

研究課題別評価書

1. 研究課題名

複合系の代謝制御—アブラムシ細胞内共生系をモデルとして

2. 氏名

重信 秀治

3. 研究のねらい

“Nothing, it seems, exists except as part of a network of interactions.” (Gilber & Epel, 2008)

地球上全ての生物の生命活動は、多かれ少なかれ他個体との相互作用の上で成り立っている。例えば、ヒトを含む多くの多細胞生物は体内に共生微生物を保有しており自前で合成できない栄養分を共生微生物から得たり、消化できない物質の分解を共生微生物に依存したりしている。このような「複合系」の協調的代謝の例は多数知られているものの、その多くが記載的な報告にとどまっており、その遺伝子・分子基盤についてはほとんど分かっていない。

本研究では、アブラムシ細胞内共生をモデルとして複合系の代謝調節機構を明らかにする。アブラムシ (*Acyrtosiphon pisum*) は、腹部体腔内に共生器官をもちその細胞内に共生細菌ブネラ (*Buchnera aphidicola*) を恒常的に維持して

いる。両者の間には絶対的な相互依存関係が築かれ、お互い相手なしでは生存が不可能である。栄養物質のやりとりに基づく相利栄養共生であることがわかっている (Douglas 1998 Annu Rev Entomol)。私は共生細菌のゲノムを解読し、宿主に依存できる代謝経路の遺伝子は共生細菌から失われていることを明らかにしていた (Shigenobu et al. 2000 Nature)。進化の過程で欠失した代謝パスウェイが、宿主との相互作用によってどのように補償され、ひとつの共生系として統合的に機能しているのかを明らかにすることが本研究の目標である。

4. 研究成果

4. 1 宿主昆虫のゲノム解読: 共生微生物と相補的遺伝子レパートリー、免疫系遺伝子の欠如

国際コンソーシアムにグループリーダーとして参加し、宿主昆虫エンドウヒゲナガアブラムシ *A. pisum* のゲノム 450Mbp を解読した (文献 1-5; Pennisi 2009 Science)。コンピュータプログラムにより約3万5千個の遺伝子を予測した。アブラムシの遺伝子セットを比較ゲノミクスにより精査したところ、アブラムシとブネラの栄養共生がゲノムに見事に反映されていることが分かった。私は、以前に共生細菌側の全ゲノムを解読し、その遺伝情報から、アミノ酸等の生合成に関わる遺伝子セットが宿主昆虫と共生細菌で相補的な関係になっていることを報告していたが、今回、両方のゲノムが揃ったことにより、その相補性をさらに強く裏付けたのみならず、ヌクレオチドなど他の代謝経路においても遺伝子セットの相補性を見いだした。これは、アブラムシと共生細菌という異なる生物種が、まるで一つの生物のように一体となって協調的な代謝を行っていることを示している。

ほかにも共生に関する新たな示唆が得られた。例えば、多細胞生物としては例外的に、細菌に対する免疫系の遺伝子が失われている事が明らかになった。共生微生物獲得のための適応進化であると解釈できる。他にもアブラムシの遺伝子セットには他の昆虫に見られないユニークな点が多い。2,000 種類以上の遺伝子がアブラムシ特異的に増幅している。重複している遺伝子は、ク

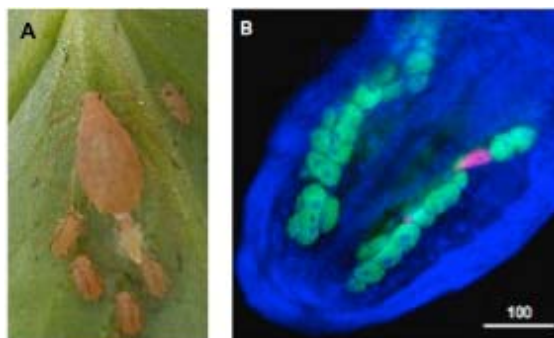


図 1 A) エンドウヒゲナガアブラムシ *Acyrthosiphon pisum*。B) 共生器官。緑: 共生細菌、青: 宿主細胞 DNA。(International Aphid Genomics Consortium 2009 より引用)

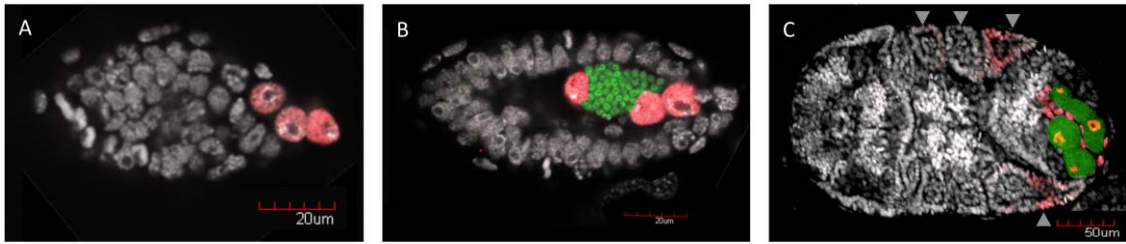


図2 アブラムシ胚発生における共生器官の形成、共生細菌の感染と転写因子 *Distal-less* の発現の関係。白:DNA, 緑:共生細菌, 赤:DII 抗体。すべて左-右が、前後軸になるように配置。A) 細胞性胞胚期前期(Stage 6)。細菌が感染直前からDIIの発現が始まる。B) 細胞性胞胚期後期(Stage 7)。胚後極より母親由来の共生細菌が腔内に流入。DII 発現核と密接に接触している。共生器官はまだ細胞化していない。C) 胚帯伸長期(Stage 14)。共生器官は細胞化。DII は共生器官の細胞核に加えて、形成途中の付属肢でも発現している(矢尻)。

ロマチン修飾や miRNA 経路など遺伝子発現調節に関わる遺伝子群、ウイルス媒介に重要な働きをする膜輸送関連の遺伝子、遺伝子発現制御脊椎動物様のエピジェネティック制御など、広いカテゴリーに渡る。また、アブラムシ独特な遺伝子が全遺伝子の約 4 割にのぼる。これらの重複遺伝子や種特異的遺伝子の共生や代謝との関わりは今後のポストゲノム研究を待たなければいけない。

4. 2 ホメオボックス転写因子 DII の機能解析

Distal-less (DII)は共生器官の発生のごく初期から核で発現する転写因子であり、いくつかの傍証から協調的プロセスを制御する master gene である可能性が高いと考えられて来た(Braendle et al. 2003 PLoS Biol)。今回、アブラムシ DII の同定、クローニングに成功した。アブラムシは DII を1コピーもっており、アミノ酸配列は他の昆虫と高い保存性を示した。抗体作成にも成功し、発現パターンを解析したところ、DIIは共生細菌が感染する直前から将来共生器官になる核で発現を開始し、その後アブラムシのライフサイクルを通じてずっと強い発現が維持されることが分かった(図2; 投稿準備中)。さらに、DII は他の昆虫と同様、形成途中の付属肢の先端でも発現を示した。DII は進化的に高度に保存されている肢形成に関わる発生遺伝子である。このアブラムシでの観察結果は、DII が元来の機能である付属肢形成の機能を保持した上で、共生というアブラムシに新規の機能を獲得したことを示唆している(co-option)。

4. 3 共生器官のトランスクリプトーム解析

アブラムシの場合、共生細菌は共生器官の細胞内にのみ棲息する。この特殊な細胞の中で、共生細菌と宿主はまるでひとつの生物のように一体化し、そこでアミノ酸等栄養分の協調的代謝が営まれている。それを支える遺伝子制御ネットワークを明らかにするために、共生器官のトランスクリプトーム解析を、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 法により解析した。同様の解析は EST(Expressed Sequence Tag) 法で行い、共生器官で発現する 276 遺伝子、enrich している遺伝子約 20 を報告していたが(Nakabachi, Shigenobu et al. 2005 PNAS)、今回、新技術により発現遺伝子1万以上、enrich している遺伝子 1000 以上を同定した(未発表)。予想通り、アミノ酸代謝遺伝子が高い発現

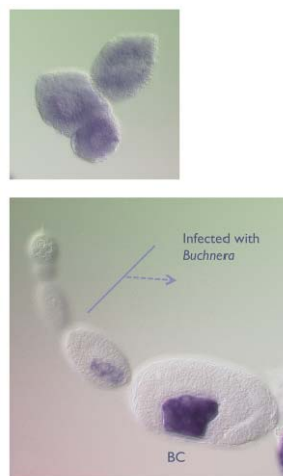


図3 アブラムシ特異的分泌タンパク質 SP4 の mRNA の分布。上)成虫の共生器官バクテリオサイトでこの遺伝子が高発現している。下)胚発生における発現分布。共生細菌が感染した直後のステージから bacteriocyte で特異的に発現している。BC:バクテリオサイト。

を示していた。さらに、多種類のアブラムシ特異的遺伝子が高発現していることを見いだした。アミノ酸配列からの機能予測はできなかったが、驚いたことに、これらの遺伝子の全ての N 末にシグナルペプチドがコードされていた。つまり、これらは新規の分泌タンパク質＝シグナル因子である。共生細胞との相互作用において重要な役割を果たしている可能性がある。

5. 自己評価

「共生」をゲノム科学やメタボロームなどの新しい技術と、発進進化化学などの新興研究分野の視点を取り入れて統合的に理解する、という、私が長年あためていた構想を、今回さきがけ事業によって現実のものとして立ち上げることができた。非モデル生物を扱っているため、その基礎的な実験系の構築には大きな労力を要した。幸い、さきがけ研究によって、アブラムシの完全長 cDNA ライブラリなどの研究リソースをはじめ、次世代シーケンサーを利用した解析技術やイメージング技術、遺伝子データベースを開発することができた(文献 2-4)。これらは今後の研究にとってもきわめて有用であり、研究者コミュニティにも公開している。「共生」は生物が新規機能を獲得する上で重要な役割を果たしており(Smith 1989 Nature)、共生生物学には基礎と応用科学の両面で注目が高まっている。本研究で開発したリソースによって、アブラムシ共生系は共生による代謝的新規性を遺伝子レベルで研究できるモデルとしての地位を確立したといえる。

アブラムシのゲノム解析や共生器官のトランスクリプトームにより、代謝の共生的制御に関わる可能性のある遺伝子の候補を多数見いだすことに成功した。これらは、共生を支える分子機構の詳細を明らかにする上で、強力な基礎的データである。

さきがけ研究は個人研究であるゆえ、研究を発展させるためには他の研究者との連携が重要である。国際アブラムシゲノム解析コンソーシアムに参加しただけでなく、本研究期間の約半分は米国プリンストン大学に研究拠点を置いたことにより、広い人的ネットワークを築くことができた。今後の研究を展開する上で重要な財産になろう。

6. 研究総括の見解

アブラムシと細胞内共生細菌の協調的な代謝制御のメカニズムをゲノムレベルで解析し、アミノ酸等栄養分代謝の遺伝子レパートリーが昆虫と細菌で相補的であること、共生をコントロールする master gene 候補 DII の同定、共生器官が産生する新規分泌たんぱく質の同定など優れた成果が得られた。これらの成果は今後さらに詳細な検討がなされるべきものであり、今後の発展を大いに期待したい。当初計画されていた代謝の生化学的研究については今後の研究に委ねられることになるが、成果を期待する。

7. 主な論文等

A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

①論文 *corresponding author

1. Shigenobu, S.*, Bickel, R.D., Brisson, J.A., Butts, T., Chang, C., Christiaens, O., Davis, G.K., Duncan, E.J., Ferrier, D.E.K., Iga, M., Janssen, R., Lin, G., Lu, H., McGregor, A.P., Miura, T., Smagghe, G. Smith, J.M., van der Zee, M., Velarde, R., Wilson, M. J., Dearden, P.K., Stern D.L. Comprehensive survey of developmental genes in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*: frequent lineage-specific duplications and losses of developmental genes . *Insect Mol Biol*, in press.
2. Shigenobu S.*, Richards S., Cree A. G., Morioka M., Fukatsu T, Kudo T., Miyagishima S., Gibbs R. A., Stern D. L., Nakabachi A. A full-length cDNA resource for the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Insect Mol Biol*, in press.
3. International Aphid Genomics Consortium. (2009) Genome sequence of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *PLoS Biology*, in press.
4. Legeai, F., Shigenobu, S., Gauthier, J., Colbourne, J., Rispe, C., Collin, O., Richards, R., Wilson, A., and Tagu, D. AphidBase: A centralized bioinformatic resource for annotation of the pea aphid genome. *Insect Mol Biol*, in press.

②招待講演

1. 重信秀治「発生学・共生学の接点－アブラムシ細胞内共生系を中心に」日本節足動物発生学会第45回大会(ひたちなか)2009年6月5-6日
2. Shigenobu S., Stern D., “Interdependent Genomes: the Aphid and the Bacterial Symbiont” The 7th Okazaki Biological Conference. Kakegawa, Japan. Jan 11-14, 2010.

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

①論文

1. Huang, T., Cook, C.E., Davis, G.K., Shigenobu, S., Chen, C., and Chang, C.C. Anterior development in the parthenogenetic and viviparous form of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*: hunchback and orthodenticle expression. *Insect Mol Biol*, in press.