

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：13904

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440196

研究課題名(和文) 各種アブラムシにおける細菌由来水平転移遺伝子群の網羅的探索と進化解析

研究課題名(英文) Comprehensive search and evolutionary analysis of bacterial transferred genes in various aphid species

研究代表者

岡村 恵子 (Okamura, Keiko)

豊橋技術科学大学・エレクトロニクス先端融合研究所・研究員

研究者番号：10570533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：エンドウヒゲナガアブラムシ (*A. pisum*) ゲノムから発見された、細菌由来水平転移遺伝子の進化動態の解明を試みた。*A. pisum*由来LdcA1遺伝子とそのオーソログから縮重プライマーを構築し、90種アブラムシゲノムDNAを鋳型として縮重PCRを行い、増幅産物の塩基配列決定を行った。アブラムシ族とヒゲナガアブラムシ族の24種からは、*A. pisum*由来LdcA1と相同性の高い配列が得られた。アミノ酸配列にもとづく近隣結合系系統樹から、LdcA1遺伝子の系統関係は、アブラムシの種の系統を概ね反映しており、LdcA1遺伝子が両族の共通祖先に水平転移し、両族アブラムシの種分化と共に進化したことを示した。

研究成果の概要(英文)：The evolutionary dynamics of bacterial transferred genes, which was found from the genome of *Acyrtosiphon pisum*, was examined. Degenerate primers were designed from LdcA1 gene originated from *A. pisum* and its orthologous genes, and the degenerate PCR was performed by using the genomic DNAs of 90 aphid species as templates, and the PCR products were all sequenced. From 24 species of aphids Aphidini and Macrosiphini, LdcA1 genes, which were highly homologous to *A. pisum* LdcA1 gene were found. The phylogenetic analysis of the deduced amino acid sequences of LdcA1 genes acquired from these 24 aphid species showed that the phylogenetic relationship of LdcA1 genes roughly reflected the present taxonomic status of these aphid species, suggesting that the LdcA1 genes were horizontally transferred to a common ancestor of these aphid groups and evolved together with speciation of these aphids groups.

研究分野：進化生物学

キーワード：アブラムシ 菌細胞 相利共生 遺伝子水平転移 オーソログ遺伝子 分子系統解析

1. 研究開始当初の背景

アブラムシは半翅目・腹吻亜目のアブラムシ上科に属する昆虫の総称で、世界に約4,400種が存在する。このうち250種ほどが世界の農作物に深刻な影響を及ぼす重要な農業害虫であり、その防除は世界的な課題となっている。

アブラムシは栄養が乏しい植物の篩管液のみを餌としながら、胎生単為生殖によるきわめて旺盛な繁殖力を示す。これを可能にしているのが、細菌との緊密な共生関係である。アブラムシは体腔内に「菌細胞 (bacteriocyte)」と呼ばれる特殊な細胞を数十個持ち、この中に相利共生細菌「ブフネラ (*Candidatus Buchnera aphidicola*, *Gamm-*aproteobacteria*)*」を多数収納している【図1】。

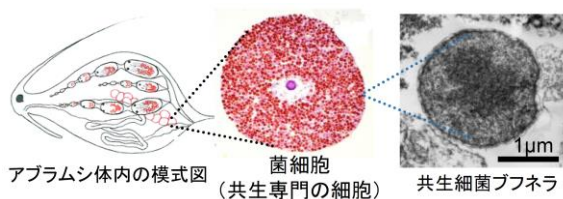


図1. 宿主アブラムシと細胞内必須共生細菌ブフネラの解剖学的関係性

ブフネラは植物篩管液に乏しい必須アミノ酸やビタミンなどの栄養分を合成・供給することでアブラムシの生存を支えており、アブラムシなしでは繁殖できない。また、ブフネラは、アブラムシの親から子へと2億年にわたって垂直感染のみで伝えられており、この過程で自身の生存に必要と思われる多くの遺伝子を失い、ゲノムサイズは420kb~650kbにまで縮小している。そのため、菌細胞の外では増殖不能であり、アブラムシとブフネラは絶対的な相互依存関係にある【図2】。



図2. 宿主アブラムシと細胞内必須共生細菌ブフネラの栄養学的関係性

現在、アブラムシの防除には化学農薬を用いるのが一般的であるが、多くの生物にとって有害なものが多く、生態系への影響が懸念されている。これに対し、菌細胞内共生系は、アブラムシの生存に不可欠である一方、周辺環境中の他の生物には存在しないため、アブラムシに対する選択性が高く、生態系への負荷の低い新規防除法開発の標的として有望である。

本研究課題の先行研究から、エンドウヒゲ

ナガアブラムシ (*Acyrtosiphon pisum*, アブラムシ科・アブラムシ亜科・ヒゲナガアブラムシ族) のゲノム解析および同種の菌細胞を用いたトランスクリプトーム解析が行われ、そのゲノム上には細菌から水平転移によって獲得された遺伝子が12種類存在 (そのうち10種類はブフネラとは別の細菌に由来) し【表1】、その多くが菌細胞で特異的に発現していることが明らかとなった。これは本遺伝子群がブフネラとの共生関係の制御・維持に重要な役割を果たす「鍵遺伝子」である可能性を強く示唆するものである。

表1. エンドウヒゲナガアブラムシのゲノム上の細菌由来水平転移遺伝子群

シンボル	遺伝子名	特徴
<i>LdcA1</i>	LD-carboxypeptidase 1	
◇ <i>LdcA4</i>	LD-carboxypeptidase (pseudo)	ペプチドグリカンの代謝に関係する。
<i>LdcA2</i>	LD-carboxypeptidase 2	<i>Walbachia</i> 類縁細菌から水平転移した
<i>AmiD</i>	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	可能性が高い
<i>blys</i>	1,4-beta-N-acetylmuramidase	
<i>RlpA1-RlpA5</i>	Rare lipoprotein A1-A5	由来系統・機能ともに不明
◇ <i>DnaE</i>	DNA polymerase III alpha chain (pseudo)	ブフネラ由来だが、偽遺伝子
◇ <i>AtpH</i>	ATP synthase delta chain (pseudo)	

通常、生物の遺伝子は親から子へと受け継がれ、これを遺伝子水平転移と言うが、ときに生物の種を超えて遺伝子の移動や伝達がおこることがあり、これを遺伝子水平転移という。

エンドウヒゲナガアブラムシから検出された水平転移遺伝子群は、細菌 (原核生物) の遺伝子のオーソログであるが、遺伝子の構造解析によって、配列中にイントロン領域が含まれ、転写後にキャップ構造付加・ポリA付加がなされるなど真核型の遺伝子構造を有していることが明らかとなっている。このようなキメラ構造は、これらアブラムシ遺伝子群に特有のものであり、他の生物に存在する可能性は極めて低い。また、水平転移遺伝子群には特異的な産物輸送系が進化するなど、独特な関連遺伝子群の存在が示唆されている。そのため、こうした細菌由来水平転移遺伝子群や、その関連遺伝子群は、新規防除法開発の標的として有望であると言える。しかし、これらの遺伝子が害虫種を含む多様なアブラムシ系統に広く存在するのかどうか、という疑問が浮上する。

2. 研究の目的

本研究では、細菌由来水平転移遺伝子の一つである *LdcA1* 遺伝子に着目し、多様なアブラムシ系統における *LdcA1* 遺伝子ホモログの存否と構造を解明することを目的として、診断PCRおよび分子系統解析を行った。

3. 研究の方法

3.1 実験に用いたアブラムシ DNA

アブラムシ DNA は産業総合研究所・深津武馬氏より提供された、アブラムシ科 (*Aphididae*)・カサアブラムシ科 (*Adelgidae*)・

ネアブラムシ科 (*Phylloxeridae*) に属する 90 種より抽出された試料 DNA を用いた。

3. 2 診断 PCR

① 縮重プライマーの設計

エンドウヒゲナガアブラムシのゲノム上の *LdcA1* 遺伝子のアミノ酸配列を BLAST に基づく類似性検索にかけ、類似性の高い “*Wolbachia endosymbiont of Drosophila simulans* wHa” や “*Orientia tsutsugamushi* str. Boryong” などの *LdcA1* 遺伝子のオーソログを抽出した。ClustalW2、Bioedit を用いてそれらの配列のアラインメントを作成し、配列中の保存性の高い領域に、*LdcA1* 遺伝子配列中の 812 塩基対を標的とした縮重プライマーセットを設計した【図 3】。

表 2. 設計した縮重プライマーセット

プライマー名	配列 (5'→3')
LdcA-26f	ATYGCWCCKTCITCSAWRGHIAAASCITC
LdcA-295r	AAAYACIGGAAASWRWACRSTGGCYGCRAA

② 縮重 PCR

90 種のアブラムシより抽出したゲノム DNA を鋳型として、縮重プライマーセット【表 2】を用いた縮重 PCR を行った。鋳型 DNA は反応液中での終濃度が 10ng/μl 以下になるように調整した。*Taq* ポリメラーゼは TaKaRa 社製の Ex Taq を使い、94°C で 2 分間の熱変性後、94°C で 30 秒の熱変性、50°C で 30 秒のアニーリング、72°C で 1 分の伸長反応を 1 サイクルとして、35 サイクルの増幅反応を行った。反応後、1×TBE バッファー中で 1% アガロースゲルを用いた電気泳動を行い、目的領域の増幅を確認した。非特異的増幅が起こったものはアニーリング温度を 60°C に上昇させることで対応した。

3. 3 サザンハイブリダイゼーション解析

電気泳動後の 1% アガロースゲルから縮重 PCR の増幅 DNA 断片を、ナイロンメンブレン (GE ヘルスケア) に転写した。プローブ DNA には、エンドウヒゲナガアブラムシのゲノム DNA を鋳型とし、図 3 に示す LdcA1-93f と LdcA1-247r のプライマーセットを用いた PCR 増幅産物 (465bp) を用いた。AlkPhos Direct Labelling Module (GE ヘルスケア) を用いてサザンハイブリダイゼーション解析を行い、90 種アブラムシゲノムにおける *LdcA1* 候補遺伝子の存否を確認した。

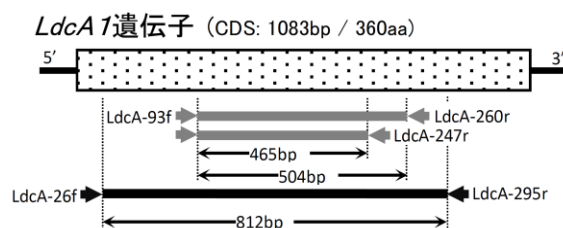


図 3. エンドウヒゲナガアブラムシゲノムの *LdcA1* 遺伝子の構造、設計した縮重プライマー

3. 4 TA クローニング

陽性シグナルが得られた DNA 断片をアガロースゲルより抽出・精製し、Promega 社の pGEM-T Easy Vector System I を使い、サブクローニングを行った。インサート DNA とプラスミドベクターの重量比が 3:1 になるように調整してライゲーション反応を行い、これを宿主大腸菌 (*E. coli* JM109) に形質転換した。その後アンピシリン入り LB 培地に、形質転換後の大腸菌培養液を塗布し、37°C で一晚培養を行った。

3. 5 コロニーハイブリダイゼーション

TA クローニングにより、寒天培地上に出現した大腸菌コロニーを、ナイロンメンブレン (GE ヘルスケア) に転写した。AlkPhos Direct Labelling Module (GE ヘルスケア) および 3. 3 と同様のプローブを用いてハイブリダイゼーションを行い、目的 DNA 断片が挿入されたプラスミドの確認を行った。

3. 6 シーケンシング

陽性シグナルが得られた大腸菌のコロニーを用いて、コロニー PCR により挿入 DNA 断片を増幅する、または大腸菌の培養物からプラスミド DNA を抽出・精製することでシーケンス反応の鋳型 DNA を調製した。シーケンス反応には BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) と Veriti Thermal Cycler (Life Technologies) を使い、シーケンス解析を行った。

3. 7 分子系統解析

得られた塩基配列から BioEdit を用いてアミノ酸配列を推定し、ClustalW2 を用いてマルチプルアラインメントを作成した。これに基づいて近隣結合法により分子系統樹を作成した。アウトグループとして *Orientia tsutsugamushi* および *Wolbachia* sp. の *LdaA1* 遺伝子オーソログ配列を用いた。作成した分子系統樹は NJ Plot を用いて描画した。

4. 研究成果

4. 1 *LdcA1* 遺伝子の存否確認

サザンハイブリダイゼーション解析によってエンドウヒゲナガアブラムシ由来 *LdcA1* 遺伝子ホモログの検出を試みたところ、90 種全てのアブラムシから、エンドウヒゲナガアブラムシの *LdcA1* 遺伝子内標的領域 (812bp) と類似した分子量の DNA 断片の存在が確認できた【図 4】。特に、アブラムシ族とヒゲナガアブラムシ族に属する 24 種の全てにおいて、エンドウヒゲナガアブラムシの候補領域と同様の分子量の単一バンドが検出できた。シーケンス解析により得られた塩基配列をクエリとして blastn による相対性検索を行ったところ、エンドウヒゲナガ

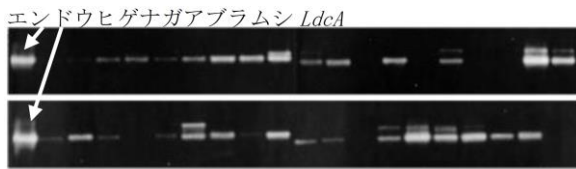


図4. サザンハイブリダイゼーションの解析結果(抜粋) 標的 DNA: 90種アブラムシゲノム DNA を鋳型とし、表2のプライマーセットを用いた縮重 PCR 産物(エンドウヒゲナガアブラムシは 812bp の増幅産物を得る)。プローブ DNA: エンドウヒゲナガアブラムシ LdcA1 遺伝子の部分配列 (465bp)

アブラムシ *LdcA1* 遺伝子の類似配列であることが確認され、アブラムシ 24 種のゲノム上に *LdcA1* 遺伝子の類似配列が真に存在することが判明した。

4. 2 分子系統樹

作成した分子系統樹を図5に示す。上部のクラスターはアブラムシ族の種から得られたアミノ酸配列であり、下部のクラスターは *Melanaphis bambusae* と *Aphis craccivora* の2種がアブラムシ族に属する他は、全てヒゲナガアブラムシ族のアミノ酸配列で構成された。

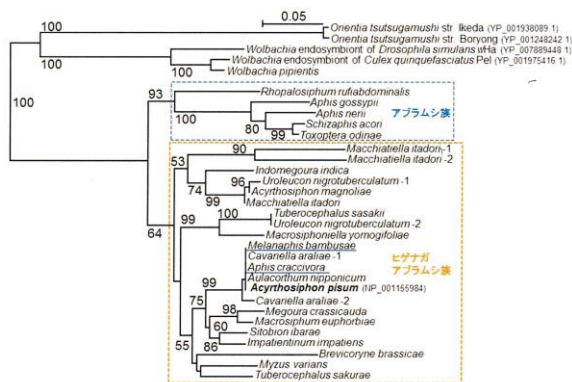


図5. アブラムシ族とヒゲナガアブラムシ族に属する24種アブラムシの *LdcA1* 遺伝子アミノ酸配列に基づく、近隣結合系統樹。

エンドウヒゲナガアブラムシ以外のアブラムシ亜科に属する種においても、*LdcA1* 遺伝子ホモログの存在が確認された。また、*LdcA1* 遺伝子の配列に基づく系統が、概ねアブラムシの系統を反映していた。現在、分子系統にもとづくアブラムシの分類は未だ完了しておらず、基準となった分類が必ずしも正確でない可能性がある。

今後さらに幅広い種を用いた系統解析を行うことで、アブラムシの分類体系に新たな知見がもたらされる可能性がある。これらの結果を考慮すると、アブラムシ亜科の共通祖先は、すでに細菌から *LdcA1* 遺伝子を獲得し、アブラムシの種分化とともに *LdcA1* 遺伝子が分化してきたことを示す。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- Okamura, K., Kawai, A., Wakao, N., Yamada, T., and Hiraishi, A. (2015) *Acidiphilium iwatense* sp. nov., isolated from an acid mine drainage treatment plant, and emendation of the genus *Acidiphilium*.

International Journal of Systematic and Evolutionally Microbiology 65:42-48. doi: 10.1099/ijls.0.065052-0.

- Hiraishi, A., and Okamura, K. (2016) Proposal of *Rhodoplanes tepidamans* sp. nov. to accommodate the thermotolerant phototrophic bacterium previously referred to as "*Rhodoplanes (Rhodopseu- domonas) cryptolactis*".

International Journal of Systematic and Evolutionally Microbiology doi: 10.1099/ijsem.0.001752.

[学会発表] (計 4 件)

- 上田翔太、岡村恵子、近藤恭光、斎藤臣雄、土田務、中鉢淳
ケミカルバイオロジー的手法によるアブラムシ共生関連タンパク質の機能解析
環境微生物系学会合同大会
静岡県浜松市 (2014年10月21-24日)

- 山本昂平、岡村恵子、杉野明日香、三澤直美、広瀬侑、中鉢淳
オルガネラ様防衛共生細菌 *Proffittella* の姉妹系統の探索
環境微生物系学会合同大会、
静岡県浜松市 (2014年10月21-24日)

- Yamada, N., Hamada, M., Sugino, A., Okamura, K., and Nakabachi, A. Differential toxicity of a novel polyketide diaphorin to various organisms.

The Irigo conference 2015
Tahara-city, Aichi. (22-23, Oct, 2015)

- 山田倫子、濱田雅東、杉野明日香、岡村恵子、中鉢淳
ミカンキジラミ共生細菌から得た新規ポリケチド「ディアフォリン」の活性評価
日本応用動物昆虫学会大会 2016
大阪府堺市 (2016年3月26-29日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡村 恵子 (Keiko OKAMURA)

豊橋技術科学大学

エレクトロニクス先端融合研究所 研究員

研究者番号: 10570533