



平成25年 7月 9日

世界初、昆虫と融合した「用心棒バクテリア」を発見

— キジラミ細胞内でしか生きられない共生細菌が、毒を合成して宿主を防衛 —

皆さんは「共生」という言葉から何を連想しますか？

海の人気者、クマノミとイソギンチャクの、持ちつ持たれつの関係を思い出す方も多いかも知れません。クマノミは、毒をもつイソギンチャクを利用して天敵から身を守る一方、イソギンチャクにエサのおこぼれを与えます。また、私たちの細胞の中にあり、酸素呼吸に欠かせない「ミトコンドリア」が、遠い昔、私たちの祖先に取込まれたバクテリアの末裔であることをご存知の方もいるかも知れません。このように、共生は生物の進化においてとても大切な役割を果たしてきました。

今回、豊橋技術科学大学の中鉢 淳 准教授らは、理化学研究所、産業技術総合研究所、東京大学、東京工業大学、国立遺伝学研究所、チューリッヒ工科大学（スイス）、ボン大学（ドイツ）などと共同で、ミカンキジラミという害虫が、毒を作るバクテリアと融合して自らの一部とし、これを武器として天敵から身を守っていることを、明らかにしました。これは、ミトコンドリアのように宿主生物と一体化しながら、クマノミにとってのイソギンチャクのように防衛機能を果たす、まったく新しい共生の形を示すもので、これまでの常識を覆す、世界初の発見です。今回の成果は、生物学全般に大きなインパクトを与えるばかりでなく、毒を利用した画期的な医薬（抗がん剤等）の開発や、これまでにない、環境負荷の低い害虫防除法の開発につながると期待されます。

この研究成果は2013年7月11日（現地時間）に米国の学術誌「Current Biology」にオンライン掲載されます。



図 自らと一体化した共生バクテリアを利用して身を守るミカンキジラミ。
（撮影：中鉢淳）

本件に関し取材ご希望の際は、下記担当までご連絡下さい。

総務課広報係 岡崎・小島 Tel. 0532-44-6506

世界初、昆虫と融合した「用心棒バクテリア」を発見

— キジラミ細胞内でしか生きられない共生細菌が、毒を合成して宿主を防衛 —

研究成果のポイント

- 生物進化の常識を覆す、宿主動物と一体化した「防衛共生体」の発見。
- 共生細菌から新規薬理活性物質を単離。抗がん剤などの創薬に期待。
- 共生系を標的とする、環境にやさしい害虫防除法の開発へ。

(概要)

豊橋技術科学大学の中鉢 淳 准教授らは、理化学研究所、産業技術総合研究所、東京大学、東京工業大学、国立遺伝学研究所、チューリッヒ工科大学（スイス）、ボン大学（ドイツ）などと共同で、カンキツ類の重要害虫であるミカンキジラミ^{*1}にすむ2種の共生細菌「カルソネラ」^{*2}と「プロフテラ」^{*3}の全ゲノム^{*4}塩基配列を決定するとともに、分子生物学・生化学・薬理的解析を行うことで、前者が宿主に必須アミノ酸^{*5}を供給する「栄養共生体」、後者が細胞毒を合成して宿主を天敵から守る「防衛共生体」であることを明らかにしました。いずれも世界のミカンキジラミ個体群に広く存在し、宿主の共生器官^{*6}の細胞内に収納され、虫の親から子へと垂直感染^{*7}により永続的に受継がれ、極小ゲノムを持つなど、ミトコンドリアや葉緑体などのオルガネラ^{*8}のように宿主生物と一体化した特徴を示しましたが、これまでそうした共生細菌の中で、防衛機能を持つものは知られていませんでした。プロフテラの発見は、従来の常識を覆し、共生による進化の新たな側面を示すものとして、生物学全般に大きなインパクトを与えるものです。また、本研究により得られた新規防衛物質「ディアフォリン」^{*9}は、強い細胞増殖阻害活性^{*10}を持つことから、抗がん剤などの医薬開発への応用展開が期待されます。さらに、今回解明した特性から、ミカンキジラミの複合共生系は、宿主昆虫の生存に不可欠と見られる一方、周辺環境中の他の生物には存在しないため、選択性が高く、安全で効果的な新規害虫防除法開発の標的として有望であることも示されました。

この研究成果は2013年7月11日（現地時間）に米国の学術誌「Current Biology」にオンライン掲載されます。

1. 背景

ミカンキジラミ (*Diaphorina citri*) (図1) は、カンキツグリーニング病^{*11}の媒介により世界のカンキツ産業に深刻な被害を与えている、きわめて重要な農業害虫です。腹部体腔内に「バクテリオーム」と呼ばれる共生器官を持ち、その表層を構成する単核の「菌細胞」内に、キジラミ類に普遍的に存在する「カルソネラ」、バクテリオーム内層の多核細胞内に、これまで同種でのみ見つかっている「プロフテラ」を収納しています。この複合共生系の機能と進化を解明するため、ミカンキジラミ共生細菌2種のゲノム解析を計画しました。

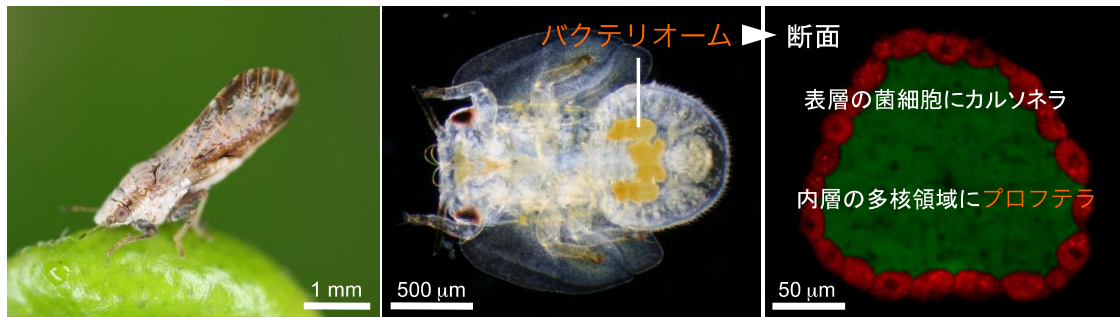


図1 (左) ゲッキツ上のミカンキジラミ成虫。(中) ミカンキジラミ5齢幼虫. 腹部に見える黄色いクロワッサン型の構造が、共生器官「バクテリオーム」。(右) バクテリオームの断面。表層の単核菌細胞内にカルソネラ(赤色)、内層の多核領域内にプロフテラ(緑色)が多数収納されている。

2. 研究手法と成果

奄美大島で採集後、研究室で累代飼育されていたミカンキジラミを解剖してバクテリオームを単離し、含まれるゲノムDNAをMDA法^{*12}で増幅したのち、全ゲノムショットガンシーケンス法^{*13}により、カルソネラとプロフテラの全ゲノム塩基配列を決定しました(図2)。

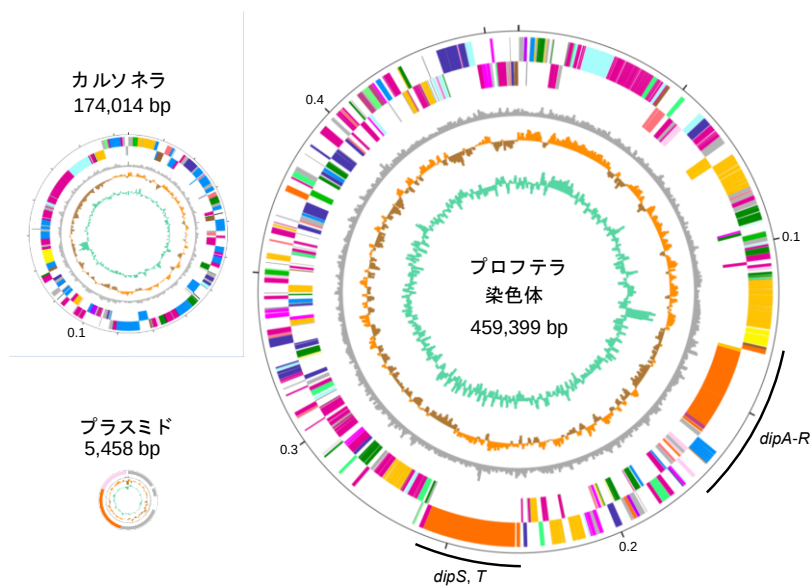


図2 (左上) カルソネラのゲノム。(右) プロフテラの染色体. 二次代謝関連遺伝子群(*dipA-dipT*)が、ゲノム上の広い領域を占めることが分かる。(左下) プロフテラのプラスミド(染色体とは独立した自律複製因子)。

その結果、カルソネラのゲノム（174,014 塩基対）は、モデル生物である大腸菌のゲノム（5 百万塩基対程度）の 1/30 程度のサイズで、既報のカルソネラ_PV（159,662 塩基対）と同様きわめて小さく、遺伝子の配列順などゲノム全体の構造がカルソネラ_PV との間で良く保存されており、その遺伝子組成は、キジラミの餌である植物師管液に乏しい必須アミノ酸の合成に特化したものであることが分かりました。また、ミカンキジラミのカルソネラはカルソネラ_PV と異なり、2 種類の必須アミノ酸、トリプトファンとヒスチジンを合成する完全な能力を持つことも明らかとなりました。以上の事実は、カルソネラがミカンキジラミに不足する栄養の補償を行う「栄養共生体」であることを示します。栄養共生体の多くは宿主の生存に不可欠であり、進化的に安定であらゆる個体に存在し、宿主の共生器官に収納され、垂直感染のみにより永続的に受継がれ、その過程でゲノムサイズが縮小する傾向を示します。カルソネラはそのゲノム縮小の最も極端な例のひとつと言えます。

一方、プロフテラのゲノムサイズは 464,857 塩基対で、カルソネラには及ばないものの、大腸菌ゲノムの 1/10 程度と、やはりきわめて小さいものでした。これは、プロフテラが長期にわたり、宿主キジラミとの間で互いになくってはならない緊密な相利共生関係にあったことを示唆します。ところが、その遺伝子組成を調べると、栄養補償関連遺伝子は少なく、二次代謝産物^{*14}の合成に関わる遺伝子群がゲノム全体の 15%と広い領域を占めました（図 2）。その遺伝子レパートリー（図 3 A）や個々の遺伝子の構造を手がかりとして、最終産物の構造を推定し（図 3 B）、予測構造を利用して、高速液体クロマトグラフィー^{*15}により、ミカンキジラミから標的化合物を単離、定量したところ、この物質はミカンキジラミの雌雄いずれにおいても高濃度で含まれることが明らかとなりました。さらに、得られた化合物に対して核磁気共鳴分光法^{*16}や質量分析法^{*17}を適用することで、詳細な構造を決定しました（図 3 D）。その結果、プロフテラはハネカクシ^{*18}のもつ強力な細胞毒「ペデリン」^{*19}（図 3 C）とよく似た構造の新規化合物を合成することが明らかとなり、「ディアフォリン」と名付けました。ディアフォリンの生理機能を検証するため、ヒトとラットのがん細胞に由来する 2 種類の培養細胞を用いて薬理活性検定（図 4）を行ったところ、当該化合物が、これらの細胞の分裂・増殖を抑制する強い活性を持つことが明らかとなりました。

さらに、ディアフォリン合成関連遺伝子群について分子系統解析^{*20}を行うと、これらは「遺伝子水平転移」^{*21}により他の系統の細菌から獲得され、その多くが、ペデリン合成関連遺伝子群と共通の起源を持つことが分かりました。

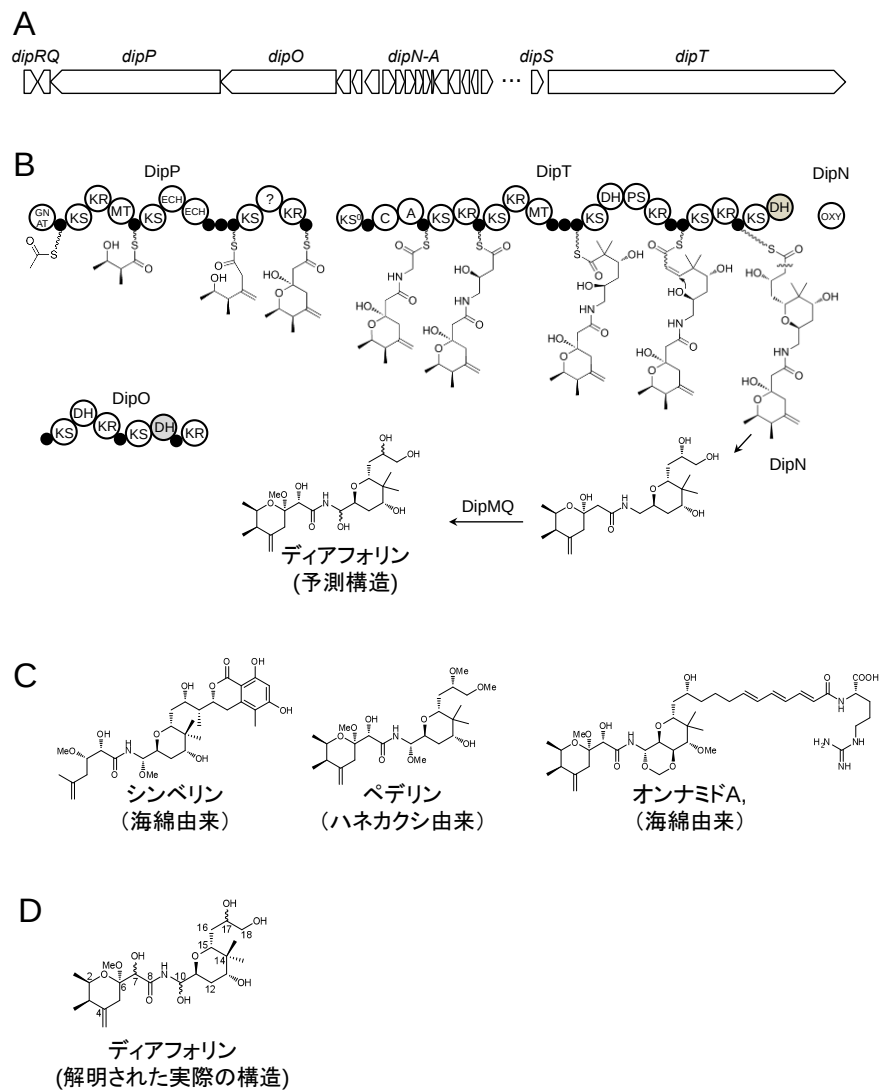


図3 ディアフォリンの構造解析。(A)プロフテラゲノム上のディアフォリン合成系遺伝子群。(B)遺伝子組成と遺伝子構造に基づく代謝経路・産物構造の推定。(C)ディアフォリンの類縁体。(D)NMR, 質量解析などにより解明されたディアフォリンの実際の構造。

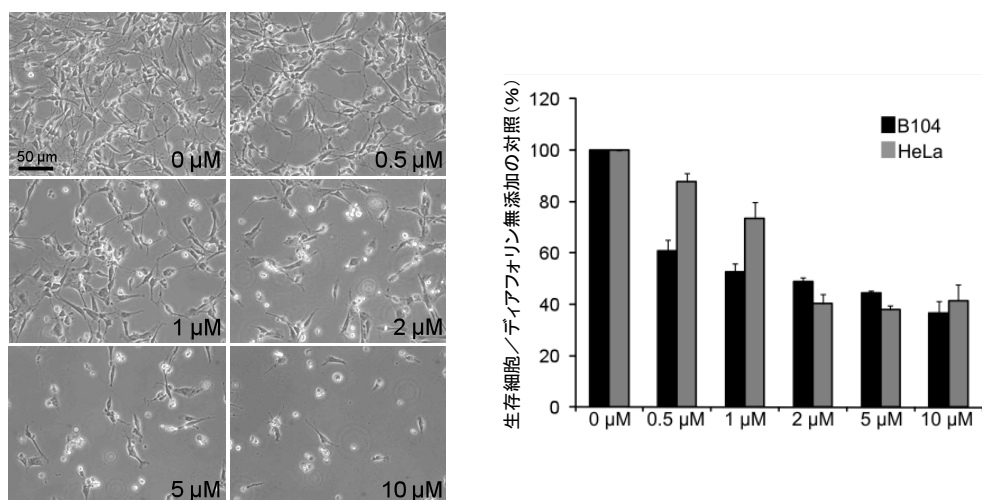


図4 (左) 各濃度のディアフォリン添加48時間後のラットB104細胞。
(右) 各濃度のディアフォリン添加48時間後のラットB104細胞とヒトHeLa細胞の、対照に対する生細胞数の比。

また、日本、台湾、インドネシア、アメリカ合衆国で採集された9つの個体群の合計806頭（雄:409頭、雌:397頭）について、診断PCR法^{*2,2}を用いて、共生細菌およびディアフォリン合成系遺伝子3種（*dipO*, *dipP*, *dipT*）の存否を調べました。その結果、806頭すべての個体がカルソネラとプロフテラの両者に感染していること、およびすべての個体中にディアフォリン合成系遺伝子3種が存在することが確認されました。これは、プロフテラやその二次代謝産物であるディアフォリンが、ミカンキジラミの生存に必須な役割を果たしていることを示唆するものです。

以上のことからプロフテラは、宿主動物と一体化した特徴を示す「防衛共生体」と結論づけることができ、世界初の発見です。先述のように、宿主の栄養要求を満たし続ける必要のある「栄養共生体」は、進化的に安定なことが知られていましたが、天敵関連の環境要因は頻繁かつ劇的に変動する一方、毒を産生する防衛共生体の維持には比較的大きなコストがかかると考えられるため、こうした細菌は宿主個体群中に安定的に保持されず、ゲノムもほとんど縮小しない(>>百万塩基対)というのが定説でした。ところがプロフテラは防衛共生体でありながら、あらゆる個体に存在し、宿主の共生器官に収納されて垂直感染により受継がれ、ゲノムサイズはわずか46万塩基対と多くの栄養共生体のゲノムさえ下回り、この常識を覆しました。

3. 今後の期待

ディアフォリンの類縁物質はほぼ例外無く抗がん活性を持ち、がんやアルツハイマー病の臨床試験に供されているものも含まれます。ディアフォリンは、上記薬理活性試験ですでに細胞増殖阻害効果が確認されているため、これを創薬シード化合物として用いた応用展開が期待されます。また、現在我々はミカンキジラミに近縁なキジラミの共生細菌叢の解析を進めており、プロフテラの姉妹種が見つかり始めています。今後はこうした細菌の各種解析を進めることで、プロフテラの特異な進化過程を明らかにするとともに、多様なディアフォリン類縁物質からなるライブラリーを構築し、応用展開の基盤としたいと考えています。また、同時に昆虫-細菌間共生系の理解を深め、これを標的とした環境負荷の低い新規害虫防除法の開発もめざします。

発表者

国立大学法人豊橋技術科学大学・エレクトロニクス先端融合研究所(EIIRIS) 准教授
(独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター 客員研究員)

中鉢淳

Tel: 0532-44-6901

E-mail: nakabachi@eiiris.tut.ac.jp

報道担当

国立大学法人豊橋技術科学大学・総務課広報係 岡崎・小島

Tel. 0532-44-6506

e-mail: kouho@office.tut.ac.jp

(補足説明)

* 1 ミカンキジラミ

「キジラミ」は、半翅目・腹吻亜目のキジラミ上科に属する昆虫の総称で、世界で約2,500種が知られる。同じ腹吻亜目に属するアブラムシなどと同様、針状の口吻を維管束に差し込んで植物の篩管液を吸い、この採餌行動の際にしばしば植物病原体を媒介する。今回の解析に用いた「ミカンキジラミ」は、キジラミ科に属し、カンキツ類やゲッキツを寄主とする種で、体長は約3 mm（翅の先まで約4 mm）。アジアの熱帯・亜熱帯地域に広く棲息するが、近年、中東や南北アメリカ大陸に侵入するなど、分布を広げている。日本においても南西諸島から北上しており、九州本土への上陸が確認された。吸汁による植物への直接被害は軽微だが、カンキツ類を枯死させるカンキツグリーンニング病（補足説明* 1 1 参照）を媒介するため、世界的にきわめて重要な農業害虫である。

* 2 カルソネラ

Candidatus Carsonella ruddii。ガンマプロテオバクテリア綱に属する細菌。すべてのキジラミが保有していると考えられ、2億年ほど前にキジラミの共通祖先にカルソネラの共通祖先が感染したのち、垂直感染のみにより受継がれ、キジラミと共種分化してきたものと考えられている。多くのキジラミ種は、このカルソネラに加え、多様な系統の「二次共生細菌」を共存させている。我々の先行研究により、二次共生細菌を欠く北米産キジラミ由来のカルソネラ_PVのゲノムは、葉緑体のゲノムと同レベルの16万塩基対にまで縮小し、際立って乏しい遺伝子組成を持つことが明らかとなっていた（*Science*, 2006）。

* 3 プロフテラ

Candidatus Proffittella armatura。これまでのところミカンキジラミのみから見出されている、ベータプロテオバクテリア綱に属する共生細菌。今回の発表論文にて種名提唱。

* 4 ゲノム

それぞれの生物の持つ遺伝情報の総体。各々の遺伝情報は、DNA（デオキシリボ核酸）上の4種類の塩基の配列により暗号化されている。一般的な細菌のゲノムサイズは2-6百万塩基対程度。

* 5 必須アミノ酸

アミノ酸のうち、哺乳動物や昆虫を含む後生動物が体内で十分量合成出来ず、食物などから摂取する必要があるもの。トリプトファン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、トレオニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、アルギニン、ヒスチジン。

* 6 共生器官

共生微生物を収納、維持するために特殊化した多細胞生物の器官。キジラミをはじめとする多くの昆虫に見られる「バクテリオーム」は、共生微生物を内包する特殊な細胞「菌細胞」から構成され、共生器官の典型例のひとつ。

* 7 垂直感染

微生物が、宿主から直接その子孫に伝播される感染様式。これに対して個体間で起こる、より一般的な感染は水平感染と呼ばれる。

* 8 オルガネラ

細胞（内）小器官。細胞内で特定の形態と機能を持つ構造で、核を持つ生物である「真核生物」で発達する。このうち、酸素呼吸の場である「ミトコンドリア」と光合成の場である「葉緑体」は、細胞内共生により取込まれた細菌の末裔である。

* 9 ディアフォリン

今回の研究で得られた、新規薬理活性物質で、「ポリケチド」と呼ばれる構造上の特徴を持つ化合物のひとつ。

* 10 細胞増殖阻害活性

あらゆる細胞は分裂により増殖するが、その過程を抑制・阻害する活性。がん細胞は正常細胞に比べて分裂・増殖が速い傾向を持つことから、抗がん剤の多くが、細胞増殖阻害剤である。

* 11 カンキツグリーニング病

カンキツ類の師部に、病原体 *Candidatus Liberibacter* spp. (以下リベリバクター。アルファプロテオバクテリア)が感染することで生じる植物病。その伝播はキジラミの採餌行動（感染樹の師管液を吸汁することでキジラミ体内にリベリバクターが取込まれ、その後の非感染樹での採餌の際に、リベリバクターが師管に注入される）および接木による。媒介キジラミは2種知られ、アフリカ以外の地域ではミカンキジラミが唯一の媒介者となる。罹患すると樹勢は衰え、果実の商品価値は消失する。現在のところ、治療法は存在せず、一度感染すると罹患樹は数年以内に必ず枯死するため、発生地域ではカンキツ産業が壊滅的な打撃を受けることが多い。

* 12 MDA (multiple displacement amplification) 法

高い伸長性と強いDNA鎖置換能を持つファイ 29 ファージのDNA合成酵素を利用して、対象となるゲノム全体を増幅する手法。

* 13 ショットガンシーケンス法

生物のゲノムDNAを多数の短い配列に断片化したのち、個々の塩基配列を決定し、それらのデータを計算機上でつなぎあわせることで、ゲノム全体の配列を決定する手法。

* 14 二次代謝産物

生命活動に欠くことに出来ない代謝（一次代謝）と異なり、生命維持に直接関与しない副次的な代謝（二次代謝）の産物。種間競争や、防御などに利用されるものが多い。

* 15 高速液体クロマトグラフィー

物質の分離・精製に用いる手法のひとつ。溶媒に溶かした試料に高圧をかけながら、円筒状容器に充填剤をつめた「カラム」に通すことで、高分離能、高感度で物質の分離・検出・定量を行う。

＊１６ 核磁気共鳴分光法

NMR (nuclear magnetic resonance)。原子核の化学的環境に関する情報を得る手法。さまざまな生体分子の構造決定に広く用いられる。

＊１７ 質量分析法

試料をイオン化し、その質量数と電荷数に基づいて分離・分析する手法。試料中の化合物の同定・定量、構造解析などに用いられる。

＊１８ ハネカクシ

鞘翅目・ハネカクシ上科・ハネカクシ科に属する昆虫。

＊１９ ペデリン

アオバアリガタハネカクシ (*Paederus fuscipes*) などの *Paederus* 属ハネカクシの体液に含まれる毒性成分で、皮膚などに接触すると激しい炎症を起こす。*Pseudomonas* 属に属する共生細菌により合成され、天敵からの防衛機能を持つ。この細菌は雌個体の多くに存在するが、雄にはいないため、ペデリンの存否もこれに従う。

＊２０ 分子系統解析

あらゆる生物は遺伝情報を担う核酸と、それに基づいて合成されるタンパク質を持つが、これらの塩基配列や、アミノ酸配列などを比較することで、遺伝子間・生物間の系統関係や進化過程を推定する手法。

＊２１ 遺伝子水平転移

生物の遺伝子は、通常親から子へと伝えられていくが、これに対して親子関係にならない生物体の間で遺伝子移ること。

＊２２ 診断 PCR 法

DNA 上の任意の配列を増幅するポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction) を用いて、試料中の特定の DNA 配列の存否を調べる手法。