

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2010

課題番号：19380032

研究課題名(和文) 細胞内共生 *Cardinium* 細菌の普遍的分布と免疫応答研究課題名(英文) Relationship between prevalence of a bacterial endosymbiont, *Cardinium*, and host immune response

研究代表者

後藤 哲雄 (GOTOH TETSUO)

茨城大学・農学部・教授

研究者番号：60178449

研究成果の概要(和文)：

多くの節足動物に寄生している体内共生微生物 *Cardinium* と *Wolbachia* は、宿主の性を操作して細胞質不和合性、単為生殖、雄殺し、そして遺伝的雄の機能的雌化を誘導することが知られている。本研究では、調査したハダニ類 12 属 47 種 218 個体群のうち、*Cardinium* 感染が 18 種(38.3%)、*Wolbachia* 感染が 17 種(36.2%)で観察され、*Cardinium* への感染率がやや高かった。*Cardinium* は宿主の免疫応答遺伝子発現を誘導する一方、*Wolbachia* は誘導しないが、その原因は細菌の細胞壁構造の違いによることを明らかにした。また、宿主に免疫応答遺伝子を強く発現させる *Cardinium* が、発現させない *Wolbachia* と同様に多くの宿主に寄生している要因を検討した。カイコ培養細胞中では *Wolbachia* の増殖率が 72 時間で 2 倍に達するのに対して、*Cardinium* のそれは低く、細菌の増殖率が感染性の違いに何らかの作用を及ぼしている可能性を示すことはできなかった。

Cardinium と *Wolbachia* に二重感染していた種は、調査した 47 種中 5 種(10.6%)であった。このうち、細胞質不和合性が認められた 2 種 2 個体群について、*Cardinium* と *Wolbachia* が宿主の性操作に相互に関与しあっているかどうかを検討した。その結果、*Cardinium* と *Wolbachia* に二重感染している個体群における細胞質不和合性は、いずれも *Wolbachia* による単独の作用であり、*Cardinium* は *Wolbachia* の作用に対して抑制的にも昂進的にも関与していないことが分かった。つまり、相互作用については、さらなる検討が必要であるものの、両細菌は宿主に対して独立に作用しているものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：

Cardinium and *Wolbachia* bacteria are intracellular symbionts in many arthropods. Both bacteria cause reproductive alterations to their hosts, such as cytoplasmic incompatibility, parthenogenesis, feminization and male killing. Of 47 spider mite species tested here, 38.3% (18 species) were infected with *Cardinium* and 36.2% (17 species) were infected with *Wolbachia*. *Cardinium* infection induced many immune-related genes, including antimicrobial peptides, pattern recognition receptors and a serine protease, whereas *Wolbachia* infection did not alter gene expression, i.e., *Wolbachia* neither induced nor suppressed immune responses of their hosts. The different cell wall structures between both bacteria are possibly responsible for the different immune responses. In Bm-aff3 silkworm cell cultures, *Wolbachia* proliferated faster than *Cardinium*, suggesting that proliferation rate has no relation with infection rates.

Double infection by *Cardinium* and *Wolbachia* was found in 5 out of 47 spider mite species (10.6%) tested in this study. To clarify the effect of both bacteria on the reproductive alterations of the infected spider mites, 16 cross combinations were carried out for two species, which harbored both *Cardinium* and *Wolbachia*. Co-infection by the two bacteria turned out to induce cytoplasmic incompatibility, and *Wolbachia* only was responsible for the cytoplasmic incompatibility. *Cardinium* seemed to have no effect on the *Wolbachia*-mediated reproductive incompatibility, suggesting that both bacteria independently affect on the reproduction of their hosts. However, the possibility of interaction between the two bacteria remains to be tested further.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2008年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
年度	0	0	0
総計	15,500,000	4,650,000	20,150,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：細胞内共生細菌・*Cardinium*・*Wolbachia*・マイクロアレイ・細胞質不和合性・抗菌タンパク質・免疫応答

1. 研究開始当初の背景

節足動物の各グループに広く感染している非病原性の体内共生微生物 *Wolbachia* や *Cardinium* は、母親の卵巣を通じて子孫に伝わり、宿主の性に様々な作用（細胞質不和合性、産雌単為生殖の誘導、遺伝的雄の機能的雌化、雄殺し）を引き起こす細菌である。これらの細菌は、昆虫、等脚類、ハダニ、カブリダニなどに感染している。*Wolbachia* と *Cardinium* は互いにかかなり遠縁の細菌であるが、共に節足動物の性を操ることが知られている (O'Neill et al., 1997; Weeks & Breeuwer, 2003)。これら 2 つの共生微生物に最も一般的な現象は、細胞質不和合性の誘導であり、感染雄と非感染雌との交配で生殖不和合性が起こり、倍数倍数性では子孫が出現せず、半数倍数性では雌子孫が出現しない。世界中の多くの研究機関が取り組んでいる *Wolbachia* の研究に比べ、*Cardinium* に関して活発な研究活動を行っている研究機関は世界で 5 箇所しかなく、未だ萌芽期分野である。*Wolbachia* の感染率は、77.4–16.7% (1 つを除いて 30%以下; Werren et al., 1995; West et al., 1998; Jiggins et al., 2001; Jeyaprakash & Hoy, 2000; Gotoh et al., 2003)、*Cardinium* では 31.6–7.1%(Weeks et al., 2003; Zchori-Fein & Perlman, 2004)であり、両者の感染率には大きな違いはない。ところが、申請者らの調査では、ハダニに対する *Cardinium* の感染率は 86.7%(26/30 系統)に達している。さらに、4 組のプライマーを使って感染の有無を検出したところ、4 組とも陽性になるケースは 46.7%に過ぎず、これまでに発表されているプライマーでは 40%の誤陰性が発生した (13.3%はすべてのプライマーで陰性)。これらのプライマーは 16S rDNA の配列に基づいて設計したものであるが、*Cardinium* の検出に関して十分ではない。つまり、近縁の CFB グ

ループの細菌と *Cardinium* を完全に識別できていない可能性がある。したがって、1 組のプライマーによって報告された過去の感染率は、誤判定の可能性を秘めている。*Cardinium* に関しては、信頼に足りうる複数のプライマーの設計が必要である。

オリゴマイクロアレイ法*による調査では、*Wolbachia* は宿主の免疫応答遺伝子を全く活性化しない (Fytro et al., 2006; Nakamura et al., 2011) 一方、*Cardinium* は少なくとも 13 の抗菌ペプチドやパターン認識タンパク質などの免疫応答遺伝子を活性化しており、虫体内では宿主の免疫機構によって攻撃されている可能性がある(*約 16,000 個の遺伝子を載せたカイコマイクロアレイ)。しかし、*Cardinium* は、宿主体内で増殖し次世代に伝わる。どのように宿主の免疫反応を回避しているのか、あるいは免疫反応に耐えているのかは不明である。そして、現在までの調査でダニ類には *Cardinium* 感染個体や感染種が、*Wolbachia* 感染種より多いことが判っている。昆虫やダニで *Wolbachia* とともに広く感染している *Cardinium* の感染・共生の機構の解明は、昆虫細胞内共生の理解を深めるだけでなく、今後細胞質不和合性の利用などの観点からも重要な課題である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、最近見つかった細胞内共生微生物 *Cardinium* 細菌と長年研究されてきている *Wolbachia* 細菌の比較を二つの点から行うことである。つまり、(1) 節足動物の性を操る体内共生微生物 *Cardinium* が宿主の免疫応答に係わる遺伝子を活性化し、*Wolbachia* が活性化しない原因を解明し、免疫応答遺伝子を活性化する *Cardinium* が活性化しない *Wolbachia* より多くのハダニに寄生できる要因を検討すること、および (2)

Cardinium と *Wolbachia* が共にハダニで細胞質不和合性を引き起こし、ハダニの系統によっては不和合性を起こす場合と起こさない場合がある。これらが両細菌によって共通の基盤のもとに起こっているのかどうか(相互作用しているかどうか)を明らかにすること、である。

3. 研究の方法

(1) *Cardinium* 特異的プライマーの作製

現在使用している CLO f/r (Weeks et al., 2003), Ch F/R (Zchori-Fein & Perlman, 2004), CFB-fl/r1 (Morimoto et al., 2006) および CFB-spF/R (Noda et al., in prep.) の 4 組のプライマーを使っても、すべてが陽性になるケースは 46.7% に過ぎない。申請者らは、広範囲の細菌を検出する約 1,500bp の fd1/rP2 プライマー (Weisburg et al., 1991) に基づいて、ハダニとウンカ 35 種に感染している *Cardinium* の塩基配列を決定しているため、この領域から *Cardinium* に特異的な配列を選抜して感度の高いプライマーを設計する。

(2) ハダニ類の *Cardinium* 感染個体群の探索および生殖におよぼす影響

本邦産ハダニ類の全属 (17 属 83 種) を網羅するように体系立てた計画に従い、50 種 100 個体群以上のハダニについて感染の有無を検討する。新規の高感度プライマーを用いる。上記の CFB-spF/R プライマーより高感度のものを作ることが困難な場合には、現段階で最も感度が高い CFB-spF/R を主として用い、2 番目に感度が高い CFB-fl/r1 と併用する。この二つのプライマーを同時に使用すれば、誤判定はほとんど起きないことを確認しているが、最低 20 個体/個体群を検定する。後述の *Wolbachia* との二重感染個体群の探索を兼ねるため、*Wolbachia* に特異的なプライマーである *wsp* を用いて、*Wolbachia* についても 10 個体/個体群を併せて検討する。

Cardinium に感染している個体群について、感染×感染、感染×非感染、非感染×感染、非感染×非感染の 4 交配を行い、生殖不和合性発現の有無を明らかにする。産卵開始後 5 日間産卵させた雌成虫および交尾させた雄成虫の両方について、感染状況が交配組合せと一致していることを確認する。

生殖不和合性を誘導する系統と誘導しない系統における次世代への垂直伝播率を明らかにするため、各々の系統について感染個体と非感染個体を 1 : 1 の割合で混合し、世代の進行に伴う感染率の変化を比較する。*Wolbachia* では、生殖不和合性を引き起こす系統同士を組合せた場合、6 世代目ではほぼ

100% の感染率に達したのに対し、引き起こさない系統同士では 15 世代目でも約 60% の感染率に留まっていたので、本課題では状況を見ながら 15~20 世代を検討する。また、100% 感染個体から次世代個体への伝播率を知るため、生殖不和合性誘導系統と非誘導系統について調査する。これによって、両系統の伝播率の相違が解明できると期待される。

(3) *Cardinium* と *Wolbachia* の二重感染個体群における相互作用

Cardinium と *Wolbachia* が二重感染している個体群で、かつ生殖不和合性を誘導する個体群について、Gotoh et al. (2006) によって報告された方法で *Cardinium* と *Wolbachia* のいずれか、または両者を除去する。つまり、二重感染個体を 30°C で 7 日間飼育することによって *Wolbachia* を除去することができ (*Cardinium* 単独感染個体)、ペニシリン G を処理することによって *Cardinium* を除去することができる (*Wolbachia* 単独感染個体)。また、2 つの共生微生物はテトラサイクリン処理によって完全に除去できる。このようにして作出した個体を用いて交配試験を行い、各微生物の単独による作用、二重感染時の作用を比較・検討し、相互干渉や相乗作用の有無を解明する。

(4) ダニの抗菌タンパク質遺伝子の解析とマイクロアレイによる発現遺伝子の探索

カイコ cDNA マイクロアレイ法によって、*Cardinium* に感染したカイコ細胞では免疫に関係する 13 個の遺伝子が活性化した。*Cardinium* は、カイコ細胞で免疫関連遺伝子の発現を誘導したので、ダニ体内での詳細を検討するため、ハダニの抗菌タンパク質遺伝子を数個クローニングし、*Cardinium* 感染個体と非感染個体において、それらの遺伝子の発現状況を比較する。対象となる遺伝子としては、マダニですでに知られている lysozyme, defensin の遺伝子をまず想定している。これらの遺伝子をハダニからクローニングし、定量 RT-PCR により、発現量を測定できるようにする。その後、*Cardinium* 感染個体、非感染個体、抗生物質で *Cardinium* を消滅させた個体を特定の数個体群について調査する。

ナミハダニの EST 解析を行ってきており、すでに 1 万クローン以上の EST を保有している。予備的なマイクロアレイ (アジレント社製 60mer のオリゴアレイ、4,300 遺伝子を搭載) もできており、*Cardinium* 感染個体と非感染個体とで発現量に差のある遺伝子を調査することが可能である。上記の抗菌タン

パク質以外の遺伝子についても、網羅的に調査することが可能であり、世界で初のハダニのマイクロアレイを使って、*Cardinium* 感染の影響を探ることを計画している。これによって、発現に特徴のある遺伝子が得られた場合、その遺伝子機能の解析、*Cardinium* 感染との関係を解析することなど、新しい分野の開拓ができるものと期待できる。

4. 研究成果

(1) *Cardinium* 特異的プライマーの作製

Cardinium のPCR検出については、特異的プライマーとして設計した2種類のプライマーペア (CFBsp F/R) を用いて、効率よく検出できた。このプライマーの開発によって、*Cardinium* 感染系統の誤陰性の可能性を大幅に削減できたため、世界中で広く使われている。

(2) ハダニ類の *Cardinium* 感染個体群の探査および生殖におよぼす影響

Cardinium と *Wolbachia* への感染について、12属47種218個体群のハダニを網羅的に探査した結果、それぞれ6属18種49個体群(38.3%)と5属17種87個体群(36.2%)への感染を確認した(図1)。

Cardinium 単感染個体群のうち、既報のスギナミハダニの他に、新たにスミスアケハダニ(口之津)とニセカンザワハダニ(北海道14)個体群が生殖不和合性を誘導した。*Cardinium* と *Wolbachia* に二重感染していたハダニ類は3属5種18個体群であり、2種では生殖不和合性が観察された。*Cardinium* と *Spiroplasma* への二重感染は1属1種1個体群で見つかったが、生殖への作用はなかった。*Wolbachia* と *Spiroplasma* の二重感染は、1属2種4個体群で検出されたが、生殖への影響はなかった(図1)。

なお、いずれの微生物も垂直伝播率は高く、ほぼ100%が次世代に伝播した。

ハダニ類では、*Rickettsia* に感染している個体群はいなかった(図1)。

ハダニ類における4種類の共生微生物の感染状況に関する大規模な研究は、本研究が世界で初めてであり、この分野に対する貢献度は高い。今後は共生微生物が他の生命現象に及ぼす影響(例えば、植物-植食者相互作用における情報化学物質の放出量と微生物感染の有無との関係など)を検討し、節足動物の生命活動に及ぼす共生微生物の複合的な作用を解明する。

(3) *Cardinium* と *Wolbachia* の二重感染における相互作用

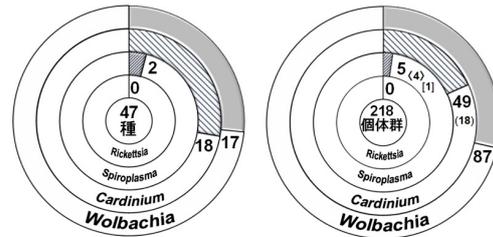


図1. 生殖に関する体内共生微生物の感染種数(左)および感染個体群数(右). (○): *Cardinium* と *Wolbachia* の二重感染個体群数; (◊): *Wolbachia* と *Spiroplasma* の二重感染個体群数; (□): *Cardinium* と *Spiroplasma* の二重感染個体群数.

二重感染している個体群のうち、生殖不和合性が見られた2種2個体群について、いずれの共生微生物の作用によるものであるかを解明した。その結果、二重感染個体群の生殖不和合性は、いずれの個体群においても *Wolbachia* による作用であり、*Cardinium* はこの作用を増強したり、干渉したりしないことが分かった(図2)。この結果は、*Wolbachia* と *Cardinium* による生殖操作が独立に働くことを示唆している。

本研究の成果は、従来の報告を補完するものであったが、二重感染個体では、*Wolbachia* の作用が他の感染微生物の作用より大きいことを明確に示した点において、本分野では高く評価されている。今後は、共生微生物間の相互作用についてより詳細な検討を実施していく予定である。

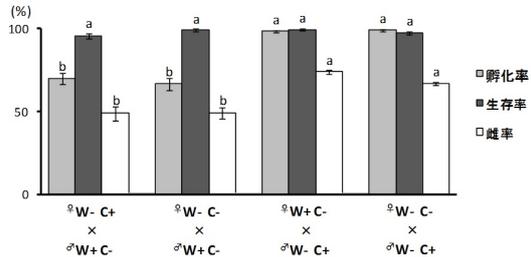


図2. フナカツメハダニの *Cardinium* と *Wolbachia* への二重感染個体群(土浦)における生殖不和合性。各色のバー上にある同一英文字間に有意差はない ($p > 0.05$)。

(4) ダニの抗菌タンパク質遺伝子の解析とマイクロアレイによる発現遺伝子の探索

カイコ培養細胞に *Wolbachia* と *Cardinium* をそれぞれ感染させて、カイコマイクロアレイを用いて網羅的な遺伝子発現解析を行った。その結果、*Cardinium* は宿主の免疫応答遺伝子発現を誘導している一方、*Wolbachia* は宿主細胞の遺伝子発現に影響していなかった(表1)。この違いは、これら2種の共生細菌の細胞壁構造の相違に基づいており、昆虫の免疫システムを受容体は *Cardinium* を認識できるが、*Wolbachia* を認識できないことが示唆された。

ハダニの EST から *dsx* 遺伝子に相同性のあるクローンを探索したところ、1クローンがヒットした。全長解析をしたところ、160ア

ミノ酸残基からなるタンパク質をコードしていた。他の昆虫の *dsx* 遺伝子のタンパク質コード部分の先頭部分に配列相同性があった。ハダニから見つかった *dsx* に似た遺伝子は、遺伝子との結合ドメインを持ち、*dsx* に比べると小さなサイズの遺伝子であった。しかし、雌雄で同じ mRNA が作られているという結果が得られ、雌雄間でのスプライシングの違いなどはなかったことから、性決定に係わるとは考えにくかった。

ナミハダニのESTクローン約10,800クローンを対象に、免疫に関連するToll経路とIMD経路の遺伝子のblast検索を行った。IMD経路に係わる遺伝子を見つけることはできなかったが、昆虫から哺乳類まで共通した自然免疫のレセプターであるTollと相同性のある遺伝子が見つかり、この遺伝子のアミノ酸配列中にはLeucine-rich repeat domainが存在した。さらに、昆虫類に比べ、系統的にハダニに近いカブトガニの免疫システムに関わる遺伝子をハダニESTデータより探索した。免疫機構の上流にあり、細菌により誘導されるセリンプロテアーゼであるFactor Cに相同性のある遺伝子がハダニESTより見つかった。その遺伝子のアミノ酸配列にはトリプシン様のセリンプロテアーゼに見られるドメイン構造が存在した。

カイコ培養細胞Bm-aff3とマイクロアレイ

表1. *Cardinium*と*Wolbachia*感染による遺伝子発現量の変化(Microarray解析による本研究の知見)

発現量の増加 (≥1.5倍)	
<i>Cardinium</i>	<i>Wolbachia</i>
lysozyme	なし
cecropin B	
gloverin 1, 3	
lebocin 1/2	
lebocin 4	
immune inducible protein	
b6tox	
3 genes of pattern recognition receptors	
発現量の減少 (≤0.67倍)	
<i>Cardinium</i>	<i>Wolbachia</i>
Type IV collagen gene	Type IV collagen gene
hemocytotrypsin-1 gene	hemocytotrypsin-1 gene

(after Nakamura et al., 2011)

法の利用によって、国内外では未決定であった共生微生物の感染によって発現量が変わる免疫機構に関する遺伝子を特定できた成果は高く評価されており、今後も継続的な解析を行っていく予定である。

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 8 件)

- ① Nakamura, Y., T. Gotoh, S. Imanishi, K. Mita, T. J. Kurtti and H. Noda. Differentially expressed genes in silkworm cell cultures in response to infection by *Wolbachia* and *Cardinium* endosymbionts. *Insect Mol. Biol.* 査読(有), 20, 2011, 279-289.
- ② Gotoh, T., R. Araki, A. Boubou, A. Migeon, F. Ferragut and M. Navajas. Evidence of co-specificity between *Tetranychus evansi* and *Tetranychus takafujii* (Acari: Prostigmata, Tetranychidae): comments on taxonomic and agricultural aspects. *Internat. J. Acarol.* 査読(有), 35, 2009, 485-501.
- ③ Nakamura, Y., S. Kawai, F. Yukuhiro, S. Ito, T. Gotoh, R. Kisimoto, T. Yanase, Y. Matsumoto, D. Kageyama and H. Noda. Prevalence of *Cardinium* in planthoppers and spider mites and taxonomic revision of "*Candidatus Cardinium hertigii*" based on detection of a new *Cardinium* group from biting midges. *Appl. Environ. Microbiol.* 査読(有), 75, 2009, 6757-6763.
- ④ Kawai, S, Y. Matsumoto, T. Gotoh and H. Noda. Transinfection of *Wolbachia* in planthoppers: nymphal injection of cultured *Wolbachia* and infection dynamics. *Environ. Entomol.* 査読(有), 38, 2009, 1626-1633.

[学会発表] (計 18 件)

- ① 後藤哲雄. 「アジサイナミハダニ」の意外な結末. 第55回日本応用動物昆虫学会大会、2011年3月27日、九州大学
- ② 吉岡主税・北嶋康樹・野田博明・後藤哲雄. ハダニに感染する共生微生物 *Cardinium* が生殖におよぼす影響. 第54回日本応用動物昆虫学会大会、2010年3月27-28日、千葉大学
- ③ 小澤理香・植田浩一・松田一彦・後藤哲雄・高林純示. ナミハダニの共生微生物はリママメのカブリダニ誘引に影響を及ぼす. 第54回日本応用動物昆虫学会大会、2010年3月26日、千葉大学
- ④ 吉岡主税・北嶋康樹・野田博明・後藤哲雄. ハダニ科11属における共生微生物の感染率および二重感染個体群における微

生物の影響. 第 18 回日本ダニ学会大会、
2009 年 9 月 29 日、茨城大学

[図書] (計 3 件)

- ① 江原昭三・後藤哲雄(編)、全国農村教育
協会、『原色植物ダニ検索図鑑』、2009、349
pp.

[その他]

<http://shokubutu.agr.ibaraki.ac.jp/gotoh/mushitop.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 哲雄 (GOTOH TETSUO)

茨城大学・農学部・教授

研究者番号：60178449

(2) 研究分担者

野田 博明 (NODA HIROAKI)

独) 農業生物資源研究所・昆虫・微生物相
相互作用研究ユニット

研究者番号：40343991