

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14893

研究課題名(和文)ボルバキアによる雄殺しの分子機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of how Wolbachia accomplishes the male-specific killing

研究代表者

勝間 進 (Katsuma, Susumu)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：20378863

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：共生細菌であるボルバキアは、宿主である昆虫の性を操作することが知られている。本研究では、チョウ目昆虫であるアワノメイガを用いて、ボルバキアによる「雄殺し」現象の分子メカニズムの解明を試みた。RNA-seq解析の結果、遺伝子量補償とオス化の二役を担う遺伝子であるMascのmRNA量がボルバキア感染胚子において低下していること、および遺伝子量補償が破綻していることが判明した。さらに、Masc cRNAのインジェクション実験により、Masc mRNA量の低下が「雄殺し」の原因であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Wolbachia is an endosymbiotic bacterium that infects a wide range of insect species. Infection of *Ostrinia furnacalis* by Wolbachia causes the production of all-female progeny. In the present study, we performed RNA-seq analysis of Wolbachia-infected and Wolbachia-uninfected *Ostrinia* embryos and revealed that Wolbachia infection markedly reduces the mRNA level of Masc, a gene that encodes a protein required for both masculinization and dosage compensation. Further bioinformatic analysis elucidated that dosage compensation of Z-linked genes fails in Wolbachia-infected *Ostrinia* embryos. In addition, injection of Masc cRNA into Wolbachia-infected embryos rescued male progeny. These results show that Wolbachia-induced male-killing is caused by a failure of dosage compensation via repression of the mRNA level of the host masculinizing gene Masc.

研究分野：昆虫分子生物学・病理学

キーワード：ボルバキア 遺伝子量補償 性決定 性操作 宿主制御 チョウ目昆虫 トランスクリプトーム 共生細菌

1. 研究開始当初の背景

微生物による宿主操作は、自然界ではよく見られる現象である。昆虫においても、バキュロウイルスやハリガネムシによる行動制御をはじめとして、多くの例が報告されている。しかし、それらの仕組みが分子レベルで解明された例はほとんどない。節足動物に感染する共生細菌の1種であるボルバキアは、細胞質不和合、雌の雄化、単為生殖化、および雄殺しにより宿主昆虫の性を操作する。例えば、アズキやホップの害虫であるアズキノメイガは、ボルバキアに感染すると雄が幼虫期の初期に致死する(雄殺し)ことが知られている(Sugimoto and Ishikawa, Biol. Lett., 2012)。多くの生物学者が、このボルバキアによる性操作のメカニズムの解明に取り組んできたが、ヒントがほとんどなかったため、難航していた。

我々のグループは、2014年にカイコの性決定カスケードの最上位システムを解明した(Kiuchi et al., Nature, 2014)。カイコの雌では、雌性決定染色体であるW染色体から産生されるメス特異的PIWI-interacting RNA(piRNA)とPIWIタンパク質の複合体が、Z染色体から発現する雄化遺伝子*Masc*のmRNAを切断することで、雄化できず結果として雌になる。これはチョウ目昆虫において性決定メカニズムを明らかにした初めての例であるとともに、性決定最上位遺伝子が小分子RNAである生物を発見した初めての報告でもある。一方、その研究過程で、*Masc*タンパク質が遺伝子量補正と雄化の両方を担う分子であることも明らかになった。さらに、*Masc* mRNAを初期胚でノックダウンすると、雄特異的胚致死をもたらすことも判明した。これは雄において遺伝子量補正が失敗した結果もたらされた死であると考えられるが、表現型としてはアズキノメイガが引き起こす「雄殺し」と酷似していた(Kiuchi et al., Nature, 2014)。

2. 研究の目的

微生物による宿主操作は、自然界ではよく見られる現象である。細菌の一種であるボルバキアは、宿主昆虫の性分化や生殖システムを操作することが知られているが、その分子メカニズムはほとんど解明されていない。我々は、カイコを用いた研究で、初期胚における遺伝子量補正システムを破壊すると雄特異的胚致死が引き起こされることを発見した。我々はこの現象が、ボルバキアに感染したオストリニア属昆虫が引き起こす「雄殺し」のフェノコピーであると考えている。すなわち、ボルバキアは自身の遺伝子を用いて、宿主の遺伝子量補正カスケードをハイジャックし、そのシステムを破壊することで「雄殺し」を達成しているのではないだろうか。本研究は、「雄殺し」を行う*Ostrinia*属昆虫を材料として、ボルバキアの性操作と宿主の遺伝子量補

正の関係を分子レベルで明らかにすることを目的とするものである。

3. 研究の方法

(1)メスバイアスを示すアワノメイガの採集および累代飼育

野外から採集したアワノメイガ類をフェロモン分析等で分類する。雄殺しやメスバイアスを示すものに関しては、PCRや抗生物質処理などによりメスバイアスが消失するかを検討することにより、共生細菌が原因かどうかを調査する。ボルバキア非感染個体も系統化し、ボルバキア感染個体との比較や、ボルバキア感染系統の維持に利用する。飼育は人工飼料育にて行う。

(2)アワノメイガの雌雄鑑別

アワノメイガの遺伝的性は、ゲノムDNAを用いた定量PCRにより、Z染色体と常染色体の遺伝子数を比較することで行う。性分化マーカーとしては、RT-PCRにより*doublesex*のスプライシングパターンを調査することで実施する。カイコで確立した方法(Kiuchi et al., Nature, 2014)により、RNAとゲノムDNAを同時に抽出する。

(3)ボルバキア感染胚子における宿主遺伝子の発現解析

ボルバキア感染・非感染アワノメイガ胚子(産下0, 12, 24, 36, 48時間)由来poly(A)+RNAを用いたRNA-seq解析により、宿主遺伝子の発現を調査する。遺伝子量補償については、カイコとのシンテニーを利用し、それぞれの遺伝子が属する染色体を予測して解析を行う。

(4)アワノメイガ*Masc*のクローニングと培養細胞を用いた機能解析

RNA-seqデータから、アワノメイガ*Masc*(*OfMasc*)の配列を取得し、RACE法でUTRを含めた全長をクローニングする。コーディング領域を昆虫細胞発現用ベクターにクローニングし、カイコ卵巣由来の培養細胞であるBmN-4に導入する。カイコ*doublesex*(*Bmdsx*)のスプライシングパターン、およびカイコ*insulin-like growth factor II mRNA binding protein*(*BmIMP*)のオス型バリエーションの発現量を調査することで、*OfMasc*タンパク質のオス化能を評価する。

(5)ボルバキア感染胚子におけるボルバキア遺伝子の発現解析

上記のpoly(A)+RNAを用いたRNA-seq解析では、ボルバキア由来のトランスクリプトを抽出できない。ボルバキア感染・非感染アワノメイガ胚子由来RNAをRibo-zeroで処理し、RNA-seq解析に供することで、ボルバキア遺伝子の発現を調査する。この際、ネガティブコントロールとして、抗生物質処理した母蛾から得られた胚子もRNA-seqに供する。

(6)アワノメイガ胚子への cRNA インジェクション

Masc の遺伝子量補償への関与を調査するため、プラスミドにクローニングした *OfMasc* を鋳型として人工的に *OfMasc* cRNA を合成し、オス殺しボルバキアが感染したアワノメイガ胚子にインジェクションする。孵化幼虫の遺伝的な性をゲノム DNA を用いた定量 PCR によって調査し、オス殺しがレスキューされているかどうかを検討する。

4. 研究成果

ボルバキア感染・非感染アワノメイガ胚子を用いて、poly(A)+ mRNA を用いたトランスクリプトーム解析を行った。その結果、カイコにおいて遺伝子量補償を司る *Masc* 遺伝子のアワノメイガオーソログ (*OfMasc*) を同定し、その発現がボルバキア感染によって顕著に低下していることを見出した。この発現低下は、定量 RT-PCR によっても確認された。

OfMasc のオス化能を評価するために、*OfMasc* を組み込んだ発現ベクターをカイコ BmN-4 細胞にトランスフェクションによって導入した。BmN-4 細胞は卵巣由来の細胞であるため、*Bmdsx* はメス型スプラシングを示し、オス型 *BmIMP* の発現はほとんど検出されない。*OfMasc* を導入した BmN-4 細胞では、ポジティブコントロールとして用いたカイコ *Masc* と同様、オス型 *Bmdsx*, *BmIMP* の発現が認められた。この結果は、*OfMasc* タンパク質がオス化能を持つことを強く示唆するものである。

一方、詳細なインフォマティクス解析の結果、「オス殺し」ボルバキアに感染しているアワノメイガ胚子では、Z 染色体の遺伝子の発現が産下 24 時間から上昇していることが分かった。常染色体の遺伝子ではこのような上昇が見られなかったことから、この結果はボルバキア感染胚子における遺伝子量補償の破綻を示していると考えられた。また、ボルバキア感染胚子に人工的に合成した *OfMasc* cRNA をインジェクションし、孵化幼虫の遺伝的な性を調査した。その結果、コントロール cRNA (*GFP* cRNA) をインジェクションした卵塊からはメスのみが孵化したが、*OfMasc* cRNA をインジェクションした卵塊からはオスも孵化することが分かった。すなわち、*OfMasc* cRNA のインジェクションはボルバキアによるオス殺しを (部分的に) レスキューしていると考えられた。

以上の結果から、「オス殺し」ボルバキアが感染したアワノメイガ胚子においては、*Masc* mRNA 量が低下し、その結果としてオス胚子における遺伝子量補償が破綻することで致死に至ることが考えられた。一方、培養細胞を用いた実験、cRNA インジェクションの結

果から、アワノメイガ *Masc* オーソログである *OfMasc* はカイコ *Masc* と同様、オス化と遺伝子量補償の二役を担うタンパク質をコードすると考えられた。

ボルバキア感染アワノメイガ胚子において発現しているボルバキア遺伝子を同定するため、ボルバキア感染・非感染アワノメイガ胚子 RNA を Ribo-zero で処理し、RNA-seq に供した。その結果、性操作時に発現していると考えられるボルバキア遺伝子群を同定することに成功した。一方、野外で採集したアズキノメイガから次代がメスに偏る「メスバイアス系統」を見出した。PCR や抗生物質処理実験から、このメスバイアス現象は共生細菌によるものではなく、遺伝的要因によるものであることが判明した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Takahiro Fukui, Munetaka Kawamoto, Keisuke Shoji, Takashi Kiuchi, Sumio Sugano, Toru Shimada, Yutaka Suzuki, Susumu Katsuma, PLoS Pathogens, 査読あり, 11 巻, 2015,e1005048

[学会発表] (計 4 件)

- ① 福井崇弘、濱中陽子、川本宗孝、庄司佳祐、木内隆史、菅野純夫、嶋田透、鈴木稔、勝間進、共生細菌 *Wolbachia* が持つオス殺し因子の探索、平成 29 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会、2017 年 3 月 21 日-22 日、農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター (茨城県・つくば市)
- ② 濱中陽子、福井崇弘、藤井毅、石川幸男、嶋田透、勝間進、愛知県犬山市産の *Ostrinia* 属における共生細菌によらない性比異常現象、第 61 回日本応用動物昆虫学会大会、2017 年 3 月 27 日-29 日、東京農工大学小金井キャンパス (東京都・小金井市)
- ③ Yoko Hamanaka, Takahiro Fukui, Keisuke Shoji, Munetaka Kawamoto, Takashi Kiuchi, Sumio Sugano, Toru Shimada, Yutaka Suzuki, Susumu Katsuma, Transcriptome analysis of *Ostrinia furnacalis* early embryos infected with a male-killing *Wolbachia*, The 5th Asia-Pacific Congress of Sericulture and Insect Biotechnology, February 28 - March 2, 2017, Maruay Garden Hotel 「バンコク (タイ)」

- ④ 福井崇弘、川本宗孝、庄司佳祐、木内隆史、菅野純夫、嶋田透、鈴木穰、勝間進、共生細菌 *Wolbachia* は、宿主の遺伝子量補償システムを標的としてオス殺しを引き起こす、第 75 回昆虫病理研究会、2015 年 9 月 25 日、北海道大学農学部(北海道・札幌市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

論文発表のプレスリリース

・共生細菌ヴォルバキアの「オス殺し」は宿主昆虫のオス化因子の発現を抑制することで達成される

<http://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/2015/20150715-1.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

勝間 進 (KATSUMA, Susumu)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：20378863

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()