

学 位 論 文 題 名

Polyethism and Reproductive Differentiation in the
Queenless Ponerine Ant *Diacamma* sp.
(Formicidae: Ponerinae)

(無女王制トゲオオハリアリ *Diacamma* sp. における
行動カースト分化と繁殖分業についての研究)

学位論文内容の要旨

社会性昆虫の多くは形態的に区別できる女王とワーカーを持つが、アシナガバチの仲間や無女王制ハリアリは、形態的に区別できるカーストを持たず、行動による繁殖分業を行っている。こうした形態カーストを欠く種は全ての巣仲間が潜在的な繁殖能力を有している点で社会性進化の初期の特徴を残しているため、“原始的眞社会性種”と呼ばれており、進化生態学的に重要なグループである。多くの場合、原始的眞社会性種は巣内でしばしば生じるつつき合い等の順位行動によってカーストを決定するため、分化のタイミングを特定することが困難である。しかし、本研究で用いた材料であるトゲオオハリアリは、メスが羽化時に“ゲマ”と呼ばれる胸部の翅芽痕を巣仲間に取り除かれるか否かによってカーストを決定するという特徴的な順位行動とカースト分化システムを持つ。行動や繁殖生理は、通常日齢によって大きく影響されるが、本種の特徴を利用して人為的に行動カーストを誘導し、正確な日齢の個体を入手できる点がカースト分化研究の材料として非常に優れている。本博士論文では行動カースト分化の生理基盤および分子基盤を明らかにするため、無女王制であるトゲオオハリアリ *Diacamma* sp. を用いて、行動カーストにおける行動学的研究、卵形成の組織学的研究および遺伝子発現に関する研究を行った。

第一章：トゲオオハリアリの行動カースト分化と卵形成の制御

本種におけるカースト分化研究の基礎として、ワーカー型女王 (gamergate) とワーカーとの間で、どのようなタイムスケジュールで、繁殖能力と行動に差が生じてくるのかを理解しておく必要がある。第一章でははじめに、行動の発達について日齢を追って観察を行い、女王運命個体 (future gamergate) は羽化後数日間にわたって巣仲間へ順位行動を示すが、羽化後7日齢でこの順位行動を行わなくなることを明らかにした。

次に繁殖能力の指標である卵巣の発達の組織学的観察を行い、女王運命個体は7日齢で卵を顕著に発達させることがわかった。一方でワーカーでは卵形成過程のいずれかのステージが停止していることが不妊化の原因であることが予想されたが、観察の結果、卵形成初期のプロセスである卵原細胞 cystoblast の分裂と卵母細胞の形成は停止しておらず、卵母細胞 oocyte の発達過程が停止することでワーカーの不妊化が引き

起こされており、卵形成後期における制御が重要であることが明らかになった。以上の結果をもとに本研究では、本種を「羽化直後」、「1日齢」、「7日齢」の3つの日齢にステージ分けして解析を進めることにした。

第二章：行動カースト分化に伴って発現する遺伝子群のスクリーニング

カースト分化に伴う行動やコミュニケーションの変化に関わる遺伝子を明らかにするため、蛍光ディフュージョン・ディスプレイ法 (FDD 法) を用いて、脳および頭部でカースト特異的に発現する遺伝子のスクリーニングを行った。FDD 法により得られた合計 31 個の候補遺伝子の中から、女王運命個体のクチクラ下上皮特異的に発現する遺伝子 (H11-2) およびワーカーの後部咽頭腺特異的に発現する遺伝子 (H9-9) を同定した。このうち上皮特異的に発現する遺伝子 (H11-2) は既知配列との相同性から、親油性物質の運搬に関わるレチノアルデヒド結合タンパクのファミリーに属する事が明らかになった。女王運命個体は妊性を他個体に示すために、体表炭化水素の組成をワーカーと異なったもの変化させる事が知られているため、この上皮特異的遺伝子は炭化水素をリガンドに持ち、体表物質によるコミュニケーションに関与することが示唆された。後部咽頭腺特異的遺伝子 (H9-9) については、配列情報から機能を推定することはできなかったが、その発現部位から、ケミカルコミュニケーションあるいは給餌に関連すると考えられた。

第三章：行動カースト分化に関与するシグナル伝達受容体の発現解析

カースト分化における行動と繁殖生理の変化には様々なシグナル伝達経路の関与が考えられる。その中で、ショウジョウバエやミツバチでの機能解析の情報をもとに、本章では攻撃性や順位の形成などに関わる神経改変物質である生体アミン、および卵形成や代謝を制御すると予想されるインスリンシグナリング経路に着目して、受容体遺伝子のクローニングと発現レベルの定量を行った。受容体遺伝子は配列の保存性からクローニングが比較的容易な上、シグナル伝達の要となっているため経路の活性化の指標となる。定量をおこなった生体アミン受容体のうちオクトパミン受容体は女王運命個体の脳で発現量の上昇が見られた。脳の各領域の中では食道下神経節と、おもに触角葉からなる領域である中大脳と後大脳でオクトパミン受容体の上昇が羽化後1日という早い段階で既に顕著であった。また、触角葉や食道下神経節でオクトパミンが作用していることから、本種のカースト分化には、女王運命個体におけるオクトパミンを介した嗅覚情報の処理能力の向上が重要な役割を果たしている事が示唆され、ゲマフェロモンの認識とゲマ切り行動の発現等、臭い刺激に誘起される攻撃行動に関与していることが考えられた。

一方で、インスリン受容体は7日齢の女王運命個体と、女王を欠くコロニーの産卵ワーカーなど繁殖個体の腹部で上昇する傾向があった。インスリン受容体は脂肪体や卵巣で発現し、卵形成に関与していると推測される。本研究は行動カーストにインスリン経路に関わる事を示唆した新たな知見であり、順位などの社会環境によってインスリン経路が制御を受け、繁殖能力の調節が行われていると考えられた。

行動レベル、組織レベルから分子レベルに及ぶ本研究は、原始的真社会性種のカースト分化の研究の中で、とりわけ詳細な繁殖制御機構と分子基盤についての知見を提供しており、行動カーストの理解に貢献できた

と考えている。行動カーストの分化には本研究で扱った因子間の相互作用や、他の多くの因子が関係している事が予想され、またカースト特異的遺伝子の機能の解析には発展の余地があるため、これらは今後の課題である。トゲオオハリアリの特殊なカースト分化システムを利用した本研究が、行動カーストの進化をもたらした制御メカニズムを解明する端緒となる事を期待している。

学位論文審査の要旨

主 査 准教授 三 浦 徹
副 査 教 授 木 村 正 人
副 査 教 授 東 正 剛

学 位 論 文 題 名

Polyethism and Reproductive Differentiation in the Queenless Ponerine Ant *Diacamma* sp. (Formicidae: Ponerinae)

(無女王制トゲオオハリアリ *Diacamma* sp. における
行動カースト分化と繁殖分業についての研究)

原始的な真社会性種は全ての巣仲間が繁殖能力を有している点で社会性進化の初期の特徴を残しており、進化生態学的に重要なグループである。しかし、順位の形成を介した行動カーストの分化メカニズムには未解明の部分が多く残されている。トゲオオハリアリは、メスが羽化時に“ゲマ”と呼ばれる胸部の翅芽痕を巣仲間に取り除かれるか否かによってカーストを決定するという特徴的な順位行動による行動カースト分化システムを持つ。本学位論文は行動カースト分化の生理基盤および分子基盤を明らかにするため、無女王制であるトゲオオハリアリ *Diacamma* sp. を用いて、行動カースト分化における行動学的研究、卵形成の組織学的研究および遺伝子発現に関する研究を行った。

まず、トゲオオハリアリにおけるカースト分化研究の基礎として、ワーカー型女王 (gamergate) とワーカーとの間で、繁殖能力と行動に差が生じてくるタイムスケジュールを決定した。攻撃性頻度の推移について日齢を追って観察を行い、予定女王 (future gamergate) は羽化後数日間にわたって巣仲間順位の行動を示すが、羽化後7日齢でこの順位行動を行わなくなることを明らかにした。次に繁殖能力の指標である卵巣の発達の組織学的観察を行い、7日齢において予定女王とワーカーの間で卵サイズの差が顕著に現れることがわかった。細胞骨格等の詳細な観察の結果、ワーカーでは卵形成初期のプロセスである卵原細胞の分裂と卵母細胞の形成は停止しておらず、卵母細胞の発達過程が停止することで不妊化が引き起こされていることを明らかにした。

第二章では、カースト分化に伴う行動やコミュニケーションの変化に関わる遺伝子を明らかにするため、脳および頭部でカースト特異的に発現する遺伝子のスクリーニングを行った。蛍光ディフレーション・ディスプレイ法により得られた合計31個の候補遺伝子の中から、女王運命個体のクチクラ下上皮特異的に発現する遺伝子 (H11-2) およびワーカーの後部咽頭腺特異的に発現する遺伝子

(H9-9)を同定した。このうち上皮特異的に発現する遺伝子(H11-2)は、親油性物質の運搬に関わるレチノアルデヒド結合タンパクのファミリーとの相同性が認められた。女王運命個体は妊性を他個体に示すために、体表炭化水素の組成をワーカーと異なったものに変化させる事が知られているため、この上皮特異的遺伝子は炭化水素をリガンドに持ち、体表物質によるコミュニケーションに関与することが示唆された。後部咽頭腺特異的遺伝子(H9-9)については、配列情報から機能を推定することはできなかったが、その発現部位から、ケミカルコミュニケーションあるいは給餌に関連すると考えられた。

第三章では行動カースト分化に関与するシグナル伝達受容体の発現解析を行った。本章では攻撃性や順位の形成などに関わる神経改変物質である生体アミン、および卵形成や代謝を制御すると予想されるインスリンシグナリング経路に着目して、受容体遺伝子のクローニングと発現レベルの定量を行った。定量をおこなった生体アミン受容体のうちオクトパミン受容体は女王運命個体の脳で発現量の上昇が見られた。脳の各領域の中では食道下神経節と、おもに触角葉からなる領域において、オクトパミン受容体の上昇が羽化後1日で生じた。また、触角葉や食道下神経節でオクトパミンが作用していることから、トゲオオハリアリのカースト分化には、女王運命個体におけるオクトパミンを介した嗅覚情報の処理能力の向上が重要な役割を果たしている事が示唆され、ゲマフェロモンの認識とゲマ切り行動の発現等、臭い刺激に誘起される攻撃行動に関与していることが考えられた。一方で、インスリン受容体は予定女王や産卵ワーカー等、繁殖個体の腹部で上昇する傾向があった。インスリン受容体は脂肪体や卵巢で発現し、卵形成に関与していると考えられた。

これまで、行動カーストは生態学的に重視される現象であるにもかかわらず、その分化過程を取り扱うことが難しかったため、カースト分化メカニズムの解明が立ちおくれていた。本研究はトゲオオハリアリの“ゲマ切り”というユニークな順位行動に着目することで、従来困難であった行動カースト分化のタイムスケジュールを設定し、行動カースト分化の分子メカニズム、組織学的メカニズムについて、新たな知見を提供した。さらに RNAi 法やアンタゴニストによる阻害など、分子の機能解析を進めることで社会行動の進化の分子レベルでの解明が期待される。審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、また、未開拓の材料や現象に挑戦する研究者としての姿勢、大学院博士課程における研鑽や単位取得をあわせ、申請者が博士(環境科学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。