

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26291074

研究課題名(和文) ショウジョウバエの自然免疫系における遺伝子の構造と発現調節による表現形質の進化

研究課題名(英文) Evolution of genomic structure and expression pattern of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* species

研究代表者

田村 浩一郎 (Tamura, Koichiro)

首都大学東京・理工学研究科・教授

研究者番号：00254144

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：ショウジョウバエの微生物環境への適応進化の機構を明らかにするため、抗菌ペプチド遺伝子の構成と発現パターンの種間、種内変異性を調べた。(1)様々な微生物環境に生育する8種のショウジョウバエの抗菌ペプチド遺伝子の発現をRNA-seqによって網羅的に調べ比較したところ、種間で大きな差異が認められた。(2)キイロショウジョウバエ種群の種が持つDrosomycin遺伝子のゲノム構成と発現パターンを調べ比較したところ、大きな種間、種内変異が観察された。これらの結果から、ショウジョウバエの多様な微生物環境への適応の背景には、抗菌ペプチド遺伝子の構造、発現制御の高い進化的変化があったことが分かった。

研究成果の概要(英文)：To clarify evolutionary mechanisms for the adaptation of *Drosophila* species to various microbial environments, inter- and intra-species variations of genomic structure and expression pattern of antimicrobial peptide genes were investigated. (1) Transcriptome analyses by RNA-seq for eight *Drosophila* species inhabiting various microbial environments revealed extensive inter-specific variations in the expression of antimicrobial peptide genes. (2) Investigation of genomic structure and expression pattern of drosomycin genes for the species belonging to the melanogaster species group revealed a substantial degree of inter- and intra-species variations in the genomic structure and expression pattern of drosomycin genes. These findings suggested that substantial evolutionary changes in the genomic structure and the expression pattern of antimicrobial peptide genes underlay the adaptive evolution of *Drosophila* species to various microbial environments.

研究分野：進化遺伝学

キーワード：抗菌ペプチド 微生物耐性 比較トランスクリプトーム RNA-seq 遺伝子重複 環境適応 ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

ショウジョウバエは、微生物によって分解されつつある発酵した果物、腐敗したキノコ、朽木などを食物とする。そのため、微生物に対する耐性が食物摂取、環境適応にとって重要な要因となるが、種間で食性が異なることから、微生物に対する耐性も種間で異なることが予想される。実際、樹液や朽木を主食とする森林性のクロショウジョウバエ (*Drosophila virilis*) は、発酵した果物を主食とするキイロショウジョウバエ (*D. melanogaster*) に比べ、アオカビに対する耐性が有意に高い。

ところが、これら2種の全ゲノム配列を比較すると、7種類の抗菌ペプチド遺伝子の中で5種類は共通するが、キイロショウジョウバエのカビ耐性に最も重要な Drosomycin 遺伝子が、クロショウジョウバエのゲノム中には存在しないことが分かる。そこで、アオカビの経口感染によって発現が誘導される遺伝子を RNA-seq によって網羅的に比較したところ、抗菌ペプチド遺伝子の発現パターンは2種間で大きく異なることが分かった。

一方、クロショウジョウバエの抗菌ペプチドの中には、アミノ酸配列の変化によって抗カビ活性が高くなった可能性を強く示唆するものがあった。例えば、双翅目のいろいろな種の Defensin のアミノ酸配列を用いて分子系統樹を推定したところ、クロショウジョウバエの Defensin は、系統的に近縁なキイロショウジョウバエの Defensin よりも、系統的には遠縁であるが抗カビ活性が知られるサシショウバエやハマダラカの Defensin に近いことが示された。すなわち、クロショウジョウバエの Defensin は、進化過程で抗カビ活性を向上し、発現量も増加したと考えられる。

このように、クロショウジョウバエとキイロショウジョウバエの2種の抗菌ペプチド遺伝子には、ゲノム中の遺伝子構成と個々の遺伝子の発現の両面において大きな差異があることが分かった。

2. 研究の目的

本研究では、ショウジョウバエが様々な微生物環境に適応することによって多様化した進化過程を解明するため、抗菌ペプチドをはじめとした自然免疫関連遺伝子の構造と発現パターンの進化を調べ、ショウジョウバエの微生物耐性との関連を明らかにすることを目的とした。

(1) いろいろな食性、微生物耐性を有する8種のショウジョウバエ種が持つ自然免疫関連遺伝子について、アオカビ摂食による発現量の変化を調べ、自然免疫系の遺伝子ネットワークの進化の中で、それらの変化がそれぞれどのように寄与してきたのかを明らかにする。

(2) Drosomycin が主要な抗カビ抗菌ペプチドとしての役割を担うキイロショウジョウバエ種群に属する種を用い、Drosomycin 遺伝子のゲノム中の構成・コピー数、発現パターンについて種間および種内の差異を調べ、進化過程における抗菌ペプチド遺伝子の可変性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 発酵した果実を好むキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*)、オオショウジョウバエ (*D. immigrans*)、カスリショウジョウバエ (*D. hydei*)、樹液や朽木を食用とするクロショウジョウバエ (*D. virilis*)、オオクロショウジョウバエ (*D. robusta*)、カラスショウジョウバエ (*D. melanica*)、キノコ食性のナガレボシショウジョウバエ (*D. brachynephros*)、フタオビショウジョウバエ (*D. bizonata*) の8種を用い、3令幼虫15匹ほどをアオカビの生えた飼育培地(感染群)と生えていない飼育培地(対照群)それぞれに入れ、20℃で12時間飼育した。その後、脂肪体、唾腺、中腸から全RNAを抽出し、mRNAを精製した。得られたmRNAを用いてcDNAライブラリを作成し、Illumina MiSeq DNAシーケンサーを用いてRNA-seqを行った。

(2) キイロショウジョウバエ種群に属するオウトウショウジョウバエ (*D. suzukii*)、タカハシショウジョウバエ (*D. takahashii*)、キハダショウジョウバエ (*D. lutescens*)、イチジクショウジョウバエ (*D. ficusphila*) および *D. eugracilis* について、キイロショウジョウバエにおいて Drosomycin 遺伝子7コピー中4コピー (*Dro2*、*Dro3*、*Dro4*、*Dro5*) が局在するゲノム領域の塩基配列を決定し、すでに決定されていたキイロショウジョウバエ亜群の4種 (*D. melanogaster*、*D. simulans*、*D. sechellia*、*D. yakuba*) とともに重複遺伝子の構成について比較・系統解析を行った。その結果コピー数変異が最も大きかった *Dro3* に関しては、アオカビおよび酵母摂食時の各遺伝子の発現量の変化を RT-qPCR 法によって調べた。

さらに *Dro3* のコピー数が最も多いことが分かった *D. lutescens* に関しては、種内16系統について塩基配列を決定し、種内変異を調べた。

4. 研究成果

(1) RNA-seq により得られた遺伝子発現データを主成分分析した結果、腸管における遺伝子発現パターンは脂肪体と唾腺で観察されたものとは大きく異なるが、種間では大きな違いは見られなかった。一方で、脂肪体と唾腺の遺伝子発現パターンは比較的よく似ていたが、各点が大きくばらけており、種間で大きな違いがあることが分かった(図1)。

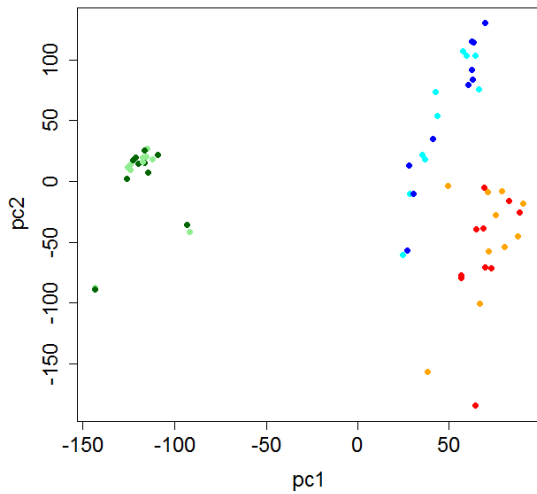


図1. 脂肪体(赤)、た腺(青)、中腸(緑)における遺伝子発現の主成分分析の結果。各組織の各点は種を表す。

食性の異なる種間で全身性の免疫応答(脂肪体)と局所的免疫応答(唾腺と腸管)の比較を行った結果、脂肪体と唾腺ではアオカビの摂食によって大きく発現が変動する免疫遺伝子の多くが抗菌ペプチド遺伝子であった。具体的には、キロショウジョウバエ(Dmel)では抗真菌ペプチドであるDrosomycinやMetchnikowin、抗バクテリアペプチドのDiptericinの遺伝子発現が最も高かった。しかしながら、キロショウジョウバエ以外の種はDrosomycin遺伝子を持っていない。このような種の抗菌ペプチド遺伝子の発現を調べると、キロショウジョウバエと同様に発酵した果実を食物とするオオショウジョウバエ(Dimm)や樹液や朽木を利用するクロショウジョウバエ(Dvir)やカラスショウジョウバエ(Dmelanica)、キノコ食性のナガレボシショウジョウバエ(Dbra)とフタオビショウジョウバエ(Dbiz)ではAttacinやDefensin、Diptericinの遺伝子発現が高かったが、果実食のカスリショウジョウバエ(Dhyd)や樹液食のオオクロショウジョウバエ(Drob)ではCecropin遺伝子が最も高い発現を示した(図2)。このことから、アオカビ感染によって産生される抗菌ペプチドの種類にはショウジョウバエ間で大きな差異があることが明らかになったが、その差異と食性との間に関係性は見いだせなかった。

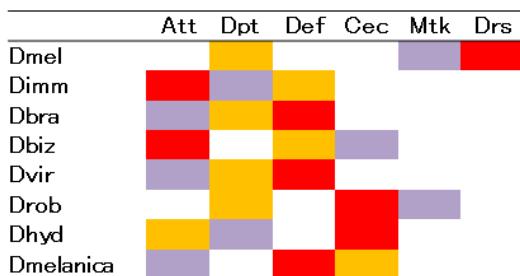


図2. 脂肪体における抗菌ペプチド遺伝子発現量のヒートマップ。発現量1位、2位、3位はそれぞれ赤、オレンジ、紫で示してある。

一方、腸管では抗菌ペプチド遺伝子の発現はほとんど観察されず、シトクローム P450 遺伝子や尿酸オキシダーゼ、グルタチオントランスフェラーゼなどの活性酸素の生成に関わる遺伝子の発現が見られた。これらの結果から、脂肪体や唾腺では抗菌ペプチド産生を中心とした免疫システムが、腸管では活性酸素生成を中心とした免疫システムが働いていることが示唆された。

アオカビの感染によって発現が誘導された抗菌ペプチド遺伝子において、分子系統解析を行い、進化速度が他から大きく異なる種が存在するか調べた。抗菌ペプチド遺伝子には遺伝子重複があり、Defensin 遺伝子はキロショウジョウバエでは1コピーのみ存在するが、クロショウジョウバエではゲノム中に2コピーのDefensin遺伝子が存在する。本研究結果から、クロショウジョウバエでは1コピー(図3、Dvir_2)のみで発現が観察された。また、カラスショウジョウバエ(図3、Dmelanica)やフタオビショウジョウバエ(図3、Dbiz)、ナガレボシショウジョウバエ(図3、Dbra_1)などもクロショウジョウバエのDefensin遺伝子と相同なコピーが発現していた。さらに、ナガレボシショウジョウバエには、配列の大きく異なるDefensin遺伝子も観察されたことから、機能的な変化が起こった可能性が示唆された。しかしながら、オオショウジョウバエ(図3、Dimm)では、クロショウジョウバエで発現の見られなかったコピーと相同なDefensin遺伝子が発現していた。以上のことから、果実食であるオオショウジョウバエとキロショウジョウバエは、アオカビ摂食に応答する遺伝子のコピーが樹液食やキノコ食の種とは異なることが明らかになった。

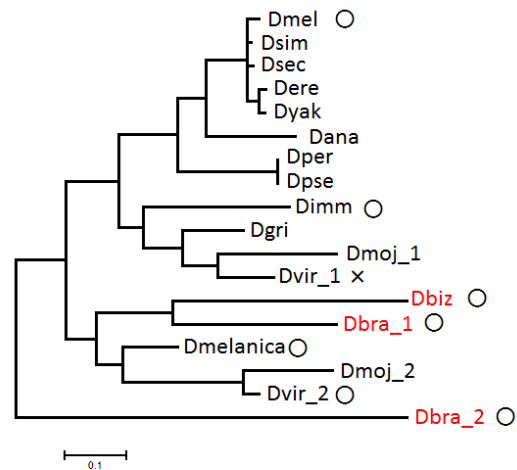


図3. Defensin 遺伝子の成熟ペプチド領域の塩基配列を用いて作成した最尤系統樹。キノコ食ショウジョウバエは赤で示してある。本研究で調べた種のうち、遺伝子発現が観察された種には○を、観察されなかった種には×を付記してある。

これらの結果から、ショウジョウバエにおいて、アオカビの摂食によって発現が誘導される免疫関連遺伝子は、食性の異なる種によって異なることが明らかとなった。このよう

な遺伝子発現制御の変化が様々な微生物環境への適応を可能にし、食性の進化の一つの要因となった可能性が考えられる。

(2) キイロショウジョウバエ種群に属する *D. suzukii*, *D. takahashii*, *D. lutescens*, *D. ficusphila*, *D. eugracilis* の5種の *Dro2*-*Dro5* 領域の塩基配列を決定し、*Dro2*, *Dro3*, *Dro4*, *Dro5* を同定した結果、種間でそれらの構成およびコピー数に大きな違いがあることが分かった(図4)。例えば、キイロショウジョウバエ亜群の4種が共有する *Dro2* はそれ以外の種では存在しておらず、一方、*D. takahashii*, *D. lutescens* では、*Dro3* が3~4コピー存在することが分かった。これらの配列の近辺には転移性因子(トランスポゾン)の断片が多く、これらの存在が高い変異性の原因となった可能性が示唆された。

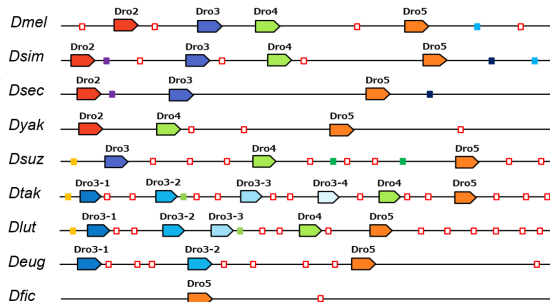


図4. キイロショウジョウバエ種群に属する9種における *Dro2*, *Dro3*, *Dro4*, *Dro5* の構成
□は Drosomycin 遺伝子、○あるいは塗つぶされた■は転移因子断片を示す。同一の色で塗りつぶされた■は相同配列を示し、□はユニークな配列を示す。

これらの配列は互いに相同性が高く遺伝子間の差異は大きくないが、分子系統樹を作製することによって容易に識別することができた(図5)。

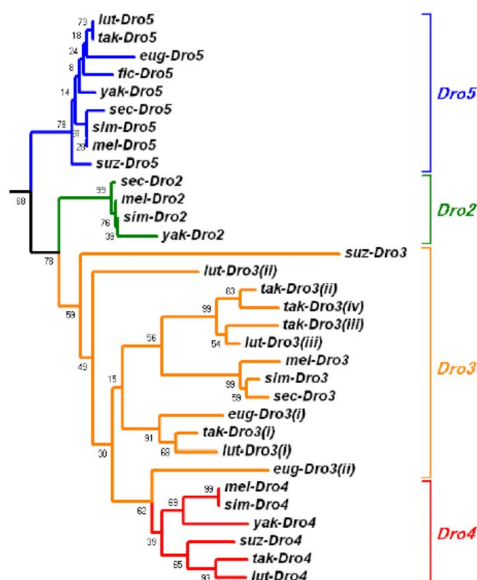


図5. *Dro2*, *Dro3*, *Dro4*, *Dro5* の分子系統樹

種間でコピー数の変異が特に大きかった *Dro3* に関しては、コピーそれぞれの遺伝子発

現量を、比較対照として *Drs*, *Dro5* とともに RT-qPCR 法によって調べた(表1)。この結果、*Dro3* を複数コピー持つ *D. takahashii*, *D. lutescens* では、遺伝子発現量が *Drs*, *Dro5* よりも多いコピーがあり、*Dro3* が主要な役割を担っていることが示唆された。また、どの *Dro3* のコピーの発現量が最も多いかは種によって異なるが、幼虫・成虫間、またアオカビ、酵母のいずれかを摂食したかによる差はあまり大きくなかった。

表1 ショウジョウバエ5種の成虫、幼虫における *Dro3*, *Dro5*, *Drs* の発現量

<i>Penicillium sp.</i>	<i>Dro3_1</i>	<i>Dro3_2</i>	<i>Dro3_3</i>	<i>Dro3_4</i>	<i>Dro5</i>	<i>Drs</i>
<i>D. melanogaster</i> 成虫	-	N/A	N/A	N/A	+	++
<i>D. melanogaster</i> 幼虫	-	N/A	N/A	N/A	-	++
<i>D. suzukii</i> 成虫	+	N/A	N/A	N/A	+	++
<i>D. suzukii</i> 幼虫	-	N/A	N/A	N/A	-	++
<i>D. eugracilis</i> 成虫	-	++	N/A	N/A	+	++
<i>D. eugracilis</i> 幼虫	-	-	N/A	N/A	-	++
<i>D. lutescens</i> 成虫	+	+	++	N/A	+	+
<i>D. lutescens</i> 幼虫	+	+	++	N/A	+	+
<i>D. takahashii</i> 成虫	++	-	-	+	++	+
<i>D. takahashii</i> 幼虫	++	-	-	++	+	+

<i>S. cerevisiae</i>	<i>Dro3_1</i>	<i>Dro3_2</i>	<i>Dro3_3</i>	<i>Dro3_4</i>	<i>Dro5</i>	<i>Drs</i>
<i>D. melanogaster</i> 成虫	-	N/A	N/A	N/A	+	++
<i>D. melanogaster</i> 幼虫	-	N/A	N/A	N/A	-	++
<i>D. suzukii</i> 成虫	+	N/A	N/A	N/A	+	++
<i>D. suzukii</i> 幼虫	-	N/A	N/A	N/A	-	++
<i>D. eugracilis</i> 成虫	-	++	N/A	N/A	+	++
<i>D. eugracilis</i> 幼虫	-	-	N/A	N/A	-	++
<i>D. lutescens</i> 成虫	+	+	++	N/A	+	+
<i>D. lutescens</i> 幼虫	+	+	++	N/A	+	+
<i>D. takahashii</i> 成虫	++	-	-	++	+	+
<i>D. takahashii</i> 幼虫	++	-	-	++	+	+

一: 発現しなかったまたは検出不可, +: 発現有, ++: 発現が最も高い, N/A: 遺伝子が存在しない。摂食によって発現量が有意に増加した場合は赤色、減少した場合は青色で示す。

種間でコピー数に大きな差異が見られた *Dro3* に関しては、*D. lutescens* の16系統を用いて種内変異の解析を行った。その結果、16系統内に大きく分けて3種類の配列型(Long, Standard, Short)が見つかった(図6A)。それぞれの配列型について塩基配列を決定して比較したところ、これらの配列型の差異は810bpおよび711bpの2カ所の挿入/欠失の有無によることが分かった(図6B)。711bpの配列中には *Dro3-1* の全長が含まれることから、*Dro3* のコピー数にも種内変異があること、また、*Dro3-1* は発現も確認されていることから(表1)、このコピー数変異は機能的差異を伴う可能性も示唆された。

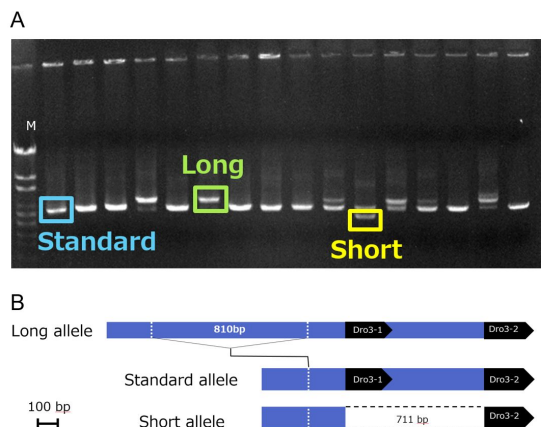


図6. *D. lutescens* 種内における *Dro3* 領域の長さの変異
A: アガロース電気泳動による長さの変異のタイピング。
B: Long, Standard, Short アレルの構造を示す模式図。

以上の結果から、ショウジョウバエの多様な微生物環境への適応進化の背景には、抗菌ペプチド遺伝子のゲノム中の構成、発現制御の両面における大きな変化があったことが明らかとなり、その関連が予想された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

市川里紗「抗菌ペプチド Drosomycin 遺伝子群におけるコピー数変異生成メカニズムの解明」2016年首都大学東京修士論文 (https://tokyo-metro-u.repo.nii.ac.jp/?action=repository_uri&item_id=2309)

〔学会発表〕(計13件)

(1) 瀬戸陽介「食性の異なるショウジョウバエにおける抗カビ免疫システムの種間比較解析」2016年9月9日・日本遺伝学会第88回大会・日本大学国際関係学部(静岡・三島)

(2) 清野健司「キイロショウジョウバエ種群におけるカビ感染時の腸内細菌叢の変動」2016年9月9日・日本遺伝学会第88回大会・日本大学国際関係学部(静岡・三島)

(3) 瀬戸陽介「食性の異なるショウジョウバエにおける抗真菌免疫システムの分子進化」2016年8月25日・日本進化学会第18回大会・東京工業大学大岡山キャンパス(東京・大岡山)

(4) 清野健司「キイロショウジョウバエ種群におけるカビ感染時の腸内細菌叢の変動」2016年8月25日・日本進化学会第18回大会・東京工業大学大岡山キャンパス(東京・大岡山)

(5) Seto, Yosuke "Comparative RNA-seq analysis of antifungal immune responses among *Drosophila* species" *SMBE* 2016, Annual Meeting of the Society for Molecular Biology and Evolution, 2016-7-4 (Gold Coast, Australia)

(6) 瀬戸陽介「ショウジョウバエ抗カビ免疫システムの種間比較解析」2015年9月7日・日本遺伝学会第87回大会・東北大学川内北キャンパス(宮城・仙台)

(7) 市川里紗「キハダショウジョウバエ種内における抗菌ペプチド Drosomycin 遺伝子の多様性」2015年9月7日・日本遺伝学会第87回大会・東北大学川内北キャンパス(宮城・仙台)

(8) 瀬戸陽介「抗真菌耐性の異なるショウジョウバエ種間における比較トランスクリプトーム解析」2015年8月20日・日本進化学会第17回大会・中央大学後楽園キャンパス(東京・文京区)

(9) 市川里紗「キハダショウジョウバエ種内における抗菌ペプチド Drosomycin 遺伝子の分子進化」2015年8月20日・日本進化学会第17回大会・中央大学後楽園キャンパス(東京・文京区)

(10) 田村浩一郎「遺伝子発現調節の変化による環境適応形質の進化」2014年9月17日・日本遺伝学会第86回大会・長浜バイオ大学(滋賀・長浜)

(11) 市川里紗「キハダショウジョウバエ種内における抗菌ペプチド Drosomycin 遺伝子群の多様性」2014年8月21日・日本進化学会第16回大会・高槻現代劇場(大阪・高槻)

(12) 田村浩一郎「キイロショウジョウバエ種群における抗菌ペプチド遺伝子 Dro3 の発現パターンの進化」2014年8月21日・日本進化学会第16回大会・高槻現代劇場(大阪・高槻)

(13) 瀬戸陽介「カビ感染に対するショウジョウバエ免疫応答の比較発現解析」2014年7月9日・日本比較免疫学会第26回学術集会・東北大学片平さくらホール(宮城・仙台)

〔その他〕

<http://www.biol.se.tmu.ac.jp/labo.asp?ID=evogen>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

首都大学東京・理工学研究科・教授
田村 浩一郎 (TAMURA, Koichiro)
研究者番号: 00254144

(2) 研究分担者

首都大学東京・理工学研究科・准教授
高橋 文 (TAKAHASHI, Aya)
研究者番号: 90370121

(3) 研究協力者

首都大学東京・理工学研究科・特任研究員
瀬戸 陽介 (SETO, Yosuke)
研究者番号: 50738614

首都大学東京・理工学研究科・大学院生
宮下 孝幸 (MIYASHITA, Takayuki)

首都大学東京・理工学研究科・大学院生
市川 里紗 (ICHIKAWA, Risa)

首都大学東京・理工学研究科・大学院生
清野 健司 (SEINO, Kenji)