

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 7日現在

機関番号： 32508
 研究種目： 基盤研究（C）
 研究期間： 2010～2012
 課題番号： 22570216
 研究課題名（和文） 昆虫が水平転移により共生細菌から獲得した遺伝子群の進化と機能
 研究課題名（英文） Molecular evolution and function of laterally transferred genes
 from symbiotic bacteria to host insects
 研究代表者
 二河 成男（NIKOH NARUO）
 放送大学・教養学部・准教授
 研究者番号： 70364916

研究成果の概要（和文）：共生細菌であるボルバキアより水平転移により多数の遺伝子を獲得しているアズキゾウムシについて、その転移した遺伝子の塩基配列を決定し、既知のものを含めて160もの転移遺伝子があることを突き止めた。これらの塩基配列について、比較解析を行うために、実体のあるボルバキアの遺伝子の中でもこのアズキゾウムシが獲得した転移遺伝子と最も類似しているボルバキアをもつ昆虫を同定した。この昆虫の持つ実体のあるボルバキアについて、アズキゾウムシ転移遺伝子のホモログ遺伝子の塩基配列を決定し、比較解析を行いつつある。また、種々のアブラムシについても、転移遺伝子の塩基配列の決定を進めた。

研究成果の概要（英文）： We sequenced genomic regions of Adzuki bean beetle, including laterally transferred genes acquired from their symbiotic *Wolbachia* and have found 160 transferred genes were inserted in the insect genomes. For comparative analysis, we identified real *Wolbachia* that have most closely related genome to the transferred genes and are sequencing the gene homologs of the transferred genes to Adzuki bean beetle.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：分子進化、遺伝子進化、比較ゲノム、機能進化

1. 研究開始当初の背景

原核生物のみならず、真核生物でも様々な生物種でゲノム解析が行われた結果、これまでの安定的、固定的なものであった生物の遺伝情報の進化の様相に対するイメージは、変更を余儀なくされた。それは、塩基置換や重複といった自身のゲノムが持つ既存の材料を用いるだけでなく、種の障壁を越えた水平

転移（あるいは水平移動）による新規遺伝子の獲得によって、生物の持つ遺伝情報は進化しているということである。生物の遺伝情報の進化は、突然変異とその集団への浸透、そして固定という過程を経る。遺伝子の水平転移による進化も同様であり、異なる種の遺伝情報がある個体の生殖細胞のDNAに取り込まれ、それが遺伝的浮動や自然選択によって

集団中に広まる。このような過程を経て集団中に固定した結果を、私たちは観察している。共生細菌ボルバキアからアズキゾウムシへの遺伝子水平転移に関しては、すでに、どのような遺伝子の水平転移が起こったかという、実際におこった現象は明らかになっている。

しかし、現象の把握だけでは理解が部十分であり、その過程がどのようなものであるかを知ることが必要である。つまり、生物進化あるいはゲノム進化において、遺伝子の水平転移が果たす役割を理解するためには、どのように遺伝子の水平転移が起こり、そして、水平転移した遺伝情報が、どのような進化の変遷を経て、私たちが目にする現在の形に到ったのかという、進化の過程を解明する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、以上のような視点に立ち、類似の生物群から水平転移により獲得した遺伝情報が、どのような分子進化の変遷を経て、現在の形に到ったかを明らかにする。そして、遺伝子の水平転移が、どのようにして生物の遺伝情報の進化に寄与してきたかを示す。そのために、本研究では2つの異なる進化の道筋をたどってきた水平転移に由来する転移遺伝子の分子レベルの進化を比較する。具体的には、①転移した生物種内で集団中に広まっているが、タンパク質をコードする読み枠が壊れ、転写もされていない、偽遺伝子となった転移遺伝子、②転移した生物種においても、発現し、機能的制約が働いている転移遺伝子という、現在は進化的に異なる力が働いている2つの水平転移について、定量的に分子進化の様式と、機能レベルの進化の様式を明らかにする。これら2つの比較は、ゲノム中に積極的に保持される遺伝情報と、現在は積極的に保持されていない中立な遺伝情報を比較することになり、進化の本質を見ているものとなる。進化においては、積極的に集団中から排除される変異もあるが、本研究では、進化において重要な上記2つに絞って研究を行う。

3. 研究の方法

アズキゾウムシが獲得した転移遺伝子の全容を明らかにするために、既知の水平転移遺伝子をプローブとして、コスミドライブラリーからスクリーニングを行い、水平転移遺伝子断片を含むゲノムの塩基配列を決定する。

転移後にどのような塩基の変異が蓄積したかを知るために、実体のあるボルバキアの

中で、転移遺伝子と最もよく似た塩基配列を持つボルバキアを探し出す。そのボルバキアについて、アズキゾウムシに転移したボルバキア由来遺伝子のホモログの塩基配列を決定する。

これらの塩基配列を比較することにより、転移遺伝子にどのような変異が蓄積するかを調べる。また、アズキゾウムシだけでなく、マツノマダラカミキリのゲノムに挿入されているボルバキア由来の転移遺伝子のよう、転移後の変異の蓄積量が異なる転移遺伝子も加えて、比較する。

エンドウヒゲナガアブラムシでは、細菌由来の遺伝子の中に、転写されているものが複数知られている。これらの遺伝子について、そのホモログを他のアブラムシにあるかどうか、特異的なプライマーを用いて、PCRで検出する。また、それらの塩基配列を決定して、細菌由来の転移遺伝子でも、機能を有すると予想される場合は、どのような変異が蓄積しているかを同定する。

偽遺伝子となる転移遺伝子と、何らかの機能を有する転移遺伝子での分子進化のパターンの違いや、機能の違いを明らかにし、その生物学的な意義を考察する。

4. 研究成果

転移後に機能を失った水平転移遺伝子の分子進化

水平転移ゲノム断片の塩基配列の決定

アズキゾウムシが獲得した転移遺伝子の塩基配列の決定を試みている。すでに、共生細菌ボルバキアの特異的なプライマーを用いたPCRと、特異的なプローブによるゲノムサザン解析により、ボルバキアからアズキゾウムシゲノムに転移した遺伝子群の全容は明らかになっている。それらをプローブとして、アズキゾウムシゲノム DNA 由来のコスミドライブラリーのスクリーニングを行っており、現在、異なる転移遺伝子断片を含むゲノム領域をカバーする、14のコスミドクローンを得ている。現在、これらの塩基配列決定を進めており、合計500kb程度の塩基配列の決定を終了している。まだ合計で40程度のcontigにわかれているが、scaffoldは予想できているので今後ギャップを埋める予定である。

また、これらのコスミドクローンや既知の転移遺伝子が、ゲノム上でどのように並んでいるかを知るために、下記の転移遺伝子に近縁な配列を持つ実体のあるボルバキアの遺伝子の並びを用いて、特異的なロングPCRにより確認した。160の遺伝子を、3つの大き

な転移断片にまでまとめることができ、その遺伝子の並びが推定できた。各々の転移断片には、23, 89, 46 個の転移遺伝子がコードされていると予想された。これら3つの断片、及び残り2つの転移遺伝子のゲノム上の位置関係については、まだ同定できていない。今後は、これらのコスミドクローンには見られない転移遺伝子についてもその塩基配列の決定を行う。

比較対象となる実体のあるボルバキアの塩基配列決定

データベース中のボルバキアの遺伝子をアズキゾウムシの転移遺伝子と比較することにより、いくつかの昆虫に共生するボルバキアが、転移遺伝子と塩基配列がよく似ていることが分かった。その中で、アリの共生ボルバキアの塩基配列が類似しているため、その塩基配列の決定を行った。現在、部分的な断片ではあるが、68の遺伝子についてその塩基配列を部分的に決定した。この配列が、現在もボルバキアの遺伝子であるため、偽遺伝子化は起こっていない。

マツノマダラカミキリゲノムの水平転移ゲノム断片の塩基配列の決定

マツノマダラカミキリのゲノムに水平転移したボルバキア由来の遺伝子について同定を進めた。214の共生細菌ボルバキアゲノムの遺伝子について作成した特異的なプライマー対を用いて、PCR法による検出を行った結果、34で増幅が見られている。これらについて種内での転移遺伝子の分子進化を明らかにすべく、まずは転移遺伝子の有無の地域差を調べた。34の遺伝子についてPCR法による検出を試みた。34の内26については、いずれの個体からも増幅が見られ、転移遺伝子群が本州、南西諸島の個体群に固定していることが分かった。一方、残りの8の転移遺伝子については、地域個体群間あるいは地域個体群内で検出の有無の差が生じた。これらについては、新たに転移遺伝子に対する特異的なプライマーも作成したが、やはり、検出の有無が生じたため、PCRエラーなどではなく、実際に違いがあることが分かった。今後は塩基配列レベルでの変異の詳細を調べる予定である。

転移後も機能を保持する遺伝子の分子進化

様々なアブラムシのサンプリングを行った。現在、7亜科36種採取できた。これらのゲノムDNAを抽出し、4つの水平転移由来の遺伝子に対するプライマーを用いて、遺伝子の増幅を試みた。Lys遺伝子は、6亜科から増幅が見られたが、残りの3つの遺伝子では、

プライマーをデザインした亜科 Aphididae に属する種以外からは増幅産物が得られなかった。得られた産物については塩基配列を行った。これらの新たに取得した塩基配列から、より特異的かつ異なる種からの増幅が可能なプライマーのデザインを行い、残りの4つの遺伝子について、異なる亜科に属するアブラムシゲノムからの増幅を再度試みる

考察

転移後に機能を喪失したタイプの転移遺伝子については、データが蓄積しつつある。転移遺伝子は、昆虫の核ゲノムにあるので、前後にレトロポゾンが多数存在し、転移遺伝子の配列をピンポイントで決めることが難しく、予想以上に時間がかかった。塩基配列の決定はおおよそ終了したので、今後は解析と論文化を目指す。転移後も機能を保持する遺伝子の分子進化については、部分的な情報のみしか得られていない。Lys遺伝子は、転移遺伝子の中でも、転写に局在性が見られず、他の共生細菌を収容する細胞である菌細胞特異的に転写が行われている RlpA, AmiD, LdcA についての解析を目指していたので、これらの遺伝子の中でアブラムシ全般に保存している遺伝子の探索を行う必要がある。

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 5 件)

1. 二河成男 (2013) 昆虫必須共生細菌の比較ゲノム解析 生物の科学 遺伝 (印刷中)
2. 二河成男、細川貴弘、森山実、大島健志朗、服部正平、深津武馬 (2012) 比較ゲノムから探る昆虫共生細菌が宿主へ付与する生物機能 日本マイコプラズマ学会雑誌 39:14-16
3. 二河成男 (2011) ヒトと常在菌の間で遺伝子の交流は起こり得るか 科学 81: 244-245
4. Nikoh N, McCutcheon J, Kudo T, Miyagishima S, Moran NA, Nakabachi A. (2010) Bacterial Genes in the Aphid Genome: Absence of Functional Gene Transfer from *Buchnera* to Its Host. *PLoS Genetics* 6(2): e1000827
5. The International Aphid Genomics Consortium (including Nikoh N as an author) (2010) Genome sequence of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *PLoS Biology* 8 (2): e1000313

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 二河成男, 細川貴弘, 森山実, 大島健志朗, 服部正平, 深津武馬 相利共生ボルバキアの進化に寄与した遺伝子水平転移 新学術領域研究「複合適応形質進化の遺伝子基盤解明」(東京) 平成 24 年度 公開シンポジウム 2012 年 9 月 26 日 [ポスター]
2. 二河成男 昆虫と細菌の共生系に生じる遺伝子の水平転移の役割 微生物研究会 (東京) 2012 年 9 月 22 日 [シンポジウム招待講演]
3. Nikoh N, Hosokawa T, Oshima K, Hattori M, Fukatsu T (2012) *Wolbachia* genes acquired through lateral gene transfer contribute to feeding habit of the host bedbug. 24th International Congress of Entomology (Daegu, Korea) August 22 2012 [Oral]
4. Nikoh N, Hosokawa T, Oshima K, Hattori M, Fukatsu T (2012) Lateral gene transfer and evolution of *Wolbachia*-insect nutritional mutualism. 7th International Symbiosis Society Congress (Krakow, Poland) July 23 2012 [Oral]
5. Anbutsu H, Nikoh N, Tanaka K, Fukatsu T (2012) Comparative genomic analysis of bacteriophages associated with male-killing and non-male-killing spiroplasmas in *Drosophila* 7th International *Wolbachia* conference (St Pierre d'Oléron, France) June 8 2012
6. 二河成男 比較ゲノムから探る昆虫共生細菌が宿主へ付与する生物機能 日本マイコプラズマ学会 (盛岡) 2012 年 5 月 24 日 [シンポジウム招待講演]
7. 二河成男, 安佛尚志, 細川貴弘, 古賀隆一, 孟憲英, 大島健志朗, 服部正平, 深津武馬 ゴウムシ類の細胞内共生細菌ナルドネラの極小ゲノムの全塩基配列決定と比較ゲノム解析 日本進化学会 (京都), 2011 年 7 月 31 日
8. 中鉢 淳, マカチョン ジョン, 工藤 俊章, 宮城島 進也, モラーン ナンシー, 二河 成男 アブラムシは、かつて別の細菌から獲得した遺伝子で必須共生細菌を制御する 日本動物学会 (東京) 2010 年 8 月 3 日
9. 相川拓也, 安佛尚志, 二河成男, 菊地泰生, 柴田洋, 深津武馬 マツノマダラカミキリから検出される共生細菌ボルバキアの遺伝子の正体 日本森林学会 (つくば) 2010 年 4 月 4 日

〔図書〕(計 1 件)

1. 二河成男(2012) 遺伝子の水平移動 「進化学事典」(日本進化学会 編) 533-541 共立出版
6. 研究組織
(1)研究代表者
二河 成男 (NIKOH NARUO)
放送大学・教養学部・准教授
研究者番号: 70364916