

## 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 6 月 3 日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22687018

研究課題名（和文） 共生による新規性創出の遺伝子基盤の解明

研究課題名（英文） Genetic basis of novelty generation by symbiosis

研究代表者

重信 秀治 (SHIGENOBU SHUJI)

基礎生物学研究所・生物機能解析センター・特任准教授

研究者番号：30399555

研究成果の概要（和文）：本研究ではアブラムシとその細胞内共生細菌をモデルに用いて、共生による新規性創出の遺伝子基盤の解明を目指した。次世代シーケンシングなどの新技術を用いた探索の結果、宿主昆虫が共生器官で大量に発現する新規の分泌ペプチド群を発見し BCR ファミリーと命名した。ある BCR は細菌の増殖に影響を与えることもわかった。BCR はアブラムシ類のみが持つ遺伝子群であるが、宿主が共生細菌を制御するためにアブラムシの系統で特異的に進化した遺伝子かもしれない。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study is to decipher genetic basis of novelty generation by symbiosis using aphid-Buchnera endosymbiosis as a model system. Taking an advantage of new technologies such as next-generation sequencing, we discovered novel secreted peptides that were preferentially expressed in the symbiotic organ of the host insects. The novel secreted peptides were designated BCR family. We also found that a member of BCR affect the growth of bacteria. These data suggest that aphids evolved novel secreted proteins for symbiosis with bacterial endosymbiont.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2011年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2012年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
年度			
年度			
総計	19,800,000	5,940,000	25,740,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：発生生物学

キーワード：進化発生、共生

### 1. 研究開始当初の背景

「共生」は生物が新規機能を獲得する上で重要な役割を果たしている。例えば、ヒトを含む多くの多細胞生物は体内に共生微生物を保有しており自前で合成できない栄養分を共生微生物から得ており（代謝的新規性）、ある種の魚類は発光微生物を保持して発光

器官を形成する（機的新規性）(Smith 1989; Gilbert 2008)。このような共生の現象とその適応進化への寄与については広く研究されている一方で、これら新規性創出の遺伝子基盤についてはほとんど分かっていなかった。

本研究では、昆虫特にアブラムシの mycetome をモデルに新規性創出の遺伝子基

盤を解明する。mycetome とは共生微生物を格納するための特別な器官（以下共生器官と称す）であり、数多くの昆虫に観察される。アブラムシの共生器官は巨大細胞（ $\phi$  100 $\mu$ m）数十個から構成され、それぞれの細胞質に数万の共生細菌を保有している。この細胞の中で宿主と細菌が協調的にアミノ酸合成を行っている（Douglas 1998）。宿主と共生細菌は、生理的にも解剖構造的にもまるでひとつの生物のように統合化されている。申請者自身により宿主昆虫と共生細菌両方のゲノムが解読されているのみならず（Shigenobu 2000 Nature; IAGC 2009 PLoS Biol, in revision）、様々なポストゲノム研究のリソース・技術の開発が急速に進んでいることから、アブラムシ共生系は遺伝子レベルの共生研究に理想的な研究プラットフォームである。

## 2. 研究の目的

アブラムシ共生系における2つの「新規性」に注目する：1) 共生器官の発生プログラム＝構造的な新規性、2) アミノ酸の協調的生合成＝代謝的新規性、これらの新規性を支える遺伝子ネットワークを明らかにする。それぞれの素過程に関わるキー遺伝子を同定する。

## 3. 研究の方法

### (1) 研究1：RNA-seq法による、アブラムシ共生器官に高発現している遺伝子の網羅的同定

共生器官のRNA-seq（次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析法）を行う。イルミナのGenome Analyzerを利用し、シングルエンド36bpのシーケンシングを行った。

### (2) 研究2：共生器官の発生を制御する転写因子D11の制御する遺伝子ネットワークの解明

これまでに、共生器官に選択的に発現する転写因子Distal-less (D11)を同定しており。D11は、いくつかの傍証から協調的発生プロセスを制御するmaster geneである可能性が高いので、ChIP-seqによるD11の標的配列・遺伝子の同定を試みた。

### (3) 研究3：アブラムシ特異的分泌タンパク質の機能解析

RNA-seqにより共生器官で多数のアブラムシ特異的遺伝子が高発現していることを見いだしていた。アミノ酸配列からの機能予測は

できなかったが、興味深いことに、これらの遺伝子の全てのN末にシグナルペプチドがコードされていた。つまり、これらは新規の分泌タンパク質＝シグナル因子である。これらの遺伝子の時空間的発現パターンをRNA in situ hybridization法で明らかにする。さらにアミノ酸配列の分子進化解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 研究1：RNA-seq法による、アブラムシ共生器官に高発現している遺伝子の網羅的同定

共生器官とコントロールとしての全虫体のRNA-seqを行い、それぞれ2200万、1300万リードが得られた（36bp）。アブラムシゲノムにマッピングしたところ両者ともに約8割がマッピングされ、共生器官と全虫体を比較することにより、共生器官に高発現している遺伝子を同定することができた。その中に、研究3で着目する、アブラムシ特異的分泌タンパク質が多く見いだされた。

### (2) 研究2：共生器官の発生を制御する転写因子D11の制御する遺伝子ネットワークの解明

D11のChIP-seqを行ったが信頼に足るChIP-seqのデータを得ることができなかった。おそらくカスタム抗体の質がChIPに不十分であり、十分量のクロマチンを得ることができなかったことが原因と考えられた。新たに別の方法でカスタム抗体を作成したが、改善が見られなかった。

### (3) 研究3：アブラムシ特異的分泌タンパク質の機能解析

上記研究1によって、次世代シーケンサーを使った共生器官のトランスクリプトーム解析により共生器官に選択的に発現する遺伝子を探索し、アブラムシ特異的な新規分泌タンパク質ファミリーを発見した。これらは、100アミノ酸残基以下の短いペプチドをコードし、分泌シグナル配列をN末に持ち、C末側にシステインを6個もしくは8個持つ特徴的な一次構造を持っており、BCR遺伝子群と命名した。

これらのタンパク質10種類以上のmRNA発現パターンをin situ hybridizationで調べた。その結果、すべての分泌タンパク質が同一の時空間発現パターンを示すことが明らか

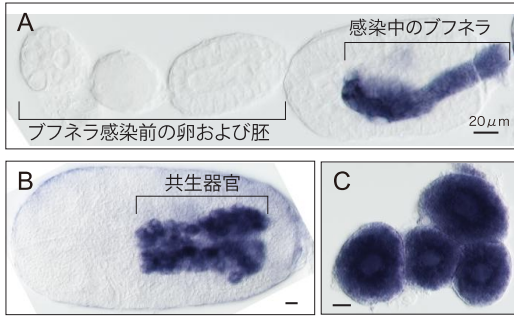


図 BCR4の発現パターン

A: BCR4はアブラムシ初期胚においてちょうどブフネラが感染する時期に発現を開始する  
 B: アブラムシ後期胚。バクテリオサイトに特異的に発現している  
 C: 成虫のバクテリオサイト

になった。つまり、胚発生における stage7 と呼ばれる cellular blastoderm に相当する時期—興味深いことにこの時期に共生細菌が母から胚に感染する—に共生器官原基の予定核の近傍で発現を開始し、以降、共生器官でのみ特異的に高レベルで発現する (図参照)。さらに、分子進化的解析を行ったところ、これらの新規分泌タンパク質はお互い一時配列はあまり似ていないが、システイン残基が多い点等似た特徴を共有することがわかった。

さらに、BCR 遺伝子の機能解析に向けて BCR リコンビナントタンパク質の発現と精製を試みた。試行錯誤の上、酵母の大量発現系を利用することにより、いくつかの BCR の発現と精製に成功し、1 つの BCR についてはこれを抗原に抗体を作成した。またある BCR を大腸菌に添加したところ細胞膜の透過性を変化させる活性があることが明らかになった。

システインリッチ分泌ペプチドは動植物に広く見られ、コミュニケーションや異種間相互作用に関わっている。例えばマメ科植物タルウマゴヤシの根粒の内部では 400 以上のシステインリッチ短ペプチドが組織特異的に発現し、これらの一部は共生細菌の内部まで運ばれて共生の確立と維持に必要である。アブラムシの共生系でも同様な共生システムの制御が BCR を介して成されているのではないかと考えられる。

## 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 6 件)

(すべて査読有)

- ① Shigenobu, S. and Stern, D. (2013) Aphids evolved novel secreted

proteins for symbiosis with bacterial endosymbiont. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. 280, 20121952.

DOI: 10.1098/rspb.2012.1952

- ② Tokuda, G., Elbourne, L. D. H., Kinjo, Y., Saitoh, S., Sabree, Z., Hojo, M., Yamada, A., Hayashi, Y., Shigenobu, S., Bandi, C., et al. (2013). Maintenance of essential amino acid synthesis pathways in the *Blattabacterium cuenoti* symbiont of a wood-feeding cockroach. Biol. Lett. 9, 20121153.  
 DOI: 10.1098/rsbl.2012.1153
- ③ Hojo, M., Maekawa, K., Saitoh, S., Shigenobu, S., Miura, T., Hayashi, Y., Tokuda, G., Maekawa, H. (2012) Exploration and characterization of genes involved in the synthesis of diterpene defence secretion in nasute termite soldiers. Insect Mol Biol. 21, 545-557  
 DOI:10.1111/j.1365-2583.2012.01162.x
- ④ Gallot, A., Shigenobu, S., Hashiyama, T., Jaubert-Possamai, S. & Tagu, D. Sexual and asexual oogenesis require the expression of unique and shared sets of genes in the insect *Acyrtosiphon pisum*. BMC Genomics 13, 76 (2012).  
 DOI:10.1186/1471-2164-13-76
- ⑤ Shigenobu, S., & Wilson, A. C. C. (2011). Genomic revelations of a mutualism: the pea aphid and its obligate bacterial symbiont. Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS, 68(8), 1297-1309.  
 DOI:10.1007/s00018-011-0645-2
- ⑥ Price, D., Duncan, R., Shigenobu, S., Wilson, A. (2011) Genome expansion and differential expression of amino acid transporters at the aphid/*Buchnera* symbiotic interface. Mol Biol Evol 28, 3113-3126  
 DOI:10.1093/molbev/msr140

[学会発表] (計 10 件)

- ① 重信秀治 Aphids evolved novel secreted proteins for symbiosis with bacterial

endosymbiont 第 57 回日本応用動物昆虫学会大会 2013 年 03 月 27 日～2013 年 03 月 29 日 日本大学湘南キャンパス(神奈川県藤沢市)

- ② 重信秀治 次世代シーケンシング技術と非モデル生物がもたらす分子生物学の未来 第 35 回日本分子生物学会年会(招待講演) 2012 年 12 月 11 日～2012 年 12 月 14 日 福岡国際会議場(福岡県福岡市)
- ③ Shuji Shigenobu. Aphid bactreocytes, a model system to study evolutionary and developmental novelty through symbiosis. 2012 APDBC Satellite Meeting on EvoDevo (招待講演) 2012 年 10 月 05 日～2012 年 10 月 05 日 Taiwan
- ④ 重信秀治 次世代シーケンシング時代のアブラムシ研究戦略 日本アブラムシ研究会第 2 回研究集会 2012 年 08 月 10 日～2012 年 08 月 11 日 岡崎コンファレンスセンター(愛知県岡崎市)
- ⑤ 重信秀治 共生のゲノム科学:アブラムシ細胞内共生系をモデルとして 植物微生物研究会第 22 回研究交流会(招待講演) 2012 年 09 月 25 日～2012 年 09 月 27 日 神戸大学(兵庫県神戸市)
- ⑥ 重信秀治 Convergent evolution of novel secreted proteins in the aphid-bacterium symbiosis and plant-bacterium symbiosis. 日本新か学会第 13 回大会 2011 年 7 月 29-31 日 京都大学(京都)
- ⑦ 重信秀治 Convergent Evolution of Novel Secreted Proteins in the Aphid-bacterium Symbiosis. 日本動物学会第 82 回大会 2011 年 9 月 21-23 日 旭川市大雪クリスタルホール(北海道)
- ⑧ 重信秀治 The pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*: an emerging model organism for ecological, developmental and evolutionary studies 日本進化学会第 12 回大会 2010 年 8 月 2 日-5 日 東京工業大学(東京)
- ⑨ 重信秀治 The pea aphid, *Acyrtosiphon*

*pisum*: an emerging model organism for ecological, developmental and evolutionary studies 日本動物学会第 81 回大会 2010 年 9 月 23 日-25 日 東京大学(東京)

- ⑩ Shuji Shigenobu. Genomic revelations of a mutualism: the pea aphid and its obligate bacterial symbiont 国際生物学賞記念シンポジウム 2010 年 12 月 7-8 日 つくば国際会議場(茨城)

[図書] (計 1 件)

- ① 重信秀治 2012 年「共生なくしてわれわれはなかった」地球外生命 9 の論点(立花隆、佐藤勝彦ほか共著) 講談社(東京)

[その他]

ホームページ

[http://www.nibb.ac.jp/sections/nibb\\_core\\_research\\_facilities/shigenobu/](http://www.nibb.ac.jp/sections/nibb_core_research_facilities/shigenobu/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

重信秀治 (SHIGENOBU SHUJI)

基礎生物学研究所・生物機能解析センター・特任准教授

研究者番号: 30399555

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし