

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03717

研究課題名(和文) 共生系の遺伝子ネットワークの制御機構とその進化

研究課題名(英文) Symbiotic genetic network: its regulatory mechanism and the evolution

研究代表者

重信 秀治 (Shigenobu, Shuji)

基礎生物学研究所・新規モデル生物開発センター・教授

研究者番号：30399555

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,800,000円

研究成果の概要(和文)：半翅目昆虫アブラムシとその細胞内共生細菌ブフネラはお互い相手なしでは生存が不可能なほど緊密な相互依存関係にあり、両者は生理的にも解剖構造的にもまるでひとつの生物のように統合化されている。本研究では、このアブラムシ-ブフネラの共生系をモデルに、共生系の統合的遺伝子ネットワークの制御機構と進化過程を解明することを目指した。その結果、アブラムシの共生器官で特異的に発現するBCRペプチドが、抗菌作用を有することを発見した。近年多様な共生系においても類似の例が報告されつつあり、共生進化の普遍原理の1つとして「共生的抗菌ペプチド」の概念を提唱した。また、アブラムシのゲノム編集技術の開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年「共生」は地球生態系や生命進化、そしてヒトの健康にも重要な役割を果たす事が認識されてきました。しかし宿主と共生者の間でどのような分子を使いどのような相互作用を通して共生が営まれているかについてはほとんどわかっていません。今回、私たちは昆虫アブラムシから発見したBCRというペプチド(短いタンパク質)が抗菌活性を持つことを発見しました。この分子を使って共生細菌を制御していると考えられます。類似の例が他の動植物の共生においても報告されていることから、共生が進化する際の一般原理として注目されます。また、今回の研究の過程でアブラムシをゲノム編集により遺伝子操作する技術を開発することもできました。

研究成果の概要(英文)：Aphid species harbor an obligate endosymbiont, *Buchnera aphidicola*, within their specialized large cells called bacteriocytes and depend on *Buchnera* for essential nutrients. Aphid and *Buchnera* are well integrated physiologically and anatomically, which resulted in the absolute interdependence between the host and the symbiont. Using aphid-*Buchnera* symbiosis as a model, we aimed to understand the mechanisms and the evolution underlying the integrative genetic network in the symbiosis. We found that BCR peptides, which we have already reported their symbiotic organ-specific expression, have antimicrobial activity. We also argued the universality of the symbiotic antimicrobial peptide considering similar cases reported in other symbiotic systems. We succeeded in the development of CRISPR/Cas9 genome editing in the pea aphid, which would open a new avenue of aphid and symbiosis studies in the future.

研究分野：ゲノム進化学

キーワード：共生 アブラムシ ゲノム編集 抗菌ペプチド

1. 研究開始当初の背景

「共生」が地球生態系や生命進化に重要な役割を果たす事が認識されつつある中、多様な共生系で、共生を担う遺伝子や分子が少しずつ明らかになってきている。このように共生を支える遺伝子が列挙されカタログが充実してきた一方で、共生という進化的新奇性が、どのような遺伝子制御ネットワークの進化によってもたらされるのか?という問題についてはほとんど分かっていない。共生系が成立する前は、宿主と共生者は元来独立の遺伝子ネットワークを持っていたはずである。共生の成立と維持には、相互作用を介した高度に統合された遺伝子ネットワークが構築される必要があるが、それはどのようなメカニズム・進化プロセスなのであろうか。本研究は、昆虫アブラムシとその共生細菌ブフネラの細胞内共生系をモデルに、その共生系を支える遺伝子ネットワークを解明し、その進化過程を明らかにする事を目標とする。

約2億年前に共生を開始したアブラムシとブフネラはお互い相手なしでは生存が不可能ほど緊密な相互依存関係にあり、両者は生理的にも解剖構造的にもまるでひとつの生物のように統合化されている。アブラムシは共生微生物ブフネラを格納するための特別な共生器官を持っている。共生器官細胞それぞれの細胞質に数万の数のブフネラが共生し、そこで宿主と細菌は協調的アミノ酸合成・代謝を行っている (図1 ; Shigenobu & Wilson 2011)。

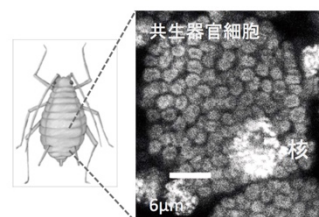


図1: アブラムシの共生器官細胞。核の周りの細胞質を埋め尽くす多数の粒状シグナルは共生細菌ブフネラ

研究代表者自身によりアブラムシとブフネラ両方のゲノム解読が完了しており (Shigenobu et al, 2000 Nature; IAGC, 2010 PLOS Biol)、近年発展著しいゲノミクス的手法を適用するのに適した研究材料である。実際、私たちはすでに共生器官のトランスクリプトーム解析により、共生器官特異的に発現する宿主遺伝子を多数同定することに成功した (Nakabachi et al., 2005 PNAS; Shigenobu & Stern 2013 Proc R Soc B)。その過程で、共生器官細胞にほぼ特異的に発現する宿主の転写因子とシグナル分子を発見しており、それらを軸に遺伝子制御ネットワークを明らかにすることを本研究では目指した。また、これら過去のトランスクリプトーム解析結果に基づく「共生因子」候補以外にも共生遺伝子が存在する可能性は大いにある。研究開始時にはアブラムシで利用できるゲノムやトランスクリプトームのデータリソースは限定的であったが、次世代シーケンシング技術の急速な発展により、これらを活用することに新規の共生遺伝子を網羅的に探索することができる技術的な土壌は整いつつあった。また、研究提案時点ではまだアブラムシでは成功例はなかったものの、ゲノム編集の技術がモデル生物で急速に広がってきており、新興モデル生物であるアブラムシにおいてもゲノム編集による機能解析の実現が期待される状況であった。

2. 研究の目的

共生系において宿主と共生者がどのように統合的な遺伝子ネットワークを構築するかはほとんど分かっていない。本研究では、昆虫アブラムシと細菌ブフネラの共生系をモデルに、共生系の遺伝子ネットワークの制御機構と進化過程を解明することが目標である。申請者はこれまでに、共生器官細胞で特異的に発現する宿主の転写因子やシグナル分子を発見しており、これらの遺伝子を軸に遺伝子制御ネットワークを明らかにする。さらに新たなゲノムワイド解析、dual-RNA-seq や比較ゲノム解析、により新規の共生因子を同定する。また、これらの「共生遺伝子」の機能を直接的に検証する手段として、アブラムシでゲノム編集を行う技術開発にも取り組む。

3. 研究の方法

(1) BCR ペプチドの生理活性の解析

アブラムシの BCR1, BCR2, BCR4, BCR4, BCR8 各ペプチドは、そのアミノ酸配列 (Shigenobu & Stern 2013) に基づいて化学合成した。適切な立体構造を取らせるべく、Refolding CA Kit (TaKaRa) でリフォールディングし、Oasis HLB カラムによって生成した。純度は HPLC で、ジスルフィド結合が形成されたことは質量分析によって確認した。抗菌活性試験に使う大腸菌 *E. coli* MG1655 は、M9 培地で培養し、対数増殖期 (OD600=0.3) に達したところで、3 倍に希釈した上で規定の濃度のペプチドで 30°C、30 分間処理した。BSA をコントロールとして用いた。ペプチド処理後の大腸菌を LB プレートに塗布し、培養し、発生したコロニーの数をカウントした。菌体の形態の観察のために、DAPI 及び PI で染色し、セルソーターと蛍光顕微鏡で観察した。

(2) ゲノム編集

エンドウヒゲナガアブラムシ (*Acyrtosiphon pisum*) の ApL 系統を使用した。アブラムシは通常胎生単為生殖なので、卵を産ませるために、低温短日条件で有性生殖を誘導した。産卵後 24 時間以内の卵を回収し、Cas9-gRNA 複合体を卵の後局にマイクロインジェクションした。アブラムシは孵化まで低温で休眠期間を経る必要があるため、インジェクション後の卵を冷蔵庫で約 2 ヶ月静置した。その後、16°C のインキュベータに戻し孵化させた。孵化したアブラムシ (crispant; G0 世代) は、まずこの世代で表現型の観察を行った。G0 世代は、体細胞にモザイクに変異が入っており、その程度はゲノム編集の効率に依存しバラつきがある。ゲノム編集効率は、次世代シーケンシング (Illumina MiSeq を利用) による amplicon-seq で定量した。次に、生殖系列に変異が導入された個体から変異系統を確立する。インジェクションした世代が産出する次世代 (G1) を個体毎にジェノタイピングする。ジェノタイピングの方法は、RGEN-RFLP 法とサンガーシーケンスを用いた。

(3) ゲノム・トランスクリプトーム解析

ゲノム解析と RNA-seq 解析はエンドウヒゲナガアブラムシ (*Acyrtosiphon pisum*) ApL 系統を用いた。ゲノム解析は、10x Genomics Chromium による linked-read ライブラリ、PacBio によるロングリードの方法に加え、Hi-C の各種データを統合してアセンブルを行った。共生器官の RNA-seq 解析は、微量 RNA に対応した SMART-seq 法を用いた。

4. 研究成果

(1) 共生的抗菌ペプチド BCR の発見と機能解析

BCR は研究代表者が発見したアブラムシ共生器官細胞に特異的に発現するシステイン残基を多く持つ分泌性ペプチドのファミリーである。アブラムシは共生細菌を細胞内に保持する特殊な共生器官細胞をもつが、この細胞のトランスクリプトーム解析 (RNA-seq) を行ったところ、公的データベースにも登録のないシステインリッチな分泌性ペプチドをコードする遺伝子群が多種類高発現していることを見だし、BCR と命名した (Shigenobu & Stern 2013 Proc Roy Soc B)。BCR はエンドウヒゲナガアブラムシには 7 遺伝子存在する。BCR のアミノ酸配列から機能を推定できる情報は得られなかったが、ディフェンシン等ある種の抗菌ペプチドがシステイン残基を多数持つことにヒントを得て、本研究では BCR の抗菌活性を検討した。

7種類のうち化学合成できた6種類のBCRペプチドを大腸菌に添加したところ、BCR1, BCR3, BCR5, BCR5は5 μ Mの濃度で著しい増殖抑制の効果が見出された(図2; Uchi et al., 2019)。BCR4にもマイルドな抗菌効果が認められたが、BCR2には抗菌効果は見いだされなかった。したがって、BCR2を除くBCRペプチド群は新規の抗菌ペプチドであると言える。

大腸菌に対するBCRの効果をさらに調べたところ、形態と膜透過性に影響があることがわかった。具体的には、菌体の形状はペプチド添加によって伸長する傾向にあり、それに伴ってDAPIやPIのシグナルが増加した。ゲノムDNAの倍加が予想された。また、ペプチド添加によってPIの染色性が顕著に増加したことは、BCRが膜透過性を上げていることを意味している。さらに、大腸菌(γ プロテオバクテリア)以外にも α プロテオバクテリアに属する根粒菌に同様な実験を実施した結果、根粒菌に対しても同様の抗菌作用が見出された。つまり、BCRはブフネラや大腸菌が属する γ プロテオバクテリアのみならず、プロテオバクテリアに対して広く抗菌活性を持つことを意味する。どれくらいの範囲のバクテリアに対して抗菌活性を有するかの抗菌スペクトラムについては今後の解析が待たれる。

上記のBCRの抗菌活性の発見について、Microbes and Environments誌上に発表し(Uchi et al., 2019)、この論文は、2019年のベスト論文賞に選ばれた(<https://www.microbes-and-environments.jp/most-valuable-paper-in-the-year-2019/>)。

上記の通りBCRの生化学的な活性は明らかにできたが、アブラムシの生体内での機能については依然不明であり解析の途中である。これまでに、いくつかのBCRについては良質なモノクローナル抗体の作成に成功し、それを使った免疫染色や免疫電顕の解析によりBCRの局在を明らかにできつつある(未発表)。また、後述するゲノム編集技術によってBCRのノックアウト変異も作成中である。近い将来、BCRがアブラムシ=ブフネラ共生系で果たしている役割について明らかにできると期待される。

BCRは相利共生を営む宿主が合成する抗菌ペプチドであるが、マメ科植物でも似たようなペプチドNCRが共生系において働いていることがわかっている。また他の動植物と微生物の共生系でも類似の例の報告が相次いでいる。私はその一般性や共生進化における役割について議論を重ね、総説を執筆、出版した(Mergaert et al., 2017; 重信 2018)。元来、抗菌ペプチド(AMP)は、多細胞生物がもつ生体防御のための物質で、自然免疫反応によって、侵略してくる微生物を攻撃するために用いられる分子である。近年、生体防御とは一見正反対の状態に見える「共生系」においても、宿主がAMPに似たペプチドが高発現していることがわかってきた。BCR然り、その他にも、マメ科植物のタルウマゴヤシは窒素固定細菌を収納する共生器官である根粒で、抗菌ペプチドディフェンシンによく似たペプチドを大量に合成している。これら、共生の文脈ではたらくAMP様ペプチドを示す語は英語も訳語もまだ定着していないが、共生的抗菌ペプチド(symbiotic AMPs)やAMP様共生ペプチド(AMP-like symbiotic peptide)と呼ばれる。生体防御におけるAMPの主要な役割は微生物を殺すことにほかならないが、共生系におけるsymAMPの役割は一体何なのだろうか? 様々なsymAMPの比較したところ、symAMPの役割として考えられるものは、共生細菌を適切な数に制御する、共生細菌以外の微生物を死排除する、細胞膜透過性を向上させて栄養物質などの宿主・共生細菌間の移動を促進する、などが挙げられた。

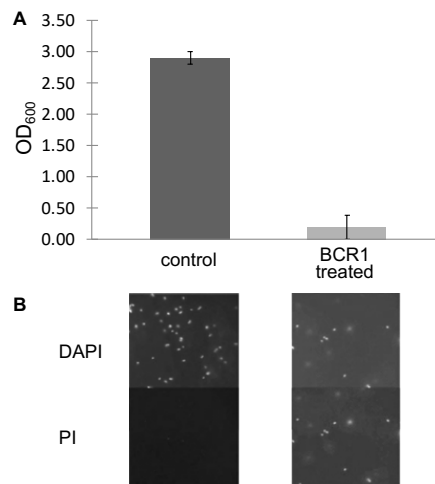


図2: アブラムシ新規抗菌ペプチドBCR1の大腸菌に対する抗菌活性。BCR1を添加すると増殖が著しく抑制される(A)。Propidium iodide (PI)により染色される事から細胞膜が崩壊していることがわかる(B)。

(2) アブラムシにおけるゲノム編集技術の確立

アブラムシとその細胞内共生細菌ブネラは共生研究のモデル系として 100 年以上もの研究の歴史を有し、私自身もこれまでのゲノミクス的アプローチによって共生に関わる重要遺伝子を同定してきた。しかし、アブラムシには RNAi が効きにくいなど、効果的な遺伝子機能解析の技術がなかったため、これまで実証的な研究が不可能であった。アブラムシ共生研究において、機能解析技術の確立は喫緊の課題であった。近年、モデル生物を中心に CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術が広く広まってきている。私は CRISPR/Cas9 ゲノム編集をアブラムシに適用することを試み、成功することができた。Proof of Concept として、色素合成に関する遺伝子と、胚発生に関わる遺伝子のノックダウンを NHEJ 法により誘導し、期待通りの機能欠損型の表現型のアブラムシを得ることができた（投稿準備中）。ターゲット近隣の次世代シーケンシングの結果、PAM 配列近傍に indel が挿入されており、正確なノックアウトが実現できていることを確認した（図 3）。また、私たちが開発した方法は非常に効率が高く、インジェクション G0 世代でもモザイク変異として表現型を観察でき、また生殖系列に変異が導入され安定した変異体も作出できるようになった。試した遺伝子の約 9 割で変異体の作出に成功した。

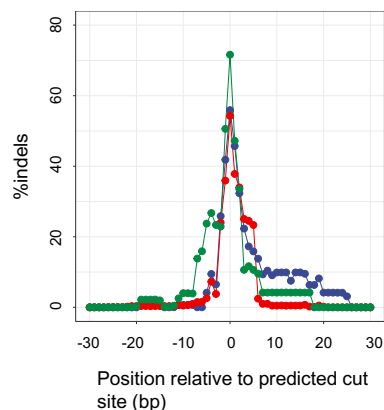


図 3 : CRISPR/Cas9 ゲノム編集の例。インジェクションした G0 世代における標的 PAM 配列の近傍の indel の割合。3 つの独立したノックアウト個体を青、赤、緑で表示。標的付近に正確に indel が生じていることがわかる。

ゲノム編集の技術開発は当初の研究計画に盛り込まれていたものの、想定していたよりも順調に開発が進んだ。そして、ゲノム編集技術は、アブラムシ研究や共生研究のアプローチを劇的に変えるインパクトがあると考えられた。そのため、当初予定していた 4 年間の基盤研究 B の研究期間の最終年度に基盤研究 A に「アブラムシ細胞内共生の分子機構をゲノム編集で明らかにする」という研究課題で申請し、採択に至った。現在、この技術を用いて、すでに発現情報などに基づいて「共生遺伝子」として同定してきた遺伝子をノックアウトして表現型を調べるとともに、その分子レベルの作用機序の解明を目指して研究を発展継続しているところである。

(3) その他

エンドウヒゲナガアブラムシのゲノムはすでに米国株が国際コンソーシアムによって解読済みであったが、私たちが実験に使っている札幌株の高精度のゲノムシーケンスを得ることができた（未発表）。このデータは、ゲノム編集はもとよりあらゆる解析の基盤となる。

ATAC-seq やシングルセル RNA-seq などの最先端のゲノミクス手法をアブラムシに適用することに成功し、実験プロトコルを確立した。

共生器官の RNA-seq データを新たに追加しそれらを解析することによって、アブラムシの新規の non-coding RNA を同定することができた（未発表）。そのうちいくつかは共生器官特異的に発現することが明らかになり、それらの共生における役割についてより深い研究が期待される。Dual-RAN-seq により共生細菌のトランスクリプトームも宿主のそれと同時に取得できている。

これまで主な研究対象はエンドウヒゲナガアブラムシであったが、社会性アブラムシの一種であるササコナフキツノアブラムシの実験室での系統維持を可能にした。さらに、数種のアブラムシのゲノムを新規に解読した。これらのリソースは比較ゲノムのアプローチによる共生進化の理解に有用であり、今後、本基盤研究終了後に幅広い研究展開を生み出す源となろう。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Uchi Nahoko, Fukudome Mitsutaka, Nozaki Narumi, Suzuki Miyuzu, Osuki Ken-ichi, Shigenobu Shuji, Uchiyumi Toshiki	4. 巻 34
2. 論文標題 Antimicrobial Activities of Cysteine-rich Peptides Specific to Bacteriocytes of the Pea Aphid <i>Acyrtosiphon pisum</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 155 ~ 160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1264/jsme2.me18148	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 -

1. 著者名 Mergaert Peter, Kikuchi Yoshitomo, Shigenobu Shuji, Nowack Eva C.M.	4. 巻 25
2. 論文標題 Metabolic Integration of Bacterial Endosymbionts through Antimicrobial Peptides	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Trends in Microbiology	6. 最初と最後の頁 703 ~ 712
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tim.2017.04.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 6件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Shuji Shigenobu
2. 発表標題 Genome editing in the pea aphid
3. 学会等名 19th Annual Workshop at Bellairs - Emerging Model Systems (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 重信秀治
2. 発表標題 NGSが切り拓く昆虫研究のフロンティア
3. 学会等名 九州大学昆虫科学・新産業創生研究センター設立記念 キックオフシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 重信秀治
2. 発表標題 NGSで切り拓く新しいモデル生物
3. 学会等名 PacBioユーザーグループミーティング 2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shuji Shigenobu
2. 発表標題 Genomic Revelations of a Mutualism: Aphids and the Endosymbiont
3. 学会等名 The 2nd NIBB-Princeton Joint Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 重信秀治
2. 発表標題 ゲノムから読み解く昆虫の不思議
3. 学会等名 大学共同利用機関シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 重信秀治
2. 発表標題 CRISPR/Cas9 Genome Editing in the Pea Aphid
3. 学会等名 日本進化学会第21回大会 (札幌)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shuji Shigenobu
2. 発表標題 Ortholog Analyses Reveal Genomic Basis of Evolutionary Novelty - Lessons from Insect Genomes
3. 学会等名 The 67th NIBB Conference "Quest for Orthologs" (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 重信秀治
2. 発表標題 NGSが切り拓く昆虫研究のフロンティア
3. 学会等名 日本畜産学会若手企画シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shuji Shigenobu
2. 発表標題 CRISPR/Cas9 Genome Editing in the Pea Aphid
3. 学会等名 Janelia Conference : New Genetic Tools for Non-Model Organisms (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 重信秀治
2. 発表標題 ゲノム解読法の最前線
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会 (広島) (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 重信秀治
2. 発表標題 オーソログ解析で解明する昆虫類の多様な新奇形質進化の遺伝子基盤
3. 学会等名 日本進化学会第20回大会（東京）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shuji Shigenobu
2. 発表標題 de novo of genome assembly of the pea aphid by a combination of long-read and short-read sequencing platforms
3. 学会等名 Nanopore London Calling 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 重信秀治
2. 発表標題 アブラムシの性と生殖
3. 学会等名 2017年度 性と生殖の懇談会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 重信秀治
2. 発表標題 アブラムシの生殖戦略--表現型可塑性と共生の視点から
3. 学会等名 日本動物学会第88回大会（富山）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 重信秀治
2. 発表標題 次世代シーケンシング時代の昆虫戦略
3. 学会等名 日本動物学会第88回大会（富山）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 重信秀治
2. 発表標題 アブラムシのゲノミクス&ポストゲノミクス
3. 学会等名 昆虫ポストゲノム研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shuji Shigenobu
2. 発表標題 Improvement of genome assembly of the pea aphid, <i>Acyrtosiphon pisum</i> , by a combination of PacBio and Nanopore technologies
3. 学会等名 Nanopore Community Meeting 2017 in New York
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 重信秀治
2. 発表標題 アブラムシ細胞内共生における新規抗菌ペプチド様遺伝子の発現と機能
3. 学会等名 日本進化学会第19回大会（京都）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究協力者	内海 俊樹 (Uchiumi Toshiki)	鹿児島大学	

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			
フランス	CNRS			
アメリカ	HHMI Janelia Research Campus			
その他の国・地域	国立台湾大学			