

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：17104

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657133

研究課題名（和文）細胞内共生細菌ボルバキアのオルガネラコミュニケーション

研究課題名（英文）Organelle communication of endosymbiotic bacterium *Wolbachia*

研究代表者

北田 栄 (Kitada Sakae)

九州工業大学・大学院情報工学研究院・准教授

研究者番号：20284482

研究成果の概要（和文）：ボルバキアは、節足動物や線虫類の細胞内に共生する細菌だが、安定的に宿主細胞内に共生する分子メカニズムは分かっていない。本研究では、ボルバキアのゲノムにコードされている機能未知な推定タンパク質が共生に関係している可能性が高いボルバキアに特異的な遺伝子を、全ゲノム配列が決定しているボルバキア 5 種のゲノムに対する生物情報学的解析からを同定 WOP1 (*Wolbachia* hypothetical protein 1)、WOP2、WOP3 し、その遺伝子の発現を実験的解析により明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Although *Wolbachia* are intracellular symbiotic bacteria in mainly insect cells, it is unknown how the bacteria stably inhabit in eucaryotic cells. Here we identified three unique genes, named *Wolbachia* hypothetical protein 1 (WOP1)、WOP2、WOP3, from bioinformatic analyses with BRAST comparison between five genomes of *Wolbachia*. The genes seemed to express in the message level under co-culture with insect cell lines.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：ボルバキア、オルガネラ、ミトコンドリア、共生、昆虫

1. 研究開始当初の背景

ボルバキア (*Wolbachia*) は細胞内寄生細菌の一属で、約 70% の昆虫やフィラリアでその感染が確認されている。遺伝子による分類上では、リケッチア (節足動物を媒介してヒトなどに感染) の一種と考えられる^[1]。ボルバキアは主に昆虫などの卵細胞に共生し、子孫へ伝播していく。この点ではミトコンドリアの母性遺伝とよく似ている。ボルバキアによる宿主への影響には、「雄殺し」、「雄の雌化」などがある。このような現象は農学分野でいち早く注目され、生物学的防除による害虫駆

除として、ボルバキアを利用しようとする研究が進められている。

近年、ボルバキアゲノム DNA がショウジョウバエ染色体に転移していることが発見された^[2]。このような遺伝子の転移は、ミトコンドリアなどの共生進化の過程でも起きたと考えられ興味深い。今年、ボルバキアがトコジラミ (南京虫) の生存に必須であり、その生理機能が必須栄養素ビタミン B 類の供給にあることが報告された^[3]。ただし、ボルバキアが引き起こす様々な生命現象やそのゲノム

DNA 解読に比べ、その細胞生物学的な解析はほとんど進んでいない。

研究代表者はこれまでミトコンドリアの形成とその共生進化に関する研究を進めてきた^{〔4〕}。一方、害虫の生物学的防除に用いられている Bt 菌毒素の研究も行っている^{〔5〕}。代表者はオルガネラと微生物を対象とした研究活動からボルバキアが存在を知り、その細胞生物学における学術的問題、特に細胞内オルガネラ相互作用について萌芽的研究の可能性を感じている。

2. 研究の目的

ボルバキアとオルガネラの相互作用を細胞生物学からとらえ、次の問題点を解明する。

- (1) ボルバキアは核などのオルガネラと情報伝達しているのか？
- (2) ボルバキアは宿主細胞内との間で物質交換や代謝系で相互作用はあるか？
- (3) ボルバキアはどのようにして安定的に宿主細胞内に存在しているのか？

謎が多かった細胞内共生細菌は、この10年余りの間にその実像が明らかとなってきた。しかし、細胞レベルでの理解はあまり進んでいない。これから発展性が期待される研究分野である。遺伝子の相同性の比較からボルバキアはミトコンドリアに最も近縁の細菌である。よって、ボルバキアを知ることはミトコンドリアの共生進化を理解する上でも重要であると考えられる。一方、ボルバキアの細胞生物学的理解は、害虫防除やファイラリアなどの生物制御に貢献することも目的とする。

3. 研究の方法

(1) ボルバキア-昆虫培養細胞系の確立

ボルバキアの研究は、細菌が感染した個体やそこから取り出した卵を用いた解析が一般的であった。詳細な細胞生物学的研究のためには、安定的にボルバキアが感染している真核生物の培養細胞系の確立が重要である。この細胞の樹立のため以下の2つの方法を行う。

① 培養昆虫細胞へのボルバキアの感染による培養共生細胞系の確立

昆虫培養細胞として *Spodoptera frugiperda* (ガの一種) 卵巣由来の BmN4 細胞を用いた。これらの細胞に昆虫から分離したヒメトビウンカ由来のボルバキア (を感染させ^{〔6〕}、ボルバキアがそのまま細胞に感染するか検討した。感染細胞の株化は細胞からのボルバキア遺伝子を PCR で検出することによって感染を確認した。

共生微生物の宿主細胞内での生存戦略は？

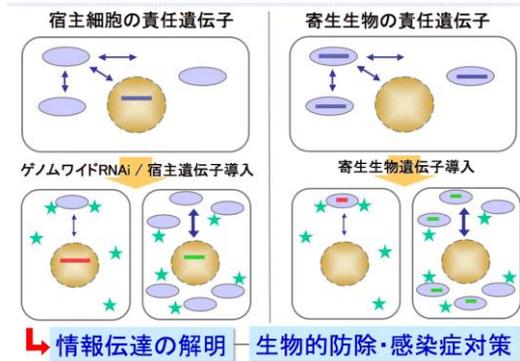


図1 細胞内共生細菌の生存戦略と研究

② ボルバキア感染卵を用いた培養細胞株の樹立

ボルバキア感染した昆虫の卵細胞を受精させ胚を得る。胚細胞を分離培養し、安定的に継代できる細胞系を樹立を試みた。感染細胞は上記の PCR 方法で確認する。一方、感染細胞に GFP 遺伝子を組み込んだプラスミド DNA を導入してボルバキアを形質転換し、感染マーカーとして利用することを検討した。

(2) 生物情報学的解析によるボルバキア特異的遺伝子の解析

全ゲノム配列が決定しているウォルバキアは、オナジショウジョウバエ由来 wRi、マレー糸状虫由来 wBm、ネッタイシマカ由来 wPi、キイロショウジョウバエ由来 wMel、オンコセルカ由来 wOo の 5 種がある。wRi の ORF 全てのアミノ酸配列データを他の 4 種それぞれに対して BLAST 解析を行い、相同性の高い遺伝子を特定した。残りの 4 種においても同様の BLAST 解析を行い、5 種のウォルバキアのゲノムに保存されている遺伝子を網羅的に解析した。

4. 研究成果

カイコ卵巣由来の BmN4 細胞と、ヒメトビウンカを宿主とするウォルバキアに感染した aff3 細胞を用いて、培養と継代を行った。まず、ウォルバキアに感染した aff3 細胞から BmN4 細胞へのウォルバキアの接触感染を行った。感染はボルバキアの rRNA 遺伝子、FtsZ 遺伝子に対する PCR 法で確認した。初期継代 1 週間から数 10 継代にわたって、BmN4 細胞にボルバキアが安定的に共生していることがわかった。感染はボルバキアの rRNA 遺伝子、FtsZ 遺伝子に対する PCR 法で確認した。

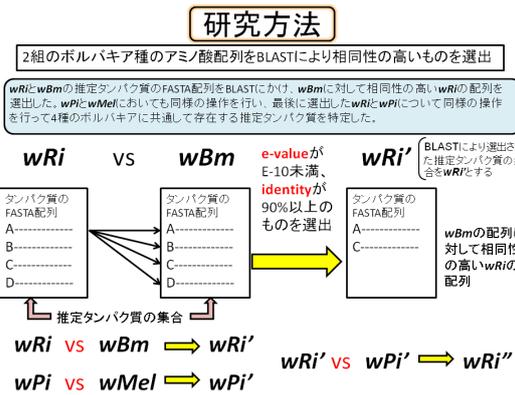
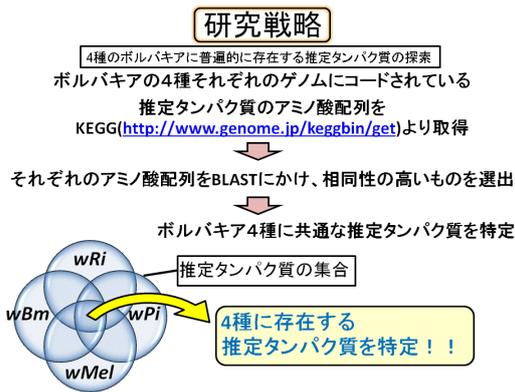


図2 生物情報学的解析の概要

初期継代1週間から数10継代にわたって、BmN4細胞にボルバキアが安定的に共生していることがわかった。ボルバキア感染した昆虫の胚から安定的に継代できる細胞系を樹立は今回行うことができなかった。一方、感染細胞にGFP遺伝子を組み込んだプラスミドDNAを導入してボルバキアを形質転換も現時点で調査段階となった。また、先の報告をもとにウォルバキアをマウス培養細胞に作用させたところ、本来、接着細胞であるマウスの細胞の接着性が大きく低下し、培養細胞の形態に変化を与えたが、マウス細胞にウォルバキアが感染しているかは確定できていない。

全ゲノム配列が決定しているウォルバキア5種それぞれの推定タンパク質群のアミノ酸配列データをKEGGデータベースから得た。5種のアミノ酸配列データを全ての組み合わせにおいてBLAST検索を行いidentityが90%以上の配列を選別した結果、4種のウォルバキアのゲノムに共通して保存されている3つの推定タンパク質を特定した。それら3つの推定タンパク質の一次構造からヒドロパシー分析を行ったところ、疎水性領域は少なく、いずれも可溶性のタンパク質である可能性が高いことが分かった。

次に、今回特定した3つの推定タンパク質がウォルバキアのゲノムにコードされていることを検証するために、それぞれ遺伝子に対す

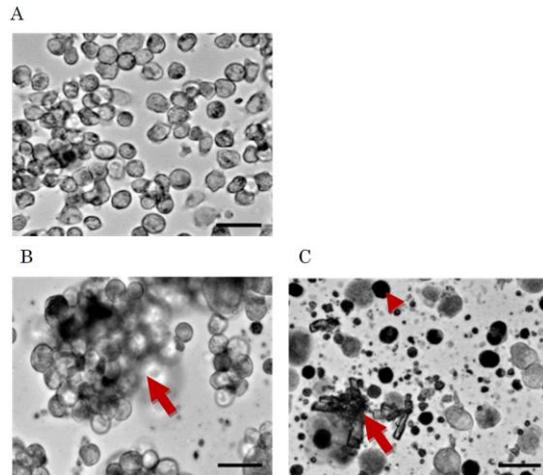


図3 ボルバキア感染ガ卵細胞の形態変化

るプライマーを設計しPCRを行った。その結果、どの遺伝子においても目的のPCR生成物が検出されたため、3つの推定タンパク質がゲノムにコードされていることが確認できた。今回特定した3つの推定タンパク質が細胞内で発現していれば、それらがウォルバキアの共生の分子機構に関係している可能性は高い。

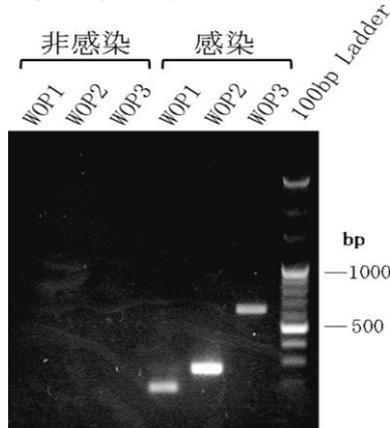


図4 PCRによるボルバキア遺伝子の検出

【引用文献】

- (1) 野田博明、生物科学、51、143-158 (1999)
- (2) Laven, H. *Nature* **177**, 141-142 (1956)
- (3) Hosokawa T *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 107, 769-774 (2010)
- (4) **Kitada, S.** *et al.* A Protein from a Parasitic Microorganism, *Rickettsia prowazekii*, Can Cleave the Signal Sequences of Proteins Targeting Mitochondria. *J. Bacteriol.* **189**, 844-850 (2007).
- (5) **Kitada, S., et al.** Cytocidal Actions of Parasporin-2, an Anti-tumor Crystal Toxin from *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* **281**, 26350-26360 (2006)
- (6) 野田博明 博士 (農業生物資源研究所)

から供与

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)

[学会発表] (計5件)

- ① 狩野貴之、鮫島結香、斉藤浩之、水城英一、北田 栄、ヒトすい臓がん細胞に作用する新規パラスポリン産生Bt菌株のスクリーニング、第5回パラスポリン研究会、2012年12月08日、崇城大学(熊本市)
- ② 岩崎新司、大林隆志、木村雄作、麻崎一哉、北田有美子、北田 栄、直腸がん移植マウスに対するパラスポリン2腹腔内投与の抗がん効果、第5回パラスポリン研究会、2012年12月08日、崇城大学(熊本市)
- ③ 木村雄作、北田有美子、日下雅友、北田 栄、抗がん性タンパク質パラスポリン2のマウスに対する毒性の解明、第5回パラスポリン研究会、2012年12月08日、崇城大学(熊本市)
- ④ 吉田裕介、嶋田拓靖、北田 栄、細胞膜傷害を示すパラスポリン2複合体の構造決定に向けた解析、第5回パラスポリン研究会、2012年12月08日、崇城大学(熊本市)
- ⑤ 浦 渉太、杉原 真、鮫島結香、井上雅広、北田 栄、トリパノソーマに対するパラスポリン2の毒性作用、第5回パラスポリン研究会、2012年12月08日、崇城大学(熊本市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.bio.kyutech.ac.jp/~kitada/>
北田 栄 サイエンス・カフェ 「あなたも毒素を食べています?」、2012年12月14日、九州工業大学飯塚キャンパス喫茶

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北田 栄 (Kitada Sakae)

九州工業大学・大学院情報工学研究院・准教授

研究者番号：20284482