

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21613

研究課題名(和文) チャバネアオカメムシと共生細菌における局所的共進化

研究課題名(英文) co-evolution of brown-winged stinkbug and the symbiotic bacteria

研究代表者

西出 雄大(Nishide, Yudai)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・研究員

研究者番号：50558096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：チャバネアオカメムシにおいて、本州と沖縄では異なる共生細菌を持ち、これらの共生細菌は入れ替えることが不可能であるという共進化が起こっていることがわかってきた。そこで、これらの現象がどのような原因で起こっているのかを調査したところ、共生部位の免疫が関与していることが疑われた。そこで、チャバネアオカメムシの液性免疫の一端を明らかにし、それがどのように共生に関与しているかを調査した。液性免疫の共生への関与は未だ研究を進める必要があるが、カメムシの免疫で興味深い結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：We had shown that brown-winged green stinkbug *P. stali* has mutualistic bacteria and the symbionts in Okinawa islands were different strains from the mainland of Japan. When I transposed the symbionts in Okinawa into stinkbug in mainland, the stinkbug was died. I researched the reason why the stinkbug was died. One of the reason why the stinkbug was died would be humoral immunity because the symbiont is absent in the symbiotic organ. Therefore, I focused on the humoral immunity of the stinkbug. Further reserch would be needed for relationship between immunity and symbiont but I found interesting phenomenon in humoral immunity in the stinkbug.

研究分野：昆虫学

キーワード：共生 進化 地理的変異

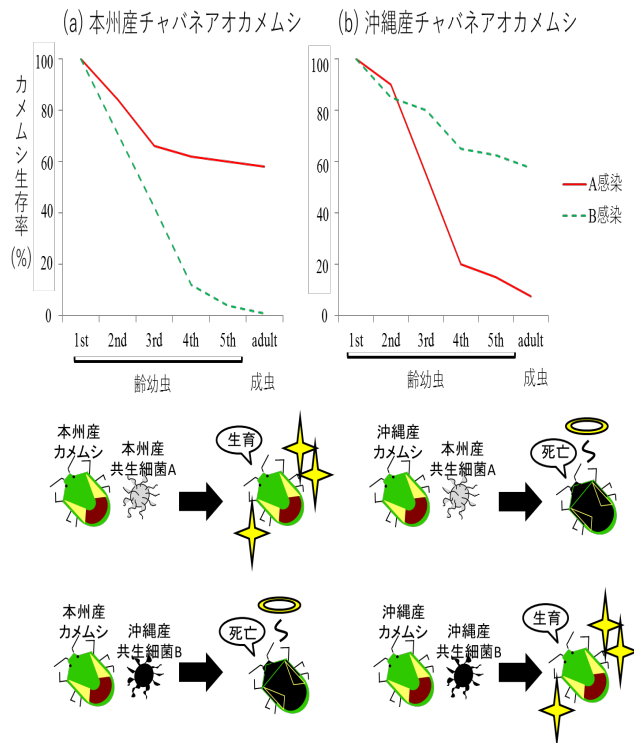
1. 研究開始当初の背景

多くの昆虫、特に植物を吸汁するカメムシ目昆虫では多くの種で共生微生物があり、餌資源からでは足りない栄養を供給することなどにより宿主昆虫の生育を助けているとされる。本研究で用いるチャバネアオカメムシも中腸末端部(M4)が共生部位となっており、そこに共生細菌が存在している。エンドウヒゲナガアブラムシなどほとんどのカメムシ目昆虫は1種の必須共生微生物と共生関係を結んでいるが、チャバネアオカメムシは6種類の共生細菌が見つかっており、そのそれぞれが必須共生細菌として働くことが知られる (Hosokawa et al., 2016, Nature Microbiology)。本州では1種の共生細菌(共生細菌 A と呼ぶ)を持つチャバネアオカメムシのみが見つかるが、沖縄では本州とは異なる5種の共生細菌(共生細菌 B,C,D,E,F)が見られる。ただし、沖縄では約8割の個体が共生細菌 B であり、他の共生細菌 C,D,E,F を持つ個体は多くない。

多くの場合、宿主と共生細菌は共進化しており、互いの存在なくしては生存できないことが知られる。これまでの研究からチャバネアオカメムシの無菌幼虫は成虫にならずに死んでしまうことから、チャバネアオカメムシでも共生細菌が生育に必須であることされている (Abe et al., 1995, Applied Entomology and Zoology)。一方で、本州産共生細菌 A と沖縄産共生細菌 B も培養が不可能であることから、生育にカメムシが必須であることが伺える。このように互いの存在が生存に必要なことは、共生の歴史が長く、それぞれが生存に必要な代謝の一部をそれぞれに任せていることが予想できる。つまり、このような状況から、本州と沖縄でそれぞれのチャバネアオカメムシと共生細菌がそれぞれ共進化していることが予想される。これら2地域で同時に進んでいる共進化で、異なる進化が起こっていれば共生細菌を入れ替えた場合に適応度の低下が見られることが予想される。

本州産カメムシと沖縄産カメムシの共生細菌の入れ替え実験を行った。この結果を図1で示す。本州産の無菌幼虫に、A 細菌、B 細菌をそれぞれ与えた場合、本州産チャバネアオカメムシは、本州産共生細菌 A を与えられた場合は約6割が成虫に生育する一方、沖縄産共生細菌 B を与えられた場合は、ほとんどすべての個体が死亡した。沖縄産のチャバネアオカメムシを用いた場合は逆の結果となり、本州産共生細菌 A を与えた場合は生存率が著しく低い一方、沖縄産共生細菌 B を与えた場合は約6割が生育した。

図1 共生細菌の入れ替え実験



本州産、沖縄産いずれの系統でも本来の共生細菌を獲得した場合は約6割が成虫まで生育する一方、共生細菌を入れ替えると生存率は著しく下がった。

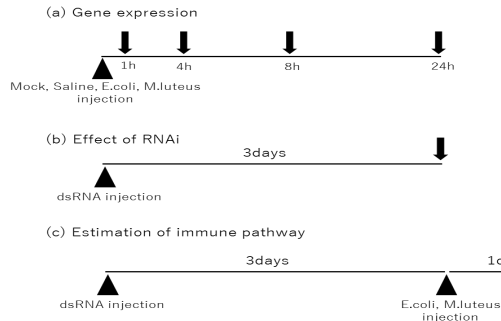
2. 研究の目的

上記の入れ替えによるカメムシの死亡は、本州と沖縄のそれぞれの個体群でカメムシと共生細菌が異なる共進化を起していることを示唆している。1種内で異なる共進化が起こっていることはこれまでに報告が無い新たな現象であり、共生細菌が関与する種分化の始まりの可能性がある。そこで、共進化の証拠を確たるものとするとともに、その至近要因と進化的要因を探ることで共生の成立・維持機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

共生細菌の定量は特異的プライマーを用いて、定量PCRを行った。また、共生部位、共生部位への入り口となる部位のRNA-seqを行い、候補遺伝子を探索した。液性免疫に関する研究では、脂肪体、大腸菌 *Escherichia coli* を注射した個体の脂肪体 (24h 後)、*Micrococcus luteus* を注射した個体の脂肪体 (24h 後) を用いて、免疫関連遺伝子を網羅的に調べた。その後、様々な処理を行った個体の脂肪体で液性免疫関連遺伝子を定量PCRで定量した。また免疫関連遺伝子の RNAi などを用いて調べることで、チャバネアオカメムシにおける液性免疫機構を調べた (下記実験スケジュール参照)。

実験スケジュール



4. 研究成果

研究の結果、共生細菌を入れ替えた場合には、供試部位に細菌が入っておらず、これが原因で死亡していることが示唆された(図2)。

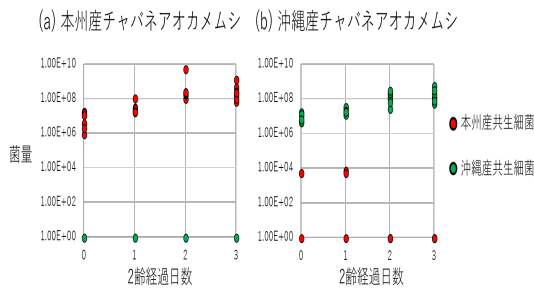
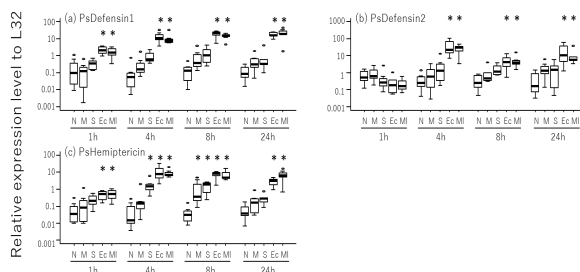


図2. 2齢での菌の量

このことから、共生部位への侵入に関わる因子が共進化の要因になっていることが考えられた。中でも液性免疫は関与の可能性が疑われ、さらに RNA-seq の結果からも液性免疫に関する因子が複数出てきたことから、チャバネアオカメムシの液性免疫に焦点を絞り研究を進めた。その結果、チャバネアオカメムシは概ね保存された Imd1 経路と Toll 経路を持つこと、そしてこれらの経路下に複数の抗菌ペプチドが存在し、大腸菌や *M. luteus* の注射により発現誘導されることが明らかとなった(図3)。

図3 抗菌ペプチドの発現



また、興味深いことに、ショウジョウバエなどとは異なる免疫機構の一端を解明した。こ

れらのことについて、カメムシ目昆虫のみでなく他の節足動物の情報を含めて、論文化を進めている。

チャバネアオカメムシにおける免疫機構と共生の関係については、これからさらに研究を進める必要があるが、共生部位や共生部位への侵入に関わる部位で高発現している免疫関連因子を複数見出している。今後はこれらの因子や免疫と共生細菌の関係を詳細に研究するとともに、免疫関連ではないが共生部位などで高発現している遺伝子の関を含めて、網羅的に調べていく。

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 1 件)

*Nishide Y., Onodera T. N., Tanahashi M., Moriyama M., Fukatsu T., Koga R. (2017) Aseptic rearing procedure for the stinkbug *Plautia stali* (Hemiptera: Pentatomidae) by sterilizing food-derived bacterial contaminants. *Applied Entomology and Zoology*, 52, 407-415.

〔学会発表〕(計 2 件)

西出雄大、田中博光、横井翔、二橋亮、深津武馬、チャバネアオカメムシにおける免疫関連遺伝子の機能解析、第 62 回日本応用動物昆虫学会大会、鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市)、3月・2018年

西出雄大・田中博光・横井翔・古賀隆一・深津武馬、チャバネアオカメムシと細菌の共生関係における Imd 経路の影響、第 61 回日本応用動物昆虫学会大会、東京農工大学(東京都府中市)、3月・2017年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

西出 雄大 (NISHIDE, Yudai)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用部門・研究員

研究者番号: 50558096

(4)研究協力者

深津 武馬 (FUKATSU, Takema)

古賀 隆一(KOGA, Ryuichi)
陰山 大輔(KAGEYAMA, Daisuke)
細川 貴弘(HOSOKAWA, Takahiro)