

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 20 日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450492

研究課題名(和文) 共生細菌スピロプラズマによる昆虫宿主制御の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular basis of host regulation by symbiotic Spiroplasma

研究代表者

陰山 大輔 (Kageyama, Daisuke)

国立研究開発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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：研究に使いやすいスピロプラズマを自然界から見つけ出すことを目的に様々なスピロプラズマの感染を探索し、ヒメハナカメムシの1種から見つかったスピロプラズマを液体培地ならびに固形培地で単独培養することに成功し、増殖に関する性状を調査した。昆虫体内と培地での性状に興味深い違いが見つかり、さらなる調査が必要となった。また、このスピロプラズマ系統を液体培地で大量培養し、プラスミドを抽出する実験を行ったところ、プラスミド様のゲノムは確認されることがわかった。一方、カオマダラクサカゲロウにオス殺しを起こすことで興味深いスピロプラズマを培養することはできなかった。より詳細な培養条件の検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：During the process of searching for suitable Spiroplasma strains for research from nature, I found a Spiroplasma strain from a predatory flower bug of the genus Orius. This Spiroplasma strain was found cultivable in liquid as well as solid artificial media. I found some interesting features of proliferation that differ according to the different culture conditions-i.e., within insects, in the liquid medium, and on the solid medium, which requires further research. Attempt to extract plasmid genome following mass culture failed, probably indicating that this Spiroplasma strain lacks plasmid. On the other hand, a male-killing Spiroplasma strain derived from a lacewing of the genus Mallada was not cultivable under the above conditions, reflecting the differences in the nutritional requirements and/or degree of intimacy with insects.

研究分野：共生微生物

キーワード：スピロプラズマ

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

様々な昆虫の体内(細胞内)には特殊な細菌が共生しており、卵を通じて垂直伝播し、宿主昆虫の生殖を驚くほど巧妙に操作していることが知られているが、今のところその分子機構は全く不明である。

2. 研究の目的

本研究では、垂直伝播しないスピロプラズマ、垂直伝播するがオス殺しは引き起こさないスピロプラズマ、そして垂直伝播してオス殺しを引き起こすスピロプラズマを研究材料として用いることで、垂直伝播および宿主生殖操作(オス殺し)に必須の遺伝子を同定し、その分子機構を解明する。

3. 研究の方法

研究に使いやすいスピロプラズマを自然界から見つけ出し、スピロプラズマのどの遺伝子が垂直伝播やオス殺しの原因となっているのかを明らかにする。また原因遺伝子産物が昆虫のどの因子と相互作用して垂直伝播・オス殺しを起こすのかを解明する。

4. 研究成果

研究に使いやすいスピロプラズマを自然界から見つけ出すことを目的に様々なスピロプラズマの感染を探索し、ヒメハナカメムシの1種(ナミヒメハナカメムシ; *Orius sauteri*) から見つかったスピロプラズマを液体培地ならびに固形培地で単独培養することに成功した(図1; 図2)。

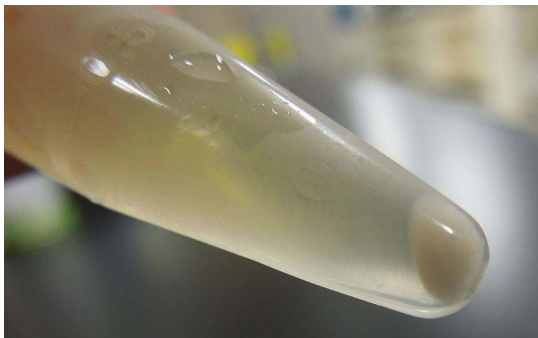


図1: 液体培地での培養

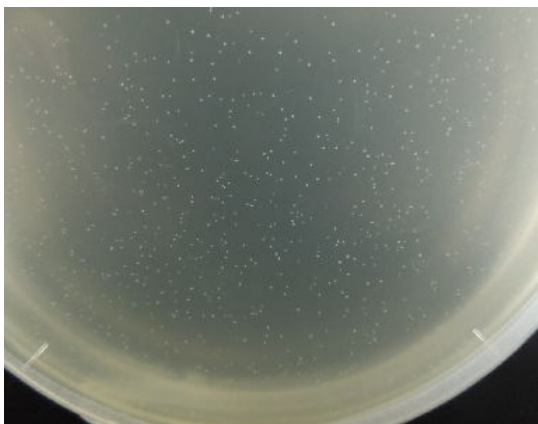


図2: 寒天培地での培養

また増殖に関する性状を調査したところ、大腸菌などとは異なり OD 値 0.3 以上には上昇しないことがわかった(図3)。

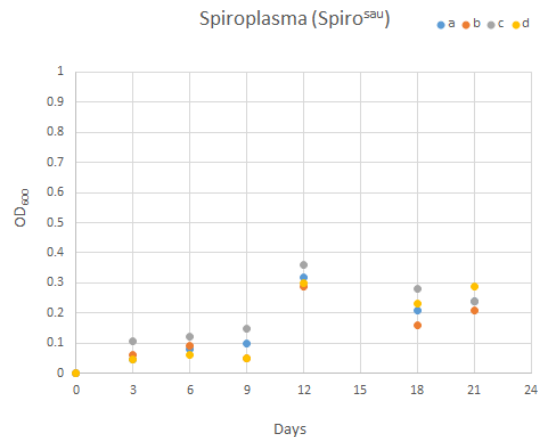


図3: 液体培地における増殖(4反復の結果)

また、寒天培地上におけるコロニー形成に関して昆虫体内と培地での性状に興味深い違いが見つかり、さらなる調査が必要となった。

また、このスピロプラズマ系統を液体培地で大量培養し、プラスミドを抽出する実験を行ったところ、プラスミド様のゲノムは確認されないことがわかった。一方、カオマダラクサカゲロウ(*Mallada desjardinsi*)にオス殺しを起こすことで興味深いスピロプラズマを培養することはできなかった。昆虫培養細胞を用いた培養法(Noda et al. 2002)もうまくいかず、より詳細な培養条件の検討が必要である。ちなみにこの昆虫培養細胞を用いた培養法ではボルバキアやリケッチアなどの昆虫細胞内共生細菌の培養には適していることがわかっている。

さらに、両系統のスピロプラズマについて、分子系統解析を行ったところ、ヒメハナカメムシ由来のものはツルニチニチソウの病原細菌として知られるスピロプラズマに、カオマダラクサカゲロウ由来のものは、トウモロコシ等の病原細菌として知られるスピロプラズマにそれぞれ非常に近縁であることが明らかとなった。

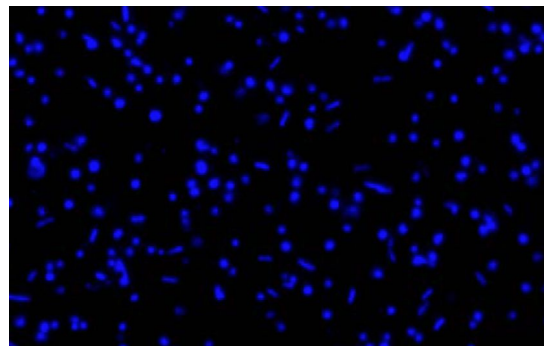


図4: 液体培地で増殖したスピロプラズマ(DAPI染色)

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7件)

- Osaka R, Watada M, Kageyama D, Nomura M (2013) Detection of Spiroplasma from the mite Macrocheles sp. (Acari; Macrochelidae) ectoparasitic to the fly *Drosophila hydei* (Diptera; Drosophilidae): a possible route of horizontal transmission? *Symbiosis* 60(2):79-84
- Osaka R, Ichizono T, Kageyama D, Nomura M, Watada M (2013) Natural variation in population densities and vertical transmission rates of a Spiroplasma endosymbiont in *Drosophila hydei* *Symbiosis* 60(2):73-78
- 陰山大輔 (2014) ワラジムシ目の体内に生息する共生微生物の多様性と機能 *Edaphologia* 95():7-14
- 陰山大輔 (2014) 昆虫の生殖を操作する細胞内共生細菌 Wolbachia の機能と特徴 蚕糸・昆虫バイオテック 83(3):243-249
- Watanabe M, Yukuhiro F, Maeda T, Miura K, Kageyama D (2014) Novel strain of Spiroplasma found in flower bugs of the genus Orius (Hemiptera: Anthocoridae): Transovarial transmission, coexistence with Wolbachia and varied population density *Microbial Ecology* 67(1):219-228
- Kern P, Cook J.M, Kageyama D, Riegler M (2015) Double trouble: combined action of meiotic drive and Wolbachia feminization in *Eurema* butterflies *Biology Letters* 11(5):20150095
- 陰山大輔 (2016) キタキチョウと共生細菌ボルバキア *昆虫と自然* 51(1):5-8

[学会発表](計12件)

- Kageyama D (2013) Sex manipulation by microbes - Are you male or female? India-Japan Symposium on Frontiers in Science & Technology: Emerging Materials for Health, Environment and Safety
- 陰山大輔, 末次克行, 小林功, 成田聡子, 今西重雄, 野田博明 (2014) ボルバキアによる宿主昆虫の性転換 - RNA-seq による解析 第58回日本応用動物昆虫学会大会():81
- 陰山大輔 (2014) 共生細菌ボルバキアが昆虫の生態、行動、進化に与える影響 第69回日本生物地理学会年次大会():
- Kageyama D (2014) Molecular mechanism

of Wolbachia-induced feminization in Lepidoptera The 8th International Wolbachia Conference():90

- Kern P, Kageyama D, Cook J.M, Riegler M (2014) A new molecular sexing technique for butterflies - dose Wolbachia really feminise genetic males in *Eurema*? The 8th International Wolbachia Conference():54
- 陰山大輔, 成田聡子 (2014) 種子島のキタキチョウにおけるメスに偏った性比異常:ボルバキアは宿主を絶滅させるか? 日本昆虫学会第74回大会():77
- 陰山大輔 (2015) 昆虫を操作する寄生者たち 第70回日本生物地理学会年次大会():
- 陰山大輔 (2015) オス殺し、メス化、マイオティックドライブ:共生細菌ボルバキアによる宿主生殖操作メカニズムに対する進化的考察 日本昆虫学会第75回大会():74
- 加藤朱莉, 陰山大輔 (2015) ダンゴムシを青くするイリドウイルスを共生細菌ボルバキアは抑えることができるか? 日本昆虫学会第75回大会():103
- 陰山大輔 (2016) 性決定システムの多様性:何が急速な進化をもたらしたか? 日本昆虫学会第76回大会・第59回日本応用動物昆虫学会大会合同大会():234
- 加藤朱莉, 陰山大輔 (2016) オカダンゴムシ由来のイリドウイルスはコシビロダンゴムシに感染するか? 日本昆虫学会第76回大会・第59回日本応用動物昆虫学会大会合同大会():278
- 宮田真衣, 陰山大輔, 野村昌史 (2016) 細胞内共生細菌 Wolbachia の生殖操作の違いによる宿主ミトコンドリアの分化への影響キタキチョウにおける2系統の Wolbachia(wCI と wFem)について 日本昆虫学会第76回大会・第59回日本応用動物昆虫学会大会合同大会():196

[図書](計1件)

- 陰山大輔『消えるオス』Dojin選書66 化学同人 208ページ

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者
陰山大輔 (Kageyama, Daisuke)
国立研究開発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

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：