

細胞内共生微生物の研究手法

農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所の野田 博明

はじめに

本特集でも明らかなように、多くの微生物が昆虫類を含む節足動物とかかわりをもっている。共生微生物の研究は、生物間相互作用を研究する点で生態学的内容を含んでいるが、宿主生物の中にいるものを対象にしているという点では、極めて生理・生化学的な手法を必要としている。また、昆虫などの無脊椎動物と微生物という異なる生物を対象としており、極めて学際的な研究分野でもある。

特集のほかの記事では、紙面の都合上研究手法についてはあまり触れられていない。ここでは、研究手法を通じて共生微生物の特徴に触れたい。研究手法といっても、基本的なもので、一般的な手法である。ただ、本稿を通じて共生微生物についての理解をより深めていただければ幸いである。

I 共生微生物の種類とその研究手法

1 ウイルス

ある種の昆虫やダニ（以下、昆虫類と総称する）の細胞内にはウイルスが存在している。これらのウイルスの多くは、病徴や特徴的な形質を示さず、働きや機能もよくわかっていない。しかし、ショウジョウバエの炭酸ガス感受性を引き起こすウイルス（BRAS et al., 1994）や、本特集でも扱われている寄生蜂のポリドナウイルス（STOLTZ, 1993）など、重要なウイルスもある。これらのウイルスを病原性のウイルスと比較することによって、病原ウイルス単独では理解できなかった特徴が明らかとなったりもする。

電子顕微鏡観察が、これらのウイルス研究の第一歩である。ネガティブ染色によって、昆虫類の磨砕液を丹念に観察することによりウイルス様粒子の存在を確認したり、超薄切片を作成して、細胞内で増殖しているかどうかを観察することになる。しかし、顕微鏡による観察だけではウイルスの種類を判断することは難しい。そこで、ウイルスの特徴を調べるために、ウイルスを単離する必要がでてくる。ウイルスの構造タンパク質、核酸の

性状を明らかにし、さらに抗体を作成して、免疫的な検出方法も確立することが望ましい。遺伝子塩基配列の一部が解読できれば、後述のように PCR（または逆転写 PCR）や *in situ* PCR によって検出診断が可能になり、虫体内分布も把握できる。また、個体間や個体群間での感染・伝搬の究明にも利用できる。

2 細菌

細菌の場合は光学顕微鏡で観察が可能である。ギムザ染色や DAPI（4', 6-diamidine-2-phenylindole-dihydrochloride）による DNA の蛍光染色により、昆虫類の磨砕液や固定標本の微生物を観察できる。透過型の電子顕微鏡を利用することも多い。共生細菌の多くは培養は困難で、培養されてくるもののほとんどは昆虫類の体表や消化管に紛れ込んだ雑菌である。培養できないものは分類や同定ができないが、後述のように、近年の分子生物学の進歩により遺伝子塩基配列を解読することによって、細菌の種類を特定できるようになった。

3 酵母・糸状菌

共生している糸状菌は酵母の形状をしており、一般に出芽で増える。光学顕微鏡で容易に観察できる。シバナムシ類の酵母様共生微生物を除いて酵母（糸状菌）は培養に成功していない。そこで、他の似た形態の酵母と識別するには抗体や PCR などを利用する必要がある。形態だけで判別しやすいためか、あまり有用な検出系は開発されていない。組織切片で共生酵母を観察するには、多糖類の反応である PAS 反応を用いると観察しやすい（NODA, 1977）。

4 微生物の培養と分離

細胞内に共生する微生物のほとんどが人工培地では培養できない。これは、細胞の中の生活に適応しているためで、培地中に何らかの栄養成分が足りなかったり、時には細胞内共生が進んでいるため、自活するための遺伝子を欠いている場合もあるかもしれない。寒天培地上で培養できるものは極めて少なく、細胞培養用の培地に血清を添加したものを用いればしばらくは維持できる。また、ウォルバキアのような微生物は細胞内で維持されるので（O'NEILL et al., 1997）、培養細胞を用いて共生微生物を培養することも考えられる。

5 共生微生物の除去

微生物の分離や培養のように微生物だけを取り出すの

ではなく、逆に虫から微生物を取り去ったときにどのような変化が起こるかを見ることによって、その微生物の役割や両者の相互関係を調べることも行われる。よく行われるのは、抗生物質を宿主生物に与えて、微生物を死滅させる方法である。アブラムシでは、その共生細菌 (*Buchnera*) をリファンピシで殺して、共生微生物を除去した (aposymbiotic と呼ばれる) アブラムシを作ると発育不良になる (ISHIKAWA and YAMAJI, 1985)。また、節足動物に広く感染しているウォルバキアは、テトラサイクリンやリファンピシで除去できる。

そのほかに、高温 (30°C 以上) で飼育することにより、微生物を死滅させることも行われる (●HITAKA and ISHIKAWA, 1991)。ウンカ類の酵母様共生微生物は高温処理により数が減少し、宿主ウンカの発育に影響が出る (NODA, 1979)。ウォルバキア感染によって雌ばかりで増殖する単為生殖系統となっている卵寄生蜂を高温で処理すると、ウォルバキアが死滅して雄が出現するようになる。

6 微生物の感染と伝搬

共生微生物に感染していない昆虫に感染させるには、消化管内の微生物は径口的に取り込ませることができるが、体内に共生するものは注射によって感染させる。感染源としての共生微生物の調製や注射手法の確立 (特に小型昆虫では重要) が必要である。微生物と宿主生物との特異性が関係していて、簡単に接種できない場合も多い。

既に述べたように、共生微生物は宿主生物の体外に取り出して維持培養することは難しいので、宿主生物を飼育して微生物を維持することになる。共生微生物の伝搬経路を明らかにすることは、その微生物の特徴を解明するためだけではなく、うまく微生物を飼育個体群内で維持するためにも重要である。また、野外で共生微生物の垂直伝搬・水平伝搬がどのように起こっているのかを解明することも重要で、そのためには、微生物の抗体を使ったり PCR を利用したりすることも行われる。

II 分子生物学的な研究手法

1 PCR

PCR (ポリメラーゼ・チェーン・リアクション) は非常に有用な手法で

ある。PCR は、目的の微生物の検出や種類の推定、微生物の定量、組織内分布の調査などに用いられている (図-1)。目的の微生物だけを検出したい場合は、その微生物の特定の遺伝子 (例えば、リボソーム RNA 遺伝子、*ftsZ* 遺伝子など) の特徴的な配列部分をプライマーにして PCR を行う (表-1)。定量 PCR の手法 (LARRICK, 1997) を用いれば、微生物の定量ができる。微生物の特定の遺伝子の量をはかることにより、微生物の数の多少を測定するわけである。

PCR で検出・診断する際、アガロースゲルなどで電気泳動をして、増幅された DNA のバンドを蛍光染色するのが一般的である。PCR で判定する場合、ゲル上で DNA が認められることと、その DNA のサイズが推定どおりであることが必要である。しかし、サイズはほぼ同じでも別の微生物の遺伝子が増幅されているかもしれない。そのような場合は、増幅された DNA を制限酵素で消化して、目的の遺伝子の酵素分解のパターンを確認することが行われる。

2 遺伝子の系統解析

一般に共生微生物は培養できず、その生理的特徴を調べられないので、微生物の種類を特定することは、極めて難しい。そこで、遺伝子塩基配列を解読して、微生物自身の系統関係を推定することが行われている。近縁な生物同士の遺伝子配列は似ており、系統的に遠く離れた

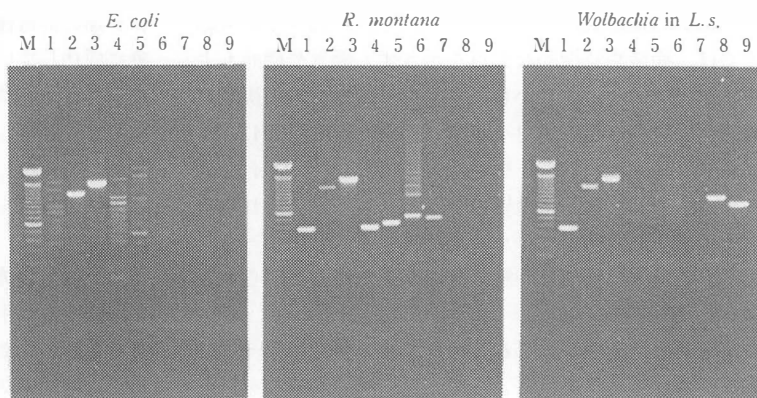


図-1 特異的なプライマーを用いた PCR による微生物の検出

左から大腸菌 (*E. coli*)、リケッチア (*R. montana*)、ウォルバキア (ヒメトビ感染 *Wolbachia*) : M はマーカー、番号は特定の遺伝子を増幅するために用いたプライマーを示す。1 : ミトコンドリア 12S rDNA, 2 : 真正細菌 16S rDNA, 3 : 真正細菌 23S rDNA, 4 : リケッチア citrate synthase, 5 : リケッチア 17-kDa antigen, 6 : リケッチア 190-kDa antigen, 7 : リケッチア 120-kDa antigen, 8 : ウォルバキア 16S rDNA, 9 : ウォルバキア *ftsZ*。

プライマー番号 1 では、宿主の細胞が入っているリケッチアとウォルバキアで増幅産物が見られ、2 と 3 はすべての微生物で産物が見られる。4~7 はリケッチアにだけ増幅が見られ、8 と 9 はウォルバキアで増幅が見られる。

表-1 共生微生物の検出に用いられる PCR 用プライマーの例

対象の遺伝子とプライマー配列	増幅サイズ (bp)	文献
真核微生物 18 S rDNA ほぼ全長 NS1 GTA GTC ATA TGC TTG TCT C NS8 TCC GCA GGT TCA CCT ACG GA	1,771	WHITE et al. (1990)
原核微生物 16 S rDNA ほぼ全長 fD1 AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG rP2 ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT	1,498	WEISBURG et al. (1991)
原核微生物 16 S rDNA 一部 Ec 16 S GCT TAA CAC ATG CAA G CCA TTG TAG CAC GTG T	1,198	O'NEILL et al. (1992)
原核微生物 23 S rRNA 一部 Ec 23 S CCG AAT GGG GAA ACC C CCA CCT GTG TCG GTT T	1,508	ROUSSET et al. (1992 b)
リケッチア Citrate synthase RpCS. 877 p GGG GGC CTG CTC ACG GCG G RpCS. 1258 n ATT GCA AAA AGT ACA GTG AAC A	381	REGNERY et al. (1991)
ウォルバキア 16 S rRNA 99 F TTG TAG CCT GCT ATG GTA TAA CT 994 R GAA TAG GTA TGA TTT TCA TGT	890	O'NEILL et al. (1992)
ウォルバキア ftsZ homologue ftsZ GTA TGC CGA TTG CAG AGC TTG GCC ATG AGT ATT CAC TTG GCT	769	HOLDEN et al. (1993)
ウォルバキア A グループ ftsZ homologue ftsZAdf CTC AAG CAC TAG AAA AGT CG ftsZAdr TTA GCT CCT TCG CTT ACC TG	約 955	WERREN et al. (1995)
ウォルバキア B グループ ftsZ homologue ftsZBf CCG ATG CTC AAG CGT TAG AG ftsZBr CCA CTT AAC TCT TTC GTT TG	約 955	
ウォルバキア groE groEf1 TGT ATT AGA TGA TAA CGT GC groEr1 CCA TTT GCA GAA ATT ATT GCA	約 800	MASUI et al. (1997)

微生物同士では遺伝子の塩基配列の違いが大きい、という一般的な事実に基づいて、遺伝子系統樹を作り、微生物の系統関係を明らかにするのである。

まず、微生物を分離するか、微生物が共生する組織を磨砕するか、あるいは虫全体をつぶして、PCR にかける。用いるプライマーは調べたい微生物の遺伝子に特異的なものを用いるとよいが、特異性が高すぎると、対象とした微生物にしか用いることができない。微生物が複数混じっている可能性が考えられる場合は、PCR で増幅した DNA をプラスミドにクローニングする。クローンは一つの一つの微生物遺伝子に由来するので、複数のクローンの DNA 塩基配列を解読して、何種類の微生物がいるかを確かめる。塩基配列を決定する方法については、ここでは省略する。

次に、得られた塩基配列から微生物の種類を推定するには、塩基配列の相同性検索を行う。配列の似ている微生物を探し出すわけである。インターネットを通じて配列を DNA データベースに送り、検索結果を受け取る。

WWW (ワールド・ワイド・ウェブ) により、ブラウザ (ネットスケープ・コミュニケーターやインターネット・エクスプローラなど) をもちいて検索できる。相同性検索 (ホモロジーサーチ) ができるサイトには、農水省の DNA Information and Stock Center (<http://www.dna.affrc.go.jp/>), DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>), GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) などがある。BLAST, FastA, MPSearch などのプログラムによって、登録されている配列の中から似たものを選び出す。例えば、ウンカ類の酵母様共生微生物の 16 S リボソーム RNA 遺伝子を用いて検索した場合、子のう菌類の核菌類に属する微生物がリストアップされ、共生微生物は核菌類の微生物であろうと推定できる (本特集, 深津を参照)。

さらに、その系統上の位置をはっきりさせるために、遺伝子系統樹を描く。ここで扱うのは遺伝子の系統樹であり、微生物そのものの系統樹ではない。しかし、リボソーム RNA 遺伝子などをもちいた系統樹は、生物の系

統関係をよく反映しているとされている。まず、データベースから比較したい微生物の配列を取り出す。その配列のうち必要な部分（自分の比較する遺伝子と同じ部分）を選び、その配列を並べる。この操作は大切で、その並び方によってはあとの計算に影響が出てくる。筆者らは、CLUSTAL W または CLUSTAL X を使っている (ftp.bio.indiana.edu, ftp.bchs.uh.edu, ftp.ebi.ac.uk または <http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/ClustalX/Top.html>)。解析用のソフトウェアとしては、PHYLP (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>) や PAUP がよく使われる。

3 形態観察と *in situ* hybridization

微生物の識別や同定は、上記のように遺伝子を見ることによって容易になってきたが、PCR で増幅すると、目的の微生物の遺伝子だけでなく、ほかの微生物のものまで増幅されてくることがある。そこで、組織切片上でその遺伝子がどの微生物のものかを判定する手段が必要となる。そのため、*in situ* hybridization (イン・サイチュ・ハイブリダイゼーション) と呼ばれる手法を用いる。

細菌の検出には、目的の遺伝子（普通はリボソーム RNA）に対してくっつく（相補的な配列にハイブリダイズさせる）20 塩基くらいのプローブと呼ばれる遺伝子にラベルをしておく。蛍光色素で直接その蛍光を判定する場合や、酵素を用いて基質を分解して不溶性の物質を沈着させることによって見る場合などがある。(FUKATSU et al., 1998)。細菌が虫の体のなかで散在しているときは、一つ一つの微生物に対する反応が十分でない場合もある。

そのほかに、*in situ* PCR という方法がある。これは、スライドガラスの上に張りつけた組織切片上で PCR を行い、微生物のゲノム遺伝子を増幅して、その遺伝子を検出する方法である。ウイルスで使われているが、共生微生物ではまだ報告はない。

お わ り に

共生微生物と病原微生物との違いを明らかにすることや、共生微生物の起源の解明など、多くの課題がある。また、共生に特異的な遺伝子やその産物の解明、ウォルバキアが宿主生物の生殖に関係する機構なども重要なテーマである。これまで、多くの細胞内共生微生物が見つかってきているが、今後特定の微生物に絞り込んでより深く追求する姿勢も必要であろう。既に、10 種類以上の微生物で全ゲノムの解読が行われており、共生微生物でもゲノムの研究がスタートしている（本特集、石川参照）。これからは、ここで紹介した以外の手法や考え方が、むしろ研究を発展させる原動力となることも期待されるので、識者のご批判を賜りたい。

引 用 文 献

- 1) BRAS, F. et al. (1994): Virology 200: 189~199.
- 2) FUKATSU, T. et al. (1998): Appl. Entomol. Zool. 33: 461~472.
- 3) HOLDEN, P. R. et al. (1993): Mol. Gen. Genet. 240: 213~220.
- 4) ISHIKAWA, H. and M. YAMAJI (1985): Insect Biochem. 15: 155~163.
- 5) LARRICK, J. W. (1997): The PCR technique: quantitative PCR. Eaton Publ., USA, 313 pp.
- 6) MASUI, S. et al. (1997): Zool. Sci. 14: 701~706.
- 7) NODA, H. (1977): Appl. Entomol. Zool. 12: 134~141.
- 8) ——— (1979): ibid. 14: 64~75.
- 9) OHTAKA, C. and H. ISHIKAWA (1991): Symbiosis 11: 19~30.
- 10) O'NEILL, S. L. (1997): Insect Mol. Biol. 6: 33~39.
- 11) ——— et al (1992): Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 2699~2702.
- 12) REGNERY, R. L. et al. (1991): J. Bacteriol. 173: 1576~1589.
- 13) ROUSSET, F. et al. (1992): Proc. R. Soc. Lond. B 250: 91~81.
- 14) STOLTZ, D. B. (1993): Parasites and Pathogens of Insects. Vol. 1 N. E. Beckage et al. eds., Academic Press, pp. 167~187.
- 15) WERN, J. H. et al. (1995): Proc. R. Soc. Lond. B 261: 55~71.
- 16) WEISBURG, W. G. et al. (1991): J. Bacteriol. 173: 697~703.
- 17) WHITE, T. J. et al. (1990): PCR protocols. M. A. Innis et al. eds., Academic Press, p. 315~322.