

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14477

研究課題名（和文）共生細菌ボルバキアが宿主のオスを殺す分子作用メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular mechanisms that underlie male-killing induced by Wolbachia.

研究代表者

杉本 貴史 (Sugimoto, Takafumi)

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・契約研究員

研究者番号：20726707

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：先行研究により、チョウ目昆虫アズキノメイガに感染し、オス殺し現象を誘導する細胞内共生微生物ボルバキアは、性転換を通じて宿主のオスを選択的に殺していることがわかっている。本研究では、その詳細な機構に迫るべく、アズキノメイガ由来の培養細胞にボルバキアを人為的に導入し、性転換を誘導させたものをサンプルとして解析を行った。その結果、ボルバキア感染による性転換とリンクして亢進するアズキノメイガ側の遺伝子を3種、抑制される遺伝子を3種見出した。これらは全て、性決定への関与が指摘される遺伝子、もしくはその近傍にある遺伝子であることが推定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の意義は、昆虫の性を自在に操り、その“生”をも操作する共生細菌の生殖操作機構を明らかにすることを通じて、生殖操作が共生細菌や宿主個体群に与える生態学的な意義の推定を可能にし、その機構に関与する遺伝子の構造や配列から、進化の歴史を明らかにすることにある。また、近年において農業におけるSDGsの達成を視野に、環境フレンドリーな生物資材として、微生物資材の研究開発を求める声が高まっており、害虫駆除や効率的な益虫生産への貢献が期待されるボルバキアの、その生殖操作機構の詳細な理解に対する期待が高まっている。

研究成果の概要（英文）：Endosymbiotic bacteria of the genus Wolbachia infecting the adzuki bean borer moth *Ostrinia scapulalis* causes male killing due to sexual-reversal during embryo to larvae. We successfully established *O. scapulalis* cell lines and reproduced the sexual-reversal via Wolbachia-infection in cultured cell. Next, we analyzed the gene expression profiles comparison between Wolbachia-infected male cell lines and uninfected lines by RNA-seq. As the result, 3 genes were up-regulated through Wolbachia induced sexual-reversal and 3 genes were down-regulated. One up-regulated and down-regulated gene had highly homology with sex determining genes and other genes were placed closely to sex-determining genes.

研究分野：応用昆虫学

キーワード：ボルバキア アズキノメイガ 生殖操作 オス殺し 性決定 培養細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

陸生節足動物の60%以上の種に感染すると見積られる細胞内共生細菌ボルバキアは、その圧倒的な繁栄の背景として、宿主の生殖を利己的に操作する能力を持つことが挙げられる(引用文献1)。なかでも、宿主のオスを選択的に殺す現象“オス殺し”は、昆虫全般で広く観察されている一般的な現象として知られている(引用文献2)。共生細菌によるオス殺し機構の研究は、アズキノメイガ-ボルバキア感染系とショウジョウバエ-スピロプラズマ感染系を中心に進められ、近年になってようやくその要因や機構に関する報告がなされはじめており、その機構として、オス特異的な性転換(引用文献3、4)、遺伝子量補償機構の異常(引用文献5、6、7)、アポトーシスの異常(引用文献8.)、神経系発達異常等の関与が報告されている。

その一方で、共生細菌側が持つオス殺し因子が未解明であったため、宿主-共生細菌間相互作用の理解については、まだブラックボックスの状態であり、オス殺し現象の全容解明を阻む障壁となっている。このような状況下、申請者は、共生細菌が持つオス殺し遺伝子を明らかにすることができれば、オス殺し現象に関する宿主-共生細菌間相互作用の全容解明に向けた実験系の構築が可能になり、共生細菌による生殖操作の理解に大きく貢献できると考えた。

2. 研究の目的

これまでの研究から、アズキノメイガ-ボルバキア感染系では、オス殺しに性転換が伴い、それによって遺伝子量補償の異常が誘導されていることがわかっている。本研究では、これまでの解析から、チョウ目昆虫の性決定のマスター遺伝子と目される masculinizer と類似性のある短いボルバキアゲノム配列8種が見出されている。そこで、これらの配列の発現状況を確認し、オス殺しとの関係を調べることを本研究のひとつ目の目的とした。

また、独自に作出したアズキノメイガ培養細胞に①ボルバキアを移植することで性転換が誘導されるかの確認を行う、②ボルバキアの移植によって発現パターンに変化が生じるアズキノメイガ側の遺伝子をスクリーニングする、という2つの戦略によって、ボルバキアによって操作される宿主側の分子機構を明らかにすることをもう一つの目的とした。

3. 研究の方法

実験①：オス殺し原因遺伝子の網羅的探索

これまでに、アズキノメイガ由来培養細胞の樹立(メス由来2、オス由来5)に成功した(図1)。これらの培養細胞にボルバキアを移植したのから total RNA を抽出し、短鎖(16-35塩基)と長鎖について Mi-Seq (Illumina 社)で網羅的にシーケンス解析を行った。コントロールとして、ボルバキア非感染の雌雄の培養細胞を用いた。短鎖の RNA データについては、ボルバキア感染と非感染、および性転換の有無に着目して解析を進めた。長鎖については、ボルバキアとアズキノメイガの両方に着目し、特に、性転換が起こると想定されるボルバキア導入オス培養細胞のみで高発現する遺伝子をスクリーニングした。

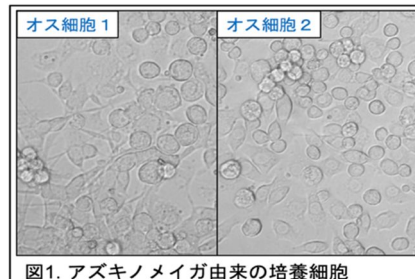
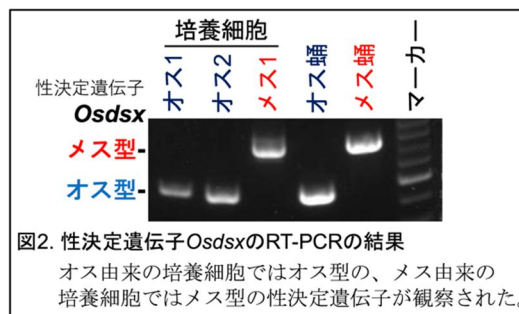


図1. アズキノメイガ由来の培養細胞

実験②：スクリーニングによって得られたボルバキア感染で変動する遺伝子の発現解析

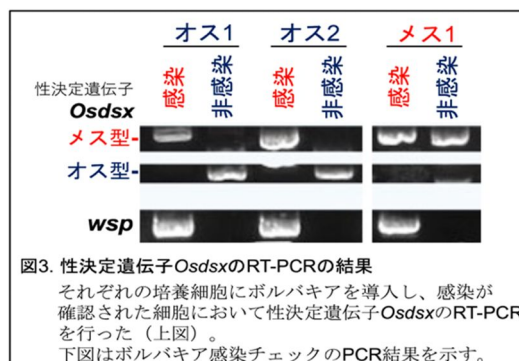
アズキノメイガにおいてボルバキア感染によるオス殺し現象は胚発生初期に誘導されることが有力である。そこで、スクリーニングによって得られた各遺伝子について、産卵後0時間、12時間、24時間、48時間の各サンプルにおいて RT-PCR によって発現状況を確認した。



4. 研究成果

まず、アズキノメイガ由来培養細胞の雌雄それぞれに由来する株について、性決定遺伝子発現 *Osd_{sx}* の発現を確認したところ、それぞれからメス型 (*Osd_{sx}F*)、オス型 (*Osd_{sx}M*) の性決定遺伝子発現パターンが確認された(図2)。そこで、雌雄それぞれに由来する培養細胞にボルバキアを感染させたところ、オス由来の培養細胞のみで性転換が誘導され、メス型の性決定遺伝子発現が観察された(図3)。この結果は、ボルバキアによる生殖操作を培養細胞上で再現することに成功したことを示しており、これにより、オス殺し現象の解析に培養細胞を利用できることがわかった。

次に、培養細胞にボルバキアを感染させたものをサンプルとして、オス由来の培養細胞において性転換が見られることを確認したのちに次世代シーケンス解析を通じて、small-RNA 解析とトランスクリプトーム解析を行った。



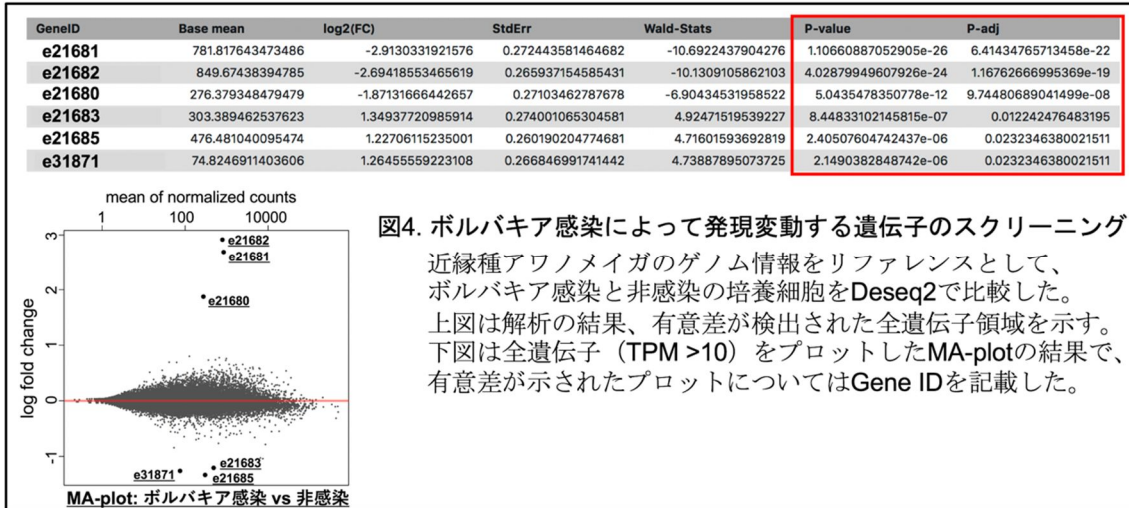


図4. ボルバキア感染によって発現変動する遺伝子のスクリーニング

近縁種アワノメイガのゲノム情報をリファレンスとして、ボルバキア感染と非感染の培養細胞をDeseq2で比較した。上図は解析の結果、有意差が検出された全遺伝子領域を示す。下図は全遺伝子 (TPM >10) をプロットしたMA-plotの結果で、有意差が示されたプロットについてはGene IDを記載した。

まず、Small-RNA のシーケンス解析の結果、ボルバキア由来と見られる配列は多く観察されたが、一方で、カイコガにおけるオス化誘導遺伝子 *masculinizer* のアズキノメイガにおける相同遺伝子である *Osmasc* と同源性のある領域については、想定された8領域はいずれも発現しているのがみられなかった。この結果から、*Osmasc* に対して抑制に働く micro-RNA 様の因子は、ボルバキアゲノム上には無いことが有力となった。一方で、pi-RNA や long non-coding RNA による操作を否定するものではないため、さらなる解析が必要であろう。

トランスクリプトーム解析の結果は、ボルバキア感染オスで特異的に発言が亢進されるものが3遺伝子、抑制されるものが3遺伝子観察された(図4)。この6遺伝子のうち、発現が亢進されていた3遺伝子(e21680-21682)および、抑制されていた2遺伝子(e21683-21685)はそれぞれ同一遺伝子座に座乗していることが有力視されたため、それぞれに跨るプライマーを総当たりで設計し、RT-PCRによる発現チェックを行ったところ、e21680-21682 および e31871 は産卵直後(0h)から発現していた一方で、e21683-21685 は産卵直後には発現が見られず、12h以降のサンプルで発現が確認された(図5)。これらの結果から、ボルバキアによって操作を受けるアズキノメイガ側の遺伝子領域は3つに絞られた可能性が高い。今後は、アズキノメイガ胚へのこれらの遺伝子の RNAi によるノックダウンを通じて、オス殺し表現型に直結する遺伝子を絞り込むとともに、培養細胞を利用したノックダウンと人工的なボルバキア導入の組み合わせを通じて、1つの遺伝子にまで絞り込む。

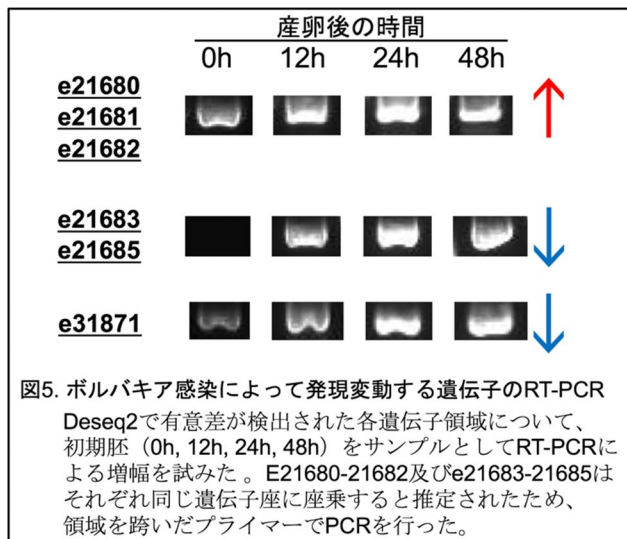


図5. ボルバキア感染によって発現変動する遺伝子のRT-PCR
Deseq2で有意差が検出された各遺伝子領域について、初期胚(0h, 12h, 24h, 48h)をサンプルとしてRT-PCRによる増幅を試みた。E21680-21682及びe21683-21685はそれぞれ同じ遺伝子座に座乗すると推定されたため、領域を跨いだプライマーでPCRを行った。

【引用文献】

1. Hilgenboecker et al., How many species are infected with Wolbachia? – a statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol Lett.* 281, 215–220. (2008)
2. Kageyama et al., Insect Sex Determination Manipulated by Their Endosymbionts: Incidences, Mechanisms and Implications. *Insects* 3, 161-199. (2012)
3. Sugimoto et al., Expression of a *doublesex* homologue is altered in sexual mosaics of *Ostrinia scapularis* moths infected with *Wolbachia*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40, 847-854. (2010)
4. Sugimoto and Ishikawa, A male-killing *Wolbachia* carries a feminizing factor and is associated with degradation of the sex-determining system of its host. *Biol. Lett.* 8, 412-415. (2012)
5. Sugimoto et al., Misdirection of dosage compensation underlies bidirectional sex-specific death in *Wolbachia*-infected *Ostrinia scapularis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 66, 72-76. (2015)
6. Harumoto et al., Male-killing symbiont damages host's dosage-compensated sex chromosome to induce embryonic apoptosis. *Nat. commun.* 21, 12781. (2016)
7. Fukui et al., The Endosymbiotic Bacterium *Wolbachia* Selectively Kills Male Hosts by Targeting the Masculinizing Gene. *PLoS Pathog.* 14, e1005048. (2015)
8. Harumoto et al., Male-Killing *Spiroplasma* Induces Sex-Specific Cell Death via Host Apoptotic Pathway. *Gene. PLoS Pathog.* 13, e1003956. (2014)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mitsuhashi Wataru, Shimura Sachiko, Miyamoto Kazuhisa, Sugimoto Takafumi N.	4. 巻 164
2. 論文標題 Spatial distribution of orally administered viral fusolin protein in the insect midgut and possible synergism between fusolin and digestive proteases to disrupt the midgut peritrophic matrix	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Archives of Virology	6. 最初と最後の頁 17~25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00705-018-4013-5	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Sugimoto Takafumi N, Tohji Kazuyoshi, Nagamine Keisuke, Ishikawa Yukio, Jouraku Akiya, Kageyama Daisuke.
2. 発表標題 Maternally inherited, non-bacterial male killer in <i>Ostrinia scapulalis</i> : searching for a novel male-killing factor
3. 学会等名 Wolbachia Conference 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杉本 貴史, 粥川 琢巳, 渡邊 和代, 松尾 隆嗣, 石川 幸男, 陰山 大輔
2. 発表標題 共生細菌ボルバキアが宿主アズキノメイガにオス殺しを誘導する分子機構の解析
3. 学会等名 第63回 日本応用動物昆虫学会 大会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----