

国際共同研究事業 共同研究報告書

令和4年4月11日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

[日本側代表者所属機関・部局]

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・
生物機能利用研究部門

[職・氏名]

上級研究員・陰山大輔

[課題番号]

JPJSJRP 20181709

1. プログラム名 英国との国際共同研究プログラム(JRPs-LEAD with UKRI)

2. 研究課題名

(和文) カオマダラクサカゲロウにおけるオス殺し抑制の進化遺伝学的動態

(英文) Genetics and evolutionary dynamics of male-killer suppression in the lacewing, *Mallada desjardinsi*

3. 共同研究実施期間(全採択期間)

平成 31 年 2 月 14 日 ~ 令和 4 年 3 月 31 日 (3 年 2 ヶ月)

4. 相手国側代表者(所属機関名・職名・氏名【全て英文】)

University of Liverpool Professor HURST Greg

5. 委託費総額(研究経費+業務委託手数料等、返還額を除く)

本事業により執行した委託費総額		25,765,752 円
内訳	1年度目執行経費	1,750,719 円
	2年度目執行経費	8,506,752 円
	3年度目執行経費	8,117,236 円
	4年度目執行経費	7,391,045 円
	5年度目執行経費	円
	6年度目執行経費	円

6. 共同研究実施期間を通じた参加者数(代表者を含む)

日本側参加者等	4 名
相手国側参加者等	3 名

7. 研究の概要・成果等

(1)研究概要(全期間を通じた研究の目的・実施状況)

多くの昆虫種には、宿主の生殖を操作しオスを殺す遺伝性の共生微生物が存在する。そのような寄生者が広まり、性比がメスに偏ることによって、宿主にはオスを救済するような進化(オス殺し抵抗性の進化)が促される。南太平洋サモア島におけるリュウキュウムラサキ(蝶の 1 種)や日本におけるカオマダラクサカゲロウでの観察によると、新規に出現した変異(オス殺し抵抗性)が 5 年以内に集団内にほぼ固定するなど、オス殺し抵抗性の進化は、自然界で見られる進化のなかで最も急速なものの 1 つである。その際、リュウキュウムラサキでは性決定遺伝子の変異がオス殺し抵抗性の発達に関与することが示唆されている。これが普遍的な現象だとしたら、オス殺し抵抗性の進化は、性決定システムの多様化のメカニズムとして今まで見過ごされてきた重要な事象であると捉えることができる。ただ、性決定を変化させることが、オス殺し抵抗性獲得における一般的なメカニズムなのかどうかはわからない。比較解析ができる現在唯一の材料として我々はカオマダラクサカゲロウとそれにオス殺しを起こす能力を持つ共生細菌スピロプラズマを対象として、本プロジェクトをスタートし、遺伝学、分子系統学、ゲノム解析等を駆使してこれらの問題にアプローチした。比較ゲノム解析によりオス殺し抵抗性に関与する遺伝子座を特定するため、採集したカオマダラクサカゲロウから 7 世代に渡るインブリーディング(近親交配)を繰り返し、純化個体を獲得した。現在、カオマダラクサカゲロウ純化個体のゲノム DNA を用いて、イギリス側(Hurst 研)で全ゲノムを解析中である。本プロジェクト中、COVID-19 の世界的流行により、日本、イギリスともに研究環境が大きく制限された。特にコロナウイルスの大規模ゲノム解析の必要性に伴い、分子生物学実験に関連する機材、消耗品はひっ迫し、本プロジェクトで計画していた次世代シーケンスによるゲノム解析の実行は大幅に遅れた。ゲノム解析には大幅な遅れが生じたものの、最近ようやく一通りの解析が終了し、非常に精度の高いゲノムデータが揃った。しかしながら、データ解析により抵抗性に関与する遺伝子座を特定するためには至っておらず、もう少しの時間を必要とする。本事業では、イギリス側で特定した遺伝子座をもとに、オス殺し抵抗性の分子マーカーを作製し、2011 年、2016 年に採取した過去のサンプルを再解析することで、オス殺し抑制の進化遺伝学的動態を明らかにすることを計画していた。一方、日本側の研究チームでは、オス殺し抵抗性の時間的・空間的な推移を推定するため、日本国内の離島を含めた様々な地域の野外個体群から経時的なサンプリングを続け、性比や共生細菌の野外感染状況、オス殺し抵抗性の有無を詳細に記述した。その結果、オス殺し抵抗性は日本の広域に拡散していたが、スピロプラズマの一部にオス殺し抵抗性に打ち勝つ変異を持ったもの(「ハイパー株」)が出現していることが明らかとなり、共生細菌と宿主との進化的軍拡競争の最前線を記録することに成功した。さらに、ある地域では、共生細菌ボルバキアが固定しており、ミトコンドリアハプロタイプが他地域とは異なるといった予想外の生物地理学的パターンも明らかになった。抵抗性打破という、共生細菌と宿主の軍拡競争がリアルタイムで観察された例はこれまでになく、今後、得られたサンプルを進行中のゲノム解析に組み込むことで、当初計画していた宿主側の「オス殺し抵抗性」の進化遺伝学的解析にとどまらず、共生細菌側の「抵抗性打破の獲得」についても解析が可能になり、宿主と共生細菌におけるゲノムレベルでの共進化・軍拡競争のメカニズム解明が期待される。

(2)学術的価値(本研究により得られた新たな知見や概念の展開等、学術的成果)本研究の第1の目的は、オス殺し抵抗性発達に伴い、宿主にどのようなゲノム進化が起きたのかを明らかにすることである。だが、それについては、現在も解析中であり、それを直接検証するためにはもう少しの時間を必要とする。当初想定していなかった発見として、宿主が身に着けたオス殺し抵抗性をかいくぐることができるように、一部のスピロプラズマ細菌(「ハイパー株」)が変化していることが、日本側での大規模野外調査と遺伝学実験によって明らかとなった。このことは、宿主側の抵抗性発達に呼応して生じた細菌側の進化とみなされ、宿主と共生細菌との間で繰り広げられる進化的軍拡競争が実際にリアルタイムで進行していることを示唆している。つまり、今までは、リュウキュウムラサキのケースのように、オス殺しに対する宿主側の抵抗性発達のみで話が終わっていたのが、その直後に細菌側の進化が起きているということは、その後果てなく続く進化的軍拡競争の存在を意味している。2011年に我々がスピロプラズマによるオス殺しを発見した後(Hayashi et al., 2016 *PLoS One*), 2016年までに宿主が抵抗性を獲得し(Hayashi et al., 2018 *Proc. R. Soc. B*)、2019年にはハイパー株が出現した(本研究)ことを考慮すると、我々が2011年から2016年までに観察した抵抗性発達・抵抗性打破のリアルタイム観測は、非常に稀な出来事を偶然観測したわけではなく、過去現在未来にかけて、数年~10年単位のスパンで繰り返し起きている事象である可能性がある(図1)。このような考えは「ハイパー株」の発見によってはじめて可能となった。リュウキュウムラサキでわかっている予備データから、宿主側の抵抗性発達は性決定遺伝子の変化であると予想しており、昆虫の生殖システムや性決定システムを劇的なスピードで変化させていく可能性がある。今後、これまでに取り終えたデータを進行中のゲノム解析に組み込むことで、宿主抵抗性とハイパー株の地理的・時間的推移を推定することが可能となる。

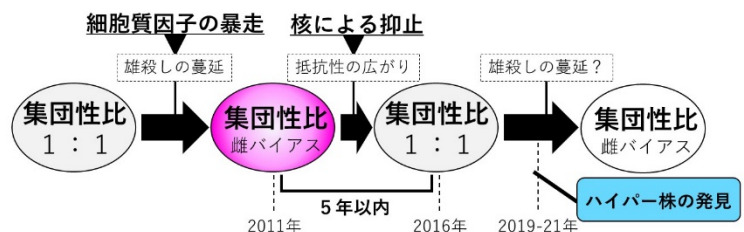


図1. カオマダラの集団で急速に起きていると考えられる細胞質と核との攻防

(3)相手国との交流(本研究による国際共同研究の活性化や、両国の研究者が協力して学術交流することによって得られた成果)

Hurst 研と我々は、オス殺しに対する宿主側の抵抗性発達に取り組んできた世界で数少ない研究グループである。この現象の意義に関してお互いに議論し、過去の知見を整理し、抵抗性発達自体が宿主の性決定の進化(あるいは多様化)と捉えることができるという考え方や、それを証明するための具体的な方法論等について、共同で論文を執筆し、英国王立学会紀要に受理された(Hornett, Kageyama, Hurst, 2022 *Proc. R. Soc. B*)。

(4)社会的貢献(社会の基盤となる文化の継承と発展、社会生活の質の改善、現代的諸問題の克服と解決に資する等の広い意味での社会的貢献はどのようにあったか)

現代社会において、微生物とは「ばい菌」のようになるべく排除すべきものとしてとらえられるか、腸内細菌のように我々にとって良いものとして捉えられることが多い。我々の研究では、微生物は、宿主の性や生殖を制御するゲノム因子として捉えることができ、それをきっかけとして高等生物における性別の決定機構の急速な進化という大きな変化が促されてきたのではないかとという新たな視点を提供できた。

(5)若手研究者養成への貢献(若手研究者養成への取組、成果)

本プロジェクト推進のために1年目に雇用した博士研究員(長峯)が、Hurst 研との交流を通じて研究を活性化させ、学振特別研究員PDとして独自の研究を開始するなど、研究者としてのステップを進めることができた。また、受け入れ中の別の学振特別研究員PD(新井)に関しても、Hurst 研との交流を活発に行っており、研究者としての成長を見て取れるようになった。コロナ前(1年目)には、Hurst 研の大学院生(Jones)を短期間受け入れるなど、若手研究者養成にも重要な貢献ができた。

(6)将来発展可能性(本事業を実施したことにより、今後どのような発展の可能性が認められるか)

本プロジェクトにおいて、イギリス側が取り組んでいる抵抗性に関わる遺伝子座の特定が、未完了ではあるものの、日本国内で行った野外調査および遺伝学的解析から、抵抗性を克服したハイパー株の出現が明らかになった。今後はゲノム解析の継続し、宿主の抵抗性分子マーカーを作出し、これまでに採集したカオマダラクサカゲロウのサンプルを再解析することで、当初計画していた「オス殺し抑制の進化遺伝学的動態」を明らかにする。さらに、スピロプラズマの通常株とハイパー株のゲノムを比較解析することで、抵抗性打破の分子メカニズムを明らかにするとともに、抵抗性打破遺伝子の分子マーカーを作出してハイパー株の動態を調査し、「抵抗性打破の進化遺伝学的動態」を明らかにする。引き続き日本各地でカオマダラクサカゲロウのサンプリングを継続し、宿主抵抗性とハイパー株をモニタリングすることで、宿主と共生細菌による進化的軍拡競争の行く末を観測する。また、本研究の内容を発展させるものとして、他の昆虫種(過去の文献から類似の現象が疑われているもの)について、Hurst 研との新たな共同研究プロジェクトを始動させる予定である。共生細菌と宿主とのせめぎ合いにおいて共通の基盤が存在するのか、つまりどこまで多様でどこまで共通性があるのかについて明らかにすることを目指して研究を多方面に発展させていく予定である。これまで、取り組まれたことがまったくない新しいタイプの研究スタイルであり、大きな成果が期待できる。本研究を通じて、お互いの信頼関係は強まり、将来にわたる協力関係を築くことができた。

(7)その他(上記(2)~(6)以外に得られた成果があれば記載してください)

8. 今後の展望(今後の国際共同研究・協力体制の維持・発展に向けた展望について、具体性・実現可能性等を踏まえて、継続的に展開していくための計画を記載してください)

本プロジェクトの遂行により、Hurst 研との強固な信頼関係・研究体制が構築できた。また、カオマダラクサカゲロウの詳細な調査により、宿主と共生細菌との間で極めて短いスパンでの進化的軍拡競争が観測できることが確認された。自然界での進化的なせめぎ合いをリアルタイムで観察できる例は現在のところ本例の他に報告がなく、本課題を継続する学術的な意義は極めて高いと考えている。

Hurst 研では本課題を継続するための予算を既に獲得しており、ゲノム解析を完了する目処が立っている。ゲノム解析後のオス殺し抑制の進化遺伝学的動態の解析に用いるサンプルはすでに用意されており、これらサンプルについて抵抗性分子マーカーの有無をPCRで確認することで行う。さらに、スピロプラズマの比較ゲノム解析からハイパー株の分子マーカーも作出予定であり、本プロジェクトで採集したクサカゲロウをサンプルとして、宿主集団内におけるハイパー株の動態も観測する。

一方、我々日本側も科研費(萌芽)を申請中であり、クサカゲロウの採集を継続し、ハイパー株がどのように宿主集団内に広がっていくのか、またハイパー株の出現に対して宿主がどのような反応を示すのかを、抵抗性分子マーカーとハイパー株分子マーカーを用いて観測する。本課題の遂行により、自然界における宿主-微生物間の進化的軍

拮競争の実態が初めて記載される。これらの成果獲得や課題継続にあたっては Hurst 研との連携が引き続き必須であり、本プロジェクトによってもたらされた協力体制が重要な基盤となっている。

今回の共同研究以外に、フランスの国立農学研究所 (INRAE)、国立科学研究センター (CNRS) 等と国際共同研究ネットワークの立ち上げを進めており、来年度から始動予定である。複数の研究機関との間の壁を越え、柔軟に共同研究の可能性を模索していく予定であり、共同研究により大幅に発展が期待できる重要な研究課題(特に応用的な課題)が定まり次第、国際共同研究への予算公募等に応募していきたいと考えている。もちろん Hurst 研との共同研究のための予算獲得の努力も必要となっている。

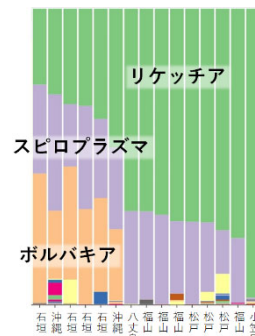
- ・最終年度実施計画書の「当該年度実施計画の概要」の内容と対応させつつ、最終年度のみの実施状況を簡潔に記載してください。再委託又は共同実施を行った場合は、それぞれの実施状況がわかるように記載してください。
- ・当該年度又は前年度(複数年契約を締結し繰越を行った場合)の各費目における増減が研究経費総額の 50% (この額が 300 万円を超えない場合は 300 万円)に相当する額を超えた場合は、その理由と費目の内訳を変更しても計画の遂行に支障がないと考えた理由を記載してください。

昨年度までの研究により、福山由来の母系系統 FK29 が抵抗性克服したスピロプラズマを持っていることがわかっていました。今年度の調査により、さらに石垣島由来の 2 系統 (ISG05 および ISG15) および小笠原由来の 1 系統 (OGS14) がオス殺しを克服していることが、それぞれ 3 世代にわたる交配実験 (12 ブルード、11 ブルード、23 ブルードがすべてメスのみであったこと) から明らかとなった。結果的に総計 134 ブルードに感染していたスピロプラズマのうち 4 ブルードのスピロプラズマが抵抗性克服能力を持っていることが明らかとなった。今後、その頻度が増加していくのかどうかに着目に値する。

抵抗性克服系統とされる母系系統 FK29 の卵巣を集めて細胞質を濃縮した抽出物を抵抗性系統(抗生物質処理で非感染にしたもの)の終齢幼虫に注射し、次世代の性比を確認するとほぼメスのみとなった(計 5 ブルードでメス 68:オス 1)。これらのほとんどはスピロプラズマに感染していたが(スピロプラズマ感染率:56/57)、リケッチアに非感染のものが多かった(リケッチア感染率:15/57)。そこでスピロプラズマのみに感染していたメスから次世代をとると、調べた 10 ブルードすべてがメスであった(n=89)。

以上のことからこれらの系統においてオス殺しの原因はスピロプラズマであり、宿主側の抵抗性克服はスピロプラズマに起きた変異であると考えられる。

沖縄本島由来の 39 個体および石垣島由来の 40 個体は全員、スピロプラズマやリケッチア以外に宿主の生殖を操作することで知られるボルバキアに感染していることが明らかとなった(右図:16S リボソーム遺伝子のアンプリコン解析の結果)。さらに *wsp* 遺伝子配列の系統解析により複数系統のボルバキアが存在していることがわかった。今後ボルバキアが宿主の進化にどのような役割を担っているかを調べる必要が出てきた。

[illegible]

- 6 -

11. 研究発表（最終年度において、本共同研究の一環として本事業による支援を受けたことを明示して発表したもの（発表予定のものを含む）について記載してください）

〔雑誌論文〕 計(1)件 うち査読付論文 計(1)件

通番	共著の有無 ^{*1}	著者名、論文標題等 ^{*2}
1	○	Hornett, E.A., Kageyama, D. and Hurst, G. D. D. (2022) Sex determination systems as the interface between male-killing bacteria and their hosts. Proc. R. Soc. B 289: 20212781. doi: 10.1098/rspb.2021.2781
2		
3		

〔学会発表〕 計()件 うち招待講演 計()件

通番	共著の有無 ^{*1}	発表者名、発表標題等 ^{*2}
1		
2		

〔図 書〕 計()件

通番	共著の有無 ^{*1}	著者名、著書名等 ^{*2}
1		

*1 相手国側参加者との共著（共同発表）がある場合は○と記入。

*2 当該発表等を同定するに十分な情報を記載すること。例えば学術論文の場合は、著者名、論文標題、雑誌名、巻号、発行年（西暦）、最初と最後の頁、掲載論文の DOI、学会発表の場合は発表者名、発表標題、学会等名、発表年（西暦）、発表地（国名、国外開催の学会の場合のみ）、図書の場合は著者名、著書名、出版社名、発行年（西暦）、総ページ数、ISBN、など（順番は入れ替わってもよい）。相手国側参加者との共著となる場合は、著者名が複数であっても省略せず、その氏名を記入し下線を付すこと。

*3 足りない場合は適宜行を追加すること。

12. 本事業による産業財産権の出願・取得状況（最終年度に出願又は取得したもの）

〔出 願〕 計()件

通番	産業財産権の名称、発明者、権利者、産業財産権の種類、番号、出願年月日、国内・外国の別
1	

〔取 得〕 計()件

通番	産業財産権の名称、発明者、権利者、産業財産権の種類、番号、取得年月日、国内・外国の別
2	

* 必要に応じて、欄を追加してください。