

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：13904

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2009～2012

課題番号：21687020

研究課題名(和文) 生物界最小ゲノムをもつ共生細菌カルソネラの生存を支える宿主昆虫細胞の機能解析

研究課題名(英文) Functional Analysis of the Psyllid Bacteriome to Harbor *Carsonella*, Mutualistic Bacteria with an Extremely Reduced Genome

研究代表者

中鉢 淳 (NAKABACHI ATSUSHI)

豊橋技術科学大学・エレクトロニクス先端融合研究所・准教授

研究者番号：40332267

研究成果の概要(和文)：共生器官 bacteriome を対象とした転写産物解析等により、キジラミ・カルソネラの2種間共生関係、プロフテラを含めた3種間関係の維持に関わると目される宿主遺伝子群について各種情報を得、動物-細菌間共生系の維持機構について重要な示唆を得た。また、ミカンキジラミのカルソネラ及びプロフテラのゲノム解析により、カルソネラのゲノム進化について新たな知見を得るとともに、プロフテラが、これまでの常識を覆す新規防衛共生体であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Transcriptome analysis of the bacteriome of the two psyllid species, *P. venusta* and *D. citri* revealed genes that apparently play pivotal roles to maintain either the psyllid-*Carsonella* symbiosis or the psyllid-*Carsonella-Proffella* symbiosis. RNAi analysis gave insight into the function of these genes. Whole genome analysis of *Carsonella_DC* and *Proffella* revealed their reductive evolution, demonstrating that *Proffella* is an unprecedented type of defensive symbiont.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
2010年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2011年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2012年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
総計	20,900,000	6,270,000	27,170,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学、進化生物学

キーワード：キジラミ、共生、菌細胞、カルソネラ、プロフテラ、極小ゲノム、トランスクリプトーム解析、ゲノム解析

1. 研究開始当初の背景

(1) 半翅目昆虫キジラミ類(腹吻亜目・キジラミ上科：記載種数約2500)は腹部体腔内に bacteriome とよばれる特殊な器官をもち(図1)、これを構成する菌細胞(bacteriocyte)の細胞質

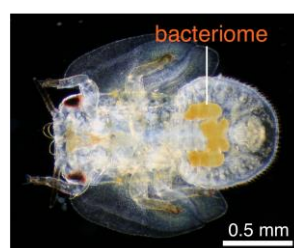


図1.
キジラミ幼虫。
腹部体腔内の
黄色いクロワッ
サン型の構造が
bacteriome。

中に *Gammaproteobacteria* に属する共生細菌、カルソネラ (*Candidatus Carsonella ruddii*) を収納している(図2)。

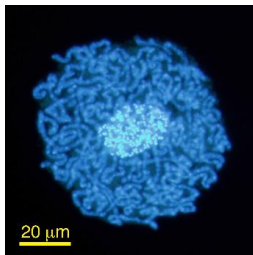


図2.
キジラミより取出した菌細胞の DAPI 染色像。中央は宿主の核で、その周りの細胞質を埋め尽くしている細長いひも状の細胞がカルソネラ。

我々の先行研究により、北米産キジラミ *Pachypsylla venusta* 由来のカルソネラのゲノムサイズは、わずか 160kb にすぎないことが明らかとなっていた (Nakabachi et al., *Science* 2006)。これは、それまで生物界で知られていた最小ゲノムの 1/3 程度と極小で、細胞内小器官である葉緑体のゲノム(120~220kb)とほぼ同等の値である。ゲノム上からはタンパク質をコードする遺伝子が 182 個しか検出されず、細胞膜や細胞壁などの合成、細胞分裂、脂質代謝、核酸代謝といった重要なプロセスにかかわる遺伝子群がほとんど存在しないなど、生命維持に必須と思われる遺伝子の多くが欠落していた。

(2) 日本を含め世界的に分布を広げつつあるミカンキジラミ *Diaphorina citri* は、カンキツ類に致命的な被害を与えるカンキツグリーニング病の病原体 *Candidatus Liberibacter spp.* (*Alphaproteobacteria*) を媒介する、きわめて重要な農業害虫である。同種は、bacteriome 内に、キジラミ類に普遍的に存在するカルソネラと、これまで同種でのみ見出されている機能未知の二次共生細菌 (*Betaproteobacteria*、今回我々が種名 *Candidatus Proffittella armatura* を提唱)の 2 種類の共生細菌を保有する (図3)。これらは、いずれも宿主昆虫の生存にとって重要な機能を持つと推察される一方、周辺環境中の他の生物には存在しないため、選択性が高く、安全で効果的な新規防除法開発の標的として期待される。

2. 研究の目的

(1) 極小ゲノムをもつオルガネラ様細菌・カルソネラの生存を支えるために、宿主菌細胞はどのような遺伝子を発現し、宿主-カルソネラ間にはどのような相互作用が存在するのか？また、二次共生細菌を含めた三者間関係についてはどうか？転写産物解析をはじめとする各種解析を行うことで、これらの問題の解明を目指す。

(2) ミカンキジラミの共生細菌 2 種のゲノム解析を行い、*P. venusta* 由来カルソネラとの比較ゲノム解析から、カルソネラゲノムの進化動態を明らかにするとともに、プロフテラの機能的意義を解明する。

3. 研究の方法

(1) *P. venusta*、*D. citri*それぞれのbacteriomeおよび虫体全体からRNAを抽出してcDNAライブラリーを作製し、次世代シーケンサー Genome Sequencer FLXシステム(Roche社)を用いたトランスクリプトーム解析を行う。転写産物ポピュレーション比較により、共生系維持に重要な役割を果たすことが示唆された遺伝子群については、RNA干渉法による発現抑制を試み、各遺伝子の機能解析を行う。

(2) *D. citri*よりbacteriomeを単離してphi29 DNAポリメラーゼによる全ゲノム増幅後、ショットガンライブラリーを作製し、カルソネラ及びプロフテラの全ゲノム塩基配列を決定する。その後、コンピュータを用いた常法により、これらのゲノム構造を解析する。

4. 研究成果

(1) カルソネラのみを持つ北米産キジラミ *Pachypsylla venusta* と、二次共生細菌を共存させるミカンキジラミ *Diaphorina citri* の bacteriome、および虫体全体から8種類の cDNA ライブラリーを作製し、次世代シーケンサー Genome Sequencer FLX システム(Roche 社)を用いたトランスクリプトーム解析を行った。得られた転写産物ポピュレーションの比較解析により、*P. venusta* と *D. citri* のいずれの bacteriome においても特異

的に高発現している遺伝子群や、両種間で異なる発現傾向を示す遺伝子群を見出すことに成功した。これらの発現について定量的RT-PCRなどで検証を進めるとともに、RNA 干渉法による発現抑制を試み、キジラミ-カルソネラの2種間共生関係、プロフテラも含めた3種間関係の維持に関わると目される宿主遺伝子群について各種情報を得、動物-細菌間共生系の維持機構について重要な示唆を得た。

(2) ミカンキジラミの共生細菌2種について全ゲノム塩基配列を決定したところ(図4)、ミカンキジラミ由来カルソネラのゲノム(174,014 bp)は、既報の *P. venusta* 由来カルソネラ(159,662 bp)と同様極小で、高いシンテニー保存性を示し、遺伝子組成は、キジラミの餌である植物師管液に乏しい必須アミノ酸の合成に特化したものであった(図5)。一方、プロフテラのゲノム(464,857 bp とやはり極小)では、栄養補償関連遺伝子が少ないのに対し、二次代謝産物の合成に関わる遺伝子群がゲノム全体の15%と広い領域を占めた(図4)。その遺伝子レパートリーや個々の遺伝子構造を手がかりとして産物を予測し(図6)、さらにその予測構造に基づく化合物の単離、生化学解析、NMR や質量分析による構造解析、培養細胞を用いた生理活性検定(図7)等を進めると、ミカンキジラミが、強い細胞増殖阻害活性を示す新規ポリケチド(ディアフォリンと命名)を微量含むことが明らかとなった。これは、プロフテラがディアフォリンを合成することで宿主キジラミを天敵などから守る「防衛共生体」であることを強く示唆する。また、世界各地より採集された806頭のミカンキジラミ全個体からプロフテラおよびそのディアフォリン合成系遺伝子群が検出された。以上の結果は、プロフテラが、宿主から排除されやすいとされてきた防衛共生体の常識を覆す、進化的に安定で極小ゲノムを持つ新しいタイプの防衛共生体であることを示す。この知見は、基礎生物学に大きなインパクトを与えるばかりでなく、新規防除法開発の基盤データとしても重要である。また、細胞増殖阻害活性を示すディアフォリンは、抗がん剤などの創薬リード化合物としての応用が期待される。

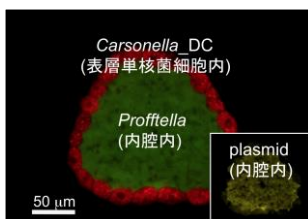


図3. ミカンキジラミ bacteriome 横断面のFISH像。

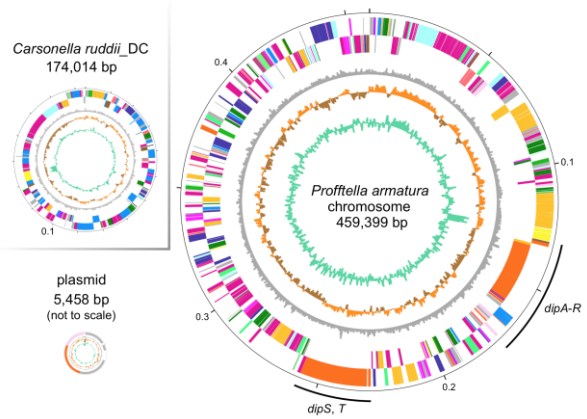


図4. ミカンキジラミ共生細菌2種のゲノム構造。

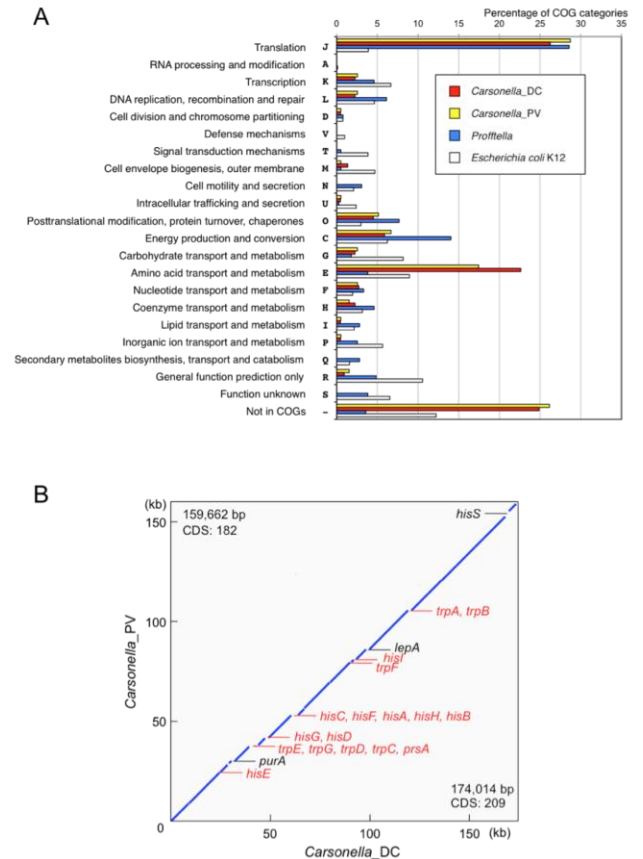


図5. カルソネラゲノムの比較解析。A. COG カテゴリーに基づく遺伝子組成比較。B. *D. citri* 系統と *P. venusta* 系統間のシンテニー。

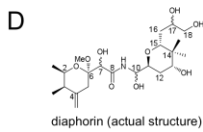
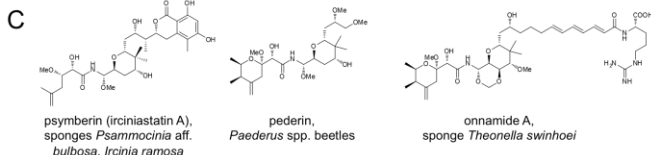
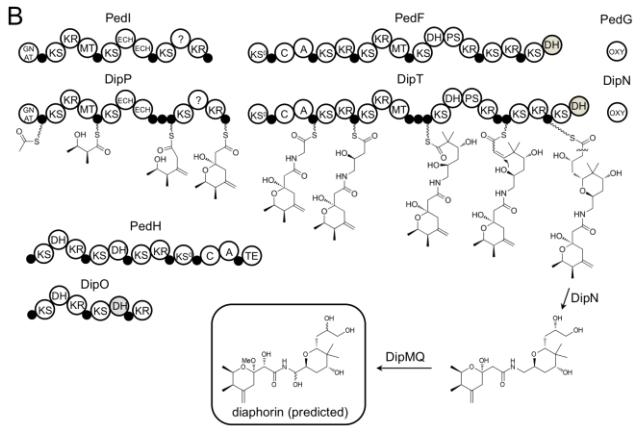
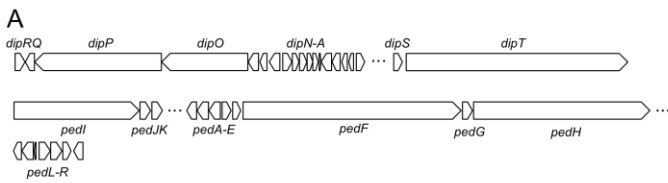


図6. プロフテラゲノムの遺伝子組成に基づく二次代謝産物予測と、予測情報を利用した化合物単離・構造解析。

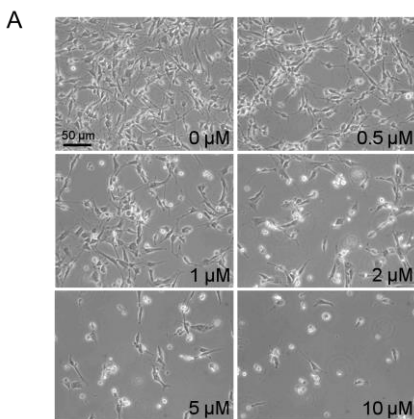
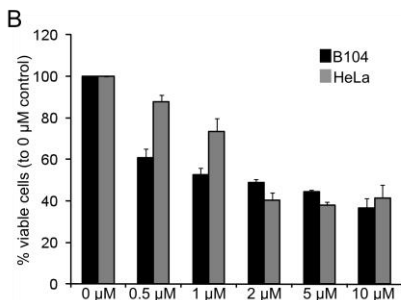


図7. ディアフォリンの生理活性試験。
A. 各濃度のディアフォリン添加後48時間培養したラットB104神経芽腫細胞。B. B104細胞及びヒトHeLa細胞に対するディアフォリンの増殖阻害効果。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計15件)

- 1) **Nakabachi A**, Ueoka R, Oshima K, Teta R, Mangoni A, Gurgui M, Oldham NJ, van Echten-Deckert G, Okamura K, Yamamoto K, Inoue H, Ohkuma M, Hongoh Y, Miyagishima SY, Hattori M, Piel J, Fukatsu T. (2013) Defensive bacteriome symbiont with a drastically reduced genome. *Curr Biol* (in press). 査読有.
- 2) **Nakabachi A**, Koshikawa S, Miura T, Miyagishima S. (2010) Genome size of *Pachypsylla venusta* (Hemiptera: Psyllidae), and the ploidy of its bacteriocyte, the symbiotic host cell that harbors intracellular mutualistic bacteria with the smallest cellular genome. *Bull Entomol Res* 100(1):27-33. 査読有.
- 3) The International Aphid Genomics Consortium (総著者数は100名を越えるため、コンソーシアム名のみを示す。研究代表者は、プロジェクト全般を主導した7名の主要著者のうちのひとり). (2010) Genome sequence of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *PLoS Biol* 8(2):e1000313. 査読有.
- 4) Nikoh N, McCutcheon JP, Kudo T, Miyagishima S, Moran NA, **Nakabachi A**. (2010) Bacterial genes in the aphid genome: Absence of functional gene transfer from *Buchnera* to its host. *PLoS Genet* 6(2):e1000827. 査読有.
- 5) **Nakabachi A**, Miyagishima S. (2010) Expansion of genes encoding a novel type of dynamin in the genome of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Insect Mol Biol* 19(s2):165-173. 査読有.
- 6) **Nakabachi A**, Shigenobu S, Miyagishima S. (2010) Chitinase-like proteins encoded in the genome of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Insect Mol Biol* 19(s2):175-185. 査読有.

- 7) Shigenobu S, Richards S, Cree AG, Morioka M, Fukatsu T, Kudo T, Miyagishima S, Gibbs RA, Stern D, **Nakabachi A**. (2010) A full-length cDNA resource for the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Insect Mol Biol* 19(s2):23-31. 査読有.
- 8) Tamborindéguy C, Monsion B, Brault V, Hunnicutt L, Ju HJ, **Nakabachi A**, Van Fleet E. (2010) A genomic analysis of transcytosis in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, a mechanism involved in virus transmission. *Insect Mol Biol* 19(s2):259-272. 査読有.
- 9) Gerardo NM, Altincicek B, Anselme C, Atamian H, Barribeau SM, de Vos M, Duncan EJ, Evans JD, Gabaldón T, Ghanim M, Heddi A, Kaloshian I, Latorre A, Moya A, **Nakabachi A**, Parker BJ, Pérez-Brocal V, Pignatelli M, Rahbé Y, Ramsey JS, Spragg C, Tamames J, Tamarit D, Tamborindéguy C, Vincent-Monegat C, Vilcinskis A. (2010) Immunity and other defenses in pea aphids, *Acyrtosiphon pisum*. *Genome Biol* 11(2): R21. 査読有.
- 10) Ramsey JS, MacDonald SJ, Jander G, **Nakabachi A**, Thomas GH, Douglas AE. (2010) Genomic evidence for complementary purine metabolism in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, and its symbiotic bacterium *Buchnera aphidicola*. *Insect Mol Biol* 19(s2):241-248. 査読有.

[学会発表] (計 13 件)

- 1) **Nakabachi A**, Ueoka R, Oshima K, Teta R, Mangoni A, Gurgui M, Oldham NJ, van Echten-Deckert G, Okamura K, Yamamoto K, Inoue H, Ohkuma M, Hongoh Y, Miyagishima SY, Hattori M, Piel J, Fukatsu T. Functions and evolution of a dual bacterial symbiosis in a serious citrus pest, *Diaphorina citri*. 第 28 回日本微生物生態学会大会 2012 年 9 月 20 日~21 日 豊橋技術科学大学 (豊橋)
- 2) **Nakabachi A**. Aphids acquired symbiotic

genes from bacteria. XXIV International Congress of Entomology Aug. 20, 2012. (Daegu, Korea)

- 3) 中鉢淳、上岡麗子、大島健志朗、Alfonso Mangoni、Mihaela Gurgui、Neil Oldham、Gerhild van Echten-Deckert、井上広光、大熊盛也、本郷裕一、宮城島進也、服部正平、Jörn Piel、深津武馬. ミカンキジラミの防衛共生. 第 56 回日本応用動物昆虫学会大会 2012 年 3 月 28 日 近畿大学 (奈良)
- 4) 中鉢淳、大島健志朗、上岡麗子、Alfonso Mangoni、Mihaela Gurgui、Neil Oldham、Gerhild van Echten-Deckert、井上広光、大熊盛也、本郷裕一、宮城島進也、Jörn Piel、服部正平、深津武馬. ミカンキジラミ共生細菌 2 種のゲノム構造と機能的役割. 第 6 回日本ゲノム微生物学会年会 2012 年 3 月 10 日 立教大学 (東京)
- 5) **Nakabachi A**. The obligate symbiosis in aphids: a promising target for highly selective pest control. The Asia-Pacific Interdisciplinary Research Conference 2011. Nov. 18, 2011. Toyohashi University of Technology (Toyohashi).
- 6) 中鉢淳、大島健志朗、宮城島進也、服部正平、深津武馬. ミカンキジラミ必須共生細菌 2 種のゲノム解析. 第 5 回日本ゲノム微生物学会年会 2011 年 3 月 14 日 東北学院大学 (仙台)
- 7) 中鉢淳. 宿主昆虫と必須共生細菌のゲノム進化. 日本進化学会大会第 12 回大会 2010 年 8 月 3 日 東京工業大学 (東京)

[その他]

ホームページ

<http://www.eiiris.tut.ac.jp/nakabachi.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中鉢 淳 (NAKABACHI ATSUSHI)

豊橋技術科学大学・エレクトロニクス先端融合研究所・准教授

研究者番号：40332267