

令和 2 年 12 月 7 日現在

機関番号：13904

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26292174

研究課題名(和文)ミカンキジラミから見つかった「オルガネラ様防衛共生体」の基盤解析

研究課題名(英文)Basic analysis of an organelle-like defensive symbiont found in the Asian citrus psyllid

研究代表者

中鉢 淳(NAKABACHI, Atsushi)

豊橋技術科学大学・エレクトロニクス先端融合研究所・准教授

研究者番号：40332267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：ミカンキジラミの共生細菌Profftellaは、他に類例のない「オルガネラ様防衛共生体」と目される。本研究はその生態、機能、進化の理解と、産生される新規ポリケチド「ディアフォリン」の有用性の検証を目標とし、以下の成果を得た。(1)キジラミ40種の共生細菌叢の解明と、Profftella 姉妹系統など共生細菌4種のゲノム配列の決定。(2)経卵感染・宿主発生時のProfftellaの挙動の解明。(3)ディアフォリンの昆虫や真菌に対する阻害活性等の解明。(4)ディアフォリンの虫体内局在や発生に伴う濃度変化、ディアフォリン合成遺伝子の発現動態の解明。(5)ディアフォリンの抗がん活性の解明。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、きわめてユニークな「オルガネラ様防衛共生体」の生態を解明し、機能の理解を進め、進化動態の解明に道筋を付けることができた。これらの成果は、生物進化の理解を深化させる学術的意義を持つばかりでなく、世界的に重要な農業害虫の生物学的防除の効率向上や新規防除法開発の基盤を提供するもので、社会的意義も大きい。ディアフォリンについては、抗がん剤シードとしての有望性は低いとの結論を得たが、こうした天然化合物の薬理活性の知見の蓄積は、今後の薬学の発展に資するものである。また、本研究で新たに見出された生物活性は、産業への応用可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：Profftella, an endosymbiont of the Asian citrus psyllid *Diaphorina citri*, appears to be an unprecedented organelle-like defensive symbiont. The present study aiming to understand its ecology, function, and evolution revealed the following: (1) bacterial populations of 40 psyllid species and genome sequences of four symbionts including an apparent sister species of Profftella; (2) behavior of Profftella during the transovarial transmission and the development of *D. citri*; (3) inhibitory effects of diaphorin, a polyketide produced by Profftella, against insects and yeasts; (4) distribution and concentration of diaphorin within *D. citri*, as well as expression of genes involved in the diaphorin synthesis during the development of *D. citri*; (5) antitumor activity of diaphorin.

研究分野：進化学、共生生物学、昆虫学、微生物学、植物保護学

キーワード：ミカンキジラミ Profftella ディアフォリン 防衛共生 細菌叢 ゲノム 生物活性 抗がん活性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界的な農業害虫「ミカンキジラミ *Diaphorina citri* (半翅目: 腹吻亜目: キジラミ上科)」は、体腔内に共生器官「バクテリオーム」を持ち、この細胞内に、親から子へと垂直感染により受け継がれる二種類の共生細菌を保有する。すなわち、キジラミ類に普遍的な「*Candidatus Carsonella ruddii* (*Gammaproteobacteria*)」および、本種でのみ見出されている「*Ca. Profftella armatura* (*Betaproteobacteria*)」である。本共生系は、宿主昆虫の生存に重要な役割を担うと推察される一方、周辺環境中の他の生物には存在しないため、高選択性・低環境負荷な新規防除法開発の有望な標的である。我々の先行研究により、*Carsonella* は、キジラミの餌である植物師管液に乏しい必須アミノ酸を合成・補償する「栄養共生体」である一方、*Profftella* は、宿主と一体化したオルガネラ様細菌ながら、哺乳類細胞に阻害活性を示す新規ポリケチド (= 「ディアフォリン」と命名) を産生し、宿主を外敵から守る「オルガネラ様防衛共生体」と目されることが明らかとなった。これは、進化的に不安定とされてきた「防衛共生体」の定説を覆すものである。また、ディアフォリンの類縁体には顕著な抗がん活性を持つものが多く、ディアフォリンについても創薬シード化合物としての可能性が期待された。

<参考文献>

Defensive bacteriome symbiont with a drastically reduced genome. [Nakabachi A](#), Ueoka R, Oshima K, Teta R, Mangoni A, Gurgui M, Oldham NJ, van Echten-Deckert G, Okamura K, Yamamoto K, Inoue H, Ohkuma M, Hongoh Y, Miyagishima SY, Hattori M, Piel J, Fukatsu T. *Curr Biol*. (2013) 23(15):1478-84. doi: 10.1016/j.cub.2013.06.027.

The 160-kilobase genome of the bacterial endosymbiont *Carsonella*. [Nakabachi A](#), Yamashita A, Toh H, Ishikawa H, Dunbar HE, Moran NA, Hattori M. *Science*. (2006) 314(5797):267.

2. 研究の目的

類例のない「オルガネラ様防衛共生体」*Profftella* について、その生態、機能、進化動態の解明を目指すとともに、新規害虫防除法開発の基盤データを取得し、さらには *Profftella* の産生する新規化合物「ディアフォリン」の応用利用の可能性を探ることが本研究計画の目的である。

3. 研究の方法

- (1) 原核性 rRNA 遺伝子を標的とするアンプリコン解析により、多様なキジラミ種の共生細菌叢を解明し、*Profftella* 姉妹系統の共生細菌を探索する。さらには、その全ゲノム塩基配列を決定し、比較ゲノム解析を行う。
- (2) rRNA を標的とした蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (Fluorescence *in situ* hybridization: FISH) 法により、ミカンキジラミ体内での *Profftella* および *Carsonella* の感染・増殖動態を解析する。
- (3) 抗生物質処理により *Profftella* の選択的除去を試み、その防衛機能を検証する。
- (4) イメージング質量分析法や高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography: HPLC) 法を用いて、ミカンキジラミ体内でのディアフォリンの局在およびミカンキジラミの発生段階、性別ごとのディアフォリン濃度を解析する。
- (5) ディアフォリンの抗がん活性をスルホローダミン B アッセイにより調査し、創薬への応用可能性を検証する。

4. 研究成果

(1) 各種キジラミの共生細菌叢解析に基づく *Profftella* 姉妹系統の発見とゲノム解析
キジラミ上科を構成する 8 科のうち 7 科にわたる 40 種のキジラミを用いて、16S rRNA 遺伝子の可変領域 V3- V4 を対象としたアンプリコン解析を行い、それぞれのキジラミ種における共生細菌叢を解析した。シーケンシングには、次世代シーケンサー MiSeq (illumina 社) を用い、得られた配列に基づく群集構造解析には DADA2 などのソフトウェアを用いた。その結果、大部分の種から *Carsonella* が検出される一方、種ごとに大きく異なる細菌叢が明らかとなった。複数のキジラミ種より *Profftella* の姉妹系統と目される細菌の検出に成功するとともに、キジラミ以外の昆虫グループの必須共生細菌や植物病原細菌の姉妹系統、抗生物質等の産生が期待される放線菌類など、多様な共生細菌群を見出した (論文準備中)。この成果に基づいてゲノム解析を行い、共生細菌 3 種の全ゲノム塩基配列の決定に成功し (論文準備中)、*Profftella* 姉妹系統についても、プラミドに 1 箇所のギャップが残るのみのドラフトゲノム配列の取得に成功した (論文準備中)。

(2)ミカンキジラミ体内での *Proffttella*, *Carsonella* の感染・増殖動態解析

Proffttella, *Carsonella* それぞれの rRNA を特異的に検出するプローブを用いた FISH 解析により、宿主卵母細胞への感染や、その後の胚発生に伴う共生細菌の局在・形態変化、さらにはバクテリオーム形成過程について、詳細なデータを得た。通常、バクテリオーム中の *Proffttella*, *Carsonella* は極めて長大な紐状の構造を取るが、性成熟後のメス成虫では、卵巣に面したバクテリオーム内で、これらの細菌は球状、もしくは極めて短い桿状へと変形する。その後、卵巣に向けて移動し、両共生細菌でモザイク状の集塊を形成し、卵母細胞に後極側から侵入する。胚の発生に伴って、2種類の共生細菌は整然と配置を変えながら、単核細胞の融合や多核細胞の単核細胞化を重ねる宿主とともにバクテリオームを形成していく(雑誌論文)。これらの共生細菌については、宿主キジラミや、不治の柑橘病「カンキツグリーニング病」の病原体 *Ca. Liberibacter* spp. (*Alphaproteobacteria*) との間で遺伝子の水平転移を起こすなど、多様かつ密接な生物間相互作用が示唆されている(雑誌論文)。今回明らかとなった *Proffttella* と *Carsonella* の感染・増殖動態の知見は、こうした相互作用の解明に向けた今後の研究の基盤となる。

(3)*Proffttella* の防衛機能の検証

各種抗生物質処理により *Proffttella* の選択的除去を試みたが、芳しい結果が得られなかったため、アプローチ法を変更し、ディアフォリンを単離し、昆虫や真菌類に対する生物活性評価を行うことで、その防衛機能を考察した。ミカンキジラミより抽出し、HPLC を用いて精製したディアフォリンを、(a) 昆虫培養細胞株 Sf9、(b) キジラミ近縁昆虫「エンドウヒゲナガアブラムシ *Acyrtosiphon pisum* (半翅目: 腹物亜目: アブラムシ上科)」生体、(c) ミカンキジラミ主要天敵「テントウムシ *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae)」生体、(d) 昆虫病原性真菌のモデルとしての「出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* BY4741 株)」に対して投与し、その生物活性を検証した。比較のため、ディアフォリン類縁体の「ペデリン」についても同様の活性評価を行った。その結果、次の事柄が明らかとなった。ディアフォリンおよびペデリンは、評価に用いた全ての生物に対して毒性を示す。毒性に対する感受性は、対象生物間で大きく異なる。ディアフォリンは、概してペデリンよりも毒性が弱い。Sf9 と酵母ではディアフォリン、ペデリン間で毒性強度が大きく異なるが、アブラムシやテントウムシでは近似する。ミカンキジラミ成虫に含まれるディアフォリン総量および濃度は、対ディアフォリン抵抗性の著しく高いテントウムシを含め、評価に用いた全ての生物に対して有効である。以上の結果は、ディアフォリンが、捕食性昆虫、病原性真菌等の天敵に対して十分な防衛機能を持つことを強く示唆するもので、ミカンキジラミの効果的な生物学的防除の実現のため考慮すべき知見と言える(雑誌論文)。また、原核生物に対するディアフォリンの活性評価を行い、興味深い活性を見出した(論文準備中)。

(4)ディアフォリンのミカンキジラミ体内の局在・濃度解析

ディアフォリンの局在について、まずイメージング質量分析法による解析を試みたが、芳しい結果が得られなかったため、外科的な解剖と HPLC 法を組み合わせた解析を行った。すなわち、ミカンキジラミ 5 齢幼虫、および羽化後 0 日、10 日の雌雄成虫を解剖し、バクテリオームを含む腹部と、それ以外の部位(頭部・胸部)に分けて、個別に濃度解析を行った。これにより、キジラミの性別や発生段階にかかわらず、ディアフォリンが広く虫体全体に分布することが明らかとなった。また、胚、1-5 齢幼虫、羽化後 0 日、5 日、10 日、15 日の雌雄成虫におけるディアフォリン総量と濃度を計測したところ、キジラミの後期発生に伴い、これらが大幅に変動することが明らかとなった。さらに、同様の発生段階の昆虫を用いて、ディアフォリン合成に関わる *Proffttella* 遺伝子群のうち、*dipP* および *dipT* について、定量 RT-PCR 法により転写レベルで発現解析を行った。その結果、これらの転写産物の相対量が、キジラミの発生に伴ってやはり大幅に変動することが明らかとなった(論文査読中)。

(5)ディアフォリンの抗がん活性の検証

「文部科学省新学術領域研究・がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動・化学療法基盤支援活動」のご支援をいただき、肺がん 7 系、胃がん 6 系、大腸がん 5 系、卵巣がん 5 系、脳腫瘍 6 系、乳がん 5 系、腎がん 2 系、前立腺がん 2 系およびメラノーマ 1 系の計 39 系より成るヒトがん細胞パネル(正常細胞は抗がん薬に対して極端な表現系を示す傾向があり、コントロールとして不適切であるため、解析対象に含まれていない)を用いて、ディアフォリンの抗がん活性について検証した。その結果、ディアフォリンはこれら 39 系すべてのがん細胞株に顕著な抑制効果を示すことが明らかとなった。標的特異性の指標となる、阻害効果の標的間差異は、他の多くの類縁体と同様 10 倍ほどで、GI₅₀ (50%増殖阻害濃度)は 0.28~2.4 μM、TGI (100%増殖阻害濃度)は 1.6~11 μM、LC₅₀ (50%致死濃度)は 7.5~>100 μM であった。抗がん薬のシード化合物として最も有望視されるシンペリンは、ディアフォリン類縁体の中で特に標的特異性が高く、阻害効果の標的間差異が 10,000 倍にも達するが、これと比較すると、ディアフォリンの創薬シード化合物としての有望性は劣ると言える(雑誌論文)。

また、当初の研究計画には含まれなかったものの、
(6)ミカンキジラミのバクテリオームにおける RNAseq 解析
(7)バクテリオーム特異的発現遺伝子の RNA 干渉法による機能解析
(8)バクテリオーム特異的発現遺伝子産物の免疫組織化学
などの解析を進め、成果を上げた（論文準備中）。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件)

Diaphorin, a polyketide produced by a bacterial symbiont of the Asian citrus psyllid, kills various human cancer cells. Nakabachi A, Okamura K. *PLoS One*. (2019) 14(6):e0218190. doi: 10.1371/journal.pone.0218190. [査読有]

Diaphorin, a polyketide synthesized by an intracellular symbiont of the Asian citrus psyllid, is potentially harmful for biological control agents. Yamada T, Hamada M, Floreancig P, Nakabachi A. *PLoS One*. (2019) 14(5):e0216319. doi: 10.1371/journal.pone.0216319. [査読有]

Behavior of bacteriome symbionts during transovarial transmission and development of the Asian citrus psyllid. Dan H, Ikeda N, Fujikami M, Nakabachi A. *PLoS One*. (2017) 12(12):e0189779. doi: 10.1371/journal.pone.0189779. [査読有]

昆虫のオルガネラ様共生細菌たち. 中鉢淳. 化学と生物 (2016) 54(10): 753-761. doi: 10.1271/kagakutoseibutsu.54.753. [査読有]

動物界で見つかった「新規オルガネラ」進化 アブラムシは細菌から獲得した遺伝子を発現し、産物タンパク質を共生細菌へ輸送する . 中鉢淳. 化学と生物 (2015) 53(12): 820-821. doi: 10.1271/kagakutoseibutsu.53.820. [査読有]

Horizontal gene transfers in insects. Nakabachi A. *Curr Opin Insect Sci*. (2015) 7:24-29. doi: 10.1016/j.cois.2015.03.006. [査読有]

感染特異的遺伝子発現ネットワークからの新展開. 安倍裕順、相川知宏、中鉢淳、宮腰昌利、丸山史人. 日本細菌学雑誌 (2014) 69(3):539-46. doi: 10.3412/jsb.69.539. [査読有]

Aphid gene of bacterial origin encodes a protein transported to an obligate endosymbiont. Nakabachi A, Ishida K, Hongoh Y, Ohkuma M, Miyagishima SY. *Curr Biol*. (2014) 24(14):R640-R641. doi: 10.1016/j.cub.2014.06.038. [査読有]

Parallel histories of horizontal gene transfer facilitated extreme reduction of endosymbiont genomes in sap-feeding insects. Sloan DB, Nakabachi A, Richards S, Qu J, Murali SC, Gibbs RA, Moran NA. *Mol Biol Evol*. (2014) 31(4):857-71. doi: 10.1093/molbev/msu004. [査読有]

〔学会発表〕(計23件)

昆虫-細菌間融合共生系からの有用遺伝子の獲得と応用展開. 中鉢淳. 平成 30 年度エレクトロニクス先端融合研究所プロジェクト研究成果報告会. 2019 年 2 月

Immunochemistry of Dcitr1, an orphan protein highly upregulated in the bacteriome of the Asian citrus psyllid. Hashimoto S, Nakabachi A. The Irago Conference 2018. 2018 年 11 月

昆虫-細菌間融合共生系の基盤解析および共生細菌からの有用遺伝子の探索. 中鉢淳. 平成 29 年度エレクトロニクス先端融合研究所プロジェクト研究成果報告会. 2018 年 3 月

ミカンキジラミにおけるオルガネラ様共生細菌 2 種の感染・胚発生時の動態観察. 池田直也、藤上雅也、壇勲興、中鉢淳. 環境微生物系学会合同大会 2017. 2017 年 8 月

ミカンキジラミ共生細菌の産生する新規毒性ポリケチド「ディアフォリン」の局在解析. 藤上雅也、桜嶋克哉、中鉢淳. 環境微生物系学会合同大会 2017. 2017 年 8 月

オルガネラ様共生細菌の産生する新規ポリケチド「ディアフォリン」は真核生物に広く毒性を示す。山田倫子、濱田雅東、中鉢淳。環境微生物系学会合同大会 2017。2017年8月

昆虫-細菌間融合共生系の基盤解析および共生細菌からの有用遺伝子の探索。中鉢淳。平成28年度エレクトロニクス先端融合研究所プロジェクト研究成果報告会。2017年3月

動物-細菌間融合共生系の基盤解析。中鉢淳。文部科学省研究大学強化促進事業・豊橋技術科学大学シンポジウム「東三河から世界へ～産学官連携による新しい価値の創造～」。2017年2月

キジラミから見つかったオルガネラ様共生細菌の産生する新規毒性ポリケチド。中鉢淳。第63回トキシシンポジウム。2016年7月 [招待有]

ミカンキジラミ共生細菌から得られた新規ポリケチド「ディアフォリン」の活性評価。山田倫子、濱田雅東、杉野明日香、岡村恵子、中鉢淳。日本昆虫学会第76回大会・第60回日本応用動物昆虫学会合同大会。2016年3月

農業害虫から見つかったオルガネラ様防衛共生体。中鉢淳。第10回日本ゲノム微生物学会年会シンポジウム「微生物の新規機能を探る」。2016年3月 [招待有]

キジラミ共生細菌の産生する新規化合物の生物活性評価等。中鉢淳。第4回次世代シーケンズ技術応用研究会。2016年2月

昆虫共生細菌からの新規有用化合物の獲得 中鉢淳。文部科学省研究大学強化促進事業・豊橋技術科学大学シンポジウム「未来への挑戦～新たなステージに立つ～」。2016年1月

RNA interference approach to analyze functional role of a gene highly expressed in the symbiotic organ of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. Dan H, Nakabachi A. The Irago Conference 2015. 2015年10月

Differential toxicity of a novel polyketide diaphorin to various organisms. Yamada T, Hamada M, Sugino A, Okamura K, Nakabachi A. The Irago Conference 2015. 2015年10月

RNA 干渉によるミカンキジラミ共生関連遺伝子の機能解析の試み。壇勲興、中鉢淳。第30回日本微生物生態学会大会。2015年10月

動物界のオルガネラ進化。中鉢淳。日本進化学会第17回大会 2015年8月

多様なキジラミ系統の共生細菌叢解析。中鉢淳、山本昂平、岡村恵子、杉野明日香、井上広光、三澤直美、広瀬侑。NGS現場の会 第四回研究会 2015年7月

ディアフォリン活性評価とキジラミ各種系統の共生細菌叢解析。中鉢淳。第3回次世代シーケンズ技術応用研究会 2015年3月

昆虫と融合するオルガネラ様共生細菌たち。中鉢淳。第162回日本昆虫学会・第99回日本応用動物昆虫学会合同東海支部会。2014年12月 [招待有]

⑪ Evolution of a novel organelle in Animalia. Nakabachi A. The Irago Conference 2014. 2014年11月

⑫ RNA 干渉によるミカンキジラミ共生関連遺伝子の発現抑制。壇勲興、中鉢淳。環境微生物系学会合同大会 2014。2014年10月

⑬ ミカンキジラミ共生細菌から得られた新規ポリケチド「ディアフォリン」の活性評価。濱田雅東、杉野明日香、中鉢淳。環境微生物系学会合同大会 2014。2014年10月

{図書}(計2件)

共生微生物。中鉢淳。(担当:分担執筆, 範囲:半翅目昆虫の菌細胞内共生, 213-224) 化学同人 2016年10月

難培養微生物研究の最新技術 微生物の生き様に迫り課題解決へ . 中鉢淳.
(担当:分担執筆, 範囲:農業害虫の生存を支えるオルガネラ様共生細菌, 85-94) シーエムシー
出版 2015年8月

〔その他〕
ホームページ等
<https://www.tut.ac.jp/university/faculty/eiiris/701.html>

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名: 井上 広光

ローマ字氏名: (INOUE, Hiromitsu)

研究協力者氏名: 広瀬 侑

ローマ字氏名: (HIROSE, Yu)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。