

氏名	ますおか ゆうだい 増岡 裕大
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	富理工博甲第126号
学位授与年月日	平成29年3月23日
専攻名	地球生命環境科学専攻
学位授与の要件	富山大学学位規則第3条第3項該当
学位論文題目	Evolutionary developmental studies on the role of hormone receptor signaling during termite soldier differentiation (シロアリの兵隊分化におけるホルモン受容体シグナリングに関する進化発生学的研究)
論文審査委員 (主査)	若杉 達也 清水 正明 土田 努 前川 清人

学位論文の要旨

学位論文題目 Evolutionary developmental studies on the role of hormone receptor signaling during termite soldier differentiation
(シロアリの兵隊分化におけるホルモン受容体シグナリングに関する進化発生学的研究)

地球生命環境科学専攻

氏名 増岡 裕大

Morphological and ecological novelties drive organismal evolution and diversification via opening up new adaptive zone. Molecular mechanisms underlying evolutionary novelties have been analyzed in many organisms. It has been proposed that changing of recruitment or co-option of existing gene network generates evolutionary novelty, due to little or no changes of genes, such as cis-regulatory related evolution of novelties rather than arising new genetic mechanisms. I focused on the soldier caste as evolutionary novelty that might be the trigger of social evolution and diversification of termites within the cockroach clade. I hypothesized that the co-option or recruitment of hormone (juvenile hormone (JH) and 20-hydroxyecdysone (20E)) receptor signaling might be quite important for soldier differentiation, and such a novel function for hormone signalings might drive the acquisition of soldier caste during the course of termite evolution. To clarify this hypothesis, I investigated the roles of JH and 20E hormone receptor signalings and a crosstalk of these signalings for soldier differentiation, and performed the comparative analysis of their roles among termites and cockroaches including the sister group *Cryptocercus* woodroaches.

In Part I, to investigate the role of JH signalings during soldier differentiation, I performed functional analysis of JH receptor signaling genes using RNA interference (RNAi) in the archotermopsid termite *Zootermopsis nevadensis* and closely related cockroaches. In Chapter 1, I found that highly expression levels of JH receptor gene, *Met*, just after the presoldier molt to form soldier-specific morphogenesis such as the mandibular elongation. In Chapter 2, I found that the woodroach *C. punctulatus* possessed the ability of nymphal molt induced by the JHA application. These results showed that the JH-inducible process of molting (plus specific morphogenesis in termites) could be observed in *Z. nevadensis* and *C. punctulatus*. Knockdown of *Met* affected expression levels of ecdysone synthesis genes in both species. Expression patterns of 20E signaling genes after *Met* RNAi, however, were notably different between *Z. nevadensis* and *C. punctulatus*.

In Part II, I focused on the cuticular formation to understand the role of 20E for soldier-specific morphogenesis. In Chapter 3, I found that the expression of tyrosine metabolic genes, especially highly expression levels of *Lac2*, was crucial for soldier-specific cuticular formation in the rhinotermitid termite *Reticulitermes speratus*. In Chapter 4, these functions of tyrosine metabolic genes for cuticular formation of not only soldiers but also other castes were confirmed by RNAi experiments in *Z. nevadensis*. In the presoldier molt, highly expression of

aaNAT gene, involved in the formation of colorless cuticle in other insects, was observed. On the other hand, all of the other tyrosine metabolic genes were basically highly expressed in the soldier molt. Then, in Chapter 5, based on the expression and function analysis in *Z. nevadensis*, it was shown that 20E receptor signaling was crucial for soldier-specific cuticular formation via the regulation of tyrosine metabolic gene expression. Moreover, I found that different expression timing of *EcR* was respectively involved in the regulation of molting process or soldier-specific cuticular formation.

Finally, in Part III, I performed RNA-seq analysis during soldier differentiation and worker molting process under natural conditions in *Z. nevadensis*. I found that most genes showed similar expression pattern during each molting process in spite of their huge phenotypic differences. On the other hand, there was a possibility that some highly expressed genes especially in heads were related to the caste determination during soldier differentiation. Based on the functional analysis of these genes, I concluded that the TGF β signaling was one of the most crucial pathway for a crosstalk between JH and 20E signalings required for soldier differentiation.

Recent studies proposed a general manner of molecular mechanisms underlying evolutionary novelty. Namely, co-option or recruitment of some important genes and gene networks might be involved in the evolution of some morphological novelties. Based on the results obtained above, I propose the following new scenario for molecular mechanisms of soldier evolution. First, the JH-inducible molting ability might be acquired in the common ancestor of termites and woodroaches. Second, recruitment or co-option of JH receptor signaling with the modification of downstream pathway, for example molecular relationships between JH and 20E signaling genes, might be required for soldier differentiation. Finally, the TGF β signaling pathway is one of the most important these candidates involved in the signaling activity between JH and 20E. To clearly understand the downstream termite-specific pathway, further analysis on the JH-sensitive genes in termites and woodroaches should be needed. Comparative transcriptomics using NGS technology, e.g. transcriptome analysis under the JH application in termites and woodroaches, and chromatin immunoprecipitation seq (ChIP-seq) analysis of JH receptor in termites, will be effective experimental method. These comparative genomic and physiological analyses will elucidate the evolutionary background of monophyletic group of termites in the cockroach lineage.

当博士論文審査委員会は、当該論文「Evolutionary developmental studies on the role of hormone receptor signaling during termite soldier differentiation」を詳細に査読した上で、平成 29 年 2 月 22 日（水）に学位論文発表会を公開で実施し、論文内容の口頭発表を受けて詳細な質疑応答を行った。以下に、当委員会による審査の結果を要約する。

祖先群には見られない形態および生態学的に新奇な形質の進化は、新たなニッチへの進出を可能にし、生物の多様化を促すことが提唱されている。新奇性（novelty）の進化には、新たな遺伝子の獲得よりも、既存の様々な形質の発生にかかわる遺伝子ネットワークの僅かな変化や、再配置および転用（co-option）が重要であることが、多くの生物で明らかにされてきた。いくつかの種では、新奇形質の進化を促した分子機構が明らかにされ、実際に種分化に関与したことが示された例もある。

真社会性は、複数の系統で独立に進化した社会形態であり、共通して見られる不妊カーストは新奇形質であると言える。2006 年にセイヨウミツバチ (*Apis mellifera*) のゲノムが解読されて以降、特に膜翅（ハチ・アリ）目昆虫において、不妊カーストの進化や維持の根底にある分子機構が解析されてきた。その結果、生殖カーストと不妊カーストの繁殖分業の成立には、単独性の祖先種がもつ発生生理機構（ground plan）の co-option が重要だった可能性が指摘されている。しかし、膜翅目とは独立に真社会性を獲得したシロアリ類では、ゲノムレベルでの解析例が少なく、祖先群との比較は全く行われていないため、不妊カーストの進化機構は未だに不明である。近年の系統解析により、シロアリはゴキブリ内の 1 単系統群であり、キゴキブリ (*Cryptocercus* 属) が姉妹群であることが明らかにされている。この系統関係に基づく、シロアリで見られる不妊カーストの進化は、ゴキブリのクレード内でキゴキブリの祖先群と分岐した後生じたことになる。更にシロアリでは、膜翅目と異なり、最初に獲得された不妊カーストは兵隊であると考えられている。つまり、共通祖先において、新奇形質である兵隊が獲得されたことが、その後のシロアリの進化を促したと言える。したがって、兵隊分化の分子機構の解明は、全てのシロアリの進化を理解する上で、最も重要な点である。

シロアリの兵隊は、二次的に失ったいくつかの系統を除いて、全ての種に存在する。兵隊分化には、昆虫の変態や生殖腺発達にかかわる幼若ホルモン（JH）が重要である。実際に多くの種において、職蟻への JH や JH 類似体の処理が、兵隊分化の中間段階である前兵隊への脱皮を促すことが示されている。しかし、JH の下流のシグナル伝達経路は明らかではなく、脱皮を促す分子機構は不明なままである。また、兵隊分化は二度の脱皮によって完了するため、脱皮ホルモンである 20-ヒドロキシエクダイソン（20E）も重要な働きを担うことが予想される。しかし、シロアリにおける 20E の解析例は極めて少なく、カースト分化における役割は全く不明である。仮にシロアリの兵隊の進化にも、キゴキブリ様の祖先群がもつ ground plan の co-option が重要であるなら、発生および生理変化の中核因子である JH や 20E が重要な役割をもつ可能性は高い。したがって、兵隊の進化を議論するためには、まず現生種において JH と 20E の役割と関係性を精査する必要がある。その際に、姉妹群であるキゴキブリを含む近縁群との比較解析は重要である。

そこで申請者は、本博士論文において JH と 20E の役割に注目し、シロアリがもつ新奇形質である兵隊の進化機構の解明を試みた。材料には、近年ゲノムが解読されたネバダオオシロアリ (*Zootermopsis nevadensis*) と、シロアリの姉妹群であるキゴキブリ (*Cryptocercus punctulatus*) を主に用いた。まず、シロアリの兵隊分化における JH の役割を、モデル昆虫で明らかにされた JH 関連遺伝子に注目し、キゴキブリを含む近縁のゴキブリ類との比較解析により明らかにした（第一部）。第一章では、モデル昆虫で明らかになった JH 受容体遺伝子 (*Met*) に注目し、JH シグナルの兵隊分化における役割を明らかにすることを目指した。その結果、ネバダオオシロアリの前兵隊の脱皮直前における *Met* の RNA 干渉 (RNAi) により、兵隊特異的な武器形質の発達が抑制された。第二章では、

JH 類似体を用いた脱皮の人為的な誘導実験系を利用して、*Met* および JH シグナル経路の遺伝子群の機能をシロアリとゴキブリで解析した。ネバダオオシロアリでは、*Met* および補因子 (*SRC*) の RNAi により、前兵隊分化が抑制された。しかし、*Met* の標的遺伝子として知られる *Krüppel homolog 1* (*Kr-h1*) の RNAi では、前兵隊分化に影響は見られなかった。一方キゴキブリでは、他のゴキブリ類とは異なり、JH 類似体の処理によって幼虫の加齢脱皮が誘導された。この JH 誘導性の脱皮は、*Kr-h1* の RNAi では抑制されなかったが、*Met* の RNAi で抑制された。さらに、ネバダオオシロアリとキゴキブリの両種において、*Met* の RNAi が 20E の合成経路遺伝子の発現を低下させた。しかし、20E シグナル経路の遺伝子発現への影響は種によって異なっていた。以上より、シロアリの JH 受容体の下流には、*Kr-h1* を介さない兵隊特異的な形態改変を司る新たな経路が存在する可能性が示された。この経路は、キゴキブリとは異なり、20E シグナル遺伝子の発現レベルに影響することが示唆された。

次に申請者は、20E 受容体とシグナル経路の遺伝子に注目し、兵隊特異的なクチクラ形成における各遺伝子の役割を明らかにした (第二部)。兵隊分化時には、武器形質 (大顎や頭部) のクチクラが顕著にタンニング (着色および硬化) する。一般に昆虫のクチクラのタンニングには、チロシン代謝 (TM) 経路から生じるメラニンやキノン類がかかわる。したがって、兵隊の特徴的なクチクラ形成には、TM 経路の各遺伝子の発現レベルの変化が関与する可能性がある。第三章では、自然条件下で前兵隊を比較的容易に採集できるヤマトシロアリ (*Reticulitermes speratus*) を用い、兵隊への脱皮時における TM 経路遺伝子 (*Lac2*) の発現解析を行った。その結果、兵隊脱皮前には、*Lac2* が頭部で顕著に高発現した。次に第四章では、RNAi が容易に利用可能なネバダオオシロアリを用い、*Lac2* を含む TM 経路の各遺伝子の機能解析を行った。自然条件下の兵隊分化過程の個体を用いて解析した結果、兵隊脱皮時には、*Lac2* を含むほとんどの TM 経路遺伝子が高発現した。更に *Lac2* の RNAi により、兵隊特異的なクチクラのタンニングは顕著に阻害された。第五章では、兵隊での TM 経路遺伝子の高発現が、20E に制御される可能性を検証した。ネバダオオシロアリの自然条件下の兵隊分化過程の個体を用い、20E 受容体遺伝子の RNAi を行った結果、TM 経路遺伝子の発現が抑制され、兵隊特異的なクチクラのタンニングも阻害された。以上より、兵隊特異的なクチクラの形成には、20E シグナル経路を介した TM 経路の活性化が関与することが示された。

最後に、兵隊分化時の JH と 20E のクロストークを明らかにすることを目指し、次世代シーケンサー (NGS) を用いて、兵隊分化時に働く未知の遺伝子群の特定を試みた (第三部)。第六章で申請者は、ネバダオオシロアリの自然条件下での兵隊分化過程と職蟻脱皮過程の個体を用い、NGS を用いた網羅的な遺伝子発現解析 (RNA-seq) を行った。その結果、昆虫一般に細胞増殖等にかかわる重要な経路である TGF β シグナルの遺伝子群が、前兵隊分化前に特異的に高発現する候補として特定された。JH 類似体を用いた前兵隊分化の誘導実験系を用いた機能解析により、これらの遺伝子が前兵隊を介した正常な分化過程の制御にかかわることが示された。これらの遺伝子は、JH の下流で働き、20E シグナル経路遺伝子の発現レベルを制御することで、兵隊分化に強く影響することが考察された。

本博士論文は、モデル昆虫での知見や RNA-seq により得られた候補遺伝子の機能解析により、シロアリの兵隊分化における JH および 20E シグナル経路の役割と関係性を明らかにした初めての研究成果である。特に、キゴキブリとの分子生物学的な比較解析を遂行することにより、兵隊の進化を考察する上でのブレークスルーとなる重要な知見が得られた。すなわち、キゴキブリとの分岐過程において、多面的な機能をもつ JH 受容体の下流シグナルに、20E シグナルに入力する新たな経路が獲得されたことが、シロアリの兵隊の進化に重要だった可能性を見出した。本審査論文の成果は、4 編の原著論文として国際専門誌に公表されており、関連する国際会議・シンポジウム (6 件) や国内学会大会 (8 件) において発表されている。

以上を総合して判断した結果、当審査委員会は、本申請論文が博士 (理学) の学位を授与するに十分値すると認め、合格と判定する。