

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660066

研究課題名(和文)コガタリハムシ腸内共生乳酸菌の機能生態の解明

研究課題名(英文)Ecophysiology of gut bacteria of leaf beetles *Gastrophysa atrocyanea*

研究代表者

大坪 和香子(Wakako, Ohtsubo)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：00598203

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：コガタリハムシ *Gastrophysa atrocyanea* および同属異種の *Gastrophysa viridula* の幼虫個体から腸内フローラの16S rRNA遺伝子解析およびメタゲノム解析を行った。両種のハムシ腸内において、*Rahnella*属、*Pantoea*属、*Serratia*属の未培養グループの腸内細菌科が優勢化していることが明らかになった。メタゲノムライブラリーから見出されたシュウ酸脱炭酸酵素遺伝子は、既知の腸内細菌科の遺伝子と同一性が最も高かったことから、上述の優勢細菌種がシュウ酸分解能を有し、外来雑草エゾノギシギシを主食とする宿主ハムシのシュウ酸分解に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We conducted 16S rRNA gene analysis and metagenomic analysis of green dock leaf beetles *Gastrophysa atrocyanea* and *Gastrophysa viridula*. Different uncultured groups of Enterobacteriaceae, including genera *Rahnella*, *Pantoea*, and *Serratia* dominated the gut microbiota of each beetle, which reflects the location of correction sites. The metagenomic library contained a gene homolog of oxalate decarboxylase, which may be involved in degradation of oxalate, a major recalcitrant compound in *Rumex Obtusifolius* that the beetles fed on. The homolog showed the highest identity to those from genomes of Enterobacteriaceae species, which suggests its origin from the gut members dominating the *Gastrophysa* beetles.

研究分野：応用微生物学

キーワード：腸内フローラ シュウ酸分解 生物農薬 昆虫微生物共生系

1. 研究開始当初の背景

タデ科の多年草エゾノギシギシ (*Rumex obtusifolius*) は、環境省の指定する要注意外来生物であり、明治以降に国内に侵入した。エゾノギシギシは、全国の牧草地や農耕地において作物の生育を阻害する強害雑草として大きな問題となっており、被災地の休耕や土壌の入れ替えの結果として繁茂している例が多く見られる。エゾノギシギシの地上部には高濃度(乾燥重量の 10%以上)の水溶性シュウ酸が含まれ、動物の血液中のカルシウムイオンと結合して中毒症状を示す他、昆虫の摂食作用を阻害することもある。日本の在来昆虫であるコガタルリハムシ (*Gastrophysa atrocyanea*) の成虫および幼虫は、このエゾノギシギシを選択的かつ旺盛に摂食するが、体内にシュウ酸は蓄積していない (Miyagi et al., *Metabolomics*, 2013)。高度に酸化されたシュウ酸は、昆虫や動物の酵素では分解されにくい、シュウ酸分解能を有する微生物は多く存在する。このため、コガタルリハムシが摂食したシュウ酸は、腸内フローラにより分解除去されている可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、コガタルリハムシが外来雑草であるエゾノギシギシ摂食を中心とする生活環に順応した短期的進化の要因として腸内フローラに着目し、その細菌群集構造およびシュウ酸分解能を明らかにすること、さらにはその感染、定着および共生機能を明らかにすることを目的として研究を行った。当初は先行研究において優勢化が示唆された *Lactococcus* 属乳酸菌の単離・解析を目指していたが、研究開始後に別の細菌の優勢化が明らかになったため(下記の研究成果参照)、研究期間の後半では、シュウ酸分解に関与する腸内細菌科細菌の単離を目指した。また、ヨーロッパ原産のエゾノギシギシを現地摂食する同属異種の *Gastrophysa viridula* を対象宿主として追加し、培養非依存的手法による腸内フローラの群集構造の地域間差異の解明およびシュウ酸代謝機能を有する細菌種の特定を目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 16S rRNA 遺伝子の T-RFLP 解析によるハムシ腸内細菌叢の比較解析

コガタルリハムシおよび *G. viridula* のハムシ幼虫から腸を採取後ホモジネートし、市販のキット (DNeasy Blood & Tissue Kit, QIAGEN) および従来のフェノール・クロロホルム法を用いて全 DNA を単離した。これらの DNA を鋳型とし、ユニバーサルプライマー 27F および 1492R を用いて 16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅を行った。得られた配列断片を DynaExpress TA PCR Cloning Kit を用いて大腸菌にクローニングした。ハムシが摂食した植物のプラスチドおよびミトコンドリア由来の配列を除くために、これらの配列を増

幅しないプライマー 799F (Chelius and Triplett, *Microb. Ecol.*, 2001) と 1492R によるコロニー PCR を行い、シーケンス用のクローンを選択した。T-RFLP については、Yamada らが報告した手法に従って行った (Yamada et al., *Syst. Appl. Microbiol.*, 2013)。

(2) シュウ酸分解能を有する細菌の単離

コガタルリハムシの幼虫から採取した腸管を 0.9% 生理食塩水中でホモジネートした懸濁液およびその段階希釈液を、シュウ酸 (終濃度 10~100 mM) を添加した合成寒天培地およびシュウ酸を単一の炭素源として与えた最少寒天培地に塗布し、嫌気または好気条件下において 30 °C でインキュベートした。得られたコロニーを、単離に用いた寒天培地および液体培地に植菌し、ゲノム DNA を DNeasy Blood & Tissue Kit で抽出し、上述したプライマーを用いて 16S rRNA 遺伝子を増幅した。得られた配列をシーケンスし、細菌種の同定を行った。

(3) 次世代シーケンサー MiSeq を用いた 16S rRNA 遺伝子のメタ解析

国内外の 20 地点において採取した *Gastrophysa* 属ハムシ 2 種の幼虫の腸試料から抽出した DNA を鋳型とし、プライマー 342F および 804R (Mori et al., *DNA Res.*, 2013) を用いて 16S rRNA 遺伝子を増幅した。本プライマーセットについては、事前に同試料を用いて T-RFLP 解析を行い、最も T-RF の数が多く得られたために使用を決定した。得られたアンプリコンを E-Gel システム (Invitrogen) により精製し、等濃度 (15 ng/μL) を調整後、MiSeq によるシーケンス (300 bp × 2 PE) を行った。得られた配列 (3368 万リード) のアセンブリおよびフィルタリング (カットオフ値: QC=20, 300 bp) およびクラスタリングを行い、RDP データベース (<https://rdp.cme.msu.edu/>) を参照した系統分類を行った。シーケンスおよびデータ解析については、2014 年度ゲノム支援(文部科学省)の支援班(東京工業大学、九州大学)の協力を頂いた。また、mothur (www.mothur.org/) による解析を同様にを行い、結果の一貫性を検討した。

(4) 次世代シーケンサー MiSeq を用いたメタゲノム解析

国内外の 2 地点において採取した *Gastrophysa* 属ハムシ 2 種の幼虫の腸試料から抽出した DNA について、Nextera ライブラリを作製し、メタゲノムシーケンスを行った。得られた配列は、アセンブラ MEGAHIT (Li et al., *Bioinformatics*, 2015) を用いてアセンブリを行い、タンパク質をコードする遺伝子配列を MetaGeneMark (<http://exon.gatech.edu/>) により抽出した。アノテーションは KEGG データベース (<http://www.genome.jp/kegg/genes.html>) を参照した。シーケンスおよびデータ解析については、メタ 16S 解析と同様に 2014 年度ゲノム支援班の協力を頂いた。

4. 研究成果

(1) T-RFLP およびクローン解析による *Gastrophysa* 属ハムシ腸内における優勢細菌種の同定

T-RFLP 解析の結果を図 1 に示す。

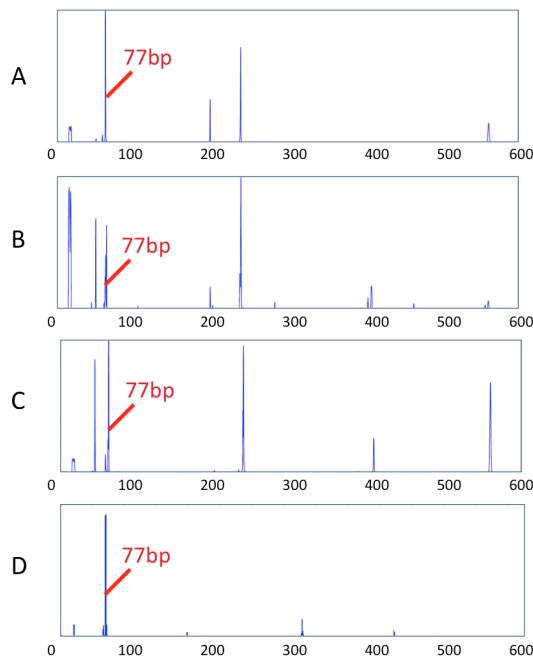


図 1 . 複数地点において採集したコガタリハムシ (A~C) およびドイツで採集した *G. viridula* (D) の 16S rDNA 遺伝子の T-RFLP 解析。腸内細菌科 (Enterobacteriaceae) に特徴的な T-RF (77bp) が各試料に観察された。

T-RFLP 解析およびクローン解析において、以下の知見が得られた。

野外で採集した幼虫と飼育条件下において孵化した幼虫の腸内フローラの菌叢は大きく異なっていた。

T-RFLP 解析において主要な T-RF (74 bp, *MspI* 消化) の 16S rDNA 遺伝子配列は、*Rahnella* 属、*Serratia* 属、*Pantoea* 属の *Enterobacteriaceae* (腸内細菌科) であったことから、*Gastrophysa* 属ハムシ腸内フローラにおいてこれらの細菌が優勢化していることが示唆された。

ユニバーサルプライマー 27F および 1492R を用いた解析では植物ミトコンドリアおよびプラスチド由来の配列が 16S rDNA 遺伝子クローンライブラリの 8 割以上を占めていた。また、これらの配列を増幅しないプライマー 799F を用いた場合には *Pantoea* 属など一部の細菌が検出できなくなってしまったため、従来のクローン解析による細菌群集構造解析は困難であると考えられた。

(2) シュウ酸分解能を有する細菌の単離

これまで、複数の合成培地および炭素源や窒素源の種類を変えた培地を用いて単離を試みたところ、シュウ酸およびグルコースを炭素源とし、さらにエゾノギシギシの水およ

びエタノール抽出物を加えた最少培地において、シュウ酸を分解する能力を有する細菌株 A (図 2) が得られた。



図 2 . コガタリハムシ腸内から単離されたシュウ酸分解能を有する腸内細菌科の新規分類株のコロニー写真。目盛りは 1 cm。

この株は、クローン解析において優勢化していた菌株とは異なっていたが、腸内細菌科に分類される新系統型の細菌であり、シュウ酸分解能およびシュウ酸を炭素源とする生育が見られた。現在詳細な系統解析および生理学的解析を行っている。

(3) メタ 16S rDNA 遺伝子解析による *Gastrophysa* 属ハムシ腸内フローラの地域間差異の解明

日本およびドイツの複数地点において採集したコガタリハムシおよび同属異種 *Gastrophysa viridula* の腸内フローラについて、MiSeq (Illumina) を用いて行った細菌群集構造解析の結果を以下に述べる。

クローン解析で既に明らかにしたように、野外で採集した幼虫と飼育条件下において孵化した幼虫の腸内フローラの菌叢は属レベルで大きく異なっており、飼育条件下では *Enterobacter* 属や *Yersinia* 属が増加していた。先行研究で検出された *Lactococcus* 属乳酸菌は、飼育条件のコガタリハムシのみに存在していた。

コガタリハムシと *G. viridula* の腸内フローラにおいて、それぞれの種に特徴的な *Rahnella* 属および *Serratia* 属に近縁の未培養グループの細菌が優勢化していた。

コガタリハムシに関して、1 齢幼虫と 3 齢幼虫の腸内フローラに大きな差は見られなかったことから、一度獲得した腸内フローラの細菌叢は幼虫期間を通して定着していることが示唆された。

G. viridula に関して、2 地点において採集した卵に由来するハムシ幼虫の腸内フローラは、1 地点で採取したエゾノギシギシを摂食させて飼育した場合において地域特異性を維持していたことから、腸内フローラの形成は摂食感染による獲得以外の因子が関与していることが示唆された。

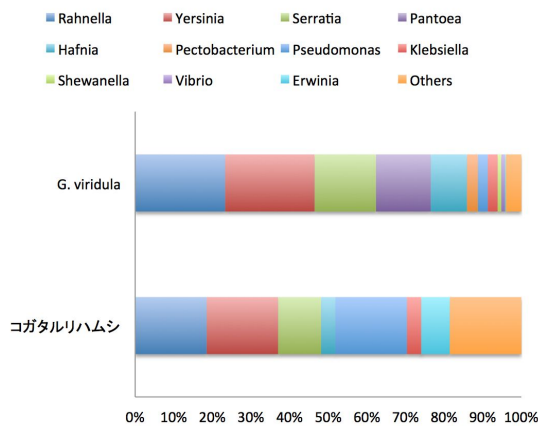


図3. コガタルリハムシおよび *G. viridula* 腸 DNA の MiSeq を用いたメタ 16S 解析の結果。各ハムシ試料の代表的な細菌群集構造を、配列の BLAST 検索において最も相関性が高かった細菌の系統 (属) として分類表示した。

(4) メタゲノム解析によるシュウ酸分解関連酵素遺伝子の探索

コガタルリハムシおよび *G. viridula* の腸 DNA からそれぞれ 1 試料を選択し、メタゲノムライブラリを構築した。そのうち、*G. viridula* のメタゲノム配列の中に、シュウ酸の分解酵素の一つであるシュウ酸脱炭酸酵素 (oxalate decarboxylase) の遺伝子が見出された。この遺伝子配列の BLAST 検索および系統解析の結果、植物の共生細菌として知られる *Pantoea agglomerans* のゲノム上の遺伝子と高い相関性が見られた。これらのことから、ハムシの腸内フローラで優勢化するシュウ酸を分解する能力のある細菌種に、エゾノギシギシ等の植物に共生する細菌と共通性があることが知られた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

(1) 大坪和香子、コガタルリハムシ腸内共生乳酸菌の機能生態の解明、新学術領域「ゲノム支援」2015 年度 拡大班会議、京都国際会館、京都市左京区 (2015 年 8 月 27 日)(口頭)

(2) 大坪和香子、宮城敦子、小島紀幸、川合真紀、内宮博文、宮内啓介、遠藤銀朗、エゾノギシギシを摂食する *Gastrophysa* 属ハムシ腸内フローラの地域的差異、日本農芸化学会 2015 年度大会、岡山大学津島キャンパス岡山市 (2015 年 3 月 29 日)(口頭)

(3) W. Ikeda-Ohtsubo, Miyagi Atsuko, Ojima Noriyuki, Kawai-Yamada Maki, Uchimiya Hirofumi, Endo Ginro, “Bacterial community structures in the gut of green dock beetles of the genus *Gastrophysa*”, 15th International

Symposium on Microbial Ecology (ISME-15), ソウル、韓国 (2014 年 8 月 26 日)(ポスター)

(4) W. Ikeda-Ohtsubo, “Bacterial community profiles in the gut of the green dock beetle *Gastrophysa atrocyanea*”, Seminar of Department of Biogeochemistry, Max Planck Institute for Terrestrial Microbiology, マールブルク、ドイツ (2014 年 6 月 4 日)(口頭)

(5) 大坪和香子、宮城敦子、小島紀幸、川合真紀、内宮博文、遠藤銀朗 “Bacterial community profiles in the gut of green dock beetles *Gastrophysa atrocyanea*”, 第 29 回日本微生物生態学会大会、鹿児島大学郡元キャンパス、鹿児島市 (2013 年 11 月 24 日)(口頭)

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大坪 和香子 (OHTSUBO WAKAKO)

東北大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：00598203

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

宮城 敦子 (MIYAGI ATSUKO)

埼玉大学・理工学研究科・研究員

研究者番号：00645971