



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Molecular developmental mechanisms of soldier-specific morphogenesis in a termite [an abstract of entire text]
Author(s)	杉目, 康広
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(環境科学)
Dissertation Number	甲第12669号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65553
Type	doctoral thesis
File Information	Yasuhiro_Sugime_summary.pdf



学 位 論 文 内 容 の 要 約

博士（環境科学）

氏 名 杉目 康広

学 位 論 文 題 名

Molecular developmental mechanisms of soldier-specific morphogenesis in a termite

（シロアリにおける兵隊特異的な形態形成の分子発生機構）

緒言

社会性昆虫であるシロアリは巣内での様々な役割を担うカースト間の分業によって高度な社会を築いている。各カーストへの分化は後胚発生の過程で起こり、カースト分化によって各役割に適したカースト特異的な形態変化が生じる。つまり、カースト特異的な形態形成の発生機構もまた、シロアリ社会の維持にとって重要な要素と言える。特に、巣の防衛を専門に行う兵隊カーストへの分化はシロアリの系統で独自に見られる発生経路である。兵隊カーストはシロアリがゴキブリ目から進化する過程で一回獲得されたと考えられている。すなわち、兵隊特異的な発生機構の解明は社会性の獲得に伴う兵隊カーストの進化を考察する上で重要であると考えられる。シロアリの兵隊分化はワーカー（または擬職蟻）から前兵隊、兵隊へと二度の脱皮を介して起こる。その過程における最も大きな形態的改変は前兵隊への脱皮に先立って起こり、微細な構造はその後に続く前兵隊の期間で調整される。兵隊分化は昆虫一般に脱皮や変態、生殖にとって重要な幼若ホルモン（JH）により引き起こされることが明らかになっており、JH 及び JH により活性化される因子が兵隊特異的な形態形成に関与することが推測される。本博士論文では、どのような遺伝子の発現や機能の改変が兵隊特異的な形態形成の獲得にとって重要だったかを明らかにするために、擬職蟻へと JH 類似体を投与することで人為的に兵隊分化を誘導することができるオオシロアリ *Hodotermopsis sjostedti* を用いて、組織や時期に特徴的な発生現象に対する組織形態学および分子生物学的解析を行った。具体的には、兵隊カーストの一つ前の発生段階である前兵隊の分化前、分化後それぞれの時期に着目して3つの

研究を行った。本種では、擬職蟻から分化を開始して外敵に噛み付くための大顎を含む頭部が著しく発達する。第一章では前兵隊脱皮時の大顎伸長における形態形成因子の発現および機能解析、第二章では前兵隊脱皮後の発生過程における組織形態学的な観察、第三章では第二章で発見した発生現象に対する分子生物学的解析をそれぞれ行った。

第一章：形態形成因子によるシロアリ兵隊の大顎伸長制御

形態形成因子は後生動物間で広く保存された生物の身体に位置情報を与える遺伝子群である。位置情報とは身体部位のパターン形成のことを指し、形態形成因子の発現によって未分化な細胞が将来的にどの部位を形成するかを決定する。形態形成因子の主な種類として、体節のアイデンティティを決定する **Hox** 遺伝子、胚発生期における分節化や後胚発生期における付属肢の前後軸や背腹軸を形成するセグメンテーション遺伝子、そして付属肢の遠近軸を決定する付属肢パターンニング遺伝子が挙げられる。幅広い動物種を用いた多くの先行研究は、胚発生の時期における形態形成因子の機能に着目することが多い。しかし昆虫は後胚発生で形態を劇的に変化させる事例が多いことから、この時期における形態形成因子の機能もまた重要であると考えられる。

オオシロアリの大顎は前兵隊への分化時に最も伸長し、その脱皮直前期では、前兵隊の発達した大顎は既に形成されているため、脱皮までの期間で大顎に顕著な細胞増殖が起こっていると考えられる。さらに、大顎に特徴的な伸長を実現するためには、細胞増殖に先立って大顎の位置情報を決定する遺伝子が発現すると予想される。第一章では、形態形成因子に着目し、大顎特異的な位置情報を与える遺伝子を特定するため、他の昆虫種で付属肢形成に寄与することが報告されている 17 個の形態形成因子に対して、兵隊分化過程における遺伝子の発現および機能を解析した。その結果、昆虫の付属肢において中間部の形成に寄与する *dachshund (dac)* という遺伝子が前兵隊分化前の大顎で顕著に発現していた。この遺伝子を **RNAi** 法によってノックダウンすると、大顎が比較的伸張していない前兵隊が出現した。本種を用いた先行研究では、昆虫の細胞増殖制御に関わるインスリン伝達経路 (**IIS**) が **JH** 投与後から前兵隊脱皮までに活性化して大顎が伸長することを報告している。高レベルの **JH** は大顎での **IIS** 活性化に寄与すると考えられる。しかしながら、*dac* は付属肢内部の位置情報に関係する遺伝子であるため、多くの昆虫の胚発生期において大顎のア

イデンテティを決定する遺伝子として知られている *Deformed* (*Dfd*) を加え、ホルモン経路と形態形成因子の上流下流の関係を精査した。*dac* と *Dfd* そしてホルモン受容体をそれぞれ RNAi 処理した時のこれら遺伝子の発現への影響を調べたところ、JH と IIS はいずれも上流で *dac* と *Dfd* の発現を制御することが明らかとなった。一方で *dac* と *Dfd* を阻害しても JH と IIS の受容体の発現には影響せず、また *Dfd* は上流で *dac* の発現を制御することが明らかとなった。第一章では、兵隊の大顎特異的な伸張には形態形成因子の発現による位置情報が必要であることが明らかとなり、兵隊の進化過程で Hox 遺伝子 *Dfd* がホルモンに応答して発現する機構を獲得したことが示唆された。

第二章： 前兵隊の頭部伸長に寄与するクチクラの組織形態学的解析

兵隊は必ず前兵隊という特殊な後胚発生ステージ (齢) を経て分化する。前兵隊の形態は兵隊の基本的な外部構造を示すにも関わらず、積極的な防衛行動を起こさないため、この発生段階は兵隊分化の準備期間であると考えられているが、前兵隊ステージで起こる発生現象の知見は乏しい。前兵隊の外皮を構成するクチクラは、他のカーストと異なり、色が白く硬化しておらず、伸長しやすい性質を持ち兵隊の伸長した頭部を形成するのにとって重要であると予測される。つまり、前兵隊のクチクラは伸長しやすい性質を持つことで前兵隊ステージ間に頭部が伸長すると考えた。第二章では、この予測の下、前兵隊ステージ間の頭や大顎を含む5つの部位のサイズを経時的に計測した。その結果、体の前後軸に沿った頭長だけが前兵隊脱皮後14日の間に有意に増大した。一方で、擬職蟻に脱皮した個体の頭長は脱皮後の同期間で増加しなかった。詳細な組織形態観察によって、脱皮直後の前兵隊の頭部表面構造には、頭部前側の領域を構成する *frons* に皺構造が存在し、これが脱皮後2週間かけて伸展することが明らかとなった。さらに、*frons* の断面構造を観察すると、クチクラは脱皮後7日の間に急激に肥厚し、その後薄くなる様子が観察された。これらの結果から、兵隊分化における形態形成の過程では、脱皮前後の成長パターンは部位ごとに異なることを明らかにした。また、兵隊の頭部形成には前兵隊ステージでの緩やかな成長も必要であり、前兵隊クチクラのゴムが伸びるような柔軟性がそれを可能にしていることを示唆した。さらに、前兵隊においては他カーストと異なる特殊なクチクラタンパクが用いられていることも示唆する。

第三章： 前兵隊の頭部伸長におけるクチクラタンパクの役割

昆虫のクチクラはキチンとタンパク質のポリマーで構成されており、クチクラの物理的な性質は様々な種類のクチクラタンパク (CP) の組成や硬化の程度に依存する。JH や エクダイソンといったホルモンは CP 遺伝子やクチクラの硬化に関与する遺伝子の時空間的な発現を制御する。第三章では、前兵隊の柔軟なクチクラ形成に関与する遺伝子の特定を目的とし、兵隊分化過程における頭部の CP 遺伝子の発現および機能解析を行い、さらにホルモン関連遺伝子やクチクラ硬化時に活性化する *Laccase2* (*Lac2*) の発現との相関を調べた。

また、本種を用いた先行研究では兵隊分化の過程で発現が上昇する 4 つの CP が特定されている。まずはこれら 4 つの CP に対し、他の昆虫種で明らかにされている CP との系統関係を調べた。その結果、3 つの CP (*CP1*、*CP2*、*CP4*) が CP のメジャーなドメインである *chitin-bind-4* を持つ CPR ファミリーに属し、*CP3* は CPF ファミリーに属することが明らかとなった。特に、*CP4* の持つドメインは CPR ファミリーの中でもマイナーな RR-3 というグループに属することが明らかとなった。さらに、遺伝子の発現量と機能解析の結果、*CP4* 遺伝子が前兵隊ステージに限定して発現しており、*CP4* のノックダウンによって前兵隊の頭部伸長とクチクラの肥厚が抑制されることが明らかとなった。また、ホルモン関連遺伝子の発現パターンとの比較では、エクダイソンの受容体 (*EcR*) のアイソフォーム特異的な発現が *CP4* の発現と相関することを示唆した。*Lac2* は擬職蟻の脱皮直後で高発現する一方で、前兵隊の脱皮直後はほぼ発現しなかった。以上の結果から、前兵隊に限定的な *CP4* の発現と脱皮直後における硬化の抑制が前兵隊ステージの頭部伸長を可能にするクチクラの柔軟性にとって重要であることが示唆された。CPR ファミリーは堅いクチクラに含まれる CP が持つ RR-1、柔らかいクチクラに含まれる CP が持つ *CP2*、そして *CP4* が属していた RR-3 の 3 つのサブグループに分けられる。クチクラの形質と RR-3 の関係はこれまで明らかにされていないが、第三章によって前兵隊というシロアリ目に特異的な発生段階におけるクチクラの柔軟性に寄与している可能性が示唆された。さらに、前兵隊クチクラの柔軟性は *CP4* だけではなく、*Lac2* の発現低下による硬化の抑制も関係することが示唆され、シロアリの兵隊分化過程ではこれら遺伝子の発現時期をホルモン受容体のアイソフォームによって制御していることが考察された。

結言

本博士論文では、シロアリ目に特異的な発生段階である前兵隊の脱皮前後における発生機構に着目することで、大顎発達を制御する形態形成因子や前兵隊ステージにユニークな発生現象及びそれに寄与する遺伝子とその機能を明らかにした。シロアリでは、これら遺伝子が **JH** に応答して発現する機構を獲得したことで、兵隊分化という特異な発生機構が獲得されたと考えられる。つまり、ゲノム上の発現制御領域の改変が兵隊の進化にとって重要だったということが考察された。近年、シロアリでもいくつかの種でゲノムが解読され始めている。将来的には、本論文で明らかとなった兵隊特異的な形態形成に関わるいくつかの遺伝子（第一章：*dac*、*Dfd*、第三章：*CP4*）の発現制御領域の解析やゴキブリとの比較解析を通じて、シロアリにおける兵隊の進化に対してさらなる理解の発展が期待される。