

博士論文要約 (Summary)

入学年 Entrance Year : 2019 年 (10 月入学)

連合農学研究科

専攻 Course : 農水圏資源環境科学

氏名 Name : 吉田 一貴

タイトル Title	ヒメトビウンカと昆虫の生殖を操作する共生細菌 および昆虫に媒介される植物ウイルスの相互作用に関する研究
------------	--

キーワード Key word (共生細菌) (生殖操作) (宿主-共生者間相互作用)

総合序論 General introduction

宿主の親から子へと伝播する内部共生細菌は、昆虫を含む節足動物で普遍的に見られる。一部の共生細菌は、宿主の生殖様式を利己的に操作する能力を持つ。一般的に、共生細菌は母親の卵細胞質を通じて子へと伝播し、父親側からは伝播できないという制約があるため、共生細菌による生殖操作は「感染メス」の個体数を増加させるように働く。生殖操作はこれまでに、①細胞質不和合 (CI)、②オス殺し、③産雌性単為生殖、④遺伝的オスのメス化 の4つが確認されている。

CIは、特に共生細菌ボルバキアが引き起こす事例が多く知られている、最も一般的な生殖操作である。CIの最も典型的なパターンでは、共生細菌に非感染のメスが感染オスと交配した際に卵が正常に発生せず、子が孵化しない。一方で、感染メスは感染オスと交配した場合にも正常に子を残すことができる。したがって、非感染メスは個体群中において、感染メスよりも繁殖成功の面で相対的に不利となる。この現象により個体群中の感染個体の頻度は増加していき、最終的にすべてが感染個体に置き換わることも少なくない。CIという現象が発見されてから数十年の間、そのメカニズムについては不明であったが、最近の研究でCIの原因となるボルバキアの遺伝子が特定され、その詳細が徐々に明らかになりつつある。

オス殺しもまた、ボルバキアやスピロプラズマを含む様々な共生細菌が、多様な昆虫宿主において引き起こすことが報告されている。オス殺しはそのタイミングにより、卵や若齢幼虫の段階でオスが死亡する早期型オス殺し (early male killing) と、老齢幼虫期にオスが死亡する晚期型オス殺し (late male killing) に大別される。これらの特徴は、オス殺しという生殖操作の進化やメカニズムを理解する上で重要なものである。近年、スピロプラズマのオス殺し遺伝子が特定され、その分子メカニズムが徐々に明らかになりつつある。

宿主と共生細菌の関係は、生物の進化を考える上で重要な研究対象である。共生細菌が宿主にどのような影響を与えるかは、宿主生物の生存に直結する。もし共生細菌が宿主の適応度を向上させるならば、共生関係は安定し、より密接なものとなり、感染個体は増加していくと予測される。一方で共生細菌が宿主に負の影響を及ぼす場合、共生関係が破綻するか、あるいは共生細菌の負の影響に抗うように宿主の形質が進化していくだろう。また、同一の宿主内に複数の共生者 (共生細菌やウイルスなど) が共存する場合、空間的・資源的に限られた環境でそれらの間にどのような相互作用が存在するか、その結果宿主にどのような影響を及ぼすかは、非常に興味深く重要な研究対象である。

ヒメトビウンカ（カメムシ目ウンカ科）はイネ縞葉枯ウイルス（RSV）を媒介する稲作の重要害虫として知られる。ヒメトビウンカには CI を引き起こすボルバキアが、一部の地域を除くほとんどの個体群に感染している。さらに一部の個体群には、ボルバキアに加えてオス殺しを引き起こすスピロプラズマが二重感染していることが知られている。同一宿主に異なる生殖操作を行う複数の共生細菌が同時に感染している事例は稀であり、また RSV も含めた三者がヒメトビウンカ体内でどのような関係にあり、その結果として宿主にどのような影響を及ぼすかは、進化生物学的観点からも非常に興味深い。

本博士論文では、まず第 1 章でボルバキアおよびスピロプラズマがヒメトビウンカのパフォーマンスに及ぼす影響について調べた。第 2 章では、ボルバキアおよびスピロプラズマがヒメトビウンカ体内の RSV に及ぼす影響について研究を行った。第 3 章では、ヒメトビウンカの累代飼育過程で生じたボルバキアの CI 遺伝子の欠失について報告している。第 4 章では、ヒメトビウンカの飼育系統から発見されたスピロプラズマのオス殺しに対する抵抗性について述べている。これらの研究結果に基づいて、ヒメトビウンカと 3 種の共生者の関係や、共生細菌が引き起こす生殖操作のメカニズムについて考察した。

第 1 章

ヒメトビウンカの 2 種の共生細菌ボルバキアとスピロプラズマが宿主のパフォーマンスに及ぼす影響

CI において、「非感染メスの繁殖における不利」は、個体群中に感染オスが存在することによって生じるため、感染オスは CI という生殖操作戦略を成立させる上で不可欠な存在である。しかし、ヒメトビウンカのように CI を引き起こす細菌とオス殺しを行う細菌が共存する場合、感染オスが存在しなくなってしまうため、CI という戦略が破綻することになる。またオス殺しにより宿主の子孫の数が半減してしまうことも考慮すると、スピロプラズマの感染はヒメトビウンカとボルバキアの両者にとって大きな不利益となると考えられる。それにもかかわらず、少なくとも一部の個体群ではスピロプラズマ感染が高頻度で確認されていることから、スピロプラズマの感染は宿主に何らかの正の影響を及ぼしていると予想し、ヒメトビウンカのパフォーマンス（幼虫期間、成虫寿命、生涯産卵数、殺虫剤抵抗性）に着目して研究を行った。

結果として、本研究で調べた限りではスピロプラズマ感染によるメリットは検出されず、むしろ生涯産卵数に対して負の影響を及ぼしていた。興味深いことに、スピロプラズマとボルバキアが二重感染している場合（SW）、スピロプラズマが単独で感染している場合

（S）に比べて生涯産卵数への負の影響が小さくなった。そこで SW と S それぞれのスピロプラズマ感染密度を比較したところ、老齢幼虫期以降の SW の感染密度は S に比べて顕著に低いことが明らかになった。2 種の共生細菌間には何らかの相互作用があり、ボルバキアの存在によりスピロプラズマが抑制されていることが示唆された。

第2章

ヒメトビウンカが媒介する植物ウイルスにボルバキアとスピロプラズマが及ぼす影響

十数年前にボルバキアの感染が宿主昆虫の RNA ウイルス媒介能を顕著に低下させることが発見されて以来、世界中で多くの研究が行われている。特に、ボルバキアを人為的に感染させたカでデングウイルスやジカウイルスといった病原性ウイルスの媒介能力が大きく低下することを応用し、これらの感染症の抑制する目的でボルバキア感染カの大規模な野外放飼も行われ、実際に成果が出始めている。このように、昆虫が媒介する動物ウイルスに対するボルバキアの影響は大きな注目を集め数多の研究が行われているが、一方で植物ウイルスに対する影響はほとんど報告されていない。本研究では、ヒメトビウンカが媒介する植物ウイルスである RSV に対し、ボルバキアおよびスピロプラズマが及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

共生細菌の感染状態の異なる系統間で RSV のウイルス量と垂直伝播率を比較したところ、ボルバキアが存在する場合に RSV 量が低下することが明らかになった。一方で、垂直伝播率には系統間で有意な差は見られなかった。動物ウイルスを対象とした複数の先行研究では、ボルバキアはプラス鎖 RNA ウイルスを抑制するが、マイナス鎖 RNA ウイルスには効果がないことが報告されている。またこれまでに、ボルバキアが他の細菌を抑制する例は報告されていない。RSV はマイナス鎖（アンビセンス）RNA ウイルスであり、また第1章では細菌であるスピロプラズマに対する抑制効果も示唆された。これらの結果から、ヒメトビウンカのボルバキア株は他の株と比較して抑制対象の範囲が広く、より強力な抑制能を持つ可能性がある。

第3章

宿主の累代飼育過程で確認されたボルバキアの *cif* 遺伝子の欠失

CI の詳細な分子メカニズムは未だ完全に解明されていないが、感染オスの精子には何らかの修飾が施されそのままでは正常な受精ができないようになっており、卵にボルバキアが存在する場合は救済されるため受精が可能になるという「修飾-救済モデル」が、CI のメカニズムを説明できるモデルとして長年提唱されている。近年、ボルバキアによる CI の原因遺伝子が特定され、ボルバキアゲノム内のプロフェージ遺伝子領域上に位置する *cifA* と *cifB* という、常に並んで存在する2つの遺伝子によって引き起こされることが明らかになった。先行研究により、*cifA* は救済を、*cifB* は修飾を担っていることが示されている。

ヒメトビウンカの交配実験の過程で、ボルバキアに感染しているにもかかわらず他系統のボルバキア感染オスと交配すると CI が起こる系統（SW-1 系統；スピロプラズマに二重感染したオス殺し系統）が偶然発見された。この系統は、毎世代非感染オスと交配させるという、極めて特殊な方法によって累代している系統であった。雌雄が系統的に大きく異なるボルバキア株に感染している場合など例外はあるものの、一般的に CI は「非感染メス」と感染オスが交配した場合に起こるものである。本研究では、この CI が起こる原因を明らかにすることを目的とした。

SW-1 系統のボルバキアは他系統のボルバキアによる CI を救済できなかったことから、SW-1 のボルバキアが累代飼育過程で CI 遺伝子を欠失してしまったのではないかと考えた。PCR による確認の結果、ヒメトビウンカのボルバキアは通常4対の *cifA-cifB* を持ってい

るが、SW-1はそのうちの1対を欠失していることが明らかになった。またSW-1のボルバキア感染オスは非感染メスとの交配でCIを引き起こし、またSW-1ボルバキア感染メスとの交配では救済された。これらの結果から、SW-1の残る3対の少なくともいずれかはCIの修飾と救済の能力を保持していると考えられる。したがって以上の結果から、SW-1系統のメスと他系統のボルバキア感染オスとの交配で起こるCIは、SW-1のボルバキアが欠失した1対の*cif*遺伝子が原因であることが明らかになった。本研究は宿主昆虫の累代飼育過程で*cif*遺伝子が欠失したことが確認された初めての事例であり、またボルバキアゲノムに存在する複数の*cifA-cifB*遺伝子には修飾-救済の互換性がなく、それぞれ独立して修飾-救済を行っていることを強く示唆している。

第4章

ヒメトビウンカ飼育系統におけるオス殺し抵抗性の発見

CI以外の生殖操作では、宿主の性比が大きくメスに偏る。一般的な条件下では、偏った性比は進化的に安定ではないため、1:1の性比に戻ろうとする力が働くと言われている。実際に、共生細菌によるオス殺しによって個体群の性比がメスに偏った後、「オス殺し抵抗性遺伝子」の出現によって急速に正常性比となった例が過去に2例（チョウ目およびアミメカゲロウ目の昆虫）のみ報告されている。抵抗性が急速に発達することや、正常性比となった宿主個体群は見分けがつかないことから、このような事例を観測することは極めて困難である。

ヒメトビウンカの飼育系統の中から、スピロプラズマに感染しているにもかかわらず正常性比を示す系統が発見された（以下、岐阜NBSW系統）。本研究では、この系統がスピロプラズマのオス殺しに対する抵抗性を持っていると考え、交配実験による検証を行った。

オス殺しに対する抵抗性を持っていない系統のオスを岐阜NBSW系統のメスに交配させ、核遺伝子を非抵抗性に置き換える交配実験（introgression）を行った結果、性比がメスに偏った。これにより、岐阜NBSWのスピロプラズマはオス殺しの能力を有しているが、宿主側の核遺伝子要因によって抑制されていることが示された。また交配実験の結果から、この抵抗性は顕性形質として発現するものであると考えられた。本研究はカメムシ目昆虫におけるオス殺し抵抗性遺伝子の存在とその遺伝様式を示した最初の報告である。

総合考察 General discussion

昆虫を含むすべての生物は、その体内に共生者を有する小さな生態系と言える。そのような生命集合体はときに「ホロビオン」とも呼ばれ、自然下で淘汰圧を受ける一単位である。共生者が宿主、あるいは同一宿主内の他の共生者にどのような影響を及ぼすかという「見えない相互作用」を詳細に紐解いていくことは、昆虫を含む生物の進化を理解する上で極めて重要である。本博士論文では、ヒメトビウンカとその多様な共生者間の相互作用に着目して研究を行った。本博士論文の研究により、これまで明らかにならなかった宿主-共生者間、あるいは共生者同士の複雑な相互作用の一端が明らかになった一方で、さらなる課題や新たな謎も浮き彫りとなった。ヒメトビウンカとその共生者は「共生」を題材とした基礎・応用研究の研究材料として極めて有用で興味深いものと言えるだろう。