

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07806

研究課題名(和文) 共生細菌が持つ雄殺し遺伝子の同定とその利用基盤技術の開発

研究課題名(英文) Identification of male-killing gene in symbiotic bacteria and exploitation of the generic technology for the application

研究代表者

安佛 尚志 (Anbutsu, Hisashi)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：30392583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ショウジョウバエに感染して、胚発生初期の雄を特異的に殺す「雄殺し」と呼ばれる生殖操作をおこなう共生細菌スピロプラズマの持つ雄殺しの原因遺伝子の同定とその利用基盤技術の開発を目的とし、雄殺しスピロプラズマ2系統(NSRO, MSRO)および雄を殺さなくなった突然変異系統(NSRO-A)の計3系統のバクテリアおよびファージの完全ゲノムの決定と比較ゲノム解析に取り組んだ。

各系統のバクテリアについて10個のコンティグからなるドラフトゲノムを得ることができたが、完全ゲノムの決定には至らなかった。一方で、ファージ完全ゲノムを決定し、ゲノム中のプロファージ領域を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Spiroplasmas are endosymbiotic bacteria causing female-biased sex ratios in *Drosophila* hosts as a result of selective death of male offspring during embryogenesis. To identify the causative genes involved in the male-killing and to develop the generic technology for the application, we have been conducting the whole genome sequencing of two male-killing Spiroplasma strains MSRO originated from *Drosophila melanogaster*, NSRO originated from *D. nebulosa*, its non-male-killing variant NSRO-A, and of bacteriophages infecting them.

For each bacterial strain, we obtained 10 contigs showing high similarity to the chromosomal contigs of Spiroplasma poulsonii published in 2015. However, terminal sequences of each contig were represented by presumable prophage sequences, which were main obstacles to obtaining the complete chromosomal sequences. On the other hand, we obtained complete genome sequences of the bacteriophages and identified prophage region within the bacteria genomes.

研究分野：昆虫微生物学

キーワード：共生細菌 ショウジョウバエ スピロプラズマ 生殖操作 雄殺し バクテリオファージ ゲノム 第3世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

(1) 共生細菌による宿主の生殖操作

昆虫の体内に共生 (= 内部共生) している細菌には、宿主に対してユニークな表現型効果を示すものが存在する。たとえば、スピロプラズマ *Spiroplasma* という共生細菌は、ショウジョウバエやテントウムシなどを宿主とし、胚発生期に雄だけを殺す“雄殺し”という生殖操作をおこなう(文献⁹)(図1)。また、ボルバキア *Wolbachia* は、双翅目、膜翅目、鱗翅目、鞘翅目、半翅目など広範な昆虫類に対して、細胞質不和合、雌への性転換、単為生殖の誘導、雄殺し等の生殖操作をおこなう(文献¹⁰)。1950年代に共生細菌による宿主の生殖操作が発見されて以来、国内外の多くの研究者がそのメカニズムの解明に取り組んできたが、具体的な分子機構は不明であった。

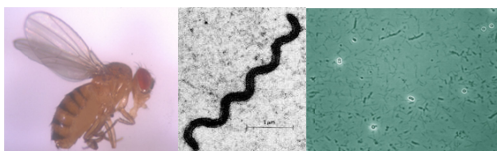


図1. ショウジョウバエ-スピロプラズマ共生系
左から、ショウジョウバエ、雄殺しスピロプラズマ、宿主体液中のスピロプラズマ

共生細菌のほとんどは難培養性であり、形質転換等による細菌側からのアプローチが困難である。そこで我々の研究グループでは、宿主側からのアプローチを可能にするために、遺伝子操作の技術が確立されているキイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* をモデル宿主として選択した。そして、共生細菌としてはキイロショウジョウバエに対して明瞭な生殖操作 (= 雄殺し) を示すことに加え、突然変異により雄を殺さなくなった系統が存在する(文献¹¹)点から、スピロプラズマを研究対象とした。

(2) 国内外の研究動向

我々は、これまでに、ショウジョウバエの遺伝子強制発現による雄殺し救済挿入系統の探索(文献¹²)、定量的PCR法を用いた宿主体内におけるスピロプラズマの感染動態の解析(文献¹³)、キイロショウジョウバエ野外系統を用いた雄殺し抵抗性因子の探索(文献¹⁴)、スピロプラズマ感染時における宿主免疫関連遺伝子の発現解析(文献¹⁵)等に取り組む、成果を挙げてきた。近年は、雄殺しスピロプラズマ2系統と非雄殺し突然変異系統のファージゲノムの解析を進め、ファージ上に存在する23の遺伝子を同定し、*Spiroplasma citri* で報告されている病原性因子の相同遺伝子の存在や、雄殺し系統と非雄殺し系統間で相同性の低い遺伝子、発現量に差がある遺伝子を明らかにした(科研費基盤C、H23-25)(図2)。ただし、サンガー法を用いたショットガンシーケンスにより得られたファージ配列は、末端配列が不明であり、NSRO-Aファージについては複数種

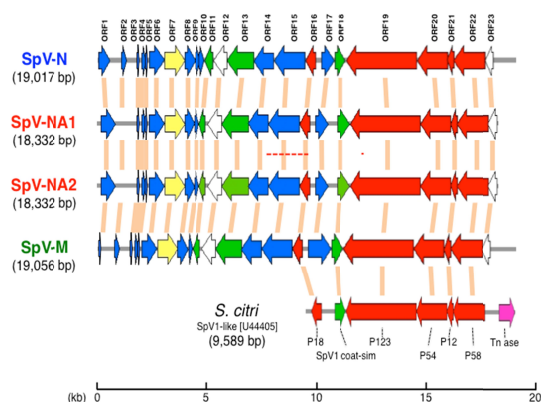


図2. スピロプラズマファージのゲノム構造

類の配列が存在するなど不完全なものであった。また、日本学術振興会特別研究員(当時)の春本敏之氏と共同研究をおこない、スピロプラズマに感染した雄胚において異所的な細胞死が起こることや、雌雄の胚でスピロプラズマの増殖に差がないことなどを明らかにした(文献¹⁰)。研究開始当初、国内においてショウジョウバエの雄殺しスピロプラズマを研究しているグループは他になかったが、海外の研究グループではスピロプラズマの垂直伝播機構(文献¹¹)や、宿主胚発生期における雄殺しの詳細な観察(文献¹²)などが報告されており、雄殺し現象への関心は高かったが、いずれのグループもメカニズムの解明にはいたっていなかった。

(3) 本研究課題を提案した動機

雄殺しのメカニズムの解明に向けての突破口の一つは、突然変異により雄を殺さなくなったスピロプラズマ系統の存在である。当時、非雄殺し系統を維持していたのは我々の研究グループのみであり、これは大きなアドバンテージであった。オリジナル系統と変異系統の全ゲノムを明らかにし、後者において変異が生じた遺伝子を同定できれば、雄殺しの原因遺伝子の極めて有力な候補を得ることができる。我々の研究グループは、以前にも従来のサンガー法によるスピロプラズマゲノムのショットガンシーケンスを試みたことがあったが、大量のファージ様繰り返し配列の存在により、全ゲノムをカバーする配列データの取得およびアセンブルが困難であったため、完全配列決定を断念した経験がある。しかし、近年の次世代シーケンサーを用いたゲノム解析技術の発達により、雄殺しスピロプラズマと非雄殺しスピロプラズマの全ゲノム決定と比較解析が理論的に実現可能になったことから、再度、雄殺し遺伝子の同定に挑戦すべく、本研究課題を提案した。

2. 研究の目的

(1) 雄殺しスピロプラズマ2系統、非雄殺しスピロプラズマ1系統の完全ゲノム配列の決定

次世代シーケンサーにより、ショウジョウ

バエの雄殺しスピロプラズマ2系統と、雄を殺さなくなった突然変異系統1つの完全ゲノム配列の決定およびアノテーションをおこない、ゲノム構造と遺伝子レパートリーを明らかにする。

(2) 共生細菌の雄殺し遺伝子の同定

雄殺しスピロプラズマと非雄殺しスピロプラズマのゲノムの比較解析により、非雄殺し系統において欠失している領域や、トランスポゾンの挿入やフレームシフトなどで機能が失われた遺伝子を明らかにし、雄殺し原因遺伝子の候補をリストアップする。それら候補遺伝子を、ショウジョウバエの遺伝子強制発現系や、組換え大腸菌やマイコプラズマの発現系を用いたバイオアッセイに供し、雄殺し遺伝子を同定する。

(3) 雄殺し遺伝子(産物)の利用基盤技術の開発

同定された雄殺し遺伝子の導入や、遺伝子産物の投与により、雄殺し効果がショウジョウバエ以外の昆虫においても有効であるかどうかを検証する。

3. 研究の方法

(1) 材料

ショウジョウバエの1種である *Drosophila nebulosa* から見つかった雄殺しスピロプラズマ NSRO 系統、NSRO 系統から偶然取得された非雄殺し変異体 NSRO-A 系統に加え、キロショウジョウバエ由来の雄殺しスピロプラズマ MSRO 系統の計3系統を対象とした。

(2) 方法

まず、スピロプラズマ感染ショウジョウバエからゲノム抽出キットを用いて精製した全DNA(共生細菌ゲノムを10-50%含む)よりゲノムライブラリを作製し、第3世代シーケンサーの PacBioRSII によるシーケンシング、ロングリード配列のアセンブルをおこなった。

次に、ファージゲノムの末端配列を決定するため、また NSRO-A ファージの実態を把握するため、暫定的なファージ配列の両末端近くに外向きにプライマーを設計し、スピロプラズマ感染ショウジョウバエから抽出したDNAをテンプレートとしてPCRをおこない、産物のシーケンス解析をおこなった。

最後に、第3世代シーケンサー MinION (Oxford nanopore) によるスピロプラズマゲノムコンティグの結合を試みた。ロングリードに適した断片化の少ないゲノム試料を得るため、スピロプラズマ NSRO に感染したキロショウジョウバエの体液を回収し、フェノール・クロロホルム抽出によるゲノム精製をおこなった。最終的に得られた DNA40ng を用いてライブラリを作製し、シーケンシングおよびロングリードのアセン

ブルをおこなった。

4. 研究成果

(1) PacBioRSII によるスピロプラズマゲノム塩基配列の取得

ロングリード配列の *de novo* アセンブルにより得られたコンティグの相同性検索により、本課題遂行中に海外のグループにより報告された10コンティグからなるスピロプラズマドラフトゲノム(文献13)と高い相同性を示す10コンティグを各系統につき取得した(図3)。得られた10個のコンティグの合

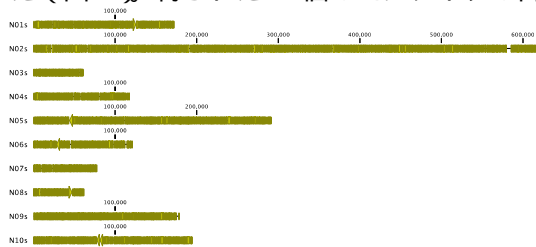


図3. スピロプラズマ NSRO ゲノム

PacBioRSII のロングリードのアセンブルにより得られた21のスピロプラズマ由来のコンティグのうち、既発表ゲノムにアライメントされた10個を、予想されるゲノム上の配列順に上から並べた。MSRO, NSRO-A もほぼ同じ結果が得られた。

計長は約2.1Mbpで、先行研究で予想されていたゲノム長1.89Mbpを超えていた。ゲノム中には10-11コピーのファージ様配列が存在し、ゲノムの約10%を占めており、コンティグの結合を妨げる要因となっていた(図4)。各ゲノム上には2,400以上の遺伝子が推定され、そのゲノム上の位置も含めて3系統間で極めてよく保存されていた。雄殺し系統と非雄殺し系統間でゲノム中のファージ様配列の挿入位置や数に違いはなく、また大規模な挿入や欠失等の変異も検出されなかった。



図4. スピロプラズマゲノム上のプロファージ領域の推定

ゲノム上の配列順に並べたコンティグに対してファージ配列をアライメントした。赤丸がファージの挿入位置を示す。

(2) 比較ゲノム解析

各スピロプラズマ系統のドラフトゲノム上に推定された約2,400の遺伝子について、アミノ酸の相同性に基づくアノテーションを行った。オス殺し系統の NSRO を例に挙げると、2,478遺伝子のうち、大部分(75%)が機能未知のタンパク質をコードしていることが示された。アノテーションがついたものは613遺伝子であり、機能の内訳としては遺伝子制御系の遺伝子が最も多く、次いで代謝系、環境シグナル、細胞プロセスに関わる遺伝子が多かった。また、非オス殺し突然変異

系統の NSRO-A において変異が生じた遺伝子を検出するため、雄殺し系統の NSRO との間でゲノム上にコードされたアミノ酸の比較を行ったところ、およそ 8%(209)の遺伝子にアミノ酸変異が生じていることが示唆された。

(3) ファージ配列の決定と一分子シーケンサーによる完全ゲノム配列決定

PCR 産物のシーケンシングによってファージ全長配列を決定した。その結果、NSRO および MSRO については各系統につき 1 種類、NSRO-A については少なくとも 3 種類の環状ファージゲノム配列(全長約 19kb)が得られ、スピロプラズマドラフトゲノムを参照することにより末端配列を特定した(図 5)。次

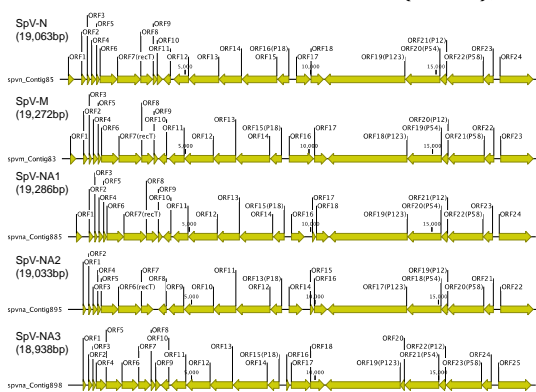


図 5. スピロプラズマファージの完全ゲノム

に、第 3 世代シーケンサー MinION (Oxford Nanopore Technologies) によるロングリード配列を用いたスピロプラズマゲノムコンティグの結合を試みた。NSRO を対象に行った 1 回のランで、ファージゲノムサイズを超えるリードが 2,026 得られたが、そのうちファージの全長を含む 31 リードのほとんどがファージ配列のみが複数連続で並んだものであり、ファージゲノムが複製される際に生じる鎖状体ゲノムに由来するものと考えられた。アラインメントパッケージの Canu を用いた *de novo* アセンブルの結果、13 コンティグが得られた(図 6)。PacBio コンティグとの比較から、染色体ゲノムのほぼ全域をカバーしていること、いくつかのコンティグが結合できることがわかったが、完全環状ゲノムの決定には至らなかった。

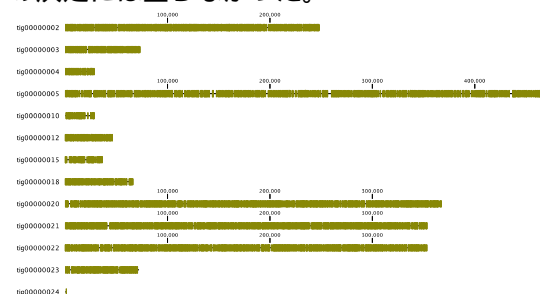


図 6. スピロプラズマ NSRO ゲノム MinION のロングリードのアセンブルにより得られた 13 のコンティグ。

(4) 本研究課題において明らかにした雄殺しスピロプラズマのファージゲノムについては、先行研究でも触れられておらず、未だ報告されていない。スピロプラズマゲノムについては、ファージの挿入による再編成が示唆されており、本細菌ゲノムの進化を考える上でも、ファージの完全ゲノムを決定したことには意義がある。今後は、ゲノム調整における断片化を可能な限り回避し、大量のゲノムを回収することで、よりクオリティの高いロングリード配列を取得し、完全ゲノムの決定を目指す。

<引用文献>

- Hisashi Anbutsu & Takema Fukatsu, *Spiroplasma* as a model insect endosymbiont, *Environmental Microbiology Reports*, 3, 2011, 144-153
- J. H. Werren, L. Baldo & M. E. Clark, *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology, *Nature Reviews Microbiology*, 6, 2008, 741-751
- Masaaki Yamada, Saburo Nawa & Takao K. Watanabe, A mutant of SR organism (SRO) in *Drosophila* that does not kill the host males, *Japanese Journal of Genetics*, 57, 1982, 301-305
- 安佛 尚志、深津 武馬, 共生微生物による宿主昆虫の生殖操作の解明への分子遺伝学的アプローチ、*日本農芸化学会誌*, 77, 2003, 137-139
- Hisashi Anbutsu & Takema Fukatsu, Population dynamics of male-killing and non-male-killing spiroplasmas in *Drosophila melanogaster*, *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 2003, 1428-1434
- Hisashi Anbutsu & Takema Fukatsu, Tissue-specific infection dynamics of male-killing and nonmale-killing spiroplasmas in *Drosophila melanogaster*, *FEMS Microbiology Ecology*, 57, 2006, 40-46
- Daisuke Kageyama, Hisashi Anbutsu, Masakazu Shimada & Takema Fukatsu, Effects of host genotype against the expression of spiroplasma-induced male killing in *Drosophila melanogaster*, *Heredity*, 102, 2009, 475-482
- G. D. D. Hurst, Hisashi Anbutsu, Mayako Kutsukake & Takema Fukatsu, Hidden from the host: *Spiroplasma* bacteria infecting *Drosophila* do not cause an immune response, but are suppressed by ectopic immune activation, *Insect Molecular Biology*, 12, 2003, 93-97
- Hisashi Anbutsu & Takema Fukatsu,

Evasion, suppression and tolerance of *Drosophila* innate immunity by a male-killing *Spiroplasma* endosymbiont, *Insect Molecular Biology*, 19, 2010, 481-488
Toshiyuki Harumoto, Hisashi Anbutsu & Takema Fukatsu, Male-killing *Spiroplasma* induces sex-specific cell death via host apoptotic pathway, *PLoS Pathogens*, 10, 2014, e1003956
J. K. Herren, J. C. Paredes, F. Schpfner & B. Lemaitre, Vertical transmission of a *Drosophila* endosymbiont via cooption of the yolk transport and internalization machinery, *mBio*, 4, 2013, e00532-12
J. Martin, T. Chong & P. M. Ferree, Male killing *Spiroplasma* preferentially disrupts neural development in the *Drosophila melanogaster* embryo, *PLoS One*, 8, 2013, e79368
J. C. Paredes *et al.* Genome sequence of the *Drosophila melanogaster* male-killing *Spiroplasma* strain MSRO endosymbiont, *mBio*, 6, 2015, e02437-14

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)

[学会発表](計4件)

安佛 尚志、二河 成男、田中 康次郎、深津 武馬、Evaluation of MinION nanopore sequencing for scaffolding of *Spiroplasma* genomes and identifying prophage sequences、Wolbachia conference 2018、2018

安佛 尚志、二河 成男、田中 康次郎、深津 武馬、オス殺し共生細菌スピロプラズマにおけるプロファージ領域の解析、第62回日本応用動物昆虫学会大会、2018

安佛 尚志、柴田 朋子、二河 成男、田中 康次郎、春本 敏之、西山 智明、重信 秀治、長谷部 光泰、深津 武馬、Comparative genomic analysis of male-killing *Spiroplasma* and its non-male-killing variant in *Drosophila*、The 9th International Wolbachia Conference、2016

安佛 尚志、柴田 朋子、二河 成男、田中 康次郎、春本 敏之、西山 智明、重信 秀治、長谷部 光泰、深津 武馬、ショウジョウバエの共生細菌スピロプラズマの全ゲノム決定と比較ゲノム解析、日本昆虫学会第76回大会・第60回日本応用動物

昆虫学会大会合同大会、2016

[その他]
ホームページ等
<https://unit.aist.go.jp/bpri/bpri-symbio/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安佛 尚志 (ANBUTSU, Hisashi)
国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員
研究者番号：30392583

(2) 連携研究者

重信 秀治 (SHIGENOBU, Shuji)
基礎生物学研究所・生物機能解析センター・特任准教授
研究者番号：30399555

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

柿澤 茂行 (KAKIZAWA, Shigeyuki)
国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員
研究者番号：10588669