

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19780046

研究課題名（和文） 共生細菌ウォルバキアが鱗翅目昆虫の性決定に与える影響の解析

研究課題名（英文） Studies on the effects of Wolbachia endosymbiont on sex determination of lepidopteran insects

研究代表者 陰山 大輔 (KAGEYAMA DAISUKE)

独立行政法人農業生物資源研究所 昆虫・微生物間相互作用研究ユニット

任期付研究員

研究者番号：60401212

研究成果の概要（和文）：

共生細菌ウォルバキアは鱗翅目昆虫であるキチョウのオスをメスに性転換させる。本研究では、キチョウのウォルバキアをカイコ培養細胞内で安定的に維持することに成功した。ウォルバキアは生きたカイコ体内でも十分に増殖したが、次世代には伝わらなかった。さらにウォルバキアはキチョウの性決定遺伝子の発現様式をオス型からメス型へと変化させる効果を持ち、広く昆虫の生育期間にわたって存在し続けながら性決定遺伝子に影響を与え続けていることが明確に示された。

研究成果の概要（英文）：

In a butterfly *Eurema mandarina*, Wolbachia endosymbiont is known to feminize genetic males into functional females. Here I succeeded in maintaining Wolbachia in a cell culture of the silkworm *Bombyx mori*. Wolbachia was shown to proliferate sufficiently in the living body of *B. mori* but no Wolbachia was found to be transmitted to the offspring. Further, Wolbachia was found to alter the splicing of a sex determining gene of *E. mandarina* from male pattern to female pattern. It was clearly shown that continuous effect of Wolbachia on sex determining gene(s) during larval development is necessary for complete feminization of the butterfly.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用昆虫学

キーワード：性決定、性転換、移植、Wolbachia、昆虫、dsx、キチョウ、共生微生物

1. 研究開始当初の背景

近年の研究により、細胞内共生細菌ウォルバキアは、様々な節足動物の生殖システムを様々な方法で操作していることがわかってきており、その基礎的、応用的な可能性が注目されつつあるが、その基盤となる分子メカニズムに関しては、ほぼ何もわかっていない状態であった。

2. 研究の目的

キチョウでは、ウォルバキアによって遺伝的オスがメスに性転換させられている。そこでモデル昆虫であるカイコを用いて、性転換メカニズムを解明するための実験系の確立を目指した。またキチョウの性決定遺伝子を解析することにより、ウォルバキアが昆虫の性決定にどのような影響を与えているのかを調査した。

3. 研究の方法

キチョウに性転換を引き起こすウォルバキアをカイコ培養細胞や生きたカイコに移植し、その効果を調査した。また他の昆虫の情報を参考にし、キチョウの性決定に関わる *doublesex* 遺伝子の配列決定とスプライシングパターンを調査した。

4. 研究成果

カイコ培養細胞へキチョウ由来のウォルバキアを感染させることに成功し、安定して維持できた。また、ウォルバキアは、生きたカイコの体細胞では、本来の宿主であるキチョウにおける密度と同程度まで増殖した。ところが、生殖細胞への感染には失敗し、次世代にも全く伝わらないことが判明した。その原因として、ウォルバキア側の宿主特異性、あるいはカイコ側（生殖細胞）の免疫特性、異物排除機構などの存在が疑われた。

さらに本研究では、性転換されたキチョウでは性決定カスケードの最下流に位置する遺伝子 *doublesex* (*dsx*) のスプライシングパターンがオス型からメス型へと切り替えられていることが明らかとなった。また、ウォルバキアに感染しているキチョウ幼虫に抗生物質を投与すると、性転換が不完全となり、雌雄の形質を併せ持つ間性個体として発育することが示された。これら間性個体では、抗生物質の投与期間に応じて、*dsx* 遺伝子のスプライシングパターンが異なることが明らかとなった。つまり、メス形態に近いものほどメス型のバンドが、オス形態に近いものほどオス型のバンドが強く表れたのである。このことは、ウォルバキアが広く昆虫の生育

期間にわたって存在し続け、*dsx* 遺伝子のスプライシングに影響を与え続けていることを示している。これは、細菌が高等生物の性決定遺伝子カスケードを分子レベルで操作していることを示す初めての発見である。以上の成果は、細胞内共生細菌による節足動物の生殖システムの操作に関わる共通基盤を解明するための重要な足がかりになると期待できる。

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 14 件)

1. Narita S, Pereira RAS, Kjellberg F & Kageyama D (2010) Gynandromorphs and intersexes: potential to understand the mechanism of sex determination in arthropods. *Terrestrial Arthropod Reviews* 3: 63-96. (査読あり)
2. Kageyama D, Narita S, Imamura T & Miyanoshita A (2010) Detection and identification of *Wolbachia* endosymbionts from laboratory stocks of stored-product insect pests and their parasitoids. *Journal of Stored Products Research* 46: 13-19. (査読あり)
3. 陰山大輔・成田聡子 (2009) チョウの生殖や行動を変える共生細菌ボルバキア. *昆虫と自然* 10月号 p. 8-12. (査読なし)
4. Nakamura Y, Kawai S, Yukuhiro F, Ito S, Gotoh T, Kisimoto R, Yanase T, Matsumoto Y, Kageyama D & Noda H (2009) Prevalence of symbiotic bacteria *Cardinium* in planthoppers (Insecta: Hemiptera) and spider mites (Arachnida: Acari) and proposal for taxonomic revision of a new *Cardinium* group from biting midges (Insecta: Diptera). *Applied and Environmental Microbiology* 75: 6757-6763. (査読あり)
5. Kageyama D, Anbutsu H, Shimada M & Fukatsu T (2009) Effects of host genotype against the expression of spiroplasma-induced male-killing in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* 102: 475-482. (査読あり)
6. Hoshizaki S, Washimori R, Kubota S, Frolov AN, Kageyama D, Gomboc S, Ohno S, Tatsuki S & Ishikawa Y (2008) Limited variation in mtDNA of maize-associated *Ostrinia nubilalis*

- (Lepidoptera: Crambidae) in Russia, Turkey and Slovenia. *European Journal of Entomology* 105: 545-552. (査読あり)
7. Osaka R, Nomura M, Watada M & Kageyama D (2008) Negative effects of low temperatures on the vertical transmission and infection density of a spiroplasma endosymbiont in *Drosophila hydei*. *Current Microbiology* 57: 335-339. (査読あり)
 8. Kageyama D, Narita S & Noda H (2008) Transfection of feminizing *Wolbachia* endosymbionts of the butterfly *Eurema hecabe* into the cell culture and various immature stages of the silkworm, *Bombyx mori*. *Microbial Ecology* 56: 733-741. (査読あり)
 9. Sakamoto H, Kageyama D, Hoshizaki S & Ishikawa Y (2008) Heat treatment of *Wolbachia*-infected *Ostrinia scapulalis* (Lepidoptera: Crambidae) gives rise to sexually mosaic offspring. *Journal of Insect Science* 8: 67. (査読あり)
 10. Sakamoto H, Kageyama D, Hoshizaki S & Ishikawa Y (2007) Sex-specific death in *Ostrinia furnacalis* (Asian corn borer moth) infected with *Wolbachia* occurs across the larval development. *Genome* 50: 645-652. (査読あり)
 11. Narita S, Kageyama D, Nomura M & Fukatsu T (2007) Unexpected mechanism of symbiont-induced reversal of insect sex: feminizing *Wolbachia* continuously acts on the butterfly *Eurema hecabe* during larval development. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 4332-4341. (査読あり)
 12. Narita S, Nomura M & Kageyama D (2007) Naturally occurring single and double infection with *Wolbachia* strains in the butterfly *Eurema hecabe*: transmission efficiencies and population density dynamics of each *Wolbachia* strain. *FEMS Microbiology Ecology* 61: 235-245. (査読あり)
 13. Narita S, Nomura M & Kageyama D (2007) A natural population of the butterfly *Eurema hecabe* with *Wolbachia*-induced female-biased sex ratio not by feminization. *Genome* 50: 365-372. (査読あり)
 14. Narita S, Nomura M & Kageyama D (2007) A gynandromorph of *Eurema hecabe* (Lepidoptera: Pieridae). *Entomological News* 118: 134-138. (査読あり)
 15. Narita S, Nomura M, Kato Y, Yata O & Kageyama D (2007) Molecular phylogeography of two sibling species of *Eurema* butterflies. *Genetica* 131: 241-253. (査読あり)
- [学会発表] (計 10 件)
1. 大坂龍, 野村昌史, 陰山大輔 (2010) カスリショウジョウバエにおいて母系伝播する内部共生細菌スピロプラズマの水平伝播の可能性 第 54 回日本応用動物昆虫学会大会
 2. 成田聡子, 野田博明, 陰山大輔 (2010) 共生細菌 *Wolbachia* によって引き起こされるキチョウの性転換: doublesex 遺伝子の発現解析によって見えてきたこと 第 54 回日本応用動物昆虫学会大会
 3. 陰山大輔, 成田聡子, 今西重雄, 野田博明 (2010) キチョウにメス化を引き起こす共生細菌 *Wolbachia* によるカイコ細胞の性転換 第 54 回日本応用動物昆虫学会大会
 4. 道幸太輝, 野村昌史, 陰山大輔, 成田聡子 (2010) 他種で生殖操作を引き起こす *Wolbachia*2 系統のモンシロチョウへの移植実験 第 54 回日本応用動物昆虫学会大会
 5. 大坂龍, 野村昌史, 和多田正義, 陰山大輔 (2009) カスリショウジョウバエのハプロタイプとスピロプラズマ共生の関係 第 53 回日本応用動物昆虫学会大会
 6. 大坂龍, 野村昌史, 陰山大輔 (2008) カスリショウジョウバエの内部共生細菌スピロプラズマの垂直伝播や体内密度に対する温度の影響 第 52 回日本応用動物昆虫学会大会
 7. 成田聡子, 野村昌史, 陰山大輔 (2008) キチョウにおけるメス化以外の機構によるボルバキア起因の性比異常現象 第 52 回日本応用動物昆虫学会大会
 8. 陰山大輔, 成田聡子, 野田博明 (2008) キチョウからカイコへのメス化 *Wolbachia* の感染移植 第 52 回日本応用動物昆虫学会大会
 9. Narita S, Nomura M, Kato Y, Yata O, Kageyama D (2007) Molecular phylogeography of two sibling species of *Eurema* butterflies 日本昆虫学会九州支部・日本鱗翅学会九州支部合同大会 (TAIIV 共催)
 10. Kageyama D, Narita S (2007) Male killing or feminization: *Wolbachia* can interfere with the sex determination of insect hosts The 11th Congress of

The European Society for Evolutionary
Biology

[図書] (計 4 件)

1. 陰山大輔・成田聡子 (2009) チョウの生殖や行動を変える共生細菌ボルバキア. 昆虫と自然 10 月号 p. 8-12.
2. 「分子昆虫学—ポストゲノムの昆虫研究—」(神村学・日本典秀・葛西真治・竹内秀明・畠山正統・石橋純 編) 5.2 共生微生物 (p. 274-287) 共立出版 [2009 年]
3. Narita S & Kageyama D (2008) Wolbachia-induced sex reversal in Lepidoptera. pp. 295-319. In Insect Symbiosis 3 (eds. Kostas Bourtzis and Thomas A. Miller), CRC Press, Boca Raton, FL, USA
4. 「微生物の事典」(渡邊信・西村和子・内山裕夫・奥田徹・加来久敏・広木幹也 編) 5.9 共生微生物の宿主への影響 (8) ウォルバキアと雌性化 朝倉書店 [2008 年]

[その他]

ホームページ等

<http://diekei.blogspot.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

陰山 大輔 (KAGEYAMA DAISUKE)
独立行政法人農業生物資源研究所
昆虫・微生物間相互作用研究ユニット
任期付研究員
研究者番号: 60401212