

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06069

研究課題名(和文) 寄生蜂の細胞内共生細菌による産雌性単為生殖化の時系列機能解析と誘導要因の探索

研究課題名(英文) Research of a time series functional analysis and an induction factor of parthenogenesis inducing Wolbachia to host parasitoids

研究代表者

田上 陽介 (Yohsuke, Tagami)

静岡大学・農学部・准教授

研究者番号：60426476

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、天敵農薬として重要な寄生蜂において、効率的な生殖制御方法を確立するための基盤として、共生細菌による宿主生殖操作のメカニズム解明に取り組んだ。その結果、性決定に重要となる寄生蜂胚のライブイメージング法の観察技術の整備基盤を確立させた。また、次世代シーケンスを用いて様々なハチ目の性決定メカニズムに関わりがあるとされる4種の遺伝子が保存されており、機能維持していること、遺伝子刷り込み型の性決定であることを明らかにした。メチレーション解析の結果、共生細菌は宿主ゲノムのメチル化率を大きく上昇していることを明らかにした。加えてファージ領域をこれまで知られていないリケッチアから明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

半数近くの昆虫で細胞内に共生細菌に感染していることが知られている。これら共生細菌は様々な形で宿主昆虫の生殖を操作していることが知られている。なかでも産雌性単為生殖化はそのメカニズムが明らかとなっていない。本研究により、この性決定という生物学上重要な事象における特異な現象のメカニズムを明らかにする端緒となる成果が得られた。それだけでなく、農業害虫に対する安心・安全な農薬として注目されている寄生蜂の効率的な増殖方法の基盤となる成果が得られた。今後生殖操作技術を活用することで様々な有用天敵寄生蜂の効率的な増殖が可能となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we researched sex determination mechanism of agricultural important natural enemy of parasitoids which infected by insect intracellular symbionts. Observation methods established by live imaging an early development of parasitoids embryo which important periods for sex determination of parasitoids. From the analysis of NGS data both parasitoids and symbionts, four important genes of sex determination (wom, tra, tra2, and dsx) were decided and cleared these genes have functions to sex determination. Moreover, cleared methylation ratio of host parasitoid up regulated by infection of symbiont. From the results, thelytokous parasitoids which infected intracellular symbionts determined sex by genetic imprinting sex determination.

研究分野：応用昆虫学

キーワード：寄生蜂 性決定 共生細菌 産雌性単為生殖

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

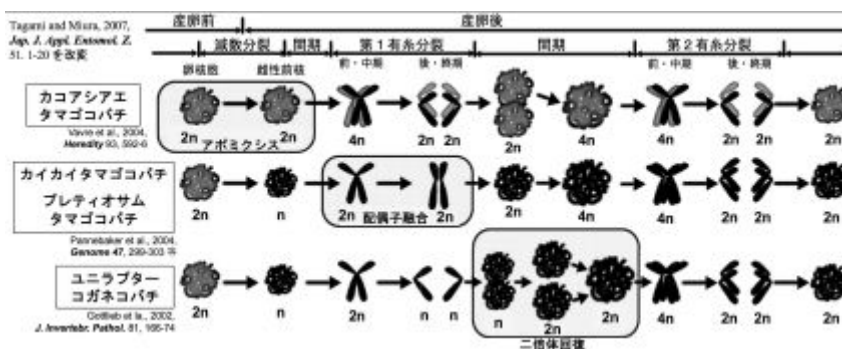
(1) 昆虫の細胞内共生細菌は宿主の生殖を利己的に操作することで知られ、節足動物の 40% 以上に感染していることが知られている。宿主外の因子によって生殖が改変・操作される現象は学術的に興味深いだけでなく、生物の性質を人為的に改変する手法の開発に向けて応用面でも注目されている。

(2) 寄生蜂類は半数倍数性の性決定様式を持ち、基本的には受精した卵はメス、未受精卵はオスになる。寄生蜂類に感染する共生細菌のボルバキアやリケッチアのなかには一倍体の未受精卵を二倍体に変えることでメス化を誘導する産雌性単為生殖が観察されているが、そのタイミングは種によって様々であり(図参照)その機構についてあまり明らかとなっていなかった。近年、上記二倍体化だけではメス化せず他のメス化要因が必要と示され、その因子は母親由来のゲノムに刷り込まれたもの(ゲノム修飾)である可能性が示されている。そこで二倍体化の誘導、ゲノム修飾について重要であると考えに至った。

(3) 農業害虫に対する安心・安全な農薬として天敵寄生蜂が挙げられる。しかし、価格が高いことがネックとなっていた。それに対し、上記のように寄生蜂の性決定メカニズムを知り、産雌性単為生殖化を天敵寄生蜂を行うことで増殖効率を 2 倍にまで高め、価格を半減することが可能になると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、共生細菌が産雌性単為生殖化誘導を通じてオスのいらぬ繁殖を実現する機構を解明することを目的とした。



3. 研究の方法

研究は大きく 3 つの工程に分けて行った。

まずライブイメージングによる生きた胚の観察により、寄生蜂の性決定に重要な核の二倍体化の時期と共生細菌の局在の比較を行った。次に、次世代シーケンサーを用い宿主寄生蜂のゲノム機能解析・遺伝子発現解析及び共生細菌のゲノム解析による生殖操作関連遺伝子のスクリーニングを行った。その後、ゲノム修飾の解析を行った。ボルバキア感染によって生物の遺伝子発現制御が影響を受けるゲノム領域を明らかにするため、ゲノム既知のプレティオサムタマゴバチをサンプルとしたバイサルファイトシーケンスを行った。

Total RNA を用いたりアルタイム定量 PCR による発現解析を行い、産雌性単為生殖誘導の候補となる遺伝子を 20 程度に絞り込んだ後、遺伝子機能解析を通じて生殖操作に重要な遺伝子を明らかにする。結果が不明瞭な場合は遺伝子発現抑制実験による遺伝子機能解析を通じて生殖操作に重要な遺伝子を明らかにする。

さらに、生殖操作に重要な時期の胚・卵巣を標的とした大規模発現遺伝子解析を行い、2 つの解析結果を総合して、ボルバキア感染による PI 誘導に重要な候補遺伝子の絞り込みを進める。絞り込んだ生殖操作要因の候補遺伝子が多数ある場合、継時的にサンプリングした寄生蜂由来の total RNA を用いたりアルタイム定量 PCR による発現解析を通じて、PI の誘導に重要な遺伝子の候補を絞り込む。候補遺伝子を 20 前後まで絞り込んだ後、遺伝子発現抑制実験 (RNAi 法) による遺伝子機能解析を通じて、生殖操作に重要な遺伝子を明らかにする。結果が不明瞭な場合は、ゲノム編集法 (TALEN や CRISPR/Cas9) を用いて候補遺伝子の機能を完全に欠失させ、遺伝子機能解析を行う。

4. 研究成果

(1)

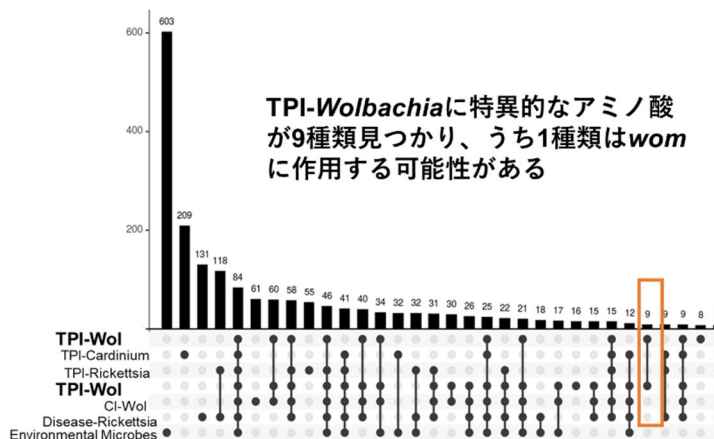
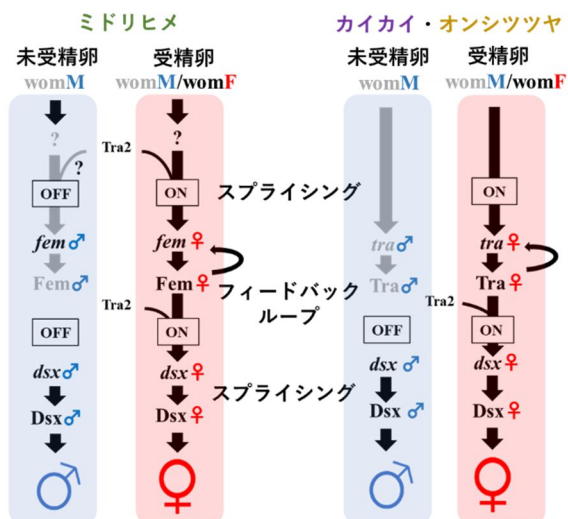
ライブイメージングについては、成否に重要な産卵前とその後のボルバキアやチューブリンの挙動を観察する手法が有用だとわかり、ライブイメージングによる解析の基礎を構築した。一方で次世代シーケンスやメチル化解析において当初の想定以上の進展が見られたため、目標達

成に向け生殖操作関連遺伝子、ボルバキア感染に影響を受ける遺伝子等を注力して行った。その結果ボルバキアに特異的なアミノ酸が9種類見つかり、そのうち一つは性決定に関わる遺伝子である *wom* に作用する可能性があることが明らかとなった(2図参照)。メチル化解析の結果、非感染系統より感染系統のメチル化率が高く、メチル化が産雌性単為生殖化に関わっていることが推測された。

(2)

3回の学会発表を行い、関わる論文を2報報告し、さらに1報の論文を投稿予定である。

本研究で用いる寄生蜂はサイズが小さく、飼育にコツが必要なこともあり、国内で同様の研究は行われていない。また、オランダでは研究が行われているが、異なった2種の共生細菌を用いて総合的にアプローチする研究は行われていない。応用も期待される研究であり、したがってインパクトは非常に高いと考えられる。本研究は新たな科研費事業に移行し、より応用面を見据えた取り組みを行う。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ardhiani Kurnia Hidayanti, Achmad Gazali, Yohsuke Tagami	4. 巻 22
2. 論文標題 Effect of Quorum Sensing Inducers and Inhibitors on Cytoplasmic Incompatibility Induced by Wolbachia (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in American Serpentine Leafminer (Diptera: Agromyzidae): Potential Tool for the Incompatible Insect Technique	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Insect Science	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jisesa/ieab106	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Achmad Gazali, Ardhiani Kurnia Hidayanti, Yohsuke Tagami	4. 巻 -
2. 論文標題 Autophagic Chemicals Effect to Atg8 and Rice Stripe Virus Relative expressions, and Wolbachia Relative Density in Laodelphax striatellus (Hemiptera: Delphacidae).	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Turkish Journal of Zoology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大畑裕太・杉本貴文・田上陽介
2. 発表標題 寄生蜂の性決定及び共生細菌によって誘導される産雌性単為生殖に関わる誘導遺伝子の探索
3. 学会等名 第9回東海昆虫研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大畑裕太・杉本貴文・田上陽介
2. 発表標題 性決定遺伝子dsxの分子進化および寄生蜂性決定プロセスの探索
3. 学会等名 日本進化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大畑裕太・杉本貴文・田上陽介
2. 発表標題 寄生蜂の性決定関連遺伝子の探索および共生細菌による産雌性単為生殖誘導機構の推定
3. 学会等名 日本応用動物昆虫学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	杉本 貴文 (Sugimoto Takafumi) (20726707)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・契約研究員 (82111)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------