

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06383

研究課題名(和文)カオジロショウジョウバエをメスのみにする2種類の細胞質因子とその機構の比較解析

研究課題名(英文)Comparative analysis between the mechanisms of two cytoplasmic factors making Drosophila offspring all-females.

研究代表者

和多田 正義 (WATADA, Masayoshi)

愛媛大学・理学部・研究員

研究者番号：00210881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：長野県でのヤマカオジロショウジョウバエの採集では、オス殺し系統を検出することはできなかった。また、産卵数やミトコンドリアの形態に相違があったボルバキアとウイルス感染系統では、寿命に関して差がないことが明らかになった。インジェクション実験によって、オス殺しウイルスである Partitivirus のセグメント(dsRNA1-4)が抜け落ちることが明らかになった。dsRNA4が存在するときのみ性が全てメスになっていたため、この遺伝子をUASベクターに組み込み、キイロショウジョウバエの胚でオス殺しの効果を調査した結果、dsRNA4がオス殺し遺伝子であり、タンパク質として機能していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヤマカオジロショウジョウバエでは、種内でボルバキアによるオス殺しだけでなく、ウイルスによるものが存在することが本研究で明らかになった。本研究では、新たにオス殺しを行う Partitivirus を検出し、オス殺しを行う遺伝子をデータベースによる相同性の解析だけでなく、その遺伝子の機能をキイロショウジョウバエを用いた実験により明らかにした。このオス殺しを行う遺伝子は、データベースにも報告されていない未知の遺伝子であった。ショウジョウバエにおいてオス殺しをするウイルスやその遺伝子は初めての発見であり、本研究は生物の性決定のメカニズムを明らかにするうえで、非常に大きな学術的意義を持つものである。

研究成果の概要(英文)：Injection experiments of the homogenate of SP12F females (male-killing) into SP11-20 (a normal strain) females established all-female matriline, and RNA-seq analysis using SP12F, SP11-20 and the transformed strain showed that partitivirus with double strand RNA genomes was a responsible virus. In the collection of Drosophila biararia in Nagano, we could not collect a male-killing strain. In addition, we could not detect the difference of life span between Wolbachia and virus infected strains. Injection experiments revealed that loss of dsRNA4 segment resulted in non-male-killing phenotype. Male-killing phenotype was recapitulated by ectopic expression of the open reading frame (ORF4) of dsRNA4 segment in uninfected Drosophila melanogaster. Moreover, overexpression of frameshifted ORF4 did not affect sex ratios, supporting the notion that the ORF4 exerts male-killing activity as a protein.

研究分野：進化遺伝学

キーワード：ショウジョウバエ オス殺し ウイルス 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

(1) 我々は北海道のヤマカオジロショウジョウバエ (*Drosophila biauraria*) の自然集団から、メスしか産まない 1 系統を最初に発見した。この系統ではよく知られた細胞内共生細菌によるオス殺し現象と同様に、母から子に確実に伝わるだけでなく、正常系統への細胞物質のインジェクションにより、正常系統がメスばかりを産む形質転換を引き起こすことが明らかになった。さらに共生細菌特異的な遺伝子をプライマーにした PCR 法による調査や、電子顕微鏡観察でも細菌や真核微生物の特有の構造は全く見られず、細胞質内(核外)にウイルスのような像が観察された。これらのことから、メスのみの成虫が得られる原因は細菌や真核微生物ではなく、細胞物質を通じて感染可能であるウイルスなどの因子であると考えられた。その後我々の研究グループは北海道の自然集団からの再度の採集により、ヤマカオジロショウジョウバエにおいてボルバキア感染によるメスしか産まない 6 系統を採集することができた。すなわち、我々はヤマカオジロショウジョウバエにおいて、ウイルスとボルバキアという 2 種類の生命体によるオス殺しの現象を発見した。

(2) 2011 年に採集されたウイルスによると思われた全雌系統、及びオスメスが生まれる正常系統、さらに形質転換により全雌系統になった系統を用いて、雌雄が生まれる正常な系統の雌雄をコントロールとして RNA-seq によりトランスクリプトームの比較実験を行った。その結果、複数のウイルス遺伝子が検出された。コントロールでは全く検出されなかったが、全雌系統と形質転換により全雌系統になった系統に共通して検出されたのは、二本鎖の RNA ウイルスである Partitivirus の遺伝子であった。RNA ウイルスによる全メス系統で、リボソームを除去した RNA を用いて RNA-seq を行ったところ、以前得られた Partitivirus の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp) に相同な配列以外に 3 本の遺伝子が全メス形質にリンクして高発現を示していることが分かった。Partitivirus は植物や菌類で知られる 2 本鎖 RNA ウイルスであり基本的に 2 分節(セグメント)のゲノムをもち、RdRp とコートタンパクがコードされている。今回見つかった 4 本の配列が、1 つの Partitivirus が持つ遺伝子なのか、それとも複数のウイルス(様因子)が共存しているのかは不明である。また、正常系統に全メス系統の磨砕物をインジェクションし、全メス系統を確立する際に、一部の系統でこれら 4 本の遺伝子のうち、一部の遺伝子が抜け落ちた系統を得ることができた。これらの系統の性比から特定の配列がオス殺しに必要な遺伝子であることが推定された。

2. 研究の目的

(1) 我々はヤマカオジロショウジョウバエから、非細菌性の母系遺伝する因子により初期型オス殺し現象を発見し、さまざまな証拠からその原因がウイルス様因子であると考えた (Kageyama et al., 2017 Biol Lett)。初期型オス殺し現象を起こす因子がどのような因子であるのかを知るために、リボソーム RNA を除去したサンプルを用いてトランスクリプトーム解析 (RNA-seq) を行なったところ、全メス形質と連動して、4 つのトランスクリプトが顕著な高レベルで見られた。そのうち、1 つは植物やカビ類に感染する Partitivirus の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼと相同性が高いものであった。その他の 3 つについては、機能未知のタンパクをコードしていると考えられ、相同性のある配列は見つかっていない。現時点では、Partitivirus が原因ウイルスであるとは言い切れず、これら 4 つが 1 つのウイルスを構成する遺伝子であるのか、複数のウイルスが共存しているのかは不明である。今後、RACE 法による遺伝子構造の解析や FISH による局在観察によって、その詳細を明らかにしていく必要がある。またどのようなメカニズムによってオスを殺しているのかについても不明である。興味深いことに、本種ヤマカオジロショウジョウバエには、よく知られた共生細菌ボルバキアによる全メス現象も見つかっており、我々の研究室で系統維持されている。予備実験の結果から、ウイルス様因子起因の全メス系統では、正常系統やボルバキア系統とは異なり、未交尾メスが著しく多数の未受精卵を産むことが確認されている。本研究では、これら異なる 2 種類の細胞質因子による全メス現象を詳細に比較しながら、その機構解明に取り組むことを通じて、昆虫の生殖、性決定、細胞内共生に関する、全く新しい知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 2 種類の全メス系統の自然界での分布調査と生理学的形質の比較

北海道の採集地である苫小牧集団では約 5 % のメスが全メス系統であることから、長野県菅平高原においても、ヤマカオジロショウジョウバエのメスを採集し、ボルバキア及びウイルス感染による全メス系統の採集を行った。予備調査の結果から、7 月下旬にヤマカオジロバエが最も採集できることから 2018 年から 2020 年まで 3 年間に渡り、アカマツ林の各所にバナナトラップを設置し、ショウジョウバエの採集を行った。従来の研究でウイルスによる全メス系統では、未交尾メスが顕著に多数の卵を産卵すること及びミトコンドリアの形態異常が多く観察されることが明らかになっている。ミトコンドリアの形態異常は寿命に関係している可能性があること

から、ボルバキア及びウイルス感染系統のメス 100 匹ずつを用いて、摂氏 25 度、湿度 50% の環境でそれぞれの寿命を測定した。

(2) 分子系統学的解析による 2 種類の全メス系統の進化的起源

ヤマカオジロシヨウジョウバエで発見された野外由来のボルバキアによる全メス系統、及びウイルスによる全メス系統の DNA のハプロタイプを比較し、分子系統学的解析を行うことにより、2 種類の全メス系統の進化的起源を推定する。ボルバキアの分子系統学的解析には、その膜タンパク遺伝子である *wsp* 遺伝子の塩基配列を決定し、分子系統樹を作成して解析する。ウイルスによる全メス系統については、すでに Partitivirus の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp) であることがデータベース解析から推測されたので他の節足動物の RdRp の塩基配列を用いて、分子系統樹を作成して解析した。

(3) 非細菌性全メス系統における原因ウイルスの構造解析と機能解析

トランスクリプトーム解析 (RNA-seq) により全メス形質と連動して、4 つのトランスクリプトが顕著な高レベルで見られ、データベース解析からこのウイルスが Partitivirus に属するものであることが推察された。Partitivirus は通常 2 つの RNA フラグメントからなっているため、今回発見された 4 つの RNA フラグメント (dsRNA1-dsRNA4) がこのウイルスのものであるかどうかを明らかにするために、RACE 法と FISH を用いて、RNA 遺伝子の構造と細胞内分布を調査した。また、オス殺しに関係するフラグメントとして dsRNA4 の関与が明らかになったが、このフラグメントが本当にオス殺しの機能が持っているかどうかを確認するために、dsRNA4 の塩基配列をキイロシヨウジョウバエの GAL4/UAS システムに組み込み、キイロシヨウジョウバエで dsRNA4 の遺伝子 (ORF4) を強制発現させて、キイロシヨウジョウバエにおいてもオス殺しができるかどうかを調査した。さらに、ORF4 の塩基配列にフレームシフトを起こした遺伝子を作成し、この遺伝子が機能するかどうかを調査した。

4. 研究成果

(1) 2 種類の全メス系統の自然界での分布調査と生理学的形質の比較

2018 年の長野県におけるヤマカオジロシヨウジョウバエの採集では、採集個体が少なく、野外での全雌系統を検出することはできなかった。その後の採集ではヤマカオジロシヨウジョウバエの採集結果では採集個体は多くなかったものの、全メス系統を 1 系統検出することはできたが、系統化することはできなかった。野外採集個体の DNA を調査では、ボルバキアの遺伝子を検出することができた。この遺伝子の解析から長野県のボルバキアは北海道の系統のボルバキアとかなり異なっていることが明らかになった。2020 年の採集では、21 系統の単一メス系統を作成することができた。これらの系統についてボルバキア感染の有無、及びオス殺しをおこなうウイルスの感染を調査した結果、ボルバキアもウイルスも検出することはできなかった。ボルバキア及びウイルス感染系統のメス 100 匹ずつを用いて、摂氏 25 度、湿度 50% の環境で、寿命を測定した結果、両系統の間には寿命の差は全く見られなかった。2 種類の全メス系統ではミトコンドリアの形態異常に差が見られたが、寿命には差が見られないという結果になった。

(2) 分子系統学的解析による 2 種類の全メス系統の進化的起源

ヤマカオジロシヨウジョウバエで発見された野外由来のボルバキアによる全メス系統に関して *wsp* 遺伝子の塩基配列を決定し、分子系統樹を作成して解析したところ、北海道で採集された全メス系統に感染していたボルバキアは、キイロシヨウジョウバエに感染しているものに近縁ではあるが、独自の系統であることが示された。

オス殺しを行う Partitivirus はシヨウジョウバエを含む多くの昆虫で発見されている。ヤマカオジロシヨウジョウバエに感染している Partitivirus の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp) の塩基配列を他の昆虫に感染している Partitivirus の RdRp と比較するために、多くの昆虫の RdRp 配列を用いて分子系統樹を作成したところ、ヤマカオジロシヨウジョウバエに感染している Partitivirus の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp) の塩基配列は、他のシヨウジョウバエに感染している Partitivirus の RdRp と相同性が非常に高かった。このことはヤマカオジロシヨウジョウバエの Partitivirus は他の Partitivirus が持っていない新たに新しい遺伝子を獲得することによりオス殺しの機能を獲得したことを示唆する。

(3) 非細菌性全メス系統における原因ウイルスの構造解析と機能解析

トランスクリプトーム解析 (RNA-seq) によって、ヤマカオジロシヨウジョウバエの非細菌性全メス現象の原因として疑われた Partitivirus の 4 種類の転写産物 (dsRNA1-4) に関して、その局在を明らかにするため、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) を行なったところ、4 種類の転写産物が細胞内で共同存在していることが明らかとなった。さらに RACE により 4 種類の転写産物の末端配列を解読したところ、3' 末端に相同性の高い部分が存在していたことから、これらはすべて 1 種類の Partitivirus が持つセグメントである可能性が高いと考えられた。インジェクション実験の際にときどき 4 つのうち一部のセグメント (dsRNA1-4) が抜け落ちる場合があることが明らかになった。セグメント dsRNA4 が存在するときのみ性が全てメスになっていたため、dsRNA4 と全メス化との因果関係が疑われた。この遺伝子を UASP ベクターに組み込んだコンスト

ラクトをキイロショウジョウバエの胚にトランスフェクションし、系統化を行った。この UASP-dsRNA4 系統の 2 系統 (F6, M1) のオスを actin-Gal4 系統のメスとかけ合わせたところ、次世代のうち、UASP と actin-Gal4 を持つ個体のみが強くメスに偏った。さらに、dsRNA1-3 に含まれる ORF についてもそれぞれ同様にコンストラクトを作成し、UAS 系統を作成した。しかし、これらのオスを actin-Gal4 系統のメスとかけ合わせた結果は性比を歪めることはなかった。すなわち、dsRNA4 に含まれる ORF がオス殺し遺伝子として機能していることが証明された。また、dsRNA4 の ORF を用いて塩基欠失によるフレームシフト変異実験を行った。その結果、1 塩基欠失と 2 塩基欠失による遺伝子産物はオス殺しの作用をなくしていたため、この ORF がタンパク質として機能し、オス殺しを行っていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 和多田正義
2. 発表標題 ヤマカオジロショウジョウバエで見られた2種類の性比異常現象の遺伝学的解析
3. 学会等名 中国四国地区生物系三学会合同大会（山口大会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 和多田正義
2. 発表標題 ヤマカオジロショウジョウバエに性比異常現象をひきおこす2つの要因の比較研究
3. 学会等名 日本遺伝学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 陰山大輔
2. 発表標題 ショウジョウバエで見つかったウイルスが原因と思われるオス殺し現象
3. 学会等名 昆虫病理研究会シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Daisuke Kageyama
2. 発表標題 A maternally transmitted male killer in <i>Drosophila biauraria</i> : Partitivirus as a reproductive manipulator of insects?
3. 学会等名 International Wolbachia Conference（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 和多田正義
2. 発表標題 Drosophila biarurariaに性比異常現象をひきおこす2つの要因の比較研究
3. 学会等名 日本動物学会中国四国支部愛媛県例会
4. 発表年 2018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
研究分担者	陰山 大輔 (KAGEYAMA Daisuke) (60401212)	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 (82111)	
研究分担者	澤村 京一 (SAWAMURA Kyoichi) (90247205)	筑波大学・生命環境系・准教授 (12102)	

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
---------	---------