

「森と川をつなぐ遺伝子：ハリガネムシのゲノム解読と宿主操作関連遺伝子の探索」

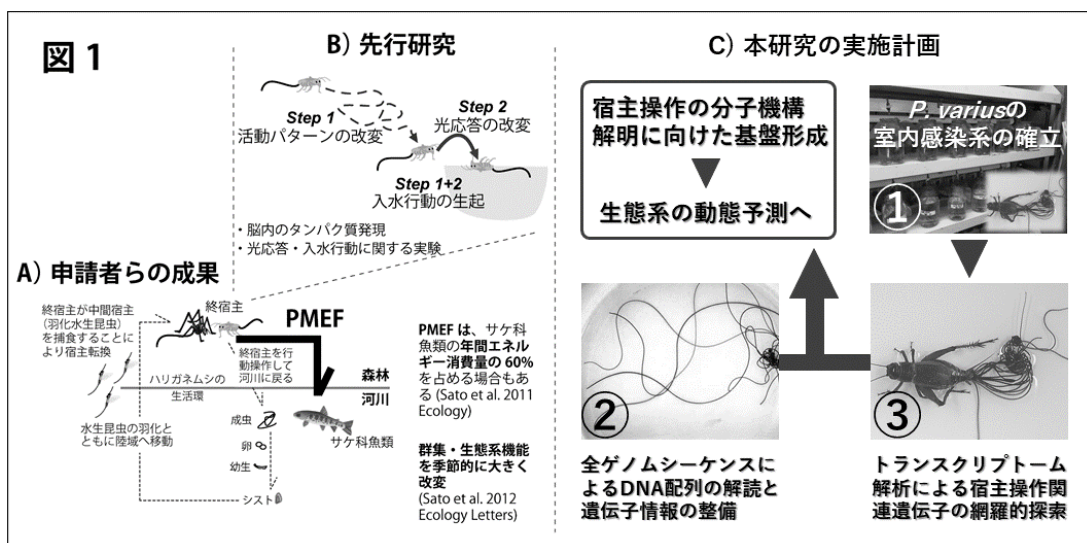
神戸大学大学院理学研究科 佐藤 拓哉

1 研究の背景と目的

寄生者は自然界に普遍的に存在する (Dobson *et al.* 2008)。そのため、寄生者が生態系の中で果たす役割の解明に注目が集まっている。その一方で、急速なゲノム解析技術の発展に伴い、「寄生」という普遍的でありながらもユニークな生きざまの分子機構を明らかにする研究が進んでいる。しかし、寄生の分子機構解明を基盤として、階層縦断的に、寄生者が生態系に果たす役割を理解する試みは未だなされていない。

研究代表者らは、寄生者 (ハリガネムシ類) が、終宿主 (陸生昆虫) の入水行動を生起して河川に飛び込ませると、それがサケ科魚類のエサとなることで森林生態系から河川生態系へのエネルギー流が生じ (Sato *et al.* 2011)、河川の生物群集や生態系の機能を大きく改変することを解明してきた (図 1A)。一方、先行研究は、宿主脳内のタンパク質の網羅的発現解析や宿主の行動実験に基づき、ハリガネムシ類が宿主の活動量を上昇させて水辺遭遇確率を高めた後、光応答を改変することで入水行動を生起すると指摘している (図 1B)。しかし、ハリガネムシ類の遺伝情報の解読や、宿主操作と関連する遺伝子群の同定は未だなされていない。このことは、宿主操作の全容解明と、それに基づく寄生者を介したエネルギー流の時空間変動予測の大きな足かせになっている。

そこで本研究では、ハリガネムシ類による宿主操作の分子・生理機構を明らかにする基盤形成のために、(1) ハリガネムシ類の室内飼育系の確立、(2) ハリガネムシ類のゲノム解読、および (3) 網羅的発現遺伝子解析を用いた宿主操作関連遺伝子群の同定を行うことを目的とする。宿主操作関連遺伝子の実体を明らかにすることにより、ゲノムから生態系までを階層縦断的に理解する道を拓くことが、本研究の究極目標である。



2 研究方法・研究内容

(1) ハリガネムシ類の室内飼育系の確立 方法

2018年8月に、申請代表者の佐藤がオクラホマ州立大学動物学科（アメリカ）の Matthew G. Bolek 博士の研究室を短期訪問した。この滞在期間中に、世代時間が短く、飼育が容易なヨーロッパエコオロギ *Acheta domestica* に感染することが知られているハリガネムシの一種 *Paragordius varius* の人工繁殖と感染実験についての指導を受けた。その後、持ち帰った *P. varius* のシスト [中間宿主となる水生生物（巻貝）の体内で休眠状態の幼生] を国内で購入したヨーロッパエコオロギ (以下、コオロギ) に人為感染させる実験を行うことで、室内飼育系の確立を目指した。

結果

申請代表者の研究室において、*P. varius* の室内感染系を確立することに概ね成功した。助成期間中に4つの実験群（計194個体）のコオロギに *P. varius* のシストを5~50個体与えた結果、およそ7%の感染率で *P. varius* の成虫を得ることができた（写真1）。コオロギ1個体に対する *P. varius* の感染個体数（感染強度）は、約4個体であり、自然環境での感染強度と比べて少し高いものの、重度の重複感染によって、成長途中で斃死するコオロギは認められなかった。



写真1 コオロギから脱出中の *P. varius* 成虫

現在、申請代表者の研究室において、すでに第3世代の *P. varius* の成虫が得られており、感染率を高める一方で、感染強度を低くするための人為感染手法について検討をしている。

(2) ハリガネムシ類のゲノム解読 ゲノムサイズの推定

方法 ゲノム解読を行う上で、対象生物のゲノムサイズを知ることは重要である。そこで、フローサイトメトリーを用いたゲノムサイズの推定を実施した (Hare & Johnstone 2011)。本研究では、ゲノムサイズ既知の生物として、マウス *Mus musculus* (ゲノムサイズ: 3.3Gb) とアフリカツメガエル *Xenopus laevis* (2.2Gb) を用いた。

結果 *Mus musculus* と *X. laevis* それぞれのゲノムサイズと染色された精子の核の蛍光強度 (図2) の比に基づいて、*P. varius* のゲノムサイズを推定した結果、概ね 0.5 Gb 程度と推定された。

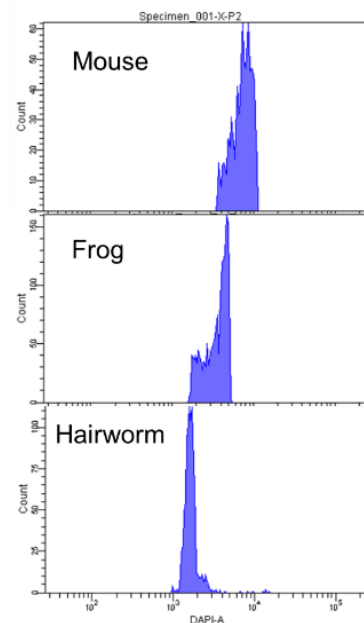


図2 染色された核の蛍光強度の頻度分布

ゲノム解読

方法 *P. varius* と *Chordodes fukuii* という2種のハリガネムシ類のゲノム解読を進めた。当初は *P. varius* のゲノム解読のみを実施予定であった。しかし、課題(3)に関して、当該種によるコオロギの行動操作実験を実施したところ、行動操作前後の遺伝子発現解析をするために適切な分析試料を助成期間内に得ることが困難であると判断された。そこで、当研究室で行動操作実験を十分に検討している、チョウセンカマキリ *Tenodera angustipennis* と *C. fukuii* の感染系で、課題(3)を実施することとした。そのためには、*C. fukuii* のゲノム情報が必要になるため、当該種のゲノム解読を実施した。

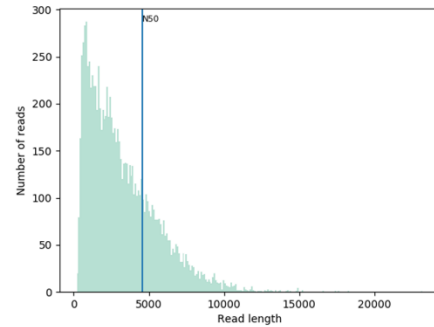


図3 MinIONによるシーケンスで得られたリード長の頻度分布

結果

P. varius については、HiSeq4000 (イルミナ社) で約 40Gb の DNA 配列情報を得た。一方、*C. fukuii* については、HiSeq4000 で約 40Gb のデータを得るとともに、minION (Oxford Nanopore Technologies 社) によるゲノムシーケンスで、より長い DNA 配列情報 (read N50 = 4,558 bp ; 図 3) をおよそ 4 Gb 得た。

HiSeq で得られたゲノム情報を用いて、k-mer 頻度分析によるゲノムサイズ推定を行ったところ、推定ゲノムサイズは約 0.5Gb と算出され、フローサイトメトリーの結果とほぼ一致した。このため、ハリガネムシ類のゲノムサイズはおおよそ 0.5 Gb と程度と考えられた。

現在、各種ゲノム解析ソフトウェアを用いて、ハリガネムシゲノムの de novo アセンブルを実行中である。

(3) 網羅的発現遺伝子解析を用いた宿主操作関連遺伝子群の同定

方法

宿主操作関連遺伝子群の同定については、上述したように、カマキリ *Tenodera angustipennis* と *C. fukuii* の感染系で実施した。

網羅的発現遺伝子解析については、チョウセンカマキリ (*T. angustipennis*) の前大脳とハリガネムシ (*C. fukuii*) の

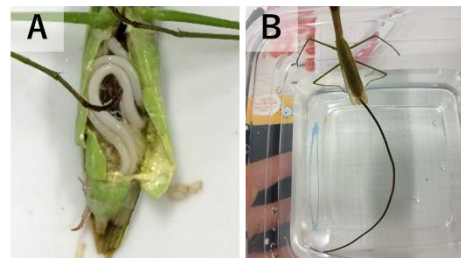


写真2 未成熟のハリガネムシ *C. fukuii* とその宿主 (A)、および成熟した *C. fukuii* とその宿主 (B)

個体全体に対して実施した。カマキリについては、(1) *C. fukuii* に感染していない非感染個体、(2) 未成熟の *C. fukuii* に感染しており、宿主操作を開始していないと考えられる個体 (操作前ハリガネ感染個体)、および (3) 成熟した *C. fukuii* がカマキリの総排泄口から一部突出しており、宿主操作中と考えられる個体 (操作中ハリガネ感染個体) の3群それぞれの発現遺伝子解析を行った (群内の個体の繰り返しは2個体とした)。一方、ハリガネムシについては、上記の2群のハリガネ感染個体から得られたメスの *C. fukuii* (写真2)、およびカマキリから脱出した後、1週間自由生活をさせた個体 (操作後ハリガネ) を含む3群それぞれの発現遺伝子解析を行った。

結果

カマキリ脳における発現遺伝子

網羅的発現遺伝子解析において、操作前ハリガネ感染個体として準備した2個体分の分析試料のうち、1個体分の分析がうまくいかなかった。そのため、現時点でハリガネ感染宿主の脳において、操作前と操作中の発現遺伝子の比較はできない（現在、予備サンプルのRNA抽出をして追加分析を計画中）。

一方、非感染個体との比較において、発現量が2倍以上、あるいは1/2倍以下になっている遺伝子を抽出した結果、それぞれ7個と8個の遺伝子が確認された。それらの遺伝子について、機能推定を行ったところ、発現上昇がみられた遺伝子については、NUIM (NADH-ubiquinone oxidoreductase chain1) と COX1 (Cytochrome c oxidase subunit1) の2つの遺伝子が確認された。前者は電子伝達系に関与することが知られており、宿主の活動量を上昇させている可能性がある。

また、発現量の低下がみられた遺伝子については、PEB3 (Ejaculatory bulb-specific protein) と VIT1 (Vitellogenin1) の2つの遺伝子が確認された。後者は生殖や変態、免疫応答に関与することが知られており、例えば宿主の生殖への資源投資を低下させている可能性が考えられる。

ハリガネムシ（全身）における発現遺伝子

ハリガネムシの発現遺伝子の解析については、予備的な解析を実施している段階であるが、現時点で操作中のハリガネムシでのみ、発現量が上昇している遺伝子が2376個、低下している遺伝子が1093個確認されている。今後、*C. fukuii* で進めているゲノム解読の情報をもとに、発現量を変化させている遺伝子を詳細に検討し、その機能推定を行う予定である。

3 研究成果

本研究プロジェクトにより、ハリガネムシ類の遺伝情報の解読が大きく進み、かつ宿主操作と関連する遺伝子群の同定への基盤が形成された。また、その過程で、生理学や行動学の分野の情報蓄積が豊富なヨーロッパイエコオロギ (*Acheta domestica*) へのハリガネムシ (*P. varius*) の人工感染系を確立することができた。

今後、本研究助成の成果を基礎として、ゲノム解読の完了、および宿主操作と関連して発現量を変化させる遺伝子の機能推定を深めることができると期待される。さらに、それらの結果を行動変化や生理的变化に関する実証データと統合することで、「森と川をつなぐ遺伝子」を解明することが可能になるだろう。

4 生活や産業への貢献および波及効果

生物多様性の維持とその持続的な利用は、今日的な社会の課題ともいえる。そのような中、本研究の成果は、これまで嫌われ者として扱われることがほとんどであった寄生生物が、生物多様性の維持に実質的に関連している仕組みを解明するための基盤形成になる。これにより、寄生生物に対する社会の認識を転換することに貢献する可能性がある。また、寄生生物は進化の過程で、宿主の行動を単純かつ効率的に操作する神経生理機構を獲得している可能性がある。そのため、宿主操作の仕組みを理解することは、精神疾患等の新たな治療方策の発見に繋がる可能性もある。