

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K14903

研究課題名（和文）チョウ目昆虫におけるウイルス性オス殺しの分子機構解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of viral male-killing in a lepidopteran insect

研究代表者

長峯 啓佑（Nagamine, Keisuke）

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・研究員

研究者番号：20817548

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：昆虫ではオス宿主を特異的に死亡させる“オス殺し”を起こす共生ウイルスが報告されている。ハスモンヨトウに共生するオス殺しウイルス（SIMKV）はゲノムに僅か7つの遺伝子のみを持つことが明らかになった。そこで本研究では、遺伝子組換えカイコを利用した解析、および卵巣移行性組換えタンパク質を利用した解析によりオス殺し遺伝子の特定を試みたが、いずれの手法でも特定には至らなかった。今後オス殺し遺伝子を特定するには、複数の遺伝子が機能してオス殺しを起こす可能性や、タンパク質ではなくウイルスRNAがオス殺しを引き起こす可能性などを考慮して解析を進める必要があるだろう。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昆虫では、様々な共生細菌が引き起こすオス殺しが報告されてきたが、近年になってウイルスによるオス殺しが立て続けに発見された。しかしながら、オス殺し遺伝子が特定されたウイルスはショウジョウバエに共生するDbMKPV1のみである。SIMKVはDbMKPV1のオス殺し遺伝子を持たないことから、独自のオス殺し遺伝子を獲得したと考えられる。ウイルスが持つ多様なオス殺しの分子機構を解明し、比較することが、オス殺しを獲得した進化的経緯や生態的な意義の解明につながると期待している。

研究成果の概要（英文）：In insects, symbiotic viruses have been reported to cause 'male-killing' by specifically killing the male host. Genome analysis of the male-killing virus (SIMKV) symbiotic with a spodopteran moth revealed that SIMKV has only seven genes. In this study, we attempted to identify the male-killing gene by functional analysis using recombinant silkworms and overy-translocating recombinant proteins. Nevertheless, despite these efforts, the male-killing gene could not be identified using either method. Future attempts to identify the male-killing gene will need to take into account the possibility of multiple genes functioning to cause male-killing and the possibility that viral RNA, rather than protein, causes male-killing.

研究分野：進化学、昆虫生理学

キーワード：オス殺し 昆虫 共生 微生物 ウイルス 性操作 生殖操作 性比異常

## 1. 研究開始当初の背景

昆虫では、母から子へ伝播する細胞内共生微生物が宿主のオスを特異的に死亡させる“オス殺し”が多数報告されている。そのほとんどは細菌により引き起こされるものであり、ウイルスによるオス殺しの報告例は、申請時にはチャハマキ(チョウ目)で見つかった Osugoroshi virus (OGV) だけであった[1]。

申請者は、宮崎県都城市で発見された、子孫がすべてメスになるハスモンヨトウ *Spodoptera litura* (チョウ目) の系統(全メス系統)について調査を進めた。全メス系統では孵化率が半減すること、オスが孵化しないことから、宿主が卵(胚)の段階でオス殺しが生じて全メスになることを明らかにした。サンプル中の RNA を網羅的に解析する手法(RNA-seq 解析)により、全メス系統と正常性比系統の RNA を比較した結果、全メス系統にのみ存在し、単一のウイルスゲノムを構成すると考えられる 5 つの配列(分節)を発見した。これら 5 つの分節ゲノム上には 7 つの遺伝子がコードされており、そのうちの 1 つには RNA ウイルスの複製に必須である RNA dependent RNA polymerase (RdRp) が含まれていた。さらに、接種実験により宿主体内での増殖と母から子への垂直伝播性が確認され、これらの RNA 断片をゲノムとするオス殺しウイルス、*Spodoptera litura* male-killing virus (SIMKV) の存在が示された[2]。

## 2. 研究の目的

本研究では SIMKV が持つオス殺しの原因遺伝子(オス殺し遺伝子)を特定し、さらにその標的となる宿主側の因子を特定することで、オス殺しの分子機構解明を目指した。

## 3. 研究の方法

SIMKV のゲノムには僅か 7 つの遺伝子のみがコードされている。本課題では、SIMKV が持つ 7 つの遺伝子について、大腸菌を用いて発現・精製した組換えタンパク質をハスモンヨトウの胚へ導入する手法、および遺伝子組換えカイコの体内で強制発現させる手法によりオス殺し遺伝子を特定する。さらに、オス殺しの標的となる宿主の標的因子を RNA-seq 解析や培養細胞への接種実験を用いて特定する。

## 4. 研究成果

### (1) 組換えタンパク質を用いたオス殺し遺伝子の特定

初めに、ReMOT 法[3]を参考にして、卵移行ペプチドを付加した組換えタンパク質を胚へ導入する技術の確立を目指した。目的タンパク質の胚への導入を観察するため、蛍光タンパク質(mCherry)に卵移行ペプチドを付加し、ハスモンヨトウのメス成虫に注射したところ、注射後のメス成虫体内の卵巣と、産卵後の胚における蛍光が観察されたことから、卵移行ペプチドによる目的タンパク質の胚への導入が確認された(図1)。

次に、SIMKV がコードする 7 つの遺伝子について、大腸菌を用いた卵移行ペプチドと蛍光タンパク質を付加した組換えタンパク質の発現・精製を試みた。その結果、3 つのウイルスタンパク質は精製できたが、残り 4 つのウイルスタンパク質は精製に至らなかった。精製された 3 つの組換えタンパク質をハスモンヨトウのメス成虫にそれぞれ注射したところ、いずれの場合も次世代の胚に導入されることは確認されたが、その世代でのオス殺しは確認できなかった。これらの結果から、今回精製できなかった 4 つの遺伝子にオス殺し遺伝子が含まれていた可能性がある。

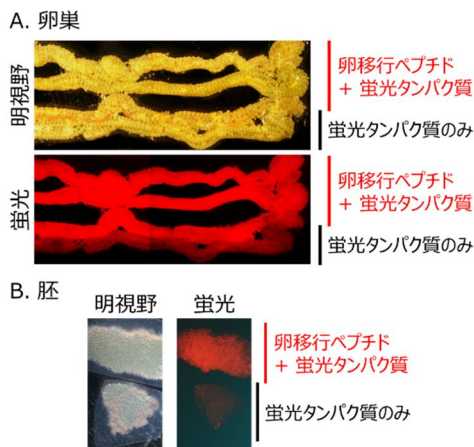


図1. 卵移行ペプチドによるタンパク質の胚への導入  
卵移行ペプチドを付加した蛍光タンパク質をメス成虫に注射  
A. メス成虫体内の卵巣、B. 産卵後の卵

### (2) 遺伝子組換えカイコを用いたオス殺し遺伝子の特定

GAL4/UAS システムを利用したウイルスタンパク質の強制発現カイコを作出し、オス殺し遺伝子の特定を試みた。GAL4 の発現には Actin プロモーターを用いて、全身でウイルスタンパク質を発現させるよう設計した。UAS の下流に 7 つの SIMKV 遺伝子をそれぞれ配置したベクターを作製し、これらを導入した遺伝子組換えカイコを 7 系統作出した。これら 7 つの UAS 系統と GAL 系統とそれぞれ交配して G1 卵を得た。G1 のうち、GAL4/UAS を持つ個体を選抜し、成虫まで飼育したところ、すべての系統でオス成虫が出現し、オス殺しは確認できなかった。さらに、オス殺しが SIMKV 遺伝子の母性効果によることを想定し、GAL4/UAS のメスと非組換えのオスとの交配で得られた G2 卵の孵化率を観察したところ、すべての系統で 100% 近い孵化率となり、

胚でのオス殺しは認められなかった。

これらの結果から、SIMKV のオス殺し遺伝子は本来の宿主ではないカイコでは作用しない可能性、複数の SIMKV タンパク質が複合的に作用してオス殺しを起こす可能性、タンパク質ではなくウイルス RNA がオス殺しを引き起こす可能性などが考えられる。これらの可能性を考慮して今後の研究を進めていく必要がある。

### (3) オス殺しの標的となる宿主因子の探索

通常、SIMKV によるオス殺しは宿主胚の後期ステージで起こるが、SIMKV 非感染の幼虫に感染虫の磨砕液を注射すると蛹後期にオス殺しが観察された。また、宿主であるハスモンヨトウ由来のオスの培養細胞株に SIMKV を接種しても培養細胞は死滅しなかった。これらのことから、オス殺しの標的は胚と蛹に共通して存在する分子機構であり、かつ培養細胞の維持や増殖に影響しない分子機構であることが分かる。

メイガ類にオス殺しを起こす共生細菌 *Wolbachia* は、オス特有の分子機構である「オスへの性決定」と「遺伝子量補償」を誘導する遺伝子を分解することで宿主オスの発生を止め、死に至らしめる[4]。そのため、オスのメイガではオスへの性決定が歪められ、性を決定する遺伝子(性決定遺伝子 *dsx*: 雌雄で異なる塩基配列を持つ)はメス型の塩基配列を示す。そこで、SIMKV も同様の形質を持つかどうかを確認するため、SIMKV に感染したハスモンヨトウにおいて、胚、蛹、培養細胞の *dsx* を調査した(図2)。

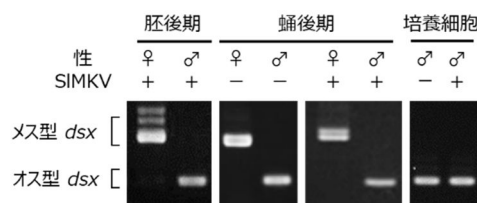


図2. SIMKVは性決定に関与しない

性決定遺伝子の *dsx* はメスとオスでバンドの位置が異なる性がオスに決定していれば *dsx* はオス型を示す。オス殺しが起こる胚後期と蛹後期でも性決定は正常だった。SIMKVを接種した培養細胞でも性決定は正常だった。よって、SIMKVは性決定をかく乱しないと考えられる。

その結果、いずれの場合もオスの *dsx* はオス型を示したことから、SIMKV はオスへの性決定を歪めることはなく、*Wolbachia* とは異なる分子機構を標的としていられる。一方で、SIMKV が遺伝子量補償を歪めている可能性を調査するため、定量 PCR による Z 染色体遺伝子の発現量解析を行ったが、明瞭な遺伝子量補償のかく乱は認められなかった。現在、RNA-seq 解析を用いて、より詳細に遺伝子量補償の検証を行っている。また、SIMKV 感染個体と非感染個体について、RNA-seq 解析により遺伝子発現を比較することで、感染オスでのみ機能する(もしくは機能しない)遺伝子群を探索し、標的因子の推定を行っている。

現在までに、いくつかの共生微生物でオス殺し遺伝子が特定されている。メイガ類の共生細菌 *Wolbachia*、ショウジョウバエの共生細菌 *Spiroplasma*、ヤマカオジロショウジョウバエの共生ウイルス DbMKPV1 からはオス殺し遺伝子である Oscar, Spaid, ORF4 がそれぞれ特定されているが、SIMKV のゲノムにはいずれの相同配列も含まれていなかった[2, 4, 5, 6]。これらのことから、それぞれの共生微生物は進化の過程で独自にオス殺し遺伝子を獲得したことが示唆され、オス殺しの標的因子も異なる可能性がある。共生微生物が持つ多様なオス殺しの分子機構を解明し、比較することで、それぞれの微生物がオス殺しを獲得した進化的経緯や生態的な意義の解明に貢献できると期待している。

### <引用文献>

1. Fujita R. *et al.*: Late Male-Killing Viruses in *Homona magnanima* Identified as Osugoroshi Viruses, Novel Members of *Partitiviridae*, *Front. Microbiol.*, 11, 620623 (2021).
2. Nagamine K. *et al.*: Male-killing virus in a noctuid moth *Spodoptera litura*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 120, e2312124120 (2023).
3. Chaverra-Rodriguez D. *et al.*: Targeted delivery of CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein into arthropod ovaries for heritable germline gene editing, *Nat. Commun.*, 9, 3008 (2018).
4. Katsuma S. *et al.*: A *Wolbachia* factor for male killing in lepidopteran insects, *Nat. Commun.*, 13, 6764 (2022).
5. Harumoto T. *et al.*: Male-killing toxin in a bacterial symbiont of *Drosophila*. *Nature*, 557, 252 - 255 (2018).
6. Kageyama D. *et al.*: A male-killing gene encoded by a symbiotic virus of *Drosophila*, *Nat. Commun.*, 14, 1357 (2023).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kageyama Daisuke, Harumoto Toshiyuki, Nagamine Keisuke, Fujiwara Akiko, Sugimoto Takafumi N., Jouraku Akiya, Tamura Masaru, Katoh Takehiro K., Watada Masayoshi	4. 巻 14
2. 論文標題 A male-killing gene encoded by a symbiotic virus of <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1357
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-023-37145-0	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 Nishide Yudai, Nagamine Keisuke, Kageyama Daisuke, Moriyama Minoru, Futahashi Ryo, Fukatsu Takema	4. 巻 12
2. 論文標題 A new antimicrobial peptide, Pentatomicin, from the stinkbug <i>Plautia stali</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16503
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-20427-w	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 Nagamine Keisuke, Kanno Yoshiaki, Sahara Ken, Fujimoto Toshiaki, Yoshido Atsuo, Ishikawa Yukio, Terao Misato, Kageyama Daisuke, Shintani Yoshinori	4. 巻 120
2. 論文標題 Male-killing virus in a noctuid moth <i>Spodoptera litura</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2312124120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2312124120	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kageyama D, Harumoto T, Fujiwara A, Watada M, Nagamine K, Kanno Y, Shintani Y
2. 発表標題 Male killing induced by maternally inherited viruses in arthropods
3. 学会等名 The 11th Wolbachia conference (国際学会)
4. 発表年 2023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	陰山 大輔  (Kageyama Daisuke)		
研究協力者	小林 功  (Kobayashi Isao)		

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