

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17日現在

機関番号：82112
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23780056

研究課題名（和文） 昆虫における性決定プロセスの解明と共生細菌による宿主生殖操作の分子機構の解明

研究課題名（英文） Understanding the sex-determining processes and the molecular mechanism of reproductive manipulations in insects

研究代表者

陰山大輔（KAGEYAMA DAISUKE）
 独立行政法人農業生物資源研究所 昆虫微生物機能研究ユニット
 主任研究員

研究者番号：60401212

研究成果の概要（和文）：

キチョウを性転換させる能力がある共生細菌ボルバキアを雄カイコ培養細胞（M1）に感染させると性決定遺伝子 doublesex (dsx) が2週間から4週間にかけてオス型のみからオスメス両方のスプライシングパターンを示すようになることがわかった。そこでマイクロアレイを行ったところ、性転換に応じて変化していると思われる遺伝子が数十個見つかったので更なる解析を進めている。また、このボルバキアをキイロショウジョウバエの培養細胞（S2）に感染させることに成功したが dsx のスプライシングは変化しないことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

When transinfected into a male *Bombyx mori* cell line (M1), feminizing *Wolbachia* endosymbiont derived from *Eurema mandarina* affected sex-specific splicing of the sex-determining gene doublesex (dsx). Two to four weeks after transinfection, dsx begins to exhibit splicing products of both male and female. Preliminary results of the macroarray analyses demonstrated dozens of candidate genes affected by the feminizing *Wolbachia*, which are currently under further analyses. The feminizing *Wolbachia* was successfully transinfected into a male *Drosophila* cell line (S2), but the splicing pattern of dsx remained unchanged.

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	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：科研費の分科・細目： 農学・応用昆虫学

キーワード： 性転換、移植、*Wolbachia*、昆虫、共生微生物、カイコ、dsx

1. 研究開始当初の背景

母系伝播する細菌ボルバキアは、様々な節

足動物や線虫の細胞内に共生している。昆虫種の約66%に感染しているとされるボルバキアは地球上で最も繁栄している共生細菌

であると見なされている。

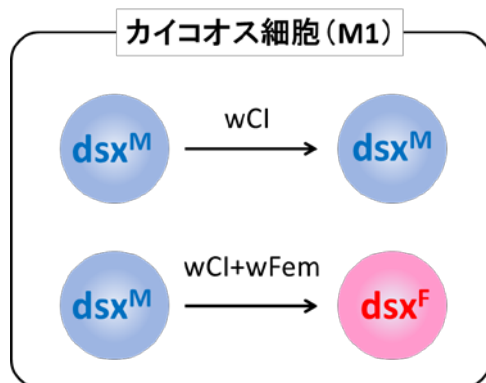
一般に細胞内共生細菌は、卵巣を通じてしか次世代に伝播されないため、オスの宿主に伝わった場合、その時点で次の宿主を失う。この不都合を回避するため、ボルバキアは様々な方法で宿主の生殖システムを操作し、自身の繁殖を維持している。このような現象は細胞内共生細菌による究極の利己的振舞いであると考えられている。

このように、高等生物の生命現象の根幹が原核生物によって握られているという、生物間の驚くべき相互作用の一端を解明できれば、基礎科学として重要な知見を提供できるだけでなく、害虫や益虫の増殖制御など、応用的にも大きな可能性が開けると考えられる。

ところが残念なことに、ボルバキアは単離培養が極めて困難であり、昆虫宿主間での感染移植が容易でなく、また、ショウジョウバエなどのモデル生物で明瞭な生殖操作を起こさないことなどから、生殖操作の分子機構については全く不明のままである。

2. 研究の目的

キチョウに対して性転換を起こすことがわかっている細胞内共生細菌ボルバキアを雄カイコ由来の培養細胞に人工的に感染させると、性決定遺伝子 doublesex (*dsx*) の性特異的なスプライシングパターンがオス型からメス型に変化することが予備実験からわかっている。



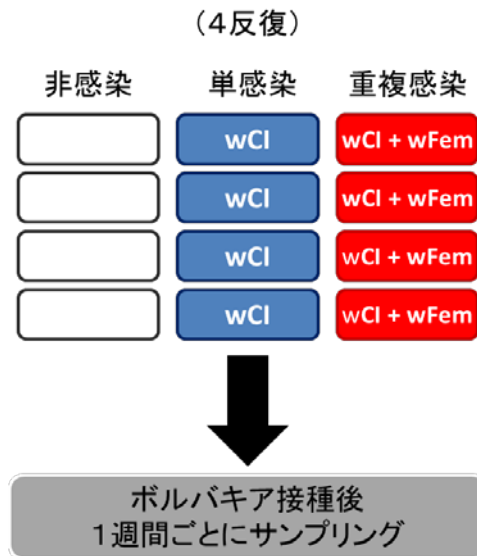
【図の説明】 2系統のボルバキア (wCI と wFem) が重複感染しているとキチョウに性転換をおこすが、単感染 (wCI のみ) ではキチョウに性転換を起こさないことが知られている。カイコ培養細胞に人工的にこれらのボルバキアを感染させるとキチョウに対する場合と同様に結果が得られることが予備実験によりわかっている。

つまり、このボルバキア系統はキチョウに対してだけでなく、カイコ細胞に対してもメス化作用をもっていると考えられる。

そこで、本研究では、カイコ雄細胞にボルバキアを感染させ、時間経過を追って、*dsx* のスプライシングがどのように変化していくかを調査するとともに、性転換した細胞と通常細胞との間で発現差が生じる遺伝子をマイクロアレイを用いて網羅的に探索する。マイクロアレイで得られる候補遺伝子を性転換の分子メカニズム解明に取り組みための足掛かりとし、更なる解析に進む。

3. 研究の方法

キチョウに性転換を起こすボルバキアを、オス胚子由来のカイコ培養細胞 (M1) に感染させ、1週間ごとにサンプリングを行い、ボルバキア感染と性転換との関連を明らかにする。

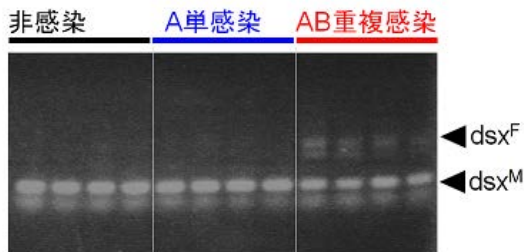


さらに、これらのサンプルを用いてマイクロアレイなどの実験系を用いて、性転換に関連する宿主遺伝子を網羅的に探索することにより、性転換などに関連して発現が変化する遺伝子候補を挙げる。その後、カイコ培養細胞やカイコ生体を用いて、性転換に関わる候補遺伝子を発現・抑制等させることにより、非感染状態での性転換の再現、感染状態での性転換の抑制を人為的に行う。さらに、様々なボルバキア系統と昆虫細胞との組み合わせによって、昆虫側、細菌側の遺伝子発現にどのような変化が生じるかを探索する。

これら一連の実験により、ボルバキアが宿主に起こす生殖操作の分子基盤、昆虫の性決定プロセスについての解明を目指し、その全貌を明らかにする。

4. 研究成果

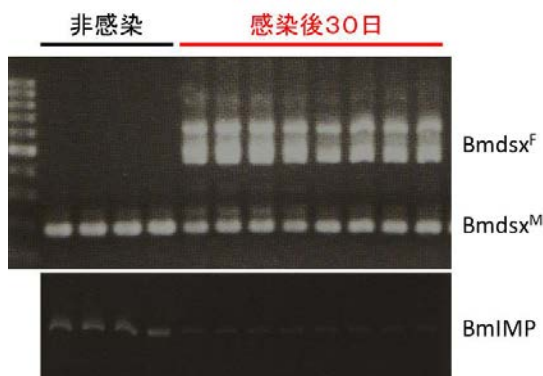
キチョウを性転換させる能力がある共生細菌ボルバキアを雄カイコ培養細胞 (M1) に感染させると性決定遺伝子 *dsx* が2週間から4週間にかけてオス型のみからオスメス両方のスプライシングパターンを示すようになることがわかった。



【図の説明】ボルバキアの感染状態の違いによる *dsx* 遺伝子のスプライシングパターン

そこでマイクロアレイを行ったところ、性転換に応じて変化していると思われる遺伝子が数十個見つかったので更なる解析を進めている。

更に、*dsx* の上流に位置し、雄のみで発現がみられる IMP 遺伝子の発現量がメス化ボルバキアの感染により大幅に減少していることが明らかとなった。



【図の説明】ボルバキア感染による宿主遺伝子発現パターンの変化

つまり、ボルバキアによる宿主への影響は IMP 遺伝子よりもさらに上流であると考えられる。

また、このボルバキアをキイロシヨウジョ

ウバエの培養細胞 (S2) に感染させることに成功したが *dsx* のスプライシングパターンはオス型のまま変化しないことが明らかとなった。

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 5 件)

1. Kageyama D, Narita S, Watanabe M (2012) Insect sex determination manipulated by their endosymbionts: incidences, mechanisms and implications. *Insects* 3: 161-199. (査読有)
2. Watanabe M, Kageyama D, Miura K (2012) Transfer of a parthenogenesis-inducing Wolbachia endosymbiont derived from *Trichogramma dendrolimi* into *Trichogramma evanescens*. *Journal of Invertebrate Pathology* 112: 83-87. (査読有)
3. Watanabe M, Tagami Y, Miura K, Kageyama D, Stouthamer R (2012) Distribution patterns of Wolbachia endosymbionts in the closely related flower bugs of the genus *Orius*: implications for coevolution and horizontal transfer. *Microbial Ecology* 64: 537-545. (査読有)
4. Narita S, Kageyama D, Hiroki M, Sanpei T, Hashimoto S, Kamitoh T, Kato Y (2011) Wolbachia-induced feminization newly found in *Eurema hecabe*, a sibling species of *Eurema mandarina* (Lepidoptera: Pieridae). *Ecological Entomology* 36: 309-317. (査読有)
5. Tabata J, Hattori Y, Sakamoto H, Yukuhiro F, Fujii T, Kugimiya S, Mochizuki A, Ishikawa Y, Kageyama D (2011) Male killing and incomplete inheritance of a novel Spiroplasma in the moth *Ostrinia zaguliaevi*. *Microbial Ecology* 61: 254-263. (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

1. 陰山大輔 『ボルバキアは宿主昆虫の性決定をどのようにして覆しているのか』小集会：『宿主昆虫の生殖を操作する寄生者達～生殖操作研究の最前線～』15:30～17:00 第 57 回日本応用動物昆虫学会大会 (会場：日本大学生物資源科

- 学部) 2013年3月29日
2. 渡部真也・林正幸・行弘文子・陰山大輔
(2012)カオマダラクサカゲロウからみつかったスピロプラズマ、リケッチアと雄殺し現象 (C303). 第57回日本応用動物昆虫学会大会 (会場: 日本大学生物資源科学部) 2013年3月29日
 3. 渡部真也・陰山大輔・行弘文子・前田太郎 (2012) ヒメハナカメムシ類に感染する細胞内共生細菌スピロプラズマ: 分子系統解析および伝播様式の観察 (D206). (2012年9月17日) 日本昆虫学会第72回大会. 玉川大学 (東京都町田市)
 4. Kageyama D (2011) Endosymbiont-mediated sex determination. Symposium 4: Development of Extended Phenotypes 第44回日本発生生物学会年会 国際シンポジウム, 沖縄コンベンションセンター (May 21)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/kageyama000/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

陰山大輔 (KAGEYAMA DAISUKE)

独立行政法人農業生物資源研究所

昆虫微生物機能研究ユニット

主任研究員

研究者番号: 60401212