

平成 22 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究B
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19780126
 研究課題名（和文） 細胞内寄生細菌“ボルバキア”がマツノマダラカミキリの生殖機能に与える影響の解明
 研究課題名（英文） Effect of *Wolbachia* endosymbiont to reproduction of *Monochamus alternatus*
 研究代表者
 相川拓也（AIKAWA TAKUYA）
 独立行政法人森林総合研究所・東北支所・主任研究員
 研究者番号：90343805

研究成果の概要（和文）：既往の研究により、マツノマダラカミキリの体内からボルバキアの遺伝子が検出されていたことから、マツノマダラカミキリはボルバキアに感染しているものと考えられていた。しかし、当研究課題において、そのボルバキアの性質を明らかにするための実験を進めたところ、ボルバキアがマツノマダラカミキリに感染しているのではなく、ボルバキアの遺伝子がマツノマダラカミキリの常染色体上に転移しているという驚愕の事実が明らかとなった。昆虫や動物などの高等生物において、遺伝子が大規模に水平転移していることを本研究のように具体的に証明した例は極めて少ないことから、本研究の成果は、今後高等生物における遺伝子水平転移の影響を解明していく上で非常に重要な知見であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：So far, the Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus*, was believed to be infected with *Wolbachia*, since previous study showed that a *Wolbachia* gene was detected from the insect. However, this study clarified that the insect was not infected with *Wolbachia*, but a chromosome of the insect had *Wolbachia* genes, demonstrating the occurrence of lateral gene transfer between two species. Because lateral gene transfer in eukaryotes have been regarded as relatively rare, the discovery in the present study would provide further insights into the evolution and fate of transferred endosymbiont genes in multicellular eukaryotes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	900,000	0	900,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	600,000	3,500,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：ボルバキア、マツノマダラカミキリ、マツノザイセンチュウ、マツ材線虫病、遺伝子水平転移

1. 研究開始当初の背景

| ボルバキアは主に昆虫類の細胞内に寄生

する細菌で、宿主昆虫に生殖異常をもたらすことで知られている。たとえば、細胞質不和合性（次世代を作らせない）、雄殺し（雄に発育すべき卵を孵化させない）、そして雄の雌化（遺伝的には雄でも雌に発育させる）などが代表的な生殖異常の例として挙げられる。その中で最も注目されているのが細胞質不和合性で、この現象を害虫に対する防除素材として利用する試みが行われている。

マツノマダラカミキリはマツ材線虫病の病原体であるマツノザイセンチュウを媒介する森林害虫である。先行研究により、マツノマダラカミキリの体内からもボルバキアの遺伝子が検出されていたことから、マツノマダラカミキリはボルバキアに感染していると考えられていた。

2. 研究の目的

このマツノマダラカミキリに感染しているボルバキアが細胞質不和合性を引き起こすタイプであれば、マツノマダラカミキリに対する生物的防除素材として利用できる可能性がある。そのような発想から、本研究ではボルバキアがマツノマダラカミキリの生殖機能に与える影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 野外マツノマダラカミキリ個体群における性比およびボルバキア感染率：

茨城県内で採集したマツ枯死木から脱出したマツノマダラカミキリ成虫を用いて雌雄の性比を調べるとともに、ボルバキアの感染率をPCR法（ボルバキアの遺伝子の特異的に検出する方法）により調査した。

(2) 抗生物質処理によるボルバキアの除去：

ボルバキアに感染していないマツノマダラカミキリ系統を作るため、抗生物質処理によるボルバキアの除去実験を行った。まず、ボルバキア遺伝子が検出される個体群（ボルバキア感染系統）の雌雄を交配させ次世代孵化幼虫を採集した。それら次世代孵化幼虫をテトラサイクリンまたはリファンピシンを含む人工試料で飼育した。これらの抗生物質の濃度を0.05、0.1、0.5または1.0%と段階的に変化させるとともに、飼育期間も2週間、4週間、または6週間と変化させて、マツノマダラカミキリ体内のボルバキア（ボルバキアの遺伝子）を完全に除去できる抗生物質の濃度と飼育期間を調査した。

(3) 卵の孵化率：

ボルバキア感染系統とボルバキアの遺伝子が検出されない系統（ボルバキア非感染系統）を用いて交配実験を行った。雌成虫が産んだ卵を系統別に区別し、それぞれの卵の孵

化率を調査した。

(4) ボルバキアの遺伝様式および性比：

ボルバキア感染系統と非感染系統を用いて交配実験を行い、ボルバキアの遺伝子がどのように子孫に遺伝するのかを調べるとともに、両系統の雌が生産する次世代の性比を調査した。

(5) 系統内・系統間の交配で得られた子孫におけるボルバキアの遺伝子量の比較：

ボルバキア感染系統の雌雄交配により得られた子孫と、感染系統・非感染系統の雌雄交配により得られた子孫を準備した。これらの個体を用いて、体内から検出されるボルバキア遺伝子の量を2つの由来（親の組み合わせパターン）の間で比較した。

(6) ボルバキア遺伝子の位置の確認：

ボルバキアの遺伝子が存在する場所を視覚的に明らかにするための解析（FISH）を行った。ボルバキア感染系統の精巣を染色体標本として、また、3つのボルバキア遺伝子を含む5.5kbの遺伝子断片をプローブとして使用した。

4. 研究成果

(1) 枯死木から脱出したマツノマダラカミキリ成虫は雄が22頭、雌が20頭であり性比はほぼ1:1であった。ボルバキアが宿主に引き起こす生殖異常の代表例である“雄殺し”または“雄の雌化”のような性比が雌に偏る現象は見られなかった。また、ボルバキアの感染率は雌雄とも95%と高頻度で感染しているようであった。

(2) 抗生物質の種類や餌を与える期間にかかわらず、供試したすべてのマツノマダラカミキリ幼虫体内からボルバキアの遺伝子が検出された。高濃度の抗生物質を長期間与え続けたにもかかわらず、マツノマダラカミキリ体内のボルバキアの遺伝子を除去することはできなかった。

(3) 非感染系統の雌雄の交配により得られた卵の孵化率は84%であった（対照区）。一方、非感染雄と感染雌をかけあわせた時の孵化率は87%、また、感染雄と非感染雌をかけあわせた時の卵の孵化率は91%であった。このように、雌雄どちらが感染した場合でも、その孵化率は対照区の孵化率とほとんど変化がなく、細胞質不和合性や雄殺しに見られるような孵化率の低下は起こらなかった。マツノマダラカミキリが保持するボルバキアは宿主昆虫の卵の孵化率に全く影響を与えていないことが示唆された。

(4) 昆虫の細胞内に共生しているボルバキアは、雌から次世代へと感染するのみで、雄から次世代へは決して感染しない。ところが、マツノマダラカミキリのボルバキア感染系統と非感染系統を用いて三世代 (G 1~G 3 世代) にわたる交配実験を行った結果、非感染雄×感染雌の組み合わせでは、他の昆虫で一般的に見られるボルバキアと同様に母親 (G 1 世代) から次世代 (G 2 世代) へ完全にボルバキアの遺伝子が移行したが、感染雄×非感染雌の組み合わせでも、得られた子孫はすべてボルバキアの遺伝子を持っていた。すなわち、細胞内で共生していればあり得ないはずの、父親から次世代への移行が確認された。さらに、ボルバキアの遺伝子が検出された G 2 世代の雌と非感染雄を交配させたところ、今度は感染個体と非感染個体が約 1:1 の割合で出現した (G 3 世代)。このように、ボルバキアの遺伝子はまるでマツノマダラカミキリの常染色体と連鎖しているかのように、メンデルの法則にしたがって遺伝することが示された。また各交配により得られた G 2・G 3 世代のどちらの子孫も、雌雄の性比は約 1:1 となり、性比が雌に偏るような現象は見られなかった。

(5) もし、このボルバキアの遺伝子が本当にマツノマダラカミキリの常染色体上に存在するのであれば、感染系統の雌雄間の交配で得られた次世代の個体 (ボルバキア遺伝子ホモ個体:++) は、感染系統と非感染系統間の交配で得られた次世代の個体 (ボルバキア遺伝子ヘテロ個体:+) の 2 倍の量のボルバキア遺伝子を持っていると推測される。そこで、感染系統雄×感染系統雌、非感染系統雄×感染系統雌、感染系統雄×非感染系統雌の 3 つの組み合わせを作り、得られた次世代成虫から卵巣、精巣、胸部の筋肉を採取後、DNA を抽出して、各組み合わせ間でボルバキア遺伝子の量を定量 PCR 法により比較した。その結果、予測された通り、どの組織においてもボルバキア遺伝子ホモ個体はヘテロ個体の 2 倍近い遺伝子の量を持っており、また、ヘテロ個体間の比較 (非感染雄×感染雌と感染雄×非感染雌) では、遺伝子の量に違いは見られなかった。この結果から、マツノマダラカミキリから検出されるボルバキア遺伝子は、マツノマダラカミキリの常染色体上に存在することが明らかとなった。

(6) マツノマダラカミキリには 10 本 (2n=20) の染色体があり、大きい方から数えて 7 番目の常染色体上にボルバキアの遺伝子があることが確認された。また、1 本の染色体上に 2 つのボルバキアシグナルが見られたことから、感染系統の個体はボルバキア遺伝子のホモ接合体であることが証明された。

このように、ボルバキア遺伝子の検出によってボルバキア感染系統として扱われていた茨城県産のマツノマダラカミキリ個体群は、実はボルバキアに感染しているのではなく、ボルバキアの遺伝子を自身の常染色体上に持っている集団であることが明らかとなり、ボルバキアからマツノマダラカミキリへ遺伝子の水平転移が起こっている事実が証明された。本研究では茨城県産のマツノマダラカミキリ個体群しか調査していないため、今後、マツノマダラカミキリで起こったボルバキア遺伝子の水平転移という現象をより詳しく理解するためには、日本全国、そしてアジア各国を含めたマツノマダラカミキリ個体群の網羅的な調査が必要である

これまで、生物の種を越えた遺伝子の移動、すなわち「遺伝子水平転移」という現象は、細菌などの下等な生物の間では比較的頻繁に起こり、かつ、それらの進化にも大きく寄与していることが知られていたが、昆虫や動物などの高等生物では非常にまれな現象であると考えられてきた。しかし、昨今の高等生物を対象としたゲノム解析研究の進展により、高等生物でも広く起こりうる現象であることが徐々に明らかにされつつある。それらに加え、今回、新たにマツノマダラカミキリで細菌由来の遺伝子の転移を発見できたことは、今後、高等生物において微生物から獲得した遺伝子がどのような運命をたどり、そして高等生物の進化にどのような影響を与えるのかを研究していく上で大変重要な知見となるであろう。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① 相川拓也・安佛尚志・二河成男・菊地泰生・柴田洋・深津武馬 (2010) 共生細菌“ボルバキア”の遺伝子がマツノマダラカミキリの常染色体上に大規模に転移していることを発見. *ブレインテクノニュース* 137: 23-28. (査読無)
- ② Aikawa, T. Anbutsu, H., Nikoh, N., Kikuchi, T., Shibata, F. and Fukatsu, T. (2009) Longicorn beetle that vectors pinewood nematode carries many *Wolbachia* genes on an autosome. *Proceedings of the Royal Society B*, 276: 3791-3798. (査読有)

〔学会発表〕（計 1 件）

①相川拓也・安佛尚志・二河成男・菊地泰生・柴田洋・深津武馬. マツノマダラカミキリから検出される共生細菌ボルバキアの遺伝子の正体. 第 121 回日本森林学会大会学術講演集 2010 年 4 月 3 日-5 日. 筑波大学（つくば市）

〔図書〕（計 1 件）

①Aikawa, T., Springer, Pine Wilt Disease, 2008, 123-138p

〔その他〕

森林総合研究所プレスリリースホームページ（共生細菌ボルバキアの遺伝子がマツノマダラカミキリの染色体上にごっそり転移—微生物から高等生物への遺伝子水平転移を具体的に証明—）

<http://www.ffpri.affrc.go.jp/labs/kouho/Press-release/2009/20090904/wolbachia20090904.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

相川 拓也 (AIKAWA TAKUYA)

独立行政法人森林総合研究所 東北支所
主任研究員

研究者番号：90343805

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

該当者なし