

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14586

研究課題名(和文)コバネヒョウタンナガカメムシにおける細胞内共生成立機構に関する研究

研究課題名(英文)Elucidation of evolutionary and molecular bases underpinning intracellular host-symbiont interactions in the seed bug Togo hemipterus

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：多くの昆虫は細胞内共生細菌を保持しており、母子間伝播によって共生細菌を受け継いでいる。昆虫の細胞内共生系については生理学的、ゲノム科学的研究が行われてきたが、その進化的起源については未だ不明である。最近我々は、共生細菌を毎世代環境土壌中から獲得するコバネヒョウタンナガカメムシが、その共生細菌を消化管の上皮細胞内に保持していることを発見した。本研究では、この環境獲得型細胞内共生系を対象に、共生成立過程の観察、遺伝的基盤の解明、進化過程の解明に取り組み、感染過程や進化過程の解明について一定の成果を得ることができ、このユニークな共生系に関する基盤的知見の蓄積と解析技術の確立を達成することができた。

研究成果の概要(英文)：A number of insects possess intracellular symbiotic bacteria in specialized cells called "bacteriocytes", wherein symbiotic bacteria are vertically transmitted. Although genomic and physiological aspects of the intracellular symbiosis have been studied, the evolutionary origin of it remains unclear. Molecular and histological investigations have strongly suggested that gut symbiosis is the origin of the intracellular symbiosis; however, the evolutionary hypothesis have never validated because of a lack of an intermediate state between gut symbiosis and highly-developed intracellular symbiosis. Recently we found that the seed bug, Togo hemipterus, which acquires its Burkholderia symbiont from environmental soil every generation, intracellularly harbors the symbiont. In this study, we have demonstrated the infection process of the symbiont, genetic bases of the symbiosis, and evolutionary diversity of the symbiotic system in heteropteran insects.

研究分野：進化生物学

キーワード：細胞内共生 進化 生物間相互作用 微生物 昆虫

1. 研究開始当初の背景

シロアリなど一部の昆虫は腸内(細胞外)に共生細菌を持つが、多くの昆虫は「菌細胞」と呼ばれる特殊な巨大細胞の細胞質中に共生細菌を保持している。このような細胞内共生は、カメムシ目、シラミ目、コウチュウ目、ハエ目、ハチ目など多様な分類群で進化してきた。細胞内共生細菌の多くは宿主の栄養代謝において必須の役割を果たしており、経卵伝播などの方法で母から子へ連鎖と受け継がれている。これら昆虫の細胞内共生細菌を対象に、これまでに生態学的、形態学的、進化的研究が数多くなされてきたが、一方で昆虫にみられる細胞内共生の起源についてはほとんど分かっていないのが現状である。昆虫において細胞内共生の起源がよく分かっていない大きな理由は、現存の多くの昆虫において細胞内共生がすでに確立しており、進化の初期段階や中間段階にある共生系がまったくみられないことに起因している。しかし、菌細胞の多くが消化管近傍に発達すること、また細胞内共生細菌の多くが系統的に「プロテオバクテリア綱の腸内細菌科」に属することから、昆虫の細胞内共生の起源は腸内共生にあると考えられている。

2. 研究の目的

ヘリカメムシ上科とナガカメムシ上科の植食性種は消化管に「盲嚢」と呼ばれる袋状またはチューブ状の組織を発達させ、その内腔中に *Burkholderia* 属の共生細菌を保持している。多くの昆虫が共生細菌を母子間伝播によって次世代へ受け渡す一方、これらカメムシ類では母子間伝播が進化しておらず、代わりに毎世代環境中から共生細菌を獲得することが知られている。ホソヘリカメムシに関する申請者の研究により、カメムシ類の *Burkholderia* 共生細菌は単離培養可能で遺伝子組換えも容易であることが明らかとなった。最近申請者は、カメムシ類にみられる環境獲得型相利共生系について研究を進める過程で、稲の害虫として知られるコバネヒョウタンナガカメムシが、盲嚢上皮の細胞内に共生細菌を保持することを発見した(図1)。コバネヒョウタンナガカメムシの「環境獲得型細胞内共生系」は未だ発見の段階にあり、その感染過程の詳細な観察や細胞内共生の分子メカニズムの解明は、昆虫内部共生系における最大の謎である「細胞内共生の進化的起源および進化過程」の解明に繋がると期待できる。

本研究では、コバネヒョウタンナガカメムシにおける環境獲得型細胞内共生系の実態を解明し、その遺伝的基盤に向けた基盤的技術の開発と基礎的知見の集積を行う。

3. 研究の方法

コバネヒョウタンナガカメムシから単離

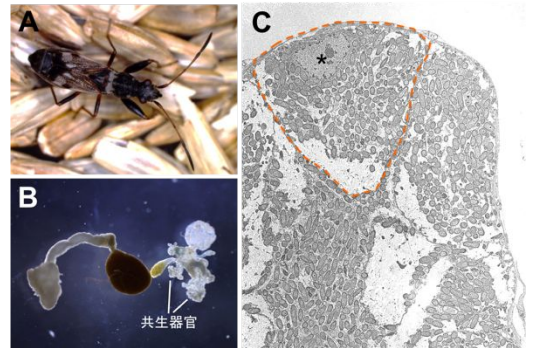


図1 (A)コバネヒョウタンナガカメムシ。(B)コバネヒョウタンナガカメムシの消化管と共生器官(盲嚢)。(C)盲嚢切片の電子顕微鏡写真。宿主の細胞を点線で囲む。*は宿主核。

された細胞内共生細菌 (*Burkholderia*) についてその感染過程を共焦点レーザー顕微鏡観察により調査し、いつどのように細胞内に感染するのかを解析した。また、共生細菌において感染に関わると予測されるいくつかの候補遺伝子について遺伝子欠損株を作成し、共生の遺伝的基盤について解析を行った。加えて、コバネヒョウタンナガカメムシ以外のナガカメムシ類についても細胞内局在の有無を調査し、カメムシ類における環境獲得型細胞内共生の進化について解析を行った。

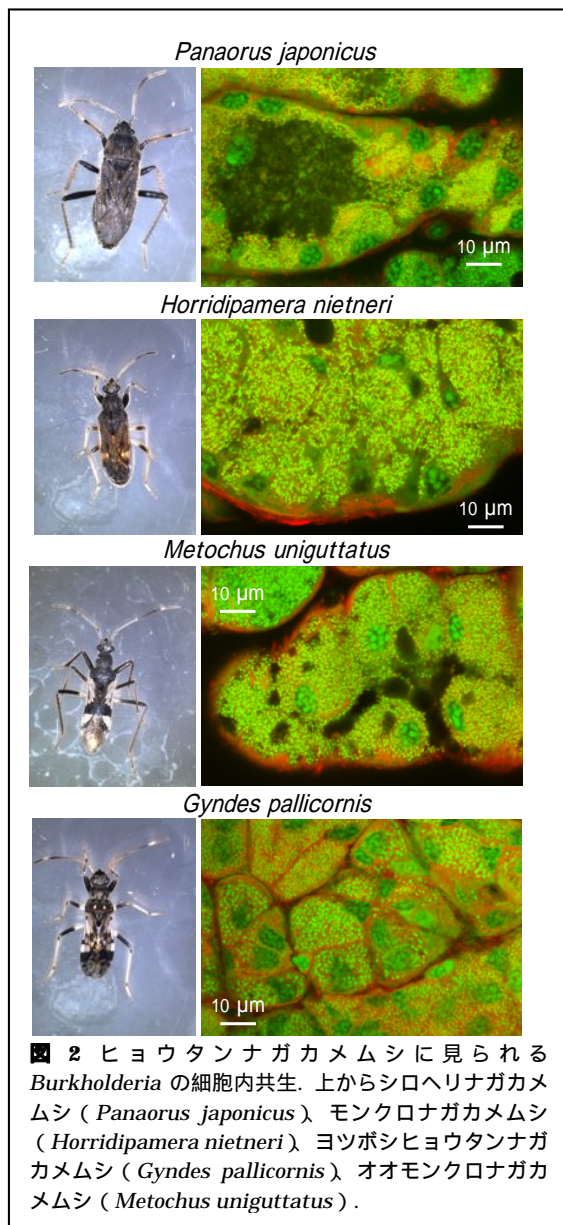
4. 研究成果

(1)【共生細菌の局在と感染過程】培養した共生細菌を用いて感染実験を行い、1齢-4齢にかけて感染動態を共焦点レーザー顕微鏡により観察を行なった。その結果、1齢または2齢において共生器官への感染が起き、3齢期間において腸管上皮細胞内への *Burkholderia* 共生細菌の侵入が起きることが明らかとなった。

(2)【遺伝子解析】*Burkholderia* 共生細菌について、細胞内共生に関わると考えられる遺伝子の欠損株を作成して感染実験を行なった。細胞内に感染する病原細菌を中心に細胞内感染因子が特定されている。その多くは細菌が持つ分泌装置であり、3型分泌装置や6型分泌装置が宿主細胞内にエフェクタータンパク質を注入するのに利用されており、注入されたエフェクタータンパク質が細胞骨格の改変を引き起こし、細胞内への細菌のエンドサイトーシスを誘導する。*Burkholderia* 共生細菌は6型分泌装置を持っていたことから、その遺伝子欠損株を作成してカメムシへの感染実験を行なった。その結果、共生器官への正常な感染がみられ、6型分泌装置は細胞内共生の発達に関与していない可能性が示唆された。しかし、さらなるゲノム解析の結果、*Burkholderia* 共生細菌が複数の6型分泌装置オペロンを持つことが判明し、その細胞内共生への関与は依然不明のまま

まと言える。本研究によって共生細菌の遺伝子改変技術の確立を行うことはできたが、細胞内共生の遺伝的基盤の解明にはさらなる研究が必要と言えるだろう。
 (3)【カメムシ類における環境獲得型細胞内共生の進化】カメムシ類における環境獲得型細胞内共生の進化過程を明らかにするため、ナガカメムシ上科の様々な種について細胞内局在の有無を観察した。その結果、*Burkholderia* による細胞内共生はコバネヒョウタンナガカメムシも含まれるヒョウタンナガカメムシ科でのみ観察され(図2) これら特殊な共生系がヒョウタンナガカメムシ科の共通祖先で特異的に進化して来た可能性が強く示唆された。

以上のように、細胞内共生の遺伝的基盤についてはさらなる研究が必要であるが、コバネヒョウタンナガカメムシにおける共生の基盤的知見や、その進化過程



に関する研究は大きな進展が見られたと言える。本萌芽研究による成果を元に、コバネヒョウタンナガカメムシの環境獲得型細胞内共生系が、新たな共生モデル系として今後大いに発展するものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

Takeshita K, Kikuchi Y. Riptortus pedestris and Burkholderia symbiont: an ideal model system for insect-microbe symbiotic associations. Research in Microbiology. 査読有, 168: 175-187 (2016). DOI: 10.1016/j.resmic.2016.11.005

Kikuchi Y, Tada A, Musolin DL, Hari N, Hosokawa T, Fujisaki K, Fukatsu T. Collapse of insect gut symbiosis under simulated climate change. mBio. 査読有, 7: e01578-16 (2016). DOI: 10.1128/mBio.01578-16

Itoh H, Matsuura Y, Hosokawa T, Fukatsu T, Kikuchi Y. Obligate gut symbiotic association in the sloe bug Dolycoris baccarum (Hemiptera: Pentatomidae). Applied Entomology and Zoology. 査読有, 52: 51-59 (2016). DOI: 10.1007/s13355-016-0453-0

Kuechler SM, Matsuura Y, Dettner K, Kikuchi Y. Phylogenetically diverse *Burkholderia* associated with midgut crypts of spurge bugs, *Dicranocephalus* spp. (Heteroptera: Stenocephalidae). Microbes and Environments. 査読有, 31: 145-153 (2016). DOI: 10.1264/jsme2.ME16042

Ohbayashi T, Takeshita K, Kitagawa W, Nikoh N, Koga R, Meng XY, Tago K, Hori T, Hayatsu M, Asano K, Kamagata Y, Lee BL, Fukatsu T, Kikuchi Y. Insect's intestinal organ for symbiont sorting. PNAS 査読有, 112: E5179-E5188 (2015). DOI: 10.1073/pnas.1511454112

Matsuura Y, Kikuchi Y, Miura T, Fukatsu T. *Ultrabithorax* is essential for bacteriocyte development. PNAS 査読有, 112: 9376-9381 (2015). DOI: 10.1073/pnas.1503371112

Tago K, Kikuchi Y, Nakaoka S, Katsuyama C, Hayatsu M. Insecticide applications to soil contribute to the development of *Burkholderia* mediating insecticide resistance in stinkbugs. Molecular Ecology. 査読有, 24: 3766-3778 (2015). DOI: 10.1111/mec.13265

〔学会発表〕(計10件)

竹下和貴、松浦優、孟憲英、三谷恭雄、新里尚也、菊池義智、ヒョウタンナガカメ

ムシ類で見つかった環境獲得型細胞内共生、第 61 回日本応用動物昆虫学会大会、2017 年 3 月 27 日、東京農工大学（東京都小金井市）

菊池義智、昆虫の内部共生微生物：共生の進化、生態、そして分子基盤、畜産生命科学部共同セミナー、招待講演、2017 年 3 月 1 日、帯広畜産大学（北海道帯広市）

竹下和貴、松浦優、菊池義智、コバネヒョウタンナガカメムシにおける環境獲得型の細胞内共生の発見、日本応用動物昆虫学会・日本昆虫学会 2016 年度北海道支部会、2017 年 1 月 18 日、北海道大学博物館（北海道札幌市）

竹下和貴、松浦優、孟憲英、三谷恭雄、菊池義智、環境から獲得される細胞内共生細菌：ナガカメムシ類で見つかった腸内共生から細胞内共生へのミッシングリンク、日本微生物生態学会第 31 回大会、2016 年 10 月 24 日、横須賀市文化会館（神奈川県横須賀市）

菊池義智、カメムシ類の腸内共生細菌に関する研究～垂直伝播を伴わない昆虫内部共生系の発見、そしてその発展～、日本微生物生態学会第 31 回大会、2016 年 10 月 24 日、横須賀市文化会館（神奈川県横須賀市）

大林翼、菊池義智、カメムシと *Burkholderia* 細菌を結ぶ共生戦略とは？、日本進化学会第 18 回東京大会、2016 年 8 月 26 日、東京工業大学（東京都目黒区大岡山）

菊池義智、Gut Symbiotic Bacteria in Stink Bugs Confer Pesticide Resistance、ASM Microbe 2016、招待講演（国際学会）、2016 年 6 月 17 日、Boston Convention and Exhibition Center（アメリカ合衆国、マサチューセッツ州ボストン）

菊池義智、Evolutionary innovation through symbiotic association with microorganisms、日本昆虫学会・日本応用動物昆虫学会合同大会、招待講演、2016 年 3 月 27 日、大阪府立大学（大阪府堺市）

菊池義智、Mutualistic endosymbiosis in insects: its diversity and molecular basis、第 89 回日本細菌学会、招待講演、2016 年 3 月 24 日、大阪国際交流センター（大阪府大阪市）

菊池義智、共生微生物による昆虫の農薬抵抗性進化、菌根研究会 2015 年大会、招待講演、2015 年 10 月 31 日、とかちプラザ（北海道帯広市）

〔図書〕（計 0 件）

なし

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

なし

取得状況（計 0 件）

なし

〔その他〕

なし

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