

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25291083

研究課題名(和文) 共生による生命システムの統合と進化：アブラムシ細胞内共生系をモデルに

研究課題名(英文) Integration of biological systems through symbiosis: insights from aphid=
Buchnera endosymbiosis

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：共生系において、いかにして異なる生物の構造や機能が融合し統合されたひとつの生命システムに進化するのか？その遺伝子基盤を明らかにするために、昆虫アブラムシと共生細菌ブフネラの細胞内共生系をモデルに、本課題では特に、代表者が発見した新規分泌ペプチドBCRに注目して研究を行った。私は、BCRがアブラムシ共生器官に特異的に発現し、さらに、翻訳されたペプチドは共生細菌にターゲティングされることを明らかにした。この観察結果はBCRがブフネラと直接に相互作用する分子であることを示している。またBCR抗菌活性を有することも見いだした。

研究成果の概要(英文)：A key question in symbiosis studies is how multiple organisms are integrated in a well-organized system through symbiosis. I used aphid-Buchnera symbiosis as a model to address this issue at molecular level. I focus on BCR peptides that are aphid lineage-specific secretion peptides I have discovered in the pea aphid genome. I found that these BCRs are expressed strongly and exclusively in the symbiotic organ called bacteriocytes. Our imaging data indicated that these peptides are secreted and then targeted to the endosymbionts. I also found BCRs have antimicrobial effects on *E. coli* and some other bacteria. Recently, antimicrobial peptide (AMP)-like peptides have been reported to function in the context of mutualism in other symbiotic systems such as *Medicago-Rizobium* symbiosis. AMP-like molecule such as BCRs should be a key to understand the principle in the symbiosis evolution.

研究分野：ゲノム進化学

キーワード：共生 アブラムシ 進化 抗菌ペプチド

1. 研究開始当初の背景

昆虫と微生物の共生は地球上のいたる所で観察され、その研究の歴史も古く、よく研究されてきた (Buchner 1965)。本研究では、共生研究のモデルとして世界で広く研究されている、昆虫アブラムシと共生細菌ブフネラの細胞内共生系を対象とする。約2億年前に共生を開始したアブラムシとブフネラはお互い相手なしでは生存が不可能なほど緊密な相互関係にあり、両者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。アブラムシは共生微生物ブフネラを格納するための特別な共生器官 (バクテリオサイトと呼ばれる) を持っている。共生器官を構成する数十個の細胞それぞれ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。その見事なまでの統合的代謝の機構については、古くは栄養生理学的研究により、最近では研究代表者自身によるゲノム解析によりかなりの部分を明らかにすることが出来た (Shigenobu et al., 2000 Nature; IAGC 2010 PLoS Biol)。しかし、栄養面以外の共生についてはほとんど注目されてこなかった。一方、研究代表者を中心とするアブラムシ-ブフネラ共生系におけるゲノム・トランスクリプトーム情報が蓄積し (Shigenobu and Stern 2013 Proc Roy Soc B)、共生によって生じたゲノムや遺伝子の進化を議論するための基盤がととのいつつあった。特に、研究開始時期の平成25年頃は、次世代シーケンシング技術の浸透により、ゲノミクス技術を生かした共生研究のアプローチ—Symbiogenomics (共生ゲノム学)—は共生研究にブレークスルーをもたらす大きな可能性を秘めていた (重信ら 2013 遺伝)。

そこで、本課題では、共生研究においてこれまであまり注目されてこなかった「システム統合」のメカニズムと進化過程の解明をめざして、Symbiogenomics 的アプローチで取り組むこととした。

2. 研究の目的

共生系において、いかにして異なる生物の構造や機能が融合し統合されたひとつの

生命システムに進化するのだろうか？ 昆虫アブラムシと共生細菌ブフネラの細胞内共生系を利用して、共生による生命システム統合とその進化を理解することを大きな目標とする。本課題では特に、申請者が発見した新規分泌ペプチド BCR に注目し、この分子が宿主=共生菌間の相互作用にどのように関わっているかを明らかにする。

3. 研究の方法

BCR の合成: BCR はピキア酵母発現系による組み換えタンパク質発現とペプチド化学合成の両方を試行した。化学合成したペプチドは人工シャペロンによりフォールディングを行った。

抗体の作製: BCR2 と BCR4 は上記の方法で合成・フォールディングした BCR ペプチドを抗原として、ウサギポリクローナル抗体を作製した。BCR1 は同様の方法では抗原に交叉する抗体が得られなかったため、マウスでモノクローナル抗体を産生するハイブドーマを作製し、BCR1 と交叉するハイブドーマをスクリーニングし、最終的にモノクローナル抗体を得ることに成功した。

免疫染色とイメージング: 上記のとおり作製した抗体を用いて定法に従い、アブラムシ共生器官 (バクテリオサイト) および卵巣に対して免疫染色を行った。二次抗体には Alexa 蛍光でラベルした抗マウスもしくはウサギ IgG 抗体を用いた。染色した検体は、共焦点顕微鏡 (Olympus FV1000) と Lattice 超高解像度顕微鏡 (開発者 Eric Betzig 博士 (HHMI Janelia) との共同研究) でイメージを取得した。

抗菌活性測定: 方法 1) 大腸菌を BCR 存在下の培地で培養し、大腸菌の増殖を OD=660nm の吸光度でモニターした。方法 2) 大腸菌を BCR で処理した後、LB プレートに塗布し、一晚培養後、コロニー数を計測し、対照群と比較した。

分子進化解析: アブラムシのモデル種でありゲノムも解読済みのエンドウヒゲナガア

アブラムシ *Acyrtosiphon pisum* の BCR の配列データは代表者の先行研究に基づいた (Shigenobu and Stern 2013 Proc Roy Soc B)。本研究期間中にゲノムシーケンスが発表された *Diuraphis noxia* と *Myzus persicae* のゲノム情報 (Nicholson 2015, Mathers2017) は NCBI より取得したが、BCR 遺伝子は公的データベースには含まれていなかったため独自にアノテーションを行った。ほかのアブラムシ、*Megoura crassicauda* 等の BCR は代表者による未発表の RNA-seq データから同定した。これら複数種のアブラムシの BCR 遺伝子群のオーソログ解析を InParanoid などのソフトウェアを使って行った。マルチプルアライメントは MUSCLE などを利用し、カスタムスクリプトを用いて Ka/Ks を計算した。

4. 研究成果

私は、先行研究において、アブラムシに特異的な新規の分泌タンパク質ファミリー BCR を同定し、それらの mRNA が共生器官特異的に発現することを明らかにしていた (Shigenobu et al., 2013)。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、分泌シグナルを N 末にもち、C 末側にシステイン残基を 6 個もしくは 8 個持つ特徴的な一次構造を有している。本研究では BCR の性質を詳細に明らかにし、共生における役割について考察した。



図1 BCR の基本構造

(1) BCR ペプチドの合成と抗体の作成に成功：BCR ペプチドの機能や局在を調べるためには、BCR ペプチドを合成すること、およびそれらの抗体を準備することが必要であった。まず、大腸菌の強制発現系による BCR ペプチドの合成を試みたが失敗に終わった。これは、後に研究が進んで振り返ると、次項に報告する通り BCR が抗菌活性をもっているために大腸菌では発現がうまくいかなかったと解釈できるが、研究開始当初は原因がわからず対応に苦慮した。ピキア酵母による発現を試行し、いくつかの

BCR では発現に成功し、解析に十分な量のタンパク質を精製することができた。平行して、ペプチド化学合成と人工シャペロンによる折畳みのプロトコル開発にも成功した。これらの BCR ペプチドを抗原に用いて、BCR1, BCR2, BCR4 のマウスモノクローナル抗体もしくはウサギポリクローナル抗体の作製に成功した。

(2) BCR は抗菌活性を持つ：BCR のいくつかは、大腸菌に対して抗菌活性を有することを明らかにした。つまり、BCR は新規の抗菌ペプチド (Antimicrobial peptide; AMP) であるといえる。BCR で処理した大腸菌は膜浸透性が上昇することも観察された。

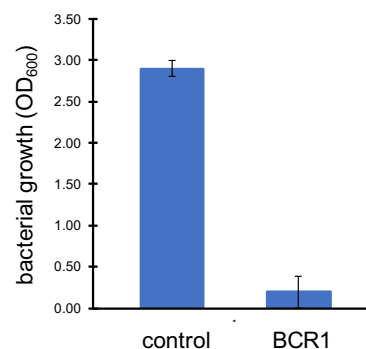


図2 BCR の抗菌活性

(3) BCR の局在：(1) で作製した抗体を用いて、アブラムシを免疫組織化学的に染色したところ、BCR は共生細菌 *ブフネラ* のまわりに局在することが、共焦点顕微鏡、Lattice 超高解像度顕微鏡、および免疫電顕で明らかになった。これは、宿主昆虫によってつくられた BCR が、分泌経路を介して *ブフネラ* にターゲットされることを示している。BCR の共生系における具体的な機能については未だ不明であるが、これらの観察結果は BCR が共生細菌と直接に相互作用する分子であることを示している。

(4) BCR の分子進化：アブラムシ数種から BCR ファミリー遺伝子を同定し、オーソログ解析を行ったところ、BCR の遺伝子レパートリーはアブラムシの各系統で頻繁に増減していることがわかった。また Ka/Ks 解析から、進化速度が速いことが明らかになった。

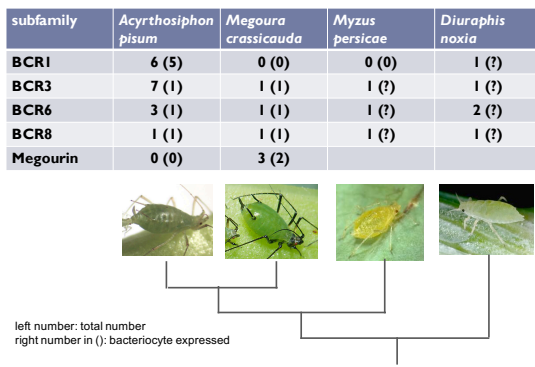


図3 BCR 遺伝子ファミリーの
アブラムシ種間比較

(5) 共生 AMP の普遍的機能の考察: BCR はアブラムシに特有の遺伝子であり、他の生物種には存在しない。しかし、システインリッチな分泌ペプチドはほかの共生系においても共生器官特異的な発現と機能についての報告がある。たとえば、マメ科植物の *Medicago* (タルウマゴヤシ) では NCR と呼ばれるシステインリッチペプチドが共生器官 (根粒) 特異的に発現し、さらに共生の維持と制御に関わっていることが示されている (Van de Velde 2010)。システインリッチ分泌ペプチドはディフェンシンに代表されるある種の抗菌ペプチド AMP を想起させ、実際に BCR も NCR も抗菌活性を有することから、これら共生系にはたらくペプチドを symbiotic AMP と呼ぶことを提唱し、その機能と進化について考察する総説論文を出版した (Margaert et al., 2017 Trends in Microbiology)。Symbiotic AMP は動植物の共生系に共通の進化のプリンシプルを明らかにするキー遺伝子となるだろう。

<引用文献>

- Buchner P (1965) Endosymbiosis of animals with plant microorganisms. Interscience, New York
- Shigenobu, S., and Stern, D.L. (2013). Aphids evolved novel secreted proteins for symbiosis with bacterial endosymbiont. Proc Biol Sci 280, 20121952–20121952.
- IAGC (2010). Genome sequence of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. PLoS Biol 8, e1000313.
- Nicholson, S.J. et al. (2015). The genome of *Diuraphis noxia*, a global aphid pest of small grains. 16, 429.
- Mathers, T.C. et al. (2017). Rapid transcriptional

plasticity of duplicated gene clusters enables a clonally reproducing aphid to colonise diverse plant species. Genome Biol 18, 27.

Van de Velde, et al. (2010). Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis. Science 327, 1122–1126.

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 1 件)

- ① Peter Mergaert, Yoshitomo Kikuchi, Shuji Shigenobu and Eva C. M. Nowack. (2017) Metabolic integration of bacterial endosymbionts through antimicrobial peptides. **Trends in Microbiology**. in press. (査読有り)

[学会発表] (計 13 件)

- ① Shuji Shigenobu (2016) “Aphids evolved novel AMP-like genes for symbiosis with bacterial endosymbiont” AMP2016 2016.6.6-6.8 (Montpellier, France)

ほか 12 件

[図書] (計 1 件)

- ① 内奈保子、内海俊樹、重信秀治 (2013) 「植物と動物に共通の共生細菌制御機構」 生物の科学「遺伝」2013 年 7 月号、p. 460-465、エヌ・ティー・エス

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ

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

(4)研究協力者

David L. Stern, Aishwarya Korgaonkar, Eric
Betzig, Wei-Ping Li, Pat Rivlin [HHMI Janelia
Research Campus]

Peter Mergaert [CNRS]

内海 俊樹 (UCHIUMI, Toshiki) [鹿児島大
学]