

令和元年6月17日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05638

研究課題名(和文) 昆虫内部共生の成立に関わる共生細菌の遺伝的基盤

研究課題名(英文) Genetic bases of bacteria for symbiotic association with an insect

研究代表者

菊池 義智 (Kikuchi, Yoshitomo)

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：30571864

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ホソヘリカメムシの腸内共生細菌であるBurkholderiaについて培養時(in vitro)と共生時(in vivo)の形態、代謝、遺伝子発現プロファイルの比較を行い、細菌の共生機構について詳細に解析を行った。その結果、共生細菌はカメムシ腸内への定着により鞭毛運動性や分泌装置を失う一方、細胞表面が薄弱化し、抗菌タンパク質や浸透圧など各種ストレスへの感受性が高まることが明らかとなった。また発現遺伝子の比較により、共生細菌はカメムシ腸内において宿主の代謝老廃物をリサイクルして必須アミノ酸やビタミンB類を合成し、これにより宿主の成長や繁殖に大きく寄与しているものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌との共生は多くの動植物に見られる普遍的な現象であるが、その遺伝的基盤についてはほとんど解明されていない。本研究ではホソヘリカメムシの共生細菌(Burkholderia)を対象に、共生細菌の機能や共生のメカニズムを解明する目的で研究を行い、本共生細菌が宿主昆虫体内で遺伝子発現を大きく変化させ、宿主の代謝老廃物を活発に利用することで昆虫体内環境に高度に適応していることが明らかとなった。本研究成果は共生細菌の昆虫体内適応機構を遺伝子レベルで解明した点で学術的に重要である。加えて、ホソヘリカメムシは大豆の重要害虫であることから、共生細菌をターゲットにした新たな防除法の開発にも繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The bean bug *Riptortus pedestris* is associated with *Burkholderia* symbionts in its gut crypts. In order to understand how the symbiotic bacteria stably colonize the midgut crypts and which services they provide to the host, the cytology, physiology and transcriptomics of free-living and gut-colonizing symbionts were compared. The analyses revealed that midgut-colonizing bacteria were smaller in size and had increased stress sensitivity, lost motility, and an altered cell surface. Transcriptomics revealed that metabolic pathways of sulfur compounds and the assimilation of insect nitrogen wastes were up-regulated in the gut-colonizing symbionts. The data also suggested that the in vivo symbionts produced all essential amino acids and B vitamins. Together, these findings suggest that the symbiont recycles host metabolic wastes, and in return, the bacterial symbiont provides the host with essential nutrients, contributing to the rapid growth and enhanced reproduction of the bean bug host.

研究分野：微生物生態学

キーワード：共生 細菌 昆虫 進化 遺伝的基盤

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

### 1. 研究開始当初の背景

多くの植食性昆虫はその体内に共生微生物を持ち、緊密な相互作用を行っている。これら共生微生物は、食物の分解や栄養補償を行うなど、宿主の栄養代謝において極めて重要な役割を担っている。例えば木材食性の害虫として知られるシロアリは、それ自身が木質を消化できるわけではなく、腸内に共生した微生物が木質分解機能を担っている。このことは、“ある餌を利用できる”という昆虫の基本的性質は、昆虫自身ではなくその共生微生物が決定しているといえる。ほとんどの農業害虫がその体内に共生微生物を持つことを考えると、これら微生物を制御することで食害の低減や害虫の成長・繁殖抑制を図りうると考えられる。しかし、これまでも共生微生物をターゲットとした害虫防除技術の開発が試みられてはいるが成功には至っていない。その大きな理由は、ほとんどの共生微生物が昆虫体内に高度に適応しているために培養困難であり、遺伝子組換え等の逆遺伝学的実験ツールを適用することができず、これにより内部共生系における宿主-細菌間相互作用の分子基盤がほとんど解明されていない点にある。我々は昆虫にみられる宿主-細菌間相互作用の分子機構の総合的理解を目指し、昆虫では例外的に共生細菌の培養と遺伝子組み換えが可能なホソヘリカメムシ-*Burkholderia* 共生系を新規モデル系として提唱し、共生の遺伝的基盤・分子基盤を網羅的に解明するべく研究を行ってきた。

### 2. 研究の目的

本研究では *Burkholderia* 共生細菌を対象に、培養時 (in vitro) と共生時 (in vivo) の細菌について生理状態やストレス耐性、発現遺伝子などを比較し、宿主カメムシ体内への感染・定着により共生細菌にどのような変化が生じるのか、そのメカニズムも含め網羅的に解明することを目的とする。本研究の全体構想は以下ようになる： 培養時と共生時における共生細菌の細胞学的比較、生理学的比較、発現遺伝子比較を行い、共生時に特異的に発現する遺伝子を同定し、その意義を明らかにする； 共生時に特異的に発現亢進する遺伝子の欠損株を作成し機能解析を行う； 得られた知見を統合し、内部共生の遺伝的基盤を網羅的に解明する。特にゲノムが解読されている *Burkholderia* 共生細菌株にターゲットを絞り、共生時に発現亢進する“共生関連遺伝子”の取得を目指し研究を行った。

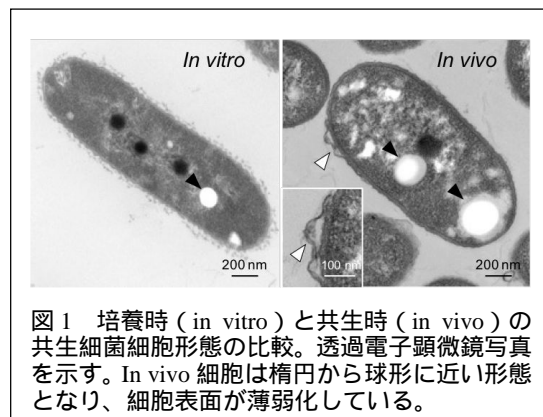


図1 培養時 (in vitro) と共生時 (in vivo) の共生細菌細胞形態の比較。透過電子顕微鏡写真を示す。In vivo 細胞は楕円から球形に近い形態となり、細胞表面が薄弱化している。

### 3. 研究の方法

In vitro の共生細菌細胞としては栄養培地および最小培地で培養したものを用いた。In vivo の共生細菌細胞としては、3 齢または 5 齢若虫から腸内共生器官を摘出し PBS 内で破碎し、遠心処理により宿主細胞を除去したものを用いた。これら in vitro 細胞と in vivo 細胞について細胞形態、膜透過性、細胞内顆粒蓄積量、ストレス耐性、遺伝子発現プロファイルの調査を行なった。ストレス耐性については界面活性剤、抗菌タンパク質、消化酵素、70%エタノール、過酸化水素、浸透圧などの各種条件について調査した。In vitro 細胞の遺伝子発現プロファイルについては培養開始 3 時間 (lag phase)、8 時間 (log phase)、16 時間 (stationary phase) の共生細菌細胞について調査を行い、in vivo 細胞の遺伝子発現と比較を行なった。In vivo 条件で特異的に発現減少または発現亢進している遺伝子を抽出し、in vivo 細胞がどのような代謝系となっているのか調査した。In vivo 細胞において特異的に発現亢進が見られた遺伝子や代謝系については相同組み換え法により遺伝子欠損株を作成し、カメムシ腸内への定着の有無を調査した。

### 4. 研究成果

透過電子顕微鏡を用いた観察により、in vivo 細菌細胞は菌体サイズが減少し細胞表面が薄弱

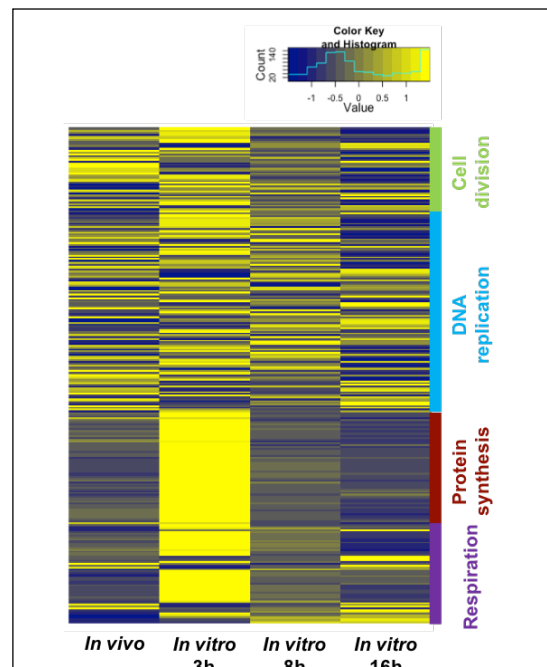


図2 In vivo 細胞と in vitro 細胞の遺伝子発現プロファイルの比較。細胞分裂、DNA 合成、タンパク質合成、呼吸関連の遺伝子について抽出した結果を示す。In vivo 細胞は in vitro 細胞(8h, log phase) に近い発現動態を示すが、いずれの in vitro 条件とも異なる独自の遺伝子発現プロファイルを示す。

化することが明らかとなった(図1)。細胞透過性に違いは見られなかったものの、in vitro 細胞に比べ in vivo 細胞は各種ストレスに対して有意に高い感受性を示し、何らかの要因により in vivo 細胞の細胞表面構造が修飾され薄弱化している可能性が強く示唆された。発現遺伝子の比較解析から、in vivo 細胞では運動性や6型分泌装置に関連する遺伝子発現が大きく減少している一方、窒素代謝や硫黄代謝に関わる遺伝子が大きく発現亢進していることが明らかとなった(図2、3)。さらなる詳細な解析により、窒素代謝系についてはカメムシ類の主要な窒素老廃物であるアラントイン酸をアミノ酸に変換する経路が in vivo 細胞において特異的に亢進しており、硫黄代謝系についてもタウリン分解経路が活性化していることが明らかとなった(図3)。同時に in vivo 細胞において必須アミノ酸やビタミンB類の生合成経路が活性化していたことから、カメムシ体内における *Burkholderia* 共生細菌の主な機能は「宿主老廃物の再利用(リサイクル)と栄養素の供給」であると結論づけた。このようなリサイクル機能は、ホソヘリカメムシの短い成長期間と高い産卵数に大きく寄与しているものと考えられる。

In vivo において発現亢進が見られた遺伝子の中から、特にアラントイン酸分解経路やタウリン代謝経路に関与する主要遺伝子をターゲットとして遺伝子欠損株の作成を行ないカメムシへの感染実験を行なった。しかし、これら遺伝子変異株は野生株と変わらずカメムシに感染し、定着量もほとんど変化はなかった。共生不全株の取得およびその機能解析のためには、さらなる調査や全く異なる実験アプローチが必要であると考えられる。

以上の成果についてはすでに国内外の学会において発表を行うと共に、成果の一部はすでに論文として発表を行った。

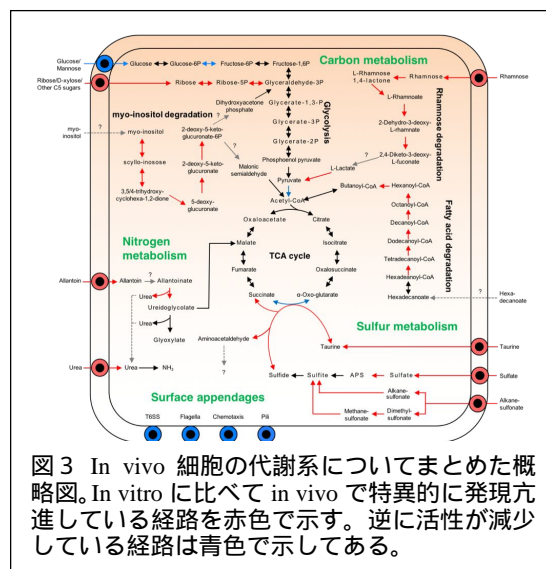


図3 In vivo 細胞の代謝系についてまとめた概略図。In vitro に比べて in vivo で特異的に発現亢進している経路を赤色で示す。逆に活性が減少している経路は青色で示してある。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 16 件)

Kikuchi Y, Tada A, Musolin DL, Hari N, Hosokawa T, Fujisaki K, Fukatsu T. 2016. Collapse of insect gut symbiosis under simulated climate change. *mBio* 7:e01578-01516.

Kuechler SM, Matsuura Y, Dettner K, Kikuchi Y. 2016. Phylogenetically diverse *Burkholderia* associated with midgut crypts of spurge bugs, *Dicranocephalus* spp. (Heteroptera: Stenocephalidae). *Microbes and Environments* 31:145-153.

Itoh H, Matsuura Y, Hosokawa T, Fukatsu T, Kikuchi Y. 2017. Obligate gut symbiotic association in the sloe bug *Dolycoris baccarum* (Hemiptera: Pentatomidae). *Applied Entomology and Zoology* 52:51-59.

Mergaert P, Kikuchi Y, Shigenobu S, Nowack EC. 2017. Metabolic integration of bacterial endosymbionts through antimicrobial peptides. *Trends in Microbiology* 25:703-712.

Takeshita K, Kikuchi Y. 2017. *Riptortus pedestris* and *Burkholderia* symbiont: an ideal model system for insect-microbe symbiotic associations. *Research in Microbiology* 168:175-187.

Itoh H, Hori T, Sato Y, Nagayama A, Tago K, Hayatsu M, Kikuchi Y. 2018. Infection dynamics of insecticide-degrading symbionts from soil to insects in response to insecticide spraying. *The ISME Journal* 12:909-920.

Itoh H, Tago K, Hayatsu M, Kikuchi Y. 2018. Detoxifying symbiosis: microbe-mediated detoxification of phytotoxins and pesticides in insects. *Natural Product Reports* 35:434-454.

Kinosita Y, Kikuchi Y, Mikami N, Nakane D, Nishizaka T. 2018. Unforeseen swimming and gliding mode of an insect gut symbiont, *Burkholderia* sp. RPE64, with wrapping of the flagella around its cell body. *The ISME Journal* 12:838-848.

Takeshita K, Tamaki H, Ohbayashi T, Meng X-Y, Sone T, Mitani Y, Peeters C, Kikuchi Y, Vandamme P. 2018. *Burkholderia insecticola* sp. nov., a gut symbiotic bacterium of the bean bug *Riptortus pedestris*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 68:2370-2374.

Ohbayashi T, Futahashi R, Terashima M, Barrière Q, Lamouche F, Takeshita K, Meng X-Y, Mitani Y, Sone T, Shigenobu S, Fukatsu T, Mergaert P, Kikuchi Y. 2019. Comparative cytology, physiology and transcriptomics of *Burkholderia insecticola* in symbiosis with the bean bug *Riptortus pedestris* and in culture. *The ISME Journal* DOI: 10.1038/s41396-019-0361-8.

[学会発表](計 13 件)

Kikuchi Y. Mutualistic endosymbiosis in insects: its diversity and molecular basis. 89th Annual Meeting of Japanese Society for Bacteriology, Osaka International House (Japan), 24 Mar **2016**.  
Kikuchi Y. Evolutionary innovation through symbiotic association with microorganisms. Joint meeting of the Entomological Society of Japan and the Japanese Society of Applied Entomology and Zoology, Osaka Prefecture University (Japan), 27 Mar **2016**.  
Kikuchi Y. Insecticide resistance by endosymbiotic bacteria. ASM Microbe2016, Boston Convention Center (USA), 17 Jun **2016**.  
Kikuchi Y. *Riptortus pedestris* and its symbiont, *Burkholderia*: an ideal model system for studying symbiosis. KSAE2017, Gyeongju (Korea), 28 Apr **2017**.  
Kikuchi Y. Symbiotic association between stink bugs and *Burkholderia*: ecology and evolution. Symposium on the Biology and Chemistry of Bacteria-Plant Interactions, University of Zürich (Switzerland), 12 May **2017**.  
Kikuchi Y. Stink bugs and their culturable symbionts, *Burkholderia* spp.: their diversity and evolution. Entomological Seminar in the University of Arizona, University of Arizona (USA), 16 Nov **2018**.

〔図書〕(計 1 件)

Kikuchi Y, Prado SS, Jenkins TM. **2018**. Symbiotic microorganisms associated with Pentatomoidea, p 643-674, “*Invasive Stink Bugs and Related Species (Pentatomoidea): Biology, Higher Systematics, Semiochemistry, and Management*”. CRC press [ISBN 978-1-4987-1508-9]

〔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

<https://staff.aist.go.jp/y-kikuchi/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

菊池 義智 (KIKUCHI YOSHITOMO)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号：30571864

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。