

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02972

研究課題名(和文) 共生細菌ボルバキアによる性染色体の伝達阻害・機能補完・非宿主の発生阻害の機構解明

研究課題名(英文) Disruption of sex chromosome inheritance, functional complementation, developmental block of nonhosts associated with endosymbiotic Wolbachia pipientis

研究代表者

陰山 大輔 (KAGEYAMA, DAISUKE)

国立研究開発法人農業・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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：キタキチョウにおいて、ボルバキアwFem系統を保持し全メスになる系統「全メス系統」は、性染色体であるW染色体を持たず、Z0型であるとされている。一方、wFemを持たず性比が雌雄1：1である「正常系統」はメスがZW型、オスがZZ型である。「全メス系統」の幼虫期には性決定遺伝子doublesexオス特異的産物、メス特異的産物が両方生産され、それが蛹期になると「正常系統」のメスと同様にほぼメス特異的産物のみとなる。ボルバキアは宿主の生育後期にいたるまで、性決定・性分化に対して不完全な影響しか与えず、その後一気に増殖し完全なメス化を達成するという新たな側面を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内共生細菌であるボルバキアが昆虫の性決定に対して、生育後期にいたるまで部分的な影響しか与えておらず、その後一気に増殖し完全なメス化を達成するという、今まで知られていなかった新たな側面を明らかにした。昆虫の性決定が胚発生のみにとどまらないこと、ボルバキアによる宿主のメス化は意外にシンプルな仕組みで起きているのかもしれない、他の昆虫で知られるボルバキアによるオス殺し現象とは大きく異なることを改めて見出した。

研究成果の概要(英文)：In *Eurema mandarina*, an "all-female line" having a Wolbachia strain wFem does not possess W chromosome, being designated Z0 while "normal line" lacking in wFem does possess W chromosome, being designated ZW. Here we revealed that larvae of "all-female" line exhibit both female-specific and male-specific splice variants of doublesex, which turns into the exclusive presence of the female-specific variant. Our study highlights a new aspect of Wolbachia action - Wolbachia partially affect sex determination/differentiation until late development, wherein rapid increase of Wolbachia titers allows completion of feminization of Z0 individuals.

研究分野：昆虫学・進化生物学

キーワード：ボルバキア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアなどと同様に、細胞内共生微生物は、母から子へと垂直伝播し、宿主の生命プロセスに深い影響を与えている。特にメスヘテロ型の生物では、細胞内共生微生物と W 染色体が連鎖しているため、共進化の過程でのダイナミックな相互作用(機能補完・代替・融合など)が想定される。

2. 研究の目的

本研究課題は、節足動物の細胞内共生細菌であるボルバキアが、宿主キタキチョウの性染色体の伝達や機能に与える影響を調査し、その仕組みの解明を目指すものである。本研究の遂行により、細胞内共生細菌が真核生物の生殖システムに対して、どこまで深く作用しているのかについての具体的な新規知見が得られるとともに、チョウ目昆虫全体の性決定に対する包括的理解が期待できる。

3. 研究の方法

キタキチョウの種子島集団では、ボルバキア系統 wFem を保有しており子どもがメスのみになる「全メス系統」と、wFem を保有せず子どもの性が雌雄 1 : 1 になる「正常系統」が同所的に生息する。

「全メス系統」および「正常系統」の野外サンプリング

「全メス系統」と「正常系統」のキタキチョウが生息している種子島で採集を行い、採集した成虫メスを研究室に持ち帰り、メドハギの葉に産卵させ、次世代を人工飼料を用いて飼育した。

リアルタイム PCR 用プライマーの設計

キタキチョウ dsx 遺伝子の性特異的転写産物 (EmDsxM および EmDsxF) をそれぞれ独立に増幅できるように、イントロン部分をまたがった形で性特異的プライマーを作成した。内部標準として EF1 を増幅させるプライマーを作成した。

培養細胞における dsx 遺伝子の転写パターン

「全メス系統」と「正常系統」のキタキチョウの蛹(ともにメス)を用いて培養細胞を樹立した。培養細胞から Total RNA を抽出し、ランダム 6mer を用いた逆転写によって得られた cDNA を鋳型として、上記プライマーを使用してリアルタイム PCR を行った。

培養細胞における W 染色体の有無

「全メス系統」および「正常系統」由来の細胞株において、間期の細胞核に対してゲノムプローブを用いた FISH を行った。繰り返し配列を多く含む W 染色体は濃く染まるのが分かっている。

生育段階ごとにおける性決定遺伝子 dsx の転写パターン

「全メス系統」および「正常系統」について、様々な生育段階(1 齢幼虫、3 齢幼虫、5 齢幼虫、蛹、成虫)においてサンプリングし、キタキチョウの性決定遺伝子 dsx (EmDsx) の性特異的転写産物バリエーション (EmDsxM および EmDsxF) の存在量をリアルタイム PCR 法によって定量した。

4. 研究成果

培養細胞における doublesex 遺伝子の転写パターン

キタキチョウ「全メス系統」由来の培養細胞 (EmZ0) および「正常系統」由来の培養細胞 (EmZW) における性特異的 dsx 転写産物の比率 (EmDsx 産物全体に占めるメス型産物 EmDsxF の割合) を調べたところ、EmZW がメス型の産物のみした見られないのに対し、EmZ0 はほぼオス型の産物のみが見られた (図 1A)。

培養細胞における W 染色体の有無

キタキチョウ「全メス系統」由来の培養細胞 (EmZ0) および「正常系統」由来の培養細胞 (EmZW) における W 染色体の有無をゲノムプローブを用いた FISH により確認した。由来した昆虫と同じように EmZ0 細胞には W 染色体が存在せず、EmZW 細胞には W 染色体が存在するという結果になった (図 1B)。

どちらも細胞樹立に用いた個体はメスであるが、「全メス系統」は W を持たず、メス決定をボル

バキア wFem に委ねていると考えられている。樹立された細胞は両方ともボルバキアには感染していなかった(樹立の過程で抜け落ちたと考えられる)。メス決定が委ねられていた wFem が存在しないので、EmZ0 はオスに性決定されていると考えられる。一方 W 染色体を持つ EmZW はメスに性決定されている。

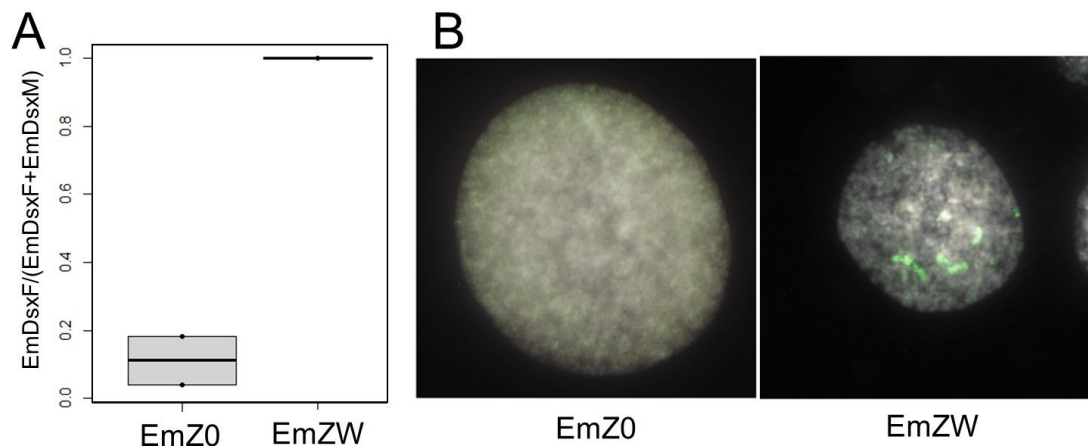


図1 (A) キタキチョウ「全メス系統」由来の培養細胞 (EmZ0) および「正常系統」由来の培養細胞 (EmZW) における性特異的 dsx 転写産物の比率 (EmDsx 産物全体に占めるメス型産物 EmDsxF の割合)。 (B) キタキチョウ「全メス系統」由来の培養細胞 (EmZ0) および「正常系統」由来の培養細胞 (EmZW) におけるゲノムプローブを用いた FISH。緑に濃く染まった部分は W 染色体。

生育段階ごとにおける性決定遺伝子 dsx の転写パターン (1 齢幼虫、蛹、成虫)

「正常系統」のメスおよび「全メス系統」は、非常に似たパターンの EmDsx 転写産物パターンを示した (図 1)。つまり、メス型産物 (EmDsxF) が多く、オス型産物 (EmDsxM) が少ないという状況であった。また、一方、「正常系統」のオスは、これとは対照的に、オス型産物 (EmDsxM) が多く、メス型産物 (EmDsxF) が少ないという状況であった (図 2 ; 1 齢幼虫・蛹・成虫)。

生育段階ごとにおける性決定遺伝子 dsx の転写パターン (3 齢幼虫および 5 齢幼虫)

3 齢幼虫および 5 齢幼虫でも、「正常系統」では、オス、メスそれぞれがオス特有、メス特有のパターンを示した (図 2 ; 3 齢幼虫・5 齢幼虫)。ところが、「全メス系統」では、雌雄の中間的なパターンを示した。つまり、EmDsxF と EmDsxM の産物量が双方とも中間的であった (図 2 ; 3 齢幼虫・5 齢幼虫)。これは、wFem によるメス化の影響が 3 齢と 5 齢で不完全であることを示している。雌雄 2 型がおそらく明確になる蛹以降の時期には、ほぼ完全なメス化が達成されているが、その前まではメス化が中途半端な状態であることを示唆している。

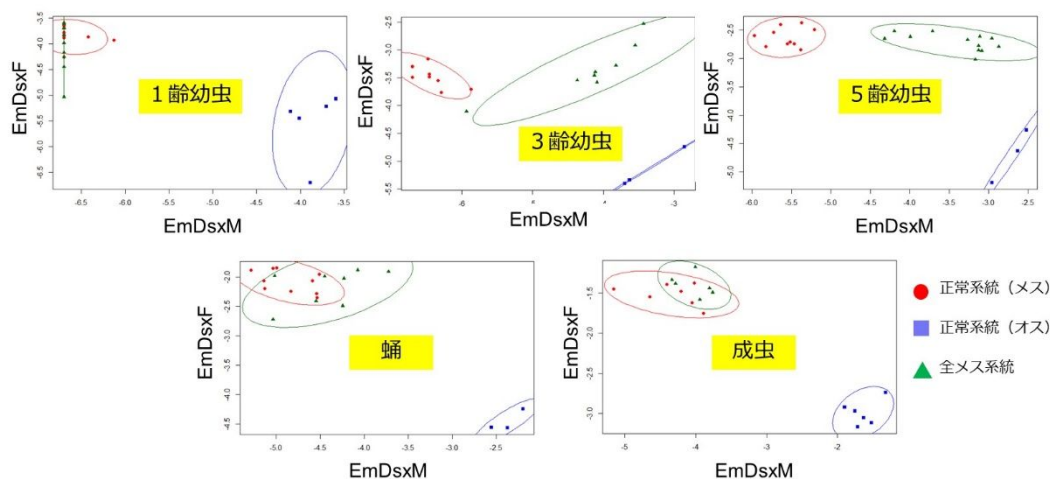


図2 生育段階別にみた性特異的 dsx 転写産物 (EmDsxM および EmDsxF) の存在比。プロット 1 つは 1 個体を示す。赤丸は「正常系統」のメス。青四角は「正常系統」のオス。緑三角は「全メス系統」の個体。

W 染色体を持っていない「全メス系統」はメス決定をボルバキア wFem に頼っていると考えられる。5 齢幼虫以降に wFem の体内密度が大きく増加することが分かっているため、この結果は wFem

の存在が幼虫期に直接的に作用し、全メスを達成していることを示唆している。

以上のことから、キタキチョウにおける W 染色体を持たない「全メス系統」は、ボルバキア wFem の幼虫期における増殖を通じて本来ならオスに性決定されるはずの Z0 個体のメス化を達成し、成虫期に完全なメスとして機能することを可能にしていると考えられる。今回明らかにできなかった性染色体伝達阻害のメカニズム解明、その他については今後の課題となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kageyama Daisuke, Narita Satoko, Konagaya Tatsuro, Miyata Mai N., Abe Jun, Mitsuhashi Wataru, Nomura Masashi	4. 巻 2020
2. 論文標題 Persistence of a Wolbachia-driven sex ratio bias in an island population of Eurema butterflies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 1-23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2020.03.24.005017	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hornett Emily A., Kageyama Daisuke, Hurst Gregory D. D.	4. 巻 289
2. 論文標題 Sex determination systems as the interface between male-killing bacteria and their hosts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences	6. 最初と最後の頁 20212781
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1098/rspb.2021.2781	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 陰山大輔・成田聡子・宮田真衣・小長谷達郎・安部淳・野村昌史
2. 発表標題 性比異常を起こす共生細菌ボルバキアが宿主集団に与える影響：種子島におけるキタキチョウの事例
3. 学会等名 第64回日本応用動物昆虫学会大会 名城大学
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 陰山大輔
2. 発表標題 昆虫の生殖を操る共生細菌ボルバキア：その多様な能力と生態について .
3. 学会等名 第72回日本衛生動物学会東日本支部大会 シンポジウム1：ボルバキアの基礎と応用（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 陰山大輔
2. 発表標題 オス殺し細菌と宿主昆虫とのせめぎ合いは性決定システムの多様化をもたらすか？
3. 学会等名 第76回日本生物地理学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Daisuke Kageyama
<https://sites.google.com/site/kageyama000jp/home>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐原 健 (Sahara Ken) (30241368)	岩手大学・農学部・教授 (11201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------