

機関番号：82112

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007 ~ 2010

課題番号：19380038

研究課題名 (和文) 細胞質不適合性ウォルバキアと宿主との相互作用解析

研究課題名 (英文) Interaction between *Wolbachia* exhibiting cytoplasmic incompatibility and its hosts

研究代表者

野田 博明 (NODA HIROAKI)

独立行政法人農業生物資源研究所 昆虫・微生物間相互作用研究ユニット ユニット長

研究者番号：40343991

研究成果の概要 (和文)：

昆虫類に広く感染し宿主昆虫類の性や生殖を操作するウォルバキア細菌とカルディニウム細菌の分布、分類、培養、宿主細胞の遺伝子発現への影響などを解明あるいは確立した。トビイロウンカおよびカイコのマイクロアレイを用いて、2種類の細菌が異なる免疫応答を引き起こすことを明らかにした。カルディニウムの人為培養に初めて成功し、セジロウンカではウォルバキアとカルディニウムがともに細胞質不適合性を引き起こしていることを明らかにした。さらに、ウンカ、ハダニ、ヌカカ各種のカルディニウムの感染調査により、カルディニウムが高い率で感染していることを示し、さらに新たな *Cardinium* 属を提案した。

研究成果の概要 (英文)：

Various aspects of intracellular symbionts, *Wolbachia* and *Cardinium*, were studied, with special reference to distribution among arthropods, cultivation in insect cell lines, gene expression profile of host cells, and classification of *Cardinium*. Cytoplasmic incompatibility was caused independently by *Wolbachia* and *Cardinium* in white-backed planthopper, *Sogatella furcifera*. The bacteria of the planthopper were successfully cultivated in insect cell lines. Immune response of host cells against bacteria was examined using microarrays. *Cardinium* induced immune response in the host cells whereas *Wolbachia* did not. Infection of *Cardinium* was surveyed in planthoppers, spider mites, and biting midges, which resulted in reclassification of the order *Cardinium*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2008年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2009年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2010年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

研究分野：応用昆虫学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：昆虫・共生微生物・ウォルバキア・細胞質不適合性・マイクロアレイ

## 1. 研究開始当初の背景

昆虫の細胞内には細菌が共生しており、細

菌の中でもウォルバキア (*Wolbachia*) やカルディニウム (*Cardinium*) は、宿主の性や

生殖に影響を及ぼし、昆虫の生活史や進化に深く関わっていることが知られている。ウォルバキアは、 $\alpha$ -プロテオバクテリア綱に、カルディニウムは、バクテロイデス綱に属し、昆虫を中心とする節足動物に広く感染している。これらの細胞内共生細菌は、宿主動物にとって必須ではなく非感染の個体も見受けられるが、感染した昆虫やダニにおいて細胞質不和合性、単為生殖、雌性化、雄殺しなどを引き起こす。

これまで、宿主昆虫とウォルバキアとの進化的・生態的側面に関する研究が多く行われてきているが、細菌が宿主の生殖に関わる分子機構は全く不明で、その機構解明が注目されている。細菌による宿主生殖操作の機構解明は、生物学の基礎的な分野だけでなく、応用的にも幅広い展開が期待できる。そのため、ウォルバキアのゲノム全配列（キロシヨウジョウバエ感染系統ならびにフィラリア線虫 (*Brugia malayi*) 感染系統）(Wu et al. 2004 PLoS Biol; Foster et al. 2005 PLoS Biol) が解読され、ウォルバキアに特徴的に見られる遺伝子について研究が進められているが、機構解明の糸口はまだ見つからない。これまでの遺伝子研究は、ウォルバキアのゲノムに焦点を合わせたものであり、ウォルバキアのゲノム解読だけではこれらの機構を解明することは難しいと考えられる。近年、昆虫のゲノム解読も進んでおり、昆虫側からの新しいアプローチも可能になってきている。

一方、カルディニウムは、10年前に発見された細菌で (Weeks et al. 2001 Science; Zchori-Fein et al. 2001, PNAS)、ウォルバキアに比べて知見に乏しい。カルディニウムについても広範な研究が求められており、ウォルバキアとカルディニウムの比較により、新たな研究展開の糸口が見つかることが期待されている。

本研究では、これまでの研究蓄積をもとに、マイクロアレイ等を用いて、独自にウォルバキアと宿主細胞との相互作用を解明しようとした。報告者の研究室では、ウォルバキアとカルディニウムを昆虫培養細胞の中で維持培養することに成功しており、この培養系を利用することにより、これまでになく展開が期待できる。細胞質不和合性の機構に係わる因子が見つければ、昆虫の発生や生殖の制御にも寄与する知見を得ることができる。

## 2. 研究の目的

本研究は、宿主の性や生殖を操る細菌の生殖操作機構の分子的解明を目指す。培養に成功しているヒメトビウカにウォルバキアを対象として、ウォルバキア感染によって影響を受ける宿主の遺伝子や細胞質不和合性

に関する遺伝子を探索し、その遺伝子機能を明らかにする。これによって、ウォルバキアの細胞質不和合性の機構解明の糸口を探し出す。また、カルディニウム細菌については、ウォルバキアに比べて研究の日の浅いので、基盤的な情報を取得するとともに、ウォルバキアとの比較を行い、生殖操作機構の解明に利用する。

## 3. 研究の方法

(1) ウォルバキア感染トビロウカを用いたウカマイクロアレイ解析

ヒメトビウカでは細胞質不和合性が非常に強く発現するので、ヒメトビウカを用いてきた。しかし、報告者の研究室で、トビロウカの発現遺伝子配列解析とマイクロアレイ作製が進んでいるので (Noda et al. 2008 BMC Genomics)、トビロウカを対象とすることにした。ベトナムで採集されたトビロウカにウォルバキアが感染していたので、羽化後2日の精巣を解剖により取り出し、全RNAを抽出後、アジレント

(Agilent) 社のプロトコルに沿って、マイクロアレイ解析を行った。ウォルバキア感染が宿主に与える影響を、遺伝子発現プロファイルから明らかにしようとした。

さらに、国内で採集したトビロウカにはウォルバキアが感染していないので、ヒメトビウカのウォルバキアを接種したトビロウカを作製した。そのトビロウカでは、羽化後2日と4日の精巣をマイクロアレイ実験に供試し、感染個体と非感染個体とで発現している遺伝子を比較した。トビロウカへのウォルバキアの接種は、ヒメトビウカのウォルバキアをヒトスジシマカ培養細胞 (AeA12) に接種して、細胞内で増やしてから、トビロウカに注射した。数世代維持して、感染を確認した個体を実験に用いた。

(2) カイコ培養細胞を用いたウォルバキアとカルディニウムの培養系でのマイクロアレイ解析

ヒメトビウカのウォルバキアとマダニのカルディニウムをカイコ細胞 (aff3) で培養し (28°C)、非感染細胞と感染細胞を1:1で混合後、1日後と3日後にRNAを抽出した。感染細胞と非感染細胞をDye-swap法でそれぞれ2回ずつ2反復し、発現量が有意に異なる遺伝子を、ウォルバキアとカルディニウムのそれぞれについて調べた。

(3) セジロウカの細胞質不和合性

セジロウカは細胞質不和合性を示すことが明らかになっているが、この種にはウォルバキアとカルディニウムの両細菌が感染

していた（2重感染系統）。細胞質不和合性にウォルバキアとカルディニウムがどのように関わるかを調べるために、細菌単独感染系統と非感染系統を作製した。テトラサイクリンを与えて、カルディニウム単独系統と非感染系統を作り出すことができたが、各種抗生物質や熱処理などを行っても、ウォルバキア単独感染系統は作製できなかった。そこで、2重感染系統、カルディニウム感染系統、非感染系統のそれぞれの雌雄間でかけ合わせを行い、イネ芽だしに産卵させて、卵の発育を調査することによって、細胞質不和合性の現れ方を調べた。

#### (4) カルディニウムの培養

上記のセジロウンカの2重感染系統とカルディニウム単独感染系統を用いて、雌成虫の虫体を殺菌後、卵巣を解剖で取り出し、蚊の細胞（AeA12）に接種した。2～3ヶ月細胞を植え次ぎ、細菌の増殖をPCRによって確認した。

#### (5) カルディニウムのゲノム解析

カルディニウムのゲノム配列を決定するために、培養しているマダニのカルディニウムを対象に、サンプルを調製した。大型フラスコで大量に培養し、percollを用いた超高速遠心分離によりカルディニウムのフラクション部分を回収し、DNAを抽出した。

インサートサイズが2 Kbと5 Kbのショットガンライブラリーを作製し、各クローンの両端配列をサンガー法で解読した。また、次世代シーケンサー（Roche454とIllumina GAII）でも解読し、全体の配列からコンティグを作製した。目的の遺伝子の探索には、in houseでblastを利用した。

#### (6) カルディニウムの分布とその分類

国内で採集したハダニ22種30系統、ウンカ57種、ヌカカ25種についてカルディニウムとウォルバキアの感染をPCRによって調べた。また、東南アジアのセジロウンカ26個体群についても同様に調査した。また、いくつかのカルディニウムの16S rRNA遺伝子並びにジャイレース（*gyr*）遺伝子の配列を解読し、系統樹を作製した。

### 4. 研究成果

#### (1) ウォルバキア感染トビロウンカを用いたウンカマイクロアレイ解析

細胞質不和合性は、ウォルバキアに感染した雄が非感染の雌と交尾したときに、産下された卵が発育しない現象であり、そのほかの感染と非感染との組み合わせでは正常に胚子発育が起こる。これまでに、トビロウンカのEST解析を行ってきており、トビロ

ウンカのマイクロアレイ（Agilent 22K）を用いて、ウォルバキア感染と非感染とでウンカの発現する遺伝子に違いがあるかどうかを調べた。日本国内で採集されたトビロウンカからはウォルバキア感染が認められなかったため、ウォルバキアに感染していたベトナム産のトビロウンカを用いた。不和合性は雄の精巣で精子に何らかの修飾が施されるためと考えられるので、精巣で発現する遺伝子をトビロウンカマイクロアレイで、感染個体と非感染個体とで比較した。しかし、感染と非感染とで再現性よく異なって発現する遺伝子を見つけることはできなかった。これらのトビロウンカでは、細胞質不和合性のレベルが低いのが原因で、ウォルバキア感染によって影響される候補遺伝子を見つけ出すことができない可能性も考えられた。

そこで、細胞質不和合性が強く表れるヒメトビウンカのウォルバキアをトビロウンカに接種した系統を用いて、同様の実験を行った。ヒメトビウンカのウォルバキアを獲得したトビロウンカは、本来の宿主であるヒメトビウンカの中にいる時ほどには不和合性のレベルや感染率は高くなかった。しかし、確実に感染している雄個体は非感染雌に不和合を引き起こした（Kawai et al. 2009 *Environ Entomol*）。感染精巣と非感染精巣で発現する遺伝子をトビロウンカマイクロアレイで比較した。その結果、いくつかの遺伝子で差が認められたが、そのレベルは高くなく、感染によって発現変化が引き起こされているかどうかさらに追求が必要と考えられた。

#### (2) カイコ培養細胞を用いたウォルバキアとカルディニウムの培養系でのマイクロアレイ解析

ウンカ個体を用いた研究では、感染と非感染とで顕著に発現の異なる遺伝子を見つけることはできなかった。これは、個体（精巣）を用いているので、わずかな変化を捉えられなかったか、あるいはトビロウンカのマイクロアレイには十分多数の遺伝子が搭載されていないことも原因と考えられた。そこで、より多くの遺伝子が搭載されているカイコのマイクロアレイ（Agilent 22K）を用い、カイコ培養細胞（aff3細胞）内で増殖させたヒメトビウンカのウォルバキアを対象とした。感染細胞と非感染細胞とで細胞の遺伝子発現を比較した。マダニから分離されたカルディニウムも維持していたので、同じ条件で同様の実験をカルディニウムに関しても行った。

ウォルバキア感染によって、細胞での発現遺伝子はほとんど影響を受けず、カラーゲン遺伝子などの発現量がわずかに低下した。これは、感染によって細胞の接着性が低下する

ことなどに関連している可能性が考えられた。発現量の上昇した遺伝子は見つからず、ウォルバキアの感染は、細胞の遺伝子発現に大きな影響を与えなかった。一方、カルディニウムでは、免疫系関連の遺伝子の発現が高まっており、カルディニウムの感染によりカイコ細胞の免疫系が誘導された (図1)。

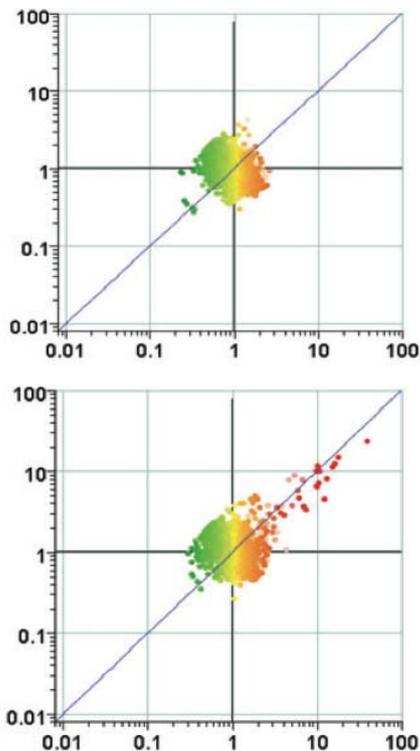


図1. ウォルバキア (上) とカルディニウム (下) に感染したカイコ細胞での遺伝子の発現 (3日培養、縦軸と横軸はそれぞれ色素交換をしたときの非感染に対する発現量の倍数、カルディニウムにおいて赤いスポットで示された免疫関連遺伝子が高発現している)

細胞内に共生する2種類の細菌間で、宿主の免疫系に対する反応性が大きく異なることが明らかとなり、この原因として細菌の細胞壁構造の違いが考えられた。そこで、ウォルバキアに関しては公開されているゲノム配列情報から、カルディニウムに関しては独自の解析結果 (後述) から、両者のゲノムデータを比較した。ウォルバキアではリポポリサッカライドを合成できず、ペプチドグリカン層も通常のグラム陰性菌とは異なると推定できた。カルディニウムは、これらの細胞壁の成分を正常に合成できると推察できた (Nakamura et al. 2011 *Insect Mol Biol*)。このように、細菌の感染による宿主免疫系の遺伝子の反応を明らかにできたが、細胞質不和合性に関わる遺伝子の候補を特定するには至らなかった。

### (3) セジロウンカの細胞質不和合性

セジロウンカでは、ウォルバキアによって細胞質不和合性が引き起こされる (Noda et al. 2001 *Insect Biochem Mol Biol*)。しかし、本研究において、セジロウンカはウォルバキアだけでなく、カルディニウムにも感染していることが判明した (図2)。

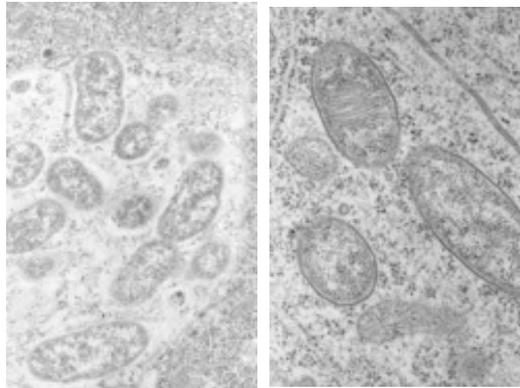


図2. セジロウンカに感染するウォルバキア (左) とカルディニウム (右) (カルディニウムには特徴的な棒状の膜構造が見える)

そこで、セジロウンカの細胞質不和合性について、再検討した。二つの細菌がどのようにセジロウンカの不和合性に関わっているのかを明らかにするために、2重感染個体から単感染系統と非感染系統を作り出した。テトラサイクリン処理により、カルディニウム単感染系統と非感染系統を作ることができたが、ウォルバキア単感染系統を作り出すことは難しかった。そこで、2重感染系統、カルディニウム感染系統、非感染系統間でかけ合わせを行い、胚子の発育を調査することによって、不和合性が起こるか否かを調べた。

その結果、カルディニウムが細胞質不和合性を起こすことが明らかとなり、倍数-倍数性の性決定機構を有する昆虫において、カルディニウムが細胞質不和合性を起こすことが初めて示された。また、2重感染系統とカルディニウム感染系統との不和合性の程度を比較すると、ウォルバキア感染も不和合性に関わっていると推定された。ウォルバキアとカルディニウムの不和合性は互いに独立であると考えられた。ウンカ類では2重感染している種が多く、2種の不和合性が絡み合っている可能性が考えられる。

### (4) カルディニウムの培養

これまでに、培養できているカルディニウムは、マダニから偶然培養されたカルディニウム1種類だけで (Kurtti et al. 1996 *J Invertebr Pathol*)、意図的に行ったカルディニウムの培養では成功例がない。そこで、上記のセジロウンカの2重感染系統とカルデ

イニウム単独感染系統を用いて、カルディニウムの培養を試みた。その結果、ウォルバキアとカルディニウムの2重感染細胞、カルディニウム感染細胞、ウォルバキア感染細胞の三つを得ることができた。カルディニウムは培養しにくいので、2重感染ウンカを出発材料としたカルチャーの中から、ウォルバキア単独感染の培養細胞が得られた。カルディニウムの培養の成功は、初めてのことであり、また2重感染している種からそれぞれの細菌が培養できたことも、細菌の機能を解析する上で有用である。

#### (5) カルディニウムのゲノム解析

マダニのカルディニウムからゲノムDNAを精製し、サンガー法並びに次世代シーケンサーで配列決定を行った。数十のコンティグに収束しており、現在さらに配列決定を行っている。免疫応答を引き起こす細胞壁構造を明らかにするために、リポポリサッカライドやペプチドグリカン合成に関わる遺伝子などを探索したところ、ほぼ必要な遺伝子を有しており、これらの構造が正常に作られていることが推測できた。上記のマイクロアレイの実験で、カルディニウムが宿主の免疫応答を引き起こしていたのは、通常のグラム陰性菌に近い細胞壁構造が宿主に認識されて、免疫反応を引き起こされたと考えられる。

#### (6) カルディニウムの分布とその分類

ウォルバキアは、多くの節足動物に広く感染しており、昆虫種の半分以上の種に感染がみられると推定されている。一方、カルディニウムも多くの節足動物に感染しているが、これまで寄生蜂やダニから感染種が多く見つかっている。そこで、ウンカ類とハダニ類において感染状況を調査した。ウンカ 57 種のうち 27 種から (47.4%) 感染が見つかり、ハダニでは 22 種うち 9 種 (40.9%) が感染していた。ウンカとハダニは、ともにカルディニウムの感染がもっとも広がっている生物群といえる。また、ウォルバキアの感染率も高く、ウンカではカルディニウムとウォルバキアの2重感染率が有意に高い ( $P < 0.05$ ) ことが認められた (Nakamura et al. 2009 Appl Environ Microbiol)。

また、ヌカカ類についても、カルディニウムの感染を調べた。ヌカカに感染していたカルディニウムの 16S rRNA 遺伝子の配列は、これまでに見つけてきているカルディニウムの配列とは6%程度異なっており、系統的にも、別のグループに属した。ジャイレース遺伝子による系統解析でも同様の結果を示し、最近報告された新属 *Paenicardinium* と異なるグループに属した。昆虫の共生細菌は、宿主とともに進化してきたため、16S rRNA 遺伝子の配列が 8-10% くらい異なっても、一

種類の細菌と見なされているところから、*Paenicardinium* 属を含めて、これまでの昆虫やダニから見つかったカルディニウム、ヌカカのカルディニウムを一つの *Cardinium* 属にするように提唱した (図3)。

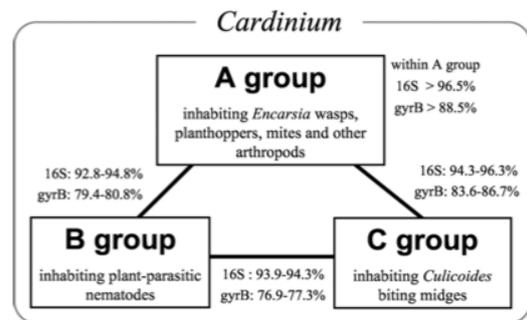


図3. カルディニウム属内の3グループ

これまで見つけているカルディニウムを A-group, *Paenicardinium* 属を B-group, ヌカカのカルディニウムを C-group とした。

本研究では、ウォルバキアの細胞質不和性に関わる分子を特定することはできなかったものの、細胞内共生細菌の培養を成功させ、細菌の大量調製法の確立ならびに培養細菌を用いたマイクロアレイ実験など、当該分野における重要な手法を確立した。また、ウォルバキアと並んで性や生殖を操る重要な細菌であるカルディニウムの分布状況、分類についての知見を報告し、カルディニウム研究の基礎を築くと同時に、ウォルバキアとの比較研究に途を開いた。

#### 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 11 件)

- ① Nakamura Y, Gotoh T, Imanishi S, Mita K, Kurtti TJ and Noda H (2011) Differentially expressed genes in silkworm cell cultures in response to infection by *Wolbachia* and *Cardinium* endosymbionts. Insect Mol. Biol. 査読有 in press
- ② Kawai S, Matsumoto Y, Gotoh T and Noda H (2009) Transinfection of *Wolbachia* in Planthoppers: Nymphal injection of cultured *Wolbachia* and infection dynamics. Environ. Entomol. 査読有 38:1626-1633.
- ③ Nakamura Y, Kawai S, Yukuhiro F, Ito S, Gotoh T, Kisimoto R, Yanase T, Matsumoto Y, Kageyama D and Noda H (2009) Prevalence of *Cardinium* in planthoppers and spider mites and taxonomic revision of

“*Candidatus Cardinium hertigii*” based on detection of a new *Cardinium* group from biting midges. Appl. Environ. Microbiol. 査読有 75:6757-6763.

- ④ Noda H, Kawai S, Koizumi Y, Matsui K, Zhang Q, Furukawa S, Shimomura M and Mita K (2008) Annotated ESTs from various tissues of the brown planthopper *Nilaparvata lugens*: a genomic resource for studying agricultural pests. BMC Genomics 査読有 9:117.

[学会発表] (計 32 件)

- ① 野田博明 (2011) 共生細菌のゲノム研究 : この 10 年の歩みと今後の展開. 第 55 回日本応用動物昆虫学会、2011 年 3 月 27-29 日、九州大学
- ② 中村有希・野田博明 (2010) 細胞内共生細菌 *Cardinium* および *Wolbachia* と宿主昆虫との相互作用. 第 54 回日本応用動物昆虫学会、2010 年 3 月 26-28 日、千葉大学
- ③ 野田博明 (2010) ゲノム研究からみた応用動物昆虫学研究. 第 54 回日本応用動物昆虫学会、2010 年 3 月 26-28 日、千葉大学
- ④ 中村有希・後藤哲雄・T. J. Kurtti・今西重雄・三田和英・野田博明 (2008) 細胞内共生細菌 *Wolbachia* ならびに *Cardinium* と宿主の免疫応答との関係. 第 52 回日本応用動物昆虫学会、2008 年 3 月 26-28 日、宇都宮大学

[図書] (計 4 件)

- ① Noda, H (2009) How planthopper genomics can be useful for planthopper management? In "Planthoppers - new threats to the sustainability of intensive rice production systems in Asia" K.L. Heong and B. Hardy eds. IRRI, Los Baños (Philippines), pp 429-446.
- ② 野田博明 他共同執筆 (2008) 昆虫と微生物. 「微生物の事典」 朝倉書店 (分担執筆) p. 257-302.

[その他]

[http://www.nias.affrc.go.jp/renkei\\_daigakuin2/i\\_index.html](http://www.nias.affrc.go.jp/renkei_daigakuin2/i_index.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

野田 博明 (NODA HIROAKI)  
農業生物資源研究所・昆虫科学研究領域・  
ユニット長  
研究者番号 : 40343991