

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03296

研究課題名(和文) 植食性昆虫における餌植物の地理分化に伴う多様化：虫こぶ形成昆虫をモデルとして

研究課題名(英文) Diversification in gall-forming insects in relation to the geographic differentiation of their host plant species

研究代表者

池田 紘士 (Ikeda, Hiroshi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：00508880

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：一部の植食性昆虫では、宿主植物の遺伝子発現を変化させて虫こぶを形成することが知られている。本研究では、マンサクに虫こぶを形成する4種の近縁なアブラムシを対象として、これらの虫こぶにおける遺伝子発現パターンとその防御戦略を調べた。RNA-seqによって虫こぶ組織の遺伝子発現解析を行った結果、防御物質の生合成や虫こぶの成長に関わる遺伝子の発現量に種間で違いがみられた。さらに、アブラムシの系統樹の構築とマンサクの系統地理解析を行って比較したところ、マンサクの地域系統の分布とHamamelistes属のアブラムシの分布や地域系統分化には対応がみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、マンサクに虫こぶを形成する近縁な4種のアブラムシにおいて、防御物質の生合成や成長の速さに関わる遺伝子の発現量の種間パターンと、実際の防御物質の量や成長の速さの種間パターンが対応していることが示された。虫こぶの形態や二次代謝産物などの防御形質についてはこれまでも研究例が多く、虫こぶ組織の遺伝子発現を調べた研究例もいくつかあるものの、防御形質と遺伝子発現の対応関係を調べた研究はほとんど行われてこなかった。本研究では、近縁種間で遺伝子発現と防御形質を比較することで、虫こぶの防御の進化過程をマイクロレベルとマクロレベルで明らかにすることができたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Gall-forming insect species induce various types of galls on their host plants by altering gene expression in host plant organs. Here, we investigated the diversification process of galls induced by four closely related aphid species in a host plant species (*Hamamelis japonica*) by comparing their gene expression patterns and resulting phenotypes. The expression levels of genes for morphogenesis and the biosynthesis of phenolics was different among aphid species. Our phylogenetic analysis of aphids and the host plant showed that geographic isolation among host plant populations has interrupted gene flow in aphids and accelerated the speciation process accompanied by phenotypic evolution in galls.

研究分野：進化生態学

キーワード：系統地理 遺伝子発現

## 1. 研究開始当初の背景

昆虫類は世界で約 100 万種が知られており、全生物種の約 7 割を占めるほど非常に高い種多様性を示す分類群である (Grimaldi & Engel, 2005)。この昆虫の高い種多様性を生み出した要因の一つとして、白亜紀における植物の多様化に伴ってそれを利用する植食性昆虫の多様化が生じたことがあげられる (Farrell, 1998; Futuyma & Agrawal, 2009)。植食性昆虫は、利用できる植物が特定の種に限られる宿主特異性をもつ種が多く、植物との特異的な関係の中で、特殊な生態や形態が進化した種も多くみられる。なかでも特殊な進化を遂げた虫こぶ形成昆虫は、宿主植物の芽や葉などに寄生し、食料とすみかを兼ねた“虫こぶ”を形成する。虫こぶ形成昆虫はおよそ 13,000 種存在し (Stone & Schönrogge, 2003)。虫こぶの形態は昆虫の種によって非常に多様であることが知られている。

虫こぶは、虫こぶ形成昆虫によって植物の遺伝子発現が操作されることで形成される (e.g. Takeda et al., 2021)。アブラムシ科ヒラタアブラムシ亜科に属する *Hamamelistes* 属のアブラムシは、日本国内で *Hamamelistes miyabei* (マンサクイガフシアブラムシ)、*Hamamelistes betulinus* (マンサクサンゴフシアブラムシ)、*Hamamelistes kagamii* (マンサクイボフシアブラムシ) の 3 種が知られており、どの種も *Hamamelis japonica* (マンサク) を一次宿主としてこの種に寄生し、種ごとに特異的な形態の虫こぶを形成する。さらに近縁種の *Hormaphis betulae* (マンサクフクロフシアブラムシ) もマンサクに虫こぶを形成するが、腋芽に虫こぶを形成する *Hamamelistes* 属のアブラムシとは異なり、マンサクの葉の表面に円錐形の単純な形態の虫こぶを形成する。イガ、サンゴ、イボ、ハフクロの 4 種のアブラムシは、4 種とも同種の植物 (マンサク) に虫こぶを形成するため、遺伝的に同一な植物組織に形成された虫こぶの遺伝子発現を比較することができる。そのため、これらの 4 種は、虫こぶの遺伝子発現パターンの進化過程を明らかにする上で適しているといえる。

## 2. 研究の目的

本研究では、イガ、サンゴ、イボの 3 種を中心に、ハフクロを含めた 4 種について、虫こぶ組織においてどのような遺伝子発現パターンの進化が生じて虫こぶの防御戦略の多様化がもたらされたのかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

マンサクに虫こぶを形成する 4 種のアブラムシの系統関係を明らかにし、さらに *Hamamelistes* 属の 3 種のアブラムシの種内の遺伝分化パターンを調べるために、系統地理解析と分岐年代推定を行った。系統解析は Bayes 法と最尤法で行い、分岐年代の推定は Bayes 法で行った。Bayes 法による系統解析と分岐年代の推定は、BEAST 1.10.4 (Suchard et al., 2018) を使用して行った。最尤法による系統解析は、RAxML-NG 1.0.2 (Kozlov et al., 2019) を使用して行った。ブートストラップは 1,000 反復行った。

虫こぶ組織の遺伝子発現パターンを種間および種内の地点間で比較するために、RNA-seq を用いた遺伝子発現解析を行った。非モデル生物であるマンサクはゲノム配列が分かっていないため、Trinity v2.13.2 (Grabherr et al., 2011) を使用して De novo トランスクリプトーム解析を行った。次に、Trinity に内挿されているスクリプトを用いて、Salmon v1.6.0 (Patro et al., 2017) を使用してコンティグ上にリードをマッピングし、コンティグごとの発現量を推定した。その後、正規化した発現量 (TPM) について、R の edgeR パッケージを使用して遺伝子のサンプル間の発現量の違いについて検定を行った。発現パターンの相関をもとに遺伝子をいくつかのまとまり (module) に分けるネットワーク解析を、R4.0.3 (R Development Core Team 2020) のパッケージ WGCNA (Weighted Gene Correlation Network Analysis; Langfelder & Horvath, 2008) を使用して行った。そして、検出されたモジュールの内、遺伝子数の多いモジュール上位 15 個について Metascape (<http://metascape.org/>) を使用したエンリッチメント解析を行い、各モジュールがどのような機能をもつ遺伝子で構成されているかを調べた。

マンサクの地理的遺伝構造と種内の系統関係を明らかにするために、MIG-seq 法 (Suyama & Matsuki, 2015) によって SNP データを取得し、得られた SNP データを用いて系統地理解析を行った。サンプルは、アブラムシの系統地理解析用に採集した虫こぶの植物組織または葉を使用した。地理的な遺伝分化パターンに基づく集団のグループ分けを、STRUCTURE ver. 2.3.4 (Pritchard et al., 2000) を使用して行った。系統樹構築は、SNP データを使用して系統解析を行うパイプラインである SNPhylo (Lee et al., 2014) を使用して PHYLIP ファイルを出力し、このデータを用いて PHYLIP (Felsenstein, 1995) の DNAML によって行った。

## 4. 研究成果

Bayes 法で作成された系統樹からは、イガとサンゴ・イボの分岐年代は約 580 万年前、サンゴとイボの分岐年代は約 213 万年前という結果になった。イボにおいては、南西の地域のみ分布するクレードが存在した。

虫こぶ 46 サンプルとコントロール用の葉 2 サンプルの RNA-seq の結果、各サンプルから 2,000 万程度のペアエンドリードが得られた。WGCNA によるネットワーク解析では、31 個のモジュールが検出された。上位 15 個のモジュールの遺伝子数は、452—3106 の範囲となった。15 個のモジュールのエンリッチメント解析の結果、フェノールの生合成に関係している可能性のあるモジュールや、虫こぶの成長や成熟に関係していると考えられるモジュールが検出され、これらのモジュールの hubgene の発現量には、アブラムシの種間で違いがみられた。

マンサクの SNP に関する STRUCTURE 解析の結果、最適なクラスター数は 2 となり、マンサクは東日本と西日本のクラスターに分かれ、東日本と西日本の集団間に遺伝的分化がみられるという結果になった。最尤法で構築された系統樹からは、大きく 2 つのクレードに分かれるという結果が得られ、このクレードは東日本と西日本で分かれており、STRUCTURE 解析の結果と一致した。得られたマンサクの地理分化パターンをアブラムシの系統樹と比較すると、マンサクの地理分化と 3 種のアブラムシの分布には対応がみられることが明らかにされた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kimura, A. and H. Ikeda	4. 巻 27
2. 論文標題 Geographic pattern in the community structure of arboreal insects in beech forests in northern Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Forest Research	6. 最初と最後の頁 63-70
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/13416979.2021.1965279	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kiyokawa, R, and H. Ikeda	4. 巻 76
2. 論文標題 Intraspecific evolution of sexually dimorphic characters in a female diving beetle can be promoted by demographic history and temperature	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Evolution	6. 最初と最後の頁 1003-1015
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/evo.14470	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 水木まゆ, 金子洋平, 雪江祥貴, 陶山佳久, 廣田峻, 澤進一郎, 久保稔, 山尾僚, 笹部美知子, 池田紘士
2. 発表標題 近縁な4種のアブラムシが形成する虫こぶにおける捕食者防御戦略の進化
3. 学会等名 第69回日本生態学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菊地孝介, 奥田圭, 池田紘士, 笹部美知子, 山尾僚
2. 発表標題 同所的に形成される虫こぶ2種類における齧歯類による捕食
3. 学会等名 日本生態学会東北地区会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小黒那智・山尾僚・池田紘士・笹部美知子
2. 発表標題 Hamamelistes miyabei 及びHamamelistes betulinus によりマンサクに誘導される虫こぶの形成メカニズムの解析
3. 学会等名 東北植物学会第9回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小黒那智・久保稔・澤進一郎・山尾僚・池田紘士・笹部美知子
2. 発表標題 マンサクに形成される2種の虫こぶの形成機構の解析
3. 学会等名 東北植物学会第10回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水木まゆ, 金子洋平, 雪江祥貴, 陶山佳久, 廣田峻, 澤進一郎, 久保稔, 山尾僚, 笹部美知子, 池田紘士
2. 発表標題 マンサクの地理分化に伴う近縁な3種のアブラムシにおける虫こぶ形態の多様化
3. 学会等名 第68回日本生態学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村彰宏、池田紘士
2. 発表標題 氷期後の二次的接触が温帯林の昆虫に与える影響：寒冷地と温暖地の比較
3. 学会等名 第67回日本生態学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木村彰宏、池田紘士
2. 発表標題 氷期後の二次的接触に伴ってブナ林の樹上性昆虫に生じた遺伝子浸透
3. 学会等名 第68回日本生態学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akihiro Kimura, Hiroshi Ikeda
2. 発表標題 Mitochondrial introgression in <i>Asiopodabrus</i> species (Coleoptera, Cantharidae ) inhabiting beech forests due to secondary contact after the last glacial period
3. 学会等名 The 9th EAFES International Congress
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉山瑞、池田紘士
2. 発表標題 ヨモギに形成される虫こぶから広がる多様性の高い寄生蜂群集
3. 学会等名 第54回種生物学会シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉山瑞、池田紘士
2. 発表標題 ヨモギに形成される虫こぶから広がる多様性の高い寄生蜂群集
3. 学会等名 第70回日本生態学会大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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 分担者	笹部 美知子  (Sasabe Michiko)  (00454380)	弘前大学・農学生命科学部・准教授   (11101)	
研究 分担者	山尾 僚  (Yamawo Akira)  (50727691)	弘前大学・農学生命科学部・准教授   (11101)	

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
---------	---------