

令和元年5月10日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15399

研究課題名(和文) 昆虫の体色形成を担う共生細菌の機能解明

研究課題名(英文) Role of symbiotic bacteria in insect body color formation

研究代表者

森山 実 (Moriyama, Minoru)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：30727251

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：昆虫の体色形成における共生細菌の関わりについて、緑色の隠蔽体色をもつチャバネアオカメムシとその腸内共生細菌を用いて、その分子-生化学機構を解析した。質量分析器などを用いた生化学分析、細菌置換実験、細菌ゲノム操作や共生器官の培養実験などの実験的アプローチを駆使して、宿主昆虫が共生細菌のつくりだす色素を自身の体色として利用していることを実証し、動物の多様性を生み出す新たな色素形成メカニズムの進化過程を提唱した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物の体色は隠蔽や擬態、体温調節、種間/種内認識など、多様な環境に適応する上で重要な役割をになう。とりわけ昆虫類は、さまざまな種類の色素を体色形成に利用しており、それが色彩、紋様、適応戦略などにおける多様性の基盤となっている。こうした多様な色彩の背景にどのような分子・生理メカニズムがあるのか、またそのしくみがどのような過程を経て進化してきたかを理解することは、進化生物学における重要な課題である。

研究成果の概要(英文)：Molecular and biochemical mechanisms of the relationship of symbiotic bacteria to insect color formation were investigated using a stinkbug *Plautia stali*, which has green cryptic coloration, and its gut-symbiotic bacterium. The fact that the host insect achieves green coloration by using symbiont-producing pigments was demonstrated by experimental approaches, including biochemical analyses with mass spectrometry, symbiont replacement, manipulation of the symbiont genome, and culture of the symbiotic organ. This finding advocated a new evolutionary pathway underlying animal diversity.

研究分野：昆虫科学

キーワード：共生細菌 カロテノイド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動物の体色は隠蔽や擬態、体温調節、種間/種内認識など、多様な環境に適応する上で重要な役割を担う。とりわけ昆虫類は、さまざまな種類の色素を体色形成に利用しており、それが色彩、紋様、適応戦略などにおける昆虫類の多様性の基盤となっている。こうした多様な色彩の背景にどのような分子・生理メカニズムがあるのか、またそのしくみがどのような過程を経て進化してきたかを理解することは、進化生物学における重要な課題である。

緑色の体色は緑葉上で隠蔽的に機能することから、植物をすみかとする昆虫類においてきわめて普遍的に見られる。一般に、昆虫の緑色はカロテノイド色素の黄色要素とビリン結合タンパク質の青色要素から構成されるが、昆虫はカロテノイド色素を自ら合成できないため、食物から獲得する必要があると考えられてきた。しかし、カロテノイドをほとんど含まない植物汁液を餌資源として利用するカメムシなどの昆虫においても、緑色の体色をもつ種が普遍的に存在しており、未解明の色素獲得プロセスが存在する可能性がある。

2. 研究の目的

本研究課題では、吸汁性カメムシ類における緑色の体色形成において共生微生物が関与する可能性に着目した。共生細菌は昆虫が自ら合成できないさまざまな化合物を宿主に供給することで、昆虫単独では持ちえなかった新しい生物機能を賦与し、昆虫の多様化を加速させる一因となっている。昆虫の体色を形成する色素を供給する可能性についても長く疑われてきたものの未だその実証には至っていなかった。本研究課題では分子遺伝学的操作の容易な大腸菌を人工的に感染させたカメムシを用いた極めて独自性の高い実験生理学的アプローチによって、共生細菌由来の色素を昆虫が自身の体色として利用することを世界に先立って実証することを目的とした。

3. 研究の方法

カメムシの体色形成における共生細菌の役割を明らかにするため、チャバネアオカメムシ腸内共生細菌をモデル系として用い、2年間の研究期間において以下の研究計画に基づき研究を進めた。まず、1)チャバネアオカメムシの体色を形成する色素の同定および定量解析法を確立する。2)共生細菌による必須アミノ酸供給を介した青色タンパク質の合成の実証を進める。3)カロテノイド合成能を改変した共生細菌および大腸菌を用いたカロテノイド供給の実証をおこなう。4)トランスクリプトーム解析を用いたカロテノイドの利用に関わる宿主因子の同定を進める。5)さまざまな分類群のカメムシ類を対象とした共生細菌由来色素を利用する機構の普遍性と多様性の解析に取り組む。

4. 研究成果

1) 色素の同定および定量法の確立

まず、チャバネアオカメムシの緑色の体色を形成する色素の同定を進めた。青色成分であるビリン結合タンパク質については、クチクラに強固に埋め込まれており、表皮からの抽出が困難であったため、体液中から青色タンパク質を分離し、LC/MSを用いたプロダクトイオンマスマフィンガープリンティング法によって分析した結果、2種類のシアノプロテイン(ヘキサメルン)型のビリン結合タンパク質であることを同定した。これらのタンパク質のアミノ酸組成を調べると、芳香族アミノ酸を筆頭に必須アミノ酸の構成比が高いことが確認された。一方、カロテノイド色素に関してはゲノム解析より、共生細菌がカロテノイド合成遺伝子クラスターを持つことがわかり、ゼアキサンチンが最終的な合成産物であると予想された。実際に表皮より有機溶媒によってカロテノイド類を抽出し、LC/MSにより分離および同定をおこなったところ、共生細菌が主に合成するのはゼアキサンチンであり、カロテンやその他の中間産物も一定の割合で存在していることが確認された。また、実験的に共生細菌を大腸菌に置換した場合、得られた成虫は正常な緑色を形成できなかった。また、大腸菌感染中の体液からは青色タンパク質が検出されなかったうえ、表皮中からもカロテノイド類が検出されなかった。

2) 共生器官 in vitro 培養による必須アミノ酸供給の検証

上記の結果よりシアノプロテインの産生に必要な必須アミノ酸を共生細菌が宿主昆虫に供給している可能性が疑われた。そこで、共生器官の in vitro 培養系においてトレーサー実験をおこない、必須アミノ酸を合成・供給しているのかについて検証した。結果、共生細菌に感染させた虫の共生器官では芳香族アミノ酸を筆頭に多くの必須アミノ酸が新規に合成されていた一方で、大腸菌に置換した虫の共生器官では合成が見られなかったことから、共生細菌が青色タン

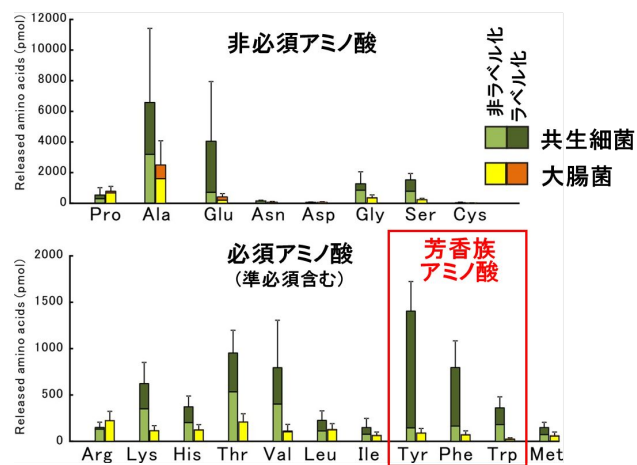


図1. 培養共生器官より放出されるアミノ酸

パク質合成に必要な必須アミノ酸を供給していることが明らかとなった(図1)。

3) カロテノイド供給の実証

次に共生細菌によるカロテノイドの供給機能を実証するために、大腸菌にカロテノイド合成オペロンを組み込んだプラスミドを導入し、カロテノイド合成能をもつ大腸菌株を作製した。カロテノイド合成大腸菌に人工感染したカメムシは顕著に体色が黄色くなり、その表皮からは大腸菌が合成したものと同一組成のカロテノイド類が検出された(図2)。今度は培養可能な共生細菌のカロテノ

イド合成遺伝子クラスター領域のゲノムを改変し、カロテノイド合成能を欠失させる、もしくは合成経路を途中で止めてカロテノイド組成が変化するように操作した株を作製した。それらに感染させた宿主昆虫の表皮におけるカロテノイド組成を測定したところ、共生細菌の合成能と対応する形で組成が変化していた。以上の結果から、宿主

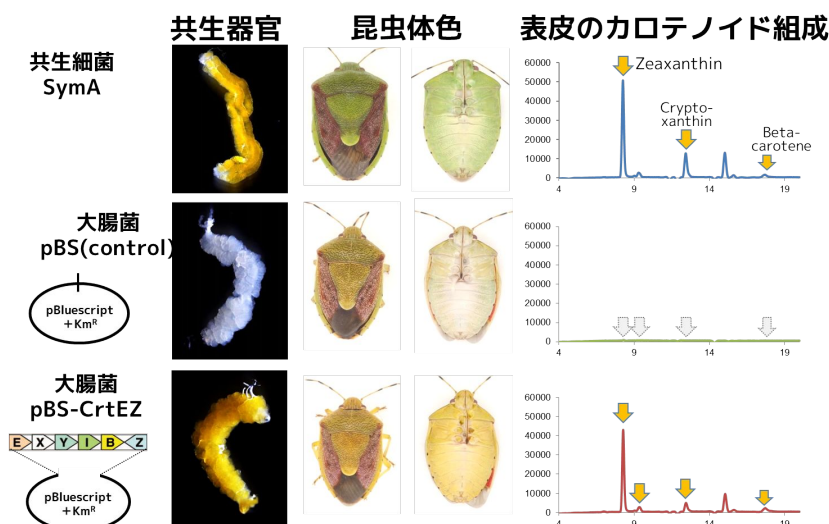


図2. カロテノイド強制発現大腸菌を用いた色素供給の検証

カメムシは共生細菌の合成したカロテノイドを自身の体色形成へと利用していることが明らかとなった。以上をまとめると(図3) 共生細菌は 必須アミノ酸を供給することで宿主によるビルン結合タンパク質の合成を栄養的に支えるとともに、カロテノイド色素を供給することによって昆虫の緑体色の形成に不可欠であることを突き止めた。この結果は、昆虫類が色素を合成できる細菌との共生関係を樹立することで、新たな色素を利用した新規体色形成機構を獲得しうることを実証する重要な成果となった。

4) カロテノイド色素の利用に関わる宿主因子の同定

宿主昆虫は共生細菌が合成したカロテノイド色素を自身の体色として利用するための機構を獲得しているはずである。そこで、色素の運搬や結合を担う宿主タンパク質の探索に取り組んだ。共生器官や体液および表皮中からタンパク質を抽出し、クロマトグラフィーを駆使してカロテノイド結合タンパク質画分を分離し、LC/MS をもちいてタンパク質の同定を試みた。現在、解析途中ではあるが、少なくともカロテノイド輸送をになう因子としてアポリポプロテインが単離され、このタンパク質が体液を介した輸送を担っていることが示唆された。

5) カロテノイド供給の普遍性と多様性

共生細菌によるカロテノイド色素供給の普遍性および多様性を調べるために、幅広い分類群のカメムシ目昆虫より緑色もしくは非緑色の体色を示す計 18 種を日本各地より採集し、その表皮および共生器官において発現している遺伝子について、RNAseq をもちいた解析を先進ゲノム支援の支援も受けて進めた。年度末にシーケンス結果を受領し、現在解析を進めているところである。

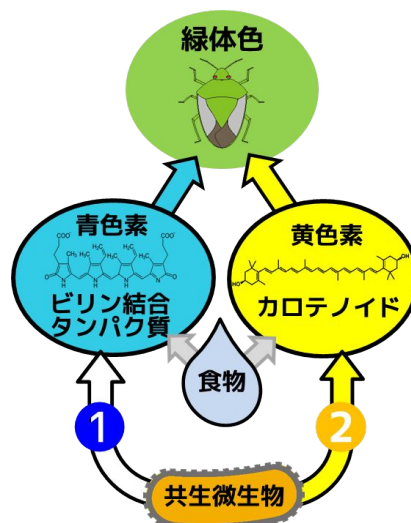


図3. 共生細菌の体色形成への関与

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

Oishi T, Moriyama M, Koga R, Fukatsu T : Morphogenesis and development of midgut symbiotic organ of the stinkbug *Plautia stali* (Hemiptera: Pentatomidae). *Zoological Letters*, in press (2019) 査読有

Moriyama M, Numata H : Eco-physiological responses to climate change in cicadas. *Physiological Entomology* 44:65-76 (2019) 査読有 doi.org/10.1111/phen.12283

Kutsukake M, Moriyama M, Shigenobu S, Meng X Y, Nikoh N, Noda C, Kobayashi S, Fukatsu T : Exaggeration and co-option of innate immunity for social defense.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America
116:8950-8959 (2019) 査読有 doi.org/10.1073/pnas.1900917116

森山実 : セミの共生微生物について. CICADA 25:26-26 (2018) 査読有

Matsuura Y, Moriyama M, Łukasik P, Vanderpool D, Tanahashi M, Meng X Y, McCutcheon J P, Fukatsu T : Recurrent symbiont recruitment from fungal parasites in cicadas.. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 115:E5970-E5979 (2018) 査読有 doi.org/10.1073/pnas.1803245115

Nishide Y, Onodera N. T., Tanahashi M., Moriyama M., Fukatsu T., Koga R. : Aseptic rearing procedure for the stinkbug *Plautia stali* (Hemiptera: Pentatomidae) by sterilizing food-derived bacterial contaminants. Applied Entomology and Zoology 52:407-415 (2017) 査読有 doi: 10.1007/s13355-017-0495-y

〔学会発表〕(計 10 件)

大石紗友美, 森山実, 古賀隆一, 深津武馬. チャバネアオカメムシの成長に伴う共生器官の形態変化. 第 63 回日本応用動物昆虫学会大会 (2019)

森山実, 深津武馬. 腸内共生細菌がつくるカメムシの 緑体色. 第 63 回日本応用動物昆虫学会大会 (2019)

森山実, 林俊成, 深津武馬. カメムシのメス特異的に発達する共生組織に発現するタンパク質の解析. 日本動物学会第 89 回大会 (2019)

Minoru Moriyama. Anthropogenic environmental change cause cicada community change in association with unique life-cycle history traits. 8th EAFES (East Asian Federation of Ecological Societies) (2018)

Minoru Moriyama. Gut symbiotic bacteria confer insect body pigmentation. 1st AsiaEvo Conference (2018)

森山実, 深津武馬. クヌギカメムシが産生する卵保護物質の分子・生化学基盤の解明. 第 62 回日本応用動物昆虫学会大会 (2018)

森山実. カメムシの休眠にともなう体色変化の分子基盤. 日本動物学会第 88 回大会 (2017)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

特になし

6 . 研究組織

研究代表者が中心となって進めた。

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。