

オカメコオロギ属の進化遺伝解析

Evolutionary analysis of *Loxoblemmus* spp.

阪本 百合香¹・小倉 淳^{1,2}

¹長浜バイオ大学バイオサイエンス学部アニマルバイオサイエンス学科

²長浜バイオ大学ゲノム編集研究所

Yurika Sakamoto¹, Atsushi Ogura^{1,2}

¹Department of Frontier Bio-Science, Faculty of Bio-Science, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology

²Genome Editing Research Institute, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology

要旨

コオロギは昆虫の中でも多様性と重要性に優れたグループであり、そのゲノム解析および進化遺伝解析は基礎研究と応用研究の両方に貢献する。日本における重要な在来種であるオカメコオロギ (*Loxoblemmus* spp.) の進化遺伝学的解析を行った。ミトコンドリア DNA のシーケンスから近隣結合法による系統樹を推定した。系統解析の結果、オカメコオロギの3種 (*L. campestris*, *L. sylvestris*, *L. doenitzi*) は日本列島に進出する前に種分岐し、それぞれが好む環境に拡散していったことが示唆された。

Crickets are a highly diverse and important group of insects, and their genomic and evolutionary genetic analyses contribute to both basic and applied research. Genetic and evolutionary analyses were carried out on the cockatoo cricket (*Loxoblemmus* spp.), an important native species in Japan. A phylogenetic tree was inferred from mitochondrial DNA sequences using the neighbour-joining method. The phylogenetic analysis suggested that the three species of cockatiel crickets (*L. campestris*, *L. sylvestris* and *L. doenitzi*) diverged species-wise before entering the Japanese archipelago and spread to their preferred environments.

1. 序論

1. 1 昆虫ゲノミクスの利点と課題

昆虫は地球上で最も多様で豊富な動物群を形成し、100 万種以上が記載され、550 万種が存在すると推定されている。昆虫は受粉、分解、害虫駆除など、多くの生態系で不可欠な機能を提供している。また、人間の健康、農業、バイオテクノロジーにも大きな影響を及ぼしている。したがって、昆虫の多様性、適応、進化の遺伝的基盤を明らかにすることは、基礎研究だけでなく応用研究にも非常に重要である。昆虫の遺伝学を研究する主な方法の1つは、生物の全遺伝子と制御要素をコードする DNA 分子の集合であるゲノムの配列決定である。ゲノムの配列決定により、昆虫遺伝子の起源、構造、機能、変異、さらには環境や他の生物との相互作用が解明される。しかし、昆虫ゲノムの配列決定には、昆虫ゲノムの複雑さ、多様性、サイズの大きさ、ゲノムリソースやツールの利用可能性の低さなど、多くの困難も伴う。昆虫ゲノムを同種内や種間で比較することで、昆虫の多様性、適応、進化のパターンやメカニズ

ムを理解することもできる。比較ゲノミクスでは、昆虫間で保存されているか分岐しているかしたゲノム領域や要素、また、種分化や交雑、遺伝子流動に関与する遺伝子を同定することができる。また、比較ゲノミクスは昆虫の系統関係や進化史の再構築、分岐時期や地理的分布の推定にも役立つ。昆虫ゲノムは、昆虫とその環境や他の生物（植物、動物、微生物、ヒトなど）との相互作用を反映することもできる。環境ゲノミクスでは、昆虫ゲノムが温度、湿度、光、化学物質、病原体、寄生虫、共生生物など、さまざまな生物的・非生物的要因にどのように応答するかを研究することができる。環境ゲノミクスはまた、昆虫ゲノムが個体群動態、群集構造、生態系機能などの生態学的プロセスにどのような影響を与えるか、あるいは受けるかを研究することもできる。昆虫ゲノムは、害虫駆除、バイオテクノロジー、医療など、昆虫に関連した人間の利益に役立つアプリケーションの開発や改良を促進することもできる。応用ゲノミクスは、遺伝子組み換え、遺伝子ドライブ、RNA干渉など、昆虫害虫を管理するための新しい戦略を設計し、実行することができる。応用ゲノミクスはまた、バイオセンサー、バイオ燃料、バイオマテリアルなど、昆虫の遺伝子、タンパク質、または製品がバイオテクノロジーに提供する機会を利用することもできる。さらに、薬剤開発、ワクチン開発、疾病研究など、昆虫の遺伝子、分子、あるいはモデルの特性を医学に利用することもできる。

1. 2 コオロギ研究

本研究では、このような昆虫研究の中でも、コオロギに着目した研究を展開している。コオロギに着目すべき理由として、コオロギは、昆虫の中でも比較的大型で、そのためにゲノムのサンプリングや分析が容易である。また、コオロギの生活環は簡素で、室内での飼育や実験が便利である。さらに、コオロギは、直翅目の中でも系統的に基底的な位置にあり、バッタやキリギリスなどの他の直翅目昆虫との比較により、直翅目の起源や進化を明らかにすることができる。また、コオロギは、発声や聴覚に関する神経系や感覚器官の構造や機能が非常によく研究されている。そのため、コオロギのゲノムから特定される遺伝子や制御要素は、これらの高次脳機能の分子的基盤を探る上で有用な情報源となる²⁾。

社会学的な観点では、多くの種が人間の居住地域に適応し、農作物や家屋の害虫となっている。例えば、アメリカでは、ハウスクリケットやフィールドクリケットが農業被害や家屋侵入の原因となっている。コオロギのゲノムを決定することで、これらの害虫の発生パターンや管理方法を改善することができる。また、コオロギは、人間の食用や飼料用に栽培される可能性が高い昆虫の一つであり、その栄養価や安全性を評価するためにもゲノム情報が必要である。以上の理由から、コオロギは昆虫研究の中でも重要な対象として注目されており、そのゲノム解読は昆虫学の発展に大きく貢献すると考えられる。生物種としてコオロギは、バッタ、イナゴ、キリギリスなどを含む直翅目に属する 900 種以上の昆虫の通称である。コオロギは世界中に広く分布し、多様な生息地、行動、生活様式を持っている。コオロギはまた、多くの動物や人間にとって重要な食料源であり、昆虫の発生、生理学、神経科学、進化を研究するためのモデル生物でもある。したがって、コオロギのゲノムを決定することは、基礎研究と応用研究の双方にとって重要な意味を持つ。

本研究では、コオロギのゲノム解析に先立ち、日本における重要な在来種であるオカメコオロギの進化遺伝学的解析を実施した。

コオロギの進化遺伝解析とは、コオロギのゲノムや分子マーカーを用いて、種の起源、系統関係、遺伝的多様性、適応のメカニズムなどを明らかにする研究である。昆虫ゲノムの進化に関する理解を深め

るためには、核ゲノムとミトコンドリアゲノムの研究をより統合する必要がある³⁾。

1. 3 オカメコオロギについて

オカメコオロギ(*Loxoblemmus spp.*)は、コオロギ目コオロギ科コオロギ亜科に属するコオロギ属で、主にアジアに分布し、アフリカやオーストラリアにも生息する。オカメコオロギは、細長い頭部、細長い体、長い触角と脚を持つ特徴的な形態を持っている。ほとんどが夜行性で雑食性、植物や動物を捕食する。また、前翅をこすり合わせることで大きな声でリズムカルに鳴き、コミュニケーションや交尾に使われる。オカメコオロギは、分類学、系統学、生物地理学、生態学、行動学などで研究されているが、その生態や進化についてはまだ不明な点が多い。日本に生息するコオロギとして、エンマコオロギ (*Teleogryllus emma*)、ミツカドコオロギ (*Loxoblemmus doenitzi*)、ツツレサセコオロギ (*Velarifictorus micado*)、オカメコオロギ (*Loxoblemmus*)が代表的な種類として挙げられる⁴⁾。iNaturalistのデータ (<https://x.gd/X5wnC>)によると、その中でも最も見られるのが *Loxoblemmus* である。

Loxoblemmus では6種類のコオロギが存在し、開けた草地や住宅街に生息するハラオカメコオロギ (*Loxoblemmus campestris*)、林内や山間部に生息するモリオカメコオロギ (*Loxoblemmus sylvestris*)、北日本といった湿った草地に生息するタンボオカメコオロギ (*Loxoblemmus aomoriensis*)、対馬に生息するツシマオカメコオロギ (*Loxoblemmus tsushimensis*)、南西諸島に生息するネッタオカメコオロギ (*Loxoblemmus equestris*)、本州に極めて局所的に生息するオオオカメコオロギ (*Loxoblemmus magnatus*)がいる。その中でも *L. campestris* と *L. sylvestris* は基本的に生息地が異なるにも関わらず、外見の特徴は大きく変わらない。現状、同定するには、胸や腹の模様が異なるということしか言われておらず、その他の遺伝的な特徴は明らかとなっていない。他のコオロギでは研究が行われているにも関わらず、日本の *L. campestris* と *L. sylvestris* は遺伝子レベルの研究が少なく、遺伝的な特徴は明らかになっていない。そのため、コオロギの大量生産に日本も貢献するためには、日本の中でも特に見られると言われている *L. campestris* と *L. sylvestris* の育種を進めることが重要だと考えられる。そのため、本研究では *L. campestris* と *L. sylvestris* の遺伝情報基盤を確立することを目的とし、進化遺伝解析を行った。

2. オカメコオロギ進化遺伝解析とその手法

オカメコオロギに関しては、下表のように、本州の生息域で採取された *L. campestris*、*L. sylvestris*、*L. doenitzi* を扱った。サンプル番号 L01 から L20 の 20 個体は系統多様性解析に、サンプル番号 L14 と C349、C364、C365 の 3 個体をハイブリッドアセンブリによるゲノム解析に用いた⁵⁾。また、これらの *Loxoblemmus* を採取した後、本学の飼育施設にて約 25°C を保った室内で飼育した。採取された後のコオロギは小型タッパーにそれぞれ取り分け、水分だけ与えて 1 日絶食を行った。NucleoSpin DNA Insect kit を用いてそれぞれ足のサンプルを用いて DNA 抽出を行った。この時、個体の大きさを考慮して *L. campestris*、*L. sylvestris* は両足、*L. doenitzi* は片足を用いた。チューブ内で粉碎した後、Elution Buffer BE (BE) 100uL、Lysis Buffer MG 40uL、Liquid Proteinase K 10uL を加え、混ぜて遠心、その後上清に Wash Buffer BW 500uL を加えて 30 秒遠心の作業を 2 回繰り返した。その後、フロースルーを捨て、乾燥させた後に 60uL BE を加え、DNA を 50 μ L 抽出した。その後、シーケンスを行った。

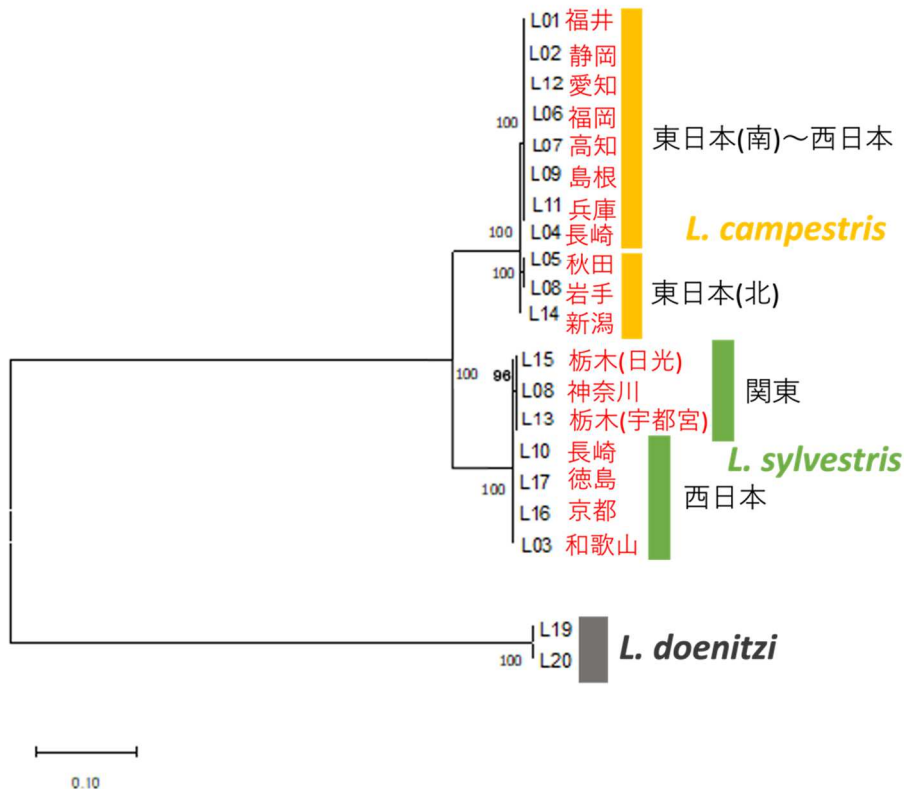
サンプル番号	種名	採取地	性別	Short or Long
L01	<i>L. campestris</i>	福井	♀	Short
L02	<i>L. campestris</i>	静岡	♀	Short
L03	<i>L. sylvestris</i>	京都	♀	Short
L04	<i>L. campestris</i>	長崎	♀	Short
L05	<i>L. campestris</i>	秋田	♀	Short
L06	<i>L. campestris</i>	福岡	♀	Short
L07	<i>L. campestris</i>	高知	♀	Short
L08	<i>L. campestris</i>	岩手	♀	Short
L09	<i>L. campestris</i>	兵庫	♀	Short
L10	<i>L. sylvestris</i>	和歌山	♀	Short
L11	<i>L. campestris</i>	島根	♀	Short
L12	<i>L. campestris</i>	愛知	♀	Short
L13	<i>L. sylvestris</i>	栃木 (宇都宮)	♀	Short
L14	<i>L. campestris</i>	新潟	♀	Short
L15	<i>L. sylvestris</i>	栃木 (日光)	♀	Short
L16	<i>L. sylvestris</i>	徳島	♀	Short
L17	<i>L. sylvestris</i>	長崎	♀	Short
L18	<i>L. sylvestris</i>	神奈川	♀	Short
L19	<i>L. doenitzi</i>	徳島	♀	Short
L20	<i>L. doenitzi</i>	福島	♂	Short
C349	<i>L. campestris</i>	福井	♀	Long
C364	<i>L. campestris</i>	滋賀	♀	Long
C365	<i>L. campestris</i>	静岡	♀	Long

分子系統解析の手法として、本研究では以下の流れで行った。まず、ショートリードシーケンスから得られた *L. campestris*、*L. sylvestris*、*L. doenitzi* の3種のゲノム配列を用いて、ミトコンドリアゲノムアセンブリを行った。得られた配列に対して、最尤系統樹推定を行った。ミトコンドリアゲノムのアセンブリには、GetOrganelleを使用した⁶⁾。GetOrganelleは、ショートリードシーケンスからミトコンドリアや葉緑体などの細胞小器官のゲノム配列を高速に抽出するツールである。ショートリードから de Bruijn グラフを構築する。次に、プラスチド特異的な K-mer を用いて、de Bruijn グラフ上でプラスチドパスを探索する。最後に、プラスチドパスの延長と丸めにより、プラスチドゲノムのコンティグを得る。この手法により、*L. campestris*、*L. sylvestris*、*L. doenitzi* のミトコンドリアゲノムのサイズはそれぞれ約 16 kb, 17 kb, 18 kb と推定された。

3. 結果

3. 1 系統解析

Getorganelle(v3,29)にて得られた mtDNA から D-loop 領域を用いた系統解析の結果は図に示す通りであった。この系統樹から *L. campestris* と *L. sylvestris* の分岐は *L. doenitzi* と比べると最近ではあるものの、日本列島において種分岐の後に拡散していったことがわかった。これにより、種間で東日本、西日本といった地理的隔離が生じたと考えた。



4. 考察

L. campestris と *L. sylvestris* の分岐が種内分岐に先行していることが系統解析から明らかになり、この二種はそれぞれ別の方向に日本各地に広がり、地域的に孤立した可能性が高い。種分化は日本列島への到達よりも前に発生し、それぞれが異なる環境に適応していったと推測される。

このようなコオロギの遺伝的進化の研究は、その多様性や保全に関する重要な情報を与えるだけでなく、昆虫の進化や生物地理学の認識を高めることにも寄与する。コオロギの系統樹や種分化のメカニズムに関する研究は、ミトコンドリア DNA や核 DNA の一部を用いたものがいくつかあるが、それらは限定的な領域やマーカーに頼っており、コオロギの遺伝的進化の全体像を描くには不十分である。最近の次世代シーケンサーの進歩により、コオロギのゲノム情報を得ることができるようになり、コオロギの遺伝的進化をより詳細に解析することが可能になった。

参考文献

- 1) Li, F., Zhao, X., Li, M., He, K., Huang, C., Zhou, Y., ... & Walters, J. R. (2019). Insect genomes: progress and challenges. *Insect molecular biology*, 28(6), 739-758.
- Huber, F., Moore, T. E., & Loher, W. (Eds.). (2019). *Cricket behavior and neurobiology*. Cornell University Press.
- 2) Cameron, S. L. (2014). Insect mitochondrial genomics: implications for evolution and phylogeny. *Annual review of entomology*, 59, 95-117.
- 3) Takeda K, Hozumi H, Nakai K, Yoshizawa M, Satoh H, **Yamamoto H**, Shibahara S., Insertion of long interspersed element-1 in the Mitf gene is associated with altered neurobehavior of the black-eyed white Mitf(mi-bw) mouse., **Genes Cells**. 19, 126-140, (2014).
- 4) Yeh, W. B., Chang, Y. L., Lin, C. H., Wu, F. S., & Yang, J. T. (2004). Genetic differentiation of *Loxoblemmus appendicularis* complex (Orthoptera: Gryllidae): speciation through vicariant and glaciation events. *Annals of the Entomological society of America*, 97(4), 613-623.
- 5) Zimin, A. V., Puiu, D., Luo, M. C., Zhu, T., Koren, S., Marçais, G., ... & Salzberg, S. L. (2017). Hybrid assembly of the large and highly repetitive genome of *Aegilops tauschii*, a progenitor of bread wheat, with the MaSuRCA mega-reads algorithm. *Genome research*, 27(5), 787-792.
- 6) Jin, J. J., Yu, W. B., Yang, J. B., Song, Y., DePamphilis, C. W., Yi, T. S., & Li, D. Z. (2020). GetOrganelle: a fast and versatile toolkit for accurate de novo assembly of organelle genomes. *Genome biology*, 21, 1-31.