

平成21年6月12日現在

研究種目： 若手研究 (B)  
 研究期間： 2006 ~ 2008  
 課題番号： 18770219  
 研究課題名 (和文) 宿主昆虫ゲノムに存在する共生微生物由来の転移ゲノム断片の機能の解明  
 研究課題名 (英文) Function of laterally transferred genome fragment from endosymbiotic bacteria to nuclear genome of host insects  
 研究代表者  
 二河 成男 (NIKOH NARUO)  
 放送大学・教養学部・准教授  
 研究者番号： 70364916

## 研究成果の概要：

アズキゾウムシゲノムのボルバキアから水平転移したゲノム断片が 360kb に及ぶこと、転移断片上の遺伝子は、読み枠が壊れ、転写産物もわずかであり、偽遺伝子化していることを示した。エンドウヒゲナガアブラムシでは、宿主昆虫の必須共生細菌ブフネラを保持する菌細胞で高い発現を示す遺伝子の中に、ボルバキアの近縁種から水平転移した遺伝子が存在することを示した。この転移遺伝子は、その由来とは異なる共生細菌の維持に関与している。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 18 年度	1,400,000	0	1,400,000
平成 19 年度	1,100,000	0	1,100,000
平成 20 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	240,000	3,540,000

研究分野： 生物学

科研費の分科・細目： 生物科学・進化生物学

キーワード： 機能進化 遺伝子水平転移 ゲノム進化 共生

## 1. 研究開始当初の背景

複数の原核生物の全ゲノム配列が決定されたことによって、原核生物では遺伝子の水平転移による生物種の障壁を越える遺伝情報の伝達が、予想以上に頻繁に起こっていることが明らかになった。さらに、ゲノム解析が進展した単細胞性の真核生物においても、遺伝子の水平転移が起こっていることが明らかになってきた。一方、多細胞の真核生物においては、過去の単細胞性の頃の痕跡や、ミトコンドリア、色素体といったオルガネラゲノムからの移行という形でのみ、遺伝子の水

平転移が見られ、他の生物から転移した遺伝子は発見されていなかった。しかし近年では、多細胞性の真核生物でも遺伝子の水平転移が明らかになった。そのきっかけとなった研究の一つが、共生細菌ボルバキアのゲノムの一部がアズキゾウムシのX染色体に水平転移したことを示した今藤らの報告である (Kondo, Nikoh, et al. 2002 PNAS)。この報告により、共生細菌から宿主多細胞生物への遺伝子の水平転移が示され、細胞分化が進んだ多細胞生物においても、遺伝子の水平転移が起こることが認知された。また、アズキゾウムシ日

本産野外個体のボルバキア感染の包括的な解析から、この転移ゲノム断片は集団中に固定されていることがわかり (Kondo et al. 2002 Mol. Ecol.), その役割や機能が注目されている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、共生細菌から宿主昆虫ゲノムへ水平転移したゲノム断片や遺伝子がどのように分子進化的な変遷を経て現在に到っているか、そして、現在の機能と役割が何であるかを明らかにすることである。

原核生物では、遺伝子の水平転移により、抗生物質耐性、病原性などの機能を生物が獲得することが明らかになっている。同様の機能転移が、共生細菌から宿主昆虫への遺伝子の水平転移に伴って起こっているか、否かを明らかにする。これは、変異や重複といった自身のゲノムの利用に加えて、水平転移といった大きな変化が、生物進化全般にどれだけの貢献をしているかを明確に示すこととなる。

具体的には、水平転移したゲノム断片の全体像を明らかにし、それらの遺伝子断片の配列解析を行う。そして、転写解析を行い、遺伝子発現の質と量を明らかにする。このなかで機能を持つとされる遺伝子について詳細な解析を行っていく。

## 3. 研究の方法

(1) アズキゾウムシゲノム中のボルバキア由来ゲノム断片について

- ① 全ゲノムが明らかになっている3種類のボルバキアの情報を元に、ボルバキア遺伝子に特異的なプライマーを200程度作成し、各遺伝子の宿主昆虫への転移の有無を明らかにする。
- ② 上記のプライマーを元に、ボルバキアゲノムを網羅するゲノム断片のロングPCRによる増幅を行う。これをプローブとして、アズキゾウムシゲノムに対して、サザンブロットを行い、各領域の転移の有無を明らかにする。
- ③ 転移が明らかになった遺伝子について RT-PCRにより転写産物の有無の確認
- ④ 定量的RT-PCR法による、転写量の同定。

⑤ 定量的RT-PCR法による、転写部位の特定。

(2) エンドウヒゲナガアブラムシゲノム中の共生細菌由来ゲノム断片について

- ① 網羅的なEST解析、全ゲノム解析が進行中であるため、それらの配列情報を元に、生物情報学的に共生細菌由来の水平転移遺伝子を同定する。
- ② その転移遺伝子配列に基づいて、分子系統進化的解析を行い、転移遺伝子の由来と、その分子進化を明らかにする。
- ③ 転移が示唆された遺伝子についてゲノム上に存在することをPCR、塩基配列の決定、定量的PCRにより確認する。
- ④ RT-PCR法、定量的RT-PCRを用いて、転写量を同定し、その転写部位も明らかにする。

## 4. 研究成果

(1) アズキゾウムシゲノム中のボルバキア由来する転移ゲノム断片について

① 205のボルバキア遺伝子特異的プライマーを用いてPCRを行ったところ、57についてアズキゾウムシゲノムから増幅が見られた。塩基配列を決定し、目的遺伝子断片の増幅であることを確認した(図1)。

また、143のボルバキアゲノム断片をロングPCRにより増幅した。この断片は平均8.4kbあり、お互いに平均0.4kbの重なりがある。この増幅断片全体で、ボルバキアゲノムの9割をカバーする。この各断片をプローブとして、アブラムシゲノムに対してサザンブロットを行い、52のプローブにおいて、シグナルを得た。このことは、プローブに用いた断片の全部あるいは一部に、宿主に水平転移したゲノム断片が含まれていることを示している(図1)。

以上のようにボルバキアゲノム全体を網羅するPCRの28%で、アズキゾウムシゲノムからの増幅が見られた。また、36%のボルバキアゲノム断片が、宿主ゲノムとハイブリダイズした。よって、少なくともボルバキアゲノムの30%に相当する380kbのゲノム断片が、宿主ゲノムに挿入されていると推測される。

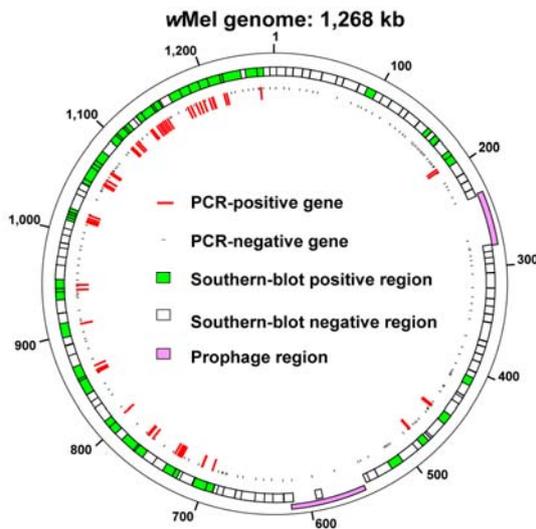


図1 ショウジョウバエ感染ボルバキアゲノムにマップしたアズキゾウムシゲノム上のボルバキア由来の遺伝子 PCRで増幅された遺伝子 (赤線)、PCRで未増幅の遺伝子 (黒線)、サザンブロットでシグナルが見られたPCR増幅断片 (緑ブロック)、シグナルが見られなかった断片 (白抜きブロック)

では、転移ゲノム断片はどのボルバキアに由来するのだろうか。56の転移遺伝子を用いて、3種類のボルバキアと転移ボルバキアゲノム断片との分子系統解析を行った。その結果、転移ボルバキアゲノム断片は、ショウジョウバエ感染ボルバキアともっとも近縁であることが再確認された。個別の遺伝子レベルでもショウジョウバエ感染ボルバキアの遺伝子ともっとも類似していることがわかった。

これまでの解析から、ショウジョウバエ感染ボルバキアゲノムにマッピングした転移遺伝子は集まって存在し(図1)、染色体FISHにおいてもX染色体の短腕基部に常にシグナルが見られ、分子系統解析も遺伝子によらずショウジョウバエ感染ボルバキアゲノムとの類縁性を示す。これらのことは、水平転移遺伝子が個別に異なるボルバキアに由来するのではなく、巨大なゲノム断片が、ショウジョウバエ感染ボルバキアと近縁なボルバキアから一度の転移で宿主に水平転移したと考えるのが妥当である。

②57の水平転移遺伝子について、塩基配列を決定して、既知のショウジョウバエに感染している共生細菌ボルバキアのゲノム配列と

比較した。その結果、27の転移遺伝子において、ナンセンス突然変異やフレームシフト突然変異により、その遺伝子の読み枠が壊れていた。したがって、水平転移遺伝子の多くは、機能するタンパク質をコードする情報を保持していないことがわかった。また、転移遺伝子においては、ボルバキアゲノムの遺伝子より、”(アミノ酸の置換を引き起こす塩基置換)/(アミノ酸置換を伴わない置換)”の比率が高く、アミノ酸置換の分子進化速度が転移遺伝子で加速していることが明らかになった。

57の転移遺伝子についてRT-PCR法により転写産物の有無を確かめた。その結果、23の転移遺伝子では増幅がみられなかったが、34の転移遺伝子については、増幅が見られた(図2A)。増幅産物は塩基配列決定により目的産物であることを確認した。

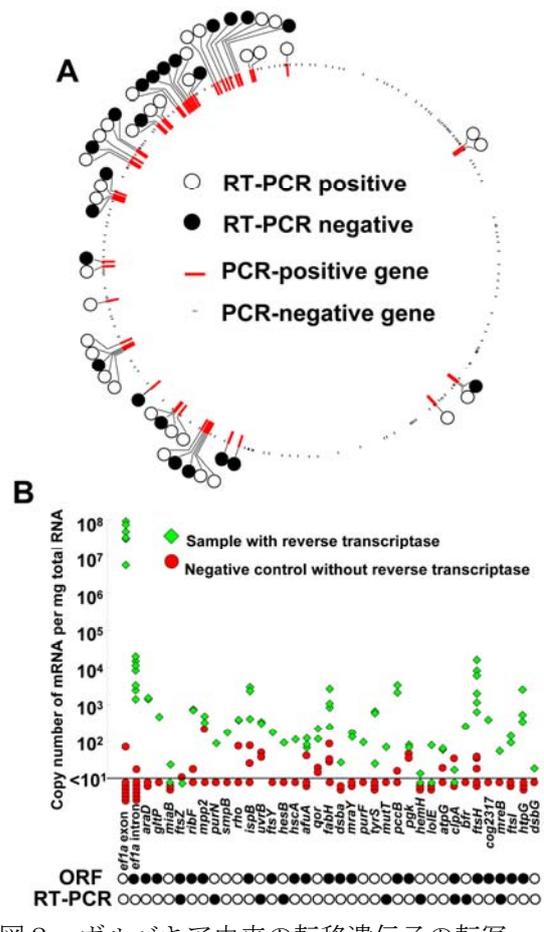


図2 ボルバキア由来の転移遺伝子の転写活性 (A) RT-PCRによる検出 目的産物の増幅有り (●)、増幅なし (○) (B) 35の転移遺伝子の定量的RT-PCR解析 転写産物 (緑菱)、ネガティブコントロール (●) ;

ORFの行、読み枠有 (○)、読み枠が壊れている遺伝子 (●) ; RT-PCRの行 増幅あり (○)、増幅なし (●)。

さらに定量的RT-PCR法を用いて35の転移遺伝子について転写産物量を測定した。17の転移遺伝子において、1 マイクログラム当たり  $10^2$ - $10^4$  コピーの転写産物が存在することがわかった。一方、コントロールとして宿主の遺伝子であるペプチド伸長因子1・のmRNAのコピー数とイントロンRNAのコピー数を測定したところ、各々  $5 \times 10^7$ 、 $10^4$  コピーの転写産物が存在することが明らかになった (図2B)。以上の結果は、転移遺伝子からの転写が起きていることを示している。しかし、その転写量はごくわずかであり、通常の遺伝子のイントロンと同一レベルである。したがって、転写されてもすぐに分解される産物と同等かそれ以下の転写産物しか存在しない。したがって、機能を持つ遺伝子であるかどうかは疑わしい。頭胸部と腹部に分けて定量的RTPCRを行っても、同様の結果であり、組織特異的な転写は見られなかった。

このように、調べた限り転移遺伝子は、タンパク質として十分な機能を持つレベルで転写が起っておらず、また、読み枠も壊れ、アミノ酸置換への機能的制約も低くなっている。これらの結果は、ボルバキア由来の転移遺伝子の全部あるいは大部分が、偽遺伝子化していると予想される。

③転移遺伝子の機能を知る上で、アズキノウムシ内で、転移遺伝子を持つ系統と持たない系統を比較することが重要である。そこで、転移遺伝子を持たない系統を探索した。ボルバキアの *wsp* 遺伝子特異的なプライマーを用いたPCRにおいて、ほとんどの日本産及び台湾産野外個体では、増幅が見られたが、いくつかの個体で、増幅が見られなかった。それらの個体について、系統を樹立し、抗生物質処理により感染しているボルバキア、あるいは他の細菌を除去した (日本産: k10U2, r13U1; 台湾産: Rmtet)。系統間の転移遺伝子数の相違に関して、これまで解析に用いてきた *jC<sup>Aus</sup>*、今回作成し

た *wsp* の k10<sup>U2</sup>、r13<sup>U1</sup>、Rm<sup>tet</sup> の4つの宿主系統を用いて、PCR法により調べた。その結果、新たに作成した系統にも転移した遺伝子の存在を確認できた。k10<sup>U2</sup> および r13<sup>U1</sup> で41の転移遺伝子が存在することがわかった (k10<sup>U2</sup> と r13<sup>U1</sup> では同一)。Rm<sup>tet</sup> では、32の転移遺伝子が見られた。これらはRm<sup>tet</sup> の1つの遺伝子を除いて、これら4つの系統に共通して存在する (図3)。そして、系統間の進化関係に基づくと、Rm<sup>tet</sup> は他の系統と分岐後、26の転移遺伝子を失い、k10<sup>U2</sup> + r13<sup>U1</sup> でも *jC<sup>Aus</sup>* との分岐後、16の転移遺伝子をRm<sup>tet</sup> 系統での欠失と平行して失ったことがわかった。これは、全系統が共有する転移遺伝子はゲノム中に *jC<sup>Aus</sup>* では2コピー保持しているため、他の系統でも元々2コピー持っていて、進化の過程で失いにくかったと推定される。このような領域内に水平転移遺伝子の機能と関連する遺伝子が存在する可能性がある。

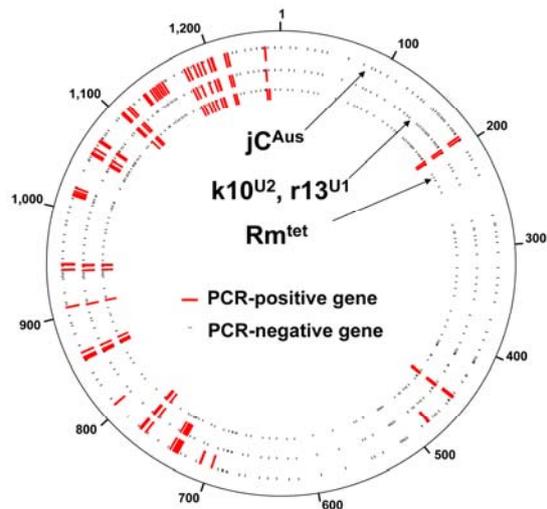


図3 ショウジョウバエ感染ボルバキアゲノムにマップした4つの系統のアズキノウムシゲノム上のボルバキア由来の遺伝子PCRで増幅された遺伝子 (赤線)、PCRで未増幅の遺伝子 (黒線)

(2) エンドウヒゲナガアブラムシゲノム中の共生細菌由来ゲノム断片について

エンドウヒゲナガアブラムシでは、ブフネラという細胞内必須共生細菌を体内の菌細胞に保持している。この菌細胞で発現する遺伝子の網羅的な解析が行われ、多数の遺伝子についてその配列の決定が行われた。

その中に、真核生物の遺伝子ではなく、細菌の遺伝子と高い相同性を示す遺伝子が2種類あることがわかっていた (Nakabachi et al. 2005 PNAS)。

この2つの遺伝子について分子進化的な解析を行った。相同検索の結果、この2つの遺伝子は、各々、ショウジョウバエ感染ボルバキアの遺伝子、および、根粒菌の *Bradyrhizobium* の遺伝子ともっとも類似していることがわかった。ボルバキアの遺伝子は、大腸菌では LD-coxypeptidase (LdcA) ともっとも類似しており、根粒菌の遺伝子は大腸菌では rare lipoprotein A (RlpA) ともっとも類似していた。アブラムシ LdcA および他の細菌の相同遺伝子との分子系統解析を行った結果、アブラムシ LdcA はリケッチア類の細菌、中でもツツガムシ共生細菌やボルバキアと近縁であることが統計的にも有意に示された (図4)。

RlpA の分子系統樹の推定も行った。アブラムシ RlpA は特定の細菌 RlpA との近縁性を示したわけではないが、*rlpA* 遺伝子をゲノム中にコードする真核生物はアブラムシのみであるため、この遺伝子もいずれかの細菌より水平転移によって獲得されたことを示している。

これら2つの遺伝子の、定量的 RT-PCR による転写産物の定量解析は、どちらの遺伝子も菌細胞特異的に高い転写活性を示した (共同研究者の実験結果)。

以上の結果から、エンドウヒゲナガアブラムシゲノム中には、水平転移により獲得した遺伝子が存在し、その内の1つはボルバキアの祖先に由来すること、さらに両遺伝子ともに、必須共生細菌 *ブフネラ* が局在する菌細胞で特異的に発現していることが示された。つまり、アブラムシは、*ブフネラ* という共生細菌の維持に、別の日和見感染したボルバキア様の細菌から水平転移で獲得した遺伝子を利用しているのである。多細胞性の真核生物が水平転移により遺伝子を獲得し、その転移遺伝子が転移後も機能していることは、水平転移の進化的な重要性を示すだけでなく、昆虫-真正細菌の共生の進化や維持機構の解明にもヒントを与えるものである。

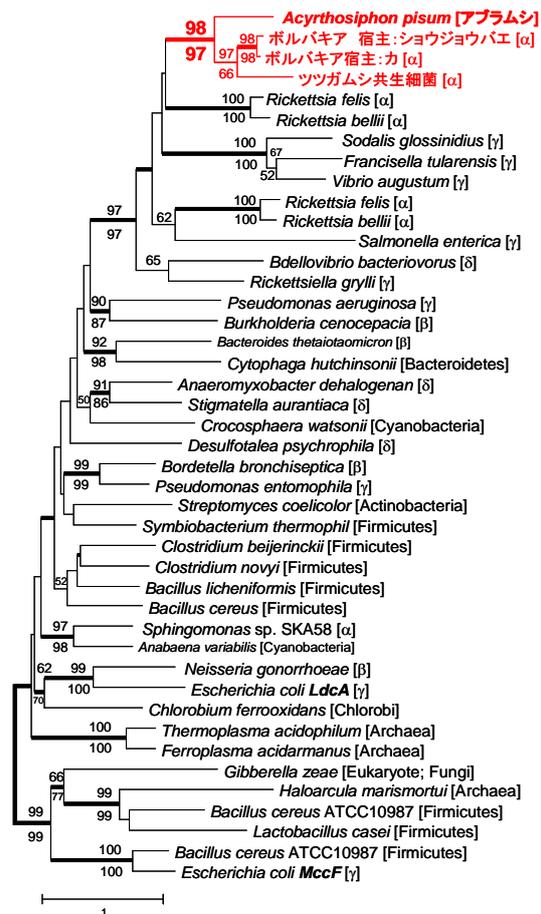


図4 LdcA の分子系統樹 NJ のブーツストラップ値 (ノード上)、ML のブーツストラップ値 (ノード下)、ベイズの事後確率 > 0.95 (ノード太線)、アブラムシ-ボルバキア-ツツガムシ共生細菌のクラスターを赤で示す。

## 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)

- ① Nikoh N and Nakabachi A (2009) Aphids acquired symbiotic genes via lateral gene transfer BMC Biology 7:12, 査読有
- ② Y Kikuchi, T Hosokawa, Nikoh, X-Y Meng, Y Kamagata T Fukatsu (2009) Host-symbiont co-speciation and reductive genome evolution in gut symbiotic bacteria of acanthosomatid stinkbugs. BMC Biology 7:2, 査読有
- ③ Nikoh N, Tanaka K, Shibata F, Kondo N,

Hizume M, Shimada M, Fukatsu T (2008) Wolbachia genome integrated in an insect chromosome: evolution and fate of laterally transferred endosymbiont genes. *Genome Research* 18:272-280, 査読有

- ④ Kutsukake M., Nikoh N., Shibao H., Risper C., Simon J.-C., Fukatsu T. (2008) Evolution of soldier-specific venomous protease in social aphids. *Molecular Biology and Evolution* 25:2627-41, 査読有
- ⑤ Fukatsu T, Koga R, Smith WA, Tanaka K, Nikoh N, Sasaki-Fukatsu K, Yoshizawa K, Dale C, Clayton DH (2007) Bacterial endosymbiont of the slender pigeon louse *Columbicola columbae* allied to endosymbionts of grain weevils and tsetse flies. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 6660-6668, 査読有
- ⑥ K Sasaki-Fukatsu, R Koga, N Nikoh, K Yoshizawa, S Kasai, M Mihara, M Kobayashi, T Tomita, T Fukatsu (2006) Symbiotic bacteria associated with stomach disc of human lice. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 7349-7352, 査読有
- ⑦ T Hosokawa, Y Kikuchi, N Nikoh, M Shimada, T Fukatsu (2006) Strict host-symbiont cospeciation and reductive genome evolution in insect gut bacteria. *PLOS BIOLOGY* 4:1841-1851, 査読有

[学会発表] (計6件)

- ① 二河成男、中鉢淳 アブラムシが水平転移により獲得した細胞内共生に関連する遺伝子について 日本進化学会 (東京)、2008年8月22日
- ② Nikoh N, Tanaka K, Shibata F, Kondo N, Hizume M, Shimada M, Fukatsu T (2008) Wolbachia Genome Integrated in a Host Insect Chromosome: Evolution and Fate of Laterally Transferred Endosymbiont Genome Fragments. 20th International Congress of Genetics (Berlin, Germany) July 15, 2008
- ③ Nikoh N, Tanaka K, Shibata F, Kondo N, Hizume M, Shimada M, Fukatsu T (2008)

Wolbachia genes transferred to a host insect chromosome: evolution and fate of a laterally transferred endosymbiont genome fragment. 5th International Wolbachia Conference (Chania, Greece) Jun 11, 2008

- ④ 二河成男、田中康次郎、柴田洋、今藤夏子、嶋田正和、深津武馬 宿主昆虫核ゲノムに水平転移した共生細菌Wolbachiaゲノム断片の構造と機能 日本微生物ゲノム学会 (千葉)、2007年3月1日
- ⑤ 二河成男、今藤夏子、深津武馬 宿主核ゲノムに水平転移した共生細菌Wolbachiaゲノム断片は機能を持つか。日本進化学会 (東京) 2006年8月30日
- ⑥ N Nikoh, N Kondo, T Fukatsu Characterization of the genome fragment of Wolbachia endosymbiont horizontally transferred to host insect chromosome 20th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (Kyoto, Japan) Jun 19, 2006

[図書] (計2件)

- ① 二河成男 (2008) 多細胞生物における遺伝子の水平転移 生体の科学 59 390-391
- ② 二河成男 (2006) ゲノムの進化. 生物界の変遷 (松本忠夫、西田博文、二河成男編) 124-135 放送大学教育振興会

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

二河 成男 (NIKOH NARUO)  
放送大学・教養学部・准教授  
研究者番号: 70364916

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし