

学位論文題名

# Regulatory mechanisms underlying the polyphenisms in aphids

(アブラムシの表現型多型制御メカニズム)

## 学位論文内容の要旨

生物は、外的刺激に応じて表現型を可塑的に変化させることで変動する環境に対応することができる。中でも同一の遺伝型から環境に応じて異なる表現型が生じる表現型多型は、変わりやすい環境に対して生物が編み出した巧みな適応戦略である。表現型多型の制御機構の解明は、生物全般が持つ可塑性を理解する上で必須であるが、その実体は殆ど明らかになってない。アブラムシは多様な表現型多型を示す代表的な昆虫であり、同一の遺伝型から、季節に応じて繁殖方法を切り替え(繁殖多型)、密度に応じて翅型を切り替える(翅多型)。本研究では、表現型多型のモデルとしてアブラムシの翅多型と繁殖多型に注目し、分子制御機構の解明を目指した。

第一部では、翅多型における有翅型と無翅型の運命決定機構に注目した。材料には容易かつ高頻度で有翅型の誘導が可能なソラマメヒゲナガアブラムシ *Megoura crassicauda* を用いた。多くのアブラムシでは母虫の受けた高密度刺激により子虫の翅型が有翅型になる。そこで、密度情報がどのように母虫から胚に伝わるのかを知るために、マイクロプレートを用いた有翅型誘導系を確立し、母虫への高密度処理時間を変化させて子虫の翅型を追跡した。その結果、10分間の高密度処理でも有翅型が産出されること、密度処理時間に応じて有翅型産出期間が長くなること、胚の高密度情報への感受性はクチクラ形成期まで維持されることが示された。これは、母虫内に、高密度刺激に応じて即座に生じ、ある程度の期間体内に蓄積した後、消失する密度シグナル物質が存在することが示唆され、それらがクチクラ形成期までの胚に感受されることで、胚の翅型が切り替わると予想された。従って、翅型運命決定機構の解明には、このシグナル物質の同定を目指した生理学的・分子生物学的解析が必要であると考えられた。

そこで、密度シグナル物質の候補として多くの昆虫の多型に関わる幼若ホルモン(JH)に注目した。LC-MSによって高/低密度処理下の母虫の体内JH濃度を計測したところ、密度処理間で有意な差はなかった。JH分泌阻害剤も子虫の翅型に影響を与えなかったことから、JHは翅型運命決定に関わらないと考えられる。一方、JHが有翅/無翅型の分化過程の制御に関わる可能性を調べるため、3~5齢

の有翅／無翅型でJH濃度を計測したところ、3齢の無翅型でJH濃度が高かった。また3齢の有翅型にJHを塗布すると、飛翔器官形成が阻害されたことから、JHは有翅／無翅型の後胚発生で、飛翔器官の発達制御に関わると示唆された。

次に、バッタの相変異で群生行動を引き起こすセロトニン (5HT) に注目し、高／低密度処理を行った母虫頭部の5HTレベルをHP-LCで計測した。その結果、低密度下に比べ、高密度下では5HT濃度が上昇する傾向が見られた。しかし5HTやアゴニストをインジェクションしても子虫の翅型に影響を与えなかったため、5HTが直接密度シグナル物質として機能する可能性は少ないと考えられた。

更に、翅型運命決定に関わる遺伝子群を網羅的に探索するためDifferential display法とcandidate gene approach法により、母体と胚で密度依存的に発現する遺伝子群のスクリーニングを行った。その結果、高密度下の母虫で発現が上昇する遺伝子4つ (*wingless*, *Naca*, *Uba1*と未知の遺伝子) と、胚で発現が上昇する遺伝子1つ (*ClpP*) を得た。相同性検索によりこれらの遺伝子の機能はシグナル伝達や翻訳制御などと推測され、密度情報の伝達や翅型運命決定に関わると考えられる。

第二部では、繁殖多型において繁殖様式の切り替えを担う内分泌機構に注目した。材料にはゲノムプロジェクトが完了したエンドウヒゲナガアブラムシ *Acyrtosiphon pisum* を用いた。アブラムシでは、短日条件により単為生殖から有性生殖への切り替えが誘導され、その制御にJHの関与が疑われてきた。長日／短日条件下で育った母虫の体内JH濃度をLC-MSで解析すると、短日条件の母虫でJH濃度が顕著に低かった。また、短日条件下の母虫にJHを塗布し、人為的にJH濃度を上昇させると雄の産出が遅れた。以上から日長条件による繁殖様式の切り替えはJHにより制御されると示された。次に、JH濃度の制御機構を知るため、JHシグナルに関わる遺伝子群をゲノムデータベースから同定し、長／短日条件下での発現をqRT-PCRで解析した。すると、JH分解酵素をコードする *JHE1* が短日条件で高く発現し、JH濃度と強い逆相関を示した。従って、短日条件によって上昇した *JHE1* の活性によりJH濃度が低下し、有性生殖が誘導される可能性が示唆された。

アブラムシの中には、繁殖多型を二次的に失い、短日条件下でも単為生殖のみを行う集団が多数存在する。本研究ではこのような繁殖多型の喪失をもたらした内分泌基盤の解明も試みた。日本国内で独立に繁殖多型を失った2つの系統を用い、長日／短日条件下でのJH濃度の測定や、JH合成、JH分解に関わる遺伝子の発現解析を行ったところ、短日条件に応じたJH濃度の低下や *JHE1* 遺伝子の発現上昇が見られなかった。したがって、繁殖多型の喪失の背景には、JH濃度や *JHE1* 発現の日長応答性の喪失という進化過程が存在すると示唆された。

本研究は、アブラムシの二つの表現型多型において、環境条件と発生制御をつなぐ分子生理機構の一端を明らかにした。中でもJHは翅多型と繁殖多型の制御機構の中で重要な役割を果たしており、また、表現型多型の喪失という進化過程においても重要な役割を果たしていると示唆された。今後、アブラムシのような表現型多型のモデルケースを用いて内分泌機構と発生制御機構を結ぶネットワークを詳細に

明らかにすることで、生物全般が示す可塑性の制御機構の理解が進むと期待される。

# 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 大 原 雅  
副 査 教 授 秋 元 信 一 (大学院農学研究院)

学 位 論 文 題 名

## Regulatory mechanisms underlying the polyphenisms in aphids

(アブラムシの表現型多型制御メカニズム)

生物は、外的刺激に応じて表現型を可塑的に変化させることで変動する環境に対応することができる。中でも同一の遺伝型から環境に応じて異なる表現型が生じる表現型多型は、変わりやすい環境に対して生物が編み出した巧みな適応戦略である。表現型多型の制御機構の解明は、生物全般が持つ可塑性を理解する上で必須であるが、その実体は殆ど明らかになってない。アブラムシは多様な表現型多型を示す代表的な昆虫であり、同一の遺伝型から、季節に応じて繁殖方法を切り替え（繁殖多型）、密度に応じて翅型を切り替える（翅多型）。本研究では、表現型多型のモデルとしてアブラムシの翅多型と繁殖多型に注目し、分子制御機構の解明を目指した。

第一部では、翅多型における有翅型と無翅型の運命決定機構に注目した。材料には容易かつ高頻度で有翅型の誘導が可能なソラマメヒゲナガアブラムシ *Megoura crassicauda* を用いた。多くのアブラムシでは母虫の受けた高密度刺激により子虫の翅型が有翅型になる。そこで、密度情報がどのように母虫から胚に伝わるのかを調べるために、マイクロプレートを用いた有翅型誘導系を確立し、母虫への高密度処理時間を変化させて子虫の翅型を追跡した。その結果、10 分間の高密度処理でも有翅型が産出されること、密度処理時間に応じて有翅型産出期間が長くなること、胚の高密度情報への感受性はクチクラ形成期まで維持されることが示された。これにより、母虫内に、高密度刺激に応じて即座に生じ、ある程度の期間体内に蓄積した後、消失する密度シグナル物質が存在することが示唆され、それらがクチクラ形成期までの胚に感受されることで、胚の翅型が切り替わると予想された。従って、翅型運命決定機構の解明には、このシグナル物質の同定を目指した生理学的・分子生物学的解析が必要であると考えられた。

そこで、密度シグナル物質の候補として多くの昆虫の多型に関わる幼若ホルモン (JH) に注目した。LC-MS によって高/低密度処理下の母虫の体内 JH 濃度を計測したところ、密度

処理間で有意な差はなかった。JH 分泌阻害剤も子虫の翅型に影響を与えなかったことから、JH は翅型運命決定に関わらないと考えられる。一方、JH が有翅/無翅型の分化過程の制御に関わる可能性を調べるため、3～5 齢の有翅/無翅型で JH 濃度を計測したところ、3 齢の無翅型で JH 濃度が高かった。また 3 齢の有翅型に JH を塗布すると、飛翔器官形成が阻害されたことから、JH は有翅/無翅型の後胚発生で、飛翔器官の発達制御に関わると示唆された。

次に、バッタの相変異で群生行動を引き起こすセロトニン (5HT) に注目し、高/低密度処理を行った母虫頭部の 5HT レベルを HP-LC で計測した。その結果、低密度下に比べ、高密度下では 5HT 濃度が上昇する傾向が見られた。しかし 5HT やアゴニストをインジェクションしても子虫の翅型に影響を与えなかったため、5HT が直接密度シグナル物質として機能する可能性は少ないと考えられた。

更に、翅型運命決定に関わる遺伝子群を網羅的に探索するため Differential display 法と candidate gene approach 法により、母体と胚で密度依存的に発現する遺伝子群のスクリーニングを行った。その結果、高密度下の母虫で発現が上昇する遺伝子 3 つ (*wingless*, *Nac α*, *Ubal*) と、胚で発現が上昇する遺伝子 1 つ (*ClpP*) を得た。相同性検索によりこれらの遺伝子の機能はタンパク質修飾や翻訳後制御などと推測され、密度情報の伝達や翅型運命決定に関わると考えられる。

第二部では、繁殖多型において繁殖様式の切り替えを担う内分泌機構に注目した。材料にはゲノムプロジェクトが完了したエンドウヒゲナガアブラムシ *Acyrtosiphon pisum* を用いた。アブラムシでは、短日条件により単為生殖から有性生殖への切り替えが誘導され、その制御に JH の関与が疑われてきた。長日/短日条件下で育った母虫の体内 JH 濃度を LC-MS で解析すると、短日条件の母虫で JH 濃度が顕著に低かった。また、短日条件下の母虫に JH を塗布し、人為的に JH 濃度を上昇させると雄の産出が遅れた。以上から日長条件による繁殖様式の切り替えは JH により制御されると示された。次に、JH 濃度の制御機構を知るため、JH シグナルに関わる遺伝子群をゲノムデータベースから同定し、長/短日条件下での発現を qRT-PCR で解析した。すると、JH 分解酵素をコードする *JHE* や *JHEH* が短日条件で高く発現した。従って、短日条件によって上昇した JH 分解酵素遺伝子の発現により JH 濃度が低下し、有性生殖が誘導される可能性が示唆された。

アブラムシの中には、繁殖多型を二次的に失い、短日条件下でも単為生殖のみを行う集団が多数存在する。本研究ではこのような繁殖多型の喪失をもたらした内分泌基盤の解明も試みた。日本国内で独立に繁殖多型を失った 2 つの系統を用い、長日/短日条件下での JH 濃度の測定や、JH 合成、JH 分解に関わる遺伝子の発現解析を行ったところ、短日条件に応じた JH 濃度の低下や JH 分解に関わる遺伝子の発現上昇が見られなかった。したがって、繁殖多型の喪失の背景には、JH 濃度や JH 分解酵素遺伝子発現の日長応答性の喪失という進化過程が存在すると示唆された。

本学位論文では、アブラムシの二つの表現型多型において、環境条件と発生制御をつなぐ分子生理機構の一端を明らかにした。中でも JH は翅多型と繁殖多型の制御機構の中で重要な役割を果たしており、また、表現型多型の喪失という進化過程においても重要な役割を果

たしていると示唆された。今後、アブラムシのような表現型多型のモデルケースを用いて内分泌機構と発生制御機構を結ぶネットワークを詳細に明らかにすることで、生物全般が示す可塑性の制御機構の理解が進むと期待される。審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、また、自らの興味をかき立てる生命現象の解明に多彩な手法を取り入れながら貪欲に取り組む研究姿勢、大学院博士課程における研鑽や修得単位などもあわせ、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。