

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H02973

研究課題名(和文)カメムシ類における共生細菌の体外保存機構の解明

研究課題名(英文) Preservation of bacterial symbiont in stinkbugs

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) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：一部のカメムシ類昆虫は、自身の成長や繁殖に必須な腸内共生細菌を次世代に引き継ぐため、特殊な分泌物の中に共生細菌を封入し、卵の傍らに塗布する。本プロジェクトでは、共生細菌を体外で保存するカメムシの垂直伝達のしくみの解明に取り組んだ。その結果、垂直伝達のための特別な組織がメス成虫において分化することや、本封入物質に糖タンパク質や低分子分泌性タンパク質を主要構成成分として含んでいることを明らかにした。また、分泌物合成に関わる遺伝子群やそれらを上流において制御する因子を特定するなど、垂直伝達の分子遺伝学的メカニズムを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

共生細菌は宿主体内の環境に高度に適応した結果、単独では環境中で生きていけないほど脆弱になっているが、カメムシ分泌物に封入された状態では、さまざまな環境ストレスにさらされる体外において一定の期間生存を保つことができることから、カメムシが生産する封入物質は高い細菌保護効果をもつことが考えられる。本プロジェクトの推進によって、封入剤の構成要素および関与する遺伝子が特定できたので、今後、得られた成果を活用していくことで、将来的には常温常圧化で簡易的に有用細菌を保存するための技術の開発につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：To transfer essential gut symbiotic bacteria to the next generation, some stinkbugs encapsulate the symbiont in special secretion and apply them beside their eggs. In this project, we worked to elucidate the mechanism of vertical transmission in which stinkbugs store the symbiont outside their bodies. As a result, we revealed that a special tissue for vertical transmission is differentiated in adult females and that this secretory material contains glycoproteins and low-molecular-weight secretory proteins as major components. In addition to genes involved in the secretion synthesis, we also identified their upstream regulators, thereby elucidating the molecular genetic mechanism of vertical transmission.

研究分野：動物生理学

キーワード：共生細菌 垂直伝達 ムチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

カメムシ類は自身の生存に不可欠な相利共生細菌を次世代へ受け継ぐ際、特殊な分泌物の中に共生細菌を封入し、一時的に体外で保管する興味深い行動が知られる。野外の過酷な環境下において脆弱な共生細菌を維持しうるカメムシ分泌物の細菌保護機能は着目すべき課題であるが、これまで詳細には解析されてこなかった。

2. 研究の目的

カメムシ類が共生進化の過程で獲得した高度な垂直伝達の分子作用機構を世界に先駆けて解明することを目的とする。常温・乾燥条件下において有用細菌を保存できる封入保護剤はきわめて魅力的なバイオマテリアルであり、本研究課題の成果は、将来的に新規細菌保存剤の開発へとつながることが期待される。

3. 研究の方法

共生細菌の除去や置換の方法を確立しているチャバネアオカメムシを主な実験対象とし、次世代シーケンス解析を基軸とした分子遺伝学的手法および質量分析を基軸とした生化学分析的手法を技術基盤とし、包括的なアプローチによって垂直伝達の分子機構の実体解明に取り組んだ。

4. 研究成果

(1) 垂直伝達器官に特異的に高発現するムチン様タンパク質の同定

カメムシの共生器官は中腸の後部に形成され、共生細菌は数百もの盲嚢と呼ばれる袋状構造の中に格納されている。これまで我々は、チャバネアオカメムシを含む数種のカメムシにおいて、中腸共生器官の後端に位置するいくつかの盲嚢が、メス成虫において特異的に膨張し、特殊な形態を持つことを明らかにしていた。分子生化学的解析より、このメスの末端膨大盲嚢部 (=SC) において特異的に発現するタンパク質を発見し、質量分析計を用いた解析によりムチン様タンパク質であると同定した。また、本タンパク質が多量の O 型糖鎖と結合していることも確認し

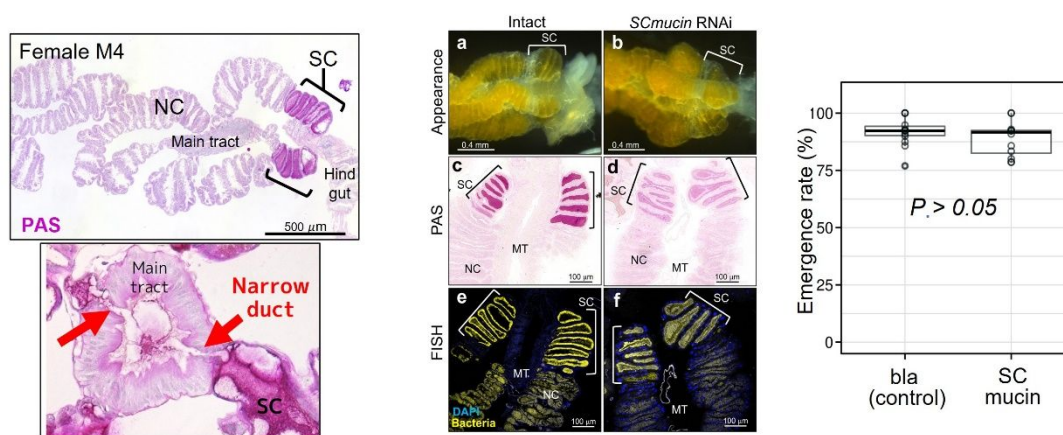


図 1. 末端膨大盲嚢で特異的に発現するムチンタンパク質 左上)メス成虫共生器官の後部末端盲嚢 (SC)の PAS 染色像。左下)SC 部の横断面。SC 部の盲嚢には消化管につながる細孔が空いている。中)ムチン遺伝子 RNAi 処理による影響。SC 内の糖タンパク質は減少するが、細菌集団は存在したままであった。右)ムチン遺伝子 RNAi は垂直伝達効率に影響しなかった。

た。このムチンタンパク質は SC 内腔に充満し、共生細菌を包み込むマトリクスを構成していること、また SC には消化管につながる特殊な孔が備わっており、垂直伝達の際に共生細菌はその孔を通して盲嚢内からムチンに封入された状態で排出され、消化管を通して卵表面へと移行することが明らかとなった(図 1)。ただし、予想に反し、このムチン遺伝子の発現を RNAi によって抑制しても、垂直伝達は阻害されなかった(図 1)。本ムチン遺伝子は通常盲嚢領域においても基底レベルの発現が見られることから、盲嚢内における共生細菌の維持や増殖に関わり、垂直伝達において必須ではないが補助的な機能を担う因子であると考えられた (Moriyama et al. 2022 Sci Rep)。

(2) カメムシ共生細菌の垂直伝達を制御する分子機構の解明

垂直伝達に関わる遺伝子群を網羅的に探索するため、チャバネアオカメムシの共生器官について領域別にトランスクリプトーム解析を実施したところ、数百もの遺伝子が SC 部特異的に高発現していることがわかった。そこで、垂直伝達に重要な遺伝子を絞り込むために、別種のクヌギカメムシにおいても同様の解析を進め、2 種のカメムシの SC 部において共通して発現上昇する遺伝子 91 個を同定した。その内、任意に選定した 15 遺伝子については、チャバネアオカメムシを用いて RNAi による遺伝子機能検証を進め、その中で 2 つの遺伝子が垂直伝達において必須な役割を担うことを明らかにした。

一つ目は分泌型の低分子量タンパク質で、SC 部において最も高発現する遺伝子でありながら、他の体組織においてはほとんど発現しないという特徴的な発現パターンを示す遺伝子であった。RNAi によって本遺伝子の発現を抑制した際には、SC 部に共生細菌が局在しなくなったことから、本タンパク質は SC 内腔に分泌され、垂直伝達に用いられる細菌集団の維持や増殖に関わる実行因子であると考えられた。二つ目の遺伝子は転写因子であり、その発現を RNAi によって抑制すると、SC 部における共生細菌の局在や糖タンパク質の蓄積が見られなくなるとともに、前出の分泌性タンパク質やムチンなど、数十の SC 特異的遺伝子の発現が低下したことから、本転写因子は垂直伝達を担う遺伝子群を上流で司る制御因子であることを明らかにした。本研究成果は、共生器官の一部の領域において垂直伝達のための構造的および機能的な分化が見られること、さらにその機能分化の分子制御機構について明らかにした重要な知見になると考えられる。

(3) クヌギカメムシの産生するゼリー状細菌封入物質

クヌギカメムシの産生する共生細菌封入物質はゼリー状の様態であり、卵の 5 倍以上の重量を有し、厳冬期に孵化する幼虫の餌としても利用されるなど、極めて興味深い特性をもつ。我々のこれまでの研究により、このゼリー状物質の主要構成成分がガラクトースのポリマーであるガラクトタンであることが示唆されたが、動物がガラクトタンを産生/利用することは極めて珍しく、その分子および生化学基盤の解明が必要であった。そこで、まずゼリー構成ガラクタンの構造分析を進めたところ、非修飾ガラクトースが複数の結合様式で連なった多分岐構造をもつと予想された。また、メス成虫を用いて組織別に RNAseq 解析をおこなった結果、ゼリー産生部位である卵巣小管基部において特異的に高発現する遺伝子群には、糖代謝に関わる遺伝子が数多く含まれており、これらがガラクトタン合成を担う遺伝子群であると推定された。一方、ゼリー状物質を摂食する幼虫からはガラクトタン分解活性が検出され、RNAseq 解析より唾液腺や中腸消化器官において糖分解に関わる遺伝子群が発現亢進していることが明らかとなった。以上の結果より、クヌギカメムシが進化の過程において特殊な生活史を実現するため、自身のみが分解・利用できる

る共生細菌封入資材かつ幼虫餌資源としてガラクトン合成能や利用能を獲得したと推察された。

(4) 異なる様態を有する多様な共生細菌封入物質の解析

カメムシ類が産生する共生細菌封入物質の様態は分類群ごとに異なっており、マルカメムシ類のカプセル型、クヌギカメムシ類のゼリー型、ベニツチカメムシの粘液型、そしてその他多くのカメムシ類でみられる卵表面塗布型などが知られるが、封入物質の成分や細菌保護機能については未解明の点が多い。そこで、卵表面塗布型のチャバネアオカメムシおよびクサギカメムシ、カプセル型のマルカメムシ、ゼリー型のクヌギカメムシについて、細菌封入物質のプロテオーム解析を進めたところ、いずれの種においても機能未知タンパク質が高発現していた。また、共通項として Odorant-binding ドメインや Calysin ドメイン、Mite allergen 様ドメインを持つ結合/認識性タンパク質群、および酸化還元に関わる酵素群などが見つかった。結合/認識性タンパク質は共生細菌や保護物質との結合を担い、酸化還元酵素群は活性酸素の除去や利用に関わると予想しているが、今後これらのタンパク質群について機能解析を進め、どのように体外で共生細菌を保護し、垂直伝達を成し遂げているかを明らかにしていく予定である。

(5) カメムシの新奇な垂直伝達行動の発見

カメムシの垂直伝達プロセスを詳細に観察する過程において、予期せず細菌伝達のための新奇的な行動を発見した。卵表面に分泌物を塗布する垂直伝達様式は、複数のカメムシ分類群にわたり最も広く見られる方法であり、共生細菌は卵を覆う粘着性の分泌液の中に混ぜ込まれ、産卵後そのまま卵表面に固着するだろうと考えられていた。ところがチャバネアオカメムシおよびクサギカメムシの産卵行動を詳細に観察したところ、卵を産みつけるたびに後脚の先端を卵側面に押しつける独特な行動が確認された。実際に、後脚先端や卵側面からは共生細菌が検出され、この行動が細菌塗布のための行動であることが確認された。さらに、先行する行動を精査したところ、産卵直前に排泄口から共生細菌を含む粘液を分泌し、後脚先端に受け渡す行動が観察された。また、さらにそれに先立ち排泄を行うという一連の行動連鎖が見られた。すなわち、カメムシ類における腸内共生細菌の垂直伝達は、従来認識されていなかった巧妙な行動シーケンスによって達成されていることが明らかとなった。共生細菌の垂直伝達は、共生器官の構造的・生理学的な機能分化のみでなく、行動レベルにおいても共生維持のための高度な進化が起きていることを示す重要な発見となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Oishi Sayumi, Harumoto Toshiyuki, Okamoto-Furuta Keiko, Moriyama Minoru, Fukatsu Takema	4. 巻 14
2. 論文標題 Mechanisms Underpinning Morphogenesis of a Symbiotic Organ Specialized for Hosting an Indispensable Microbial Symbiont in Stinkbugs	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e00522-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mbio.00522-23	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Moriyama Minoru, Hayashi Toshinari, Fukatsu Takema	4. 巻 12
2. 論文標題 A mucin protein predominantly expressed in the female-specific symbiotic organ of the stinkbug <i>Plautia stali</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7782
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-11895-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Moriyama Minoru, Fukatsu Takema	4. 巻 13
2. 論文標題 Host's demand for essential amino acids is compensated by an extracellular bacterial symbiont in a hemipteran insect model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphys.2022.1028409	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Koga Ryuichi, Tanahashi Masahiko, Nikoh Naruo, Hosokawa Takahiro, Meng Xian-Ying, Moriyama Minoru, Fukatsu Takema	4. 巻 118
2. 論文標題 Host's guardian protein counters degenerative symbiont evolution	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2103957118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2103957118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Oishi Sayumi, Moriyama Minoru, Koga Ryuichi, Fukatsu Takema	4. 巻 5
2. 論文標題 Morphogenesis and development of midgut symbiotic organ of the stinkbug <i>Plautia stali</i> (Hemiptera: Pentatomidae)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Zoological Letters	6. 最初と最後の頁 16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40851-019-0134-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計29件(うち招待講演 2件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 水野陽太、森山実、深津武馬
2. 発表標題 共生細菌を守るマルカメムシの新規カプセルタンパク質
3. 学会等名 日本進化学会第23回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大石紗友美, 水谷政希, 森山実, 深津武馬
2. 発表標題 変態関連遺伝子によるカメムシ共生器官および共生細菌の形態制御
3. 学会等名 日本動物学会第92回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森山実、深津武馬
2. 発表標題 カメムシ科昆虫における共生細菌の垂直伝達のための新奇的な行動
3. 学会等名 日本昆虫学会第81回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森山実
2. 発表標題 昆虫の環境適応機構に関する研究
3. 学会等名 日本昆虫学会第81回大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大石紗友美, 森山実, 水谷政希, 深津武馬
2. 発表標題 カメムシの腸内で共生細菌の消化吸収を制御するHox遺伝子
3. 学会等名 第66回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水野陽太, 森山実, 深津武馬
2. 発表標題 共生細菌の伝達に必要なマルカメムシの新規カプセルタンパク質
3. 学会等名 第66回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森山実, 深津武馬
2. 発表標題 共生細菌がつくるカロテノイド色素を利用したカメムシの体色形成
3. 学会等名 日本動物学会第90回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森山実、林俊成、深津武馬
2. 発表標題 共生細菌の垂直伝達を担うカメムシ中腸共生器官の構造と機能
3. 学会等名 第64回応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大石紗友美、森山実、古賀隆一、深津武馬
2. 発表標題 カメムシの消化管に存在する共生器官はどのように形成されるのか
3. 学会等名 日本動物学会第90回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大石紗友美、森山実、古賀隆一、深津武馬
2. 発表標題 カメムシ共生器官に盲嚢はどのように配列するのか
3. 学会等名 第64回応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Oishi S, Moriyama M, Koga R, Fukatsu T
2. 発表標題 Morphogenesis and development of midgut symbiotic organ of stinkbug
3. 学会等名 Gordon Research Conference on Animal-Microbe Symbioses (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大石紗友美, 森山実, 春本敏之、深津武馬
2. 発表標題 カメムシ共生器官基本パターン形成への内臓筋の関与
3. 学会等名 日本動物学会第91回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森山実
2. 発表標題 カメムシ体色の季節変化を制御する機構
3. 学会等名 日本蚕糸学会第 91 回大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大石紗友美, 森山実, 深津武馬
2. 発表標題 カメムシ共生器官の形態変化は変態制御遺伝子群によって制御される
3. 学会等名 第65回応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大石紗友美, 森山実, 水谷政希, 深津武馬
2. 発表標題 Hox遺伝子Labialの新機能 -カメムシ腸内共生細菌の消化・吸収制御-
3. 学会等名 日本進化学会第 2 4 回沼津大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水野陽太、森山実、深津武馬
2. 発表標題 Buchnerは正しかった！カツオゾウムシ類の共生細菌の再発見
3. 学会等名 日本進化学会第24回沼津大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森山実、深津武馬
2. 発表標題 カメムシ腸内細菌の垂直伝達を制御する分子機構の解明
3. 学会等名 第67回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 汪 亜運, 古賀 隆一, 小口晃平, 細川貴弘, 二河成男, 森山実, 深津武馬
2. 発表標題 環境細菌Pantoeaがカメムシ共生細菌に進化する原因遺伝子
3. 学会等名 第67回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 水野 陽太, 森山実, 深津武馬
2. 発表標題 細胞外共生系をもつカツオゾウムシ類は驚くほど多様な細菌と共生する
3. 学会等名 第67回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------