

26. ボルバキア逆遺伝学の創成

東京大学大学院農学生命科学研究科 教授 勝間 進

概要

ボルバキアは昆虫の60%以上に感染していると考えられており、その宿主制御の巧みさも相まって「最も成功した寄生者」と言われている。ボルバキアは4種類の性・生殖操作を行うが、その実行因子とその分子機構が解明されているのは、キイロショウジョウバエに感染するボルバキア *wMel* の「細胞質不適合」と私たちのグループによるアワノメイガに感染するボルバキア *wFur* の「オス殺し」だけであった。この主たる原因は、ボルバキアの遺伝子操作が不可能であり、遺伝子機能解析が宿主での過剰発現系に依存しているためである。最近の研究から、ボルバキアをはじめとする共生細菌の遺伝子機能は宿主における過剰発現系による解析だけでは正しい結論を出すことが難しいことも判明しており、ボルバキア自身における逆遺伝学プラットフォームの創成が切望されている。本課題では、ボルバキアにおける逆遺伝学のツールを開発すべく、ボルバキア感染培養細胞の樹立、ボルバキア移植実験系の構築、ボルバキア遺伝情報の整備、およびゲノム編集モジュールの作成を目指したボルバキア移行配列の探索を行った。その結果、ノメイガ類のボルバキアを材料として、感染細胞の樹立、および移植実験系確立に成功した。一方、ボルバキア移行配列はまだ見つけられておらず、探索を継続し、ゲノム編集ツールの開発を目指す予定である。

背景および目的

私たちは、チョウ目昆虫の性決定研究をきっかけに、ボルバキアによる「オス殺し」現象の解明に取り組んできた。私たちは、2014年にカイコの性決定がW染色体上の小分子RNAである *Fem* piRNA とZ染色体上のオス化遺伝子 *Masc* によって行われることを明らかにした (Kiuchi et al., *Nature*, 2014)。これはチョウ目昆虫として初めて、性決定カスケード最上位遺伝子を同定した報告であったが、それと同時にオス化遺伝子 *Masc* が遺伝子量補償に関与し、チョウ目昆虫における遺伝子量補償の破綻がオス特異的胚致死をもたらすことも明らかにした。私たちはこの現象がボルバキアによる「オス殺し」のフェノコピーであると考え、その検証モデルとしてトウモロコシの害虫であるアワノメイガとそのオス殺しボルバキアを用いることにした (図1)。研究を進めた結果、仮説通り、ボルバキアはアワノメイガ *Masc* (Of*Masc*) をターゲットとしてオス殺しを引き起こしていることが証明された (Fukui et al., *PLoS Pathog.*, 2015)。しかし、研究材料としての問題、すなわち遺伝子操作や培養ができないボルバキア、および遺伝子操作や系統化がキイロショウジョウバエのように自由にできないアワノメイガ、が高いハードルとなり、研究が難航していた。この状況を打開するために、私たちはボルバキア感染胚子から培養細胞を作出し、ボルバキアを培養細胞ベースで解析する技術を開発した。それを用いた生化学的手法により、ついにボルバキアのオス殺し因子を同定することに成功した。このタンパク質 *Oscar* はアンキリンリピートを40コピーも持つユニークな構造を取り、Of*Masc* と相互作用することで細胞質において Of*Masc* を分解経路に誘導すること、その結果、オス化抑制と遺伝子量補償の破綻が引き起こされることを明らかにした (Katsuma et al., *Nat. Commun.*, 2022) (図2)。

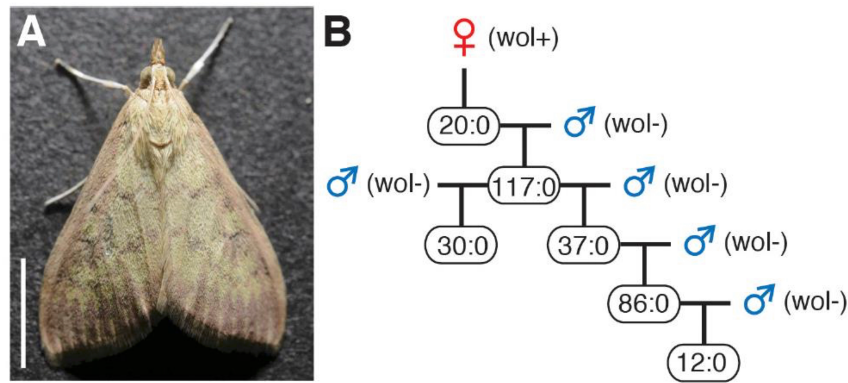


図 1. ボルバキア感染アワノメイガ(A)とオス殺し(B)

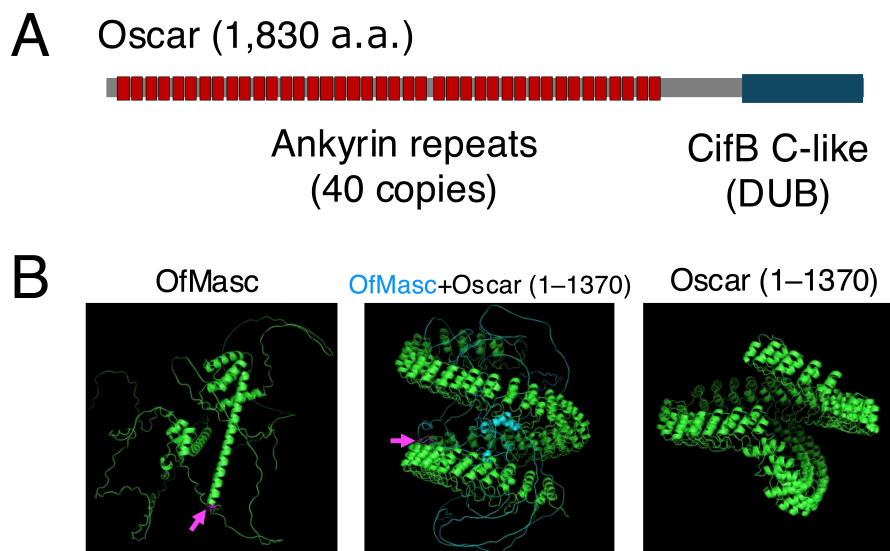


図 2. Oscar の構造と AF2 による複合体の構造予測

Oscar の構造(A)と AF2 による Oscar-Masc の構造予測(B)を示す。

以上の結果は、私たちが開発した培養細胞ベースの実験系がボルバキア研究に極めて有用であることを示している。本課題では、これまでに私たちがすでに取得した技術とツールをベースに、これまで不可能であったボルバキアにおける逆遺伝学を確立を目指す。この研究成果は、他の培養不可能な共生細菌にも応用可能なフローチャートの構築につながるものである。

方法

(1) ボルバキア感染培養細胞の樹立

ボルバキア感染、非感染の胚子から、以前に報告した方法 (Katsuma et al., *Nat. Commun.*, 2022) を用いて新規培養細胞の樹立を試みた。

(2) ボルバキア移植実験系の構築

論文で報告しているボルバキア感染培養細胞（Katsuma et al., *Nat. Commun.*, 2022）からボルバキア粗精製液を調製し、非感染アワノメイガ由来培養細胞に添加することで移植ができるかどうか検討した。また、ボルバキア感染が安定した際の細胞増殖能やオス殺し能について調査した。

(3) ボルバキア遺伝情報の整備

ボルバキア研究やゲノム編集のリソースとして利用するために、ボルバキアゲノム配列の整備を試みた。実際には、ボルバキア感染個体の卵巣を PacBio でシーケンシングすることで、ボルバキアゲノムの全長配列の取得を試みた(Muro et al., *Microb. Ecol.*, 2023)。

(4) ボルバキア移行配列の探索

ボルバキアのゲノム編集を感染培養細胞中で行うためには、ゲノム編集ツールをボルバキア内に移行させる必要がある。実際、植物オルガネラにおけるゲノム編集では、移行配列にゲノム編集モジュールを付加したツールが利用されている（Kazama et al., *Nat. Plants*, 2019）。このような配列があることを想定し、ボルバキア内に存在する宿主タンパク質を網羅的に同定することで移行配列の探索を試みた。

結果および考察

(1) ボルバキア感染培養細胞の樹立

ノメイガ類の胚子を用いて培養細胞の樹立を試みた結果、オス殺しボルバキア感染培養細胞を2種類（異なる種由来）と非感染培養細胞を1種類樹立することができた（図3）。これらは現在良好に継代できており、今後の研究に利用できる状況にある。

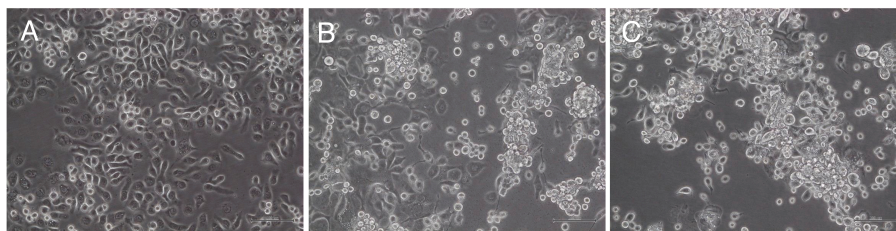


図3. 樹立したノメイガ類由来の培養細胞

AとBがボルバキア感染細胞、Cが非感染細胞である。

(2) ボルバキア移植実験系の構築

ボルバキア粗精製液を非感染培養細胞に移植した結果、移植1~2ヶ月後に細胞の状態が悪化することが多く、半分以上の試行において死滅した。一方、その状況から回復した場合は良好に継代できるようになった。その際、細胞増殖は mock 細胞（非感染細胞から調製した粗精製液を移植したもの）より移植した細胞の方が顕著に遅くなった。一方、ボルバキアオス殺し因子 Oscar のターゲットとなっている Masc に GFP を融合させたタンパク質を発現させたところ、Masc-GFP の蓄積抑制がみられたことから、移植したボルバキアがオス殺し能を維持していることが示唆された。すなわち、この実験系でのボルバキア移植がボルバキアの性状を維持した状態で行われていることが示された。

(3) ボルバキア遺伝情報の整備

ボルバキアの遺伝子リソースを整備するために、ボルバキアに感染した様々なノメイガ蛹卵巣から PacBio による長鎖シーケンシングを行った。その結果、3種類のノメイガからボルバキアゲノムを決定することができた。そのうちの一種からはすでに報告されているオス殺し能を持つ Oscar と塩基配列レベルで完全に同一のものを発見した。一方、4系統のボルバキアが共感染しているケースも観察されたが、その中に新規 Oscar を見出した。培養細胞を用いたオス殺し能の検定により、この Oscar が実際にオス殺し能を持つことが明らかになった。また、ハエ目昆虫において細胞質不和合を引き起こす *cifA-cifB* の遺伝子ペアをもつボルバキアも発見した。*cifA-cifB* をもつボルバキアに感染していたノメイガにおいては実際に細胞質不和合が観察されたことから、チョウ目昆虫

においても *cifA-cifB* が細胞質不和合に関与していることが示唆された。現在、培養細胞、および個体においてこの *cifA-cifB* の機能を調査している。

(4) ボルバキア移行配列の探索

ボルバキア内に存在する宿主タンパク質を同定するため、はじめにボルバキアのみを精製する方法を探索した。フィルター濾過や低速遠心を組み合わせることである程度精製できることがわかったため、そこからさらに抗体を用いてボルバキア菌体を濃縮する方法を考えた。実際には、ボルバキア表面抗原として知られている WSP に対する抗体を作成し、その抗体を結合したビーズを利用して精製する方法を実施した。作成した WSP 抗体はボルバキア感染細胞から調製したタンパク質を用いて検出できたため（図 4）、これを用いて精製を試みたが、ボルバキアの濃縮は成功しなかった。現時点では、WSP が菌体外に露出している部分が少なく、免疫沈降できないのではないかと考えている。現在、他の精製方法を検討しているところである。

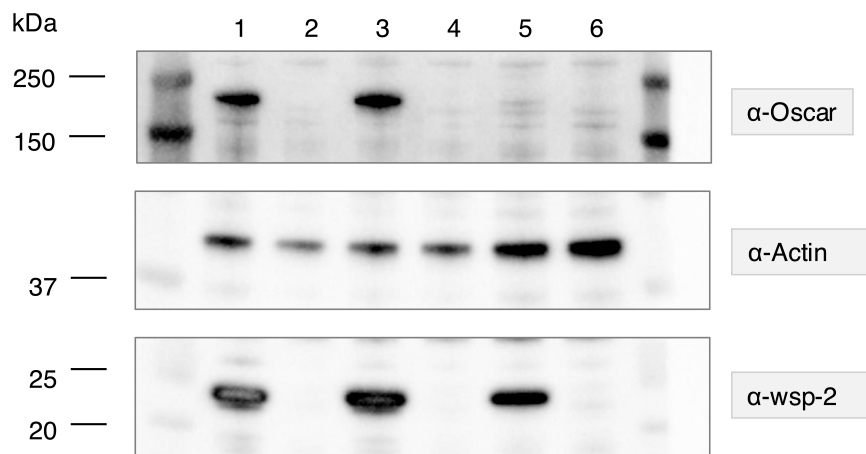


図 4. 抗 WSP 抗体の作成と検討

1, 3, 5 は感染細胞、2, 4, 6 は感染除去細胞から調製したサンプルである。

(5) 総合考察

本研究によって、ボルバキア感染培養細胞の樹立方法、およびボルバキア移植実験系は確立することができた。さらに、研究に用いるリソースとしてのボルバキア遺伝情報の整備も行うことができた。これらを組み合わせることで、*in vitro* でのボルバキア研究が加速することが期待できる。一方、ゲノム編集モジュールの作成を目指したボルバキア移行配列の探索は現時点では成功していない。今後はボルバキアの精製法をさらに検討し、このような配列があるかどうかという点から明らかにしていく予定である。

(完)

発表論文

- 1) 勝間進『ボルバキアのオス殺し因子 Oscar の発見』細胞 Vol.56, No.1, 2023 年 12 月
- 2) 勝間進『共生細菌による宿主の性・生殖操作の分子機構』実験医学増刊 Vol.42, No.17, 2024 年 10 月

引用文献

- 1) Kiuchi et al., A single female-specific piRNA is the primary determiner of sex in the silkworm. *Nature*. 2014 509, 633-6.
- 2) Fukui et al., The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* selectively kills male hosts by targeting the masculinizing gene. *PLoS Pathog*. 2015 11, e1005048.

- 3) Katsuma et al., A *Wolbachia* factor for male killing in lepidopteran insects. *Nat Commun.* 2022 13, 6764.
- 4) Muro et al., Two complete genomes of male-killing *Wolbachia* infecting *Ostrinia* moth species illuminate their evolutionary dynamics and association with hosts. *Microb Ecol.* 2023 86, 1740-1754.
- 5) Kazama et al., Curing cytoplasmic male sterility via TALEN-mediated mitochondrial genome editing. *Nat Plants.* 2019 5, 722-730.