

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：82105

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23657163

研究課題名(和文) マツノマダラカミキリのゲノム上に存在する共生細菌由来遺伝子群の機能解析

研究課題名(英文) Analysis of function of endosymbiotic bacteria, Wolbachia, genes on the genome of *Monochamus alternatus*.

研究代表者

相川 拓也 (Aikawa, Takuya)

独立行政法人森林総合研究所・東北支所・主任研究員

研究者番号：90343805

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：既往の研究により、マツ材線虫病の媒介昆虫であるマツノマダラカミキリの染色体上には、昆虫類の共生細菌ボルバキアの遺伝子が大規模に転移していることが明らかにされている。本研究では、マツノマダラカミキリ成虫の各組織からRNAを抽出し、トランスクリプトーム解析を行うことにより、マツノマダラカミキリに転移したボルバキア遺伝子の発現の有無を明らかにするための実験を行った。その結果、マツノマダラカミキリの各組織から、ボルバキア由来と思われる配列が複数確認され、その数は組織間で大きく異なっていた。このことは、ボルバキア由来の遺伝子の一部は宿主昆虫の体内において発現している可能性があることを示唆している。

研究成果の概要(英文)： *Monochamus alternatus* is the longicorn beetle notorious as a vector of the pinewood nematode that causes the pine wilt disease. This insect carries many Wolbachia genes on an autosome. In this study, The RNA was extracted from each tissue of the insect, transcriptome analysis was conducted to clarify the presence or absence of the expression of Wolbachia genes. Several arrays that seem to be derived from Wolbachia genes in each tissue were detected, the number of the arrays was different between the tissues remarkably. This result suggests that some of the Wolbachia genes transferred to *M. alternatus* have been expressed in the insect.

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：マツノマダラカミキリ ボルバキア 遺伝子水平転移 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

生物の遺伝子は親から子へと伝えられ、延々とその子孫に受け継がれる。これは遺伝子の垂直伝播と呼ばれ、どの生物でも普遍的に見られる遺伝子の継承機構である。その一方で、遺伝子が生物の種の壁を越えて全く関係のない他の生物へ伝えられる現象も知られており、これは遺伝子の水平転移と呼ばれている。この遺伝子の水平転移は垂直伝播のような一般的な現象とは異なり、単細胞の下等生物間で偶発的に起こるごく稀な現象であると長い間考えられてきた。

しかし近年のゲノム解析の飛躍的な進展により、下等生物だけでなく多細胞の高等生物からも水平転移により獲得したと思われる遺伝子が少しずつ見つかるようになってきた。そして近年、昆虫から検出された細菌由来の遺伝子とその昆虫体内で機能している例が発見された(Nikoh and Nakabachi 2009)。この事実は、高等生物が水平転移により得た他の生物の遺伝子を使って新しい機能を獲得したことを意味している。

そのような中、昨年申請者らはカミキリムシの一種でマツ材線虫病の媒介昆虫として知られる“マツノマダラカミキリ”の染色体上に、昆虫類の共生細菌“ボルバキア”の遺伝子が大規模に転移していることを発見した(Aikawa et al. 2009)(図1)。もし、こ

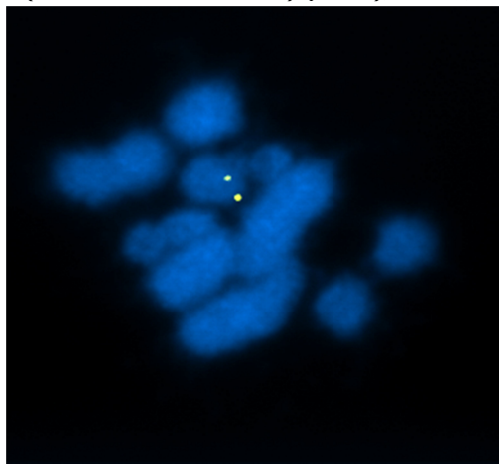


図1. マツノマダラカミキリの染色体(青色)上に存在するボルバキアの遺伝子(黄色シグナル)。

れらのボルバキアの遺伝子も宿主昆虫体内で機能しているならば、それは高等生物における新たな機能の獲得に遺伝子水平転移が大きく貢献していること裏付ける貴重な証拠となる。このような発想から本研究の提案に至った。

2. 研究の目的

これまでの我々の研究により、マツノマダラカミキリの染色体にはボルバキアの遺伝子の約14%(以上)が転移していることが明らかになっている(Aikawa et al. 2009)。本研究の目的は、マツノマダラカミキリの染色体上に大規模に転移しているボルバキア

由来の遺伝子群の中に、宿主昆虫に利用されている遺伝子があるかどうかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1)人工飼料を使ったマツノマダラカミキリの飼育:

H24年度に行う予定のマツノマダラカミキリのトランスクリプトーム解析に用いる成虫体を大量に確保するため、供試昆虫の人工飼育に取り組んだ。まず、H23年4月にマツノマダラカミキリが寄生している野外のマツ枯死木を伐倒後玉切りにし、それらの丸太を網室に入れた。6月から8月の間に羽化したマツノマダラカミキリ成虫を採集し、約1カ月間個別飼育して新鮮なアカマツの枝を与え、性成熟させた。性成熟後のマツノマダラカミキリ成虫は雌雄1頭ずつペアにしてマツの丸太に産卵させた。産卵丸太は週に2回程度新しものと交換した。マツノマダラカミキリは産卵すると「産卵痕」という傷を残すので、丸太のどの位置に卵があるのかをすぐ知ることができる。カッターおよびピンセットを用いて丸太の産卵痕付近の樹皮を剥ぎ、その樹皮下にある卵を取り出し、シャーレに並べて25℃で保温した。孵化した幼虫は1頭ずつ人工飼料に入れ25℃の温度条件下で飼育した(図2)。終齢幼虫まで发育した個体は、休眠を覚醒させるために順次10℃の恒温室に入れ保管した。



図2. マツノマダラカミキリ幼虫を人工飼料上で飼育している様子(飼育開始から約4週間経過した状態)。孵化後約2ヶ月半から3ヶ月で終齢幼虫になる。

(2)マツノマダラカミキリ成虫各組織からのRNA抽出およびトランスクリプトーム解析:

マツノマダラカミキリ成虫を人工飼育により作出し、それらの各組織から抽出したRNAをトランスクリプトーム解析に供試した。まず、マツノマダラカミキリ雌雄成虫をペアにして交尾させ、産卵用丸太に産卵させた。産卵丸太は週に2回ほど新しいものと交換し

た。卵は丸太の樹皮を剥いで取り出し、シャーレに並べて25℃で保温した。孵化幼虫は1頭ずつ人工飼料に入れ、終齢幼虫になるまで发育させた。得られた終齢幼虫は順次10℃で保管し休眠を覚醒させた。約3ヶ月後、終齢幼虫を1頭ずつ湿らせた濾紙を敷いたシャーレに移し成虫になるまで25℃で保管した。羽化したマツノマダラカミキリ成虫を1頭ずつプラスチック容器に移し、餌となるマツの枝を与えて2週間から3週間ほど性成熟するまで飼育した。性成熟したマツノマダラカミキリ雌雄成虫を解剖し、精巣、卵巣、筋肉、消化管を取り出し、各組織別にRNAを抽出した。その後、それらのRNAサンプルを用いてトランスクリプトーム解析を行った。

(3) トランスクリプトーム解析によるボルバキア由来遺伝子の探索：

トランスクリプトームのデータを整理し、その解析を進めた。相補的DNA(cDNA)シーケンスの結合をおこない、相同性検索によってボルバキアの水平転移遺伝子由来のものがあるかどうかを調べた。

4. 研究成果

(1) 上記の方法で、約200頭のマツノマダラカミキリ終齢幼虫を確保できた。

(2) 得られたマツノマダラカミキリ終齢幼虫を10℃の低温下で、3ヶ月間保管することで休眠を覚醒させた。その後1頭ずつシャーレに移し、再び25℃に加温して成虫になるまで发育させた。得られた成虫には新鮮なマツの枝を2~3週間ほど与え、性成熟するまで飼育した。その後、成虫から精巣、卵巣、筋肉、消化管を組織別に取り出し(図3)、それらの組織からRNAを抽出した。そのRNAサンプルを用いてトランスクリプトーム解析を行った。

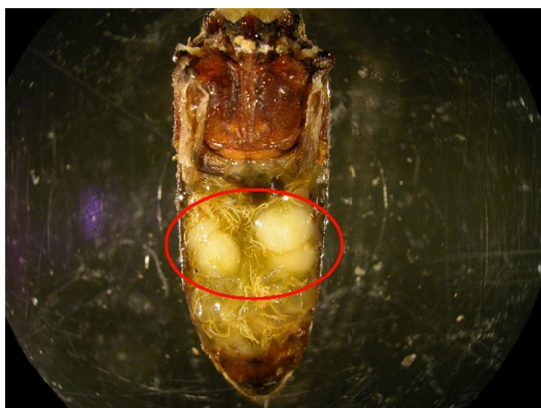


図3. マツノマダラカミキリ雄成虫の前翅と後翅を取り除き、腹部を解剖した様子。赤丸で囲んである4つの白い丸い組織が精巣。精巣、卵巣、胸部の筋肉、および消化管を各個体から取り出して、各組織からRNA抽出を行った。

(3) マツノマダラカミキリの各組織(精巣・卵巣・筋肉・消化管)から、ボルバキアの遺伝子と高い相同性を示す配列が複数検出された。また、その数は各組織間で大きく異なっていた。このことは、ボルバキア由来の遺伝子の少なくとも一部は宿主昆虫の体内において発現していること、特定の組織において何らかの機能を果たしている可能性があることを示唆している。今後は、マツノマダラカミキリの各組織間で、その発現している遺伝子の種類や発現量を詳しく調べていく必要がある。その機能性を証明することができれば、ボルバキアの遺伝子がマツノマダラカミキリの生命活動にどのように寄与しているのかを明らかにすることができるだろう。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Aikawa T, Nikoh N, Anbutsu H, Togashi K. (2014) Prevalence of laterally transferred *Wolbachia* genes in Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Applied Entomology and Zoology* 49: 337-346. (査読有)(DOI 10.1007/s13355-014-0256-0)

相川拓也(2012)マツノマダラカミキリに残る共生細菌の痕跡. 日本森林学会誌 94: 292-298. (査読有)
(https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjfs/94/6/94_292/_pdf)

[学会発表](計2件)

相川拓也・安佛尚志・今藤夏子. アズキゾウムシ由来のボルバキアがマツノマダラカミキリに引き起こす細胞質不和合. 第125回日本森林学会大会 2014年3月29日. 大宮ソニックシティー(埼玉県)

相川拓也・安佛尚志・今藤夏子. アズキゾウムシからマツノマダラカミキリへのボルバキア人工感染の試み. 第123回日本森林学会大会 2012年3月28日. 宇都宮大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

相川 拓也 (Aikawa Takuya)

独立行政法人森林総合研究所・東北支所・主任研究員

研究者番号: 90343805

(2) 研究分担者

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・研究員
研究者番号：30392583

菊地 泰生 (Kikuchi Taisei)
宮崎大学・医学部・准教授
研究者番号：20353659

(3)連携研究者

二河 成男 (Nikoh Naruo)
放送大学・教養学部・准教授
研究者番号：70364916