

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580084

研究課題名(和文) 宿主昆虫 共生細菌間相互作用の分子機構の解明とその利用基盤技術の開発

研究課題名(英文) Exploration of molecular mechanisms underlying the interaction between host insects and symbiotic bacteria and development of basic technology for the application

研究代表者

安佛 尚志 (Anbutsu, Hisashi)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号：30392583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：ショウジョウバエの共生細菌スピロプラズマには宿主の雄を胚発生期に殺すものがある。本研究では、まず、雄殺し2系統、非雄殺し1系統のスピロプラズマに感染しているファージの全ゲノム配列を決定した。解析の結果、近縁のスピロプラズマにおいて病原性因子とされている遺伝子群が見つかった。次にファージの動態を調べたところ、ファージ系統によって異なる挙動を示すことがわかった。さらに、ファージ遺伝子の発現量を調べることにより、雄殺し系統で発現量が高い遺伝子を同定した。

研究成果の概要(英文)：Some spiroplasmas cause female-biased sex ratios of their host insects including *Drosophila* fruit flies, as a result of selective death of the male offspring during embryogenesis. In this study, three closely related bacteriophages were isolated from two male-killing spiroplasmas and a non-male-killing one, and their whole genome sequences were determined. Each phage genome included five sequences with similarity to putative virulence genes of closely related spiroplasma. In general, density dynamics of the three phages showed different pattern. The expression levels of a gene were about 10 times higher in adult flies infected with male-killing spiroplasma than in those infected with non-male-killing one.

研究分野：昆虫微生物学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：共生細菌 ショウジョウバエ スピロプラズマ 生殖操作 雄殺し バクテリオファージ

1. 研究開始当初の背景

昆虫の体内に共生(内部共生)している細菌には、宿主に対してユニークな表現型効果を示すものが多い。たとえば、スピロプラズマ(*Spiroplasma*)という共生細菌は、ショウジョウバエやテントウムシなどを宿主とし、胚発生期に雄だけを殺す“雄殺し”という生殖表現型を発現させる。また、ボルバキア(*Wolbachia*)は、双翅目、膜翅目、鱗翅目、鞘翅目、半翅目など広範な昆虫類に対して、細胞質不和合、雌への性転換、単為生殖の誘導、雄殺し等の生殖操作を行う。共生細菌による宿主の生殖操作の分子機構には、その現象の発見以来、国内外の多くの研究者が注目してきたが、具体的なメカニズムは依然として不明である。共生細菌のほとんどは難培養性であり、形質転換等による細菌側からのアプローチが困難であることから、我々は宿主側からのアプローチを可能にするために、キイロショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)をモデル宿主として選んだ。自然界においてキイロショウジョウバエから見つかっている母系伝播する共生細菌はスピロプラズマとボルバキアのみであるが、明瞭な生殖操作表現型(雄殺し)を示すのは前者であることから、ショウジョウバエスピロプラズマ共生系をモデル実験系とし、研究を開始した。この系を用いて、これまでショウジョウバエの遺伝子強制発現による雄殺し救済挿入システムの探索や、感染時の宿主免疫関連遺伝子の発現解析などに取り組み、成果を挙げてきた。これら、宿主側からのアプローチに加え、ネックであった「共生細菌の単離培養」を介さない細菌側からのアプローチとして、スピロプラズマとそのファージのゲノム解析にも取り組んだ。これまでにスピロプラズマ本体については、近縁菌(*Spiroplasma kunkelii*)で報告された遺伝子のほぼ全てに対応する塩基配列が得られている。ファージについては、雄殺しスピロプラズマ2系統と雄を殺さない突然変異系統のファージゲノムのショットガンシーケンスが完了していた。

2. 研究の目的

(1) 共生細菌スピロプラズマとそのファージについて、共生関連遺伝子とその機能を明らかにする。これまでに得られたゲノム情報の解析から、既知の遺伝子との相同性や予測される生物学的機能、スピロプラズマ系統間での違いなどについて明らかにする。特に、雄殺し系統と非雄殺し系統の比較により、雄殺し能力に直接関係する遺伝子の推定をめざす。

(2) カスリショウジョウバエのスピロプラズマは、寄生蜂に対する耐性を宿主に付与することが最近報告されたが、そのメカニズムは明らかになっていない。そこで、宿主免疫系遺伝子の発現解析により、それらの遺伝子

の関与を明らかにする。

(3) 雄殺し救済挿入システムの探索で副次的に得られた、雌成虫の卵巣で強制発現した際に子孫の性比に影響を及ぼす宿主遺伝子について、雄殺しとの相互作用や、遺伝子の機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 相同性検索等のゲノム解析により、雄殺しや共生に関わるスピロプラズマゲノムまたはファージゲノム上の候補遺伝子を推定するとともに、分子系統解析をおこないスピロプラズマファージの進化的起源を明らかにする。また、定量的PCR法や定量的RT-PCR法を使って、ファージの動態解析やファージ遺伝子の発現解析をおこなう。

(2) スピロプラズマに感染したカスリショウジョウバエの体液をキイロショウジョウバエに微細注入することにより、感染システムを作出する。定量的RT-PCR法により、感染システムの抗菌タンパク質遺伝子等免疫関連遺伝子の発現量を測り、非感染系統と比較することにより、スピロプラズマがこれらの遺伝子発現制御に関わっているかどうかを明らかにする。

(3) 我々がこれまでに行ってきた、宿主遺伝子の強制発現によって雄殺しを救済するような挿入システムの探索においては、ショウジョウバエ雌成虫の生殖器官で強制発現させることにより、子孫の性比が雄に極めて偏る「雌殺し」系統が複数得られ、原因遺伝子を推定している。これらの遺伝子のいくつかについては機能未知で雌特異的致死との関連が不明である。*in situ* ハイブリダイゼーションや定量的RT-PCR等の手法を用いて、それらの遺伝子の発現局在と発現様式を明らかにする。

4. 研究成果

(1) スピロプラズマのファージゲノムの解析
3系統のスピロプラズマ(*Drosophila nebulosa*由来の雄殺しスピロプラズマNSRO系統、NSRO系統の突然変異体で雄を殺さないNSRO-A系統、キイロショウジョウバエ由来の雄殺しスピロプラズマMSRO系統)のファージ(それぞれSpV-N, SpV-NA, SpV-Mとする)のゲノム解析を進め、完全長ゲノムとして19,063 bp、19,277 bp、19,272 bpの結合配列を得た。SpV-NAの配列には、一部多型が認められた。ORF検索により、それぞれ23(SpV-N)ないし22(SpV-NAおよびSpV-M)のORFが推定され、*Spiroplasma citri*や雄殺しスピロプラズマの既知の遺伝子と高い相同性を示した。その中には*S. citri*において昆虫との相互作用に関わっていると推測されるP58, P12, P18, P54, P123が含まれており、これらの遺伝子が共生に関与して

いる可能性が示唆された。その他、DNA 組換え酵素遺伝子や機能未知の膜蛋白質遺伝子を同定した (図 1)。

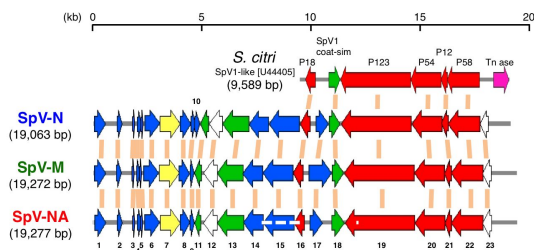


図 1. スピロプラズマファージのゲノム構造。ORF を矢印で示す。青は既知のスピロプラズマ遺伝子、緑は膜蛋白質、黄色は DNA 組換え酵素、赤は *Spiroplasma citri* の病原性因子に相溶性が高いことを示す。白の点線は多型を示す。

各ファージゲノムの全体的な塩基配列の相溶性は 81% であり、ORF の並びもよく保存されていた。各 ORF のファージ間の相溶性を塩基配列およびアミノ酸配列について調べたところ、ORF8 (hypothetical protein gene)、ORF18 (hypothetical lipoprotein transmembrane gene)、ORF19 (*p123*)、ORF23 (新規) は、雄殺し系統と非雄殺し系統の間の相溶性が低かった (図 2)。

| ORF18 | | | | |
|---------|-------|---------|---------|-------|
| | SpV-N | SpV-NA1 | SpV-NA2 | SpV-M |
| SpV-N | | 62.2 | 62.2 | 100.0 |
| SpV-NA1 | 44.3 | | 100.0 | 62.2 |
| SpV-NA2 | 44.3 | 100.0 | | 62.2 |
| SpV-M | 100.0 | 44.3 | 44.3 | |

図 2. ORF18 のファージ間の比較。各ファージの ORF18 の塩基配列の相溶性 (斜線右上) およびアミノ酸配列の相溶性 (同左下)、赤のマスは相溶性が 70% 以下であることを示す。なお、SpV-NA については 2 つの多型毎に分けて示した。

ORF22 (*p58*) の塩基配列および ORF7 (RecT) のアミノ酸配列を用いて分子系統解析をおこなったところ、各ファージは極めて近縁なファージファミリーに属することが示された (図 3)。

定量的 PCR 法により、宿主昆虫の加齢に伴うスピロプラズマファージの動態が、スピロプラズマ系統によって異なることを明らかにした。特に非雄殺しスピロプラズマ NSRO-A 系統のファージである SpV-NA の動態については、調べた ORF によって 2 パターンに分かれるという奇妙な挙動を示しており (図 4)、これらの特徴と雄殺し機能の喪失との関連が興味深い。

スピロプラズマファージ上の 9 つの遺伝子について、定量的 RT-PCR 法による発現解析をおこなったところ、各遺伝子の発現量がスピロプラズマ系統によって有意に異なることが明らかになった。しかし、その発現変動に何らかの傾向を見出すことはできな

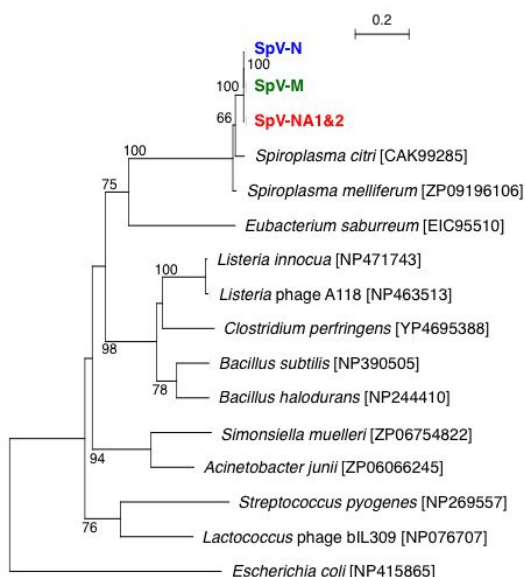


図 3. RecT (DNA 組換え酵素) の蛋白質配列に基づく分子系統樹 (近隣結合法)

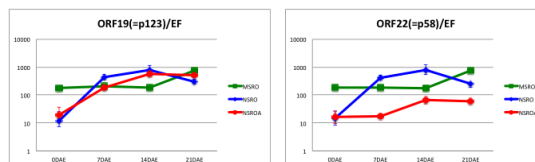


図 4. ショウジョウバエ体内におけるファージの動態 (定量的 PCR 法)。ショウジョウバエの遺伝子 (*EF1-*) あたりのファージ ORF19 (*p123*) (左) および ORF22 (*p58*) (右) のコピー数を示す。横軸はショウジョウバエ成虫の脱出後の日齢を表す。各ポイントは 10 個体の中央値を、エラーバーは四分位範囲領域を表す。青: SpV-N, 赤: SpV-NA, 緑: SpV-M

った。その中で、唯一 *p58* 遺伝子の発現量だけが、雄殺し系統と非雄殺し系統の間で有意に異なっており、雄殺し系統に感染したハエの体内では、非雄殺し系統に感染したハエに比べて約 10 倍高発現していることが明らかになった (図 5)。P58 はショウジョウバエのスピロプラズマに近縁な *Spiroplasma citri* において宿主昆虫との相互作用に関わっているとされる細胞接着性因子であることから、ショウジョウバエ-スピロプラズマ共生系においても共生、あるいは雄殺しそのものに関わっていることが期待される。

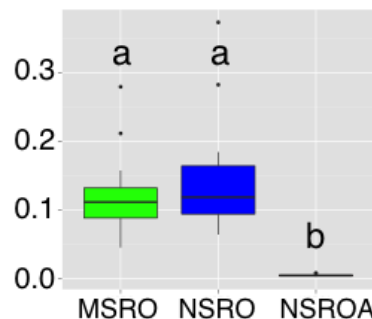


図 5. *p58* 遺伝子の発現量の比較 (定量的 RT-PCR 法)。各スピロプラズマに感染したハエにおける *p58* の発現量をショウジョウバエ *RpL32* 遺伝子の発現量で標準化した値を箱ひげ図で示した (各 $n=12$)。異なるアルファベットは統計的に有意な差があることを表す ($p < 0.05$)。

今後は、非雄殺しスピロプラズマのファージの奇妙な挙動について詳細に解析するとともに、発現量に差があった遺伝子の解析、さらには次世代シーケンサーを用いたスピロプラズマゲノムと遺伝子発現の網羅的解析によって、雄殺しに関与する共生細菌遺伝子の同定を目指す。

(2) カスリショウジョウバエのスピロプラズマの、微小注入法によるキロショウジョウバエへの移植を試みたが、感染状態を安定的に維持することができず、実験を断念した。

(3) 性比が雄に偏る (= 雌致死) EP 因子挿入ショウジョウバエ 16 系統について、inverse PCR による原因遺伝子の同定を進め、*esg*, *emc*, *h*, *aop*, *CG10543* などが得られていた。このうち、雌殺しとの関与が不明であった *aop*, *CG10543* について解析をおこなう予定であったが、次項の RNA-seq による共生関連宿主遺伝子の網羅的解析に計画をシフトしたため、解析をおこなわなかった。

(4) 雄殺しや共生に関わる宿主遺伝子の同定を目的とし、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq により、スピロプラズマ感染により宿主雌成虫において発現が変動する遺伝子の網羅的探索をおこなった。得られた候補遺伝子については、定量的 RT-PCR 法による確認をおこなった。その結果、スピロプラズマ感染により発現が抑制される遺伝子の候補として *snail* が得られた (図 6)。

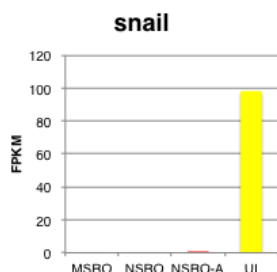


図 6. スピロプラズマ 3 系統 (MSRO, NSRO, NSRO-A) に感染したショウジョウバエと非感染ショウジョウバエ (UI) における *snail* 遺伝子の発現量 (RNA-seq, FPKM)。

(5) 雄殺しとショウジョウバエ胚におけるスピロプラズマの増殖との関係を明らかにするため、雄殺しスピロプラズマに感染したショウジョウバエの胚におけるスピロプラズマ密度の変動を、定量的 PCR 法を用いて調べた。その結果、雄特異的な細胞死が起こる発育ステージにおいて、スピロプラズマ密度の増加は認められず、雌雄の違いも観察されなかったことから、雄殺しは、雄胚におけるスピロプラズマの異常増殖が原因ではないことを明らかにした (図 7)。

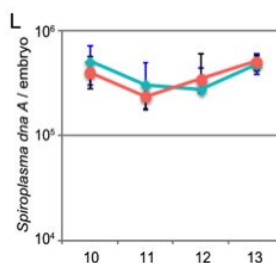


図 7. 雄殺しスピロプラズマ感染胚におけるスピロプラズマ密度の変動 (定量的 PCR 法) ショウジョウバエ胚あたりのスピロプラズマ *dnaA* 遺伝子のコピー数を示す。横軸は胚の発育ステージを表す。各ポイントは 12 個体の中央値を、エラーバーは四分位数間領域を表す。青: , 赤:

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 1 件)

Toshiyuki Harumoto, Hisashi Anbutsu, Takema Fukatsu, Male-killing *Spiroplasma* induces sex-specific cell death via host apoptotic pathway, PLoS Pathogen, 査読有, Vol.10, 2014, e1003956
DOI: 10.1371/journal.ppat.1003956

[学会発表] (計 6 件)

Hisashi Anbutsu, Naruo Nikoh, Kohjiro Tanaka, Toshiyuki Harumoto, Takema Fukatsu, Quantitative analysis of proliferation and gene expression of bacteriophages infecting male-killing and non-male-killing spiroplasmas in *Drosophila*, 8th International Wolbachia Conference, 2014 年 6 月 6 日 -11 日, Innsbruck (Austria)

安佛 尚志, 春本 敏之, 二河 成男, 田中 康次郎, 深津 武馬, ショウジョウバエ-スピロプラズマ共生系における宿主-共生細菌間相互作用, 第 41 回日本マイコプラズマ学会学術集会, 2014 年 5 月 22 日, 東京大学伊藤謝恩ホール

安佛 尚志, 二河 成男, 田中 康次郎, 春本 敏之, 深津 武馬, ショウジョウバエの共生細菌スピロプラズマのファージの比較ゲノム解析, 第 58 回日本応用動物昆虫学会大会, 2014 年 3 月 27 日, 高知大学 (高知市)

安佛 尚志, 春本 敏之, 重信 秀治, 吉武和敏, 深津 武馬, Exploration of host genes involved in *Drosophila-Spiroplasma* endosymbiosis and male-killing phenotype by using RNA-seq, 第 10 回日本ショウジョウバエ研究会, 2012 年 10 月 15 日, 東京慈恵医

科大学（新橋）

Hisashi Anbutsu, Naruo Nikoh, Kohjiro Tanaka, Takema Fukatsu, Comparative genomic analysis of bacteriophages associated with male-killing and non-male-killing spiroplasmas in *Drosophila*, 7th International Wolbachia Conference, 2012年6月8日, Oleron Island (France)

〔その他〕

産総研論文検索システム（産総研リポジトリ）

http://www.aist.go.jp/aist_j/aist_repository/index.html

6．研究組織

(1)研究代表者

安佛 尚志（ANBUTSU, Hisashi）

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号：30392583

(2)連携研究者

二河 成男（NIKOH, Naruo）

放送大学・教養学部・教授

研究者番号：70364916