

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06373

研究課題名(和文) 兵隊アブラムシのゴール修復行動に伴い進化したチロシン合成・蓄積メカニズムの解明

研究課題名(英文) Molecular analyses of tyrosine synthesis and accumulation mechanisms in soldier aphids that has evolved with gall repairing behavior.

研究代表者

沓掛 磨也子 (Kutsukake, Mayako)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究グループ付

研究者番号：90415703

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：社会性昆虫に見られる高度かつ巧妙な社会システムがどのように成立し、維持され、また進化してきたのかを知ることは、進化生物学において重要な課題である。本研究では、この問題にアプローチするため、社会性アブラムシに着目した。モンゼンイスアブラムシの兵隊は、「ゴール修復」という興味深い社会行動を示す。しかし、その分子基盤については、体液メラニン化が重要な役割を果たしていること以外はほとんど解明されていなかった。本研究課題では、兵隊で特殊化したチロシン合成・蓄積に関わる分子基盤について解明するとともに、ゴール修復の分子基盤の進化や巨大顆粒細胞の発生起源について明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

モンゼンイスアブラムシ兵隊が示すゴール修復は、体表の傷をふさぐ「かさぶた」の形成機構を著しく増強し、凝固活性が高い体液を外部に大量に放出することで、巣の傷を修復する。本研究では、ゴール修復に必要なチロシンを兵隊が大量蓄積する遺伝的基盤を、トランスクリプトーム解析から明らかにすることができた。また、フェノール酸化酵素の種間比較解析から、ゴール修復という社会行動が進化する過程で、遺伝子重複や発現組織の変化という分子進化的イベントが重要な役割を果たしたという事実が明らかになった。また、ゴール修復に特化した巨大顆粒細胞が、脂肪体細胞に由来するという新たな知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Social insects have highly sophisticated social systems, but how they have established, maintained and evolved remain unknown. To approach this question, I focused on social aphids. In the social aphid, *Nipponaphis monzeni*, soldiers show a unique social behavior, namely gall repair, wherein the soldiers discharge a large amount of their own body fluid to repair the damage of the gall, but the molecular basis of this social behavior has been largely unknown, except that body fluid melanization plays an important role in the process of the gall repair and that soldiers contain a large amount of tyrosine, a starting substance of the melanin pathway. In this study, I clarified molecular basis of the tyrosine synthesis and/or accumulation in soldiers, molecular evolution of the soldier-specific phenoloxidase genes, and a developmental origin of peculiar cells specialized for the gall repair, namely large globular cells.

研究分野：社会性昆虫

キーワード：社会性アブラムシ ゴール修復 フェノール酸化酵素 チロシン 巨大顆粒細胞 菌細胞

1. 研究開始当初の背景

社会性昆虫に見られる高度かつ巧妙な社会システムがどのように成立し、維持され、また進化してきたのかを知ることは、進化生物学において重要かつ興味深い課題である。本研究では、この問題にアプローチするため、社会性アブラムシに着目した。社会性アブラムシは、様々な興味深い特徴や現象を有し、利他階級である兵隊が独立に複数回進化してきたため、種間比較により社会性進化を考えるのに適した材料である。

本研究で扱うモンゼンイスアブラムシの兵隊は、「ゴール修復」という興味深い社会行動を示す。本種はイスノキという常緑樹に完全閉鎖型のゴールを形成するが、成長中の未成熟ゴールは外敵であるガの幼虫にしばしば食い破られてしまう。これに対して兵隊は、ゴールの傷口にすばやく集合し、尾部から白い液体を大量に分泌する。すると分泌液は次第に固化し、穴は完全に塞がれる。これまで申請者は、このゴール修復行動に関わる分子基盤、特に分泌液凝固の分子メカニズムについて解明するため、様々な解析に取り組んできた。これまでの研究から、(1)兵隊分泌液にはメラニン合成に関わる酵素(フェノール酸化酵素)や基質(チロシン)が大量に含まれており、体液のメラニン化の過程で、周辺タンパク質の架橋が起こり分泌液が凝固する、(2)兵隊の腹部体腔内は、巨大顆粒細胞と呼ばれる巨大かつ特殊化した細胞で充満しており、ゴール修復時に分泌液とともに体外に排出される。(3)巨大顆粒細胞にはゴール修復に必要なタンパク質成分や脂質成分が蓄積しており、分泌時に細胞が破裂することで凝固反応が開始することがわかってきた。しかしながら、兵隊の分子・代謝レベルでの特殊化に関わるメカニズムや、ゴール修復に特化した巨大顆粒細胞の発生起源については、未解明であった。

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ゴール修復行動に関わる分子・細胞・代謝基盤およびその進化について包括的に解明することを目的として、以下の課題に取り組む。

(1) 兵隊において特殊化したチロシン合成・蓄積メカニズムの解明

アブラムシにおけるアミノ酸合成は、内部共生細菌**ブフネラ**と協調的に行われることが知られている。そこで、本種**ブフネラ**のゲノム解析、および**ブフネラ**を収納するアブラムシ菌細胞におけるトランスクリプトーム解析を行い、モンゼンイスアブラムシ兵隊において高度に特殊化したチロシン合成・運搬・蓄積に関わる分子基盤を明らかにする。

(2) ゴール修復の分子基盤の進化、および巨大顆粒細胞の発生起源

社会性アブラムシにおいて、ゴールの傷を修復するために自らの分泌液を使うという高度かつ巧妙な方法を進化させたのは、モンゼンイスアブラムシだけである。そこで、近縁種との比較解析により、モンゼンイスアブラムシが示す高度なゴール修復が分子レベルでどのように進化してきたのかについて解明する。また、モンゼンイスアブラムシのゴール修復のために特殊化した巨大顆粒細胞の発生起源について明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、モンゼンイスアブラムシおよびその近縁種(イスノフシアブラムシ、イスノフシアブラムシ、イスノアキアブラムシ、ヨシノミヤアブラムシ)を対象に研究を行った。アブラムシは野外からゴールごと採集し、実験室に持ち帰った後にゴール内の虫を取り出して実験に用いた。

ブフネラ全ゲノム解析は、モンゼンイスアブラムシの菌細胞からゲノム DNA を抽出し、断片化した後、TruSeq Nano DNA Sample Prep Kit を用いて DNA ライブラリーを作成した。MiSeq によりシーケンシングし、得られたリード配列を用いて全ゲノム配列を決定し、遺伝子アノテーションを行った。

トランスクリプトーム解析は組織別に行い(菌細胞、巨大顆粒細胞、体全体)、菌細胞については、アブラムシ側と**ブフネラ**側の両方の遺伝子について発現解析を行った。cDNA ライブラリーは、TruSeq RNA Sample Preparation キットを用いて作製し、HiSeq2000/2500 によるシーケンシングにより得られたリード配列を用いて、遺伝子アノテーションおよび遺伝子発現解析を行った。その他の分子生物学的解析、分子系統学的解析、生化学的解析については、Kutsukake *et al.* 2019 に記載の通りに実施した。

4. 研究成果

(1) 兵隊で特殊化したチロシン合成・蓄積メカニズムの解明

全ゲノム解析の結果、モンゼンイスアブラムシの**ブフネラ**は1つの染色体(0.59Mb)と2つのプラスミド(pLeu, pTrp)から構成されていることが明らかになった(図1A)。チロシン合成に

関わるシキミ酸経路の遺伝子群は全て保存されており、新たなプラスミドの獲得や遺伝子コピー数の増加は見られなかった。このことから、本種兵隊に見られる顕著なチロシン合成は、プフネラゲノムの変化によるものではないことがわかった。また、菌細胞トランスクリプトーム解析の結果、プフネラ側のチロシン合成遺伝子 (*AroH*, *AroB*, *AroQ*, *AroE*, *AroK*, *AroA*, *AroC*, *PheA*, *HisC*) が他のアミノ酸合成遺伝子よりも顕著に高発現しているという傾向は検出されず、発現変動していない可能性が示唆された。一方、アブラムシ側の遺伝子については、チロシン合成の最終反応を担うフェニルアラニン-4-モノオキシゲナーゼ遺伝子が菌細胞において顕著に発現亢進していた。このことから、アブラムシ側の遺伝子発現がチロシン合成を制御している可能性が示唆された。続いて、チロシン合成に必要な基質合成に関わる遺伝子発現について調べた。基質であるエリトロース-4-リン酸 (E4P) およびホスホエノールピルビン酸 (PEP) の合成酵素に着目したところ、E4P を合成するトランスアルドラーゼ遺伝子、および PEP を合成するホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK) 遺伝子が、兵隊の菌細胞や巨大顆粒細胞において顕著に発現亢進していることがわかった (図 1B)。すなわち、兵隊体内でチロシン合成に必要な基質が大量に生産され、菌細胞に輸送されることにより、高レベルでチロシンが合成されている可能性が考えられた (Kutsukake *et al.* 2019)。

兵隊におけるチロシンの蓄積メカニズムについても様々な知見が得られた。兵隊の分泌液におけるアミノ酸分析を行ったところ、チロシンは 31.7mM であり、全アミノ酸の約 3/4 を占めていることがわかった (Kutsukake *et al.* 2019)。その大半は分泌液中の血リンパに存在していたが、一部は巨大顆粒細胞において蓄積されていた。このことは、菌細胞で合成されたチロシンが体液中に分泌され、巨大顆粒細胞に運搬されることを示唆している。チロシンの運搬や輸送に関わる遺伝子の候補を組織別 RNAseq 解析から探索したところ、複数のトランスポーター遺伝子 *slimfast* が巨大顆粒細胞で発現亢進していたことから、チロシンの輸送に関与している可能性が示唆された。また、巨大顆粒細胞で高発現している遺伝子として UDP-グリコシルトランスフェラーゼ遺伝子が複数同定された。UDP-グリコシルトランスフェラーゼは、糖転移反応により分子の可溶化に関わることから、兵隊体内での高濃度チロシンの蓄積に関与している可能性が考えられた。今後、これらの可能性については、組換えタンパク質を用いた機能解析などを通じて検証する必要がある。

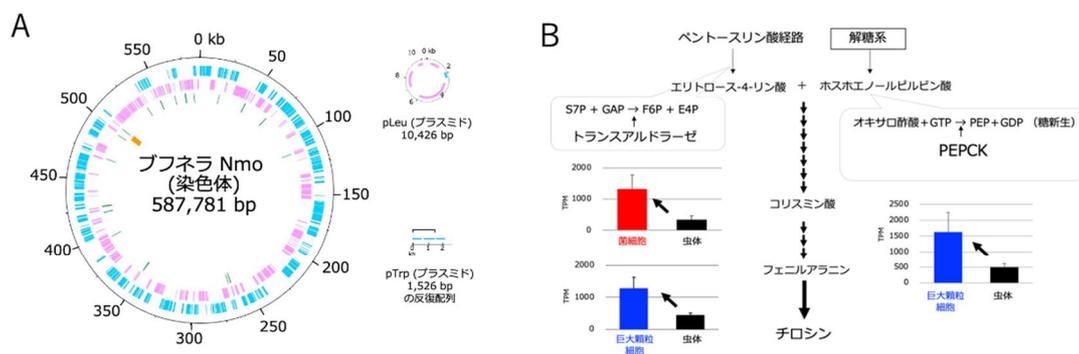


図 1. (A) プフネラ全ゲノム配列。1本の染色体と 2つのプラスミドから構成されていた。(B) トランスアルドラーゼとホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK) の遺伝子発現量。菌細胞 (赤) や巨大顆粒細胞 (青) において発現上昇していた。

(2) ゴール修復の分子基盤の進化、および巨大顆粒細胞の発現起源

フェノール酸化酵素 (PO) はメラニン合成反応における鍵酵素であり、兵隊の分泌液凝固に重要な役割を果たす酵素である。RNAseq 解析から、モンゼンイスアブラムシおよびその近縁種においては、3~5 種類のフェノール酸化酵素遺伝子が存在し、ファミリーを形成していることが明らかになった。ゴール修復に関わる PO-S 遺伝子は、そのうちの一遺伝子であり、ゴール修復を行わない近縁種においてもオーソログ遺伝子が存在していた。分子系統解析の結果、PO-S 遺伝子は最も初期に生じ、また進化速度が他のパラログ遺伝子よりも早く、遺伝子発現レベルが高い傾向にあることがわかった (図 2)。また、PO-S 遺伝子は、モンゼンイスアブラムシでは兵隊特異的発現様式を獲得したのに対し、イスノフシアブラムシとイスノオオムネアブラムシでは構成的発現を示した。さらにイスノオオムネアブラムシにおいては偽遺伝子化、イスノオオムネアブラムシにおいては遺伝子重複がおこるなど、ダイナミックに進化してきたことが明らかになった。これらの結果は、社会性アブラムシにおけるゴール修復の進化において、フェノール酸化酵素の遺伝子重複や発現組織の変化という分子進化的イベントが重要な役割を果たしたことを示している。

巨大顆粒細胞を持たない近縁種における PO-S 遺伝子の発現組織を、免疫組織化学によって調べたところ、イスノフシアブラムシおよびイスノアキアブラムシにおいては、脂肪体で発現して

いることが判明した。以上の結果は、モンゼンイスアブラムシの巨大顆粒細胞が脂肪体細胞に由来することを強く示唆するものであり、これまで未解明だった巨大顆粒細胞の進化起源が解明された。

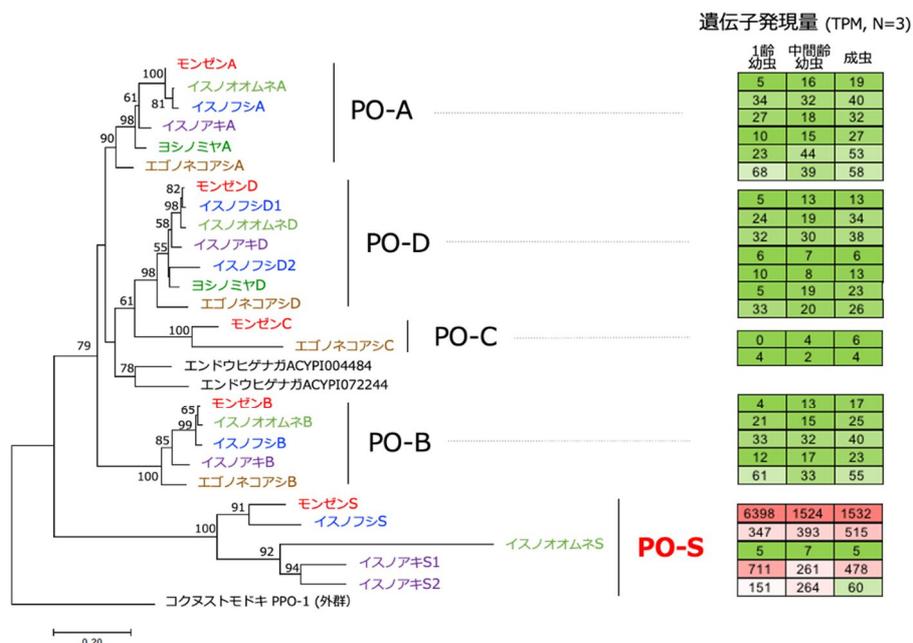


図2. モンゼンイスアブラムシと近縁種におけるフェノール酸化酵素遺伝子。左は252アミノ酸配列を用いた最尤法による分子系統樹、右は遺伝子発現量

主な成果

Kutsukake M., Moriyama M., Shigenobu S., Meng X. Y., Nikoh N., Noda C., Kobayashi S., Fukatsu T. (2019) Exaggeration and co-option of innate immunity for social defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116: 8950-8959.

プレス発表

沓掛 磨也子、森山 実、深津 武馬 (2019) 兵隊アブラムシが放出する体液で巣を修復する仕組みを解明 - 傷修復の分子機構を増強した「スーパー凝固体液」で壊れた巣を修復 - 2019年4月16日 産業技術総合研究所プレスリリース

https://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2019/pr20190416/pr20190416.html

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Shibao H., Kutsukake M., Matsuyama S., Fukatsu T.	4. 巻 8
2. 論文標題 Linoleic acid as corpse recognition signal in a social aphid.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Zoological Letters	6. 最初と最後の頁 2
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40851-021-00184-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shibao Harunobu, Kutsukake Mayako, Fukatsu Takema	4. 巻 11
2. 論文標題 Temporal division of labor in an aphid social system	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1183
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-81006-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 沓掛磨也子, 植松圭吾, 深津武馬	4. 巻 12
2. 論文標題 ゴールで生活するアブラムシの安全快適な住まいづくりと社会生活	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 植物科学最前線 (BSJ-Review)	6. 最初と最後の頁 80-88
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.24480/bsj-review.12b2.0020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kutsukake M., Moriyama M., Shigenobu S., Meng X. Y., Nikoh N., Noda C., Kobayashi S., Fukatsu T.	4. 巻 116
2. 論文標題 Exaggeration and co-option of innate immunity for social defense.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	6. 最初と最後の頁 8950-8959
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1900917116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 沓掛磨也子
2. 発表標題 ゴールをつくるアブラムシの安全快適な住まいづくりと社会生活
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会シンポジウム「植物は策士!? 瞠目の異種間コミュニケーション」（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mayako Kutsukake
2. 発表標題 Plant manipulation by gall-forming social aphids
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会ワークショップ「寄生共生複合体における分子レベルでの相互作用」（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 沓掛磨也子
2. 発表標題 ゴールをつくる社会性アブラムシにおける昆虫 - 植物間相互作用 - 分子から行動, 進化まで -
3. 学会等名 第37回日本植物細胞分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 沓掛磨也子、森山実、重信秀治、深津武馬
2. 発表標題 モンゼンイスアブラムシ兵隊が示すゴール修復の分子基盤と種間比較解析
3. 学会等名 日本動物学会第90回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 沓掛 磨也子
2. 発表標題 植物を变身させるアブラムシの安全快適な住まいづくりと社会性生活
3. 学会等名 第57回植物バイテクシンポジウム「变身する生き物, 变身させる生き物」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mayako Kutsukake
2. 発表標題 Molecular mechanisms and evolution of social behaviors by soldier aphids.
3. 学会等名 The 3rd TISTR-AIST Mini Joint Symposium (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 沓掛 磨也子、森山 実、深津 武馬
2. 発表標題 兵隊アブラムシの自己犠牲的なゴール修復に関わる脂質成分の解析
3. 学会等名 日本動物学会第89回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 沓掛 磨也子、森山 実、深津 武馬
2. 発表標題 ゴール修復する兵隊アブラムシの特殊化したアミノ酸合成・蓄積メカニズム
3. 学会等名 第63回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 沓掛 磨也子
2. 発表標題 昆虫研究者という道を選んで
3. 学会等名 お茶の水女子大学理系女性教育開発共同機構 第1回フロントランナーセミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 沓掛 磨也子
2. 発表標題 アブラムシも弱くない ～仲間を守る兵隊アブラムシの知られざる行動と生物機能～
3. 学会等名 日本進化学会第23回大会 公開シンポジウム 「東京-Evo-リンピック ～驚くべき性質や能力をもつ生き物たち～」（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 沓掛 磨也子
2. 発表標題 社会性アブラムシにおける利他行動の分子基盤と進化
3. 学会等名 第11回日本昆虫科学連合・日本学会会議 公開シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

産業技術総合研究所生物プロセス研究部門 https://unit.aist.go.jp/bpri/ 個人ホームページ https://sites.google.com/view/mayakokutsukake 産総研プレス発表「兵隊アブラムシが放出する体液で巣を修復する仕組みを解明」 https://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2019/pr20190416/pr20190416.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	森山 実 (Moriyama Minoru) (30727251)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員 (82626)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関