

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850195

研究課題名(和文)吸血性節足動物のゲノム内に組み込まれた微生物由来遺伝子の機能解析

研究課題名(英文)Horizontally transferred genetic elements in the tsetse fly genome

研究代表者

中尾 亮 (NAKAO, RYO)

北海道大学・(連合)獣医学研究科・特任助教

研究者番号：50633955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：トリパノソーマを媒介するツェツェバエ(*Glossina morsitans*)ゲノム内の水平伝播遺伝子の検出を試みた。塩基の出現パターンを用いて由来生物種を推定する一括学習型自己組織化マップ法(BLSOM)を用いた結果、ハエゲノムの約3.8%が細菌由来の配列であることが推測された。さらに、ザンビア共和国でツェツェバエを野外採集し、水平伝播遺伝子の供与体としてのハエ保有細菌叢の特定を試みた。その結果、節足動物の共生細菌として知られる *Arsenophonus* 属、*Wolbachia* 属が優占細菌属として検出された。また、水平伝播遺伝子の由来として推定された一部の細菌属も見つかった。

研究成果の概要(英文)：Tsetse flies (*Glossina* spp.) are the primary vectors of trypanosomes, which can cause Human and Animal African trypanosomiasis. The objective of this study was to explore the genetic elements horizontally transferred from microorganisms in the genome of *Glossina morsitans* using a composition-based bioinformatics program, so-called Batch Learning Self-Organizing Map (BLSOM). The method allows clustering of the sequence fragments based on the similarity of oligonucleotide frequencies independently of homologous sequences. After initial scan of potential HGT events by BLSOM, nearly 3.8% of the tsetse fly genome was assigned as potential HGT candidates. In order to find potential donors of HGT elements, bacterial communities in the field-captured tsetse flies were investigated. In addition to the previously recognized arthropod symbionts including genera *Arsenophonus* and *Wolbachia*, the bacteria of which genetic elements were found in tsetse genome were identified in the tsetse flies.

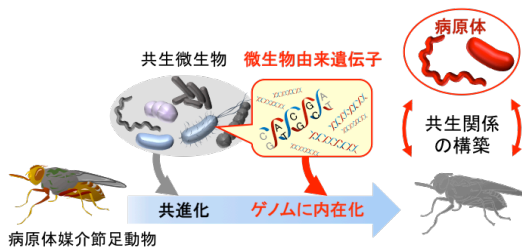
研究分野：獣医寄生虫学

キーワード：遺伝子水平伝播 吸血性節足動物 ツェツェバエ ベクター BLSOM *Wolbachia* 共生 ゲノム進化

1. 研究開始当初の背景

蚊、ハエ、ダニ等の吸血性節足動物はヒトや動物に重篤な疾病を引き起こす様々な病原体を媒介する。例えば、発展途上国を中心とした熱帯地域ではマラリア（ハマダラカによる媒介）やアフリカ睡眠病（ツェツェバエによる媒介）が蔓延し、毎年多くの人命が失われている。また、リケッチア症やタイレリア症（マダニによる媒介）などの致死率の高い動物疾病が伴侶動物ならびに産業動物の健康を脅かし、甚大な経済的損失を与えている。節足動物は病原体以外にも様々な微生物を体内に保有しユニークな共生関係を構築している。例えば、節足動物のモデル生物として研究が進むアブラムシでは機能性物質の合成や病原体からの防御を共生細菌に依存する。一方、微生物も代謝系の一部を節足動物に依存することで、自身の増殖を有利にすることが知られている。つまり、節足動物と微生物は互いの生存に有利な共生関係を構築することで、進化し繁栄してきたと考えられる。さらに驚くべきことに、共生細菌の遺伝子そのものが節足動物のゲノムに取り込まれ、他の共生細菌の維持に重要な働きをすることが近年報告された。このように、遺伝子が種のみならず分類群の垣根を越えて水平転移し、遺伝子の受け手側ならびにその共生体の生存に大きく影響することは最近になって明らかとなった事実である。これまで病原体を媒介する節足動物が保有する共生細菌や外来遺伝子に関する知見は乏しい。病原体を節足動物が保有する微生物集団の一部と捉えた場合、他の共生細菌や外来遺伝子が病原体の伝播・増殖に影響を持つことが推察される。

図1: 微生物共生機構の仮説



2. 研究の目的

本研究では、病原性原虫（トリパノソーマ）を媒介する吸血性節足動物（ツェツェバエ: *Glossina morsitans*) をモデルとして、原核生物由来のゲノム断片を網羅的に検出し、水平伝播遺伝子のゲノム進化における役割を検証する。さらに、ザンビアのトリパノソーマ流行地でツェツェバエを野外採集し、水平伝播遺伝子の供与体としての保有細菌叢を特定することを目的とした。

3. 研究の方法

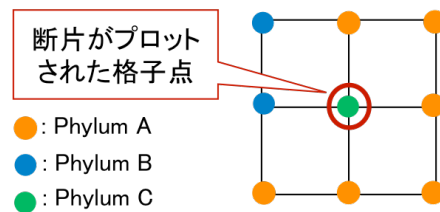
(1) 水平伝播遺伝子候補の検出

通常、受け手側の生物のゲノムに埋め込まれた外来遺伝子は長い進化の過程で痕跡化し検出が困難である。そこで、塩基配列の痕跡化の影響を克服するために、塩基の出現パターンを用いて、塩基配列の由来生物種を推定する一括学習型自己組織化マップ法 (BLSOM) を用いて解析を行った。解析対象には、2014年に米国・エール大学によって解読されたツェツェバエ・ゲノムスキューホルド情報を用いた。9,710 配列のツェツェバエゲノム配列をステップ幅 1 kb で各 5 kb に断片化し、全ゲノム配列が公開されている原核生物ゲノム配列とともに、BLSOM によるクラスタリングを行った。

(2) 水平伝播遺伝子の由来推定

分類された格子点±1の格子点で、最上位と第二位の Phylum を集計し、総数の 40% 以上で最上位のものを Phylum 由来推定の結果とした。なお、同数の場合は、「Unclassified」とした。また同様に、各 Phylum ごとに作成したマップを用いて分類後、分類された格子点±1の格子点で、最上位と第二位の Genus を集計し、総数の 40% 以上で最上位のものを Genus 由来推定の結果とした。

図2: 由来推定の模式図



(3) ツェツェバエ細菌叢の解析

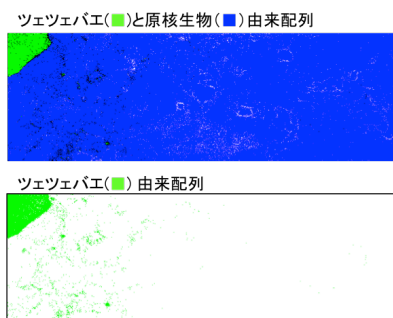
アフリカ睡眠病が流行するザンビア共和国ルンザ地区にて、野外に生息するツェツェバエをツェツェトラップにより捕獲した。ゲノム DNA を抽出後、16S リボソーム RNA 遺伝子の超可変領域 (V3-4) を対象とした PCR を行った。得られた PCR 産物に対し、インデックス PCR を行い両端にタグを付加し、Illumina MiSeq によるアプリコン解析を行った。

4. 研究成果

(1) 水平伝播遺伝子候補の検出

Prokaryote-BLSOM 解析の結果、ツェツェバエゲノム (9,710 コンティグ配列) 由来の 303,250 断片のうち、11,524 断片 (3.8%) が、原核生物由来配列とクラスタリングされ、水平伝播遺伝子候補として検出された。

図3: Prokaryote-BLSOMの結果



(2) 水平伝播遺伝子の由来推定結果

水平伝播遺伝子候補が含まれる全 2,960 コンティグ配列について、配列単位でその由来を推定した。まず、Phylum レベルでは、Firmicutes (n = 758)、Bacteroidetes (n = 370)、Alphaproteobacteria (n = 90)、Gammaproteobacteria (n = 23)の順で多く検出された。一方で、1,671 コンティグ配列については、複数系統の由来が混在したために、「Unclassified」としてPhylumレベルの分類結果が得られなかった。Firmicutes、Bacteroidetes、Alphaproteobacteria に分類されたものに関してはさらに Genus レベルの分類を行った結果を図4に示す。

図4: 由来推定結果(Genus)

Firmicutes	配列件数
<i>Staphylococcus</i>	134
<i>Enterococcus</i>	83
<i>Listeria</i>	31
<i>Leuconostoc</i>	17
<i>Streptococcus</i>	9
その他	35
Bacteroidetes	配列件数
<i>Flavobacterium</i>	197
<i>Polaribacter</i>	37
<i>Kordia</i>	18
<i>Prevotella</i>	10
<i>Paludibacter</i>	9
その他	19
Alphaproteobacteria	配列件数
<i>Wolbachia</i>	56
<i>Bartonella</i>	8
<i>Neorickettsia</i>	8
<i>Rickettsia</i>	5
<i>Anaplasma</i>	4
その他	1

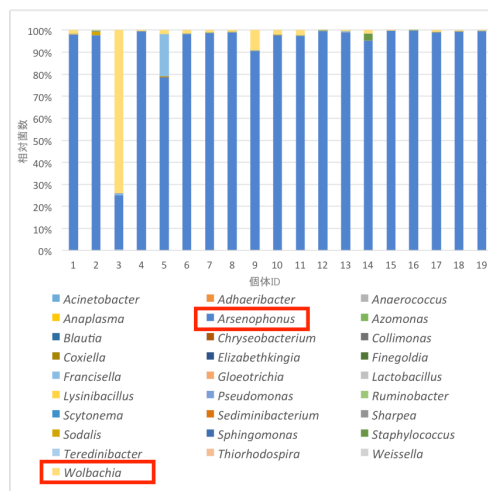
(3) *Wolbachia* 由来配列を用いた検証

ツェツェバエゲノム内にその遺伝子断片が存在することが既に報告されている *Wolbachia* 属細菌の検出結果を塩基配列の相同性に基づく blast 法と比較した。その結果、blast 法で検出された全 38 断片のうち、36 断片が BLSOM 法でも検出された。一方で、20 断片が BLSOM 法でのみ *Wolbachia* 属細菌由来と推定され、新規水平伝播遺伝子断片として検出した。

(4) ツェツェバエ細菌叢の解析

これまでのところ、19 個体のツェツェバエの保有細菌プロファイルを得た (図5)。ほぼ全ての個体で昆虫の共生細菌として知られる *Arsenophonus* 属細菌が最優占属として検出された。次に、*Wolbachia* 属細菌が第二優占属としてみられた。また、節足動物の細胞内寄生細菌として知られる *Francisella* 属、*Sodalis* 属の細菌も多く個体で検出された。一方、水平伝播遺伝子の由来として推定された細菌属のうち、*Staphylococcus* 属については一部の個体から検出されたが、*Enterococcus* 属、*Flavobacterium* 属などについては検出されなかった。

図5: ツェツェバエの保有細菌プロファイル



本研究では、ツェツェバエを解析対象とし、ゲノムに組み込まれた水平伝播遺伝子と保有細菌叢のカタログ化を試みた。今後、水平伝播遺伝子の発現解析や病原体感染との相関性解析を進めることで、節足動物-共生微生物(由来遺伝子)-病原体の複雑な三者関係の解析に応用されることが期待出来る。

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 10 件)

- ① Qiu Y, Nakao R, Thu MJ, Akter S, Alam MZ, Kato S, Katakura K, Sugimoto C. (2016) Molecular evidence of spotted fever group rickettsiae and Anaplasmataceae from ticks and stray dogs in Bangladesh. Parasitol Res. 115(3): 949-55. (査読有) doi: 10.1007/s00436-015-4819-y.
- ② Bawm S, Htun LL, Maw NN, Ngwe T, Tosa Y, Kon T, Kaneko C, Nakao R, Sakurai T, Kato H, Katakura K. (2016) Molecular survey of Babesia infections in cattle from different

- areas of Myanmar. *Ticks Tick Borne Dis.* 7(1): 204-7. (査読有)
doi: 10.1016/j.ttbdis.2015.10.010.
- ③ Moustafa MA, Lee K, Taylor K, **Nakao R**, Sashika M, Shimozuru M, Tsubota T. (2015) Molecular characterization and specific detection of *Anaplasma* species (AP-sd) in sika deer and its first detection in wild brown bears and rodents in Hokkaido, Japan. *Infect Genet Evol.* 36:268-74. (査読有)
doi: 10.1016/j.meegid.2015.09.027
- ④ Laohasinnarong D, Goto Y, Asada M, **Nakao R**, Hayashida K, Kajino K, Kawazu S, Sugimoto C, Inoue N, Namangala B. (2015) Studies of trypanosomiasis in the Luangwa valley, north-eastern Zambia. *Parasit Vectors.* 8:497. (査読有)
doi:10.1186/s13071-015-1112-y.
- ⑤ **Nakao R**, Qiu Y, Salim B, Hassan SM, Sugimoto C. (2015) Molecular Detection of *Rickettsia africae* in *Amblyomma variegatum* collected from Sudan. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 15(5): 323-5. (査読有)
doi: 10.1089/vbz.2014.1748.
- ⑥ Nakayima J, Hayashida K, **Nakao R**, Ishii A, Ogawa H, Nakamura I, Moonga L, Hang'ombe BM, Mweene AS, Thomas Y, Orba Y, Sawa H, Sugimoto C. (2014) Detection and characterization of zoonotic pathogens of free-ranging non-human primates from Zambia. *Parasit Vectors.* 7:490. (査読有)
doi: 10.1186/s13071-014-0490-x.
- ⑦ Qiu Y, **Nakao R**, Ohnuma A, Kawamori F, Sugimoto C. (2014) Microbial population analysis of the salivary glands of ticks; a possible strategy for the surveillance of bacterial pathogens. *PLoS One.* 9(8): e103961. (査読有)
doi: 10.1371/journal.pone.0103961.
- ⑧ **Nakao R**, Qiu Y, Igarashi M, Magona JW, Zhou L, Ito K, Sugimoto C. (2013) High prevalence of spotted fever group rickettsiae in *Amblyomma variegatum* from Uganda and their identification using sizes of intergenic spacers. *Ticks Tick Borne Dis.* 4(6):506-12. (査読有)
doi: 10.1016/j.ttbdis.2013.07.001.
- ⑨ Qiu Y, **Nakao R**, Namangala B, Sugimoto C. (2013) First genetic detection of *Coxiella burnetii* in Zambian livestock. *Am J Trop Med Hyg.* 89(3):518-9. (査読有)
doi: 10.4269/ajtmh.13-0162.
- ⑩ Nakayima J, **Nakao R**, Alhassan A, Hayashida K, Namangala B, Mahama C, Afakye K, Sugimoto C. (2013) Genetic diversity among *Trypanosoma (Duttonella) vivax* strains from Zambia and Ghana, based on cathepsin L-like gene. *Parasite.* 20:24. (査読有)
doi: 10.1051/parasite/2013024.
- [学会発表] (計 3 件)
- ① **Nakao R**, Funayama S, Abe T, Sugimoto C. Horizontally transferred genetic elements in the tsetse fly genome. 25th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology : WAAVP 2015. 17 August 2015. Liverpool (United Kingdom)
- ② **Nakao R**, Sugimoto C. Co-evolution of vector arthropods and pathogens driven by microbiomes and horizontal gene transfers. 第88回 日本細菌学会総会, 2015年3月26日, 長良川国際会議場 (岐阜県・岐阜市)
- ③ **Nakao R**, Qiu Y, Abe T, Ikemura T, Sugimoto C. Metagenomic approaches to identify potential pathogens in ticks. 日本遺伝学会 第86回大会, 2014年9月19日, 長浜バイオ大学 (滋賀県・長浜市)
- [その他]
- ホームページ等
<http://www.vetmed.hokudai.ac.jp/organization/parasitol/index.html>
6. 研究組織
(1) 研究代表者
- 中尾 亮 (NAKAO RYO)
北海道大学・大学院獣医学研究科・特任助教
研究者番号: 50633955