

論文題目

細胞内共生細菌 *Cardinium* および *Wolbachia* と宿主昆虫類との相互作用

氏名 中村 有希

【序論】

昆虫を始めとする節足動物は、その体内に様々な微生物を保持しており、その微生物と共生関係を築くことにより、限られた餌や環境条件に上手く適応している。それとは別の共生関係として、宿主の生存には影響しない、宿主の生殖に影響を与えている微生物が存在する。その代表と言えるのが、 α プロテオバクテリアに属する *Wolbachia* で、*Wolbachia* は昆虫を始めとする節足動物宿主に様々な生殖異常（単為生殖、雄殺し、雌化、細胞質不和合性）を引き起こす。最も報告例が多いのが細胞質不和合性（CI）で、*Wolbachia* に感染していない雌と感染している雄が交尾したときに、産下卵の胚発育が停止し、致死となる現象である。そのような生殖異常を引き起こす能力は、*Wolbachia* が独自に保有しているものであると考えられてきたが、系統的に異なる細菌 *Cardinium* も *Wolbachia* と同様の生殖異常を引き起こすことが近年分かってきた。*Cardinium* は、*Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* グループに属し、単為生殖、雌化、細胞質不和合性の3つの表現型を引き起こすことが報告されている。ただしその報告例は未だ少なく、寄生蜂およびハダニで見つかっている数例にとどまる。また節足動物全般における *Cardinium* の感染率は4-7%で、*Wolbachia* の感染率20-75%に比べると低い。*Wolbachia* と *Cardinium* の引き起こす生殖異常が共通する機構によってもたらされているどうかは不明であるが、*Cardinium* との比較を突破口として、生殖異常のメカニズムが明らかになる可能性がある。本研究では、これまで明らかにされていない *Cardinium* の情報を積み重ね、*Cardinium* の全体像の把握に努めた。その中で、同一宿主に感染している *Cardinium* と *Wolbachia* の関係および *Cardinium* と *Wolbachia* が宿主に与える影響の違いについて調査した。

【結果および考察】

1. 特定の節足動物グループにおける *Cardinium* の感染状況の調査および *Cardinium* の再分類

ウンカおよびハダニにおける *Cardinium* の分布状況を特異的プライマーを用いた PCR により調査した。*Cardinium* はウンカ 57 種のうち 27 種に感染しており (47.4%)、ハダニ 22 種のうち 9 種に感染していた (40.9%)。ウンカとハダニはともに *Cardinium* が高い割合で感染しており、*Cardinium* の感染が最も広がっている生物と言える。また *Wolbachia* の感染も見つかかり、ウンカにおいては *Cardinium* と *Wolbachia* の重複感染が有意に高く検出された ($P < 0.05$)。牛などの家畜に病気を引き起こすヌカカからも *Cardinium* に似た細菌が検出された。しかしその細菌は、これまで見つかった *Cardinium* とは 16S rRNA 遺伝子の配列が 6% 異なっていた。一般的に細菌は 16S rRNA 遺伝子で 3% 異なると別種とされているが、昆虫の共生細菌は、その宿主と共に進化してきた結果、8-10% の違いを持っていても一種の細菌として扱われている。ヌカカに由来する細菌を *Cardinium* と呼べるかどうかの指標として、*Cardinium* が持つ形態的な特徴であるマイクロフィラメント様構造に注目したところ、ヌカカに由来する細菌もこの構造を有していた (図 1)。*Cardinium* に近縁な植物寄生性線虫の共生細菌 *Paenicardinium* もこの構造を持つことが報告されている。16S rRNA 遺伝子の配列と形態から、上記の細菌を全て *Cardinium* 属に含め、その下にそれぞれのグループに分けることを提案した (図 2)。

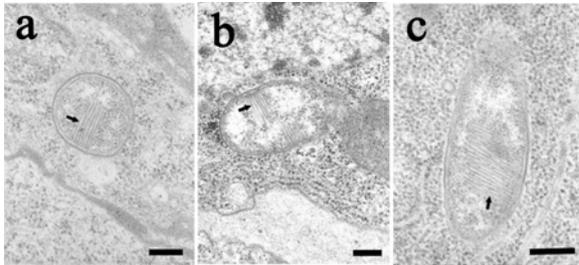


図 1. *Cardinium* の電子顕微鏡写真.

(a)セジロウンカの follicle cell, (b)クワオオハダニの follicle cell, (c)レンチヌカカの oocyte.

矢印はマイクロフィラメント様構造を示す.

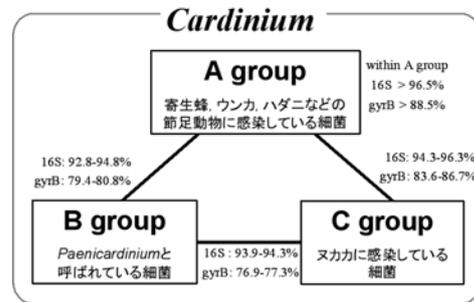


図 2. *Cardinium* の A, B, C グループの関係.

16S rRNA 遺伝子 (1,447-1,448 bp) および gyrB (286 アミノ酸) の一致率を示した.

2. *Cardinium* と *Wolbachia* の感染がセジロウンカの生殖に与える影響の調査

Cardinium と *Wolbachia* の重複感染の影響をセジロウンカを用いて調査した。セジロウンカはイネの害虫で、毎年東南アジアから季節風に乗って中国や日本などに飛来する。*Cardinium* と *Wolbachia* の感染を調査した 6 ヶ国 26 個体群の全てのセジロウンカは *Cardinium* と *Wolbachia* に重複感染していた。その重複感染しているセジロウンカに抗生物質を投与して、非感染系統ならびに *Cardinium* 単独感染系統を作出した。*Wolbachia* 単独感染系統を作るとは困難で未だ得られていない。これらの系統と、もとの重複感染系統との間で交配を行

い、卵の孵化率を調査した。その結果、非感染系統同士の交配における孵化率は 85.2%であったのに対し、非感染雌と *Cardinium* 感染雄間の孵化率は 21.4%、非感染雌と重複感染雄間の孵化率は 4.3%であった (表 1)。*Cardinium* は CI を誘導しており、また *Cardinium* と *Wolbachia* の重複感染はそれよりも強い CI を誘導した。それぞれの細菌の密度を計測すると、*Cardinium* が *Wolbachia* よりも雄で 5 倍、雌では 10 倍高く、生殖巣では雄で 57 倍、雌で 10 倍高かった。CI の強さと細菌密度には正の相関性があると言われている。強い CI を引き起こす細菌は短期間で感染が宿主個体群内に広がり、その感染は固定すると考えられているが、セジロウンカでは *Cardinium* と *Wolbachia* がともに誘導する CI により、これら 2 種の感染がセジロウンカ全体に広がり、その結果重複感染が固定している、あるいはそれに近い状態にあると考えられた。

表 1. *Cardinium* 単感染と *Cardinium* と *Wolbachia* の重複感染が誘導する CI

♀ x ♂	N	孵化率 (%)	産卵数
U x U	39	85.2 ± 3.40 a	35.9 ± 3.84
U x <i>Car</i>	38	21.4 ± 4.83 b	34.1 ± 3.87
U x <i>CarWol</i>	15	4.3 ± 3.02 c	20.2 ± 3.02
<i>Car</i> x U	35	89.2 ± 3.50 a	36.7 ± 3.68
<i>Car</i> x <i>Car</i>	43	89.3 ± 2.96 a	32.1 ± 3.56
<i>Car</i> x <i>CarWol</i>	18	60.4 ± 5.91 b	39.2 ± 4.13
<i>CarWol</i> x U	34	84.6 ± 3.39 a	41.4 ± 3.83
<i>CarWol</i> x <i>Car</i>	36	79.1 ± 4.41 a	39.7 ± 4.01
<i>CarWol</i> x <i>CarWol</i>	12	88.6 ± 3.18 a	34.3 ± 3.44

U: 非感染個体, *Car*: *Cardinium* 単感染個体, *CarWol*: 重複感染個体を示す.

3. *Cardinium* と *Wolbachia* の感染が発現に影響を与える宿主細胞遺伝子

Cardinium と *Wolbachia* がそれぞれ宿主の遺伝子発現にどのような影響を及ぼしているか、特に宿主の免疫に与える影響について、カイコ培養細胞 (Bm-aff3 細胞) とカイコ 22K マイクロアレイを用いて調査した。実験には、細胞での培養が唯一できているマダニに由来する *Cardinium* と非常に強い CI を誘導するヒメトビウンカの *Wolbachia* を使用した。*Cardinium* の感染では、宿主の免疫応答遺伝子である *cecropin B*, *lysozyme*, *lebocin*, *tox*, *gloverin* 遺伝子、セリンプロテアーゼ遺伝子、細菌の細胞壁成分を認識するパターン認識蛋白質遺伝子などの発現量が増加しており、宿主の生体防御反応を引き起こしていた (図 3)。一方 *Wolbachia* の感染では、それらの遺伝子の発現量の増加は見られなかった。その原因は、*Wolbachia* は宿主に認識されていないためであると考えられた。宿主細胞の *Cardinium* と *Wolbachia* の認識の違いを探るため、それぞれの細菌のゲノムを比較した。*Cardinium* のゲノムは本研究室にてドラフトシーケンスを解読しており、*Wolbachia* は数種類のゲノムが公開されている。まずグラム陰性細菌の細胞壁の主要成分の 1 つであるリポ多糖 (LPS) の有無をみると LPS 合成酵素である *lpxA*, *lpxB*, *lpxC*, *lpxD*, *lpxH*, *lpxK*, *lpxL*, *lpxM*, *kdtA* は *Cardinium* のゲノム中に

存在し、*Wolbachia* はそれらの合成酵素を持っていなかった。また、もう 1 つの細胞壁成分であるペプチドグリカン合成するためのペプチドグリカン合成酵素である *murA*, *murB*, *murC*, *murD*, *murE*, *murF*, *alr*, *ddl*, *mraY*, *murG* は *Cardinium* のゲノム中に存在した。*Wolbachia* も同様にペプチドグリカン合成酵素を持っているものの、2 つの異性化酵素 (*murI* と *alr*) がいないため、一般的な細菌とは少し異なる構造であることが予想される。そのため、一般的な細菌と同じ構造をしていると考えられる *Cardinium* の細胞壁は宿主に認識され、LPS を失い、ペプチドグリカンの形状が変化していると考えられる *Wolbachia* の細胞壁は認識されていないことが示唆された。ただし *Cardinium* のゲノム中にはフルクトース-6-リン酸から UDP-N-acetylglucosamine を合成する酵素 (*glmS*, *glmM*, *glmU*) が見つからなかった。

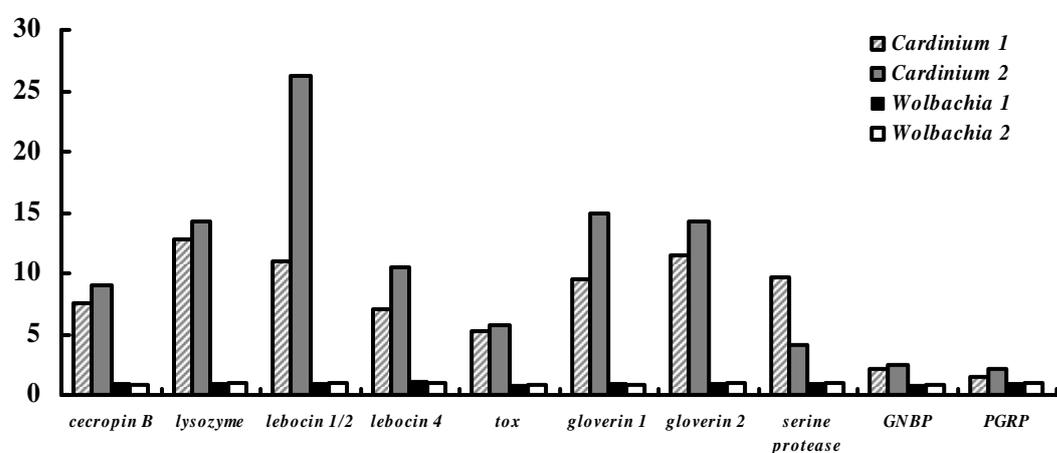


図 3. *Cardinium* および *Wolbachia* の感染による免疫応答遺伝子の発現量への影響。

Cardinium 1 と *Wolbachia* 1 は非感染細胞と同量の感染細胞を混ぜて 24 時間後における発現量、*Cardinium* 2 と *Wolbachia* 2 は 72 時間後の発現量で、それぞれの感染細胞で非感染細胞に比べ何倍の発現量になったかを示した。

【結論】

Cardinium とは、マイクロフィラメント様構造を持ち、宿主の生殖異常を引き起こすものを含む細胞内共生細菌である。本研究において、*Cardinium* を 16S rRNA 遺伝子が 8%異なるものを含む 3 つのグループからなる 1 属の細菌とすることを提案した。*Cardinium* はウンカ類とハダニ類に広く感染しており、ウンカ類には *Cardinium* と *Wolbachia* が有意に高く重複感染していた。セジロウンカを用いて生殖への影響を調査すると、*Cardinium* と *Wolbachia* は同一個体内で共に CI を起こしており、それぞれの細菌の引き起こす CI が両細菌の感染を個体群内および個体群間に広げていると考えられた。*Cardinium* と *Wolbachia* の感染が宿主細胞に与える影響として、*Cardinium* は宿主の免疫応答遺伝子の発現を誘導していた。一方の *Wolbachia* は、宿主細胞の遺伝子発現にほとんど影響を与えていなかった。*Cardinium* と *Wolbachia* が異なる細胞壁を持つことがそれぞれの細菌のゲノムより推測され、それにより発現の違いが引き起こされると考えられた。