植物の細胞増殖や組織再生を促している可能性が考えられる。そこで、そのような兵隊分泌液中の生理活性物質を同定することを目的に、野外操作実験や分泌液中の成分分析、特に脂質に着目した研究を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 分泌液凝固に関わる分子基盤の解析

ゴール修復時に分泌される体液は、兵隊の腹部を細い針で刺激することによって分泌されるので、これを水でメスアップして回収した。回収した兵隊分泌液を、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により解析し、クーマジー染色によりタンパク質のバンドを検出した。特に濃く染まったバンドについては、存在量の多い主要タンパク質成分と判断し、その後の解析対象とした。実験方法としては、エドマン分解法による N 末端アミノ酸配列

解析、PCR 法による遺伝子クローニングといった分子生物学的手法による遺伝子同定のほか、酵素活性測定、免疫組織化学による組織局在解析、リアルタイム PCR による遺伝子発現解析などを行った。

### (2) ゴール組織再生に関わる生理活性物質の探索

兵隊分泌液による修復後に起こるゴール組織の再生は、アブラムシとの何らかの相互作用により起こると考えられる。そこで、兵隊分泌液中に存在する何らかの生理活性物質が植物細胞の増殖・組織再生が誘導するという可能性を検討するため、野外ゴールを用いた操作実験を行った。方法としては、イスノキに形成されたゴールに 2 ミリ四方の小さな穴をカッターナイフであけ、これを兵隊に修復させた。一方、別のゴールには、穴をあけた後、兵隊が修復を始める前に木工用ボンドで塞いだ。これらのゴールを 1 ヶ月後に採集し、ゴール内部において組織再生が起きているかどうかを調べた。

また、ゴール組織の再生過程について詳細に把握するため、切片観察による組織学的解析を行った。切片は、再生途中のゴール組織を固定後、樹脂に包埋し、ミクロトームを用いて切片を作成し、トルイジンブルーで染色して観察した。

## 4. 研究成果

### (1) 分泌液凝固に関わる分子基盤の解析

ゴールの穴を修復するために兵隊が角状管から出す分泌液について、構成するタンパク質成分を解析したところ、存在量が顕著に多い 6 つの主要成分が存在することが明らかになった (図 1)。

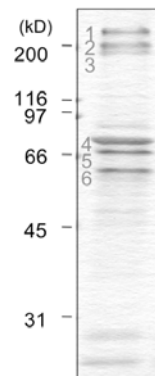


図 1  
兵隊分泌液中に存在する 6 つの主要タンパク質成分  
兵隊分泌液を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により解析した

これらの主要タンパク質成分について様々な解析を行ったところ、以下のことが明らかになった。

#### ① 分泌液凝固に関わる酵素

6 つのタンパク質成分のうち、最も存在量

の多いタンパク質は、フェノール酸化酵素であった。兵隊分泌液中のフェノール酸化酵素活性を測定したところ、実際にこの酵素の活性が存在することがわかった。ゴール修復する兵隊とゴール修復しない個体の体内フェノール酸化酵素の活性を比較したところ、ゴール修復兵隊の方が約 20 倍高い活性を示した (図 2)。これらの結果から、メラニン合成がゴール修復に重要な役割を果たしていることが示唆された。兵隊分泌液は分泌直後には乳白色だが、凝固するとともに黒化していく。このような色の変化は、ゴール修復過程において実際にメラニンが蓄積していくことによると考えられる。

フェノール酸化酵素は、多くの生物に存在する酵素であり、黒色素であるメラニンの合成経路における鍵酵素である。昆虫類においては、フェノール酸化酵素およびメラニン合成経路は、細菌などの異物に対する生体防御、体液凝固、かさぶた形成、昆虫クチクラ硬化、紋様形成など重要な生体機能・現象に関与していることが報告されている。

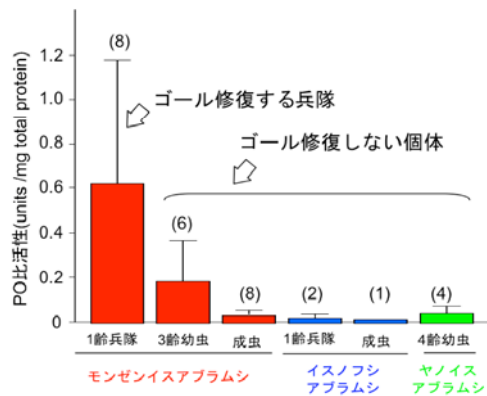


図2 ゴール修復する兵隊とゴール修復しない個体におけるフェノール酸化酵素活性の比較

②兵隊分泌液中のその他のタンパク質成分 フェノール酸化酵素以外の5つの主要タンパク質成分について解析を行ったところ、2つの成分については、内部に8個のアミノ酸を一つの単位とする繰り返し配列を持つ新規タンパク質であることがわかった。2つは基本的に同一タンパク質であったが、繰り返し領域内の一部配列に違いが見られた。その他、このタンパク質のN末端にはシグナル配列が存在し、全体的なアミノ酸組成に偏りが見られた (グリシン、セリン、ヒスチジン、グルタミンの4つのアミノ酸で全体の約60%以上を構成)。データベース上に登録されている既知配列に相同性を示すものは存在しなかった。

興味深いことに、このタンパク質はゴール間で分子量に多型を示した (図 3)。複数の

ゴールを用いた解析から、このゴール間分子量多型は、内部繰り返し配列の数の違いによって生じることがわかった。おそらく、このような分子量多型は、ゴール創設母 (幹母) の遺伝的背景の違いにより生じたのではないかと考えられる。

これらのタンパク質成分が分泌液凝固反応に果たす役割に関しては、まだ不明な点が多いが、考えられる仮説としては、メラニン合成過程における中間産物として生じる反応性の非常に高いキノン類の働きにより、タンパク質の架橋反応が起こり、その結果、不溶で強固なタンパク質層が形成されているという可能性が考えられる。

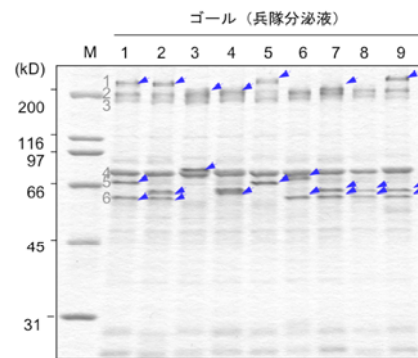


図3 兵隊分泌液内のタンパク質成分に見られるゴール間分子量多型 (青矢印のタンパク質)

### ③まとめ

フェノール酸化酵素は、昆虫を含む節足動物においてよく研究されており、異物から自分の体を守る生体防御機構 (フェノール酸化酵素前駆体カスケード) に重要な役割を果たすことが知られている。またこの酵素は、体表が物理的損傷を受けた時に起こる体液凝固やかさぶた形成にも関与することが、ショウジョウバエやカにおいて明らかになっている。

これらの知見を参考すると、おそらくモンゼンイスアブラムシの兵隊は、本来、体表に傷ついた時に起こる修復メカニズムをうまく利用することによって、ゴール修復を行っているということが考えられる。つまり、自分の血リンパ (血液) を角状管からあえて大量出血させることによって、傷を治しているということである。ゴール修復兵隊におけるフェノール酸化酵素活性が非修復個体に比べて高かったことから、おそらく兵隊分泌液の凝固活性は普通のアブラムシのものに比べて著しく上昇していることが考えられる。本種においてゴール修復行動が進化した背景には、体液凝固にかかわるタンパク質について、遺伝子発現様式が亢進する方向に変化

したのではないかと推測される。

## (2) ゴール組織再生を促す生理活性物質の探索

### ① 兵隊分泌液中におけるゴール組織再生を促す生理活性物質の有無について

野外ゴールに小さな穴をあけ、兵隊による自然修復、またはボンドによる人為的修復を行い、1ヶ月後にゴール内部の組織再生の有無を確認した。自然修復ゴールの生存率は78% (N=9)、人為的修復ゴールの生存率は88% (N=8)であった。いずれの処理区についても、穴をあけた場所の内側のゴール組織は完全に傷を覆い隠し、壁が復元していた。ゴール組織の再生は、穴を埋めているものが兵隊分泌液でなくとも引き起こされたことから、ゴール組織再生を促す生理活性物質は兵隊分泌液中に存在していないことが示唆された。

また本実験では、兵隊が修復に失敗したゴール、および人為的に修復を阻害したゴールについても観察を行った。いずれのゴールも1ヶ月後には乾燥して死んでおり、穴は空いたままで周辺組織も再生していなかった。このことから、兵隊によるゴール修復はその後のゴール存続に確かに有効であることが明らかになった。

### ② ゴール組織の再生過程に関する組織学的解析

ゴール組織が再生する過程について、切片を作成し、組織学的に観察したところ、兵隊が分泌液で穴を修復してから14日目頃に傷の周辺ゴール組織が隆起しはじめ、22日目には穴の中央に向かって伸長を開始していた。30日目には、伸長してきたゴール組織同士が密着し、傷を覆い隠すように新しい壁が形成され、ゴール組織は穴をあける前の完全な姿に復元した(図4)。

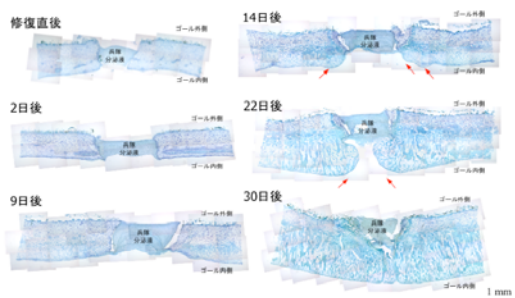


図4 ゴール組織の再生過程。組織再生中のゴール壁を水平方向に観察した。上がゴール外側、下がゴール内側。赤矢印はゴール組織が補償増殖していることを示す。

### ③ ゴール組織再生中の兵隊の行動およびその役割

②において組織再生中のゴール内部の様子を観察していたところ、傷周辺の領域には兵隊が常に高密度で集合していることを発見した。そこで、この現象についてより詳細に調べるために、再度野外ゴールを用いた実験を行った。方法は、上述の実験と同様にゴールに小さな穴を開けて兵隊が修復させ、3日目、13日後、30日後にゴールを採集し、傷口周辺に局在している兵隊数を計測した。その結果、ゴール組織再生中である3日目と13日目には、兵隊が傷口周辺に有意に高密度で集合していたが、組織再生が完了した30日後には、このような集合は見られなかった(図5)。このことから、兵隊は再生中の間、ずっとゴール組織に集合し、おそらく口針から何らかの生理活性物質を注入することで植物組織を刺激しているのではないかと推測された。

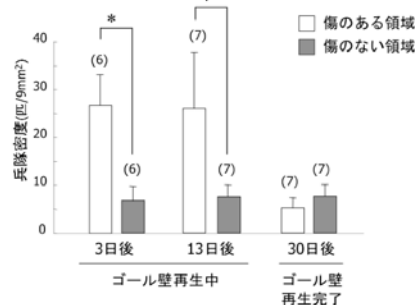


図5 傷領域と無傷領域における兵隊密度の比較。ゴール再生中の3日後と13日後において、兵隊は有意に高密度で傷領域に集合していた。

次に、ゴール組織の再生にアブラムシの存在が必要か否かを調べるため、農薬処理を施しアブラムシを殺した場合にゴールの組織再生が起こるかどうかを調べた。兵隊により穴を修復させたゴールに、神経系に作用する2種類の農薬(モスピラン、スミチオン)をそれぞれゴール表面に塗布し、1ヶ月半後にゴールを回収し、内部を調べたところ、コントロール(水をゴール表面に塗布)ではゴール組織が再生されたのに対し、農薬を塗布したゴールでは組織は再生されなかった(図6)。このことから、組織再生にはゴール内のアブラムシの存在が必要であることがわかった。その中でも、おそらく傷口付近に集合している兵隊は特に重要な役割を果たしているものと考えられた。



図6  
農薬処理によるゴール組織再生の阻害。  
スミチオン塗布ゴール(左)は組織再生しなかったが、コントロールの水塗布ゴール(右)は組織再生した。

#### ④まとめ

本研究の結果から、ゴール修復過程には2つのステップが存在することがわかった。すなわち、まず兵隊が分泌液により応急措置的に修復し、その後、植物組織が再生するというものである。このような修復過程は、生物の体表が傷ついたときに起こる一連の「創傷治癒」過程、つまり、迅速なかさぶた形成とその後の皮膚組織の再生という過程に非常に類似しているということが言える。

兵隊は傷形成直後の修復のみならず、植物組織の再生においても重要な役割を果たすことが示唆された。おそらく兵隊は何らかの生理活性物質を口針から再生中のゴール組織に注入し、再生を誘導しているようである。そもそもアブラムシはゴールを形成する際に口針から何らかの化学物質(植物ホルモン様物質?)を注入して形態操作していると考えられている。このことから、本種の兵隊はゴール形成能力を利用することにより、ゴール組織の再生を誘導していることが示唆される。今後は、このような生理活性物質についてアブラムシの唾液に着目して探索していく予定である。

本研究で明らかになった現象は、昆虫が自分とは全く異なる生物である植物の傷を治すというこれまでに報告のない新しい現象である。ゴールが存続するか否かという点は、自分たちの生存に直結する問題だけに非常に重要であり、それゆえこのような行動が進化したのではないかと考えられる。

#### 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1件)

1. Kutsukake M., Shibao H., Uematsu K., and Fukatsu T. Scab formation and wound healing of plant tissue by soldier aphid. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 276: 1555-1563 (2009), 査読有

[学会発表] (計8件)

1. 杵掛磨也子ら, 社会性アブラムシの兵隊階級によるゴール修復と植物組織の再生誘導, 日本応用動物昆虫学会第53回大会, 2009年3月29日, 北海道大学(札幌)

2. 杵掛磨也子ら, 社会性アブラムシの兵隊階級によるゴール修復の分子基盤, 日本動物学会第79回大会, 2008年9月6日, 福岡大学(福岡)

3. 杵掛磨也子ら, 兵隊アブラムシの自己犠牲的なゴール修復に関わる分子基盤の解明, 日本応用動物学会第52回大会, 2008年3月27日, 宇都宮大学(栃木)

4. 杵掛磨也子ら, 社会性アブラムシの兵隊階級によるゴール修復の分子基盤, 日本動物学会第78回大会, 2008年9月22日, 弘前大学(青森)

5. 杵掛磨也子ら, 社会性アブラムシにおけるゴール修復行動の分子基盤およびその進化, 日本進化学会第9回大会, 2008年8月31日, 京都大学(京都)

6. 杵掛磨也子ら, 兵隊アブラムシの自己犠牲的なゴール修復過程に関わる分子基盤の解明, 日本応用動物学会第51回大会, 2007年3月29日, 広島大学(広島)

7. 杵掛磨也子, ゴールを守る兵隊アブラムシの社会行動に関わる分子基盤, 日本昆虫学会第66回大会, 2006年9月17日, 鹿児島大学(鹿児島)

8. Kutsukake M et al., Molecular basis of self-sacrificing gall repair by soldier aphids in *Nipponaphis monzeni*., 第15回国際昆虫学会, 2006年8月4日, Washinton DC (USA)

[その他]

○産総研プレスリリース

「昆虫による植物組織の修復・再生現象の発見 -植物の傷を自己犠牲的に自分の体液で塞ぎ、口針で癒す兵隊アブラムシ-」

<http://staff.aist.go.jp/t-fukatsu/PressRelease090225.pdf>

○研究室ホームページ

<http://staff.aist.go.jp/t-fukatsu/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杵掛 磨也子 (KUTSUKAKE MAYAKO)  
独立行政法人産業技術総合研究所・  
生物機能工学研究部門・研究員  
研究者番号：90415703

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし