

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07189

研究課題名(和文) ショウジョウバエで発見された新規の性比異常現象の原因因子とその機構の解明

研究課題名(英文) An analysis of the factor and the mechanism of sex ratio distortion found in *Drosophila bauraria*

研究代表者

和多田 正義 (WATADA, MASAYOSHI)

愛媛大学・理工学研究科(理学系)・教授

研究者番号：00210881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々はヤマカオジロショウジョウバエ (*Drosophila bauraria*) において、北海道から採集した複数の系統では子供が全て雌になる性比異常象を示すことを発見した。PCR実験、テトラサイクリン処理、RNA-seqによる解析等から、*D. bauraria*における性比異常現象の要因は、RNAウイルスとボルバキアが候補であること明らかになった。また、RNAウイルスによる雄殺しの系統では、未交尾の雌でも産卵が活発であり、RNAウイルスの作用は雄殺しだけでなく、産卵数の増加にまで影響を与えることが明らかになった。一方、ボルバキアによる全オス系統では、産卵数に与える特別な影響は見られなかった。

研究成果の概要(英文)：A single female of *Drosophila bauraria* collected in Hokkaido, produced all-female offspring. This trait was maternally inherited in the iso-female line (SP12F) by backcrossing with males of a normal line (SP11-20). Injection of the homogenate of SP12F females into SP11-20 females established all-female matriline, suggesting that transmissible agent are most likely viruses, but not bacteria or protists. RNA-seq analysis using SP12F, SP11-20 and the transformed strain suggested that partitivirus with double strand RNA genomes was a candidate virus. In addition, we collected each three females of *D. bauraria* that produced all-female offspring in Tomakomai in 2015 and 2017. However, these females were not infected by the virus, but by *Wolbachia*. We found large difference in two physiological characters. One is the degeneration of mitochondria in *D. bauraria* strain infected by the virus, and the other is the abundance of eggs oviposited by virus infected virgin females.

研究分野：進化遺伝学

キーワード：ショウジョウバエ 性比異常 RNAウイルス ボルバキア インジュークシオン

1. 研究開始当初の背景

昆虫の細胞内には様々な微生物が共生していることが知られている。このような微生物の多くは感染性を持たず、卵内の細胞質を介してメス親からのみに伝播する。娘(メス)に伝わった場合はさらにその次世代に伝わるができるが、息子(オス)に伝わった場合はそれ以上伝播できず進化的には死んだも同然となる。近年、様々な微生物がいろいろな方法で宿主の性比をメスに偏らせていることが分かり、昆虫の繁殖システムに与えるこのような微生物の利己的な振る舞いに対して、進化生物学、発生生物学、害虫管理学などの分野からの注目が集まっている。性比異常を引き起こす昆虫の中でも、ショウジョウバエは多くの種について研究されており、ボルバキアやスピロプラズマの感染に関しては、225種にもわたって調査した網羅的な研究もある。一方、共生細菌以外が性比異常を引き起こす例は、非常に少なく、昆虫ではチャハマキという蛾の一種でウイルスによる雄殺しの報告があるだけである。

今回、我々は北海道のヤマカオジロショウジョウバエ(*Drosophila biauvaria*)の自然集団から、メスしか産まない1系統を発見した。この系統ではよく知られた細胞内共生細菌によるオス殺し現象と同様に、母から子に確実に伝わるだけでなく、正常系統への細胞物質のインジェクションにより、正常系統がメスばかりを産む形質転換を引き起こすことが明らかになった。さらに共生細菌特異的な遺伝子をプライマーにしたPCR法による調査や、電子顕微鏡観察でも細菌や真核微生物の特有の構造は全く見られず、細胞質内(核外)にウイルスのような像が観察された。これらのことから、メスのみの成虫が得られる原因は細菌や真核微生物ではなく、細胞物質を通じて感染可能である何らかの因子であるといえる。現時点ではRNAウイルスである可能性が濃厚であるが、それを確かめるためには超遠心によるウイルスの単離がRNA-seqによる遺伝子の同定が必要である。チャハマキでは、ウイルスの単離は行われていないものの、メスばかり生まれる系統のみに特定のRNA断片が存在することや細胞物質のインジェクションによりメスばかりになる形質転換が起こることから、原因はRNAウイルスであると考えられている。

共生細菌による性比異常の現象は多くの昆虫で報告されているが、どのような機構で性比異常が起こるのかを明らかにした研究は、未だにない。フタスジショウジョウバエにおける雄殺しが、雄の胚発生における染色体の分裂異常であるという報告があるが、ウイルスが原因でメスばかりになるチャハマキにおいても詳細は不明のままである。このような状況で、ヤマカオジロショウジョウバエの性比異常現象が、ウイルスによるものであるとすると、メスばかり生まれるメカニズムの解明に大きな貢献をすることができる

ようになると思われる。

2. 研究の目的

我々はヤマカオジロショウジョウバエで、子がすべてメスになる系統を発見した。この現象は、細胞内共生細菌による雄殺しと同様に母から子に確実に伝わりと同時に、正常系統への細胞物質のインジェクションによって形質転換が可能である。ところが、分子生物学的解析や電子顕微鏡観察などでは細菌類が検出されないことから、ウイルス様の因子がその原因として疑われる。ウイルスが原因でメスばかりになる現象は非常に稀で(チャハマキで報告があるのみ)、詳細は不明のままである。本研究では、その原因因子を特定するとともに、モデル生物であるキイロショウジョウバエを用いるなど、様々なアプローチでメスばかりになる機構を明らかにする。これにより、昆虫の生殖システムを人為的に操作する技術の開発にもつながることが期待できる。

(1) 北海道でヤマカオジロショウジョウバエを採集し、単一雌系統を確立することによってメスしか出現しない系統が、どの程度集団中に存在するかを調査する。採集した単一雌系統は、上記の頻度調査に用いられるだけでなく、後の研究にも用いることができる。ウイルスが同定された後は、ウイルス由来の特異的プライマーを作成し、野外集団での性比異常に関するウイルス抵抗性系統のスクリーニングに使用される。また、採集されたメスしか出現しない系統は、異なる遺伝的バックグランドを持った系統としてRNA-seqの研究に使用する予定である。

(2) 野外で採集したヤマカオジロショウジョウバエの全メス系統に関して、そのメカニズムや他の形態的、生理的な特徴を正常系統と多面的に比較することにより、共生因子の宿主に与えるさまざまな影響を研究する。

(3) ヤマカオジロショウジョウバエ間では、全メス系統の細胞物質をインジェクションすることにより、正常系統での形質転換が起こることがすでに明らかになっている。このインジェクション研究を本格的に行い、多くの形質転換系統を作成する。また、本研究では、キイロショウジョウバエなどの近縁種に、インジェクション実験をすることにより、メスのみを出現させる因子がどの種まで有効であるかを試みる。キイロショウジョウバエで感染が成立すれば、今後の研究を発展させる上で非常に重要な結果になる。

(4) ヤマカオジロショウジョウバエのいろいろなバックグランドを持つ全メス系統と正常系統を用いて、RNA-seqを行い、性比異常の原因遺伝子を特定する。ウイルスのゲノムの全長又は一部の塩基配列を決定する。これにより、ヤマカオジロショウジョウバエの性比異常がウイルスによるものであることの決定的な証拠を得ることができる。また、

これによりウイルス由来の特異的プライマーを作成することが可能になり、自然集団中のスクリーニングを可能にする。

3. 研究の方法

(1) ヤマカオジロショウジョウバエの野外採集と性比異常系統の確立

平成 27 年と 29 年の夏に北海道の苫小牧でヤマカオジロショウジョウバエを採集し、性比異常系統の収集を行う。このことにより、性比異常系統の自然集団中の頻度が分かるだけでなく、ウイルス由来の特異的プライマーの作成が可能になった後は、野外集団での性比異常に関するウイルス抵抗性系統のスクリーニングに使用される。また、複数の全メス系統は、異なる遺伝的バックグラウンドを持った系統として RNA-seq の研究に使用する。

(2) 全メス系統の形態的、生理的研究

野外で採集したヤマカオジロショウジョウバエの全メス系統に関して、卵巣の電子顕微鏡観察を行う。このことにより、ウイルス粒子が存在するかどうか形態的に確認することができる。また、全メス化以外の多面的な影響があるかどうかを、正常系統のメス及び形質転換によって全メス系統になった系統と共に産卵数の測定を行い、産卵数にどのような影響を与えるかを調査する。

(3) 原因因子のインジェクション実験

ヤマカオジロショウジョウバエの全メス系統の細胞物質をインジェクションする法を用いて、多数の正常系統のメスにインジェクションを行う。インジェクションしたメス個体に正常系統の雄を交配し、子供にオスも出てくるかどうかで形質転換の有無を判断する。ヤマカオジロショウジョウバエの全メス系統の細胞物質をキイロショウジョウバエのメスにもインジェクションを行い、他種でもウイルスがメスのみにすることが可能であるかどうか調査する。

(4) ヤマカオジロショウジョウバエの正常系統と全メス系統を用いた RNA-seq の実験

ヤマカオジロショウジョウバエで全メス系統、形質転換により全メス系統になった系統及び正常系統を用いて RNA-seq によりトランスクリプトームの比較を行う。ヤマカオジロショウジョウバエは、いくつかの正常系統が当研究室に維持されている。また、北海道での採集により、新たに全メス系統を収集できればそれらの系統を用いて、いろいろな遺伝的バックグラウンドを持つ系統による RNA-seq を行う。RNA-seq は、Illumina HiSeq2000 シークエンサーを用い、100 bp x 2、ペアード・エンドによる解析により、全 12 サンプルをマルチプレックスにてシークエンスを行う。得られた各サンプル由来のリードを計算機上でショウジョウバエゲノム配列にマッピングすることで、発現遺伝子の構造決定や遺伝子発現情報等の解析を行

い、性比異常の原因遺伝子を特定する。

4. 研究成果

(1) ヤマカオジロショウジョウバエの野外採集

2015 年に北海道で採集されたヤマカオジロショウジョウバエのメスになる系統（全メス系統）は、細胞内共生菌による雄殺しと同様に母から子に確実に伝達する。本研究での分子遺伝的解析や抗生物質処理、及び電子顕微鏡観察では原因となる細菌類が検出されなかったことから、この性比異常現象の原因はウイルス様因子が原因ではないかと考えられた。最初の系統が発見された北海道で 2015 年と 2017 年にヤマカオジロショウジョウバエの採集を行った。2015 年に採集されたヤマカオジロショウジョウバエ 55 系統のうち、3 系統が性比異常の系統であり、その頻度は 2011 年の 5% と同様な 5.5% になった。2015 年に北海道で採集されたヤマカオジロショウジョウバエの 3 系統の性比異常系統は、PCR 法による調査で *Partitivirus* によるものでなく、ボルバキアによるものであることが明らかになった。本研究の結果、ショウジョウバエでは初めて 1 つの種で 2 つの要因による性比異常現象があることが明らかになった。すなわち、ヤマカオジロショウジョウバエにおける性比異常現象の要因はウイルスとボルバキアの 2 つがあることが判明した。2017 年に採集されたヤマカオジロショウジョウバエ 43 系統のうち、3 系統はボルバキアが感染した性比異常の系統であり、その頻度は 6.9% になった。これらの調査により性比異常現象は現在も野外で維持されていることが明らかになった。

(2) 全メス系統の形態的、生理的研究

Partitivirus による全メス現象が雄殺しであるかどうかを確認するために、全メス系統及び雌雄が産まれる正常系統で孵化率と卵から成虫までの生存率を調査したところ、全メス系統では卵から成虫までの生存率は孵化率の半分で、この現象が雄殺しであることが示唆された。さらに、*Partitivirus* による全メス系統は、正常系統と比較して産卵数の増加やミトコンドリアの形態異常の増大も引き起こすことが観察された。一方、ボルバキアによる雄殺しの系統では、産卵数に与える特別な影響は見られなかった。以上の事より、雄殺しのメカニズムは同一でないことが示唆された。

(3) 原因因子のインジェクション実験

全雌系統の細胞物質をヤマカオジロショウジョウバエとキイロショウジョウバエの雌にインジェクションし、その雌の子に雄が出るかどうかで判断する形質転換の実験を行った。結果は一部のヤマカオジロショウジョウバエでのみ形質転換がおり、キイロショウジョウバエでは現在のところ形質転換体は得られていない。インジェクションによる正常系統から全メス系統への形質転換の

割合は大変低く、再現性がほとんどなかった。そこでインジェクションする体液を濃縮する方法を開発した結果、インジェクションの成功率を上げることができ、より多くの形質転換体を得ることができた。また、正常系統に全メス系統の磨砕物をインジェクションし、全メス系統を確立する際に一部にオスが現れる不完全な系統が出現した。この系統のメスをそれぞれ単一メス系統として確立し、それぞれの性比を調査したところ、正常系統、不完全な系統、及び完全な全メス系統が得られた。

(4) ヤマカオジロショウジョウバエの正常系統と全メス系統を用いた RNA-seq の実験

2011年に採集された全雌系統、正常系統及び形質転換により全雌系統になった系統を用いて、雌雄が産まれる正常な系統の雌雄をコントロールとして RNA-seq によりトランスクリプトームの比較実験を行った。その結果、複数のウイルス遺伝子が検出された。コントロールでは全く検出されなかったが、全雌系統と形質転換により全雌系統になった系統に共通して検出されたのは、RNA ウィルスである *Partitivirus* の遺伝子であった。全雌系統に複数のウイルスが存在することが RNA-seq の結果、明らかになったので超遠心機によるウイルス粒子の精製は行わないことになった。RNA ウィルスによる全メス系統で、リボソームを除去した RNA を用いて RNA-seq を行ったところ、以前得られた *Partitivirus* の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp) に相同な配列以外に3本の遺伝子が全メス形質にリンクして高発現を示していることがわかった。これら3本の遺伝子(ここでは MKV1, MKV2, MKV3 とする)はタンパクをコードしていると推定されるが、相同性検索からは既知の配列は見つからなかった。*Partitivirus* は植物や菌類で知られる2本鎖 RNA ウィルスであり基本的に2分節のゲノムをもち、RdRp とコートタンパクがコードされている。今回見つかった4本の配列が、1つの *Partitivirus* が持つ遺伝子なのか、それとも複数のウイルス(様因子)が共存しているのかは不明である。また、正常系統に全メス系統の磨砕物をインジェクションし全メス系統を確立する際に、一部の系統でこれら4本の遺伝子のうち、一部の遺伝子が抜け落ちた系統を得ることができた。これらの系統の性比から特定の配列(MKV1)がオス殺しに必要な遺伝子であることが推定された。

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 1件)

- (1) Kageyama D, Yoshimura K, Sugimoto TN, Katoh TK, Watada M. Maternally transmitted non-bacterial male killer

in *Drosophila biauraria*. *Biology letters* (2017) 13, DOI: 10.1098/rsbl.2017.0476

[学会発表](計 5件)

- (1) 和多田正義・芳村奏夢・杉本貴史・陰山大輔. ヤマカオジロショウジョウバエで発見された2種類の性比異常現象の遺伝学的解析(2018) 生物系三学会中国四国支部大会(山口大会)
- (2) 陰山大輔・藤原亜希子・杉本貴史・加藤雄大・和多田正義. 非細菌性因子による全メス現象:RNA ウィルスが原因か?(2018) 日本応用動物昆虫学会第62回大会
- (3) 和多田正義・芳村奏夢・杉本貴史・陰山大輔. ヤマカオジロショウジョウバエの性比異常現象における2つの要因の比較研究(2017) 日本分子生物学会
- (4) 和多田正義・芳村奏夢・陰山大輔. ヤマカオジロショウジョウバエで発見された2種類の性比異常現象の比較解析(2017) 日本昆虫学会第77回大会
- (5) 和多田正義・芳村奏夢・陰山大輔. ショウジョウバエで発見された新規の性比異常現象の遺伝的解析(2016) 日本遺伝学会第88回大会

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和多田 正義 (WATADA MASAYOSHI)
愛媛大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号: 00210881

(2) 研究分担者

陰山 大輔 (KAGEYAMA DAISUKE)
農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・上級研究員
研究者番号: 60401212