

平成30年 5月31日現在

機関番号：32651

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15065

研究課題名(和文) ボルバキア因子Tom0の宿主の性を与える影響の解析

研究課題名(英文) Host manipulation by the Wolbachia effector protein Tom0

研究代表者

大手 学 (Ote, Manabu)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：20386717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ボルバキアによる宿主操作の分子機構を明らかにするため、キイロショウジョウバエ培養細胞を用いたボルバキア遺伝子のスクリーニングを行った結果、Tom0を同定した。Tom0は、ボルバキアによるSxl変異の回復を一部再現した。また、強制発現したTom0はRNA結合タンパク質複合体と共局在することから、Tom0が宿主RNAを標的にしている可能性について検証したところ、nanos mRNAと複合体を形成していた。Tom0はNanosタンパク質を増加させることによりSxl変異体表現型を回復させていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Wolbachia, endosymbiotic bacteria prevalent in invertebrates, manipulate their hosts in a variety of ways: they induce cytoplasmic incompatibility, male lethality, male-to-female transformation, and parthenogenesis. However, little is known about the molecular basis for host manipulation by these bacteria. In *Drosophila melanogaster*, Wolbachia infection makes otherwise sterile Sex-lethal (Sxl) mutant females capable of producing mature eggs. Through a functional genomic screen for Wolbachia genes with growth-inhibitory effects when expressed in cultured *Drosophila* cells, I identified the gene Tom0, which phenocopies some of the Wolbachia effects in Sxl mutant *D. melanogaster* females. Tom0 enhanced the maintenance of germ stem cells by elevating Nanos expression via its interaction with nos mRNA, ultimately leading to the restoration of germ cell production in Sxl mutant females that are otherwise without GSCs.

研究分野：昆虫学

キーワード：ボルバキア RNA Tom0

1. 研究開始当初の背景

地球上には140万種余りの動物が生息しているが、その約70%がチョウやアリなどの昆虫である。ボルバキアというリケッチャに近縁の細菌は、70%程の昆虫種に感染しているが、このことはつまり、地球上の動物種の半数が共生細菌ボルバキアに感染していることになる。昆虫種によっては、ボルバキア感染によって雄から雌への性転換が引き起こされる。これにより、ボルバキアは感染した個体から子へと伝わることもできる。また、ボルバキアが感染した蚊(ネッタイシマカ)では、デングウイルスなどの感染症ウイルスが増殖できない。このウイルスを伝播しない蚊は、感染症撲滅を目指して、すでに世界各国で野外に放飼されている。その他、多様な現象がボルバキアによって引き起こされるが、その宿主昆虫を操作する能力こそが、ボルバキアが宿主昆虫で感染を拡大できた理由であると考えられる。

2. 研究の目的

ボルバキアの持つ巧みな宿主操作機構を応用、または人為的に操作することができれば、多様な農業、衛生害虫を効果的に防除することができる可能性がある。その基盤となる知見を集積するため、ボルバキアと宿主の相互作用を分子レベルで解明することを試みた。

3. 研究の方法

実験には、詳細な遺伝学的解析が可能なキイロショウジョウバエと、それに自然界で感染しているボルバキア wMel を用いた。特に、ボルバキア-宿主相互作用に参与するボルバキア遺伝子の同定を目指した。ボルバキアの遺伝子操作技術は未発達のため、宿主細胞にボルバキア遺伝子を発現させることによって、その機能解析を試みた。まず、ボルバキアゲノムDNAを単離し、ショウジョウバエ発現ベクターにクローニングすることにより、ボルバキア遺伝子発現ライブラリーを作成した。これをキイロショウジョウバエ培養細胞 S2 に導入し、細胞の生育に影響を与えるDNA断片を単離した。同定されたボルバキア遺伝子をキイロショウジョウバエ個体に発現させ、ボルバキア様現象が再現されるか観察し、遺伝学的手法を用いて機能解析を行った。

4. 研究成果

培養細胞を用いたスクリーニングにより、ボルバキア-宿主相互作用を担う可能性のある9つの配列を得た。これらを GAL4/UAS システムを用いてキイロショウジョウバエ個体に強制発現した。その結果、nanos-GAL4 を用いた雌の生殖細胞での強制発現により、妊性を低下させる遺伝子 WD1278 を得て、TomO と名づけた。

キイロショウジョウバエで観察される、ボ

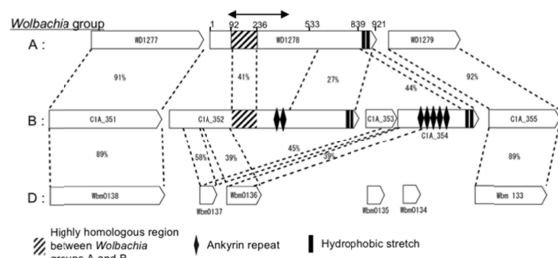


図1 TomO と近傍のゲノム構造

ルバキアにより引き起こされる主な現象は、細胞質不和合性と *Sex-lethal* 変異体の回復である。まず、細胞質不和合性への関与を調べるため、雄生殖細胞にて TomO を強制発現した。だが、成熟した精子が形成されず、細胞質不和合性は再現されなかった。

キイロショウジョウバエでは、*Sex-lethal* (*Sxl*) は雌決定の支配遺伝子であるが、RNA 結合領域周辺の幾つかのミスセンス変異アリルの雌では、卵巣が未熟で不妊となる。変異体の異常は、生殖幹細胞でも確認される。雌生殖幹細胞では *Nanos* が *dpp* 経路を活性化して分化を抑制し、マーカータンパク質 pMad が誘導される。一方、分化した細胞では *Bam* が発現し、*Nanos* を抑制する。*Sxl* 不妊変異体では *Nanos* 発現細胞が減少し、代わりに本来幹細胞があるべき場所で分化し

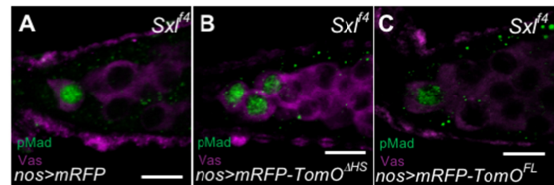
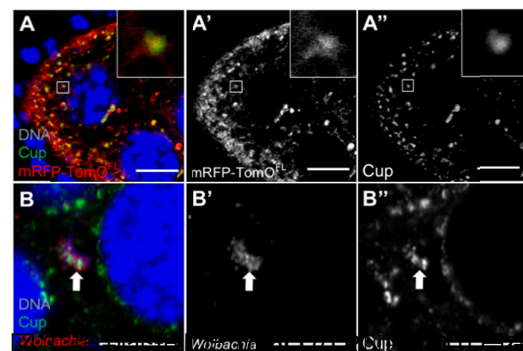


図2 TomO 強制発現により雌生殖幹細胞が増加する

た *Bam* 発現細胞が見られる。一方、この変異体にボルバキアが感染すると、*Nanos* が発現する雌生殖幹細胞が増加し、妊性が一部回復する。キイロショウジョウバエ GAL4/UAS システムを用いて、*Sxl* 変異体雌生殖幹細胞で TomO を強制発現したところ、幹細胞マーカー pMad のシグナルが著しく増強し、幹細胞が増加した。結果、*Nanos* 発現細胞数が著しく増加した。

雌生殖細胞に強制発現した TomO の分布を詳細に観察した所、細胞間、細胞内の RNA



輸送に関わる Ribonucleoprotein (RNP) に局在した。また、ボルバキア自身も RNP に局在した。そこで、TomO が宿主 RNA を標的にしている可能性を検証するため、雌生殖幹細胞の発生に関与する遺伝子がコードする RNA と TomO の相互作用を RNA 免疫沈降により観察した所、*nanos* mRNA が同定された。また、TomO 強制発現細胞では *nanos* mRNA と翻訳抑制因子 Cup との結合が阻害され、Nanos タンパク質が増加していることが明らかとなった。Nanos の増強によって生殖幹細胞が増加したこと、ボルバキアの効果には *nanos* の働きが必要なことから、TomO が Nanos を増強することにより、*Sxl* 変異体にて雌生殖幹細胞を増加させていることがわかった。

自然界ではキイロショウジョウバエに感染しているボルバキア *wMel* を、近縁のオナジショウジョウバエに移植すると異常増殖し、雌生殖細胞の発生に異常が見られることを明らかにした。将来卵へと分化する卵母細胞

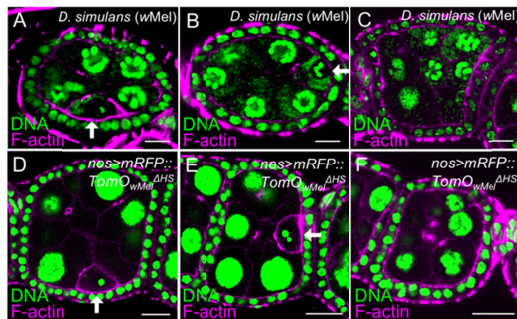


図4 ボルバキアと TomO によって引き起こされる雌生殖細胞発生異常

胞の位置の異常、DNA 異常、分化異常が観察された。この異常は、キイロショウジョウバエにおいて、野生型にて TomO を強制発現することによって再現された。この時、ボルバキア感染卵巣では、卵母細胞の決定に関与する *orb* mRNA と翻訳抑制因子 Cup の相互作用が阻害されており、保育細胞での翻訳抑制が解かれていた。同様の阻害は、TomO 強制発現卵巣でも観察された。

以上の結果から、ボルバキアは *nanos* mRNA, *orb* mRNA を標的として宿主と相互作用していることが明らかとなった。これらは共に、母親から子へと伝わる母性 RNA である。胚発生初期には後極に集積して、生殖細胞形成時に細胞内に取り込まれる。同様の tropism はボルバキアにも見られることから、ボルバキアはこれら母性 RNA と共に子へと伝わり、効率的に発現をコントロールしているのかもしれない。

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 3件)

Hideki Kawasaki, Asaithambi Manickam,

Rima Shahin, Manabu Ote, Masashi Iwanaga.

Expression of matrix metalloproteinase genes during basement membrane degradation in the metamorphosis of *Bombyx mori*.

Gene Vol. 638 pp. 26-35, 2018

Manabu Ote, Morio Ueyama, Daisuke Yamamoto.

Wolbachia Protein TomO Targets *nanos* mRNA and Restores Germ Stem Cells in *Drosophila* Sex-lethal Mutants.

Current Biology Vol. 26 pp. 2223-2232, 2016

Ryoya Tanaka, Hina Murakami, Manabu Ote, Daisuke Yamamoto.

Clustered regulatory interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-mediated mutagenesis and phenotype rescue by piggyBac transgenesis in a nonmodel *Drosophila* species.

Insect Molecular Biology Vol. 25 pp. 355-361, 2016

[学会発表](計 8件)

大手学、嘉糠洋陸

共生細菌ボルバキアによる RNA ウイルス抑制の分子機構 (2018)

第 62 回日本応用動物昆虫学会大会

Manabu Ote

Molecular basis of symbiosis between bacteria and insects: *Wolbachia* colonize *Drosophila* germline stem cells and target host RNAs

Neuro Global Focused symposium, 2018

大手学、嘉糠洋陸

Dissecting interaction between arbovirus and symbiotic bacteria *Wolbachia* in *Aedes* mosquitoes

ConBio2017, 2017

Manabu Ote

Symbiotic bacteria *Wolbachia* manipulate host germline stem cells by targeting host RNAs

EMBO Conference Molecular and Population Biology of Mosquitoes and Other Disease Vectors Vector and Disease Control, 2017

大手学、嘉糠洋陸

ネッタイシマカでの共生細菌ボルバキアの感染様式

日本衛生動物学会第 69 回大会, 2017

Manabu Ote

Wolbachia Protein TomO Targets nanos mRNA and Restores Germ Stem Cells in Drosophila Sex-lethal Mutants
The 3rd Vector Encounter, 2017

大手学、上山盛男、山元大輔、嘉糠洋陸
Manipulation of Aedes mosquito and Drosophila by symbiotic bacteria Wolbachia
日本分子生物学会第 39 回年会, 2016

Manabu Ote, Morio Ueyama, Daisuke Yamamoto
Host manipulation by a novel Wolbachia protein TomO
Wolbachia conference 2016, 2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
大手学 (OTE, Manabu)
東京慈恵会医科大学・医学部・助教
研究者番号：20386717