

令和 6 年 4 月 11 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K22458

研究課題名（和文）昆虫類の必須共生微生物におけるゲノム進化と多様化：野外集団の追跡調査による実証

研究課題名（英文）Genome evolution and diversification of obligate symbiotic bacteria in insects: tracking survey of field populations

研究代表者

細川 貴弘（Hosokawa, Takahiro）

九州大学・理学研究院・准教授

研究者番号：80722206

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：生物の進化を野外集団で観察できた例はいまだ少ない。本研究課題は昆虫の共生細菌の置換とゲノム縮小に注目し、その進化過程を野外集団観察することを目的としておこなった。チャバネアオカメムシの南西諸島集団を対象に過去（2008年-2010年）に共生細菌頻度の大規模調査をおこなっており、これと比較できるデータを本研究の調査（2019年-2021年）で得ることができた。共生細菌頻度については予想通り共生細菌Bを持つ個体が減少していたことから、共生細菌の置換は進行している可能性が考えられたが、今後さらに調査を継続して動向を見守る必要がある。加えて、今後の調査で比較対象となる共生細菌のゲノムサンプルを得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昆虫類の共生細菌の研究は実験室内における遺伝子レベルの研究に偏っており、野外で起きていることを対象にした研究は世界的に見ても稀であることから、昆虫の野外集団で共生細菌進化を調べた本研究の成果は極めてオリジナリティーが高く、注目を集めるものである。また、日本の南西諸島において非常にユニークな現象が起きていることを明らかにした点で、我が国の誇る南西諸島の生物多様性とその重要性をあらためてアピールする研究成果でもある。

研究成果の概要（英文）：There are still few examples of field observations of the evolution of organisms. This study focused on the replacement and genome reduction of symbiotic bacteria in insects to observe the evolutionary process in field populations. A large-scale survey of symbiont infection frequencies was conducted in the past (2008-2010) in southwestern island populations of the pentatomid stinkbug *Plautia stali*, and comparable data were obtained in this study (2019-2021). As expected, the number of individuals with symbiotic bacteria B decreased, suggesting that symbiont replacement may be underway, but further surveys are needed to monitor the trend. I also obtained genomic samples of symbiotic bacteria to compare in future surveys.

研究分野：進化生物学

キーワード：必須共生細菌の種内多型 カメムシ 共生細菌の置換 南西諸島 ゲノム縮小 野外集団

### 1. 研究開始当初の背景

昆虫類の必須共生微生物の置換はこれまで多くの分類群で報告されてきたが、それらはすべて分子系統解析のみによる研究であり、遠い過去に起きたイベントの推定であった。たとえば、ゾウムシ類の大部分の種はナルドネラと呼ばれる共生細菌を保持しているが、*Sitophilus* 属のゾウムシはナルドネラを持たず、その代わりにソダリスと呼ばれる、ナルドネラとはまったく異なる系統の共生細菌を保持している。*Sitophilus* 属のゾウムシは単系統群を形成することから、このグループの共通祖先においてナルドネラがソダリスに置換されたと考えられている。これに対して応募者は、ごく最近に起きたと考えられる、個体レベルでの必須共生微生物の置換を発見した (Hosokawa et al. 2016 *Nat. Microbiol.*)。チャバネアオカメムシ *Plautia stali* の南西諸島集団では、共生の歴史が比較的長いと考えられる培養不可能な共生細菌 B を持つ個体と、共生の歴史が比較的短いと考えられる培養可能な共生細菌 C~F を持つ個体が混在しており (図 1)、さらに共生細菌 C~F のそれぞれについて系統的・機能的に同等とみなせる細菌が環境中に生息している。この現象を目の当たりにした応募者は、チャバネアオカメムシの南西諸島集団では集団レベルにおいて古い共生細菌 (B) が新しい共生細菌 (C~F) へと置き換わる途上の段階にあるのではないかと考えた。共生細菌 B から共生細菌 C~F への個体レベルでの置換は今後も繰り返して生じていくであろう。一方、共生細菌 B は環境中には生息していないので、共生細菌 C~F から共生細菌 B に戻る置換は起こりにくそうである。したがって、南西諸島では共生細菌 B と共生する個体の頻度が徐々に減少し、最終的にはすべての個体が共生細菌 C~F と共生するようになることが予想される。さらに応募者は 10 年前の調査においてカメムシから単離した共生細菌 C~F を培養した際、一部の菌株では培地上での増殖速度が著しく遅いことに気がついた。この増殖速度が遅い菌株ではすでにゲノム縮小が進みつつあるのではないかと考えている。これらの観察結果から応募者は、“共生細菌の置換とゲノム進化は意外に速いスピードで進行しており、数十年間かけて野外集団を追跡調査すれば、その変遷の過程を捉えられるかもしれない”と期待し、南西諸島の野外集団を長期間にわたって追跡調査する計画を立案した。前回の調査から約 10 年が経過した今が第二回目の調査の頃合いと考え、本研究の構想に至った。

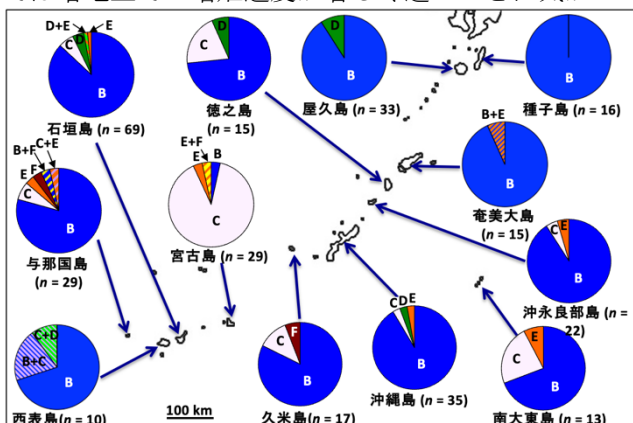


図1：南西諸島で採集したチャバネアオカメムシの持つ共生細菌タイプ

### 2. 研究の目的

カメムシ類における共生細菌の置換とゲノム縮小の過程を野外集団の追跡調査によって明らかにすることを本研究の目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 3-1 野外での採集

2008 年~2010 年におこなったチャバネアオカメムシの大規模調査 (図 1) において比較的多くの個体数を調べることができていた屋久島、沖縄島、石垣島、与那国島を調査地に設定し、2019 年~2021 年に新たに採集をおこなった。また予備調査においてチャバネアオカメムシと似たような共生細菌の種内多型が見られることがわかってきたミヤコキンカメムシ *Lampromicra miyakona* (図 2 上) とツチカメムシ *Macroscytus japonensis* (図 2 下) も新たに研究対象にして沖縄島、石垣島、与那国島で採集をおこなった。採集した個体は生きたまま実験室に持ち帰り、以下の実験をおこなった。



図2：ミヤコキンカメムシ (上) ツチカメムシ (下)

#### 3-2 共生細菌の培養性調査と DNA 抽出

カメムシ類の共生器官である中腸盲嚢部を解剖摘出し、PBS 内ですりつぶしたあと、懸濁液の一部を LB 寒天培地に塗布してコロニー形成が起こるかどうかを調査した。塗布後 48 時間までにコロニー形成されたものを“培養できた”と判断し、コロニーを液体培地内でさらに培養したのち DNA を抽出した。培養できた細菌についてはすべてグリセロールストックを作成して保存した。また、中腸盲嚢部をすりつぶした懸濁液の残りは 15,000rpm で 1 分間遠心し、沈殿物 (共生細菌細胞のペレット) から DNA 抽出をおこなった。

#### 3-3 共生細菌のジェノタイプング

各共生細菌 DNA から 16S rRNA 遺伝子 (約 1,450bp) を PCR 増幅し、シーケンス・系統解析によってジェノタイプングをおこなった。ミヤコキンカメムシの共生細菌については 16S rRNA に

加えて *groEL* (848bp) および *gyrB* (922bp) 遺伝子の配列も決定して共生細菌のジェノタイプピニングをおこなった。

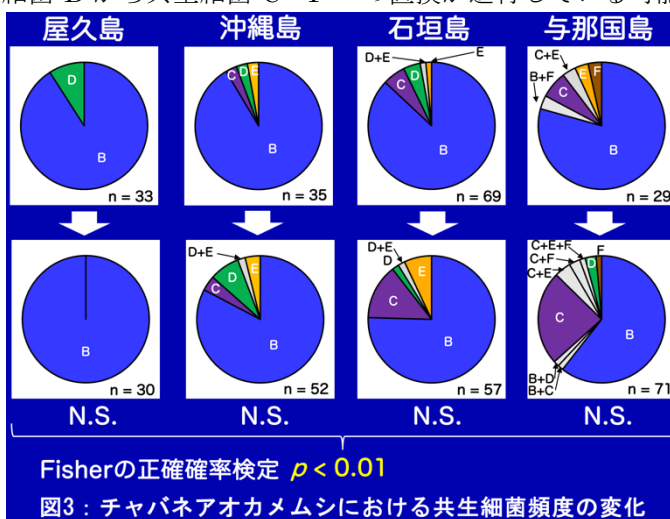
### 3-4 共生細菌のゲノムシーケンス

上記の抽出した共生細菌ゲノム DNA について、Nanopore MinION を用いてゲノムシーケンスをおこなった。

## 4. 研究成果

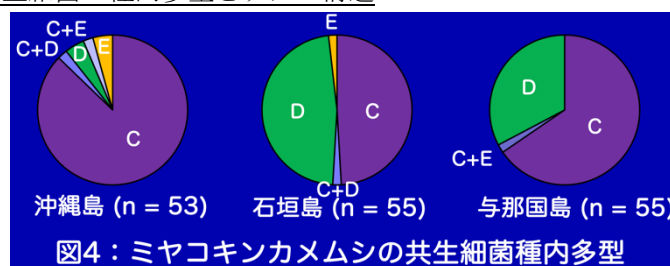
### 4-1 チャバネアオカメムシ南西諸島集団における共生細菌頻度の変化

チャバネアオカメムシの共生細菌頻度の結果を図3に示した。図の上段が2008年～2010年の調査結果、下段が今回(2019年～2021年)の調査結果である。各島における共生細菌Bを保持する個体の割合は屋久島で90.9%(30/33)→100%(30/30)と増加していたものの、沖縄島で91.4%(32/35)→82.7%(43/52)、石垣島で87.0%(60/69)→75.4%(43/57)、与那国島で82.8%(24/29)→63.4%(45/71)と他の3島ではいずれも減少していた。各島における共生細菌Bを保持する個体の割合の変化は統計的に有意ではなかったが、すべての島のデータをプールすると共生細菌Bを持つ個体の頻度88.0%(146/166)→76.7%(161/210)となり、これは統計的に有意な減少であった(Fisherの正確確率検定、 $p < 0.01$ )。すなわち南西諸島全体で見ると共生細菌Bを保持する個体の割合は減少している可能性が考えられる。これは予想通りの結果であり、南西諸島においては共生細菌Bから共生細菌C～Fへの置換が進行している可能性が示唆された。ただし現段階では2回の調査結果の比較のみであることから、「共生細菌の置換が確かに進行している」とは結論づけることはできず、今後さらに調査回数を増やして動向を調べる必要がある。また、今回採集した個体の一部から共生細菌BとCのゲノムシーケンスをおこなっており、培養できた共生細菌C～Fについてはグリセロールストックを作成している。これによって、これから10年後に予定している次回調査の際は共生細菌頻度の比較だけでなく、共生細菌のゲノムにどのような変化が生じているかも調査することが可能となった。

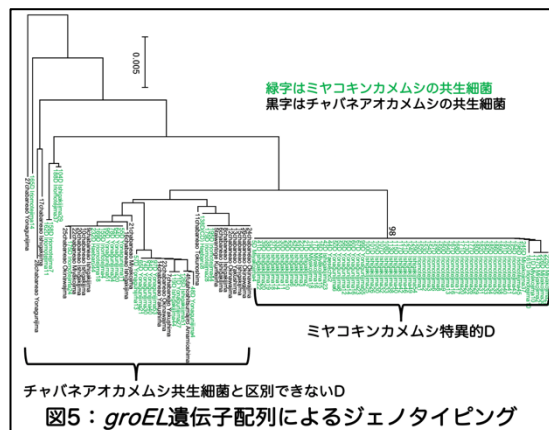


### 4-2 ミヤコキンカメムシにおける共生細菌の種内多型とゲノム構造

ミヤコキンカメムシの共生細菌を16S rRNA 遺伝子配列を用いてジェノタイプピニングしたところ、チャバネアオカメムシで見られた共生細菌C, D, Eと同じと思われる共生細菌を保持しており、これらの共生細菌を保持する個体が各島に混在していることも共通していた(図4)。またこれらの共生細菌はすべて培養できることも明らかになった。ミヤコキンカメムシについても10年後に予定している調査で共生細菌の頻度だけでなくゲノムについても比較できるようにすべての共生細菌をグリセロールストックとして保存している。



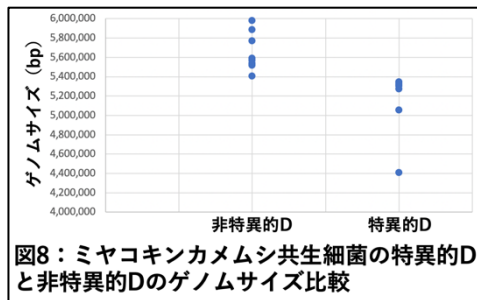
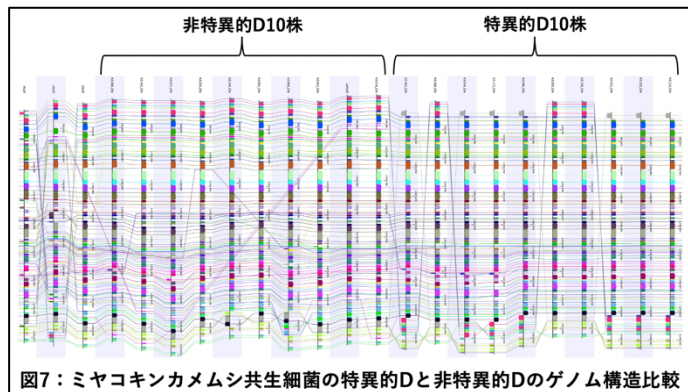
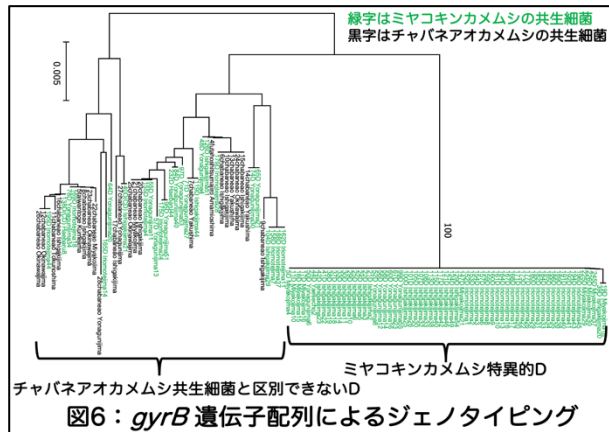
これらの共生細菌がチャバネアオカメムシの共生細菌C, D, Eと同じと言えるかどうかを検討するために、*groEL* 遺伝子および *gyrB* 遺伝子の配列についても比較をおこなったところ、予想外なことに、ミヤコキンカメムシの共生細菌Dの中にはチャバネアオカメムシの共生細菌Dと区別できるものとできないものの両方が存在することが明らかになった(図5, 6)。以下ではチャバネアオカメムシの共生細菌と区別できるものをミヤコキンカメムシ特異的D、区別できないものを非特異的Dと呼ぶ。なお、共生細菌Cと共生細菌Eについては *groEL* と *gyrB* 遺伝子の配列を使ってもチャバネアオカメムシのものとミヤコキンカメムシのものは区別できないことが明らかになった。



おそらく、ミヤコキンカメムシ特異的 D は非特異的 D よりもミヤコキンカメムシとの共生の歴史が長いことが予想され、特異的 D と非特異的 D の間では共生の歴史の長さの違いによって生じたゲノム構造の違いが見られることが期待される。特異的 D (10 株) と非特異的 D (10 株) についてゲノムシーケンスをおこないゲノム構造を比較したところ、構造には大きな違いは見られなかったが (図 7)、特異的 D の方が非特異的 D よりもゲノムサイズがわずかに小さいことが明らかになった (図 8)。このことから、特異的 D ではカメムシと共生を続けることによるゲノム縮小がわずかだが進行していると考えられた。今回の調査では特異的 D はすべて培養できたが、今後さらにゲノム縮小が進行するとチャバネアオカメムシの共生細菌 B のように培養ができなくなることが予想される。ゲノム縮小がどれくらいの時間スケールで進行するかは今回の調査だけでは推定できないが、10 年後に予定している調査で採集した個体について特異的 D のゲノムシーケンスをおこない今回の調査結果と比較するとゲノム縮小速度の推定という画期的な解析が可能になるかもしれない。

#### 4-3 ツチカメムシにおける共生細菌の種内多型

ツチカメムシの南西諸島集団についても共生細菌の種内多型と培養性を確認できたが、チャバネアオカメムシとミヤコキンカメムシとは大きく異なる共生細菌を保持することが明らかになりつつある。しかし詳細な解析をおこなうにはサンプル数が不十分であり、今後の研究でサンプル数を増やして解析する予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takahiro Hosokawa, Takema Fukatsu	4. 巻 39
2. 論文標題 Relevance of microbial symbiosis to insect behavior	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Opinion in Insect Science	6. 最初と最後の頁 91~100
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cois.2020.03.004	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 Takahiro Hosokawa, Megumi Imanishi, Ryuichi Koga, Takema Fukatsu	4. 巻 54
2. 論文標題 Diversity and evolution of bacterial symbionts in the gut symbiotic organ of jewel stinkbugs (Hemiptera: Scutelleridae)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied Entomology and Zoology	6. 最初と最後の頁 359-367
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13355-019-00630-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松本くるみ・細川貴弘
2. 発表標題 ミヤコキンカメムシの共生細菌4系統の機能的な違い:実験室内環境下と塩ストレス環境下での比較
3. 学会等名 三学会合同熊本大会2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 細川貴弘・中脇琢磨・渡邊修人
2. 発表標題 ツチカメムシと腸内細菌の共生関係維持機構
3. 学会等名 三学会合同熊本大会2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 細川貴弘
2. 発表標題 カメムシ類と腸内細菌の共生システム
3. 学会等名 第134回日本森林学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中脇琢磨・渡邊修人・細川貴弘
2. 発表標題 ツチカメムシ <i>Macroscytus japonensis</i> における成長に必要な共生細菌の環境獲得
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 中脇琢磨・渡邊修人・細川貴弘
2. 発表標題 チャバネアオカメムシの共生細菌はなぜ南西諸島集団だけで多様化したのか？
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 鐘ヶ江正恵・今西萌美・細川貴弘
2. 発表標題 ミヤコキンカメムシの共生細菌の種内多型
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 細川貴弘、今西萌美
2. 発表標題 チャバネアオカメムシの野外集団では共生細菌の置換が進行しているか？：10年前と現在の比較
3. 学会等名 第65回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 細川貴弘、今西萌美、深津武馬
2. 発表標題 キンカメムシ類における腸内共生細菌の多様化と進化
3. 学会等名 第64回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡邊修人、細川貴弘
2. 発表標題 ツチカメムシ類 (Macroscytus属) は腸内共生細菌を垂直伝播するか？
3. 学会等名 第64回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2020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
研究協力者	古賀 隆一  (Koga Ryuichi)		

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
---------	---------