

機関番号：82626

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20780042

研究課題名（和文） 共生細菌による宿主昆虫の生殖操作の分子機構の解明

研究課題名（英文） Investigation into the molecular mechanisms of reproductive manipulation of host insect by endosymbiotic bacteria.

研究代表者

安佛 尚志（ANBUTSU HISASHI）

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究グループ付

研究者番号：30392583

研究成果の概要（和文）：ショウジョウバエと、その共生細菌で「雄殺し」という生殖操作をおこなうスピロプラズマからなる共生系において、3系統のスピロプラズマのファージゲノムを決定し、その特徴を明らかにした。また、スピロプラズマは宿主の全身性の免疫反応を誘導も抑制もしないが、雄殺しスピロプラズマ系統は宿主の構成的な免疫反応を抑制し、活性化した免疫反応に対する抵抗性を示すことを発見した。さらに、ショウジョウバエの性比に影響を及ぼすショウジョウバエ挿入系統を16系統取得し、原因遺伝子候補を同定した。

研究成果の概要（英文）：This study has been conducted using the endosymbiotic system consists of host insects, *Drosophila* fruit flies, and symbiotic bacteria, *Spiroplasma*, which cause “male killing” on its hosts. From the three *Spiroplasma* strains, genome sequences of their phages were identified and characterized. It was shown that *Spiroplasma* infections neither induced nor suppressed the systemic immune response of the host. In addition, it was also determined that the male-killing *Spiroplasma* is capable of suppressing the constitutive immune response and is resistant to mounted immune attacks. Sixteen insertion lines, which showed extremely male-biased sex ratio, have been obtained and the possible causative genes have been identified.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：昆虫微生物学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：共生細菌、ショウジョウバエ、スピロプラズマ、ファージ、生殖操作、雄殺し、免疫機構、性比

1. 研究開始当初の背景

昆虫の体内に共生（内部共生）している細菌には、宿主に対してユニークな表現型効果を示すものが多い。たとえば、スピロプラズマ（*Spiroplasma*）という共生細菌は、ショウジョウバエやテントウムシなどを宿主と

し、胚発生期に雄だけを殺す“雄殺し”という生殖表現型を発現させる（図1）。また、ボルバキア（*Wolbachia*）は、双翅目、膜翅目、鱗翅目、鞘翅目、半翅目など広範な昆虫類に対して、細胞質不和合、雌への性転換、単為生殖の誘導、雄殺しといった生殖操作を

おこなう。細菌による宿主の生殖操作のメカニズムについては、国際的にも多くの研究者が関心を持っており、ボルバキアの細胞質不和合における“修飾-救済仮説”などの理論モデルが提唱されていたが、それらの実証はされていなかった。近年、ボルバキアの全ゲノムが決定され、スピロプラズマの雄殺しとショウジョウバエの遺伝子量補償機構との関連が示唆されるなど進展も見られていたが、生殖操作の具体的な分子メカニズムは依然として不明であった。



図 1. 雄殺しスピロプラズマに感染したことにより雌だけになったキイロショウジョウバエ

2. 研究の目的

申請者は、共生細菌による宿主昆虫の生殖操作のメカニズムや、共生関係の成立・維持に関わる宿主-共生体間相互作用の分子機構の全容を解明することをめざして研究をおこなっている。そのなかで、本研究では以下の3つの目的を設定し、研究を遂行した。

(1) 共生細菌スピロプラズマのファージについて、その全ゲノム配列を明らかにし、共生関連遺伝子とその機能の解明をめざす。

(2) 昆虫は、外部からの細菌などの異物の侵入に対する防御として、様々な細胞性免疫や液性免疫機構を備えている。しかし、共生細菌は、宿主の免疫に排除されることなく宿主体内で増殖することができる。スピロプラズマは、フェノール酸化酵素カスケードや血球による食作用、抗菌タンパク質の産生などの防御機構が働く場であるショウジョウバエ体液中に存在し、増殖している(図2)。

このことから、スピロプラズマは何らかの方法で免疫機構からの攻撃を防いでいる(回避している)と考えられる。そこで、スピロプラズマに感染しているショウジョウバエにおける免疫遺伝子、特に抗菌タンパク質遺伝子の発現や、抗菌タンパク質に対するスピロプラズマの抵抗性を明らかにすることで、スピロプラズマがどのようにして宿主免疫機構による防御を回避しているのかを明らかにする。

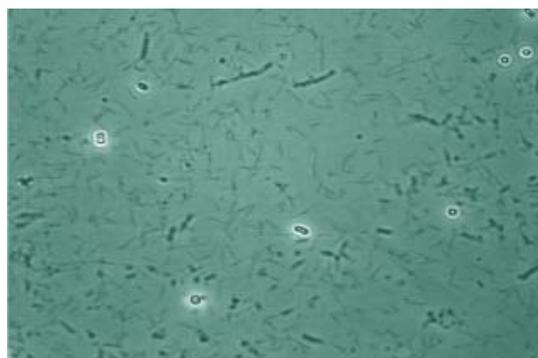


図 2. ショウジョウバエ体液中のスピロプラズマ

(3) 共生細菌が宿主の生殖を操作するメカニズムはほとんどわかっていないが、考えられる仮説として、宿主の性決定関連遺伝子の働きに何らかの関係があることが考えられる。また、雄殺しは母系効果であることが先行研究により示唆されている。そこで、母親で強制発現させた時に子孫の性比に影響を及ぼす宿主遺伝子を同定し、共生細菌による生殖操作との関係や、性比に影響を及ぼすメカニズムを明らかにすることをめざす。

3. 研究の方法

(1) スピロプラズマのファージゲノムの解析

4つのスピロプラズマ系統(*Drosophila nebulosa*由来の雄殺しスピロプラズマ NSRO 系統、NSRO をキイロショウジョウバエに移植して維持するうちに偶然単離された雄を殺さない突然変異スピロプラズマ NSRO-A 系統、キイロショウジョウバエ由来の雄殺しスピロプラズマ MSRO 系統、カスリショウジョウバエ由来の雄を殺さないスピロプラズマ系統)に感染したショウジョウバエを材料として、ファージゲノムの精製を試みた。次いで、得られたファージゲノムを直接、あるいは増幅した後、ショットガンシーケンス及びアセンブルをおこなうことにより、全ゲノム配列を得た。得られたゲノム情報の解析により、既知の遺伝子との相同性や予測される生物学的機能について調べた。

(2) スピロプラズマ感染と宿主免疫機構との関係

① スピロプラズマ感染によって宿主免疫機構が働いているかどうかを明らかにするため、非感染ショウジョウバエ、スピロプラズマ(NSRO 系統及び NSRO-A 系統)感染ショウジョウバエを材料とし、羽化直後、3、5週間後の抗菌タンパク質遺伝子の発現量を定量的 RT-PCR 法で調べた。

② 抗菌タンパク質遺伝子の発現誘導がスピロプラズマ感染によって抑制されるかどうかを明らかにするため、羽化後 7-10 日のスピロプラズマ(NSRO 及び NSRO-A 系統)感染及び非感染ショウジョウバエに対して

菌体接種をおこない、6.5-7 時間後の抗菌タンパク質遺伝子の発現量を定量的 RT-PCR 法によって調べた。接種源としては、大腸菌 K-12(グラム陰性菌)、黄色ブドウ球菌(グラム陽性菌)、灰色カビ病菌(真菌)のカクテルを加熱殺菌した後、遠心によってペレット状にしたものを用いた。

③ 抗菌タンパク質に対するスピロプラズマの耐性を明らかにするため、ショウジョウバエの免疫カスケードのひとつである *Toll* カスケードを恒常的に活性化させるショウジョウバエ突然変異系統 *Tl^{10B}* に、スピロプラズマ NSRO 系統及び NSRO-A 系統に感染したショウジョウバエの体液を微細注入法により導入した。こうして作成した感染系統を用い、宿主の羽化直後、1 および 3 週間後のスピロプラズマの密度を定量的 PCR 法で調べた。

(3) ショウジョウバエの性比に影響を及ぼす宿主遺伝子の探索

UAS-Gal4 システムとよばれる遺伝子強制発現システムを用いて、ショウジョウバエ EPg 因子(トランスポゾン)の 1 種) 挿入系統の大規模スクリーニングをおこない、母親の卵巣で遺伝子を強制的に発現させることで、子孫の性比やスピロプラズマによる雄殺しに影響を及ぼすような挿入系統を取得する(図 3)。取得したショウジョウバエ系統について、inverse PCR により原因遺伝子を同定する。

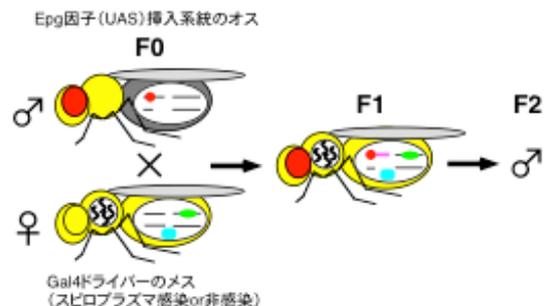


図 3. UAS-Gal4 システムを用いたスクリーニング

4. 研究成果

(1) スピロプラズマのファージゲノムの解析
3 系統のスピロプラズマ (NSRO 系統、NSRO-A 系統、MSRO 系統) について、そのファージ (それぞれ *spv1*, *spv1-A*, *spv1-M* とする) のゲノムの精製に成功した。カスリショウジョウバエのスピロプラズマのファージについては同じ方法で精製ゲノムを得ることはできなかったため、前述の 3 系統についてゲノム解析を進めた。ショットガンシーケンスとアセンブルをおこない、それぞれ予想される全長にほぼ等しい 19,019 bp、18,372 bp、19,052 bp の結合配列を得た。相

同性検索により、少なくとも 11 の *Spiroplasma citri* (及びそのファージ) や雄殺しスピロプラズマの既知の遺伝子と高い相同性を示す配列が見つかった。興味深いことに、その中には *S. citri* において昆虫との相互作用に関わっている *P58* 遺伝子ファミリー (*P58*, *P12*, *P18*, *P54*, *P123*) が含まれており、スピロプラズマ-ショウジョウバエ共生系において、ファージが宿主との相互作用に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。その他には、スピロプラズマのファージの組換えタンパク質 (*recT*) 遺伝子、機能未知の遺伝子が見つかった。3 つのファージの間で、高い相同性を示した既知遺伝子のレパートリーはほぼ一致していた。今後は、特に雄殺しスピロプラズマと非雄殺しスピロプラズマのファージゲノムの違いに注目して、さらに詳しく解析を進めることで、雄殺しに直接関わる遺伝子の発見をめざす。

(2) スピロプラズマ感染と宿主免疫機構との関係

① スピロプラズマ感染ショウジョウバエにおける抗菌タンパク質遺伝子の発現

スピロプラズマ感染個体における抗菌タンパク質遺伝子の発現量は、菌体接種をおこなった場合と比べてきわめて低く、スピロプラズマ感染自体は抗菌タンパク質遺伝子の発現を誘導しないことが示された(図 4)。

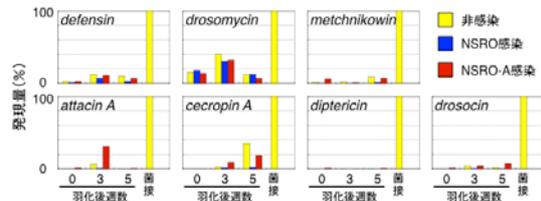


図 4. 各感染タイプのショウジョウバエにおける抗菌タンパク質遺伝子の発現量

RpL32 遺伝子の発現量で標準化した各抗菌タンパク質遺伝子の発現量を、非感染ショウジョウバエに菌体接種をおこなった場合の発現量に対する割合 (%) で表す。各カラムは中央値 (n=10) を示す。

一方、スピロプラズマ感染個体と非感染個体の抗菌タンパク質遺伝子の発現量を比較すると、*drosomycin* をのぞく 6 つの抗菌タンパク質遺伝子において、NSRO 感染ショウジョウバエでの発現量が非感染に比べて低い傾向が見られた(図 5)。

ショウジョウバエにおいては、消化器官系、生殖器官系、呼吸器官系など細菌の侵入にさらされる組織では抗菌タンパク質が構成的に発現している。NSRO 系統のスピロプラズマはこのような構成的な抗菌タンパク質遺伝子の発現を抑制している可能性が示された。

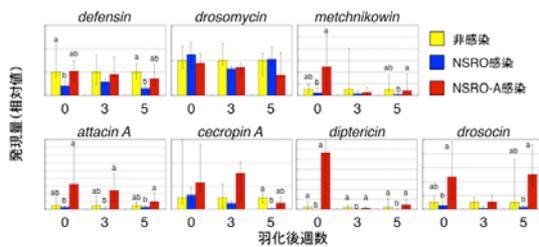


図 5. 各感染タイプのショウジョウバエにおける抗菌タンパク質遺伝子の発現量
RpL32 遺伝子の発現量で標準化した各抗菌タンパク質遺伝子の発現量を、各齢期の非感染ショウジョウバエにおける発現量を 1 としたときの相対値で表す。各カラムは中央値 (n=10)、バーは四分位数間領域を示す。異なるアルファベットは有意差があることを示す (Scheffe test after Kruskal-Wallis test, $P < 0.05$)。

② スピロプラズマ感染ショウジョウバエにおける抗菌タンパク質遺伝子の発現誘導

スピロプラズマ感染ショウジョウバエと非感染ショウジョウバエに菌体接種をおこなった際の抗菌タンパク質遺伝子の発現量を比較したところ、有意な差はほとんど検出できなかった (図 6)。

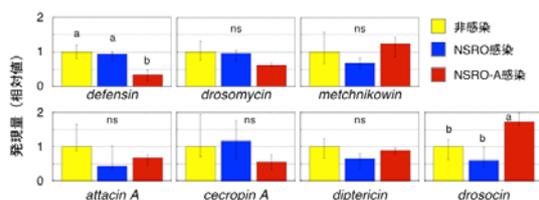


図 6. 各感染タイプのショウジョウバエに菌体接種をおこなった際の抗菌タンパク質遺伝子の発現量
RpL32 遺伝子の発現量で標準化した各抗菌タンパク質遺伝子の発現量を、非感染ショウジョウバエにおける発現量に対する相対値で表す。各カラムは中央値、バーは四分位数間領域を示す (n=10)。異なるアルファベットは有意差があることを、"ns" は有意差がないことを示す (Scheffe test after Kruskal-Wallis test, $P < 0.05$)。

このことから、スピロプラズマは、細菌感染によって誘導される全身的な抗菌タンパク質遺伝子の発現を抑制することはできないことが明らかになった。

③ 抗菌タンパク質を恒常的に発現する突然変異系統におけるスピロプラズマの個体群動態

TI^{10B} に NSRO 系統及び NSRO-A 系統に感染したショウジョウバエの体液を導入したところ、前者は感染が成立したが、後者は成立しなかった。*TI^{10B}* におけるスピロプラズマ NSRO 系統の密度は、羽化直後、1、3 週間後のいずれにおいても、コントロールの野生型ショウジョウバエと比べて有意に低く、1/6 程度に抑制されていた (図 7)。

これらの結果から、スピロプラズマは抗菌タンパク質によって抑制されることが示された。しかし、ショウジョウバエ成虫の加

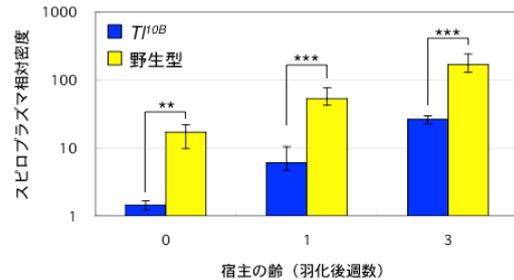


図 7. 宿主免疫系の活性化がスピロプラズマ NSRO 系統の密度及び増殖に及ぼす影響
 スピロプラズマ相対密度はスピロプラズマ *dnaA* 遺伝子のコピー数を宿主 *EF1* 遺伝子のコピー数で標準化することによって求めた。各カラムは中央値 (n=10) を、バーは四分位数間領域を示す。アスタリスクは差が統計的に有意であることを示す (GLM (ボンフェローニ補正): ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)。

齢に伴い、スピロプラズマ NSRO 系統の密度の上昇が確認されたことから、抵抗性は少なからず有しており、完全に排除されることはないことが示唆された。

以上、①、②の結果から、NSRO 系統も NSRO-A 系統も、宿主の抗菌タンパク質遺伝子の発現を誘導しないが、発現誘導を抑制している訳ではないことが明らかになった。すなわち、スピロプラズマは宿主の免疫機構に認識されないことで、その攻撃にさらされることなく体液中に存在しているものと考えられた。スピロプラズマは細胞壁を持たないことがわかっており、そのことが関係していると思われる。

NSRO 系統については宿主の抗菌タンパク質遺伝子のいくつかについて構成的な発現を抑制していること、抗菌タンパク質に対する抵抗性を有するという、予想外の発見があった。さらに、NSRO-A 系統はこれらの特徴を失っており、雄殺し能力の喪失との関係が興味深い。

(3) ショウジョウバエの性比に影響を及ぼす宿主遺伝子の探索

性比に関係する母系効果遺伝子を取得するためにおこなった EPg 因子挿入系統のスクリーニングにおいて、雌の卵巣で遺伝子を強制発現させると子孫の性比が雄に偏る (胚発生途中で雌が死亡する) 系統を 16 系統取得した。Inverse PCR により EPg 因子の挿入部位を決定したところ、下流の遺伝子は *escargot (esg)* が 8 系統、*extramacrochaetae (emc)* が 4 系統、*anterior open (aop)*、*hairy (h)*、*CG10543* がそれぞれ 1 系統であった。残りの 1 系統は EPg 因子が二つ挿入されているようであった。*esg* は雄の胚で性特異的に発現する転写因子であり、母親での強制発現により雌胚への母系伝播が起こり、性特異的な遺伝子発現に異常を来す結果、雌致死になると考えられる。また、*emc* は性決定のマ

スター遺伝子である *Sex lethal (Sxl)* を抑制する母系効果因子であり、強制発現により雌で必須な *Sxl* が作られなくなり雌致死になると思われる。*h* にも *Sxl* 抑制効果が知られており、そのために雌致死になると考えられる。*aop* も転写抑制因子としての働きが知られているが、機能未知の *CG10543* とともに雌特異的致死との関係は現段階では不明である。

これら 16 系統については、雄殺しスピロプラズマ MSRO 系統に感染した状態での遺伝子強制発現もおこない、生殖操作表現型を確認したが、明瞭な相互作用は確認できなかった（共生細菌による雄殺しと強制発現による雌殺しが同時に起こり、雌雄ともに胚致死となった）。今後は、各遺伝子の生物学的機能や雌特異的致死のメカニズムについて明らかにする必要があるだろう。

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 2 件）

- ① 安佛尚志、深津武馬、*Spiroplasma* as a model insect endosymbiont、*Environmental Microbiology Reports*、査読有、Vol. 3、No. 2、2011、144-153
- ② 安佛尚志、深津武馬、Evasion, suppression and tolerance of *Drosophila* innate immunity by a male-killing *Spiroplasma* endosymbiont、*Insect Molecular Biology*、査読有、Vol. 19、No. 4、2010、481-488

〔学会発表〕（計 5 件）

- ① 安佛尚志、宿主昆虫の生殖を操作する共生細菌スピロプラズマ、第 37 回日本マイコプラズマ学会学術集会、2010 年 6 月 10 日、国立感染症研究所（東京都）
- ② 安佛尚志、深津武馬、Infection dynamics and immune resistance of male-killing and non-male-killing spiroplasmas、Symposium “Microbial Interactions Leading to Novel Biological Functions”、2010 年 1 月 8 日、産業技術総合研究所（茨城県つくば市）
- ③ 安佛尚志、深津武馬、Expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* infected with *Spiroplasma* endosymbiont and its effect on infection dynamics、The 9th Japanese *Drosophila* Research Conference、2009 年 7 月 6 日、ヤマハリゾートつま恋（静岡県掛川市）
- ④ 安佛尚志、ショウジョウバエ・スピロプラズマ共生系を用いて昆虫内部共生のメ

カニズムを探る、日本節足動物発生学会第 45 回大会、2009 年 6 月 5 日、ホテルニュー白亜紀（茨城県ひたちなか市）

- ⑤ 安佛尚志、なぜ共生細菌スピロプラズマは宿主の免疫システムによって排除されないのか、第 53 回日本応用動物昆虫学会大会、2009 年 3 月 29 日、北海道大学（札幌市）

〔その他〕

産総研論文検索システム（産総研リポジトリ）

http://www.aist.go.jp/aist_j/aist_repository/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安佛尚志（ANBUTSU HISASHI）

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究グループ付

研究者番号：30392583

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：