

令和 6 年 6 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：2021～2023

課題番号：21H02537

研究課題名(和文)種内寄生によって強化される生物界の階層性進化：社会性昆虫における検証

研究課題名(英文) The evolution of biological hierarchy reinforced by intraspecific parasitism: a test with social insects

研究代表者

土畑 重人 (Dobata, Shigeto)

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授

研究者番号：50714995

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、生物階層を超えた階層性進化の共通原理への洞察を得るために、階層性の典型例である社会性昆虫の一種アミメアリと、そこに生じた種内社会寄生者を用いた実証研究を展開した。社会寄生・通常系統の高精度レファレンスゲノムの取得、遺伝子発現の系統間比較、コロニー階層の統合性として巣仲間識別行動の解析を行った。その結果、社会寄生系統は祖先種の女王形質を転用していることが示唆され、またかれらの他コロニー侵入時には、侵入先コロニーは一般的な巣仲間識別行動で侵入を排除すること、などが判明した。これらの成果は、社会システムの進化的維持機構、階級分化の分子基盤を解明するための基盤情報になると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究が対象とした社会寄生現象の進化は、社会性昆虫の事例研究にとどまらず、生物の社会システムの起源・維持に関して、生物階層を問わない一般性を持ちうるものである。例えば、微生物集団のふるまいや、がん細胞の小進化プロセス、さらに人間社会の進化史的な成立においても、社会寄生者の問題は存在する。社会性昆虫の研究に絞っても、社会寄生系統は、野外で進化した「女王変異体」とみなすことが可能であるため、通常は表現型可塑性で生じる社会性昆虫の階級分化の分子メカニズムの理解に、新たなアプローチを与えることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We conducted an empirical study using a social insect *Pristomyrmex punctatus*, which harbors intraspecific social parasites, in order to gain insight into the common principles in the evolution of biological hierarchies. We obtained high-quality reference genomes of socially parasitic (cheater) and normal lineages, compared gene expression among lineages, and analyzed nestmate discrimination behavior as an integral part of colony hierarchy. The results suggest that the cheater lineage has co-opted queen traits from their ancestor species, and that when the cheaters invade other colonies, the hosting colony exhibits normal nest-mate discrimination behavior to exclude the invaders. These results will provide basic information for elucidating the evolutionary maintenance mechanisms of social systems and the molecular basis of caste differentiation in social insects.

研究分野：進化生態学

キーワード：階層性進化 社会性昆虫 ゲノミクス

## 1. 研究開始当初の背景

本研究課題は「階層性の進化」に焦点を当てたものである。ここで階層性は、細胞の集合による多細胞性や個体の集合による真社会性などを指す。階層性の進化においては一般に、下位階層のレベル(例:個体)での進化的な拮抗関係が、上位階層(例:コロニー)の進化を抑制すると考えられてきた。その一方で、階層性の上昇は生物界に普遍的なトレンドであり、生命の高度な複雑性の進化的駆動力とみなされている。本研究は、一見矛盾するこれらの見解を止揚することを目指すものである。

具体的には、下位階層の構成要素間で生じる拮抗関係が、実は上位階層の統合性を共進化的に強化する役割を持つ、という作業仮説のもとに、**階層性の典型例である社会性昆虫と、そこに生じた拮抗関係の例として社会寄生者を用いた実証研究**を着想した。社会寄生者は社会の進化的存続にとって脅威となりうるが、社会の側も、社会の統合性をより強化して社会寄生者に対抗する方向に適応進化すると考えられる。

本研究で用いる社会寄生者は、宿主から同所的に分化したものであるため、塩基配列を容易に比較することができる。近年進捗が目覚ましい社会性昆虫のオミクス研究に力を得て、ゲノム・トランスクリプトームの基盤情報取得、社会寄生者・宿主間の比較も、併せて計画した。

## 2. 研究の目的

個体階層レベルでの社会階層への寄生(=社会寄生系統)が種内で実際に観察される社会性昆虫の1種、アミメアリを用いて、**社会寄生者と宿主社会との対抗的共進化の実態を、ゲノムレベルから行動レベルまで詳らかにすること**を目的とした。具体的には、社会寄生系統(非協力系統)と通常系統(協力系統・宿主系統)の高精度のドラフトゲノムの取得、社会寄生系統の成立に貢献した進化的新規性の起源の特定、コロニー階層の統合性を高める寄生系統への対抗進化としての兼仲間識別行動に着目した解析を行うことで、社会性昆虫の社会システムの維持機構、カースト分化の分子基盤や、生物階層を超えた生命の共通原理への深い洞察を得ることを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) ゲノム・トランスクリプトーム・形態の比較解析

<高品質ドラフトゲノムの取得(土畑)> 三重県産の社会寄生系統・通常系統各1個体からゲノムDNAを抽出し、Chromiumシステム(10x genomics)を用いたライブラリー作成によって、Illuminaのショートリードシーケンスからロングリードレベルのドラフトゲノム情報を取得した(研究協力者:基礎生物学研究所・重信秀治教授)。得られたリンク済みリードを、専用ソフトウェアSupernovaを用いてアセンブルした。さらに、通常系統については染色体レベルでのスキファールドを得るために、ゲノムの3次元構造の解析法のひとつHi-C解析を行った(研究協力者:沖縄科学技術大学院大学・Evan Ecomono教授、東京大学・Hsu PoWei氏)。通常系統10個体をプールしてゲノムDNAを抽出し(Qiagen, MagAttract HMW DNA Kit使用)た後に、Dovetail® Omni-C® キットを用いてHi-C用ライブラリー調整を行った。作製したライブラリーは、Illumina NovaSeqプラットフォームでシーケンスし(150-PE)、解析パイプライン(<https://github.com/dovetail-genomics/Omni-C/>)に従ってHi-Cスキファールドを得た。最終的にはJuicebox1.11を使用してマニュアルキュレーションを行った。

<遺伝子アノテーション(土畑)> 通常系統のドラフトゲノムに対して遺伝子アノテーションを行った。まず、RepeatModelerを用いてゲノム中の反復領域を特定し、RepeatMaskerを用いてソフトマスク処理を行った。遺伝子予測には、RNA-seqデータとタンパク質データを統合してGeneMark-ETPとAUGUSTUSをトレーニングするBRAKER3パイプラインを使用した。予測に使用するRNA-seqデータとして、合計18個体の成虫全身から得たもの(以下のRNA-seqの項で詳述)を、さらに、プロテオームデータとしてアリ22種の情報をNCBI RefSeqデータベースから取得した。RNA-seqデータはHISAT2を用いてゲノムにマッピングし、StringTieを用いてアセンブルした。RNA-seq・プロテオームのデータを統合し、ProtHintパイプラインによって評価した。選択されたエビデンスはGeneMark-ETPのトレーニングに使用し、その出力はAugustusのさらなるトレーニングに供した。2つのde novo予測ツールによるアノテーション結果を組み合わせ、最終的な結果を生成し、PythonスクリプトselectSupportedSubsets.pybによるフィルタリングの後に、完全なサポートを持つものを選択して予測結果とした。(研究協力者:東京大学・Hsu PoWei氏)

<嗅覚関連遺伝子および脳構造の系統間比較(北條)> 個体間相互作用の調節に関与し、そのファミリーの大きさから進化速度が速いと予測される嗅覚受容体(ORs)遺伝子ファミリーに着目し、相同性検索によってそのレパートリーを系統間で比較した。ORs 遺伝子のモチーフおよび他の昆虫種の ORs アミノ酸配列をクエリとし、通常・社会寄生両系統のレファレンスゲノムに対して相同性検索を行った。脳構造については、両系統の脳をシナプシン抗体で染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて脳構造を解析・比較した。

<RNA-seq 解析(土畑)> 三重県産の社会寄生系統5個体、東京都・三重県産の通常系統(内勤個体4頭・外勤個体4頭)、および東京都・三重県産の「女王表現型」(通常系統から表現型可塑性によって稀に生じると考えられる、女王表現型を示す個体)5個体、計18個体の成虫全身から RNeasy Micro Kit (Qiagen) を使用して RNA を抽出した。SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA Kit (TAKARA Bio) を使用してライブラリを調製し、Illumina NovaSeq プラットフォームでシーケンスした(150-PE)。品質チェック・トリミングの後、STAR v2.7.11 を使用して通常系統レファレンスゲノムにマッピングした。その後の解析には、R パッケージの Rsubread と edgeR を用いた。(研究協力者: 東京大学・Hsu PoWei 氏)

## (2) 集団ゲノム解析(土畑)

得られたドラフトゲノムを活用して、ddRAD-seq 法による集団のゲノムワイド SNP データの精度向上を試みた。京都市にて採取した計192個体(24コロニー、各8個体)の成虫から ddRAD-seq 法でライブラリを作製し(研究協力者: 慶應大学・永野惇特任教授 京都大学・渡邊薫氏)、Illumina HiSeqX にてシーケンスを行った。得られたリードデータは Bowtie2 を用いて通常系統レファレンスゲノムへのマッピングを行い、samtools mpileup を用いて variant を抽出した。すべての解析個体からは、同時に個体の絶対適応度の情報も得られているため、ゲノムワイド関連解析(GWAS)を応用して、適応度の変動を説明する要因の解析を行った。この手法(「インダイレクトーム解析」と命名)は、各 SNP サイトごとに、個体のアリル頻度のみならず、コロニー平均アリル頻度をも説明変数に含めた重回帰である。社会性をもつ生物において、個体の表現型が、個体自身の遺伝子型のみならず、相互作用相手の遺伝子型からも影響を受けるという事実を統計的に表現しており、汎用性の高い手法である。

## (3) コロニー侵入時の行動解析(土畑)

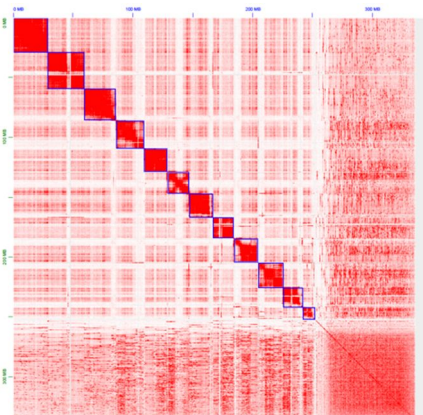
社会寄生系統は、他コロニーに侵入することで寄生を拡大することが、先行研究で示唆されている。コロニー侵入時に、侵入者側・宿主側それぞれに(拮抗的共進化の産物としての)特異的な行動が見られることを期待して、実験室内で侵入行動を再現する行動実験を行った(研究協力者: 東京大学・中村拓磨氏)。2022年5月に、社会寄生系統を含む三重県紀北町の調査集団にてサンプリングを行った。社会寄生系統を含む・含まないコロニーを実験室に持ち帰り、室内で異コロニー個体の侵入実験を行った。社会寄生系統の個体、通常系統の内勤・外勤個体、対照実験として巣仲間個体を、社会寄生系統を含まない実験コロニーに導入し、侵入者・受け入れ側それぞれの行動を最大5分間動画撮影した上で、敵対性に基づくスコアリングを行った。さらに、導入後1時間、24時間後に、導入個体の生存と巣内侵入の成否を記録した。

アミメアリの集団行動の動画解析を効率化すべく、薄板アリーナに多数個体を導入して動画撮影し、深層学習を用いて複数個体をマーカーレストラッキングする新たな手法を開発した(研究協力者: 東京大学・池上高志教授研究室)。

## 4. 研究成果

### (1) ゲノム・トランスクリプトーム・形態の比較解析

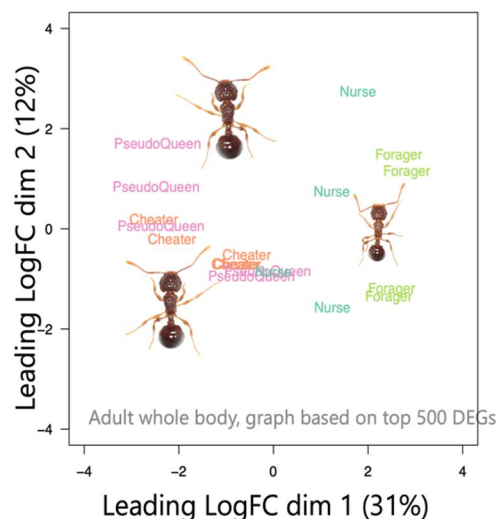
Hi-C 解析の結果、染色体(n=12)レベルの高精度なアセンブリを構築することができた(est. size = 約330Mbp, Scaffold N50 = 約20M, BUSCO score [hymenoptera\_odb10] = 95.5%)。右図はコンタクトマップ)。遺伝子アノテーションの結果、13955 遺伝子が同定された。嗅覚関連遺伝子については、社会寄生・通常両系統ともゲノム上に約400個のORs 遺伝子を有しており、ORs レパートリーに系統間での大きな違いは見られなかった。ORs のアミノ酸配列を基に最尤法による系統解析を行った結果、ORs ファミリーの1クレードであり、アリ科においてその数が拡張している9-exon-ORs 遺伝子の数に、社会寄生系統で減少している傾向が見られた(通常系



統 175 遺伝子 vs 社会寄生系統 141 遺伝子)。これは、他のアリ社会寄生種での知見と軌を一にするものである。

脳構造の系統間比較については、昆虫の嗅覚系一次中枢である触角葉における糸球体の数が寄生系統で減少している傾向が見られた。以上の結果は系統間で嗅覚処理能力に遺伝的な違いが生じている可能性を示唆している。

RNA-seq 解析では、遺伝子レベルのアノテーションに基づいて edgeR 解析を行った。MDS 解析の結果、第 1 軸に沿って繁殖能力の順 (社会寄生系統 cheater > 通常系統内勤 nurse > 通常系統外勤 forager) にクラスターが形成され (右図)、全身の遺伝子発現プロファイルは概ね成虫の繁殖状態を反映していると考えられた。興味深いことに、「女王表現型 Pseudoqueen」(通常系統から表現型可塑性によって稀に生じると考えられる、女王表現型を示す個体)のプロファイルは、社会寄生系統のそれとよく一致した。両者の形態はきわめて類似していることから、社会寄生系統は本種 (通常状態で女王階級は失われている) の祖先に存在した女王階級と共通の分子基盤を転用していることが強く支持される。社会寄生系統のみで特異的に発現変動が見られる遺伝子が 100 個前後見出され、中には複数の odorant binding protein が含まれていた。今後さらなる解析を行うための基盤情報が得られた。

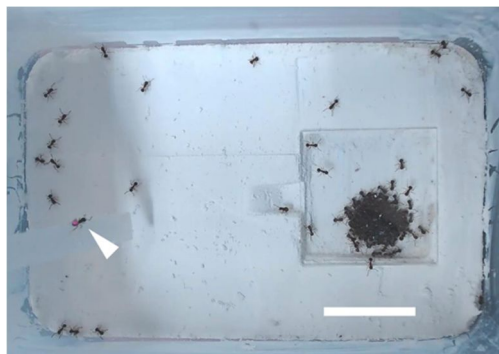


## (2) 集団ゲノム解析

dd-RADseq + 適応度データに GWAS を適用した「インダイレクトーム解析」においては、個体のアリル頻度と個体適応度が連動する SNP サイトは見つからなかった反面、コロニー平均アリル頻度と個体適応度が連動する SNP サイトが 3 つ見出された。このことは、社会性昆虫の野外集団において、コロニーレベルの階層的な自然選択が生じうることを、ゲノムレベルで示した重要な成果である。

## (3) コロニー侵入時の行動解析

行動解析 (右写真) の結果、侵入時の社会寄生系統の行動プロファイルは、通常系統の侵入時行動と有意な違いが見られないことが判明した。さらに、侵入に対峙する宿主側通常個体の行動プロファイルにも、侵入者のタイプに依存した有意な変動は検出されなかった。このことは、研究計画当初の予想であった社会寄生系統特異的な相互作用に反するものであった。むしろ種内の社会寄生系統が、通常の巣仲間識別メカニズムによって排除されることは、巣仲間識別システムが社会免疫 social immunity として有効に機能していることの証左とみなせる。なお、社会寄生系統の 24 時間後の侵入成功率は 6.7% であった。この結果は、野外集団では低い侵入成功率によって社会寄生系統の存続が実現していることを示唆している。行動解析の結果は、プレプリントサーバ bioRxiv に登録し (<https://doi.org/10.1101/2024.05.16.593084>)、報告書執筆時点で国際誌にて査読中である。



## (4) その他

COVID-19 での行動制約があった期間中は、階層性進化に関する理論研究にエフォートを割いた。社会性昆虫の協力的行動の進化を説明する理論である包括適応度理論を、他種との相互作用の進化にも拡張する (「隣縁選択」と命名) ことを試み、遺伝共分散が進化の駆動因となるさまざまな種間相互作用について、理論解析・学会発表を行った。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shimoji Hiroyuki, Dobata Shigeto	4. 巻 377
2. 論文標題 The build-up of dominance hierarchies in eusocial insects	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences	6. 最初と最後の頁 20200437
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1098/rstb.2020.0437	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 Shigenobu Shuji, Hayashi Yoshinobu, et al. (incl. Masaru K. Hojo)	4. 巻 119
2. 論文標題 Genomic and transcriptomic analyses of the subterranean termite <i>Reticulitermes speratus</i> : Gene duplication facilitates social evolution	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2110361119	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 Suzuki Ryohei H., Hanada Takumi, Hayashi Yoshinobu, Shigenobu Shuji, Maekawa Kiyoto, Hojo Masaru K.	4. 巻 32
2. 論文標題 Gene expression profiles of chemosensory genes of termite soldier and worker antennae	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Insect Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 424 - 435
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/imb.12841	査読の有無 無
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21件（うち招待講演 4件/うち国際学会 10件）

1. 発表者名 Norika Kaneda, Shigeto Dobata
2. 発表標題 Spontaneous aggregation behaviors in the ant <i>Pristomyrmex punctatus</i>
3. 学会等名 ASAB Hublet (Asia) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Norihiko Maruyama, Michael Crosscombe, Shigeto Dobata, Takashi Ikegami
2. 発表標題 Emergence of Individuality and the Self-organization of the Collective: The epsilon transducer analysis of an ant colony
3. 学会等名 AROB- ISBC- SWARM 2023 ( 国際学会 )
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shigeto Dobata
2. 発表標題 Quantifying multilevel selection in a male-free, queenless and annual ant species
3. 学会等名 IUSSI 2022: International Union for the Study of Social Insects ( 国際学会 )
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 土畑重人
2. 発表標題 被食・捕食系の生態-進化ダイナミクスにおける種間の遺伝共分散の効果
3. 学会等名 第38回個体群生態学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shigeto Dobata
2. 発表標題 Social insects as a model system of adaptive complexity
3. 学会等名 RIMS Workshop "Toward an integration of fluids, ecology, and evolution" ( 招待講演 ) ( 国際学会 )
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中康就, 土畑重人, 辻和希, 下地博之
2. 発表標題 アリのワーカーが持つ繁殖ポテンシャルがタスク選択に与える影響
3. 学会等名 第40回日本動物行動学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shigeto Dobata
2. 発表標題 Quantifying social dilemma in ant societies
3. 学会等名 ICMMA 2021 International Conference on "Emergence of Cooperation and Organization in Groups of Animals and Non-living Objects" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shigeto Dobata, Norihiro Maruyama, Itsuki Doi, and Takashi Ikegami
2. 発表標題 Emergence and collapse of frozen clusters in experimental ant ( <i>Pristomyrmex punctatus</i> ) groups
3. 学会等名 AROB-ISBC-SWARM 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 土畑重人
2. 発表標題 「超個体」はいかにして進化するのか
3. 学会等名 第69回日本生態学会大会 第26回 日本生態学会宮地賞受賞講演 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tetsu Morimoto, Masaru K. Hojo
2. 発表標題 The effects of colony size on pheromone trail foraging in an ant.
3. 学会等名 IUSSI 2022: International Union for the Study of Social Insects (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuka Ito, Masaru K. Hojo
2. 発表標題 Cognitive control in trail-following ant foragers.
3. 学会等名 IUSSI 2022: International Union for the Study of Social Insects (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tetsu Morimoto, Masaru K. Hojo,
2. 発表標題 Group size dependent nestmate recruitment in ants and its underlying mechanisms.
3. 学会等名 Animal Behavior Society 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yohei Hamaya, Yuka Funabiki, Yuka Ito, Hajime Yaguchi, Masaru K. Hojo
2. 発表標題 The role of serotonin on responsiveness to sucrose and walking activity in the ant, <i>Pristomyrmex punctatus</i>
3. 学会等名 日本比較生理生化学会大会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 Yuka Ito, Masaru K. Hojo
2. 発表標題 Selective sensory information uses in foraging ant workers.
3. 学会等名 日本比較生理生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yohei Hamaya, Yuka Funabiki, Yuka Ito, Hajime Yaguchi, Masaru K. Hojo.
2. 発表標題 Effects of trail pheromone exposure on odor learning and brain gene expression in the ant, <i>Pristomyrmex punctatus</i> .
3. 学会等名 日本比較生理生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nadhira Afiani Ramadhanty, Masaru K. Hojo
2. 発表標題 Individual and collective trail-following behavior of an ant <i>Pristomyrmex punctatus</i> .
3. 学会等名 日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森本哲, 北條賢
2. 発表標題 アミメアリの集団サイズに応じた採餌様式の調節機構
3. 学会等名 日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Norihiko Maruyama, Shigeto Dobata, Takashi Ikegami
2. 発表標題 Behavioral Analysis of Ant Colonies: Distinguishing Between Stochastic/Deterministic Modes and Global Behavior
3. 学会等名 AROB- ISBC- SWARM 2024 ( 国際学会 )
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 土畑重人
2. 発表標題 個体間相互作用が生み出す集団内異質性とその進化的帰結：社会性昆虫での事例
3. 学会等名 第71回日本生態学会大会 ( 招待講演 )
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 兼田典佳・土畑重人
2. 発表標題 拘束か誘引か：巣仲間の化学的痕跡がアリの行動に及ぼす影響
3. 学会等名 第71回日本生態学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 土畑重人・渡邊薫・永野惇
2. 発表標題 ゲノムワイドSNP情報から階層的な自然選択の遺伝基盤を定量する
3. 学会等名 日本進化学会第25回大会
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	北條 賢  (Hojo Masaru K.)  (70722122)	関西学院大学・生命環境学部・教授   (34504)	

	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	シュウ ポーウェイ  (HSU Po-Wei)		
研究 協力者	重信 秀治  (SHIGENOBU Shuji)		
研究 協力者	渡邊 英博  (WATANABE Hidehiro)		
研究 協力者	永野 惇  (NAGANO Atsushi)		
研究 協力者	渡邊 薫  (WATANABE Kaworu)		

6. 研究組織（つづき）

	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	中村 拓磨  (NAKAMURA Takuma)		
研究協力者	エコノモ エヴァン  (ECONOMO Evan)		
研究協力者	池上 高志  (IKEGAMI Takashi)		

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